



HAL
open science

Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments

Manon Hiolle

► **To cite this version:**

Manon Hiolle. Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments. Alimentation et Nutrition. Agrocampus Ouest, 2019. Français. NNT : 2019NSARB328 . tel-02877614v2

HAL Id: tel-02877614

<https://hal.inrae.fr/tel-02877614v2>

Submitted on 9 Feb 2021

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

AGROCAMPUS OUEST
COMUE UNIVERSITÉ BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : Sciences des Aliments

Manon HIOLLE

Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 13/12/2019
Unité de recherche : UMR 1253 Science & Technologie du Lait & de l'Œuf
Thèse n° : 2019-23 / B-328

Composition du Jury :

Sylvie TURGEON Professeure, Université Laval, Québec, Canada
Catherine RENARD Directrice de recherche, INRA, Nantes, France
Patrick BOREL Directeur de recherche, INRA, Marseille, France
Françoise NAU Professeure, Agrocampus Ouest, Rennes, France
Didier DUPONT Directeur de recherche, INRA, Rennes, France

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse
Co-directeur de thèse

Remerciements

À l'issue de cette thèse, il est temps pour moi de remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce projet. Par leur envie de transmettre, leur bienveillance ou leur simple soutien, elles ont fait de ces trois années une expérience incroyable, scientifiquement, humainement, et sur tant d'autres plans. Je n'en changerais rien, ou si peu de choses.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse, Françoise Nau, pour son accompagnement exigeant, rigoureux et bienveillant tout au long de cette thèse, pour sa disponibilité, son dévouement et sa patience. Nos échanges ouverts et ses précieux conseils m'ont appris la rigueur scientifique et m'ont permis de mener à terme ce travail.

Je remercie également Didier Dupont, mon co-directeur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordé en me permettant de réaliser cette thèse, pour son optimisme, son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide et son expertise toujours bienvenue du monde de la digestion.

Un grand merci aux membres de mon comité de suivi de thèse pour leurs conseils scientifiques et leurs avis sur le déroulement de ce projet. Je remercie une nouvelle fois Sylvie Turgeon et Catherine Renard d'avoir accepté d'assumer la charge de rapporteur. Je tiens également à remercier Patrick Borel d'avoir bien voulu évaluer ce travail et participer à ce jury de thèse en tant qu'examineur.

Ce travail est le fruit de la collaboration entre de nombreuses équipes de recherche. Je tiens de ce fait à remercier sincèrement tous les membres du projet MicroNut pour leur implication tout au long de cette étude à laquelle j'ai eu la chance de participer, pour avoir toujours répondu présents lors de mes questionnements et pour avoir contribué, par leurs expertises diverses, à mener à terme ce projet. Merci aux volontaires qui ont accepté de participer à l'étude clinique.

Je remercie Yves Le Loir de m'avoir accueillie au STLO et de toujours promouvoir la convivialité et la bienveillance au sein du laboratoire.

Merci à tous les membres de l'équipe BN pour les échanges instructifs que nous avons eus et leur aide au cours de ce travail. Merci à Juliane Floury et Jordane Ossemond de m'avoir fait profiter de leurs compétences en microscopie ; et à Steven Le Feunteun pour nos discussions toujours pertinentes et ton point de vue un peu décalé du monde de la digestion, qui m'a encouragé à approfondir certains aspects de ma thèse. Je remercie également Olivia Ménard de m'avoir fait partager son expertise du digesteur. Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur constante, les journées de digestion sont toujours agréables à tes côtés.

Merci à toute l'équipe du bâtiment 23, pour votre accueil si chaleureux de l'autre côté de la passerelle, pour la convivialité qui règne aux pauses café et pour les discussions plus ou moins recherchées mais toujours passionnantes ! J'ai une pensée particulière pour Valérie Lechevalier, merci pour ton aide précieuse en statistiques ; Monique Bouriel pour ta spontanéité et ta bonne humeur qui varie en fonction de la météo, mes collègues de labo Margaux Boussemaere et Peggy Bouquet d'avoir supporté tour à tour mes sautes d'humeur et mes stations de radio vintage ; Marie-Françoise Cochet pour les déboires que nous avons partagé avec les boîtes à moustaches, mais surtout pour ta gentillesse et ta prévenance ; Nathalie Boulier-Monthéan, co-présidente de l'UB1, de m'avoir si bien formée aux diverses analyses et Frédérique Pédrone de nous avoir tant de fois éclairées sur les nombreux individus de la famille des lipides. Je tiens également à remercier Claire Prioul pour le partage de tes compétences au labo (mais pas seulement !) et ton écoute attentive. Merci d'avoir tenu pendant 3 ans le SAV des manips, ouvert presque 24h/24 mais toujours 7j/7 !

Je souhaiterais d'autre part remercier toutes les personnes qui contribuent au bon fonctionnement du laboratoire. Sans votre apport, discret mais vital, rien de tout ceci ne serait possible. Merci donc à Nathalie, Laurence et Danielle, à Maryvonne, à Sylvie, à Rachel, à Jessica, toujours disponible pour dénicher le matériel idéal pour nos manips ; à Michel pour ton accueil si chaleureux le matin ; et à Paulette pour ton écoute et le soutien inconditionnel que tu apportais à « tes jeunes ».

Je remercie également le personnel de la plateforme Lait du STLO pour l'aide qu'ils m'ont apporté dans le montage du dossier HACCP et pendant les journées de production. Merci également à Sandra Wiart-Letort pour son aide précieuse dans la préparation des échantillons pour la microscopie.

Un grand MERCI à tous les apprentis chercheurs que j'ai pu côtoyer au cours de ces trois années pour l'entraide permanente qui règne dans ce petit groupe. Merci particulièrement à Linda, pour tes conseils avisés, ton écoute et ton soutien durant toutes ces étapes de fin de thèse, que tu passais brillamment quelques jours seulement avant moi. Un grand merci également à Manon pour tous ces moments passés ensemble, nos discussions sans fin sur des sujets sans intérêt mais tellement essentiels, et ta force de caractère qui m'a si souvent redonné la motivation de continuer. Merci à Maëllis pour ta gentillesse, ton humour et les moments précieux passés en ta compagnie, en France ou ailleurs. Merci à Lucie de m'avoir guidé dans mon choix de faire une thèse bien avant mon arrivée au laboratoire et de m'avoir si bien vendu le STLO. Tu avais raison sur tous les points !

Et merci également à tous les autres, qui contribuent par leur seule présence à faire du laboratoire un lieu de travail si agréable, et démontrent au quotidien qu'il n'y a pas besoin d'être triste pour être sérieux : Jonathan, Elise, Alexia, Domitille, Thomas, Natayme, Florian, Floriane G., Stefano (merci d'avoir ensoleillé les couloirs du labo quelques mois par an !), Amira, Olivier, Fanny, François, Julien, Vincent, Emma, Brenda, Elham, Carlos (merci pour ton calme à toute épreuve et pour m'avoir si souvent rassuré sur l'issue de ma thèse !), Simon, Marie, Marine, Floriane D., Antoine, Louis, Ousmane, et tant d'autres encore.

Je remercie tous mes amis et les membres de ma famille pour le soutien qu'ils ont su m'apporter pendant ces années. Merci à mes copines du lycée, on se connaît depuis si longtemps déjà, et tous les moments passés ensemble engendrent des souvenirs mémorables ! Merci particulièrement à Aude-Claire pour ta profonde gentillesse, ta vivacité et ta joie de vivre constante ; et à Hélène pour ton soutien durant ces trois années et bien avant encore. Merci de m'avoir aidé tant de fois à relativiser.

Enfin, un merci tout particulier à mes parents pour avoir toujours cru en moi malgré les projets aventureux dont je leur faisais part, pour le soutien et la confiance qu'ils me témoignent sans relâche. Aucun obstacle n'est insurmontable quand ils sont à mes côtés. J'ai de la chance.

Two roads diverged in a yellow wood,
And sorry I could not travel both
And be one traveler, long I stood
And looked down one as far as I could
To where it bent in the undergrowth;

[...]

I shall be telling this with a sigh
Somewhere ages and ages hence:
Two roads diverged in a wood, and I—
I took the one less traveled by,
And that has made all the difference.

The Road Not Taken - Robert Frost (1916)

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières	9
Liste des abréviations	11
Liste des figures	12
Liste des tables	17
Introduction générale.....	19
Chapitre I. Synthèse bibliographique	25
I.1 La matrice alimentaire.....	26
I.2 La digestion chez l'Homme.....	31
I.3 Les micronutriments.....	54
Chapitre II. Développement d'une gamme d'aliments enrichis en micronutriments	95
II.1 Introduction.....	96
II.2 Matériel et méthodes.....	96
II.3 Résultats et discussion	100
II.4 Conclusion	111
Chapitre III. Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments.....	113
III.1 Introduction.....	114
III.2 Déroulement de l'étude clinique.....	116
III.3 Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments lipophiles	118
III.4 Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité de la vitamine B9.....	137
III.5 Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité de la vitamine B12... 155	
III.6 Conclusion	161
Chapitre IV. Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion <i>in vitro</i>	163
IV.1 Introduction.....	164

IV.2	Étude en modèle de digestion <i>in vitro</i> statique.....	166
IV.3	Étude combinant un simulateur de mastication et un modèle de digestion <i>in vitro</i> dynamique paramétrés à partir de données recueillies chez l’homme	195
IV.4	Suivi de la désintégration des matrices au cours des digestions <i>in vitro</i> en modèle dynamique par microscopie confocale	220
IV.5	Conclusion.....	225
Chapitre V.	Discussion générale et perspectives	227
V.1	La structure des aliments influence effectivement le processus de digestion et la biodisponibilité des nutriments	228
V.2	Quelques pistes d’amélioration des modèles de digestion <i>in vitro</i>	231
V.3	Des divergences marquées entre les différents modèles d’étude	237
V.4	Encore trop peu d’études <i>in vivo</i> disponibles pour valider la pertinence des modèles <i>in vitro</i>	241
V.5	Vers une plus grande pertinence globale des modèles de digestion	245
	Liste des références bibliographiques	249
	Annexes.....	311
	Valorisations scientifiques	313
	Publications.....	313
	Communications orales et posters	314

Liste des abréviations

AAN : Amino-Nitrogen	MFA : Multiple Factor Analysis
AGL : Acide Gras Libre	NTD : Neural Tube Defects
ANOVA : ANalysis Of VAriance	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
AUC : Area Under the Curve	OPA : o-Phthaldialdehyde
B : Biscuit	PABA : Acide Para-Amino-Benzoïque
BCRP : Breast Cancer Resistance Protein	PCA : Principal Component Analysis
C : Custard	PCAUC : Proportional Cumulative Area Under the Curve
CCM : Chromatographie Couche Mince	PCFT : Proton-Coupled Folate Transporter
CHOL : Cholesterol	PL : Phospholipides
DAG : Diglycérides	PMS : Plan De Maîtrise Sanitaire
DHF : 7,8-Dihydrofolate	PRP : Protéines salivaires Riches en Proline
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à L'âge	RFC : Reduce Folate Carrier
FAME : Fatty Acid Methyl Esters	ROS : Reactive Oxygen Species
FBP : Folate Binding Protein	SC : Sponge Cake
FFA : Free Fatty Acids	SEC : Size Exclusion Chromatography
FI : Facteur Intrinsèque	SGF : Simulated Gastric Fluid
HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point	SIF : Simulated Intestinal Fluid
HCA : Hierarchical Clustering Analysis	SR-BI : Scavenger-Receptor class B type I
HDL : High-Density Lipoprotein	TAG : Triglycérides
HTC : Holotranscobalamine	TFA : Acide Trifluoroacétique
iNOS : forme inductible de l'oxyde nitrique synthase	THF : 5,6,7,8-Tetrahydrofolate
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique	UVB : rayons Ultraviolets B
LDL : Low-Density Lipoprotein	VDBP : Vitamin D-Binding Protein
MAG : Monoglycérides	VDR : Récepteur De Vitamine D

Liste des figures

Figure 1 : Structure du projet MicroNut	23
Figure 2 : Échelle de taille des structures de la matrice alimentaire et techniques pour leur caractérisation (Aguilera, 2006).....	30
Figure 3 : Organes principaux et annexes du système digestif humain (d'après Rogers, 2011) ...	31
Figure 4 : Anatomie de l'estomac humain (d'après Bornhorst & Singh, 2014)	33
Figure 5 : Phénomènes physiques découlant de la configuration anatomique de l'estomac. (A) Séparation du bol alimentaire en strates, consécutive aux phénomènes de sédimentation et de crémage. (B) Différenciation de la vidange gastrique en fonction de la densité du chyme (Schulze, 2006).....	35
Figure 6 : Structure de l'épithélium intestinal (Marieb, Hoehn, Moussakova, & Lachaîne, 2015)	36
Figure 7 : Localisation et mécanismes de l'absorption intestinale. (A) Sites d'absorption des nutriments. (B) Mécanismes de transports membranaires des nutriments. (d'après Gropper & Smith, 2012; Thévenot, 2014).....	38
Figure 8 : Fractions bioaccessible et biodisponible des composants ingérés (Guerra et al., 2012).	40
Figure 9 : Comparaison de l'anatomie digestive de différents vertébrés (Furness, Cottrell, & Bravo, 2015).	47
Figure 10 : Les carences en micronutriments ont des conséquences tout au long de la vie d'un individu et se perpétuent au fil des générations (d'après Bailey, West, & Black, 2015).....	56
Figure 11 : Étapes de développement d'une carence nutritionnelle en micronutriment (Shenkin, 2008)	57
Figure 12 : Structures des vitamines D ₂ et D ₃ (Makin & Gower, 2010)	59
Figure 13 : Voie endogène de production du cholécalférol (Gropper & Smith, 2012)	60
Figure 14 : Métabolisme de la vitamine D (Keane, Elangovan, Stokes, & Gunton, 2018).....	62
Figure 15 : Effet du statut vitaminique en 25(OH)D sur la santé osseuse (Rosen et al., 2012).....	64
Figure 16 : Structure chimique de la lutéine (Abdel-Aal et al., 2013).....	66
Figure 17 : Solubilisation et absorption intestinale des caroténoïdes (Nagao, 2011).....	67
Figure 18 : Structure chimique de la lutéine et de quelques métabolites (Kotake-Nara & Nagao, 2011)	68
Figure 19 : Structures chimiques de l'acide folique (A) et deux principales formes réduites du cycle ptéridique des folates alimentaires (B) (Ball, 2008)	71

Figure 20 : Schéma récapitulatif de l'absorption et du métabolisme de la vitamine B9 (Veujoz, Gaudineau, Sananes, Fritz, & Langer, 2013)	73
Figure 21 : Structure chimique de la vitamine B12 ou cobalamine (Dali-Youcef & Andres, 2009) 76	
Figure 22 : Absorption et métabolisme de la vitamine B12 (Scott & Molloy, 2012).....	77
Figure 23 : Relation entre le statut en vitamine B12 des individus nord-américains et leur passif végétarien (Miller, Specker, Ho, & Norman, 1991).....	80
Figure 24 : Facteurs susceptibles d'influencer la biodisponibilité des nutriments chez l'Homme (Graham, Welch, & Bouis, 2001)	81
Figure 25 : Diagramme de fabrication des matrices	102
Figure 26 : Photos des matrices finales. (A) Biscuit, (B) Génoise, (C) Flan, (D) Crème.....	103
Figure 27 : Pertes en micronutriments lors du procédé de fabrication des matrices (Flan, Génoise et Biscuit), exprimée en pourcentage de la teneur initiale. (A) Perte en vitamine B9. (B) Perte en vitamine B12. (C) Perte en vitamine D. (D) Perte en lutéine. ■ Teneur avant cuisson Teneur après cuisson.	107
Figure 28 : Répartition des prélèvements sanguins lors d'une journée de cinétique.....	117
Figure 29 : Séparation des chylomicrons après centrifugation.....	117
Figure 30 : Participant flow chart	122
Figure 31 : Model food characteristics.....	126
Figure 32 : Chylomicron TG responses.....	127
Figure 33 : Chylomicron D3 responses.....	129
Figure 34 : Chylomicron lutein responses.	130
Figure 35 : Production flow chart of model food	134
Figure 36 : Baseline-adjusted chylomicron lutein concentration over 8 h after consumption of model foods.....	135
Figure 37 : Baseline-adjusted chylomicron D3 concentration over 8 h after consumption of model foods.....	135
Figure 38 : Macroscopic images of the four foods: Biscuit, Sponge Cake, Pudding, and Custard (from left to right).	143
Figure 39 : Confocal images of the Biscuit (A), Sponge cake (B), Pudding (C), and Custard (D) at magnification x20 (lipids appear in red and proteins in green).	144
Figure 40 : Foliates concentrations (ng/mL) in plasma over the postprandial period and area under the curve (AUC, ng/mL.min) 180 minutes post ingestion for the four tested matrices.	145
Figure 41 : Insulin concentrations ($\mu\text{g/L}$) in plasma over the post prandial period. Values are means \pm SEM, statistical analysis: 2 ways RM ANOVA.....	148

Figure 42 : Glucose concentrations ($\mu\text{g/L}$) in plasma over the post prandial period.	148
Figure 43 : Alpha amino nitrogen concentrations (mmol/L) in plasma over the post prandial period and area under the curve (AUC, $\text{mmol/L}\cdot\text{min}$) 240 minutes post ingestion for the four tested matrices.	149
Figure 44 : Triglycerides concentrations (mmol/L) in plasma over the post prandial period and area under the curve (AUC, $\text{mmol/L}\cdot\text{min}$) over the entire (480 min) post prandial period for the four tested matrices. Values are means \pm SEM, statistical analysis: 2 ways RM ANOVA for triglycerides concentrations and One way ANOVA for AUC.....	149
Figure 45 : Évolution de la teneur plasmatique en vitamine B12 postprandiale après ingestion des 4 matrices. Moyenne des cinétiques des 12 volontaires.....	158
Figure 46 : Évolution de la teneur plasmatique en holotranscobalamine postprandiale après ingestion des 4 matrices. Données pour un volontaire.	160
Figure 47 : Production flowcharts and food composition.	170
Figure 48 : Macroscopic images of the four foods: Biscuit, Sponge cake, Pudding and Custard (from left to right).	177
Figure 49 : Confocal images of the Biscuit (A), Sponge cake (B), Pudding (C), and Custard (D) at magnification $\times 20$ (lipids appear in red and proteins in green), and size distribution of lipid droplets in the four model foods represented by their cumulative area percentage (E, vertical lines correspond to x_{50} , the median of each distribution).	178
Figure 50 : Protein digestion: Peptide release (a) and free amino group release (b) during <i>in vitro</i> digestion of the four foods.	179
Figure 51 : Carbohydrate digestion: Release of oligosaccharides during <i>in vitro</i> digestion of the four model foods; top left insert is a zoom on oral phase.....	180
Figure 52 : Lipid digestion: Lipid release (A) and lipolysis (B) during <i>in vitro</i> digestion of the four foods. At a given time, the differences between matrices are demonstrated by different letters ($P < 0.05$).	182
Figure 53 : Micronutrient bioaccessibility: vitamin B9 (A) and lutein (B) release in the supernatant during <i>in vitro</i> digestion of the four foods. Lutein release is expressed as the percentage of the total amount quantified at each digestion time to account for the progressive degradation of lutein under <i>in vitro</i> digestion conditions. Top left insert (A) is a zoom on the oral phase.	184
Figure 54 : Projection of the variables (A) and of the individuals (B, C) on the first two dimensions (PC1 and PC2) of the principal component analysis (PCA). (A) Active variables (in black) correspond to the characteristics measured on the <i>in vitro</i> digesta. Digestion time was added as an illustrative variable (in blue). Individuals are identified according to the food matrix (B) or to the digestion	

time (C). (B) Empty squares correspond to the barycentre of each of the four foods. (C) Black arrows represent the direction of the digestion process during the gastric and intestinal phases.	188
Figure 55 : Hierarchical clustering analysis (HCA) applied to the first two principal components of the PCA.	189
Figure 56 : MFA map of the individuals for the four model foods during <i>in vitro</i> digestion. Lines illustrate the changes of the individuals' coordinates throughout digestion; circles indicate the barycentres for each food.	191
Figure 57 : Production flowcharts and composition of the model foods.....	199
Figure 58 : Kinetics of micronutrient appearance in the bloodstream for the three foods (A) and gastric emptying curves set on the digestion system (B).	205
Figure 59 : Kinetics of matrix disintegration during <i>in vitro</i> dynamic digestion, as estimated by protein and peptide release (A and B), lipid release (C and D), and starch release (E and F) in the gastric (A, C and E) and intestinal (B, D and F) compartments. X-axis: Time (min). B = Biscuit, SC = Sponge cake, C = Custard. At a given time, significant differences between matrices are evidenced by different letters ($p < 0.05$).	208
Figure 60. Kinetics of macronutrient hydrolysis during <i>in vitro</i> dynamic digestion, as estimated by free amino group release (A and B), free fatty acids release (C and D), and oligosaccharides release (E and F), in the gastric (A, C and E) and intestinal (B, D and F) compartments. X-axis: Time (min). B = Biscuit, SC = Sponge cake, C = Custard. At a given time, significant differences between matrices are evidenced by different letters ($p < 0.05$).....	211
Figure 61 : Kinetics of lutein (A and B) and vitamin D (C and D) release during <i>in vitro</i> dynamic digestion in the supernatant in gastric (A and C) and intestinal (B and D) compartments. X-axis: Time (min). B = Biscuit, SC = Sponge cake, C = Custard. At a given time, significant differences between matrices are evidenced by different letters ($p < 0.05$).	214
Figure 62 : MFA map of the individuals for the three foods during <i>in vitro</i> digestion. Lines illustrate the changes of individuals coordinates throughout the three phases of digestion: oral (Bolus), gastric (G) and intestinal (I) for Biscuit (B), Sponge cake (SC) and Custard (C). G and I coordinates are mean of food behaviour during all the corresponding phase. The circle in the middle of the map represents the projection of the reduced centred variables on the plane defined by the first two principal components of the PCA.....	216
Figure 63 : Images en microscopie confocale des trois matrices (Biscuit, Génoise et Crème) avant digestion (Matrice), après mastication (Bol) et au cours de leur digestion <i>in vitro</i> dynamique dans	

les compartiments gastrique (G180, G330) et intestinal (I180 et I330). Les protéines apparaissent en rouge, les lipides en vert. 222

Figure 64 : Modèle stomacal de digestion *in vitro* dynamique (DIVHS, Soochow). Les éléments majeurs sont (5) l'estomac modèle en silicone souple imprimé en 3D, (7) les rouleaux excentrés mimant le péristaltisme. 234

Figure 65 : Digesteur dynamique gastro-intestinal (DIDGI[®], Rennes) 235

Liste des tables

Table 1 : Nutriments essentiels au métabolisme humain (d'après Welch & Graham, 2004)	55
Table 2 : Teneur en vitamine D de certains aliments (ANSES, 2017).	61
Table 3 : Teneur en lutéine de certains aliments	66
Table 4 : Teneur en folates des principaux aliments vecteurs d'apport (ANSES, 2017)	72
Table 5 : Teneur en vitamine B12 de quelques aliments (ANSES, 2017)	76
Table 6 : Analyses microbiologiques réalisées sur les matrices et limites d'acceptation des lots .	98
Table 7 : Composition des matrices	101
Table 8 : Description sensorielle des quatre matrices	103
Table 9 : Composition biochimique des matrices (en g/100 g d'extrait sec).	104
Table 10 : Répartition des différentes classes de lipides dans les matrices (en % de la densité totale)	105
Table 11 : Valeurs cible et enrichissements réalisés au cours de la fabrication des matrices	110
Table 12 : Baseline characteristics of healthy men.....	122
Table 13 : Model food recipes and nutritional composition	123
Table 14 : AUC and time peak	128
Table 15 : Pearson's correlation	131
Table 16 : Folate content measured in ingested matrices (μg). Area under the curve (AUC, $\text{ng/mL}\cdot\text{min}$) for plasma folate concentrations 180 and 480 minutes post ingestion of one of the four tested matrix: Biscuit, Sponge cake, Pudding and Custard. AUC were corrected or not for ingested folates. For each matrix, average maximum values (ng/mL) and time (min) when the maximum value was observed (T_{max}). Values are means \pm SEM, statistical analysis: 1 factor ANOVA.	145
Table 17 : Area under the curve (AUC, $\mu\text{g/L}\cdot\text{min}$) for insulin concentrations 120 and 480 minutes post ingestion of one of the four tested foods: Biscuit, Sponge cake, Pudding and Custard. For each matrix, average maximum values ($\mu\text{g/L}$) and time (min) when the maximum value was observed (T_{max}). Values are means \pm SEM, statistical analysis: 1 factor ANOVA.	146
Table 18 : Area under the curve (AUC, $\text{mmol/L}\cdot\text{min}$) for triglycerides 480 minutes post ingestion of one of the four tested matrix: Biscuit, Sponge cake, Pudding and Custard. For each matrix, average maximum values ($\mu\text{g/L}$) and time (min) when the maximum value was observed (T_{max}). Values are means \pm SEM, statistical analysis: 1 factor ANOVA.	147
Table 19 : Teneur en vitamine B12 des matrices de l'étude clinique.....	157
Table 20 : Details and meaning of variables obtained from supernatant analysis.	175

Table 21 : Statistical significance of the variables “Food matrix” and “Digestion time” on the characteristics of <i>in vitro</i> digesta, model R^2 and the p-value of the linear model.	186
Table 22 : Gastro-intestinal conditions for the <i>in vitro</i> digestion of food matrix simulating adult conditions.....	202
Table 23 : Statistical significance of variables “Food” and “Time” on characteristics of the <i>in vitro</i> digesta, model R^2 , and p-value of the linear model.	215
Table 24 : Résumé des résultats obtenus par les différentes approches de l'étude.....	238

Introduction générale

Depuis les années 1960 et plus particulièrement dans les pays industrialisés, les habitudes alimentaires ont profondément changé, y compris dans la consommation des aliments de base, en faveur de régimes alimentaires plus diversifiés (Kearney, 2010). La consommation de viande a ainsi été multipliée par neuf en Chine et par trois au Brésil depuis 1963. Dans le même temps, la consommation d'œufs et de lait a également augmenté dans ces pays, alors que celle des produits laitiers se voit plutôt diminuer dans les pays développés et particulièrement aux États-Unis, où on observe concomitamment une augmentation de la consommation de boissons gazeuses (Cavadini, Siega-Riz, & Popkin, 2000). Dans de nombreuses régions du Monde, la consommation des céréales locales telles que le riz, le millet ou le sorgho diminue en faveur du blé et du maïs, même si ces céréales restent prédominantes dans le régime alimentaire. La consommation des aliments dits « fournisseurs d'énergie » (le sucre, les huiles végétales et les graisses animales) suit la même croissance de consommation. La consommation de matières grasses d'origine animale stagne, voire diminue dans les pays développés (principalement en Europe et en Océanie) au profit des huiles végétales dont la consommation a par ailleurs triplé dans les pays en développement, tout comme celle du sucre raffiné. Ces évolutions ont largement contribué à accroître la consommation alimentaire disponible (en kcal par habitant et par jour) et représente donc l'un des facteurs majoritaires de l'instauration d'une sécurité alimentaire dans les pays en développement.

Dans certaines régions du Monde, notamment la Chine et le Brésil, cette transition nutritionnelle rapide et amplifiée par leur développement économique concomitant, a engendré l'apparition de maladies dites « de civilisation », jusque-là plutôt spécifiques des pays développés. Ainsi, en 2017, on enregistrait plus d'1,9 milliard d'adultes en surpoids et plus de 650 millions en situation d'obésité (soit 47 % de la population mondiale adulte) (OMS, 2017). Sur l'île de Nauru, sous l'effet de cette transition nutritionnelle et d'un terrain génétique propice au stockage d'énergie (Myles et al., 2007), la prévalence des adultes en surpoids atteint 94 % (Grasset, 2014). Dans le même temps, la prévalence du diabète non insulino-dépendant chez les adultes est passée de 4,7 % en 1980 à 8,5 % en 2014 (The Emerging Risk Factors Collaboration, 2010). En 2025, les projections prévoient qu'un diabétique sur cinq sera indien et que trois sur quatre proviendront d'un pays en voie de développement (Popkin, Horton, Kim, Mahal, & Shuigao, 2001; Popkin, 2006), avec des conséquences économiques et sociétales importantes (Bloom et al., 2011).

A l'inverse, dans le Monde, plus de 820 millions de personnes (soit 10,7 % de la population totale) souffrent de malnutrition protéino-énergétique en 2019, un chiffre en augmentation pour la troisième année consécutive après des décennies d'amélioration de la situation. Près de deux tiers de ces personnes viennent du continent asiatique et un tiers sont en Afrique (Concern Worldwide, 2019). Dans le Monde, une personne sur quatre est en situation d'insécurité alimentaire, définie comme un manque d'accès constant à suffisamment de nourriture pour mener une vie saine et active, dont 8 % en Amérique du Nord et en Europe (FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO, 2019; USDA, 2018). La pauvreté est la cause principale de la faim dans le Monde – environ 767 millions de personnes vivaient ainsi en dessous du seuil international de pauvreté en 2013 (The World Bank, 2013) – suivie des conflits ; plus de la moitié des personnes souffrant de malnutrition protéino-énergétique vivent dans des pays affectés par des conflits (FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO, 2017).

La situation mondiale de l'alimentation n'est toutefois pas aussi dichotomique que l'on pourrait l'imaginer. En effet, l'Asie et l'Afrique, qui comptent neuf dixièmes des enfants souffrant de sous-nutrition (retard de croissance ou amaigrissement) dans le Monde, abritent également près des trois quarts des enfants en surpoids, en raison d'une mauvaise alimentation.

Qu'elles résultent d'une situation de sous-nutrition, ou de malnutrition souvent associée à la surabondance alimentaire évoquée plus haut, les carences en un ou plusieurs micronutriments concerneraient entre un tiers et la moitié de la population mondiale soit 2,4 à 3,6 milliards de personnes (Miller & Welch, 2013). Chaque année, 115 000 femmes décèdent durant leur grossesse du fait d'une anémie ferriprive, responsable également du décès de 600 000 bébés à la naissance ou durant leur première année de vie. Les conséquences d'une carence en fer sont également observées à long terme, 18 millions de bébés naissant annuellement avec un retard mental résultant d'un manque d'apports en iode et en fer durant la grossesse. Un apport insuffisant en folates dans l'alimentation de la mère avant et pendant les premiers stades de la grossesse serait par ailleurs responsable de la naissance chaque année de 270 000 enfants souffrant d'un défaut de fermeture du tube neural (Sijbesma & Sheeran, 2012; WHO, 2013). La prévalence des déficiences en micronutriments est souvent difficile à estimer au niveau mondial car les conséquences ne sont pas toujours visibles extérieurement. Les méthodes de détection ne sont souvent pas unanimes et beaucoup de pays tendent à cacher ces problèmes (Micha & Mannar, 2018). C'est pourquoi on parle de « hidden hunger » ou faim inapparente/insoupçonnée. Néanmoins, comme les exemples ci-dessus le montrent, les conséquences des carences en

micronutriments peuvent se faire ressentir sur le long terme. De plus, un document marquant de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) datant de 2006 rapporte que : « Outre les manifestations cliniques les plus évidentes, la malnutrition en micronutriments est responsable d'un large éventail de déficiences physiologiques non spécifiques, entraînant une réduction de la résistance aux infections, aux troubles métaboliques et au développement physique et psychomoteur retardé ou altéré ». Ce rapport souligne ainsi que la malnutrition en micronutriments n'est pas, comme largement supposé habituellement, seulement un problème des pays en développement (Allen, 2006; Tulchinsky, 2010).

La malnutrition toucherait ainsi entre 5 et 10 % des adultes en France et presque 50 % des personnes âgées présentent une carence en vitamine D, 12 % en vitamine B9 et 4,5 % en vitamine B12 (Kettaneh, Stirnemann, Fain, Letellier, & Thomas, 2004). Plus de 20 millions de séniors présenteraient en outre un risque de dénutrition dans l'Union Européenne (Mak & Caldeira, 2014). Dans la population générale, les déficiences observées ne s'accompagnent généralement pas de manifestations cliniques ou de symptômes spécifiques. Néanmoins, 20 % des adultes ont un manque d'apport en vitamine C et jusqu'à 60 % des femmes présentent une déficience en fer (Kettaneh et al., 2004).

La qualité nutritionnelle des aliments devient de ce fait un enjeu de santé publique, tout autant qu'un enjeu stratégique pour le développement et l'innovation dans l'industrie alimentaire. L'enrichissement des aliments en certains nutriments et en particulier en micronutriments est l'une des pistes de « l'optimisation nutritionnelle ». De tels aliments enrichis sont utilisés dans les pays en développement en situation de crise notamment, mais aussi dans les pays développés où ils peuvent bénéficier d'allégations. Ainsi, 95 % des aliments céréaliers vendus aux États-Unis sont enrichis en acide folique (Kearney, 2010). Mais la pertinence de ces enrichissements reste souvent à prouver, au regard de la bioefficacité réelle des micronutriments ajoutés.

Le rôle des caractéristiques structurales d'un aliment sur sa désintégration, donc sur le déroulement du processus de digestion et *in fine* sur l'utilisation des nutriments par l'organisme fait aujourd'hui consensus au sein de la communauté scientifique (Parada & Aguilera, 2007; Turgeon & Rioux, 2011). Cependant, les impacts au niveau des processus biochimiques ne sont pas clairement définis et ce lien entre structure des aliments et biodisponibilité des nutriments reste largement inconnu. Il n'est donc pas possible aujourd'hui de formuler des recommandations claires quant au type de structure d'aliments à privilégier pour maximiser la biodisponibilité d'un

nutriment donné. Dans le cas particulier des micronutriments, si la nature de la matrice alimentaire est reconnue comme l'un des facteurs les plus importants, les études ne permettent pas, pour la plupart, de distinguer l'effet structure de l'effet composition de la matrice.

Le projet MicroNut a été conçu dans ce contexte. Ses objectifs étaient de démontrer l'impact du changement de structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments, et de déterminer les caractéristiques structurales des aliments ou bien les étapes de la digestion expliquant les différences observées *in vivo*. Contrairement à la majorité des études réalisées précédemment, l'originalité du projet MicroNut réside dans le fait d'étudier des matrices modèles complexes, proches d'aliments réels, et de composition constante mais de structures différentes, afin d'étudier spécifiquement l'effet de la structure, indépendamment de la composition. La stratégie expérimentale a reposé sur une première phase d'étude clinique chez l'Homme afin d'établir la « preuve de concept » (impact de la structure de l'aliment sur la biodisponibilité des micronutriments), suivie d'études *in vitro* pour explorer le devenir des micronutriments tout au long du processus de digestion. Ces études *in vitro* incluaient les étapes orale, gastrique et intestinale de la digestion. Le projet MicroNut visait ainsi à investiguer le processus de digestion dans son ensemble, du niveau macroscopique au niveau moléculaire.

Ce projet, financé par le Carnot Qualiment, la région Bretagne et l'INRA, a été lancé en novembre 2016 pour une durée de 3 ans. Il a impliqué quatre laboratoires de l'INRA – l'UMR408 SQPOV d'Avignon (Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale), l'UMR1019 UNH de Clermont-Ferrand (Unité de Nutrition Humaine), l'UMR1260 C2VN de Marseille (Nutrition, Obésité et Risque Thrombotique) et l'UMR1253 STLO de Rennes (Science & Technologie du Lait & de l'Œuf), pilote du projet – ainsi que le Centre Hospitalier Universitaire et le Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) de Clermont-Ferrand.

Le projet est structuré en quatre lots ([Figure 1](#)) qui seront détaillées dans les chapitres à venir :

- T1 : Conception et caractérisation des matrices modèles
- T2 : Étude *in vivo* chez l'Homme : mesure de la biodisponibilité des micronutriments
- T3 : Études *in vitro* : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion
- T4 : Intégration et analyse des résultats

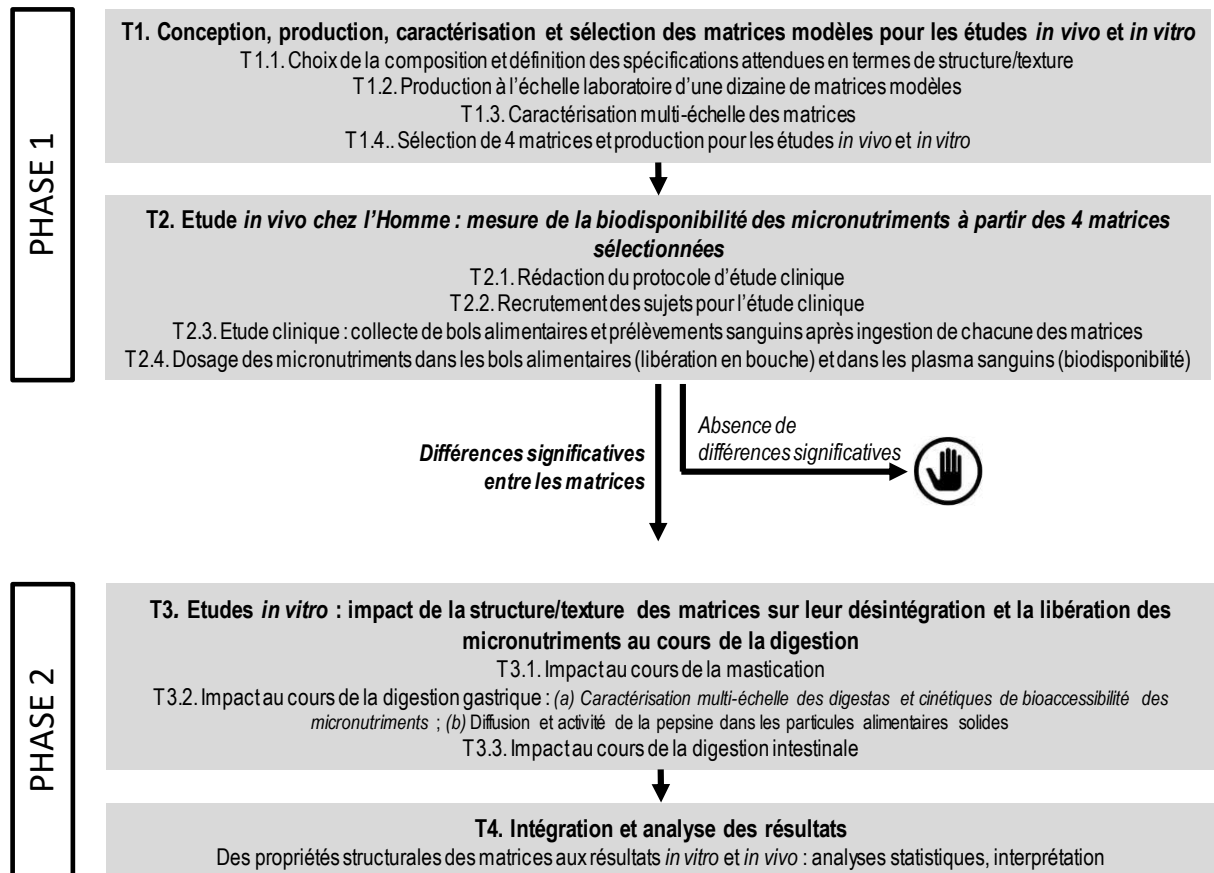


Figure 1 : Structure du projet MicroNut

Au sein du projet MicroNut, les travaux de cette thèse consistait à :

- concevoir, produire et caractériser les matrices enrichies en micronutriments (T1) ;
- produire ces matrices pour les besoins de l'étude clinique (T2) ;
- aider à la mise en place du protocole expérimentale de l'étude clinique (T2) ;
- réaliser les deux études de digestion *in vitro* en modèle statique et dynamique (T3) ;
- intégrer et analyser les résultats provenant des trois approches de la digestion (T4).

Chapitre I. Synthèse bibliographique

I.1	La matrice alimentaire.....	26
I.1.1	Émergence du concept de matrice alimentaire et importance en nutrition	26
I.1.2	Définition de la matrice alimentaire.....	28
I.1.3	Les différentes échelles d'étude.....	29
I.2	La digestion chez l'Homme.....	31
I.2.1	Appareil digestif et étapes de la digestion	31
I.2.2	Notions de Bioaccessibilité et Biodisponibilité.....	40
I.2.3	Impact des traitements technologiques sur la digestion des nutriments.....	41
I.2.4	Modèles de digestion	45
I.3	Les micronutriments.....	54
I.3.1	Présentation générale	54
I.3.2	Malnutrition.....	56
I.3.3	La vitamine D	59
I.3.4	La lutéine	65
I.3.5	La vitamine B9	70
I.3.6	La vitamine B12	75
I.3.7	Facteurs influençant la biodisponibilité des micronutriments et leviers d'action	80

I.1 LA MATRICE ALIMENTAIRE

I.1.1 ÉMERGENCE DU CONCEPT DE MATRICE ALIMENTAIRE ET IMPORTANCE EN NUTRITION

Depuis les premières recherches en nutrition débutées il y a environ 200 ans, la qualité nutritionnelle des aliments a été majoritairement établie sur la base de leur composition en nutriments, en distinguant d'une part les macronutriments (protéines, lipides et glucides) et d'autre part les micronutriments et nutriments dits d'intérêt (vitamines, minéraux, fibres, polyphénols, etc.) (Fardet, 2017; Turgeon & Rioux, 2011). Cette tendance au « nutritionism » ou réductionnisme nutritionnel a incité les industriels de l'agroalimentaire à formuler des produits (ultra-)transformés, faisant appel à une grande variété d'ingrédients afin de maîtriser la composition en macronutriments, et/ou enrichis en macro ou micronutriments afin de potentialiser l'effet santé de leurs produits (Scrinis, 2013). Malgré des résultats positifs à l'égard de l'occurrence de certaines pathologies consécutives à une carence nutritionnelle (telles que le scorbut), cette stratégie du « nutritionism » n'a pas empêché la recrudescence du nombre de maladies dites métaboliques telles que le diabète ou l'obésité (+ 5,4 % de personnes dépistées diabétiques par an en France entre 2006 et 2009) (Drewnowski, 2005; Fain, 2013).

A la fin des années 1970, certaines études commencent à différencier la qualité des nutriments en fonction des caractéristiques de l'aliment vecteur. Ainsi en 1977, il a été montré que le mode de consommation de pommes (entières, en purée ou en jus) par des jeunes volontaires sains avait un impact sur leur réponse glycémique, celle-ci étant d'autant plus rapide que la teneur en fibres était basse ; l'effet de la déstructuration de la matrice était dès lors mis en évidence (Haber, Heaton, Murphy, & Burroughs, 1977). Par la suite, plusieurs études ont confirmé le rôle majeur de la structure de la matrice. Ainsi en 2006, la comparaison entre des repas contenant des carottes entières (conservant leur structure et leur teneur en fibres), en purée (sans structure) ou sous forme de nutriments (sans fibres ni structure) a montré que la satiété des volontaires était significativement plus faible après consommation du repas sous forme de nutriments (Moorhead et al., 2006). En 1991, la consommation par des sujets sains de semoules de blé ayant subi deux traitements technologiques différents, sous forme de pâtes ou de pain, a montré que la consommation de pâtes induisait un index glycémique plus faible que le pain. *In vitro*, la digestion de l'amidon des pâtes était significativement ralentie par rapport à celle du pain (Granfeldt, Björck, & Hagander, 1991). Une autre étude, réalisée en 2006 sur dix volontaires sains, a démontré une corrélation positive entre le volume d'un pain blanc et l'index glycémique. Cette corrélation a également été constatée avec l'indice de satiété des volontaires suite à la consommation des

différents pains. Par conséquent, toute modification de la macrostructure d'un aliment pourrait potentiellement avoir un effet sur la réponse métabolique (Burton & Lightowler, 2006).

Des études analogues réalisées ultérieurement sur les protéines ont permis de montrer que la vitesse d'absorption des acides aminés variait selon qu'ils étaient apportés par des caséines ou des protéines du lactosérum. Par analogie avec les études portant sur les glucides, la notion de protéines rapides et lentes a été introduite à partir de 1997 (Boirie et al., 1997). Plus récemment, l'apport d'acides aminés sous forme de protéines laitières intactes ou hydrolysées a conduit à des différences en termes de cinétiques d'absorption de ces acides aminés chez l'Homme (Deglaire et al., 2009). De même, chez l'Homme, une rétention postprandiale plus importante des protéines d'un lait soumis à un traitement UHT (Ultra-Haute Température) a été observée par rapport à celles d'un lait microfiltré ou pasteurisé (Lacroix et al., 2008). Chez le mini-porc, l'impact de traitements technologiques (traitement thermique et gélification par acidification ou par présure) sur la biodisponibilité des acides aminés issus de protéines laitières a été également montré, avec des différences en termes de cinétiques d'absorption et d'utilisation métabolique de ces acides aminés (Barbé et al., 2014).

Plus récemment encore, des études portant sur la structure de la matière grasse au sein d'un repas ont mis en évidence qu'il était possible de moduler l'absorption des chylomicrons et le devenir métabolique des acides gras par le biais de traitements technologiques de la matière grasse tels que l'émulsification ou l'homogénéisation. Cela pourrait désormais ouvrir la voie à un concept de « lipides lents » et « lipides rapides », impliquant la structuration et l'organisation des matières grasses alimentaires (Gabert et al., 2011; Vors et al., 2013).

Enfin, les études portant sur le lien entre produits ultra-transformés et satiété s'accordent sur l'impact du degré de transformation d'un aliment. Plus le degré de transformation est important, plus l'index glycémique augmente et l'effet satiétogène diminue (Fardet, Lakhssassi, & Briffaz, 2018; Fardet, Méjean, Labouré, Andreeva, & Feron, 2017; Poti, Mendez, Ng, & Popkin, 2015).

Ces différentes études suggèrent donc qu'à composition constante, la structuration des nutriments au sein de l'aliment affecte directement le processus de digestion dans le tractus gastro-intestinal et joue un rôle sur l'utilisation métabolique des nutriments par l'organisme. Dès lors, il ne s'agit plus dorénavant de considérer les aliments selon une perspective exclusivement quantitative (l'aliment n'est pas une simple somme de nutriments), mais d'y adjoindre une

perspective qualitative (Jacobs & Tapsell, 2007). Cette approche holistique de la nutrition introduit la notion de matrice alimentaire qui intègre à la fois la structure de l'aliment, sa composition, ainsi que les interactions entre les différents constituants (Aguilera, 2006; Fardet, Souchon, & Dupont, 2013; Parada & Aguilera, 2007; Slattery, 2008).

I.1.2 DÉFINITION DE LA MATRICE ALIMENTAIRE

Une matrice alimentaire peut être décrite comme « un assemblage complexe de nutriments et de composés non-nutritifs interagissant physiquement et chimiquement, qui influence le relargage, les transferts de masses, l'accessibilité, la digestibilité et la stabilité de nombreux composants alimentaires » (Aguilera, 2005; Crowe, 2013; Della Valle, Souchon, & Anton, 2013). Le terme de matrice alimentaire reflète le fait que les composés d'un aliment ont des propriétés différentes selon qu'ils sont isolés ou font partie d'une structure. Le saccharose par exemple possède une diffusivité 14 % plus faible lorsqu'il est inclus dans un gel d'alginate de calcium par rapport à une solution aqueuse (Aguilera & Stanley, 1999). Le fait qu'il soit inclus dans une matrice influence donc bien ses propriétés physiques.

Les interactions entre les nutriments confèrent à la matrice sa structure et ses propriétés physiques et texturales : forme, densité, couleur, collant, dureté, etc. Les premières transformations alimentaires ont ainsi eu pour but de contrôler, créer ou transformer la structure initialement conférée à l'aliment par la nature et ceci par l'intermédiaire des procédés technologiques (Aguilera & Stanley, 1999). Les différents types de cuisson ou traitements thermiques peuvent par exemple provoquer la dénaturation des protéines, la formation d'agrégats ou bien des réactions telles que la réaction de Maillard (Raikos, 2010). Le traitement thermique de l'amidon en présence d'eau induit sa gélatinisation au sein de la matrice, modifiant sa structure (Holm, Lundquist, Björck, Eliasson, & Asp, 1988). Et aujourd'hui, les procédés technologiques sont abordés en tant que levier potentiel, parmi d'autres, pour maîtriser les effets métaboliques des aliments, et donc leur qualité nutritionnelle. La modulation des procédés technologiques en fonction des qualités attendues du produit fini est classiquement désignée sous le terme d'ingénierie reverse (Bruin & Jongen, 2003).

I.1.3 LES DIFFÉRENTES ÉCHELLES D'ÉTUDE

Lors de la caractérisation d'une matrice alimentaire, on distingue couramment 4 échelles :

- la macrostructure, qui concerne l'aliment dans son ensemble et/ou les ingrédients observables à l'œil nu ;
- la microstructure, qui se rapporte aux éléments observables au microscope tels que les cellules, les fibres, les pores ;
- la mésostructure, qui renvoie aux parois cellulaires, aux interfaces des émulsions ;
- la nanostructure, qui concerne les biopolymères alimentaires.

Ces échelles sont plus ou moins arbitraires et peuvent se chevaucher en pratique lors de l'étude d'un aliment. Ces définitions ne sont d'ailleurs pas consensuelles et certains auteurs considèrent en tant que microstructure tout ce qui n'est pas macrostructure (Ho et al., 2013).

La macrostructure d'un aliment se rapporte à ses caractéristiques perceptibles au premier abord : couleur, forme, etc. Elles sont déterminantes pour la perception et l'appréciation d'un aliment par le consommateur (Cifuentes, 2012). La macrostructure d'un aliment détermine ses propriétés texturales, perçues à travers la mastication et la formation du bol salivaire. En effet, la texture d'un aliment est intimement liée à sa structure et lui confère ses propriétés sensorielles. Ainsi, lorsque des aliments sont présentés sous forme déstructurée à des volontaires et ingérés à l'aveugle, seuls 41 % des produits en moyenne sont correctement identifiés (Schiffman, 1977; Schiffman, Nash, & Dackis, 1978).

La microstructure résulte de l'organisation et de l'interaction des constituants d'une matrice alimentaire résultant en une répartition spatiale des différentes phases, visible au microscope (Devahastin, 2018). L'échelle microscopique de la structure alimentaire a été très largement étudiée, notamment par les industriels du secteur, car de nombreuses propriétés déterminant la qualité d'un produit alimentaire dépendent de sa microstructure : le moelleux de la mie de pain, le croustillant de la croûte, le caractère juteux d'un fruit ou bien encore la couleur d'un aliment, liée aux propriétés de diffusion de la lumière dans les couches superficielles de l'aliment (Karim, Rahman, Pham, & Fawzia, 2018). Les spécialistes des sciences de l'alimentation se sont alors accordés très tôt sur le fait que, tout comme la macrostructure, la microstructure d'un aliment gouverne sa texture (Stanley, 2017). La caractérisation de la microstructure est essentiellement fondée sur les microscopies optique ou électronique, qui fournissent des images en 2 dimensions. Cependant des techniques de tomographie commencent à être utilisées, ce qui permet de caractériser pleinement l'organisation spatiale de la microstructure en 3D (Figure 2) (Russ, 2005).

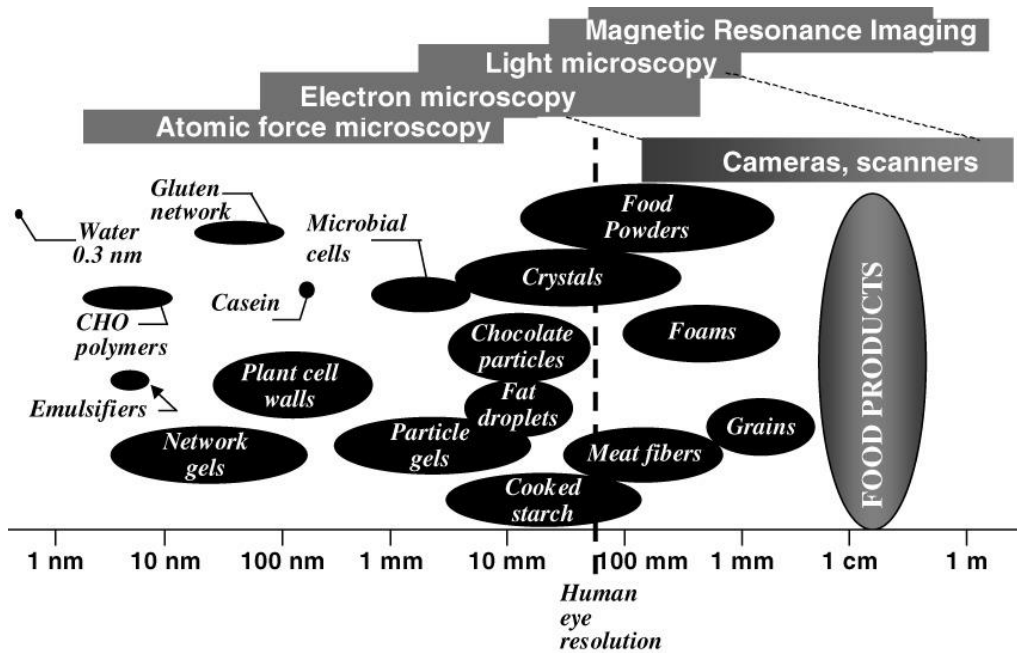


Figure 2 : Échelle de taille des structures de la matrice alimentaire et techniques pour leur caractérisation (Aguilera, 2006)

La démocratisation des méthodes d'analyses de pointe a incité les industries de l'agroalimentaire à s'intéresser aussi depuis quelques années à la nanostructure des matrices alimentaires. En effet, de nombreuses interactions à cette échelle ont une influence sur la microstructure, et donc sur les caractéristiques structurales des aliments : associations de colloïdes sous forme de micelles, liposomes, etc. L'étude des structures à l'échelle nano a de ce fait permis d'améliorer les connaissances sur les structures de niveau hiérarchique plus élevé, à l'exemple des émulsions huile-dans-eau ou des phénomènes d'agrégations dans les gels (Leser, Michel, & Watzke, 2007). Un des enjeux majeurs du domaine de la science des aliments sera prochainement l'étude des interactions entre des structures de tailles différentes et le développement subséquent de matrices aux propriétés contrôlées, de la nano à la macrostructure (King et al., 1995; Schüth & Schmidt, 2002).

I.2 LA DIGESTION CHEZ L'HOMME

Les réactions chimiques constitutives du métabolisme cellulaire sont dépendantes d'apports en nutriments. Chez les organismes hétérotrophes, ces nutriments doivent provenir de sources extérieures, afin de servir au renouvellement et à la croissance des tissus. L'alimentation est la seule source d'apports en nutriments chez l'Homme. Mais l'ingestion d'aliments n'est que la première étape d'un processus complexe concourant au catabolisme des nutriments : la digestion.

I.2.1 APPAREIL DIGESTIF ET ÉTAPES DE LA DIGESTION

La digestion est un procédé séquentiel complexe au cours duquel, par des actions mécaniques, chimiques et enzymatiques, les aliments ingérés sont transformés en nutriments assimilables par l'organisme pour sa croissance, l'entretien et la survie des cellules. Au cours de la digestion, deux processus majeurs coexistent : la réduction de la taille des particules alimentaires sous l'effet de contraintes mécaniques et l'hydrolyse des macronutriments par les transformations chimiques et enzymatiques. La désintégration physique des aliments se déroule majoritairement dans la bouche et l'estomac, tandis que leur hydrolyse prend place à partir de l'estomac et jusqu'à l'intestin grêle. Il s'ensuit une phase d'absorption des nutriments dans le petit et le gros intestin (Figure 3). Les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas ne font pas partie à proprement parler du tractus digestif, mais ces quatre organes sécrètent des enzymes et fluides nécessaires au processus de digestion, qu'ils déversent par des canaux sécréteurs dans la lumière du tractus digestif.

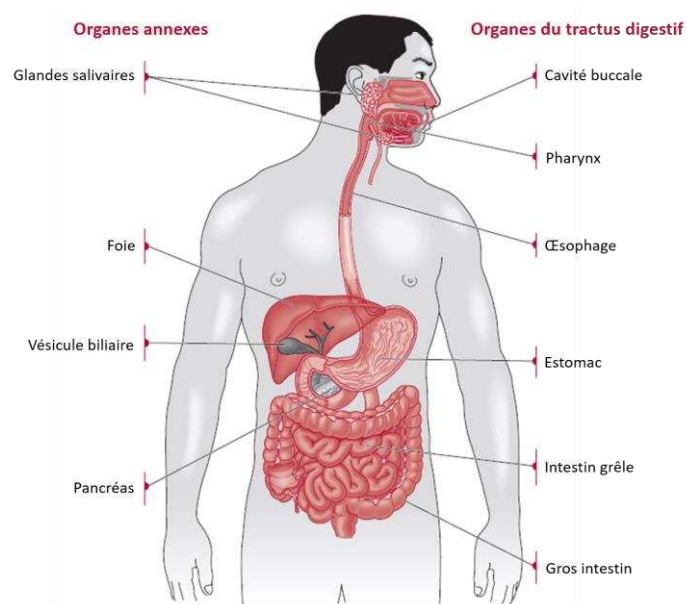


Figure 3 : Organes principaux et annexes du système digestif humain (d'après Rogers, 2011)

I.2.1.1 PHASE ORALE

La phase orale est la première étape du processus de digestion. Elle a pour but de déstructurer l'aliment et de le préparer à être dégluti. Le bol alimentaire doit être constitué de particules d'une taille suffisamment petite et être convenablement lubrifié par la salive pour qu'il puisse être avalé en toute sécurité. À cet effet, deux phénomènes concomitants se produisent : la mastication et la salivation. La mastication implique l'activité coordonnée des muscles oro-faciaux et de la langue. Par le biais des forces de cisaillement et de compression, l'aliment est incisé, mis en pièces puis réduit en particules de petites tailles. La salivation remplit plusieurs fonctions : solvant, lubrifiant de la sphère oro-pharyngée et digestion. Au cours de la mastication, la salivation permet la lubrification du bol, l'agrégation des particules, puis la déglutition (Neyraud, Heinzerling, Bult, Mesmin, & Dransfield, 2009; Pushpass, Daly, Kelly, Proctor, & Carpenter, 2019).

La salive est majoritairement sécrétée par trois paires de glandes : les parotides, les sous-maxillaires et les sublinguales. D'autres zones de sécrétions mineures peuvent s'ajouter : les glandes labiales, jugales et palatines. On distingue habituellement la salive au repos, sécrétée par les glandes sous-maxillaires et sublinguales et la salive stimulée, provenant principalement des glandes parotides. Il existe une forte variabilité interindividuelle pour la production de salive, qui est toutefois généralement comprise entre 0,1 et 0,5 mL/min en conditions de repos et 1,1, à 3,0 mL/min en conditions stimulées (Chen, 2009; Mosca & Chen, 2017). La salive est constituée d'environ 99 % d'eau, contenant des électrolytes (sodium, potassium, calcium, chlorure, magnésium, bicarbonate, phosphate), des protéines (enzymes – amylase, lipase, lysozyme, peroxydase –, immunoglobulines, glycoprotéines, etc.), du glucose et des produits azotés (urée et ammoniac) (de Almeida, Grégio, Machado, de Lima, & Azevedo, 2008; Tenovuo, 2002). Par ses propriétés hydratantes et hydrolytiques, la salive favorise la déstructuration de la matrice et ainsi la libération des nutriments (de Wijk, Prinz, Engelen, & Weenen, 2004). Le rôle de l' α -amylase salivaire – ou ptyaline – dans l'hydrolyse des polysaccharides en dextrines est patent (Freitas & Le Feunteun, 2019). Les protéines salivaires riches en proline (PRP) permettent en outre la perception des tanins (de Wijk & Prinz, 2005), et l'anhydrase carbonique VI celle du CO₂ (Dessirier, Simons, Carstens, O'Mahony, & Carstens, 2000). La présence de lipase salivaire est un sujet de controverse dans la communauté scientifique, mais quelques études tendent à prouver son existence (Abrams, Hamosh, Hubbard, Dutta, & Hamosh, 1984; Feron & Poette, 2013; Hamosh, 2008; Poette et al., 2014). L'action des enzymes salivaires se prolonge dans l'estomac jusqu'à leur inhibition par le pH acide.

Il est nécessaire d'atteindre un double seuil de déstructuration et de lubrification pour déclencher la déglutition. La langue comprime alors les aliments contre le palais pour former un bol alimentaire, lequel est envoyé en direction du pharynx. La mauvaise orientation du bol est évitée par le blocage de la cavité buccale par la langue, de la cavité nasale par le voile du palais et du larynx par l'épiglotte. Le bol alimentaire résultant des dégradations mécaniques et enzymatiques dans la bouche est alors transporté à travers l'œsophage jusqu'à l'estomac, par le biais des mouvements péristaltiques et sous l'effet de la gravité (Feron & Salles, 2013).

1.2.1.2 PHASE GASTRIQUE

L'estomac est la partie la plus dilatée du tractus digestif : il mesure environ 10 cm de large pour 20 à 22 cm de long au repos (Torgersen, 1946). Il communique avec l'œsophage *via* le sphincter œsophagien inférieur et se compose de deux grande parties : l'estomac proximal comprenant le cardia, le fundus et le corps ; et l'estomac distal comprenant l'antrum et le pylore (Figure 4). Situé au niveau du cardia, le sphincter cardiaal empêche le bol alimentaire de remonter dans l'œsophage (Sernka & Jacobson, 1983). Au repos, le volume des sécrétions résiduelles de l'estomac est de 25 mL environ et l'estomac sécrète environ 1 mL de fluides par minute. L'ingestion d'aliments induit une augmentation de la sécrétion gastrique qui peut atteindre 10 à 50 mL/min, pour un total journalier de 2 à 3 litres (Oomen et al., 2003).

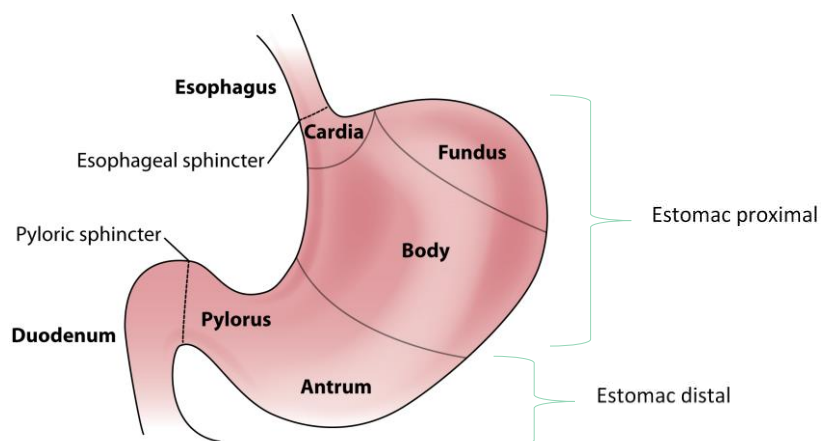


Figure 4 : Anatomie de l'estomac humain (d'après Bornhorst & Singh, 2014)

L'épithélium de l'estomac présente des invaginations régulières où se logent les glandes gastriques. Des cellules sécrétrices de mucine (protéine constitutive du mucus, protégeant les épithéliums contre l'autodigestion et les agressions endogènes et exogènes) et de bicarbonate se trouvent au niveau du cardia et de l'antrum. Le fundus contient les cellules pariétales, responsables de la production de l'acide chlorhydrique (HCl), et les cellules principales qui

sécrètent le pepsinogène, précurseur de la pepsine, activé au contact de l'HCl (lorsque le pH du milieu est inférieur à 5) ou bien en présence de pepsine déjà active (Bornhorst & Singh, 2014; Cheng et al., 2010). La pepsine (pH optimal : 1-2 (Blanco & Blanco, 2017)) est une endopeptidase responsable de moins de 20 % de la protéolyse totale du tractus digestif (Mat, Cattenoz, Souchon, Michon, & Le Feunteun, 2018). L'HCl participe également à la dénaturation des protéines et à l'élimination des bactéries exogènes. De surcroît, les cellules pariétales sécrètent le facteur intrinsèque qui permet l'absorption de la vitamine B12 au niveau intestinal, tandis que les cellules principales sécrètent aussi la lipase gastrique (pH optimal : 4-5,4), responsable d'environ 10 à 30 % de l'hydrolyse des triglycérides du repas (Favé, Peyrot, Hamosh, & Armand, 2007; Gallier & Singh, 2012). Au-delà de leur hydrolyse, les lipides du repas subissent également une homogénéisation lors de la phase gastrique sous l'action des contractions de l'estomac, l'estomac. On a pu mesurer dans le cas d'un repas standard administré sous forme d'émulsion et composé d'huile d'olive, d'œuf et de sucre, que le diamètre moyen des globules gras passait, au cours de la phase gastrique, de 57 à 17 μm et la surface de contact moyenne de 0,7 à 2,1 m^2/g (Armand et al., 1994; Pafumi et al., 2002; Pasquier et al., 1996).

Le niveau basal de production d'HCl confère à l'estomac un pH à jeun compris entre 1,3 et 2,5 chez l'Homme adulte. Après l'ingestion d'un repas, le pH augmente jusqu'à une valeur généralement comprise entre 4,5 et 6 selon la composition du repas et l'individu concerné. La valeur du pH redescend habituellement en-dessous de 3 une heure après l'ingestion du bol alimentaire (Kong & Singh, 2008; Russell et al., 1993).

Lorsque le bol alimentaire pénètre dans l'estomac, la partie proximale se détend, permettant au bol de se superposer sur les bols précédemment avalés (Schulze, 2006). La partie proximale agit ainsi comme réservoir d'aliments avant qu'ils ne migrent vers la partie distale. C'est dans cette zone que se produisent les contractions péristaltiques de l'estomac, appelées ondes de contractions antrales, dont le rôle est d'écraser et de broyer les particules alimentaires jusqu'à ce que leur taille leur permette de passer à travers le sphincter pylorique (d'environ 1 cm de diamètre), en direction de l'intestin grêle (Bornhorst & Singh, 2014).

La configuration anatomique de l'estomac entraîne la formation de strates au cours de la digestion, en fonction de la densité relative des différents constituants du bol alimentaire, désormais appelé chyme. Deux phénomènes sont alors observés : une décantation et un crémage. Les particules alimentaires de taille trop importante pour passer le pylore sédimentent au fond de

l'antrum, sous l'effet de leur densité, alors que la phase grasse du bol alimentaire a tendance à flotter, formant une couche de gouttelettes lipidiques à la surface. Entre les deux se situe la phase aqueuse contenant les particules en suspension (<1 mm) isodenses avec l'eau et les molécules dissoutes (Figure 5A).

La forme conique du pylore agit comme un entonnoir. La phase aqueuse s'écoule en direction du duodénum sous l'impulsion des contractions gastriques alors que les particules sédimentées et les gouttelettes lipidiques, se déplaçant le long des parois, sont retenues dans l'antrum. Cet ensemble de phénomènes est appelé le tamisage gastrique (Figure 5B) (Boulby, Moore, Gowland, & Spiller, 1999; Marciani, Gowland, Fillery-Travis, et al., 2001; Marciani, Gowland, Spiller, et al., 2001; Schulze, 2006).

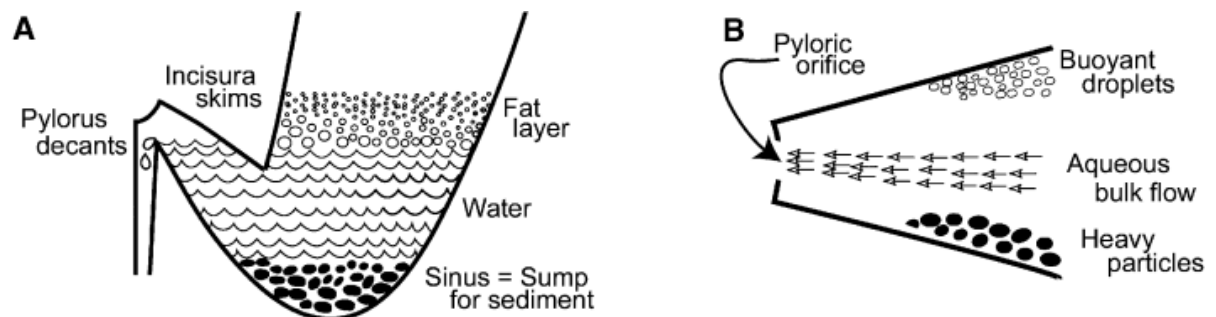


Figure 5 : Phénomènes physiques découlant de la configuration anatomique de l'estomac. (A) Séparation du bol alimentaire en strates, consécutive aux phénomènes de sédimentation et de crémage. (B) Différenciation de la vidange gastrique en fonction de la densité du chyme (Schulze, 2006).

La vidange gastrique débute quelques minutes après l'arrivée du bol dans l'estomac, mais son pic de vitesse est observé entre 1h30 et 2h après ingestion (Kong & Singh, 2008). Sa vitesse est influencée par la composition biochimique du chyme (Benini et al., 1994; Hertz, 1910), le volume du repas (Doran, Jones, Andrews, & Horowitz, 1998; Hunt & Macdonald, 1954; Lin, Elashoff, Gu, & Meyer, 2008), sa texture (Barbé et al., 2013; Minekus, Marteau, Havenaar, & Huis in't Veld, 1995), sa densité calorique (Moore et al., 1984), le genre du mangeur (Hermansson & Sivertsson, 1996), les conditions physiologiques (Costill & Saltin, 1974) et la motilité gastrique (Camilleri, Malagelada, Brown, Becker, & Zinsmeister, 1985; Camilleri, Brown, & Malagelada, 1986). La vidange se produit sous forme d'écoulements pulsatiles, avec une fréquence de 3-4 contractions par minute.

La vidange gastrique est un paramètre clé des études de digestion, car elle influence directement la cinétique d'absorption des nutriments. Elle est caractérisée par deux grandeurs (Bornhorst, Ferrua, & Singh, 2015) : le temps de latence, qui correspond au temps nécessaire avant que la

vidange ne débute, et le temps de demi-vidange (généralement nommé $t_{1/2}$) qui correspond au temps nécessaire pour que 50 % du repas ait quitté l'estomac. La forme de la courbe de vidange est également une caractéristique de ce phénomène.

L'absorption n'est pas une fonction majeure de l'estomac mais certaines molécules sont absorbées pour partie à cet endroit : l'eau en cas de déshydratation, certains médicaments tels que l'aspirine, certains acides aminés, l'éthanol, la caféine et certaines vitamines hydrosolubles (la vitamine C notamment) (Debry, 1994; Hogben, Schanker, Tocco, & Brodie, 1957; Karel, 1948).

1.2.1.3 PHASE INTESTINALE

La phase gastrique représente une faible part de la digestion des nutriments, la majeure partie ayant lieu dans l'intestin grêle. Les deux grandes fonctions de ce dernier sont l'hydrolyse des macronutriments, déjà engagée au niveau gastrique, et l'absorption des nutriments.

D'une longueur totale de 6 m pour un diamètre moyen de 2,5 cm, l'intestin grêle est divisé en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Ce dernier relie l'intestin grêle au cæcum du côlon, au niveau de la jonction iléo-cæcale. L'épithélium de l'intestin grêle, appelé « bordure en brosse », est composé de villosités et microvillosités permettant d'augmenter la surface d'échange pour aboutir à une surface totale d'environ 200 m² chez l'Homme adulte, alors qu'elle ne serait que de 0,47 m² en absence de villosités et microvillosités, soit une surface d'échange 425 fois plus importante (Figure 6) (Khan, Roman, Peulen, & Mion, 2009).

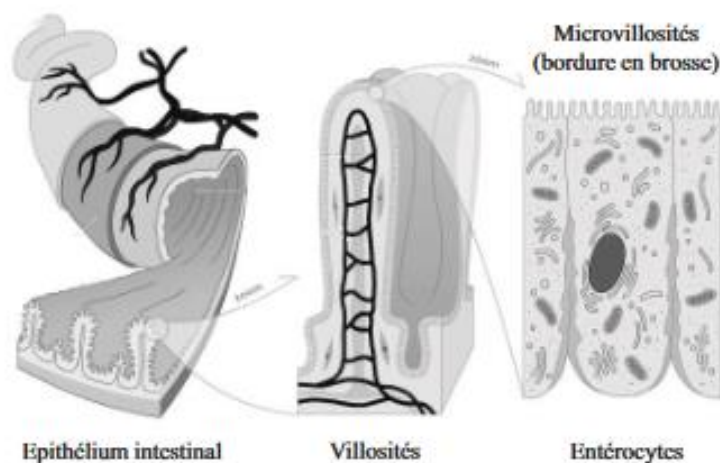


Figure 6 : Structure de l'épithélium intestinal (Marieb, Hoehn, Moussakova, & Lachaine, 2015)
Le chyme progresse dans l'intestin sous l'effet de diverses contractions impulsées par le système nerveux. Les contractions des muscles longitudinaux lisses mélangent le contenu intestinal avec les sucs digestifs, tandis que les ondes péristaltiques déplacent le chyme le long de la muqueuse

intestinale vers la valve iléo-cæcale. Le temps de transit moyen dans l'intestin grêle est de 3 heures, mais il peut varier entre 1 et 6 heures (Gropper & Smith, 2012).

Le duodénum reçoit le chyme acide provenant de l'estomac *via* le sphincter pylorique. En réponse à la présence du chyme, le tissu exocrine du pancréas (et plus particulièrement les cellules de la paroi du canal de Wirsung) sécrète une solution aqueuse alcaline riche en bicarbonate qui se déverse *via* le canal de Wirsung dans le duodénum et permet de remonter le pH du chyme jusqu'à des valeurs comprises entre 5,9 et 6,8, compatibles avec les activités enzymatiques à venir (Fallingborg, Pedersen, & Jacobsen, 1998). Le pH augmente ensuite progressivement pour atteindre 7,5 au niveau de l'iléon. Le tissu exocrine du pancréas comprend en outre les cellules acineuses, responsables de la sécrétion des enzymes pancréatiques suivantes :

- le trypsinogène, précurseur inactif converti en trypsine (endopeptidase) dans la lumière duodénale par l'entéropeptidase (enzyme sécrétée par les cellules épithéliales du duodénum) ;
- le chymotrypsinogène, converti en chymotrypsine (endopeptidase) par la trypsine dans le duodénum ;
- la procarboxypeptidase, convertie en carboxypeptidase (exo-peptidase) par la trypsine dans la lumière duodénale ;
- la lipase et l'amylase pancréatiques, sécrétées sous formes actives.

Le volume journalier de sécrétions pancréatiques est de 1500 mL chez l'Homme adulte (Oomen et al., 2003). La bile, sécrétée par le foie et stockée dans la vésicule biliaire, est également déversée dans le duodénum par le canal cholédoque, pour un volume total d'environ 500 mL/jour. Composée majoritairement d'eau, de sels minéraux, de lécithine et de sels biliaires, le rôle de la bile est de favoriser la formation de micelles mixtes par l'intermédiaire des sels biliaires afin de solubiliser les lipides alimentaires et de permettre l'accès de la lipase à ses sites d'action (Guerra et al., 2012; Whipple, 1922). Le duodénum traite ainsi environ 5 litres de sécrétions par jour, dont 1 litre de salive, 2 litres de sécrétions gastriques, 1,5 litre de sécrétions pancréatiques et 0,5 litre de bile. De surcroît, l'intestin sécrète entre 1 et 2 litres de mucus par jour par l'intermédiaire des glandes de Brunner de façon à protéger la muqueuse intestinale (à l'instar de la sécrétion de bicarbonate) et la lubrifier pour faciliter le transit (Florey, 1962).

La plus grande partie de la digestion et de l'absorption des nutriments a lieu dans l'intestin grêle proximal (duodénum et jéjunum). Au niveau duodénal se déroule principalement l'absorption de l'eau, des glucides et des électrolytes. Le jéjunum est le site d'absorption de la majorité des macro-

et micronutriments. L'iléon est quant à lui un site complémentaire d'absorption pour le duodénum ; il assure de plus de manière exclusive l'absorption de la vitamine B12 (Figure 7A). Quatre mécanismes permettent l'absorption des nutriments, selon leur nature et leurs propriétés biochimiques (solubilité et taille de la molécule notamment) (Kiela & Ghishan, 2016; Richardson, 2006) (Figure 7B) :

- la diffusion simple à travers la membrane des entérocytes ou au niveau de la jonction entre deux cellules, selon un gradient de concentration ;
- la diffusion facilitée où les molécules sont transportées à travers la membrane des entérocytes grâce à des transporteurs, toujours selon un gradient de concentration ;
- le transport actif grâce à des transporteurs membranaires utilisant l'énergie de la cellule ou un transport couplé à d'autres molécules ;
- la pinocytose, processus minoritaire par lequel les molécules invaginées dans des vésicules traversent la membrane entérocytaire (phénomène non représenté sur la figure).

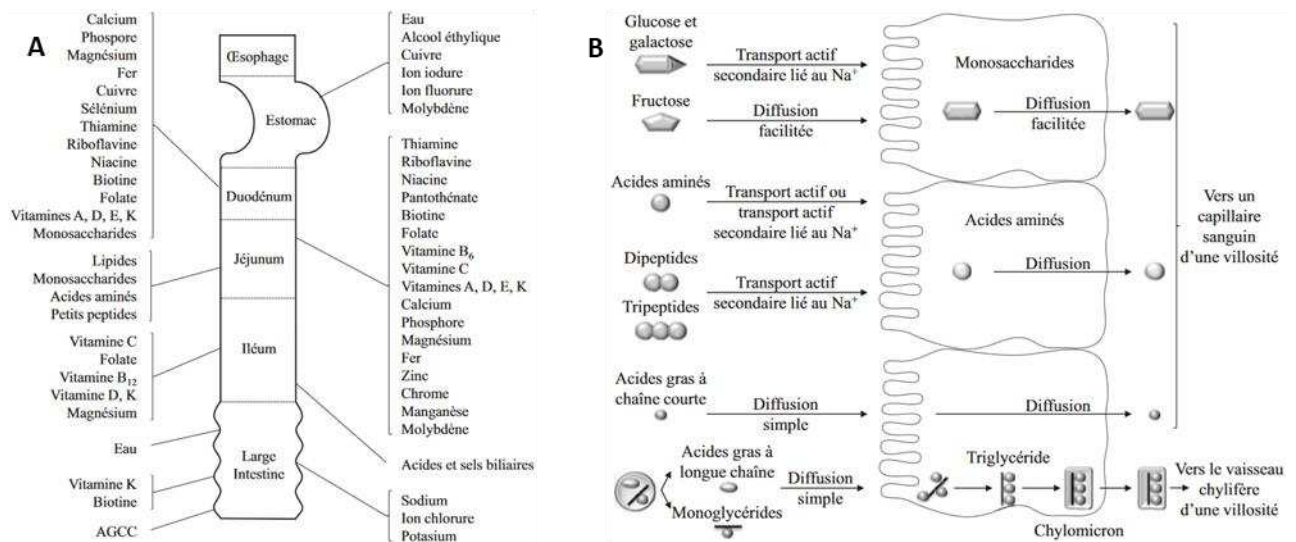


Figure 7 : Localisation et mécanismes de l'absorption intestinale. (A) Sites d'absorption des nutriments. (B) Mécanismes de transports membranaires des nutriments. (d'après Gropper & Smith, 2012; Thévenot, 2014)

La dernière étape de la digestion prend place dans le côlon. Cet organe d'environ 1,5 m de long s'étend de la jonction iléo-cæcale jusqu'à l'anus. Son épithélium est composé majoritairement de cellules produisant du mucus, ayant pour rôle de faciliter la progression des particules alimentaires non digérées et l'élimination de fèces, ainsi que de cellules destinées à l'absorption des nutriments restants et de l'eau, les colonocytes (Litvak, Byndloss, & Bäumlér, 2018). Le matériel intestinal progresse dans le côlon à l'aide des contractions de segmentation. Les

contractions occultent la lumière intestinale puis se dilatent de manière proximale et distale, entraînant la séparation du contenu intestinal et son écoulement. Ce mouvement de va-et-vient produit par les contractions segmentaires produit un puissant effet de mélange (Schulze, 2006). Le temps de transit dans le côlon, dépendant du type d'alimentation et de l'activité physique peut varier entre 12 et 70 heures (Gropper & Smith, 2012). La faible vitesse de propagation permet l'instauration d'un écosystème bactérien au sein du matériel intestinal. Le côlon héberge en effet une communauté microbienne dense, le microbiote, exerçant de nombreuses fonctions physiologiques : fermentation des substrats exogènes (glucides non digérés) et endogènes (notamment les protéines du mucus), synthèse de vitamines hydrosolubles, etc. (Tuddenham & Sears, 2015).

Le phénomène d'absorption au niveau du côlon concerne principalement l'eau, le sodium, le chlorure et les sels biliaires. Le matériel non absorbé – incluant de petites quantités de nutriments, de l'eau, de la matière inorganique, des bactéries et des constituants cellulaires du tractus digestif – forme les fèces et progresse jusqu'au rectum où il est éliminé (Gropper & Smith, 2012).

I.2.2 NOTIONS DE BIOACCESSIBILITÉ ET BIODISPONIBILITÉ

L'efficacité nutritionnelle réelle des nutriments fait appel à deux concepts majeurs: la bioaccessibilité et la biodisponibilité (Figure 8).

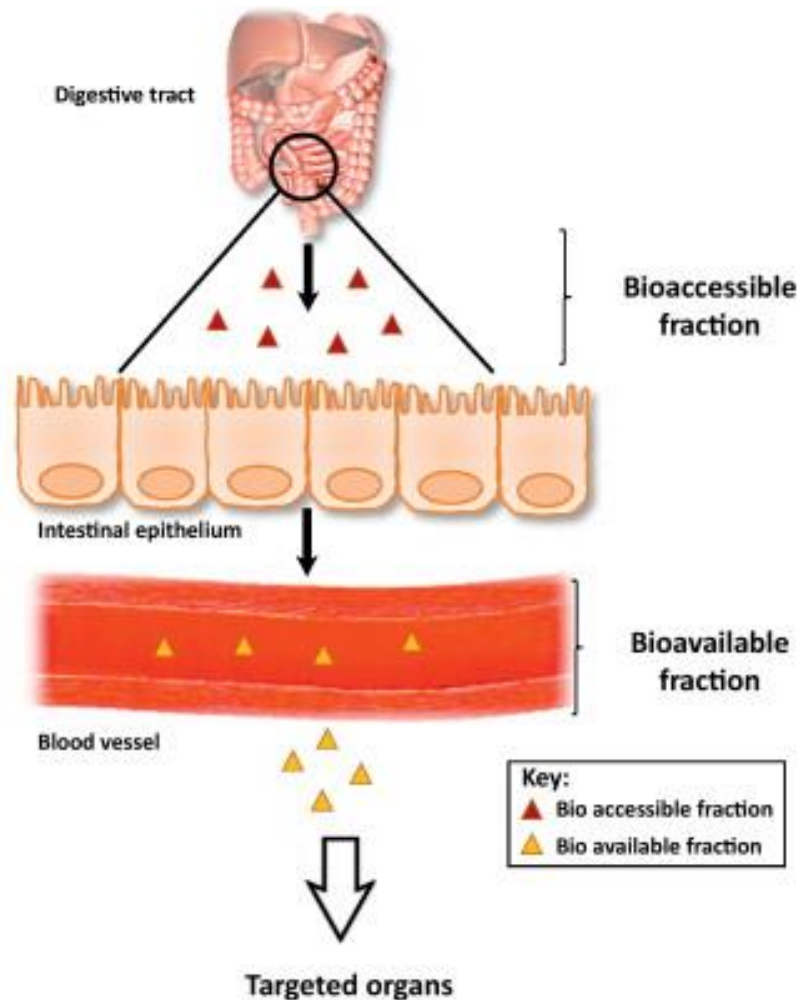


Figure 8 : Fractions bioaccessible et biodisponible des composants ingérés (Guerra et al., 2012).

La bioaccessibilité est la proportion d'un nutriment ingéré qui est libéré de la matrice alimentaire et solubilisé dans les fluides digestifs du tractus gastro-intestinal (Hedrn, Mulokozi, & Svanberg, 2002). Elle dépend donc majoritairement des propriétés structurales et de composition de la matrice alimentaire qui déterminent son aptitude à la déstructuration sous l'effet des contraintes mécaniques (mastication, contraction de l'estomac), chimiques (acidité gastrique) et enzymatiques, et de la solubilité du nutriment considéré dans les fluides digestifs (salive, fluides gastrique et intestinal).

La biodisponibilité représente la fraction d'un nutriment ingéré (ou de ses métabolites) qui est absorbée dans la circulation sanguine et qui est donc disponible pour être stockée ou utilisée pour

une fonction physiologique spécifique (Motilva, Serra, & Rubió, 2015). Elle dépend donc directement de la bioaccessibilité. En effet, pour devenir biodisponible, un composé alimentaire doit en premier lieu être libéré de la matrice durant le processus de digestion, donc être bioaccessible (Shi & Le Maguer, 2000). Elle dépend tout autant de l'efficacité des sites d'absorption, de la présence d'autres composés dans le repas, de l'état physiologique du sujet, etc. (Faulks & Southon, 2005; Gregory, Quinlivan, & Davis, 2005). La biodisponibilité d'un composé est devenu le critère principal pour déterminer l'efficacité nutritionnelle d'un aliment vis-à-vis d'un composé donné et pour avérer les allégations nutritionnelles réglementaires (Holst & Williamson, 2008; Rein et al., 2013).

Après son absorption dans la circulation systémique, il est possible d'étudier la bioactivité d'un composé, plus précisément son effet spécifique après exposition d'un organisme à cette substance. Cela inclut l'absorption par un tissu cible et la réponse physiologique subséquente (anti-inflammatoire ou antioxydante par exemple).

Les études *in vivo* chez l'Homme fournissent des données directes sur la biodisponibilité, mais présentent des inconvénients majeurs en matière de coût et de variabilité des états physiques individuels. Les modèles animaux sont souvent limités par les différences de physiologie digestive et de capacité d'absorption entre les animaux et les humains. Les modèles *in vitro* offrent une alternative aux dosages *in vivo* mais ne permettent de déterminer que la bioaccessibilité d'une substance ingérée.

1.2.3 IMPACT DES TRAITEMENTS TECHNOLOGIQUES SUR LA DIGESTION DES NUTRIMENTS

Les nutriments ne sont pas ingérés purs mais sous forme de matrices alimentaires plus ou moins complexes et possédant dans tous les cas une structure propre. Les interactions entre les différents composés de la matrice influencent leur libération et par conséquent les cinétiques de digestion. La compréhension fine de ces influences est cruciale afin de pouvoir optimiser la fonctionnalité des aliments, ce qui justifie le grand nombre d'études consacrées à ce sujet. Parce que la structure des matrices alimentaires est majoritairement définie par les macronutriments qui les composent, l'impact des traitements technologiques sur le déroulement de la digestion est abordé ici par ses conséquences sur la digestion des macronutriments. L'impact des traitements technologiques sur la digestion des micronutriments est quant à lui abordé en section 1.3.7.

I.2.3.1 LES LIPIDES

Les lipides, naturellement présents au sein des aliments ou ajoutés au cours de la formulation, peuvent subir des modifications de structure sous l'effet des traitements technologiques. Les processus d'homogénéisation ont pour but d'obtenir une diminution de la taille des globules gras ce qui favorise les réactions de lipolyse (Innocente, Biasutti, Venir, Spaziani, & Marchesini, 2009; Islam et al., 2017; Michalski, 2009). Des gouttelettes lipidiques de petite taille facilitent en effet leur digestion par la lipase gastrique du fait d'une plus grande interface eau-lipides (Armand et al., 1999). Ainsi, la vitesse de réaction des lipases pancréatiques, et donc la quantité d'acides gras libérés, est inversement corrélée à la taille moyenne des globules gras d'une émulsion (Armand et al., 1999). Une étude clinique comparant la digestion de trois types de matrices laitières (cream cheese, cheddar et beurre) a montré des différences en termes de concentrations plasmatiques en triglycérides (+44 % par rapport à la teneur basale à 2h postprandiales pour le cream cheese contre +24 % pour le beurre et +16 % pour le cheddar). Ce résultat a été imputé à la différence de diamètre moyen des globules gras dans ces matrices : 0,5 μm pour le cream cheese contre 3 μm pour le cheddar. Cependant aucune différence de biodisponibilité totale des lipides n'a été observée entre les trois matrices (Drouin-Chartier et al., 2017). Enfin, un pic d'absorption des triglycérides significativement plus tardif a été observé suite à la consommation de 30 g de lipides sous forme de beurre par rapport à de la mozzarella ou du lait, alors que la quantité totale de triglycérides absorbés au cours des 6 h de l'étude était similaire. En conclusion, bien que la structure physique des aliments riches en matières grasses n'ait pas d'effet majeur sur les concentrations plasmatiques postprandiales de triglycérides, elle peut influencer le moment du pic d'absorption des triglycérides et donc les cinétiques de lipolyse. Le temps de vidange gastrique ne semble pas jouer un rôle majeur dans la modulation de la réponse postprandiale des triglycérides (Clemente et al., 2003).

I.2.3.2 LES PROTÉINES

Les traitements thermiques sont les processus technologiques ayant le plus d'impact sur les protéines. Sous l'effet de la chaleur, les protéines se dénaturent, plus précisément elles subissent des modifications de leur structure tridimensionnelle, et ce potentiellement à plusieurs niveaux (Bryant & McClements, 1998). Ces modifications résultent essentiellement de la rupture de liaisons intramoléculaires : ponts disulfures, liaisons hydrogène, liaisons de Van der Waals. Il peut en résulter, au niveau de la structure secondaire, la perte de motifs répétitifs (double-hélice, feuillet) au profit de structures aléatoires. Au niveau de la structure tertiaire, cela peut se traduire par une modification du repliement de la protéine et l'exposition en surface de zones

hydrophobes initialement enfouies au cœur de la protéine native. Au niveau de la structure quaternaire, les sous-unités protéiques peuvent se séparer ou bien voir leur position spatiale altérée (Dill & Shortle, 1991). Pour les protéines ayant une fonction biologique (activité enzymatique par exemple), la dénaturation est habituellement définie comme la perte de cette fonction. La dénaturation est un phénomène irréversible pour la majorité des protéines (Lechevalier, Croguennec, Anton, & Desfougères, 2010; Wijayanti, Bansal, & Deeth, 2014). Le niveau de dénaturation des protéines au sein des aliments dépend du barème de température appliqué au produit (Michalski & Januel, 2006). Du fait des modifications structurales qu'ils engendrent au niveau moléculaire et des déséquilibres thermodynamiques qu'ils induisent, les traitements thermiques se traduisent souvent par des phénomènes d'agrégation intermoléculaire, voire une gélification si la concentration en protéines est suffisante (Munialo, Euston, & de Jongh, 2018; Ziegler & Foegeding, 1990).

La dénaturation peut être soit bénéfique, soit néfaste sur le plan de la digestibilité des protéines. La cuisson par extrusion détruit par exemple les facteurs antinutritionnels tels que les inhibiteurs de trypsine présents dans certains extraits protéiques végétaux, ce qui favorise leur digestion (Alonso, Orúe, & Marzo, 1998). La modification de la structure des protéines peut également améliorer leur digestibilité, comme cela a été démontré dans le cas de la pasteurisation des protéines laitières et notamment de la β -caséine (Deglaire et al., 2019). Les protéiques sériques telles que la β -lactoglobuline et l' α -lactalbumine sont également résistantes à la protéolyse *in vitro* alors qu'elles deviennent plus sensibles à l'hydrolyse en phase gastrique après un traitement thermique (Dupont et al., 2010; Mandalari et al., 2009). Au contraire, la réaction de Maillard, qui est favorisée par les fortes températures et qui intervient entre un groupement aminé libre d'une protéine et un groupe carbonyle d'un sucre réducteur, entraîne une diminution de la disponibilité des acides aminés impliqués et donc de la digestibilité des protéines (Öste & Sjödin, 1984; Seiquer et al., 2006). Il en est de même de composés toxiques tels que l'acrylamide qui sont formés lors de traitements thermiques intenses des protéines (Singh, Gamlath, & Wakeling, 2007). Ainsi, du fait des hautes températures appliquées dans le processus de fabrication des amandes grillées, la vidange gastrique des protéines est significativement ralentie par rapport aux amandes fraîches (Bornhorst, Roman et al., 2013).

1.2.3.3 LES GLUCIDES

La teneur et la qualité nutritionnelle des glucides alimentaires peuvent être modifiées de plusieurs façons lors des traitements technologiques requis pour la production ou la cuisson des aliments avec des effets désirables ou au contraire négatifs sur la valeur nutritive.

Un des premiers effets observés est la perte en glucides de faibles poids moléculaire (mono ou disaccharides) dans l'eau de cuisson lors du blanchiment ou d'une cuisson à l'eau bouillante. Très variable selon le type d'aliments considérés, elle représente une perte de 25 % et 45 % respectivement dans le cas de carottes ; 12 % pour le blanchiment et 25 % pour la cuisson des choux de Bruxelles (Nyman, 1995). Ces pertes concernent davantage le glucose et le fructose que le saccharose (Svanberg, Nyman, Andersson, & Nilsson, 1997). Les fibres ne semblent au contraire pas être affectées puisqu'aucune perte n'a été constatée lors de la cuisson à l'eau de ces légumes (Nyman, 1995).

Sous l'effet des traitements thermiques, plusieurs réactions biochimiques peuvent affecter les glucides. Le brunissement non-enzymatique (ou réaction de Maillard) qui affecte le groupe carbonyle d'un sucre réducteur sous l'effet des fortes températures n'entraîne pas de diminution notable de la biodisponibilité des glucides (Öste, Sjödin, Jägerstad, Björck, & Dahlqvist, 1985). Le phénomène de gélatinisation, qui consiste en la perte irréversible de la structure semi-cristalline du grain d'amidon, se produit lors d'un chauffage supérieur à 50°C d'une solution d'amidon en excès d'eau. Après une première phase de gonflement des grains d'amidon, ceux-ci éclatent lorsque le chauffage se prolonge à une température supérieure à 100°C, et dispersent dans le milieu leur contenu composé de chaînes d'amylose et d'amylopectine (Tako, Tamaki, Teruya, & Takeda, 2014). Cette réaction physicochimique facilite considérablement l'accès des enzymes amylolytiques à leur substrat, conduisant à une biodisponibilité supérieure des glucides (FAO, 1998). Suite à la gélatinisation de l'amidon, un phénomène de rétrogradation se produit progressivement au cours du refroidissement, impliquant en premier lieu les chaînes d'amylose qui se réassocient en doubles hélices. La formation de ce réseau diminue légèrement la biodisponibilité des glucides, mais elle reste tout de même supérieure à celle des granules d'amidon (Granfeldt, Hagander, & Björck, 1995; Hagander et al., 1987). Dans les produits céréaliers tels que le pain, le gluten forme un réseau viscoélastique autour des grains d'amidon, empêchant le phénomène de gélatinisation de se produire. Cela entraîne donc la formation d'amidon résistant, dont la digestion consiste principalement en une fermentation au niveau du côlon et dont la biodisponibilité est par conséquent moindre (Englyst, Kingman, & Cummings,

1992; Granfeldt et al., 1991). Des amidons ou oligosaccharides résistants, produits par génie enzymatique, sont couramment utilisés dans des aliments dits fonctionnels. Très peu digérés et absorbés dans le duodénum, l'objectif de ces glucides est de pouvoir nourrir la flore bactérienne du microbiote, à la manière des prébiotiques. A l'instar du réseau de gluten, la biodisponibilité de ces glucides est amoindrie (Bornet, 1994).

1.2.4 MODÈLES DE DIGESTION

Il paraît *a priori* logique que les études conduites sur le thème de la digestion soient menées directement chez l'Homme. Néanmoins, en fonction des considérations éthiques, financières ou des besoins techniques, l'utilisation de modèles *in vivo* animaux ou *in vitro*, voire *in silico*, peut s'avérer dans certains cas plus judicieuse. C'est pourquoi des modèles simulant avec plus ou moins d'exactitude et de précision l'environnement physico-chimique et physiologique complexe du tractus digestif humain ont été développés.

1.2.4.1 MODÈLES *IN VIVO*

1.2.4.1.1 Le modèle humain

Les études sur la mastication sont généralement menées directement chez l'Homme. Elles sont peu invasives, faciles à mettre en œuvre, peu coûteuses et peuvent parfois être réalisées sur un grand nombre de volontaires simultanément lorsqu'elles ne requièrent pas l'implication d'un personnel technique. L'étude des cycles de mastication et l'analyse des bols alimentaires formés sont ainsi couramment réalisés (Bornhorst, Kostlan, & Singh, 2013; Motoi, Morgenstern, Hedderley, Wilson, & Balita, 2013; Marie-Agnès Peyron et al., 2011).

L'accès au tube digestif humain est quant à lui plus difficile. C'est pourquoi il a longtemps été considéré comme une boîte noire. Chez les patients ayant subi une iléostomie, l'accès direct aux digestas *via* une poche externe permet la réalisation de mesures de digestibilité assez proches des valeurs sur patients sains (Evenepoel et al., 1999). Les études réalisées sur des patients jéjunostomisés permettent quant à elles de se focaliser sur la digestion gastrique (Mahé, Messing, Thuillier, & Tomé, 1991). Une autre méthode directe consiste en la pose de sondes nasales avant le repas pour collecter les chymes à différents endroits du tube digestif. Outre leur nature invasive et inconfortable pour les patients, la représentativité des échantillons collectés par ces sondes est biaisée du fait de leur faible diamètre, limitant la collecte des particules (Gaudichon, 2013). Un des avantages de cette méthode réside cependant dans le fait que le volume stomacal est

mesurable au moment du prélèvement par injection d'un marqueur puis calcul de la dilution résultante (Borel et al., 2001).

Pour pallier les inconvénients des méthodes directes, les méthodes d'imagerie se sont beaucoup développées depuis la fin des années 1960. La scintigraphie, reposant sur l'ingestion d'un repas contenant un radio-isotope, permet par suivi de la radioactivité par gamma-caméra de mesurer la vidange gastrique (Griffith, Owen, Kirkman, & Shields, 1966). La technique d'imagerie par résonance magnétique (IRM) se base sur l'ingestion d'un produit de contraste au moment du repas puis sur la prise d'images de coupes stomacales, réassemblées en images 3D pour évaluer les cinétiques digestives (Marciani et al., 2006). Une méthode de mesure du volume stomacal par échographie a à son tour été proposée (Bolondi et al., 1985). Cependant, l'utilisation de ces techniques est aujourd'hui marginale du fait de leur coût (IRM), de leur caractère irradiant (scintigraphie) ou de leur imprécision (ultrasons). De plus, elles ne fournissent d'informations que sur la partie gastrique du tractus digestif (Gaudichon, 2013).

Enfin, certaines mesures indirectes se basent sur l'ingestion d'un marqueur dans le repas, puis la mesure de son excrétion dans les rejets corporels. L'utilisation de la caféine et son excrétion dans la salive montrent ainsi de bonnes corrélations sur les mesures de vidange gastrique avec une méthode IRM (Sager et al., 2018). La mesure du ^{13}C expiré, bien qu'étant davantage une méthode de comparaison, donne également de bons résultats en cinétiques (Sanaka & Nakada, 2010). Le suivi postprandial des nutriments dans le sang (acides aminés par exemple) est également un témoin indirect des cinétiques de digestion. La vidange gastrique peut de cette façon être mesurée après ingestion d'une dose de paracétamol, en suivant son apparition dans le compartiment sanguin (van Wyk, Sommers, Snyman, & Moncrieff, 1995).

Cependant, les problèmes d'éthique, de coûts et le manque d'accessibilité aux différentes parties du tractus digestif astreignent souvent à se tourner vers d'autres modèles *in vivo*, les modèles animaux.

1.2.4.1.2 Les modèles animaux

Afin de pallier les difficultés évoquées ci-dessus, l'utilisation d'un modèle animal est courante. Plusieurs espèces d'animaux ont permis d'accroître les connaissances scientifiques dans le domaine de la nutrition car, contrairement aux études chez l'Homme, il est possible de réaliser

des gestes plus invasifs afin d'analyser en détail les mécanismes de déstructuration de la digestion par exemple (Baker, 2008).

Les éléments constitutifs du système digestif sont similaires chez les mammifères et vertébrés non mammifères, et dans une large mesure chez les invertébrés (Figure 9). Les divergences les plus grandes sont observées en termes anatomiques, les organes témoignant des évolutions inter-espèces en fonction de l'alimentation disponible dans l'environnement, mais également de l'anatomie générale des animaux (position debout, présence d'un pouce opposable, etc.). En revanche, les similitudes sont importantes au niveau cellulaire et moléculaire. Des extrapolations entre espèces largement séparées dans leurs physiologies digestives sont donc possibles.

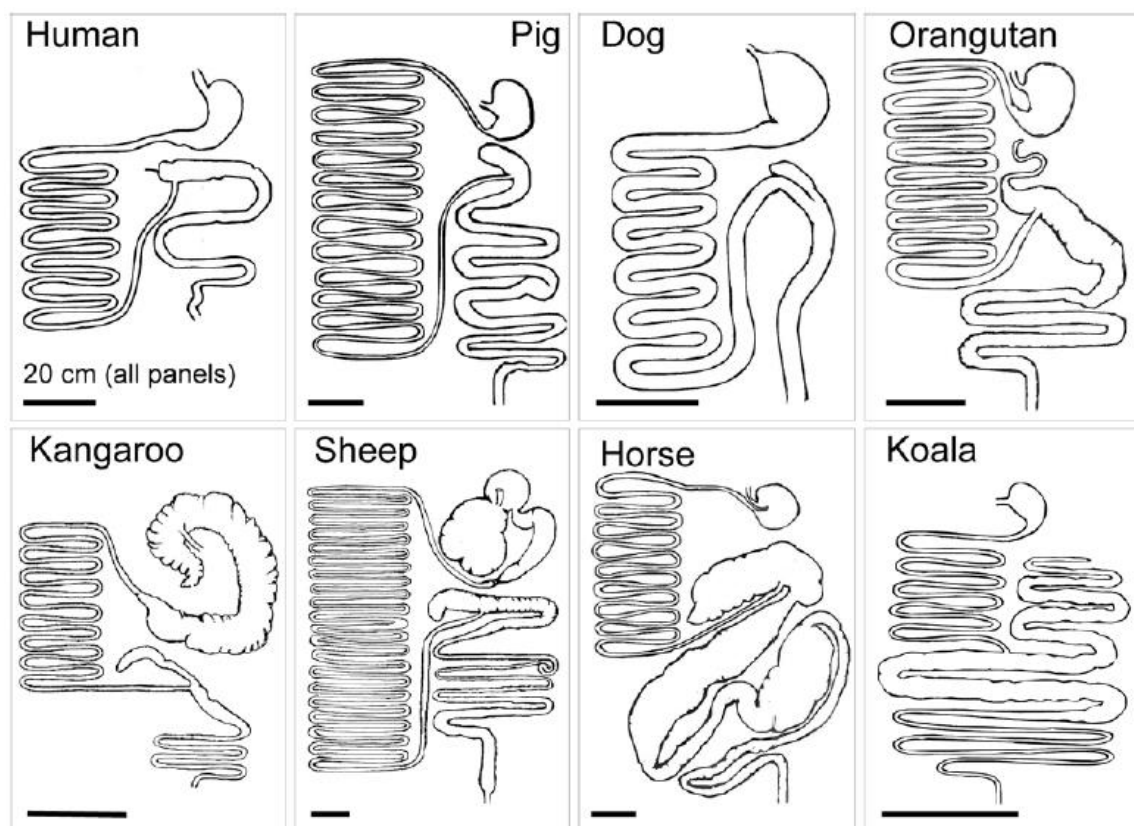


Figure 9 : Comparaison de l'anatomie digestive de différents vertébrés (Furness, Cottrell, & Bravo, 2015).

De nombreux modèles ont dès lors été testés selon les besoins des différentes études :

- le primate (Handelman, Snodderly, Adler, Russett, & Dratz, 1992; Krinsky et al., 1990; Slifka, Bowen, Stacewicz-Sapuntzakis, & Crissey, 1999; Snodderly, Handelman, & Adler, 1991; Snodderly, Russett, Land, & Krinsky, 1990) ;
- la gerbille (Lee, Lederman, Hofmann, & Erdman, 1998; Pollack, Campbell, Potter, & Erdman, 1994; Thatcher, Lee, & Erdman, 1998) ;
- le mouton (Gomez, Lallès, Bogaërt, & Poncet, 1992; Thielemans et al., 1978) ;

- le furet (Tang, Dolnikowski, Blanco, Fox, & Russell, 1993; White, Peck, Ulman, & Erdman, 1993) ;
- le veau pré-ruminant (Hammon et al., 2018; Montagne, Créviu-Gabriel, Toullec, & Lallès, 2003) ;
- le hamster (Schwartz & Shklar, 1987) ;
- le poulet (Erdman, Fahey, & White, 1986; Tyczkowski & Hamilton, 1986) ;
- le lapin (Sun, Giraud, Moxley, & Driskell, 1997; Yap, Choo, Hew, & Goh, 1997) ;
- le chien (Chew et al., 1998; Kim et al., 1998) ;
- le chat (Kim et al., 2000; Parks, Chew, Hayek, Massimino, & Reinhart, 2004) ;
- la caille (Dorey et al., 1998).

Le primate semble intuitivement être le modèle idéal du fait de ses origines communes avec l'Homme, entraînant une parfaite similitude dans leurs systèmes digestifs (Diogo, Muchlinski, & Hartstone-Rose, 2015). Cependant, les contraintes éthiques et financières motivent l'adoption d'autres modèles animaux, dont les plus répandus sont le rat et le porc (Baker, 2008).

Le rat présente l'avantage d'être facile à manipuler, peu coûteux et son système digestif est proche de celui de l'Homme. Il est donc couramment utilisé pour des mesures de digestibilité totale. Cependant, il présente quelques altérités majeures avec la physiologie humaine (DeSesso & Jacobson, 2001). Le rat possède en premier lieu un pré-estomac destiné à la digestion bactérienne suivi d'un estomac glandulaire, lieu de la digestion enzymatique. Il ne dispose pas de vésicule biliaire et son cæcum est très développé alors qu'il est pratiquement inexistant chez l'Homme (Wisker, Bach Knudsen, Daniel, Feldheim, & Eggum, 1996). Sur le plan comportemental, le rat fractionne ses apports alimentaires toute la journée, contrairement à l'Homme qui consomme généralement 3 à 4 repas par jour, à des heures définies. De plus, le rat pratique la coprophagie, ce qui impacte les mesures de digestibilité fécale (Williams & Senior, 1985). Enfin, s'il est possible de prélever facilement des digestas dans les différentes parties de son tractus digestif, sa petite taille induit le prélèvement d'échantillons de faible volume, peu compatibles avec l'étude de micronutriments par exemple (Guilloteau, Zabielski, Hammon, & Metges, 2010).

Le porc présente quant à lui une physiologie, notamment gastrique, et un comportement alimentaire analogues à ceux de l'humain et occupe donc une place de premier choix pour les études nutritionnelles aujourd'hui. Après pose de canules et cathéters, il est possible d'accéder à la fois aux effluents gastriques ou intestinaux et au compartiment sanguin, permettant l'étude de la dégradation de l'aliment, des flux de nutriments et de la biodisponibilité au cours du transit

(Miller & Ullrey, 1987; Patterson, Lei, & Miller, 2008). De plus, la digestion et le métabolisme des glucides, des prébiotiques, des lipides et des acides aminés produisent des métabolites similaires et engendrent les mêmes effets sur le développement du tractus digestif, faisant du porc un modèle plus comparable à l'Homme que d'autres espèces de primates. Toutefois, il existe des divergences importantes. Les porcs ont un cæcum fonctionnel, un côlon plus gros et un microbiote endogène différent (la présence de *Bifidobacterium* est faible ou inexistante notamment, alors qu'il s'agit une espèce microbienne majoritaire chez l'Homme) (Sciascia, Daş, & Metges, 2016). Pour se soustraire à ces différences de microbiotes, des modèles animaux gnotobiotiques ont été développés. Initialement microbiologiquement stériles, les animaux sont inoculés avec un microbiote humain afin de pouvoir étudier spécifiquement les interactions hôte/bactéries et la digestion d'aliments dans un environnement proche des conditions retrouvées dans le côlon humain (Bry, Falk, Midtvedt, & Gordon, 1996). Cependant, ce modèle n'est pas idéal sur le long terme car on observe une sélection des espèces au fil du temps, le microbiote inoculé s'éloignant alors du microbiote humain.

Un même animal peut être conservé tout au long d'une cinétique ou bien utilisé pour tester différents repas, ce qui permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaires au déroulement d'une étude. Toutefois, les interventions chirurgicales pour la pose des canules sont onéreuses et techniques, et l'entretien des porcs nécessite une présence humaine régulière.

L'étape de mastication est indispensable pour mimer de manière convenable la cinétique de libération des nutriments. Or, elle diffère grandement d'un animal à l'autre selon son régime alimentaire et son efficacité masticatoire (lubrification de l'aliment, déglutition, type de dentition, etc.). Le compromis entre adéquation du modèle masticatoire et de la physiologie digestive est donc difficile à trouver, d'autant plus que cette étape de la digestion a été très peu étudiée chez les animaux (Lucas et al., 2006; Pérez-Barbería & Gordon, 1998; Van Der Bilt, 2011).

Les études *in vivo* sur animaux fournissent néanmoins des résultats plus réalistes que les études *in vitro*, en raison notamment des mécanismes de rétrocontrôle inhérents aux êtres vivants (Nicholl, Polak, & Bloom, 1985), et impossibles à reproduire *in vitro*. Mais elles sont dispendieuses et nécessitent une présence humaine sur une période longue. De plus, elles requièrent l'obtention d'autorisation des comités d'éthique et l'utilisation d'un grand nombre d'individus pour tenir compte des variations interindividuelles. C'est pourquoi il a été nécessaire de développer des modèles de digestion *in vitro* permettant en outre, tout en reproduisant de manière fidèle les

conditions d'une digestion, de limiter l'étude à un seul compartiment digestif, un nutriment ou bien un métabolite.

1.2.4.2 LES MODÈLES *IN VITRO*

La volonté de reproduire un système digestif dans le but de décrypter les mécanismes de la digestion est ancienne puisque les premières études documentées datent du XVIII^{ème} siècle. Pour preuve, l'abbé Lazzaro Spallanzani écrivait en 1777, dans son ouvrage *Expériences sur la digestion de l'Homme et de différentes espèces d'animaux* : « *J'en fis entrer (du suc gastrique humain) dans un tube en verre (...); je mis avec ce suc quelques brins de chair de bœuf cuits et mâchés (...). Je le plaçai dans un fourneau où on éprouvait à peu près la chaleur de mon estomac* » (Spallanzani, 1777). Bien que surannés, ces écrits prouvent l'intérêt ancien des scientifiques pour ce phénomène naturel qu'est la digestion.

Depuis lors, les modèles se sont améliorés et les études *in vitro* sont de plus en plus utilisées en tant qu'alternative aux modèles *in vivo*. Ils permettent en effet de limiter les coûts inhérents aux chirurgies des animaux, de s'affranchir des contraintes éthiques, de limiter les variations interindividuelles et donc d'améliorer la reproductibilité. De plus, ils permettent la réalisation d'études éthiquement impossibles chez l'Homme (études de substances toxiques, survie de pathogènes, etc.). Une très large gamme de modèles de digestion a ainsi été développée, différant par les parties du système digestif étudiées (bouche, estomac, intestin ou combinaison des trois) ou par leur type (statique, dynamique ou semi-dynamique).

1.2.4.2.1 Les modèles statiques

Les modèles de digestion les plus simples sont les modèles statiques mono-compartimentés. Ils reproduisent successivement dans un seul récipient les phases orales, gastriques et/ou intestinales en ajoutant les enzymes correspondantes, d'origine humaine ou animale (Englyst, Kingman, Hudson, & Cummings, 1996). Aucun système à ce jour n'inclut la fermentation colique mais des modèles disposant de systèmes de dialyse mimant une absorption intestinale ont été développés (Miller, Schrickler, Rasmussen, & Van Campen, 1981).

Les modèles statiques sont couramment utilisés car ils sont faciles à mettre en œuvre et ne requièrent pas d'équipements particuliers. Les paramètres sont instaurés en début de chaque phase de digestion et ne varient pas. Les modèles ne prennent ainsi pas en compte les courbes d'acidification de pH ou les mouvements péristaltiques. Les quantités d'enzymes sont constantes tout au long de la digestion et il n'y a pas de temps de transit ni de système de vidange entre les

compartiments. Un protocole a été développé par le réseau scientifique international INFOGEST afin d'harmoniser les pratiques des laboratoires de recherche en matière de digestion statique (Brodkorb et al., 2019; Minekus et al., 2014). Ce modèle standardisé, bien que simpliste, a été validé sur des études de digestibilité et est particulièrement adapté à l'étude d'aliments simples, de nutriments isolés ou lors d'étapes préliminaires de criblage avant l'utilisation d'un système plus complexe. Les modèles statiques sont pareillement souvent utilisés pour avancer les preuves de la bioaccessibilité d'un composé bioactif et de ce fait justifier les demandes d'allégations nutritionnelles (Fernández-García, Carvajal-Lérida, & Pérez-Gálvez, 2009).

Pour l'étude d'aliments solides, il est nécessaire de simuler l'étape de mastication. Cependant, l'étape orale de déstructuration alimentaire est très souvent mal simulée dans les études de digestion et n'est parfois même pas considérée. De nombreuses études statiques sont menées avec un bolus simulé par hachage, mélange ou broyage, ne tenant nullement compte des propriétés physiologiques d'un bolus en termes de distribution granulométrique ou de l'action de la salive dans le bol alimentaire (Bornhorst & Singh, 2013; Giuseppina Mandalari et al., 2018). Des simulateurs de mastication artificielle ont été développés afin de pallier ce problème, reproduisant plus ou moins fidèlement une mastication humaine : du simple hachage des aliments (Hoebler et al., 2002), aux modèles fondés sur la reproduction d'une bouche et dentition humaine pour modéliser la libération d'arômes (Meullenet & Gandhapuneni, 2006; Salles et al., 2007), ou bien sur la reproduction fidèle d'un bolus mastiqué par l'Homme (Woda et al., 2010). Un bol alimentaire produit par un simulateur de mastication est de ce fait plus réaliste, plus proche de la matière passant par l'œsophage et arrivant dans l'estomac, et il peut donc être consécutivement soumis à un modèle de digestion *in vitro* statique, semi-dynamique ou dynamique (Peyron et al., 2019; Peyron & Woda, 2016).

I.2.4.2.2 Les modèles semi-dynamiques

Les modèles semi-dynamiques sont basés sur l'utilisation du pH-stat pour enregistrer et compenser les variations de pH du milieu dans le but de le maintenir à une valeur stable, ou bien de lui faire suivre une courbe d'acidification. La neutralisation par la soude peut par exemple être mise en œuvre pour compenser l'acidification par les ions libérés lors de l'hydrolyse d'une liaison peptidique (Garcia, 2016; Yasumaru & Lemos, 2014) ou par la libération d'acide gras (Bourlieu et al., 2015; Li & McClements, 2010; Mat, Le Feunteun, Michon, & Souchon, 2016; Scheuble et al., 2018; Thomas, Holm, Rades, & Müllertz, 2012). Ce type de modèles est adapté à l'étude d'un couple macronutriment (ou substrat) /enzyme spécifique, mais ne peut pas être utilisé pour

étudier la digestion d'aliments complexes. De plus, il ne considère qu'un seul compartiment et n'intègre donc pas de système de vidange gastrique (McClements & Li, 2010).

1.2.4.2.3 Les modèles dynamiques

Les modèles de digestion dynamiques, plus adaptés à l'étude d'aliments structurés et complexes, prennent en compte l'évolution au cours de la digestion de certains phénomènes biochimiques et mécaniques qui se déroulent dans le tractus digestif humain. Ces systèmes sont de ce fait plus proches physiologiquement de ce qui se passe chez l'Homme : l'acidification en phase gastrique, les flux d'enzymes et de sécrétions et les vidanges gastro-intestinales peuvent être reproduits (Bellmann, Lelieveld, Gorissen, Minekus, & Havenaar, 2016; Ménard & Dupont, 2014). Afin de paramétrer au mieux ces systèmes, il est nécessaire de disposer de données obtenues *via* des études *in vivo* sur la population souhaitée (enfant, adulte ou sénior) : vitesses des vidanges gastrique et intestinale, courbes d'acidification gastrique, débit de sécrétions enzymatiques, etc. Certains modèles sont dotés de pompes ou de systèmes de brassage dans le but de reproduire les mouvements péristaltiques et les contractions des parois gastriques (Chen et al., 2016; Hur, Lim, Decker, & McClements, 2011; Kong & Singh, 2008; Wang et al., 2019).

Ces systèmes de digestion *in vitro* dynamiques sont des outils performants, mais à ce jour ils permettent essentiellement d'évaluer la bioaccessibilité. Cependant, certains modèles peuvent simuler l'absorption des nutriments par l'intermédiaire de systèmes de dialyse (Wickham, Faulks, & Mills, 2009). Afin d'évaluer la biodisponibilité des nutriments, certains systèmes ont même été couplés à des cellules intestinales humaines en culture (Caco-2) (Déat et al., 2009; Delie & Rubas, 1997).

1.2.4.3 MODÈLES IN SILICO

L'accumulation de données liée à la croissance exponentielle du nombre d'études de digestion permet aujourd'hui de développer des modèles mathématiques afin de remplacer partiellement l'observation expérimentale (Lefebvre et al., 2015). Cette approche *in silico*, établie sur la mise en équations des phénomènes biochimiques, permet de prédire les cinétiques de dégradation des aliments durant la mastication, l'absorption des nutriments, la vidange gastrique ou encore les cinétiques d'hydrolyse des macronutriments (Marze, 2017; Moxon & Bakalis, 2016; Moxon, Gouseti, & Bakalis, 2016). Les études *in silico* ne peuvent toutefois pas remplacer totalement les études *in vitro* et *in vivo*, car elles s'appuient sur les résultats de ces dernières pour créer leurs

modèles. Néanmoins, la modélisation constitue un outil complémentaire aux autres méthodes afin de rassembler les connaissances accumulées et les extrapoler à l'étude de nouveaux aliments.

I.2.4.4 CORRÉLATIONS ENTRE LES MODÈLES *IN VIVO* ET *IN VITRO*

Afin de valider les modèles *in vitro* développés, des mesures comparatives par rapport à un modèle *in vivo* (humain ou animal) peuvent parfois être réalisées. La corrélation entre les résultats *in vivo* et *in vitro* est alors vérifiée, dans la mesure du possible toutefois. En effet, si des modèles de digestion *in vitro* centrés sur la libération de contaminants ou de substances toxiques ont été développés, il n'est pas éthiquement imaginable de pratiquer une étude *in vivo* pour pouvoir valider ces modèles *in vitro* (Brandon et al., 2006). Quoiqu'il en soit, différentes études ont avéré la justesse des modèles statiques (Bohn et al., 2018; Egger et al., 2016, 2017; Van de Wiele et al., 2007), semi-dynamiques (Scheuble et al., 2018) ou dynamiques (Egger et al., 2019; Guerra et al., 2016; Ménard et al., 2014).

Les systèmes *in vitro*, lorsqu'ils sont programmés de manière physiologique, sont donc pertinents pour mimer le système digestif humain. Cependant, si un modèle *in vitro* a été validé pour un type d'aliment en particulier, l'extrapolation à un tout autre type d'aliment ou de texture est périlleuse, et nécessite inéluctablement des études complémentaires (Dupont et al., 2019; Emami, 2006). Les études *in vitro* découlent nécessairement d'observations et de paramètres déterminés par l'intermédiaire des études *in vivo*. Le modèle *in vitro* idoine devrait fournir rapidement des résultats en adéquation avec ceux provenant d'études *in vivo*, quelle que soit la complexité des aliments digérés ou la question de recherche. En pratique, les résultats d'études *in vitro* diffèrent de ceux obtenus *in vivo* compte tenu de la complexité du phénomène de digestion et du système hormonal qui lui est associé. Un compromis entre facilité de mise en œuvre et réalisme nécessaire est donc à trouver en fonction des résultats attendus, pour permettre de choisir le modèle de digestion le plus pertinent (Sun Jin Hur et al., 2011).

I.3 LES MICRONUTRIMENTS

Par le biais de l'alimentation, l'organisme d'un Homme adulte reçoit environ 2,9 kg de nutriments par jour, que l'on peut diviser en deux grandes catégories : les macronutriments, responsables de l'apport énergétique et des constituants pour l'anabolisme, et les micronutriments, généralement supports du métabolisme.

I.3.1 PRÉSENTATION GÉNÉRALE

Du fait de leur rôle essentiel dans le support du métabolisme, la plupart des micronutriments ont été découverts à l'occasion de recherches consécutives à des états de carence et de la découverte de traitements préventifs ou palliatifs par l'alimentation. En 1905, le Dr. Fletcher étudie les causes d'une maladie courante en Inde, le béribéri, et découvre qu'elle touche particulièrement les marins consommant du riz blanc poli. Sa première hypothèse est que le riz blanc contient une toxine dont l'action est inhibée par une antitoxine présente dans le son de riz (Carpenter, 2000; Fletcher, 1993). Mais l'isolement de la molécule en 1912 par Kazimierz Funk permet la caractérisation de la première « amine vitale », appelée vitamine B en raison de la maladie dont elle protège (Guillaume, 2014; Maltz, 2013). Cette découverte est rapidement suivie par celle de la vitamine A, puis des autres vitamines du groupe B. Le développement depuis 1950 des techniques d'analyse des traces et microquantités de molécules dans les aliments a permis par la suite l'étude systématique des micronutriments. Le signe le plus courant de l'importance d'un micronutriment est l'apparition d'une maladie ou d'un trouble lors de son absence d'un régime alimentaire, mais cela n'est pas avéré dans tous les cas car des voies de synthèse endogènes ou bien des mécanismes de compensation peuvent exister (Fraser et al., 1989).

Les micronutriments sont définis comme étant des nutriments sans valeur énergétique, apportés le plus souvent par l'alimentation (ils représentent 2 % des nutriments ingérés) et qui nécessitent d'être présents en faible quantité pour participer à l'accomplissement d'une fonction corporelle. Ils peuvent agir en tant que :

- Cofacteurs, en modulant l'activité d'une enzyme. Le zinc joue un rôle de cofacteur dans plus de 100 réactions enzymatiques (Maret, 2013).
- Coenzymes. La riboflavine et la niacine jouent un rôle actif dans la chaîne de transport des électrons (Pinto & Zempleni, 2016).
- Régulateurs génétiques. Les « doigts de zinc » (« zinc finger ») sont des facteurs de contrôle de la transcription des récepteurs des hormones stéroïdes (Bird, 2003).

- Antioxydants. Plusieurs composants du système de défense du corps humain contre le stress oxydatif sont des micronutriments (vitamines C et E) ou s'appuient sur des micronutriments (les superoxyde dismutases sont des métalloprotéines contenant un atome de zinc, de cuivre ou de manganèse) (Evans & Halliwell, 2001; Fukai & Ushio-Fukai, 2011).

Le corps humain a besoin de 49 nutriments essentiels, c'est-à-dire qu'il ne sait pas synthétiser, afin de couvrir ses besoins métaboliques (Table 1). Mais d'innombrables autres substances bénéfiques présentes dans les aliments sont également connues pour contribuer à une bonne santé. Un apport inadéquat en un ou plusieurs de ces nutriments entraîne une situation de carence pouvant mener au développement de troubles métaboliques néfastes, situation généralement reprise sous le terme de « malnutrition » (Welch & Graham, 2004).

Table 1 : Nutriments essentiels au métabolisme humain (d'après Welch & Graham, 2004)

Eau et énergie	Acides aminés	Acides gras	Macroéléments minéraux	Microéléments minéraux	Vitamines
Eau	Histidine	Acide linoléique	Sodium	Fer	A
Glucides	Isoleucine	Acide linoléique	Potassium	Zinc	D
	Leucine		Calcium	Cuivre	E
	Lysine		Magnésium	Manganèse	K
	Méthionine		Soufre	Iode	C
	Phénylalanine		Phosphore	Fluor	B1
	Thréonine		Chlorure	Bore	B2
	Tryptophane			Sélénium	B3
	Valine			Molybdène	B5
				Nickel	B6
				Chrome	B8
				Vanadium	B9
				Silicium	B12
				Arsenic	
				Etain	
				Cobalt	

Dans la suite de ce chapitre, la notion de malnutrition sera approfondie, et les quatre micronutriments étudiés dans cette thèse (vitamine D, lutéine, vitamine B9 et vitamine B12) seront présentés de manière détaillée. Une dernière partie portera sur les facteurs modulant la biodisponibilité des micronutriments.

I.3.2 MALNUTRITION

Trois situations sont le reflet de la malnutrition observée actuellement dans le Monde (Ritchie & Roser, 2017) :

- la sous-alimentation : les apports énergétiques sont inférieurs au niveau minimal nécessaire pour maintenir un poids de santé ;
- la suralimentation : les apports énergétiques dépassent les besoins ;
- les carences en micronutriments : un manque de vitamines et minéraux essentiels empêche l'organisme de croître et/ou de se développer de manière adéquate.

Si les deux premières trouvent leur origine uniquement dans le déséquilibre entre les apports énergétiques et les besoins métaboliques, la troisième renvoie davantage au facteur qualitatif du régime alimentaire.

Les carences en micronutriments constituent un problème de santé mondial important, car elles peuvent affecter toutes les fonctions corporelles, et pareillement avoir un effet sur le développement physique et mental des enfants ou la vulnérabilité aux maladies. Les causes et les conséquences des carences au cours de la petite enfance ont des répercussions sur la vie future de l'individu et peuvent constituer des facteurs de risque pour les générations futures. Non traitées, ces conséquences perdurent tout au long de la vie d'un individu et entraînent plus généralement une perte de productivité et une mortalité précoce et accrue. Le cycle des carences en micronutriments se perpétue alors d'une génération à l'autre, avec des conséquences profondes sur la population entière (Figure 10).

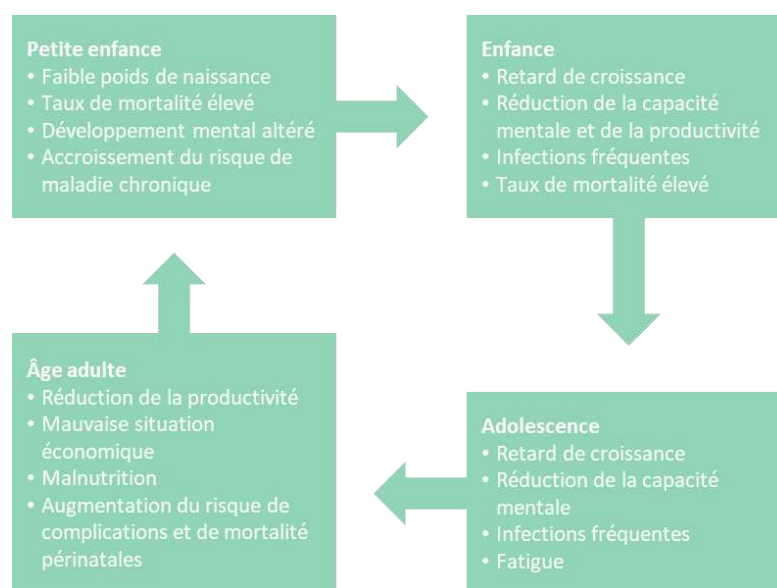


Figure 10 : Les carences en micronutriments ont des conséquences tout au long de la vie d'un individu et se perpétuent au fil des générations (d'après Bailey, West, & Black, 2015)

Mais contrairement à la sous- et suralimentation, les effets des carences en micronutriments sur la santé ne sont pas toujours visibles. C'est pourquoi on parle de « hidden hunger » ou faim inapparente/insoupçonnée. Selon l'OMS, entre un tiers et la moitié de la population mondiale souffrirait d'une carence en un ou plusieurs micronutriments (soit 2,4 à 3,6 milliards de personnes) (Miller & Welch, 2013). Bien que les carences en micronutriments soient plus fréquentes et plus graves dans les pays en développement et parmi les populations défavorisées, elles représentent tout autant un problème de santé publique dans certains pays industrialisés. Elles touchent alors principalement les populations dites sensibles : les enfants, les femmes enceintes ou en âge de procréer et les personnes âgées. Les carences les plus communes sont celles en vitamine A, folates, fer, iode et zinc. Cependant, elles peuvent coexister, aussi bien entre elles qu'avec d'autres carences, et sont souvent couplées avec une sous-nutrition protéique (ACC/SCN, 2000).

Le développement d'une carence en un micronutriment suit le même cheminement typique pour tous les micronutriments essentiels, bien que le temps nécessaire pour passer par chacune des étapes puisse varier d'un nutriment à l'autre (Figure 11). Rapidement après l'instauration d'un régime alimentaire inadéquat, le corps tente de restaurer l'état d'équilibre en augmentant l'absorption intestinale ou en réduisant l'excrétion urinaire (Liuzzi, Bobo, Lichten, Samuelson, & Cousins, 2004). Lorsque le manque d'apport se prolonge, diverses fonctions sont affectées avant que des signes évidents de carence clinique se manifestent.

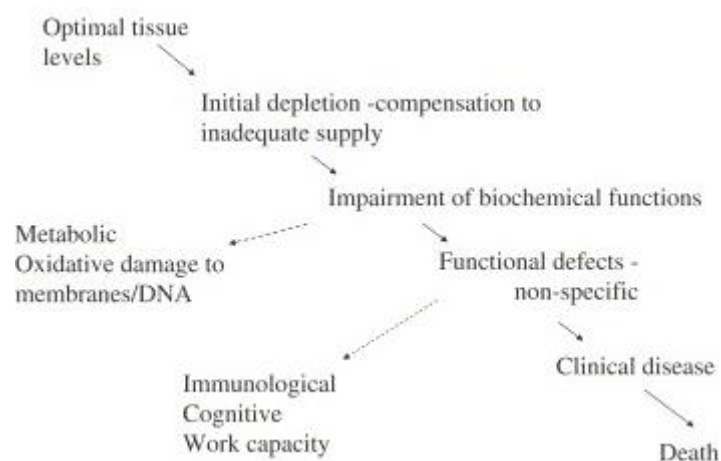


Figure 11 : Étapes de développement d'une carence nutritionnelle en micronutriment (Shenkin, 2008)

Les mesures visant à corriger les carences en micronutriments ont pour but de garantir une alimentation équilibrée et adaptée concernant chaque nutriment. Malheureusement, cet objectif est loin d'être atteint partout, car il nécessite un accès universel à une alimentation adéquate et

des habitudes alimentaires appropriées. Afin d'augmenter les apports en micronutriments dans la population générale, trois stratégies peuvent alors être instaurées (Allen, 2006).

La stratégie la plus souhaitable consiste à accroître la diversité des produits consommés par la population en faveur d'aliments riches en micronutriments. Cela nécessite la mise en place de programmes visant à améliorer la disponibilité des produits désignés, l'accès de la population à ces produits et leur consommation, mais cela demande aussi un changement d'habitudes alimentaires et une éducation. De ce fait, il s'agit d'une stratégie dont les résultats sont observés à long terme.

La supplémentation est le moyen le plus rapide et le plus efficace pour lutter contre une carence en un micronutriment spécifique auprès d'une population définie, à condition que les moyens d'accès aux compléments alimentaires soient assurés et que l'observance de la population soit contrôlée. Cette stratégie est couramment utilisée dans les pays développés : supplémentation en acide folique des femmes en âge de procréer, en vitamine D des enfants, en fer des femmes enceintes, etc. (Gernand, Schulze, Stewart, West Jr, & Christian, 2016; Institute of Medicine (US) Committee, 1993).

Une stratégie alternative consiste à compléter en micronutriments les aliments déjà consommés par une population. L'enrichissement des aliments présente le double avantage de pouvoir fournir des nutriments à de larges segments de la population sans nécessiter de changements radicaux dans les habitudes de consommation alimentaire. Les effets sont visibles rapidement puisque le consommateur est passif dans cette démarche, à condition que les produits enrichis soient consommés en quantité adéquate par la population cible. Cette stratégie a été adoptée en 1998 par les États-Unis afin de lutter contre les carences en folates, et a été mise en œuvre par l'enrichissement massif des produits céréaliers en acide folique à hauteur de 140 µg/100 g. Une baisse considérable du nombre de cas de défauts de fermeture du tube neural (Neural Tube Defects) a consécutivement été observée (-32 % de cas en 4 ans) (Crider, Bailey, & Berry, 2011). On parle dans ce cas d'enrichissement généralisé, lorsque le micronutriment est ajouté au sein d'aliments couramment utilisés par une part importante de la population. On distingue également l'enrichissement universel, lorsque les aliments concernés sont consommés à la fois par la population et les animaux, comme c'est le cas du sel iodé, ou bien l'enrichissement ciblé lorsque l'aliment est consommé spécialement par un groupe de personnes restreint présentant une caractéristique commune (âge ou pathologie) (OMS, 2011).

L'enrichissement des aliments en vitamines et minéraux est bien accepté par les consommateurs à condition de respecter 3 principes : le coût engendré par l'enrichissement doit être faible par rapport à la valeur initiale du produit, le goût ne doit pas en pâtir, de même que la stabilité et l'homogénéité des produits (absence de variation de couleur, goût, flaveur, etc. au cours du vieillissement du produit).

Pour autant, la distinction entre la finalité des aliments et des médicaments doit rester claire. La supplémentation des aliments est autorisée dans le but de remplacer les nutriments perdus pendant la transformation, ou pour prévenir les carences en nutriments dans la population. Le traitement des maladies doit quant à lui rester du domaine du médicament.

1.3.3 LA VITAMINE D

Les recherches réalisées successivement au cours des XIX et XX^{ème} siècles sur le rachitisme ont abouti à la découverte de la vitamine D par Elmer McCollum en 1922 (McCollum, Simmonds, & Becker, 1922), suivie de près par la caractérisation de sa structure biochimique par Adolf Windaus en 1928 (Shampo & Kyle, 2001) (Figure 12).

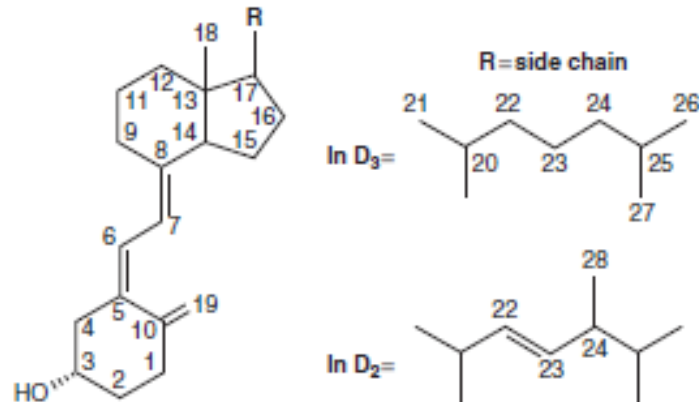


Figure 12 : Structures des vitamines D₂ et D₃ (Makin & Gower, 2010)

1.3.3.1 SOURCES DE VITAMINE D

1.3.3.1.1 Synthèse de la vitamine D par exposition solaire

L'épiderme est la source majeure de vitamine D pour le corps humain. La vitamine D₃ est de cette façon obtenue par photosynthèse : elle est naturellement synthétisée au niveau de la peau en réponse à une exposition au soleil. Les rayons ultraviolets B (UVB) (280-320 nm), qui représentent environ 2 % des rayonnements solaires atteignant la Terre, pénètrent dans les couches superficielles de la peau (Lucas, Prüss-Üstün, & World Health Organization, 2006). L'irradiation par

les UVB du 7-déhydrocholestérol, présent dans toutes les couches de la peau et en particulier l'épiderme, entraîne leur conversion en pré-vitamine D₃ (Figure 13). Sous l'effet de la chaleur, une isomérisation immédiate de cette pré-vitamine D₃ permet la formation de vitamine D₃ dans les couches inférieures de la peau. Afin de prévenir les risques d'intoxication à la vitamine D dans le cas d'une exposition prolongée au soleil, des voies de régulation sont mises en place entraînant la conversion de la pré-vitamine D₃ excédentaire en composés inactifs (lumistérol et tachystérol), ou bien celle de la vitamine D₃ en suprastérols I et II (Bikle, 2011).

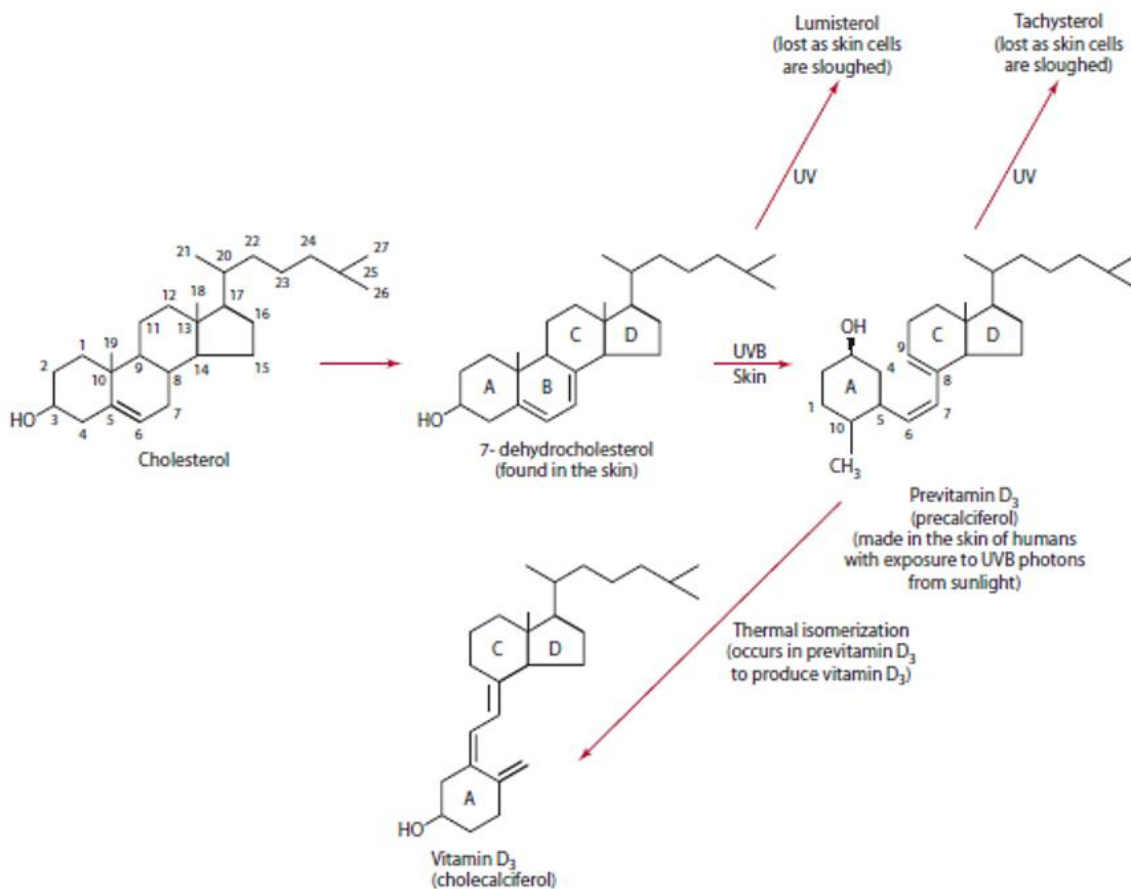


Figure 13 : Voie endogène de production du cholécalciférol (Gropper & Smith, 2012)

I.3.3.1.2 Apports en vitamine D par l'alimentation

Une partie des apports en vitamine D provient cependant de l'alimentation (Table 2). On retrouve la vitamine D sous forme de vitamine D₃ (cholécalciférol) dans certains aliments, en particulier ceux d'origine animale et riches en matières grasses. La vitamine D₂ (ergocalciférol), d'origine végétale, est retrouvée dans certains champignons où elle est synthétisée à partir de l'ergostérol sous l'action du rayonnement UV. Pour accroître les apports en vitamine D, certains aliments sont enrichis. En France, cela concerne certains produits laitiers, céréales et huiles. Des études portant sur l'irradiation des champignons aux UVB ont tout autant démontré qu'il était possible d'enrichir

naturellement leur teneur en vitamine D₂ jusqu'à 70 µg/100g (Cardwell, Bornman, James, & Black, 2018).

Table 2 : Teneur en vitamine D de certains aliments (ANSES, 2017).

Aliment	Teneur en vitamine D (µg/100 g)
Huile de foie de morue	250
Champignons irradiés ¹	10-70
<i>Champignon non irradiés</i>	0,3
Hareng	10,7
Saumon	8,6
Thon	7,8
Huile combinée enrichie Isio 4 ²	5
<i>Huiles combinées non enrichies</i>	0
Jaune d'œuf	2
Foie de dinde	1,3
Beurre	1,1
Lait demi-écrémé enrichi Lactel ³	0,8
<i>Lait demi-écrémé non enrichi</i>	<0,5
Fromage à pâte dure, type Emmental	0,3
Fromage à pâte molle, type Maroilles	<0,1
Spiruline	0

Sources : ¹ Cardwell *et al.*, 2018 ; ² Nouffert & Renaudin, 2010 ; ³ Lactel, 2014

I.3.3.2 DIGESTION ET ABSORPTION

La vitamine D étant une molécule liposoluble, sa digestion est comparable à celle des principaux lipides alimentaires (phospholipides et triglycérides) (Tso & Fujimoto, 1991). Après libération de la matrice alimentaire par l'intermédiaire des enzymes gastro-intestinales (pepsine dans l'estomac puis amylases, lipases et protéases dans le duodénum), la vitamine D est émulsifiée au sein de gouttelettes lipidiques puis dissoute dans les micelles mixtes. Cela lui permet de diffuser à travers la couche d'eau stagnante en surface des entérocytes puis de pénétrer la membrane entérocytaire. Les conditions chimiques du tractus digestif (le pH notamment) semblent impliquées dans les mécanismes de libération de la vitamine D depuis la matrice alimentaire (Maurya & Aggarwal, 2017).

L'absorption de la vitamine D a longtemps été considérée comme étant soumise à un procédé de diffusion passive insaturable. Cependant, de récentes études font l'hypothèse d'un changement de mode d'absorption de la vitamine D du transport à médiation protéique à la diffusion passive, selon la concentration en vitamine D du chyme. Ainsi, à concentration physiologique (alimentaire), des transporteurs membranaires impliqués dans le transport du cholestérol (SR-BI, CD36 et NPC1L1) pourraient être associés dans celui de la vitamine D, alors qu'à concentration

pharmacologique, un système de diffusion passive pourrait être mis en place (Reboul et al., 2011). D'autres transporteurs seraient en outre impliqués au niveau du jéjunum (Goncalves et al., 2015).

I.3.3.3 MÉTABOLISME DE LA VITAMINE D

La vitamine D₃ produite par l'épiderme rejoint la circulation sanguine au niveau du derme en se liant à la protéine de transport VDBP (vitamin D-binding protein). Les vitamines D₂ et D₃ ingérées *via* l'alimentation sont fixées par les chylomicrons, intégrant de cette manière la circulation lymphatique puis veineuse, où elles se lient à la protéine de transport. La vitamine D est alors transportée dans le sang jusqu'au foie (Figure 14). Elle y est hydroxylée par une 25-hydroxylase (CYP2R1) pour former la 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D), aussi appelée calcidiol, qui est stockée dans le foie. Ce composé est ensuite véhiculé par le plasma jusqu'au tube proximal du rein où il est de nouveau hydroxylé par l'enzyme 1 α -hydroxylase (CYP27B1) en 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)₂D₃), qui est la forme biologiquement active majeure de la vitamine D (nommé calcitriol) (Christakos, Ajibade, Dhawan, Fechner, & Mady, 2010). Le calcitriol est ensuite distribué aux tissus cibles où il exercera son activité biologique. La conversion de la vitamine D₃ en 1,25(OH)₂D₃ par la D-25hydroxylase (CYP27A) et la 25OHD-1 α -hydroxylase (CYP27B1) a également été constatée dans les kératinocytes (Lehmann, Genehr, Knuschke, Pietzsch, & Meurer, 2001).

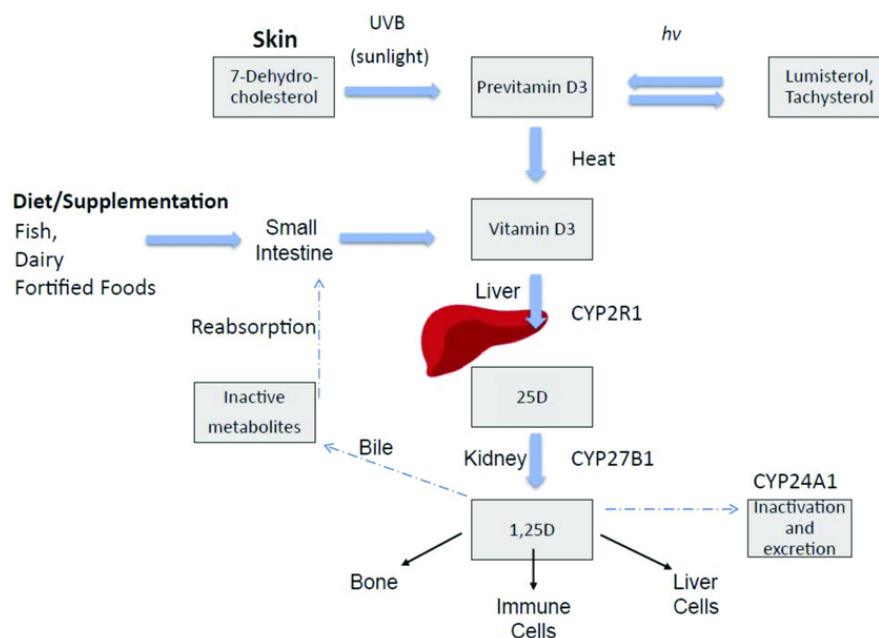


Figure 14 : Métabolisme de la vitamine D (Keane, Elangovan, Stokes, & Gunton, 2018)

I.3.3.4 FONCTIONS BIOLOGIQUES

L'activité de la vitamine D est médiée par la liaison du 1,25(OH)₂D au récepteur de vitamine D (VDR), qui peut réguler la transcription d'autres gènes impliqués dans la régulation cellulaire, la croissance et l'immunité par exemple. Du fait de la présence de VDR dans de nombreux types cellulaires et organes, la vitamine D est désormais qualifiée de pro-hormone. Elle joue de ce fait un rôle dans de nombreuses fonctions métaboliques, telle que l'homéostasie calcique.

La présence de calcium est nécessaire au fonctionnement de l'organisme pour la contraction musculaire ou la transmission neuronale par exemple. Le maintien de l'homéostasie calcique dans la circulation sanguine est donc primordial. Lorsque la concentration circulante en calcium diminue, des récepteurs dédiés (calcium-sensing receptor) au niveau des glandes parathyroïdes induisent la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne, qui stimule la conversion du calcidiol en calcitriol, celui-ci stimulant à son tour l'absorption du calcium au niveau intestinal et la mobilisation du calcium osseux (Dusso, Brown, & Slatopolsky, 2005). Outre son rôle dans l'homéostasie calcique, il semblerait que la vitamine D soit impliquée dans le développement du cartilage et le remodelage osseux, *via* l'action des ostéoblastes et ostéoclastes, à travers des mécanismes n'impliquant pas uniquement la régulation de la calcémie (Bikle, 2014; Panda et al., 2004).

Outre cette fonction biologique dont les voies métaboliques ont été établies, il semblerait que la vitamine D joue également un rôle dans :

- Le système immunitaire : différenciation des monocytes en macrophages, synthèse de peptides antimicrobiens, prévention de pathologies auto-immunes (Hosseinezhad & Holick, 2013; Moukayed & Grant, 2013; Zasloff, 2005) ;
- Le système musculaire : croissance et développement des muscles squelettiques (Bischoff-Ferrari, 2012; Michael, 2011) ;
- Le fonctionnement cognitif : développement du cerveau et prévention des maladies neurodégénératives (Assmann et al., 2015; Jackson et al., 2019; van der Schaft et al., 2013) ;
- La régulation cellulaire : régulation de la prolifération et de la croissance cellulaire, apoptose (Ross, 2014).

Ces différentes fonctions ont pour la plupart été déterminées sur la base d'études d'observation, mais le niveau de preuve reste insuffisant. La compréhension des voies métaboliques impliquées et la mise en place d'études d'intervention sont nécessaires pour pouvoir prouver la causalité.

I.3.3.5 PRÉVALENCE DES CARENCES

La teneur en 25(OH)D dans le plasma étant proportionnelle à la quantité de vitamine D ingérée et synthétisée par l'épiderme, elle est de ce fait communément utilisée en tant que marqueur du statut vitaminique d'un individu (Holick, 1981). Un consensus existe dans la communauté scientifique sur un seuil de concentration en 25(OH)D, fixé à 10 ng/mL, en-dessous duquel des manifestations cliniques peuvent être observées, telles que le rachitisme ou l'ostéomalacie (Figure 15). Sur la base d'études observationnelles portant sur la relation entre la santé osseuse et le statut vitaminique, l'Académie Nationale de Médecine américaine a ensuite défini un seuil de référence permettant d'assurer la bonne santé osseuse d'un individu à 20 ng/mL (Kennel, Drake, & Hurley, 2010; Rosen et al., 2012).

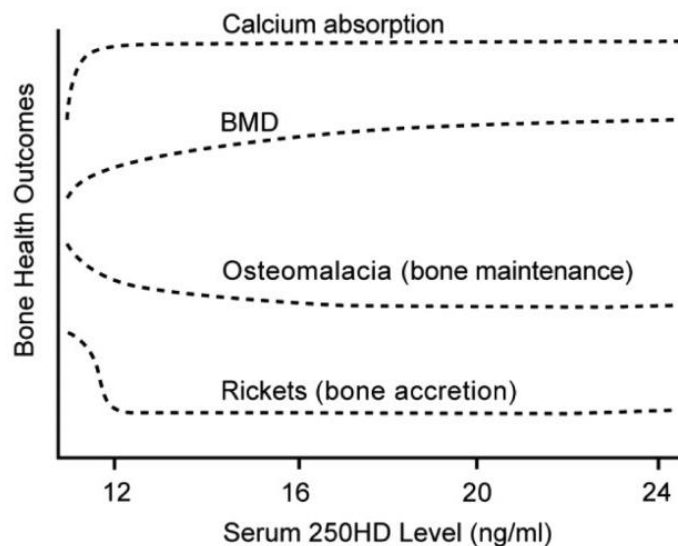


Figure 15 : Effet du statut vitaminique en 25(OH)D sur la santé osseuse (Rosen et al., 2012)

Avec une consommation journalière moyenne de 2,4 µg de vitamine D (ANSES, 2015), pour un apport journalier recommandé de 5µg/j en période hivernale (European Parliament, 2011), les résultats de l'étude nationale Nutrition-Santé de 2006-2007 ont montré que 43 % des adultes résidant en France métropolitaine présentaient un déficit modéré en 25(OH)D (<20 ng/mL) (Vernay et al., 2012). Les principaux facteurs de risque de déficience sont la faible exposition au soleil, le port excessif de vêtements couvrant les bras et le fait d'avoir une peau fortement pigmentée. Ces déficiences chez l'adulte peuvent exacerber les phénomènes d'ostéopénie, d'ostéoporose et augmenter le risque de fracture (Chapuy et al., 1996; Holick, 2007). La faiblesse musculaire semble être liée à une déficience en vitamine D, pouvant élever le risque de chute, chez les personnes âgées notamment (Bischoff-Ferrari et al., 2004; Visser, Deeg, Lips, & Longitudinal Aging Study Amsterdam, 2003). Plus fréquemment, les défauts de minéralisation

osseuse engendrés par une déficience prolongée en vitamine D se manifestent par des douleurs dans les articulations et les muscles (Aaron et al., 1974; Al-Ali & Fuleihan, 2000), diagnostiquées à tort comme fibromyalgie, syndrome de fatigue chronique ou arthrite (Holick, 2007; Plotnikoff & Quigley, 2003).

A l'inverse, une surdose de vitamine D (d'origine alimentaire, car un système de régulation de la production de vitamine D endogène existe) peut provoquer une hypercalcémie, qui se traduit par une élévation anormale du taux de calcium dans le sang. Un risque existe lorsque la teneur plasmatique en 25(OH)D est supérieure à 100 ng/mL. Cela peut être consécutif à la prise quotidienne de 250 µg de vitamine D pendant 3 mois, ou la consommation de 7500 µg de vitamine D sur 24h (Tebben, Singh, & Kumar, 2016; Vieth, 1999).

Sauf précision, la vitamine D₃ et ses métabolites seront nommés vitamine D dans la suite de ce manuscrit.

1.3.4 LA LUTÉINE

Les caroténoïdes sont des tétraterpénoïdes majoritairement constitués d'un squelette de 40 atomes de carbone (C₄₀), organisé en huit unités isoprènes et contenant des systèmes de doubles liaisons conjuguées et des structures cycliques. Dérivés de précurseurs isoprénoïdes, ils se divisent en deux grandes classes : les carotènes, qui sont majoritairement des hydrocarbures cycliques, et les xanthophylles, classifiées en dérivés oxygénés des carotènes (ou caroténoïdes oxygénés) (Rao & Rao, 2007). Dans la nature, plus de 600 caroténoïdes ont été identifiés mais seuls 40 sont communément retrouvés dans les tissus et le plasma humain, dont les principaux sont la lutéine (20 %), le lycopène (20 %), le β-carotène (10 %), la β-cryptoxanthine (8 %), l'α-carotène (6 %) et la zéaxanthine (3 %) (Khachik, Beecher, Goli, Lusby, & Smith, 1992; Khachik et al., 1997). Les caroténoïdes retrouvés dans le corps humain proviennent uniquement des sources alimentaires car les animaux n'ont pas la capacité de les synthétiser (Mares, 2016).

La lutéine (C₄₀H₅₆O₂) est une xanthophylle qui possède trois centres chiraux et peut donc potentiellement exister sous huit formes stéréo-isomères, mais elle prédomine naturellement sous sa forme (R,R,R) (Figure 16) (Abdel-Aal, Akhtar, Zaheer, & Ali, 2013). Il s'agit un pigment jaune-orangé qui agit en tant que capteur de lumière dans les plantes, en complément de la chlorophylle. Il s'agit d'un composé phyto-chimique, à savoir qu'elle exerce potentiellement un effet bénéfique sur la santé de l'Homme, mais n'est pas essentiel aux fonctions biologiques.

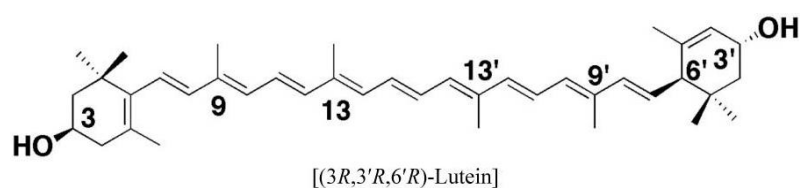


Figure 16 : Structure chimique de la lutéine (Abdel-Aal et al., 2013)

I.3.4.1 SOURCES ALIMENTAIRES DE LUTÉINE

La lutéine est majoritairement retrouvée dans les végétaux à feuilles vertes et le jaune d'œuf (Table 3). L'enrichissement du régime alimentaire des poules en lutéine entraîne une coloration jaune-orangée du jaune d'œuf en raison du stockage de la lutéine liposoluble dans cette partie de l'œuf (Nys, 2000).

Table 3 : Teneur en lutéine de certains aliments

Aliment	Teneur en lutéine (µg/g)	
	Min	Max
Basilic	70,5	
Persil	64,0	106,5
Épinards	59,3	79,0
Chou frisé	48,0	114,7
Poireau	36,8	
Pois	19,1	
Salade	10,0	47,8
Poivron rouge	2,5	85,1
Jaune d'œuf	3,84	13,2
Pistache	7,7	49,0
Lait demi-écrémé	0	

(Maiani et al., 2009; Perry, Rasmussen, & Johnson, 2009)

Les principaux aliments contributeurs des apports en lutéine chez la population adulte en France sont les épinards (31 % des apports totaux), la salade (8 %) et les œufs (8 %). Les légumes verts représentent 56 % des apports totaux en lutéine (Granado, Olmedilla, & Blanco, 2003). La consommation moyenne de caroténoïdes avoisine les 16 mg par personne et par jour, parmi lesquels 16 % sont de la lutéine (O'Neill et al., 2001).

I.3.4.2 DIGESTION ET ABSORPTION

Du fait de son groupement hydroxyle, la lutéine est plus polaire que les autres caroténoïdes. Néanmoins, sa digestion est similaire à celle des lipides (Figure 17). Après libération de la matrice alimentaire sous l'effet des enzymes gastro-intestinales et du pH gastrique, la lutéine est dispersée dans le tractus gastro-intestinal sous forme de gouttelettes lipidiques associant lipides

alimentaires, sels biliaires et dérivés de phospholipides, puis elle est transférée au sein des micelles mixtes. La solubilisation des caroténoïdes dans les micelles mixtes est généralement le facteur limitant pour leur biodisponibilité, mais dans le cas de la lutéine, son caractère plus polaire permet d'outrepasser ce point critique (Nagao, 2011).

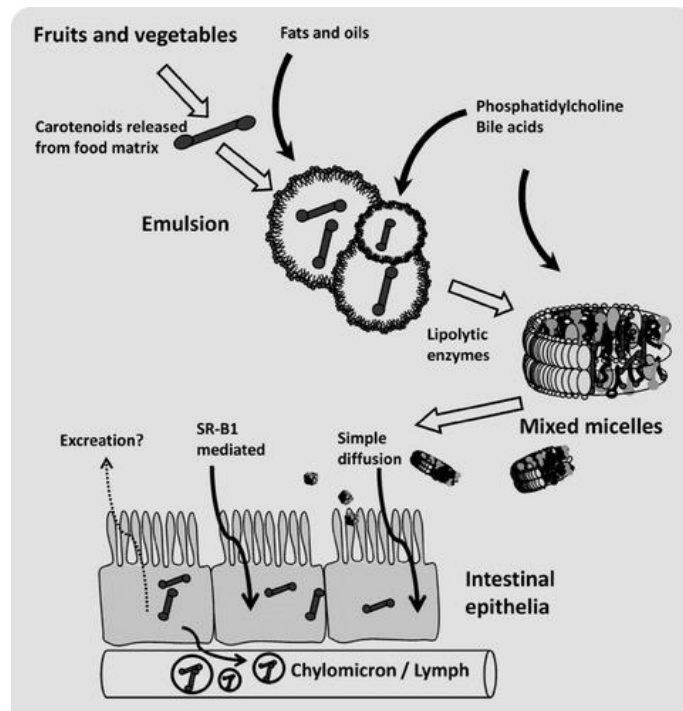


Figure 17 : Solubilisation et absorption intestinale des caroténoïdes (Nagao, 2011)

La lutéine est ensuite absorbée au travers de la membrane entérocytaire, par simple diffusion passive ou bien médiée par le récepteur SR-BI (scavenger-receptor class B type I) (During, Doraiswamy, & Harrison, 2008; Moussa et al., 2008; Reboul et al., 2011; van Bennekum et al., 2005). D'autres transporteurs pourraient également être impliqués à l'instar du transporteur ABCG5 (Herron et al., 2006). Selon le mécanisme de diffusion simple, les micelles migrent à travers la couche d'eau non agitée jusqu'à la bordure en brosse de la membrane entérocytaire. Le caroténoïde quitte alors la structure micellaire et diffuse à travers la membrane dans le cytoplasme des entérocytes. Bien qu'aucune étude n'ait pour le moment prouvé ce phénomène, la présence de lutéine dans la bile indiquerait potentiellement une sécrétion de xanthophylles par les hépatocytes et l'excrétion des épithéliums intestinaux dans la lumière intestinale (Leo et al., 1995; Yonekura & Nagao, 2007).

La lutéine est ensuite incorporée dans les chylomicrons puis excrétée dans le système lymphatique avant de rejoindre le système sanguin au niveau de la veine sous-clavière gauche. Durant son

transport vers le foie, la lutéine se répartit équitablement entre les lipoprotéines de basse et haute densité (low- et high-density lipoprotein, LDL et HDL) (Clevidence & Bieri, 1993).

Chez l'Homme, la lutéine rejoindrait ensuite préférentiellement la macula de l'œil où sa concentration varie entre 0,1 et 1 mM (Bernstein et al., 2016; Bone et al., 1997). Mais de récentes études indiquent une accumulation de la lutéine dans d'autres tissus et organes tels que le système nerveux central (Tanprasertsuk et al., 2016).

1.3.4.3 MÉTABOLISME DE LA LUTÉINE

Le métabolisme de la lutéine après son absorption reste à l'heure actuelle en grande partie méconnu. Néanmoins, la présence de métabolites (3'-epilutein) dans le sérum et les tissus humains suggère qu'elle subit des réactions d'oxydation, de réduction ou de délocalisation électronique (Khachik et al., 1992). L'oxydation de la lutéine au niveau du C3 convertirait celle-ci en kéto-caroténoïdes : 3-hydroxy- β,ϵ -caroten-3'-one (appelé 3'-oxolutein), 3'-hydroxy- ϵ,ϵ -caroten-3-one, et ϵ,ϵ -carotène-3,3'-dione (Figure 18) (Khachik et al., 1997; Matsuno et al., 1986). Deux autres métabolites de la lutéine, suspectés d'être des produits de déshydratation, le 3-hydroxy-3',4'-didéhydro- β,γ -carotène et le 3-hydroxy-2',3'-didéhydro- β,ϵ -carotène, seraient formés consécutivement à son exposition aux conditions acides de l'estomac au cours d'une réaction non-enzymatique (Khachik, 2003; Khachik, Englert, Beecher, & Cecil Smith, 1995).

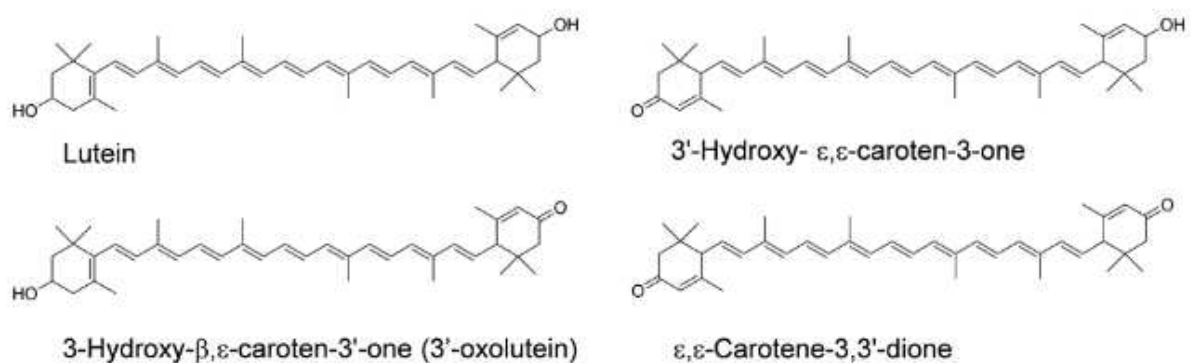


Figure 18 : Structure chimique de la lutéine et de quelques métabolites (Kotake-Nara & Nagao, 2011)

Dans le reste de ce document, le terme lutéine se réfère indifféremment à la lutéine alimentaire ou à un de ses métabolites.

I.3.4.4 FONCTIONS BIOLOGIQUES

La lutéine démontre un très fort pouvoir antioxydant par neutralisation des oxygènes singulets et élimination des radicaux libres (Kim, Nakanishi, Itagaki, & Sparrow, 2006). La lutéine présente aussi la capacité de filtrer la lumière bleue, annihilant ainsi les dommages phototoxiques sur les cellules photo-réceptrices (Junghans, Sies, & Stahl, 2001). Les propriétés de la lutéine pourraient être amplifiées par sa localisation dans les régions les plus vulnérables de la rétine et par son orientation au sein des membranes (Subczynski, Wisniewska, & Widomska, 2010). Plusieurs études ont en ce sens observé que la lutéine inhibait la cascade de cytokines pro-inflammatoires et le facteur de transcription nucléaire NF- κ B (Chang et al., 2018; Chung, Leanderson, Lundberg, & Jonasson, 2017; Liu, Liu, Zhao, Meng, & Wang, 2017). De plus, la lutéine diminuerait la production des dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS) (Li et al., 2015) et modulerait l'expression de la forme inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) (Rafi & Shafaie, 2007). À travers ces mécanismes, la lutéine jouerait donc un rôle central dans la régulation des voies immunitaires, la modulation des réponses inflammatoires et la réduction des dommages oxydatifs (Buscemi et al., 2018; Tian et al., 2015).

De nombreuses études ont attesté les effets positifs de la lutéine sur l'amélioration de la densité optique du pigment maculaire (Fujimura, Ueda, Nomura, & Yanagi, 2016; Huang, Dou, Huang, Xu, Zou, Lu, et al., 2015), de l'acuité visuelle (Dawczynski et al., 2013; Liu et al., 2014) et de la sensibilité au contraste (Huang, Dou, Huang, Xu, Zou, & Lin, 2015; Sasamoto, Gomi, Sawa, Tsujikawa, & Nishida, 2011), trois composantes de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Toutefois, d'autres études n'ont pas abouti aux mêmes résultats : la consommation de lutéine n'entraînerait pas d'amélioration de l'acuité visuelle (Berrow, Bartlett, Eperjesi, & Gibson, 2013; Wang et al., 2014), ni de la sensibilité au contraste (Beatty et al., 2013). La lutéine ne réduirait pas le risque de développer une DMLA et ne ralentirait pas sa progression (Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group, 2013; Akuffo et al., 2015; Cho, Hankinson, Rosner, Willett, & Colditz, 2008; Chong, Wong, Kreis, Simpson, & Guymer, 2007). Les divergences entre ces études pourraient s'expliquer par les durées de supplémentation en lutéine ou bien par les caractéristiques cliniques des patients enrôlés dans chacune des études. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour avérer, ou non, le rôle de la lutéine dans la prévention ou le traitement de la DMLA. À ce jour, l'existence de données contradictoires ne permet pas aux autorités de santé de statuer sur le bien-fondé de la supplémentation en lutéine, chez la population senior notamment.

Par son pouvoir antioxydant, la lutéine serait de même capable de retarder l'apparition de la cataracte en inhibant la prolifération et la migration des cellules du cristallin (Brown et al., 1999; Hu & Xu, 2008). Elle pourrait être utilisée pour traiter les cas de cataracte avérés, bien avant le stade de l'opération (Weikel, Garber, Baburins, & Taylor, 2014).

La consommation de lutéine serait également associée à de meilleures performances cognitives chez les personnes âgées (Feeney et al., 2017; Johnson et al., 2013), telles que la fluidité verbale, la mémoire et les capacités d'apprentissage (Johnson et al., 2008).

La progression de l'athérosclérose et la santé cardiovasculaire en général dépendant de l'activation des cytokines pro-inflammatoires, la lutéine pourrait prévenir les dommages cardiovasculaires (Sharavana, Joseph, & Baskaran, 2017; Wang et al., 2013). Une méta-analyse portant sur plus de 350 000 participants a en ce sens abouti à la conclusion que le risque de maladie coronarienne et d'accident vasculaire cérébral était plus faible dans le tercile affichant les apports en lutéine les plus élevés, par rapport au tercile recevant les apports les plus faibles (Leermakers et al., 2016).

I.3.4.5 TOXICITÉ DE LA LUTÉINE

La lutéine n'étant pas considérée comme une vitamine, il n'y a pas de risque de carence associé à un apport insuffisant dans l'alimentation. De même, aucune étude n'a prouvé à ce jour le caractère toxique de la lutéine à haute dose, que ce soit par supplémentation chronique ou aiguë (EFSA Panel, 2010; Harikumar et al., 2008; Ravikrishnan et al., 2011). Une consommation excessive de lutéine peut cependant se traduire par une caroténodermie (coloration jaune et bénigne de la peau), observée chez des patients ayant consommé 15 mg de lutéine par jour durant 20 semaines (Lascari, 1981; Olmedilla et al., 2002). Néanmoins, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a statué sur une limite de sécurité de 1 mg/kg (EFSA Panel, 2010), sur la base d'études montrant l'innocuité de la consommation de 30 à 40 mg de lutéine par jour (Dagnelie, Zorge, & McDonald, 2000; Landrum et al., 1997).

I.3.5 LA VITAMINE B9

Folates est le terme générique pour désigner les composés dérivant de l'acide ptéroïque, dont l'acide folique, et présentant une activité vitaminique B9 chez l'Homme. S'ils paraissent être synonymes, les termes folates et acide folique sont cependant souvent employés improprement. « Acide folique » désigne en effet le composé synthétique entièrement oxydé (acide ptéroylmono-

glutamique) utilisé dans les compléments alimentaires et l'enrichissement des aliments, tandis que "folates" désigne les divers dérivés du tétrahydrofolate naturellement présents dans les aliments (Marchetti et al., 2014).

L'acide folique est constitué d'un radical bi-cyclique ptérine lié par un groupement méthylène à un acide para-amino-benzoïque (PABA), lui-même relié à un acide glutamique par une liaison α -peptidique (Figure 19A). Dans la plupart des aliments, le cycle ptéridique est réduit en 7,8-dihydrofolate (DHF) ou 5,6,7,8-tétrahydrofolate (THF) (Figure 19B). L'ajout d'atomes de carbone au niveau de l'azote sur ces formes réduites génère des molécules intervenant dans le métabolisme des folates : 10-formyl-THF, 5-méthyl-THF, 5-formimino-THF, 5,10-méthylène-THF et 5,10-méthényl-THF. Les folates alimentaires existent principalement sous forme de polyglutamates, contenant entre cinq et sept résidus glutamate reliés par des liaisons γ -peptidiques (Ball, 2008). Le carbone C₆ des tétrahydrofolates étant asymétrique, deux stéréo-isomères nommés 6S et 6R coexistent. Néanmoins, seul le stéréo-isomère 6S se retrouve à l'état naturel et possède une fonction biologique. La synthèse chimique des tétrahydrofolates par hydrogénation catalytique ne permettant d'obtenir que des mélanges racémiques des deux stéréo-isomères, la forme d'acide folique est préférée lors des enrichissements des aliments en vitamine B9 (Combs & McClung, 2017a).

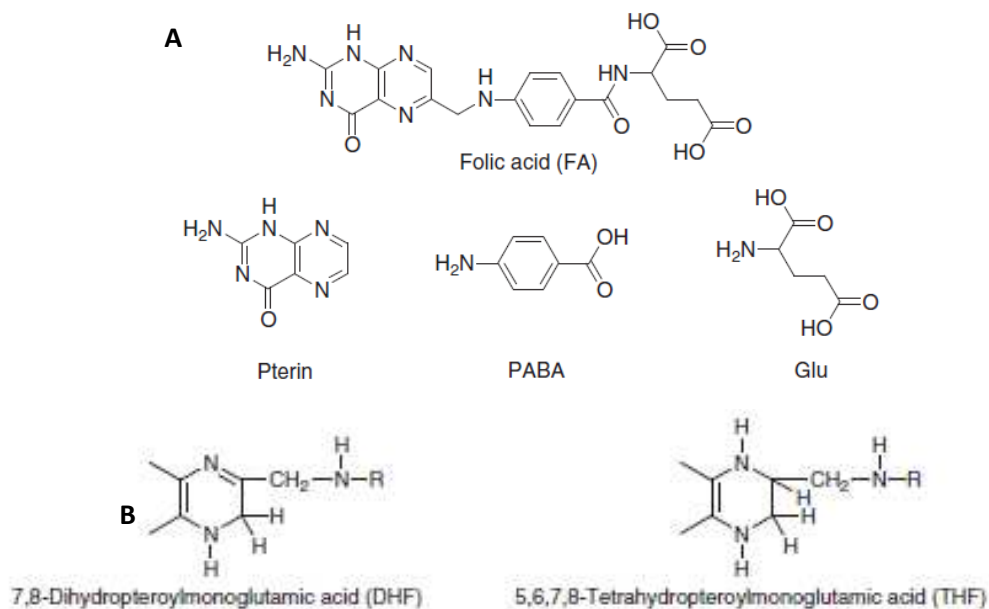


Figure 19 : Structures chimiques de l'acide folique (A) et deux principales formes réduites du cycle ptéridique des folates alimentaires (B) (Ball, 2008)

Dans la suite de ce manuscrit, le terme de vitamine B9 désigne les folates et l'acide folique, sans distinction.

I.3.5.1 SOURCES ALIMENTAIRES DE VITAMINE B9

Les folates sont des composants biochimiques essentiels des cellules vivantes où ils sont liés aux protéines (Baugh & Krumdieck, 1971) et aux polysaccharides de stockage (amidon et glycogène) (Černá & Káš, 1983). On les retrouve ainsi dans la plupart des aliments (Table 4). Malgré sa relative faible teneur en folates, le jus d'orange, par sa consommation journalière, est une très bonne source d'apports et représente presque 10 % de la consommation journalière en folates aux États-Unis (Ohrvik & Witthöft, 2008; Subar, Block, & James, 1989).

Table 4 : Teneur en folates des principaux aliments vecteurs d'apport (ANSES, 2017)

Aliment	Teneur en vitamine B9 (µg/100 g)
Levure de boulanger	2340
Lichen de mer (<i>Chondrus crispus</i>)	866
Foie	690
Pois chiche	369
Foie de morue	300
Lentilles	181
Asperges	142
Épinards	125
Noisettes	121
Pois cassés	119
Choux de Bruxelles	113
Cresson	95
Brocolis	75
Châtaigne	70
Noix	66
Œuf	57
Fromage	34,4
Jus d'orange	30
Farine de blé T55	15,4
Farine de blé enrichie ¹	140
Farine de blé T150	52,4
Lait	9,49
Viande	8,37

¹ Source : Castillo-Lancellotti, Tur, & Uauy, 2013

I.3.5.2 DIGESTION ET ABSORPTION DE LA VITAMINE B9

Au cours de la digestion, les folates présents sous forme de polyglutamates subissent une première étape de déconjugaison par la foyl/poly-γ-glutamyl carboxypeptidase. Toutefois, cette enzyme étant présente dans de nombreux aliments crus, une grande proportion des folates alimentaires sont déjà sous forme de monoglutamates lors de leur arrivée au niveau de la muqueuse intestinale (Gregory, 1989) (Figure 20). Cette enzyme est également exprimée par la bordure en brosse de la muqueuse jéjunale.

L'absorption des résidus monoglutamates se produit tout le long de l'intestin grêle, mais elle est maximale au niveau du jéjunum proximal. À concentration physiologique, leur transport est médié par deux protéines, la reduce folate carrier (RFC) et la proton-coupled folate transporter (PCFT) dont les affinités diffèrent selon la forme de présentation des folates. Ce mécanisme de transport est un phénomène saturable, très dépendant du pH et de la teneur en sodium. Lorsque la concentration en folates dans le jéjunum augmente, un phénomène de diffusion passive se met en place (Schron, 1991; Selhub & Rosenberg, 1981).

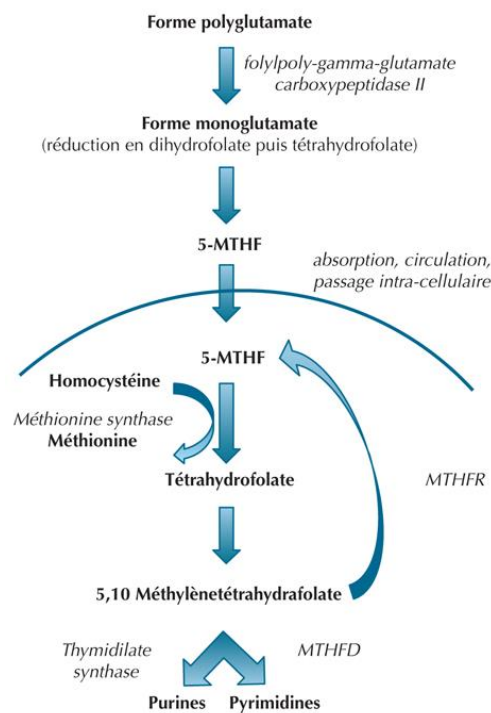


Figure 20 : Schéma récapitulatif de l'absorption et du métabolisme de la vitamine B9 (Veujoz, Gaudineau, Sananes, Fritz, & Langer, 2013)

1.3.5.3 MÉTABOLISME DE LA VITAMINE B9

Une fois qu'ils ont pénétré dans l'entérocyte, les résidus monoglutamates sont convertis en des formes supérieures de glutamates pour limiter leur excrétion cellulaire. Ils sont alors réduits en THF et méthylés, puis transportés jusqu'au foie ; la principale forme libérée dans le plasma est le 5-méthyl-THF (Figure 20). Les folates circulent sous forme libre dans le plasma, ou liée à l'albumine ou à une protéine de transport FBP (Folate Binding Protein). Une partie des 5-MTHF circulants est alors stockée dans le foie (il contient la moitié des stocks de folates) et les globules rouges (Combs & McClung, 2017a). Le stock corporel, d'environ 10 à 15 mg, permet de subvenir aux besoins de l'organisme pendant quatre mois environ, en conditions normales (Herbert, 1962).

I.3.5.4 FONCTIONS BIOLOGIQUES

Les folates jouent un rôle important de donneurs de groupements monocarbonés dans la synthèse des purines (adénine et guanine), impliquées à leur tour dans la synthèse de l'ADN et l'ARN (Forges, Pellanda, Diligent, Monnier, & Guéant, 2008). Ils participent également au métabolisme de certains acides aminés et notamment au cycle de l'homocystéine, intermédiaire réactionnel dans la conversion de la cystéine en méthionine grâce à la méthionine synthase, dont la vitamine B12 est un cofacteur (Figure 20). Les folates participent également à la conversion de l'histidine en acide glutamique et à celle de la sérine en glycine (Selhub & Miller, 1992).

I.3.5.5 CAUSES ET CONSÉQUENCES DES CARENCES EN VITAMINE B9

Les besoins nutritionnels en acide folique ont été évalués à 200 µg/j chez l'Homme adulte (European Parliament, 2011). Afin d'assurer une suffisance d'apports dans la majorité des situations physiologiques, les apports nutritionnels conseillés en vitamine B9 ont donc été définis à 330 µg/j chez l'Homme de plus de 18 ans et à 440 µg/j chez la femme en situation périconceptionnelle (ANSES, 2019). Les apports constatés dans la population générale ont été estimés à 286,8 µg/j en France (ANSES, 2015). Malgré cela, la prévalence des carences est estimée à 18,6 % de la population générale (teneur sérique < 10 nmol/L) (Ferraro, Panzeri, & Panteghini, 2017). Les carences en vitamine B9 peuvent provenir de trois origines. Les faibles apports alimentaires constituent la principale cause de carences, en particulier chez la femme enceinte, et peuvent résulter soit d'un régime alimentaire naturellement pauvre en folates, soit des procédés de transformation des aliments (et particulièrement le décortilage des grains ou la cuisson). Des troubles de l'absorption tels qu'une maladie cœliaque ou bien des troubles du métabolisme des folates peuvent également entraîner une situation de carence. Enfin, la prise de médicaments tels que certains anti-infectieux (méthoxétrate, triméthoprime, pyriméthamine) ou anti-inflammatoires (colchicine) est susceptible de réduire la biodisponibilité des folates (AFSSA, 2003).

Le principal signe clinique de la déficience en folates chez l'Homme adulte est l'anémie mégalo-blastique, résultant d'une synthèse incorrecte de l'ADN (Hesdorffer & Longo, 2015). Une carence en acide folique serait également associée à un risque de dépression (Gilbody, Lightfoot, & Sheldon, 2007), de démence (Durga et al., 2007), de cancers (Oaks et al., 2010; Rampersaud, Bailey, & Kauwell, 2002; Williams, Jacobson, Kim, Kim, & Jacobson, 2012) ou de maladies neurodégénératives et neuropsychiatriques (Kronenberg, Colla, & Endres, 2009). Au cours de la

grossesse, les carences maternelles en folates sont responsables de malformations du tube neural, pouvant se traduire par une anencéphalie ou un *spina bifida* (Iyer & Tomar, 2009).

Pour diminuer les risques de carence, certains pays tels que les États-Unis ont instauré une supplémentation systématique des produits céréaliers en acide folique à hauteur de 140 µg/100g (Castillo-Lancellotti et al., 2013). Aucun effet indésirable n'a été associé à la consommation de folates normalement présents dans les aliments, même enrichis. Cependant, la prise de compléments alimentaires à forte dose pourrait masquer une déficience en vitamine B12. En effet, celle-ci est diagnostiquée en partie *via* l'observation d'une carence en vitamine B9 dont le métabolisme requiert la vitamine B12. Or, l'absorption d'une forte dose de folates entraîne la mise en place d'un phénomène d'absorption passive, pouvant masquer cette déficience en folates (Kelly, McPartlin, Goggins, Weir, & Scott, 1997). D'autres risques semblent être associés à une prise massive de vitamine B9 : apparition de cancers colorectaux (Mason et al., 2007) ou de démence (Morris, Jacques, Rosenberg, & Selhub, 2007).

1.3.6 LA VITAMINE B12

La vitamine B12, ou cobalamine, tire son nom de l'atome de cobalt qui la compose. C'est la dernière vitamine du groupe B à avoir été découverte, en 1948. Sa configuration tridimensionnelle n'a été identifiée qu'en 1955 (Figure 21) (Hodgkin et al., 1955) Il s'agit d'une vitamine hydrosoluble retrouvée presque exclusivement dans les produits d'origine animale, expliquant qu'auparavant, l'adoption d'un régime exclusivement végétal était fortement réprouvée par la communauté scientifique, comme le déclarait le Docteur Ernest Monin à l'occasion du décès de deux pionniers du végétarisme des suites d'une anémie pernicieuse : « [...] le légumisme exagéré anémie le système nerveux : les végétariens exclusifs, remarque avec raison Gaëtan Delaunay, finissent presque tous par devenir spirites » (Monin, 1895).

La vitamine B12 est un nom générique pour désigner l'ensemble des cobalamines formées sur la base de ce squelette. Selon la molécule qui se lie à l'atome de cobalt dans la partie supérieure de la molécule (voir Figure 21, radical R), on la qualifie de :

- cyanocobalamine avec un groupement cyanide (–CN) ;
- méthylcobalamine s'il s'agit d'un groupement méthyl (–CH₃) ;
- hydroxycobalamine avec un groupement hydroxyl (–OH) ;
- adénosylcobalamine dans le cas d'un résidu 5'-deoxyadénosyl.

Les formes cyano- et hydroxycobalamine sont les plus stables (Watanabe, 2007).

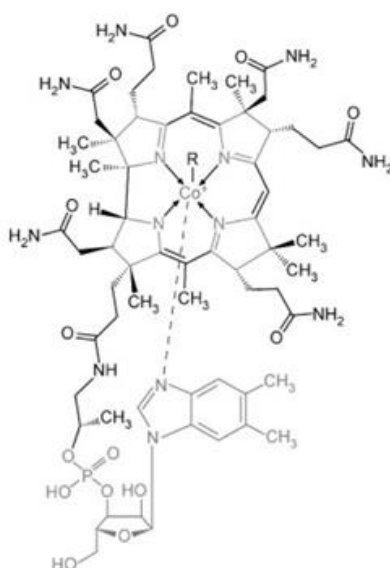


Figure 21 : Structure chimique de la vitamine B12 ou cobalamine (Dali-Youcef & Andres, 2009)

1.3.6.1 SOURCES ALIMENTAIRES DE VITAMINE B12

Aucun organisme eucaryote ne possède les voies métaboliques nécessaires à la production de la vitamine B12. Seules quelques bactéries, micro-algues et champignons disposent des enzymes nécessaires à sa biosynthèse. Les animaux dépendent donc de leur consommation alimentaire pour se procurer cette vitamine. On retrouve principalement cette vitamine dans les produits d'origine animale et dans quelques aliments fermentés (Table 5).

Table 5 : Teneur en vitamine B12 de quelques aliments (ANSES, 2017)

Aliment	Teneur en vitamine B12 ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)
Foie d'agneau	96
Rognons d'agneau	79
Œufs de saumon	47
Palourde	40
Algue Aonori (<i>Enteromorpha sp.</i>)	31
Huître	29
Moule	18
Laitue de mer (<i>Ulva sp.</i>)	9,55
Œuf	1,45
Fromage	1,33
Viande de poulet	1,29
Feuilles de thé noir ¹	0,3-1,2
Thé noir infusé ¹	2,0 ng/100 mL
Lait demi-écrémé	0,38
Spiruline	0
Champignons de Paris	0

¹ Source : Kittaka-Katsura, Ebara, Watanabe, & Nakano, 2004

1.3.6.2 DIGESTION ET ABSORPTION DE LA VITAMINE B12

Du fait de son poids moléculaire important et de sa grande solubilité dans l'eau, la vitamine B12 peine à traverser les membranes cellulaires. De ce fait, le mécanisme de son absorption est complexe et nécessite le concours de nombreuses protéines (Figure 22). Lors de l'ingestion du repas, la majorité de la vitamine B12 est liée aux protéines et présente sous forme d'adénosylcobalamine ou de méthylcobalamine. La cobalamine libre est prise en charge par les haptocorrines salivaires. Sous l'effet des conditions acides de l'estomac, la liaison de la vitamine aux protéines du repas est clivée et la cobalamine se lie préférentiellement aux haptocorrines résiduelles (Allen, Seetharam, Podell, & Alpers, 1978). Les haptocorrines sont ensuite dégradées par les enzymes pancréatiques dans le duodénum et la vitamine se retrouve de nouveau sous forme libre (Russell-Jones & Alpers, 1999). Sous l'effet des conditions neutres du milieu, elle se retrouve liée au facteur intrinsèque (FI) précédemment excrété dans l'estomac par les cellules pariétales (voir 1.2.1.2.) (Nicolas & Guéant, 1994). Le complexe FI-B12 se fixe ensuite sur un récepteur spécifique de la bordure en brosse de l'épithélium iléal, le cubam, et pénètre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose médiée par un récepteur (Guéant et al., 1988). Une fois le complexe internalisé, le FI est dégradé, libérant ainsi la vitamine B12 au sein de l'entérocyte avant son excrétion dans le sang (Lildballe, Mutti, Birn, & Nexo, 2012). Un mécanisme d'absorption par diffusion passive se produit en outre dans l'intestin grêle, mais ne devient significatif qu'à haute dose (> 500 µg en une prise) (Combs & McClung, 2017b).

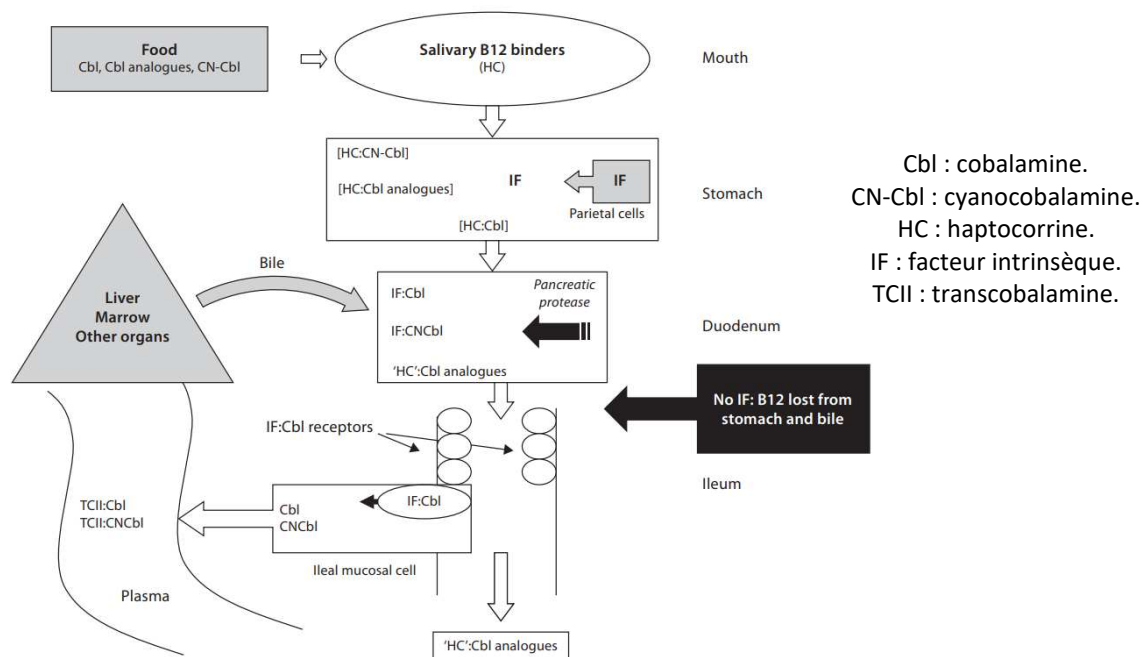


Figure 22 : Absorption et métabolisme de la vitamine B12 (Scott & Molloy, 2012).

I.3.6.3 MÉTABOLISME DE LA VITAMINE B12

Dans le compartiment sanguin, environ 20 % de la vitamine B12 circulante est liée à la transcobalamine (Seetharam, Bose, & Li, 1999) et forme un complexe nommé holotranscobalamine (HTC). La quantité résiduelle de vitamine B12 se fixe à l'haptocorrine (également nommée protéine R), mais le rôle et la finalité de ce complexe sont encore méconnus (Fernandes-Costa & Metz, 1982).

Après fixation sur un récepteur d'endocytose spécifique (récepteur mégalin pour les reins, CD320 pour les autres organes dont le foie), l'HTC est internalisée dans le lysosome de la cellule cible, où se produit la dégradation de la transcobalamine. La vitamine B12 est alors transportée par le transporteur membranaire lysosomal 1 (LMBRD1) dans le cytoplasme de la cellule, où elle joue son rôle de cofacteur (Guéant-Rodriguez et al., 2003; Nielsen, Rasmussen, Andersen, Nexø, & Moestrup, 2012). Une quantité significative de la vitamine B12 absorbée est en outre stockée dans le foie (60% du stockage) et les muscles (30 %). Environ 1,5 mg de vitamine B12 se retrouve ainsi stockée dans le foie chez les adultes, pour une capacité de stockage totale de 2 à 5 mg. Ce stockage permet de protéger le corps lors de périodes de carences d'apports (jusqu'à 1 an chez l'enfant, 7 ans chez l'adulte) (Combs & McClung, 2017b).

I.3.6.4 FONCTIONS BIOLOGIQUES DE LA VITAMINE B12

La fonction principale de la vitamine B12 est d'être cofacteur de deux réactions enzymatiques :

- L'adénosylcobalamine est un cofacteur de la méthylmalonyl CoA mutase, qui catalyse la conversion de la méthylmalonyl CoA en succinyl CoA dans la voie de dégradation du propionate formé à partir des acides gras (Johnson Jr, Reyes, Polaski, & Batey, 2012);
- La méthylcobalamine joue le rôle de cofacteur pour la méthionine synthase, qui catalyse la méthylation de l'homocystéine en méthionine (Oltean & Banerjee, 2005).

Par le biais de ces deux réactions enzymatiques, la vitamine B12 participe :

- au développement hématologique : synthèse du thymidylate, nécessaire à la synthèse de l'ADN (Selhub et al., 1996) ;
- aux fonctions neurologiques : synthèse de la gaine de myéline et de la choline (précurseur de l'acétylcholine) (Herbert, 2006);
- au développement du fœtus : quelques cas de défauts de fermeture du tube neural, lorsqu'une carence en folates a été écartée, pourraient être attribués à un manque de vitamine B12 (Ray & Blom, 2003) ;

- à la santé osseuse : une association positive entre le taux sérique de vitamine B12 d'une part et la densité minérale osseuse, les marqueurs du renouvellement osseux et les risques d'ostéoporose et de fracture de la hanche d'autre part a été démontrée (Bailey, Looker, et al., 2015; Dhonukshe-Rutten, van Dusseldorp, Schneede, de Groot, & van Staveren, 2005).
- à la prévention des acouphènes (Houston et al., 1999; Shemesh, Attias, Ornan, Shapira, & Shahar, 1993).

I.3.6.5 CARENCES EN VITAMINE B12 : CAUSES ET CONSÉQUENCES

Le statut vitaminique d'un individu peut être évalué par le dosage de différents marqueurs. La teneur sérique en vitamine B12 est le plus courant. La valeur normale est comprise entre 150 et 665 pM (Bailey et al., 2013). Cependant, cette mesure induit un biais car 80 % de la vitamine B12 sérique est liée à l'haptocorrine et n'est donc pas disponible pour le métabolisme. La concentration sérique en holotranscobalamine est donc un indicateur plus fiable des apports récents en B12 et des capacités d'absorption de l'individu. D'autres marqueurs sont utilisés pour évaluer l'efficacité de différents aspects du métabolisme de la vitamine B12 : la teneur sérique en homocystéine, en méthionine, en acide méthylmalonique ou bien en acide formiminoglutamique.

Les carences en vitamine B12 ont deux causes majeures. La plus courante est une insuffisance d'apports, du fait de l'adoption d'un régime à base végétale. Plus de 50 % des végétaliens en Inde ou aux États-Unis présentent une carence sérique en vitamine B12 (Obersby, Chappell, Dunnett, & Tsiami, 2013). L'apparition des carences est cependant ralentie chez les adultes, les capacités de stockage hépatique pouvant pallier le manque d'apports durant 7 ans environ (Figure 23). La seconde cause majeure de carence en vitamine B12 est une mauvaise absorption ou métabolisation de la vitamine : perte de fonction des cellules pariétales (sécrétrices du facteur intrinsèque), insuffisance pancréatique, inflammation du côlon, etc. Hors dosages sanguins, les carences en vitamine B12 sont couramment diagnostiquées par l'apparition d'une anémie macrocytique ou bien d'une démyélinisation nerveuse, pouvant favoriser la perte de cognition (Lindenbaum et al., 1988), l'apparition d'une dépression (Levitt, Wesson, & Joffe, 1998) ou des maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Hooshmand et al., 2010; Lamberti et al., 2005).

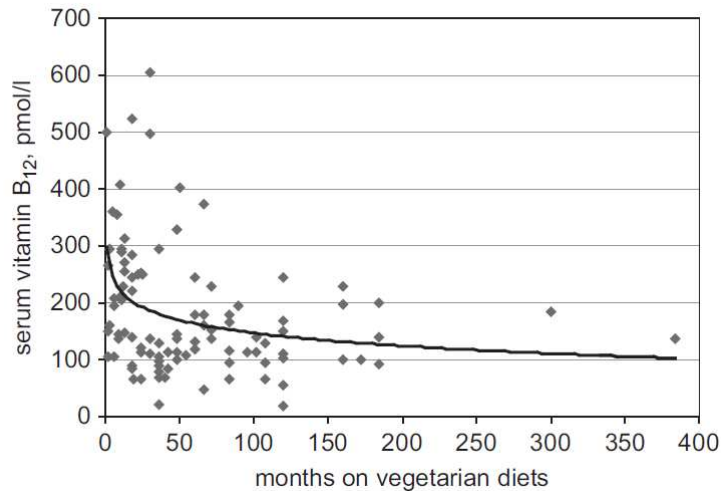


Figure 23 : Relation entre le statut en vitamine B12 des individus nord-américains et leur passif végétarien (Miller, Specker, Ho, & Norman, 1991).

A l'inverse, aucun effet toxique de la vitamine B12 n'a été identifié, même après administration intramusculaire d'une dose correspondant à 3000 fois la dose journalière recommandée (Allen, 2012). La vitamine B12 ingérée excédant la capacité limite de stockage du plasma et des tissus est excrétée dans les urines.

Les métabolites de la vitamine B12 seront nommés vitamine B12 dans la suite de ce manuscrit.

1.3.7 FACTEURS INFLUENÇANT LA BIODISPONIBILITÉ DES MICRONUTRIMENTS ET LEVIERS D'ACTION

Une étude réalisée en Indonésie et visant à évaluer les apports en caroténoïdes de différents aliments a permis d'observer que, malgré la consommation de fruits et légumes à teneur élevée en provitamine A (plus de deux fois les apports journaliers recommandés), une partie des sujets de l'étude présentaient une carence en vitamine A (West & Poortvliet, 1993). Une seconde étude réalisée simultanément, au cours de laquelle une même quantité d'acide folique et de β -carotène était consommée soit *via* l'enrichissement de gaufres, soit *via* la consommation de légumes (groupe témoin), a montré que les teneurs sériques en ces micronutriments étaient supérieures dans le groupe ayant consommé des gaufres, par rapport au groupe témoin (de Pee, West, Karyadi, & Hautvast, 1995). Ces deux études montrent que le vecteur d'apport est l'un des facteurs pouvant moduler la biodisponibilité des caroténoïdes. Mais il n'est pas le seul, comme de Pee & West (1996) ont pu l'établir à l'issue d'une revue exhaustive de la littérature. Ces auteurs ont listé l'ensemble des facteurs susceptibles d'affecter la biodisponibilité des micronutriments et les ont

réunis sous l'acronyme « SLAMANGHI », repris ultérieurement en « SLAMENGHI » (Figure 24) (Borel, Caillaud, & Cano, 2015) :

- **Species of micronutrients** : espèce moléculaire ;
- **Linkage** : liaison chimique de la molécule ;
- **Amount of micronutrients consumed in a meal** : quantité dans le repas ;
- **Matrix in which the micronutrient is incorporated** : effet de la matrice alimentaire ;
- **Absorption modifiers** ou **Effectors of absorption and bioconversion** : autres molécules pouvant moduler l'absorption ;
- **Nutrient status of the host** : statut en micronutriment de l'individu ;
- **Genetic factors** : facteurs génétiques ;
- **Host-related factors** : facteurs relatifs à l'individu ;
- **Mathematical Interactions** : interactions entre tous ces facteurs.

Ces différents facteurs seront détaillés dans la suite de ce chapitre, en se focalisant sur les micronutriments étudiés dans cette thèse : la lutéine et les vitamines D, B12 et B9.

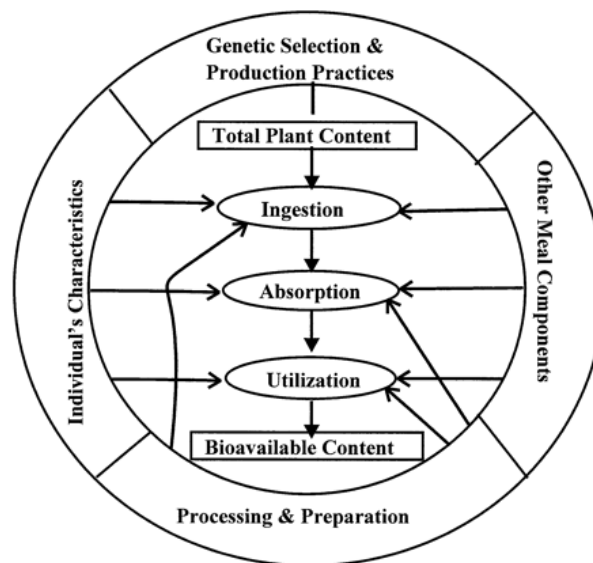


Figure 24 : Facteurs susceptibles d'influencer la biodisponibilité des nutriments chez l'Homme (Graham, Welch, & Bouis, 2001)

I.3.7.1 ESPÈCE MOLÉCULAIRE

L'espèce chimique d'un micronutriment influe sur plusieurs paramètres pouvant moduler son absorption. En particulier, selon leur caractère lipophile ou hydrophile, les micronutriments se répartissent plutôt dans la phase lipidique ou aqueuse de la matrice alimentaire, ce qui conditionne l'action des enzymes digestives. Les micronutriments lipophiles subissent l'action des lipases de la cavité orale, puis gastrique dans l'estomac, et enfin des lipases pancréatiques et des

sels biliaires dans l'intestin (Harrison & Kopec, 2018). Un micronutriment hydrophile, piégé dans les réseaux protéiques et amylacés, subit quant à lui plutôt l'action de l'amylase salivaire, puis de la pepsine et enfin des protéases pancréatiques. Les cinétiques d'action des enzymes sont de ce fait différentes et peuvent aboutir à des libérations différées des micronutriments (Bishu & Quigley, 2015).

La polarité d'un caroténoïde influence de surcroît son transfert vers les micelles mixtes. Les caroténoïdes polaires étant distribués à la surface des émulsions, tandis que les carotènes sont situés dans le noyau hydrophobe des gouttelettes lipidiques, les premiers peuvent passer directement des émulsions aux micelles mixtes, à la différence des seconds (Borel et al., 1996; Gärtner, Stahl, & Sies, 1996). Une étude réalisée chez le rat a ainsi démontré que la biodisponibilité de caroténoïdes purs était inversement corrélée à leur hydrophobie, et était liée directement à leur bioaccessibilité (Sy et al., 2012).

La voie d'absorption dans l'intestin dépend aussi du micronutriment considéré. Si on a longtemps supposé qu'ils étaient absorbés par diffusion passive, il est maintenant établi que des protéines entérocytaires sont impliquées dans l'absorption des micronutriments lipidiques. Ainsi, l'absorption de la lutéine implique le récepteur SR-BI (scavenger-receptor class B type I). Ce récepteur n'est cependant pas spécifique de la lutéine ; il intervient aussi dans l'absorption de plusieurs autres molécules lipidiques à l'instar du β -carotène, du lycopène et du cholécalférol (Moussa et al., 2008; Reboul et al., 2011; van Bennekum et al., 2005). L'absorption du cholécalférol implique d'autre part deux autres transporteurs : CD36 (Cluster Determinant 36) et NPC1L1 (Niemann-Pick C1 Like 1). La protéine BCRP (breast cancer resistance protein), transporteur associé à de nombreuses molécules, pourrait de même avoir un rôle dans l'absorption de la lutéine (Borel et al., 2014). Pour finir, une fraction de la vitamine D et de la lutéine pourrait être absorbée par diffusion passive (Reboul et al., 2011; Sugawara et al., 2001). Du mécanisme impliqué (diffusion passive ou facilitée par un transporteur) dépend l'efficacité de la voie d'absorption, qui est donc variable selon le micronutriment considéré. Cela explique le fait que la lutéine présente une efficacité d'absorption de 37 à 60 %, contre 55 à 99 % pour le cholécalférol (Borel, 2012a).

Comme indiqué précédemment, la vitamine D est présente sous deux formes au sein des aliments : l'ergocalciférol (vitamine D₂) et le cholécalférol (vitamine D₃). Selon les études, les conclusions divergent en ce qui concerne la bioefficacité des deux formes. Certaines concluent

que les deux formes n'ont pas la même bioefficacité, et que l'augmentation de la teneur sérique en 25(OH)D est 70 % plus élevée après ingestion de vitamine D₃ par rapport à la vitamine D₂, à dose égale (Trang et al., 1998; Tripkovic et al., 2012). D'autres observent des biodisponibilités équivalentes entre les deux formes chez l'Homme sain (Parrish, 1979; Reboul et al., 2011). En revanche, l'aptitude des différents isomères de la vitamine D à exercer leur activité biologique (« biopotency ») diffère selon leur proximité métabolique avec la forme active 25-OH-D (Combs & McClung, 2017c).

1.3.7.2 LIAISON CHIMIQUE DE LA MOLÉCULE

Les micronutriments peuvent être présents sous forme libre ou liée au sein des aliments. On estime que 90 % des caroténoïdes consommés dans le cadre d'un régime alimentaire français courant sont sous forme libre. Le reste des caroténoïdes, présent sous forme liée, est couramment estérifié avec des acides gras, ce qui diminue leur polarité par rapport au même composant à l'état libre. Les esters de xanthophylles se trouvent alors plus concentrés au cœur des micelles mixtes qu'à leur surface, contrairement aux xanthophylles non estérifiées. Ceci a pour effet de diminuer l'accessibilité aux enzymes et de limiter l'absorption intestinale des xanthophylles estérifiées (Pérez-Gálvez & Mínguez-Mosquera, 2005). Cependant, une étude clinique réalisée chez 18 volontaires a démontré que les esters de lutéine présentent une biodisponibilité équivalente à celle de la forme libre de lutéine (Bowen, Herbst-Espinosa, Hussain, & Stacewicz-Sapuntzakis, 2002). Une biodisponibilité supérieure des esters par rapport à la forme libre a même été observée dans le cas de la zéaxanthine (Breithaupt, Weller, Wolters, & Hahn, 2004). Afin d'expliquer ces résultats, ces auteurs ont émis deux hypothèses : soit l'hydrolyse des esters de xanthophylles dans la lumière intestinale est un mécanisme très efficace, soit le transport à travers la membrane intestinale est plus efficace pour les esters que pour les formes libres. Cependant, d'autres études montrent qu'une quantité plus importante de lipides est nécessaire pour obtenir une absorption aussi efficace de la lutéine estérifiée par rapport à la lutéine libre (Roodenburg, Leenen, van het Hof, Weststrate, & Tijburg, 2000).

Le niveau de saturation de l'acide gras entrant dans l'estérification peut également avoir un impact sur les propriétés bioactives des micronutriments. Lorsqu'un acide gras polyinsaturé est estérifié avec une xanthophylle, on observe une diminution du pouvoir antioxydant de ce dernier. Cela serait dû à la propagation des réactions radicalaires par la chaîne insaturée qui augmenterait le pouvoir pro-oxydant du milieu de façon synergétique (Pérez-Gálvez & Mínguez-Mosquera, 2002).

Concernant la vitamine D, si la forme estérifiée n'existe pas à l'état naturel, certains compléments alimentaires peuvent toutefois en proposer sous différentes formes : calcitriol (25-hydroxyvitamine D), calcidiol (1,25-dihydroxyvitamine D), 7-dehydrocholecalciferol (provitamine D), etc. Ces composés estérifiés ont tendance à être plus stables que la vitamine D sous forme libre. Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'impact de ces modifications chimiques sur la biodisponibilité des composés. Une étude réalisée chez l'Homme a démontré que la biodisponibilité de la vitamine D₂ et de la vitamine D₃-palmitate étaient similaires, à condition toutefois que le système digestif soit mature, ce qui correspond pour ces auteurs à environ 89 jours de vie (Hollis, Lowery, Pittard, Guy, & Hansen, 1996).

La biodisponibilité de la vitamine B9 dépend principalement de sa forme d'apports. Les formes polyglutamiques devant subir une première étape de déconjugaison enzymatique dans l'intestin grêle avant leur absorption, cela explique la plus faible biodisponibilité des folates au regard de celle de l'acide folique. La présence dans les aliments d'acides organiques inhibant cette réaction de déconjugaison joue de surcroît un rôle dans cette différence (Cuskelly, McNulty, & Scott, 1996; Wei & Gregory, 1998), tout comme la liaison des folates aux protéines et polysaccharides et leur emprisonnement au sein des structures cellulaires dans le cas des sources végétales (Castenmiller, West, Linssen, van het Hof, & Voragen, 1999; van het Hof, Tijburg, Pietrzik, & Weststrate, 1999). La biodisponibilité des folates a ainsi été estimée à 50 % (Gregory et al., 1991; Sauberlich, Kretsch, Skala, Johnson, & Taylor, 1987), contre 85 % pour l'acide folique utilisé comme enrichissement dans les aliments (Pfeiffer, Rogers, Bailey, & Gregory, 1997). L'acide folique sous forme de compléments alimentaires, consommé seul, présente une biodisponibilité de 98 à 100 % (Brouwer et al., 1999).

I.3.7.3 QUANTITÉ DE MICRONUTRIMENT DANS LE REPAS

Peu d'études se sont intéressées à l'impact de la dose de micronutriment consommée sur leur biodisponibilité. Il est admis que les caroténoïdes sont absorbés de manière efficace jusqu'à une dose de 20 à 30 mg par prise (Charles Desmarchelier & Borel, 2017). En effet, la voie d'absorption majoritaire des caroténoïdes étant saturable, il semble rationnel de penser qu'un apport massif de caroténoïdes soit moins efficace qu'un apport étalé dans le temps. La répartition d'une forte dose de β -carotène (51 mg) en trois repas (17 mg par repas) pris tout au long de la journée peut ainsi augmenter jusqu'à trois fois la biodisponibilité de ce micronutriment (Prince & Frisoli, 1993). Cependant, des résultats divergents ont montré qu'un apport massif de caroténoïdes (23 mg)

durant le repas de midi était plus efficace, en termes d'absorption, que ce même apport réparti en deux repas (Goltz, Sapper, Failla, Campbell, & Ferruzzi, 2013).

Concernant la vitamine D, une étude clinique impliquant 116 sujets a démontré un accroissement proportionnel de la teneur sérique en vitamine D avec la dose consommée, dans la gamme de la dose physiologique (jusqu'à 10 μmol) (Barger-Lux, Heaney, Dowell, Chen, & Holick, 1998). En revanche, à dose pharmacologique (100 μmol), une saturation de la voie d'absorption facilitée par un récepteur a été observée sur modèle *in vitro* (Reboul et al., 2011), la voie majoritaire devenant alors la diffusion passive au travers des entérocytes (Hollander & Truscott, 1976). D'autres facteurs limitants l'absorption des nutriments lipophiles ont été notés, à l'instar de la capacité limitée des micelles mixtes à les solubiliser, ou la saturation des chylomicrons (Stahl, 2002).

La biodisponibilité de la vitamine B12 dépend de la quantité ingérée, car le mécanisme d'absorption est régulé par un phénomène de rétrocontrôle. Ainsi, environ 70 % d'une dose de 0,5 μg de vitamine B12 ingérée sont absorbés (soit 0,35 μg environ). Pour une dose de 5 μg , la proportion absorbée n'est plus que de 28 % environ (soit 1,4 μg) et pour une dose de 10 μg , de 16 % en moyenne (soit 1,6 μg). Lors d'une prise massive de 100 μg , l'absorption est inférieure à 1% (Herbert, 1987).

I.3.7.4 EFFET DE LA MATRICE ALIMENTAIRE

La matrice d'incorporation est considérée comme l'un des facteurs clés de la biodisponibilité des micronutriments. En effet, tel qu'évoqué précédemment, les propriétés de la matrice influencent sa déstructuration au cours de la digestion et donc la libération des micronutriments.

Contrairement aux croyances populaires, un fruit ou un légume n'est pas forcément plus « nutritif », au sens où il fournit à l'organisme un certain nombre de nutriments, à l'état naturel qu'après transformation. Dans les végétaux, les caroténoïdes sont localisés à l'intérieur des tissus, au sein de structures cellulaires. Ils peuvent être encapsulés ou bien associés à différents organites tels que les chloroplastes, limitant leur libération de la matrice et donc leur absorption subséquente au cours de la digestion (Lemmens et al., 2014). En conséquence, la biodisponibilité de la lutéine est plus importante lorsqu'elle est apportée par des brocolis (où elle est localisée dans la fleur), plutôt que par des épinards (où elle se retrouve liée aux chloroplastes) (van het Hof et al., 1999). De même, la biodisponibilité de la lutéine est supérieure lorsque le vecteur d'apport

est un œuf, où la lutéine est libre en solution et directement accessible, plutôt que des épinards (Chung, Rasmussen, & Johnson, 2004).

Les procédés technologiques, thermiques ou mécaniques (broyage par exemple), en altérant la microstructure de la matrice, peuvent augmenter la bioaccessibilité des micronutriments et ainsi compenser, au moins partiellement, leur dégradation. Pour preuve, la bioaccessibilité de la lutéine est plus élevée lorsque la matrice des épinards est altérée par cuisson ou par hachage (48 % contre 38 % pour les feuilles entières) (Reboul et al., 2006; van het Hof et al., 1999). Ce même résultat a été prouvé pour les folates (Castenmiller et al., 2000; van het Hof et al., 1999). Toutefois, la présence de fibres alimentaires ne semble pas affecter leur biodisponibilité (Ristow, Gregory, & Damron, 1982).

En revanche, il semble que la matrice d'apport n'ait pas d'influence sur la biodisponibilité de la vitamine D. En effet, aucune différence d'absorption de la vitamine D n'a été observée selon qu'elle était apportée *via* du pain ou sous forme de complément alimentaire (Natri et al., 2006). Le même résultat a été observé entre des champignons biofortifiés en vitamine D₂ par irradiation et un complément alimentaire de vitamine D₂ (Outila, Mattila, Piironen, & Lamberg-Allardt, 1999; Urbain, Singler, Ihorst, Biesalski, & Bertz, 2011).

La biodisponibilité de la vitamine B12 est comparable entre un complément alimentaire sous forme cristalline et la vitamine B12 issue de poisson (Doscherholmen, McMahon, & Economon, 1981) ou de viande de mouton et poulet (Doscherholmen, McMahon, & Ripley, 1978; Heyssel, Bozian, Darby, & Bell, 1966). En revanche, la vitamine B12 des œufs est mal absorbée du fait de sa liaison aux protéines dans le jaune et le blanc d'œuf (Levine & Doscherholmen, 1983).

1.3.7.5 MOLÉCULES POUVANT MODULER L'ABSORPTION

Au-delà des caractéristiques de structure de la matrice, la présence en son sein d'autres composants peut dans certains cas moduler la biodisponibilité des micronutriments. Dans le cas des micronutriments lipophiles par exemple, la présence de lipides au sein de l'aliment permet leur solubilisation au sein d'une phase lipidique, ce qui améliore leur absorption. Les lipides stimulent en outre la sécrétion des sels biliaires et facilitent de ce fait la production de micelles mixtes (Unlu, Bohn, Clinton, & Schwartz, 2005). Ainsi, l'ajout de trois œufs (soit 15 g de lipides) à un repas standardisé augmenterait de 4 à 5 fois la biodisponibilité de la lutéine contenue dans la totalité du repas (Hollander & Ruble, 1978; Kim, Gordon, Ferruzzi, & Campbell, 2015). Dans une

autre étude portant sur l'absorption des esters de lutéine, il a été montré que la teneur sérique en lutéine était augmentée de 207 % par rapport à la teneur basale après un repas contenant 36 g de lipides, contre 88 % d'augmentation pour un repas contenant seulement 3 g de lipides (Roodenburg et al., 2000). En se basant principalement sur les études portant sur le β -carotène, certains auteurs estiment qu'une dose de lipides comprise entre 3 et 5 g par repas serait optimale pour favoriser l'absorption des caroténoïdes (Jayarajan, Reddy, & Mohanram, 1980).

En revanche, il semble que la présence de lipides dans l'aliment-vecteur ne favorise pas l'absorption de la vitamine D. Ainsi, la biodisponibilité de la vitamine D ne diffère pas qu'elle soit apportée par du lait entier (3,6 % de matière grasse), écrémé (0,2 %) ou du jus d'orange (0,1 à 0,2 %) (Tangpricha et al., 2003). De même, la consommation de 2 g d'huile de poisson, concomitamment avec une dose de vitamine D, n'améliore pas la biodisponibilité en comparaison de la vitamine D seule (Korkor & Bretzmann, 2009). La présence de stérols dans le repas ingéré semble cependant diminuer l'efficacité d'absorption de la vitamine D, comme cela a pu être démontré par une étude sur cellules Caco-2 (Goncalves et al., 2011).

Le type d'acide gras consommé pourrait avoir également un effet sur la biodisponibilité des micronutriments. Des études suggèrent que la biodisponibilité de la lutéine serait plus élevée lorsqu'elle est apportée par un aliment riche en acides gras mono-insaturés, plutôt qu'en acides gras polyinsaturés (Lakshminarayana, Raju, Krishnakantha, & Baskaran, 2007). Les poly-insaturations pourraient favoriser l'oxydation de ce caroténoïde au sein du tractus intestinal, limitant son absorption. De plus, l'incorporation d'acides gras poly-insaturés au sein des micelles mixtes engendre la formation de micelles de taille plus importante (Clark, Yao, She, & Furr, 2000). Cela limiterait leur diffusion à travers la couche d'eau non agitée adjacente à l'entérocyte, réduisant ainsi le taux d'absorption des caroténoïdes (Hollander & Ruble, 1978). De même, l'absorption de la vitamine D serait facilitée lorsqu'elle est apportée au sein d'une matrice contenant des acides gras mono-insaturés par rapport aux acides gras poly-insaturés (Niramitmahapanya, Harris, & Dawson-Hughes, 2011). Les acides gras mono-insaturés favoriseraient en outre l'absorption de la lutéine et de la vitamine D par rapport aux acides gras saturés (Goltz, Campbell, Chitchumroonchokchai, Failla, & Ferruzzi, 2012).

Des études *in vivo* ont montré que certaines fibres solubles, telles que la gomme de guar, la pectine ou la gomme arabique, pouvaient avoir un effet inhibiteur sur les réactions de lipolyse et donc un effet négatif sur la digestion des lipides (Pasquier et al., 1996) ; il en est de même pour le

chitosane (Hur, Lim, Park, & Joo, 2009). Plusieurs mécanismes pourraient être à l'origine de ce phénomène : inhibition des enzymes pancréatiques et principalement de la lipase par ces fibres (Hansen, 1987), complexation des sels biliaires avec les fibres (Eastwood & Mowbray, 1976), accroissement de la viscosité du chyme qui aurait pour effet de ralentir la vitesse de diffusion des micelles mixtes (Gallaher, Hassel, Lee, & Gallaher, 1993).

Les cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) peuvent aussi altérer la digestion des lipides, et donc l'absorption des micronutriments lipophiles. Ils agiraient en formant des sels insolubles avec les acides gras libres ou les sels biliaires, dans la partie supérieure de l'intestin (McClements, Decker, & Park, 2009).

Enfin, certains micronutriments peuvent interagir entre eux au sein d'une matrice et ainsi moduler leur biodisponibilité. Au sein du groupe chimique des caroténoïdes par exemple, les différents composés peuvent entrer en compétition pour leur solubilisation au sein des micelles mixtes, limitant ainsi leur absorption par l'entérocyte (Tyssandier et al., 2002). La vitamine E à forte dose (100 μmol) peut altérer l'absorption de la vitamine D de 17 % (Goncalves et al., 2015). D'autres micronutriments, tels que les vitamines C et E, peuvent quant à eux favoriser la biodisponibilité de la lutéine en la protégeant contre l'oxydation au sein du tractus gastro-intestinal (Tanumihardjo, Li, & Dosti, 2005).

Le volume total de repas ingéré peut tout autant avoir un impact sur la biodisponibilité des micronutriments. Chez des patients traités pour une carence en vitamine D, la biodisponibilité des compléments de vitamine D est améliorée lorsqu'ils sont consommés au cours du repas le plus copieux de la journée. En conséquence, lorsqu'il était spécifié aux patients de consommer leur complément de vitamine D avec le repas du midi, une élévation de la teneur sérique en vitamine D de 56,7 % en moyenne a été observée par rapport au groupe témoin où aucune indication de consommation n'a été fournie (Mulligan & Licata, 2010). Cela pourrait résulter d'une sécrétion d'enzymes plus importante, proportionnellement au volume du repas ingéré, ou bien d'un ralentissement de la vidange gastrique.

Il a également été démontré que la présence d'acides organiques tels que les acides malique, citrique ou phytique pouvait diminuer la biodisponibilité des folates, en inhibant les enzymes responsables de la conversion des formes polyglutamates en monoglutamates (Wei & Gregory, 1998). Cette inhibition est plus marquée selon l'aliment ingéré, de 35 % avec la banane, les

épinards ou les haricots à 46 % avec la tomate, voire 80 % dans le cas du jus d'orange (Bhandari & Gregory, 1990).

I.3.7.6 STATUT DE L'INDIVIDU EN MICRONUTRIMENT

Un système de rétrocontrôle négatif a été observé entre le statut d'un individu en vitamine A et la sécrétion des protéines de transport SR-BI qui interviennent dans l'absorption du β -carotène, précurseur de la vitamine A (Lobo et al., 2010). Les mécanismes d'absorption de la vitamine D et de la lutéine impliquant eux aussi ce récepteur, le statut d'un individu en vitamine A pourrait donc influencer l'absorption de ces deux micronutriments (Charles Desmarchelier & Borel, 2017; Widjaja-Adhi, Lobo, Golczak, & Von Lintig, 2015). Par ailleurs, chez le rat, l'absorption de vitamine D₃ est plus élevée chez des sujets carencés en vitamine D, que chez ceux préalablement supplémentés en vitamine D (Apukhovskaia, Khrestovaia, Antonenko, Omel'chenko, & Dotsenko, 1990).

I.3.7.7 FACTEURS GÉNÉTIQUES

Peu d'études ont été consacrées à l'impact du facteur génétique sur l'absorption des micronutriments. Néanmoins, une étude réalisée chez l'Homme a montré l'impact de différents polymorphismes du gène codant la protéine de transport SR-BI sur le taux plasmatique de vitamine E. Les auteurs de cette étude émettent l'hypothèse qu'il pourrait en être de même pour la vitamine D (Reboul et al., 2011). L'influence de ces polymorphismes sur l'absorption de la lutéine a également été investiguée, mais sans qu'aucune corrélation n'ait pu être établie (Borel et al., 2007). Toutefois, une variabilité interindividuelle pour la biodisponibilité de la lutéine a été récemment mise en évidence. Contrôlée en partie génétiquement, elle pourrait s'expliquer par un polymorphisme des gènes codant les protéines de transport (Borel et al., 2014).

I.3.7.8 FACTEURS RELATIFS À L'INDIVIDU

De nombreux facteurs relatifs à l'individu ont été associés à des modifications de la teneur sérique en caroténoïdes, mais peu d'études ont finalement permis d'établir des corrélations entre ces facteurs et la biodisponibilité de ces micronutriments. De plus, les corrélations en question pourraient être biaisées. Dans le cas du genre par exemple, une plus grande teneur sérique en lutéine et autres caroténoïdes a été observée chez les femmes, mais elle pourrait être liée à une plus grande consommation de fruits et légumes riches en caroténoïdes, et non à de réelles différences en termes d'absorption (Brady, Mares-Perlman, Bowen, & Stacewicz-Sapuntzakis, 1996).

L'âge pourrait être un facteur affectant la biodisponibilité des micronutriments, du fait de l'altération du système digestif (diminution des sécrétions gastriques et intestinales principalement) (Chantarojanasiri et al., 2015; Feldman, Cryer, McArthur, Huet, & Lee, 1996). Pour preuve, un léger effet de l'âge a été observé sur la biodisponibilité du lycopène, mais il pourrait être biaisé par la faible efficacité d'absorption de ce caroténoïde en général. Cet effet n'a pas été observé sur l'absorption des autres caroténoïdes (Cardinault et al., 2003). De même, la biodisponibilité de la vitamine D est inférieure chez les personnes âgées comparativement à de jeunes adultes, à dose ingérée identique (Barragry et al., 1978). Cette différence pourrait être due à une plus faible synthèse endogène de vitamine D chez les personnes âgées, en raison d'une exposition plus modérée au soleil et/ou d'apports alimentaires insuffisants. À l'inverse chez le rat, l'absorption de la vitamine D₃ augmenterait avec l'âge (Hollander & Tarnawski, 1984), ou ne serait pas affectée par ce facteur (Harris & Dawson-Hughes, 2002; Johnson et al., 2005).

L'état de santé de l'individu, et principalement les maladies du système digestif telles que la maladie de Crohn ou la maladie cœliaque, affecte évidemment la biodisponibilité des micronutriments. Dans ces pathologies en effet, une réaction immunitaire anormale de l'intestin grêle, engendrée par certains composés alimentaires, entraîne une réaction inflammatoire au niveau des cellules des villosités intestinales, avec pour conséquence une malabsorption des nutriments en général et donc des micronutriments (Edes, Walk, Thornton, & Fritsche, 1991). Les maladies entraînant une malabsorption des lipides, telles que l'insuffisance pancréatique ou la fibrose kystique, peuvent diviser par deux l'efficacité d'absorption de la vitamine D (Farraye et al., 2011; Kanhere, Chassaing, Gewirtz, & Tangpricha, 2018; Lark et al., 2001).

L'obésité semble être corrélée positivement avec un risque de carence en vitamine D. En effet, une corrélation négative a été établie entre d'une part le poids corporel et la teneur en masse grasse d'un individu et d'autre part sa teneur sérique en vitamine D (Drincic, Armas, Van Diest, & Heaney, 2012). Une étude portant sur l'impact de l'obésité sur la biodisponibilité de la vitamine D à dose pharmacologique et la production cutanée de vitamine D₃ a également démontré une corrélation négative entre l'indice de masse corporelle et la teneur sérique en vitamine D (Wortsman, Matsuoka, Chen, Lu, & Holick, 2000). Néanmoins, il semble que l'absorption de la vitamine D soit améliorée chez les sujets obèses (Liel et al., 1988). Du fait de son caractère lipophile, la vitamine D est stockée dans les tissus adipeux. Un effet de dilution de la vitamine D dans la masse grasse des individus obèses explique donc leur faible taux sanguin de vitamine D.

On observe ainsi un accroissement de la teneur sérique en vitamine D au cours de la perte de poids des individus obèses, suite au relargage de cette vitamine par les tissus adipeux (Zittermann et al., 2009).

I.3.7.9 INTERACTIONS

Ce facteur a été défini pour refléter la synergie ou l'antagonisme probables entre plusieurs des facteurs précédemment étudiés. Il est important de prendre en compte ces interactions, car elles pourraient masquer des biais inhérents à certaines études. Il est toutefois extrêmement difficile d'établir des règles simples compte tenu de la complexité des mécanismes et de la multitude et diversité des facteurs impliqués.

I.3.7.10 LEVIERS D'ACTION POUR AMÉLIORER LA BIODISPONIBILITÉ DES MICRONUTRIMENTS

Bien que les différents facteurs susceptibles de moduler la biodisponibilité des micronutriments aient été distingués et intégrés dans l'acronyme « SLAMENGI », il existe très peu d'informations sur leur contribution relative. Prédire la biodisponibilité d'un micronutriment présent au sein d'une matrice alimentaire donnée serait envisageable s'il était possible de quantifier les effets relatifs à chaque facteur. Si certains facteurs ne peuvent être modulés car propres au micronutriment considéré (espèce moléculaire) ou à l'individu (facteurs génétiques), il semble néanmoins possible d'améliorer la biodisponibilité d'un micronutriment en agissant sur quatre de ces facteurs :

- L : les liaisons chimiques naturelles ou artificielles des micronutriments ;
- A : la quantité de micronutriments ingérée ;
- M : la matrice d'incorporation ;
- E : les effecteurs d'absorption.

I.3.7.10.1 Les modifications chimiques des micronutriments

Les micronutriments peuvent être présents naturellement sous plusieurs formes chimiques (esters, polymères, etc.). Mais ils peuvent aussi être modifiés chimiquement afin de faciliter leur incorporation au sein des matrices, modifier leur solubilité ou augmenter leur stabilité. Ainsi, la forme glycosylée de la quercétine (un flavonoïde) est plus biodisponible que la forme aglycone, moins hydrophile. Le caractère hydrophile plus marqué de la quercétine glycosylée faciliterait sa solubilisation dans les fluides digestifs (Lesser, Cermak, & Wolfram, 2004). De même, l'estérification de la quercétine avec un groupement d'éthanoate d'éthyle améliore sa biodisponibilité (Hu, Zou, He, Chen, & Deng, 2016).

I.3.7.10.2 Quantité de micronutriment ingérée

Si la quantité de micronutriment ingérée est globalement positivement corrélée à la quantité absorbée, un plateau est observé à dose pharmacologique pour les molécules ayant un système de transport actif à travers la membrane des entérocytes, du fait de la saturation de ces transporteurs. Au-delà de la dose seuil, les micronutriments ne sont plus absorbés que par diffusion passive, mécanisme non saturable mais moins efficient. On observe donc un fléchissement de la courbe effet-dose pour les fortes doses de micronutriment ingérées (Diwadkar-Navsariwala et al., 2003; McCormick, 2002; Reboul et al., 2011).

I.3.7.10.3 Effet de la matrice alimentaire

L'effet de la matrice d'incorporation sur la biodisponibilité des composés alimentaires, au cœur de ce travail de thèse, a été traité précédemment (voir 1.2.3 : Impact des traitements technologiques sur la digestion).

I.3.7.10.4 Effecteurs d'absorption

Les effecteurs d'absorption peuvent avoir un effet positif ou négatif sur la biodisponibilité des micronutriments. Il peut s'agir de lipides digestibles qui, présents au sein des matrices, favorisent l'absorption des micronutriments lipophiles (Fielding, Rowley, Cooper, & O' Dea, 2005). Ainsi, la biodisponibilité du β -carotène ingéré en présence d'huile essentielle de citron (non digestible) ou d'huile de maïs (digestible) est de 5 et 76 % respectivement (Rao, Decker, Xiao, & McClements, 2013).

Les protéines semblent également jouer un rôle d'effecteurs d'absorption. En effet, sur un modèle de cellules Caco-2, l'assemblage de la vitamine D au sein de micelles de caséines a eu pour effet d'augmenter d'un facteur 4 la biodisponibilité de la vitamine. Cet effet a été attribué par les auteurs à une protection des micelles contre la dégradation de la vitamine D (Cohen et al., 2017).

L'impact des fibres sur la biodisponibilité des micronutriments serait modéré. Ainsi, la niacine ingérée en présence de son de blé présente une absorption plus de deux fois inférieure à la niacine ingérée pure (Carter & Carpenter, 1982), mais ce résultat pourrait provenir d'une glycosylation des micronutriments plus que d'un réel effet des fibres. L'effet semble variable selon le micronutriment considéré. En effet, l'introduction de 20 % de pain complet dans un régime ne s'est traduit par aucun impact sur la biodisponibilité de la vitamine E chez le rat (Kelsay, 2011).

Certains micronutriments peuvent entrer en compétition pour leur absorption. Un effet antagoniste a ainsi pu être mis en évidence chez le furet entre la canthaxanthine, un caroténoïde de la famille des xanthophylles, et le β -carotène (Tang et al., 1993). En outre, les caroténoïdes entrent en compétition pour leur solubilisation dans les globules gras et leur incorporation dans les micelles mixtes (Berg, 2009). L'inhibition des enzymes de conversion du β -carotène par la lutéine et la canthaxanthine, ou bien de l' α -carotène par le β -carotène, a également été observée (Grolier, Duszka, Borel, Alexandre-Gouabau, & Azais-Braesco, 1997; Kostic, White, & Olson, 1995; van Vliet, van Schaik, Schreurs, & van den Berg, 1996). Enfin, il pourrait également y avoir une compétition entre caroténoïdes pour leur absorption dans l'entérocyte ou bien leur incorporation dans les chylomicrons (Tyssandier et al., 2002).

Chapitre II. Développement d'une gamme d'aliments enrichis en micronutriments

II.1	Introduction.....	96
II.2	Matériel et méthodes.....	96
II.2.1	Ingrédients et micronutriments	96
II.2.2	Production	97
II.2.3	Analyses microbiologiques	98
II.2.4	Caractérisation des matrices	98
II.3	Résultats et discussion	100
II.3.1	Formulation des matrices.....	100
II.3.2	Diagrammes de fabrication et description des matrices.....	102
II.3.3	Caractérisation de la microstructure des matrices	103
II.3.4	Composition biochimique des matrices	104
II.3.5	Enrichissement en micronutriments	105
II.4	Conclusion	111

II.1 INTRODUCTION

Le but était ici de concevoir, produire et caractériser les matrices modèles qui ont été utilisées pour les études *in vivo* et *in vitro* du projet MicroNut. Plus spécifiquement, les objectifs étaient :

- De concevoir à l'échelle du laboratoire une dizaine de matrices lipoprotéiques de composition constante mais de structures variées, sur une base « œuf-protéines végétales » ;
- De définir les teneurs d'enrichissements en considérant les teneurs naturellement présentes dans les matrices conçues, la quantité d'aliment à ingérer, et les données de la littérature quant aux doses nécessaires pour permettre la détection des micronutriments suivis en phase postprandiale ;
- De caractériser les matrices conçues afin de sélectionner de manière objective les quatre matrices modèles retenues pour les études *in vivo* et *in vitro*.

Bien que de nombreuses formulations et textures aient été testées au cours du développement des matrices, seule la version finale des quatre matrices sera présentée dans cette section : une Crème, un Flan, une Génoise et un Biscuit. Les matrices ont été développées premièrement en vue de l'étude clinique et ont donc été pensées en tenant compte des contraintes inhérentes à la conduite d'une étude *in vivo* chez l'Homme: sécurité sanitaire, densité calorique, stabilité durant le transport et la conservation et qualité organoleptique.

II.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.2.1 INGRÉDIENTS ET MICRONUTRIMENTS

La formulation finale des matrices utilisées pour les différentes études se compose de farine de blé (Francine T45, Grands Moulins de Paris, Ivry Sur Seine, France), de farine de pois décortiqués extrudée (Sativa 32/100, Sotexpro, Bermericourt, France), de sucre blanc en poudre (Saint-Louis Sucre, Paris, France), d'huile de tournesol (Lesieur, Asnières-sur-Seine, France), de jaune d'œuf pasteurisé en poudre, de blanc d'œuf granulé pasteurisé à haut pouvoir foisonnant (Liot, Pleumartin, France) et d'eau stérilisée au laboratoire.

La sélection des sources d'approvisionnement en micronutriments s'est faite sur plusieurs critères. Les produits se devaient d'être :

- disponibles en quantité suffisante provenant du même lot de production pour pouvoir réaliser toutes les tâches du projet ;
- les plus purs possible afin de mieux maîtriser les enrichissements des matrices et d'éviter la présence d'effecteurs d'absorption ;
- certifiés de qualité alimentaire ;
- sous une forme facilement conservable dans le temps, de ce fait sous forme de poudre dans la mesure du possible ;
- sous une forme chimique la plus neutre possible.

La vitamine B9 (sous forme d'acide folique) et la vitamine B12 sont des poudres pures obtenues auprès de Nutrilo GmbH (réf. 05-050 et 05-450 respectivement, Cuxhaven, Germany). La forme acide folique a été choisie afin de faciliter les dosages biochimiques ultérieurs et limiter les variations individuelles dans l'étape de déconjugaison des tétrahydrofolates avant leur absorption lors de l'expérimentation *in vivo*. La vitamine D (fournie sous forme de vitamine D₃) provient du même fournisseur (réf. 05-052). Elle se présente sous forme de poudre contenant 100 000 UI/g soit 2500 µg de vitamine/g (1 µg de vitamine D = 40 UI). Faute de pouvoir trouver un fournisseur de lutéine sous forme de poudre non estérifiée, le produit choisi pour les enrichissements se présente sous forme de gélules contenant 20 mg de lutéine libre en suspension dans de l'huile de tournesol (Diet Horizon, réf. 2779, Bordeaux, France). Afin de mieux maîtriser les quantités de lutéine à ajouter, une huile enrichie a ensuite été produite à partir de ces capsules en les dispersant dans de l'huile de tournesol, et sa concentration a été vérifiée par absorbance à 445 nm.

II.2.2 PRODUCTION

Les matrices ont été produites au sein du laboratoire STLO, dans une pièce dédiée et selon le protocole détaillé dans le Plan de Maîtrise Sanitaire (PMS) (voir Annexe 1), conçu afin d'assurer l'hygiène et la sécurité sanitaire des matrices tout au long de leur durée de vie, de leur production à leur expédition. Ce document de 68 pages est composé de quatre grandes parties :

- la maîtrise des bonnes pratiques d'hygiène ;
- le plan HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) permettant l'analyse et la maîtrise des dangers et points critiques ;
- le système de traçabilité des productions ;
- la gestion des produits non conformes.

Les matrices ont été conditionnées sous vide dans des sacs en polyamide/polyéthylène thermosoudables et non rétractables. Elles ont ensuite été stockées à -20°C pendant une durée variable selon l'analyse réalisée.

II.2.3 ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

Les analyses microbiologiques des matrices ont été réalisées par le laboratoire agréé Labocea (Fougères, France) selon le Règlement (CE) n° 1441/2007 de la commission du 5 décembre 2007 modifiant le Règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Trois échantillons aléatoires provenant de trois cuissons différentes ont été analysés pour chaque lot de production. Les analyses réalisées, ainsi que les limites d'acceptation des lots sont détaillées dans la [Table 6](#). Le lot est considéré comme sain microbiologiquement lorsque les résultats de toutes les analyses sont inférieurs à la valeur m ou bien lorsque 1/3 des échantillons au maximum est compris entre les valeurs m et M. Lorsqu'un échantillon est supérieur à la valeur M ou bien que plus d'1/3 des échantillons est compris entre les valeurs m et M, le lot est considéré comme contaminé et une procédure d'élimination des produits est mise en œuvre.

Afin de valider la durée de conservation des matrices, un lot de produit de chaque matrice a été analysé en sortie de production, puis après 4 mois de conservation à -20°C. Pour la Crème, l'analyse a été réalisée le lendemain de sa mise en œuvre.

Table 6 : Analyses microbiologiques réalisées sur les matrices et limites d'acceptation des lots

Souche	Méthode d'analyse	Limites pour acceptation du lot	
		m	M
Flore mésophile totale	NF ISO 4833-1 TEMPO AC-BIO 12/35-05/13	10 ⁵ UFC/g	5.10 ⁵ UFC/g
Flore thermophile totale	PCA en aérobiose 55 °C	10 ⁵ UFC/g	5.10 ⁵ UFC/g
Entérobactéries	NF V08-054 TEMPO EB-BIO 12/21-12/06	10 UFC/g	10 ² UFC/g
Levures/moisissures	NF V08-036	10 ³ UFC/g	
Staphylocoques	NF EN ISO 6888-2 37 °C TEMPO STA-BIO 12/28-04/10	10 ² UFC/g	10 ³ UFC/g
<i>Bacillus cereus</i>	AES 10/10-07/10	50 UFC/g	5.10 ² UFC/g
<i>Salmonella</i>	BRD 07/11-12/05	Absence dans 25 g	

m : limite de tolérance de contamination. M : limite d'acceptabilité de contamination.

II.2.4 CARACTÉRISATION DES MATRICES

II.2.4.1 TAUX D'EXTRAIT SEC, CENDRES, PROTÉINES ET LIPIDES

La teneur en eau des matrices a été déterminée par pesée après leur dessiccation en étuve à 102 ± 2°C durant 7h. Le taux de cendres était mesuré par pesée après incinération à 525 ± 25°C

durant 5h, en vue de la minéralisation de la matière organique. La teneur en protéines a été déterminée par dosage de l'azote par la méthode Kjeldhal (Latimer & AOAC International, 2016) et en lui appliquant un facteur de conversion de 6,25. La teneur en lipides a été mesurée par pesée après une extraction Folch (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957). Tous les dosages ont été effectués en triplicat, sur trois échantillons provenant de trois lots de production différents (n=9).

II.2.4.2 DÉTERMINATION DES CLASSES DE LIPIDES

La répartition des classes de lipides a été déterminée par chromatographie couche mince (CCM). Après extraction suivant la méthode Folch, les lipides ont été séparés sur une plaque de silice à l'aide d'un mélange hexane:diéthyl éther:acide acétique (70:30:1, v:v) pour phase mobile. La visualisation des bandes était rendue possible après application d'une solution contenant 10 % (p/v) de sulfate de cuivre et 8 % (p/v) d'acide orthophosphorique et chauffage des plaques pendant 10 minutes à 150 °C. Les plaques étaient ensuite numérisées en utilisant un scanner de laboratoire (Labscan, GEHealthcare, ImageScanner III) et la densité des bandes déterminée en utilisant le logiciel Image J.

Cinq classes de lipides ont été séparées : les esters de cholestérol, les triglycérides, les acides gras libres, une classe comprenant le cholestérol et les diglycérides, et les phospholipides. Les résultats sont exprimés pour chaque classe de lipides en pourcentage de la densité totale, représentatif de la quantité massique de chaque classe.

II.2.4.3 DOSAGE DES MICRONUTRIMENTS

II.2.4.3.1 Vitamine B9

Afin de déterminer la teneur en vitamine B9 des matrices, les échantillons de produits congelés ont préalablement été réduits en poudre sous azote liquide. Une quantité de matrice correspondant à environ 500 ng de folates a été homogénéisée dans 30 mL de tampon phosphate 75 mM contenant 52 mM d'acide ascorbique et 0,1 % de mercaptoéthanol, puis les tubes ont été fermés sous azote pour éviter l'oxydation (Ruggeri, Vahteristo, Aguzzi, Finglas, & Carnovale, 1999). Après 10 minutes d'incubation dans un bain-marie à ébullition, les tubes ont été centrifugés pendant 20 minutes à 11000 g. Après lavage des culots au tampon phosphate, les surnageants ont été regroupés, le volume des solutions ajusté à 50 mL et la teneur en folates a été déterminée à l'aide d'un test radio-immunologique (kit Simultrac B12/Folates SNB, MP Biomedicals, Eschwege, Allemagne) et d'un compteur gamma (Kontron, Augsburg, Allemagne). Ces analyses ont été réalisées en triplicat par l'UNH de Clermont-Ferrand.

II.2.4.3.2 Vitamine B12

Afin de déterminer la teneur en vitamine B12 dans les matrices, les échantillons de produits congelés ont préalablement été réduits en poudre sous azote liquide. Après homogénéisation dans un tampon acétate (0,1 M, pH 4,6) et hydrolyse par une solution de papaïne à 100 mg/mL (Papain from papaya latex, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), les échantillons ont été incubés avec une solution de cyanide 1 % (Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, United States of America) à 60 °C pendant 1 heure en vue de leur cyanuration (Ortigue-Marty et al., 2006). La teneur en vitamine B12 a ensuite été quantifiée en utilisant un kit de dosage radio-immunologique (Simultrac B12/Folates SNB kit, MP Biomedicals, Eschwege, Germany) et un compteur gamma (kontron, Augsburg, Germany). Ces analyses ont été réalisées en triplicat par l'UNH de Clermont-Ferrand.

II.2.4.3.3 Vitamine D

Après une double extraction à l'hexane, la teneur en vitamine D des matrices a été déterminée par analyse HPLC sur une colonne C18 Zorbax (250x4,6mm, 5µm), connectée à un détecteur à barrettes de diode, par élution avec un mélange acétonitrile:méthanol:eau (60:38:2) pour phase mobile à un débit de 1,5 mL/min. La vitamine D et l'apo-8'-caroténal (utilisé comme standard interne) ont été quantifiés dans les échantillons par le biais de gammes d'étalonnage externe, par comparaison de leurs absorbances à 265 et 450 nm respectivement. Ces analyses ont été réalisées en triplicat par l'UMR C2VN de Marseille.

II.2.4.3.4 Lutéine

La lutéine a d'abord été extraite des digestas selon le protocole de Gleize et al. (2013). Il consiste premièrement en une double extraction à l'hexane, suivie d'une évaporation des échantillons sous flux d'azote avant de les dissoudre de nouveau dans un mélange méthanol:dichlorométhane (65:35, v/v). La lutéine a ensuite été quantifiée par HPLC selon Gleize et al. (2012). Ces analyses ont été réalisées en triplicat par l'UMR SQPOV d'Avignon.

II.3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

II.3.1 FORMULATION DES MATRICES

La formulation des matrices a été déterminée de manière à respecter deux exigences : assurer une satiété suffisante pour les 8 heures d'étude et avoir une densité calorique suffisante pour

permettre l'ingestion d'une portion en un temps limité. Le respect d'un équilibre entre les trois macronutriments était souhaitable mais non indispensable.

Étant donné les conditions particulières de l'étude clinique, à savoir une prise unique au petit-déjeuner suivie de 8 heures de jeûne, il n'existait pas de recommandations nutritionnelles auxquelles nous référer concernant l'apport énergétique nécessaire. Toutefois, nous disposions d'une « référence » au travers d'une étude réalisée dans des conditions similaires, au cours de laquelle un repas apportant 3710 kJ (888 kcal) avec 22 g de protéines, 99 g de glucides et 45 g de lipides était fourni aux volontaires (Reboul et al., 2007). Cependant, le repas était dans ce cas composé de plusieurs aliments (blanc d'œuf, semoule, pain et yaourt), permettant d'augmenter la quantité de calories ingérées sans être écœurant pour les volontaires. En accord avec les nutritionnistes de l'étude MicroNut, et pour tenir compte du fait qu'il s'agissait de fournir aux volontaires un aliment unique et non un repas varié, un apport de 3000 kJ (718 kcal) a été jugé suffisant pour assurer une satiété durant 8 heures. Tenant compte d'une part de ces différentes contraintes, et d'autre part des résultats des essais préliminaires visant à obtenir quatre structures différentes à partir d'une même composition globale sur extrait sec, la formulation qui a été retenue est celle présentée dans la [Table 7](#).

Table 7 : Composition des matrices

Ingrédients				
Farine de blé (g)				10
Farine de pois (g)				10
Sucre blanc (g)				54
Jaune d'œuf en poudre (g)				31
Blanc d'œuf en poudre (g)				10
Huile de tournesol (g)				20
Eau (g)	Biscuit	Génoise	Flan	Crème
	17,0	118,7	169,5	376,3
Énergie et composition théorique en macronutriments				
Énergie (kJ / kcal)				3000 / 718
Protéines (g)				21,6
Lipides (g)				39,2
Glucides (g)				68,0
Portion à consommer par les volontaires				
Poids avant cuisson (g)	Biscuit	Génoise	Flan	Crème
	152,57	254,29	305,15	511,97
<i>soit</i> Extrait sec (g)				130,68

II.3.2 DIAGRAMMES DE FABRICATION ET DESCRIPTION DES MATRICES

À partir de la formulation unique décrite ci-dessus, quatre diagrammes de fabrication (Figure 25) ont été développés de manière à obtenir un Biscuit, une Gênoise, un Flan et une Crème (Figure 26). La description sensorielle des matrices est résumée dans la Table 8.

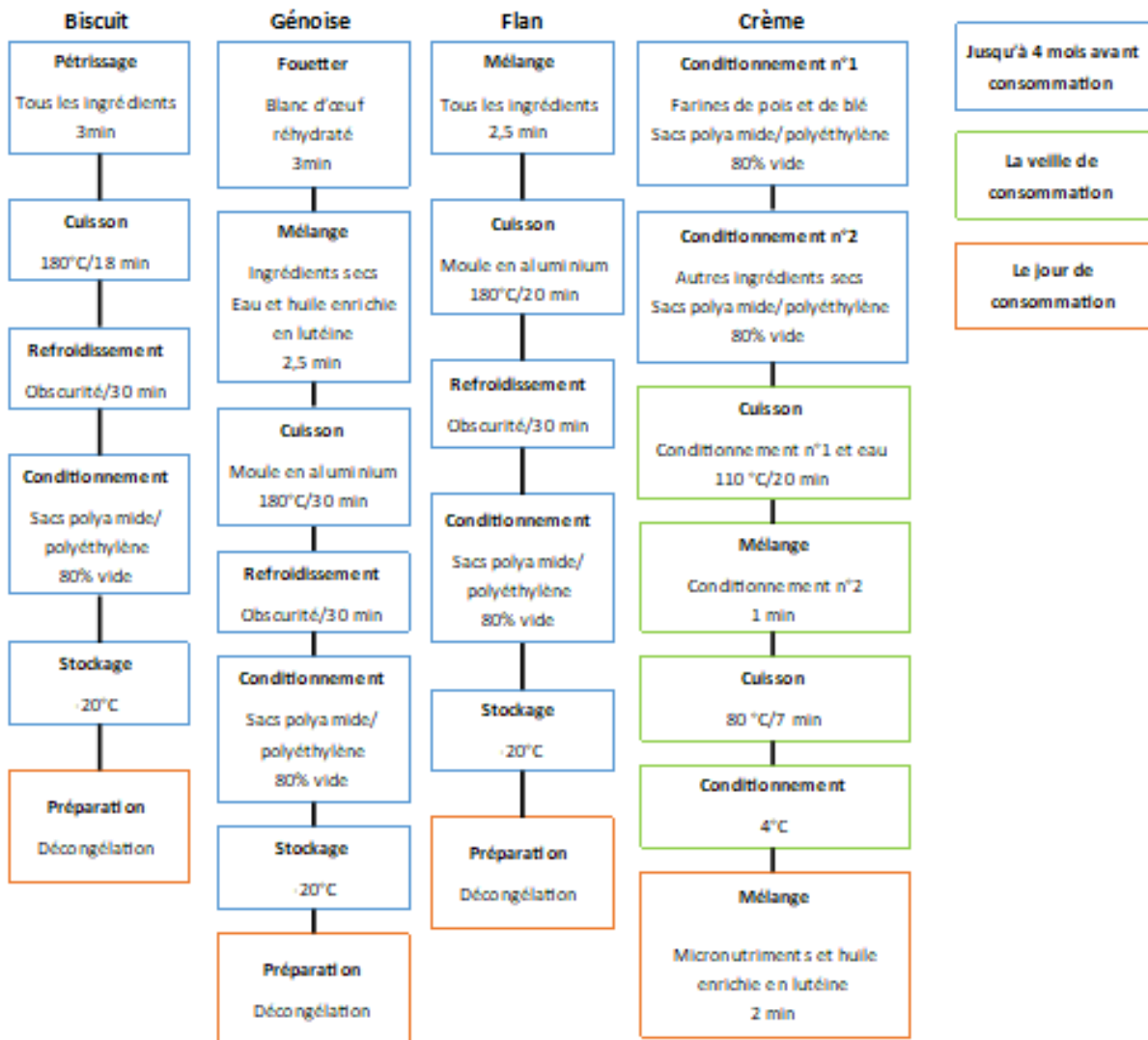


Figure 25 : Diagramme de fabrication des matrices

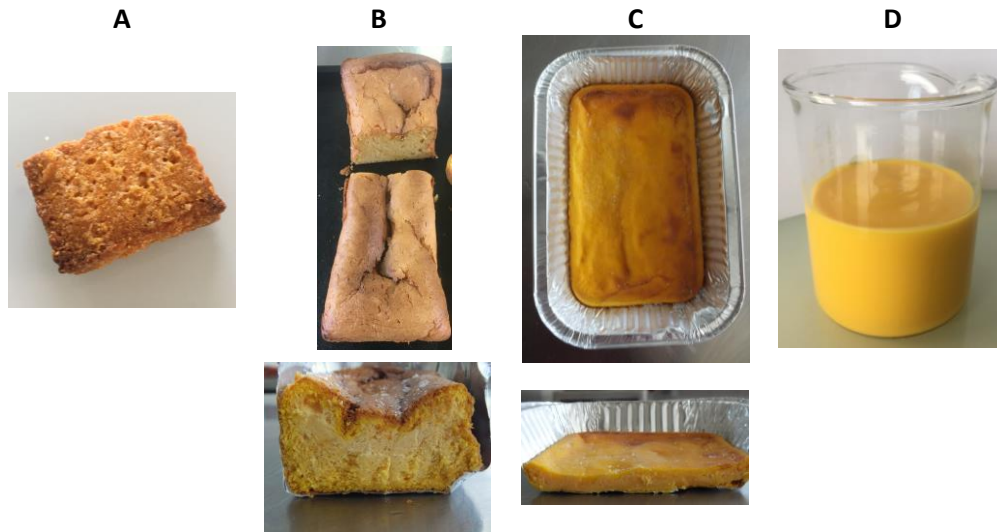


Figure 26 : Photos des matrices finales. (A) Biscuit, (B) Génoise, (C) Flan, (D) Crème.

Table 8 : Description sensorielle des quatre matrices

Descripteur	Biscuit	Génoise	Flan	Crème
Aspect	Carré et fin, jaune bronze à brun	Volumineux, brun clair, aspect uniforme	Rectangulaire et fin, jaune doré	Liquide jaunâtre
Odeur	Produit sucré, pâtisserie	Produit sucré, pâtisserie, gâteau cuit	Produit sucré, pâtisserie	Produit sucré, frais
Consistance	Sec, granuleux et croquant	Moelleux, légèrement sec	Humide, élastique	Liquide, voluptueux
Flaveur	Sucré, friable, agréable	Sucré, doux	Sucré, rond, fraîcheur	Sucré, délicat, suave

Les 3 matrices solides étaient conditionnées en sachets individuels, un sachet correspondant à la quantité à consommer entièrement par un volontaire. Les micronutriments étaient déjà inclus dans les matrices. Pour la matrice n°4 (Crème), un kit de préparation sèche était préparé ; il se composait de deux sachets de poudres, contenant pour le premier les farines de blé et de pois, et pour le second le sucre et les poudres de jaune et blanc d'œuf, et d'un pot thermoscellé contenant l'huile enrichie en lutéine. La Crème était à reconstituer la veille de l'utilisation, un kit correspondant à la portion à consommer par un volontaire.

II.3.3 CARACTÉRISATION DE LA MICROSTRUCTURE DES MATRICES

La caractérisation de la microstructure des matrices est présentée plus en détail en sections IV.2.3.3 et IV.2.4.1. Les différences entre les quatre matrices ont été mises en évidence par

microscopie confocale et analyse d'image. Les conclusions majeures de cette analyse sont les suivantes :

- Trois matrices (le Biscuit, la Gênoise et le Flan) présentent un réseau protéique continu, contenant possiblement l'amidon, alors que des particules d'environ 50 µm de diamètre sont visibles dans le cas de la Crème, suggérant la présence d'agrégats protéiques.
- La Crème et le Biscuit présentent de larges flaques de lipides alors que ceux-ci semblent plus diffus dans le cas du Flan et de la Gênoise.
- La distribution de taille des gouttelettes lipidiques est variable entre les quatre matrices. La Crème présente la taille médiane la plus faible (34,47 µm²), suivie du Flan, de la Gênoise et du Biscuit (18 930 µm²). Le coefficient d'étendue de distribution suit la même tendance, indiquant que la Crème présente des gouttelettes lipidiques de taille relativement similaire, alors que le Biscuit présente à la fois de très grosses et très petites gouttelettes lipidiques.

II.3.4 COMPOSITION BIOCHIMIQUE DES MATRICES

La composition biochimique des matrices est détaillée dans la [Table 9](#). Les teneurs sont indiquées en pourcentage de la matière sèche. Les matrices étaient donc composées de 16,3 % de protéines sur extrait sec, 28,9 % de lipides, 53,4 % de glucides et 1,3 % de cendres.

Table 9 : Composition biochimique des matrices (en g/100 g d'extrait sec).

	Protéines		Lipides		Cendres		Glucides
	Moyenne	± EC	Moyenne	± EC	Moyenne	± EC	<i>Par différence</i>
Crème	16,4	0,1	29,9	0,7	1,5	0,1	52,1
Flan	17,0	0,2	30,9	0,5	1,3	0,0	50,9
Gênoise	15,8	0,2	27,4	1,1	1,2	0,1	55,7
Biscuit	16,1	0,2	27,4	0,4	1,3	0,0	55,1
Moyenne	16,3	-	28,9	-	1,3	-	53,4

La répartition des différentes classes de lipides ([Table 10](#)) montre une prédominance des triglycérides (environ 70 % des lipides totaux). La teneur en triglycérides des matrices est toutefois basse comparée à la teneur habituelle des aliments (85 à 90 %), au profit d'une teneur élevée en cholestérol, esters de cholestérol et phospholipides. Cela provient de la composition des matrices incluant une grande quantité de jaune d'œuf en poudre, dont les lipides sont à 29 % sous forme de phospholipides et 5 % sous forme de cholestérol (Guérin-Dubiard, Anton, Gautron, Nys, & Nau, 2010).

Table 10 : Répartition des différentes classes de lipides dans les matrices (en % de la densité totale)

	Biscuit	Génoise	Flan	Crème
Esters de cholestérol	10,91	12,15	13,34	13,06
Triglycérides	71,03	69,12	68,42	69,57
Acides gras libres	0,36	1,10	0,47	0,67
Cholestérol + Diglycérides	8,87	8,66	8,82	10,75
Phospholipides	8,84	8,97	8,95	5,95
Total	100	100	100	100

II.3.5 ENRICHISSEMENT EN MICRONUTRIMENTS

II.3.5.1 CHOIX DES NIVEAUX D'ENRICHISSEMENT DANS LES PRODUITS FINIS

Les niveaux d'enrichissement simultané des matrices avec les quatre micronutriments ont été définis en tenant compte des données de la littérature quant aux doses nécessaires pour observer, en phase postprandiale, une augmentation significative du taux des micronutriments ou de leurs métabolites dans le sang, par rapport au taux basal à jeun. Par ailleurs, des doses maximales ont été définies de manière à garantir l'autorisation par le CPP de conduire l'étude clinique. Il était toutefois difficile de fixer ces limites maximales avec certitude, peu d'études ayant été réalisées selon un schéma identique à celui de l'étude clinique MicroNut, à savoir la prise d'une dose unique pour un suivi dans le sang durant les 8 heures postprandiales, avec quatre tests sur une période relativement courte (3 mois) pour un même volontaire.

Une étude en dose unique sur des laits enrichis en folates à hauteur de 130 µg/portion consommée avait montré une augmentation notable de la teneur plasmatique 6,5 heures après l'ingestion, la teneur basale étant multipliée par 1,8 (Achón, Arrate, Alonso-Aperte, & Varela-Moreiras, 2011). Aucune étude en dose unique n'a été trouvée en revanche pour la vitamine B12. Ces deux micronutriments hydrosolubles ne présentant pas de toxicité à forte dose en prise unique (Allen, 2012; Patel & Sobczyńska-Malefora, 2017), du fait de l'efficacité des voies d'élimination, des doses d'enrichissement élevées ont été choisies pour les vitamines B9 (1000 µg) et B12 (12 µg), afin de s'assurer d'avoir des résultats probants au cours de l'étude clinique.

Une revue portant sur les études d'enrichissement en vitamine D a montré qu'une dose de 7,5 mg (300000 UI) était efficace pour augmenter la teneur basale de plus de 100 % (de 12,6 à 29,9 ng/mL de 25(OH)D), même chez les sujets carencés (Kearns, Alvarez, & Tangpricha, 2014). Cependant, il s'agissait d'une étude en prise unique non répétée, or cette dose ingérée à quatre reprises sur une période courte aurait pu être jugée à risque de toxicité pour les volontaires. C'est pourquoi il

a été décidé d'enrichir les matrices à hauteur de 1250 µg de vitamine D (soit 100000 UI) par portion.

En ce qui concerne la lutéine, plusieurs études réalisées avec des doses autour de 20 mg ont permis d'observer des augmentations significatives de la teneur basale de 0,055 µmol/L, passant de 0,183 à 0,238 µmol/L (Evans et al., 2013; Kostic et al., 1995). À notre connaissance, aucune étude ne mentionnant un risque de toxicité liée à une ingestion de lutéine à cette dose, nous avons retenu pour notre étude un enrichissement des matrices à hauteur de 20 mg de lutéine par portion.

II.3.5.2 CALCUL DU NIVEAU DE SUPPLÉMENTATION TENANT COMPTE DES PERTES EN COURS DE FABRICATION DES MATRICES

Afin que les quantités de micronutriments réellement ingérées par les volontaires soient identiques pour toutes les matrices, la stabilité des micronutriments au cours du procédé de fabrication a dû être évaluée pour pouvoir compenser les éventuelles dégradations. Les pertes dues aux procédés ont été mesurées pour les 3 matrices solides uniquement, les risques de dégradation étant jugés négligeables dans le cas de la Crème pour laquelle l'enrichissement était réalisé juste avant consommation ([Figure 25](#)). Les résultats sont présentés en [Figure 27](#).

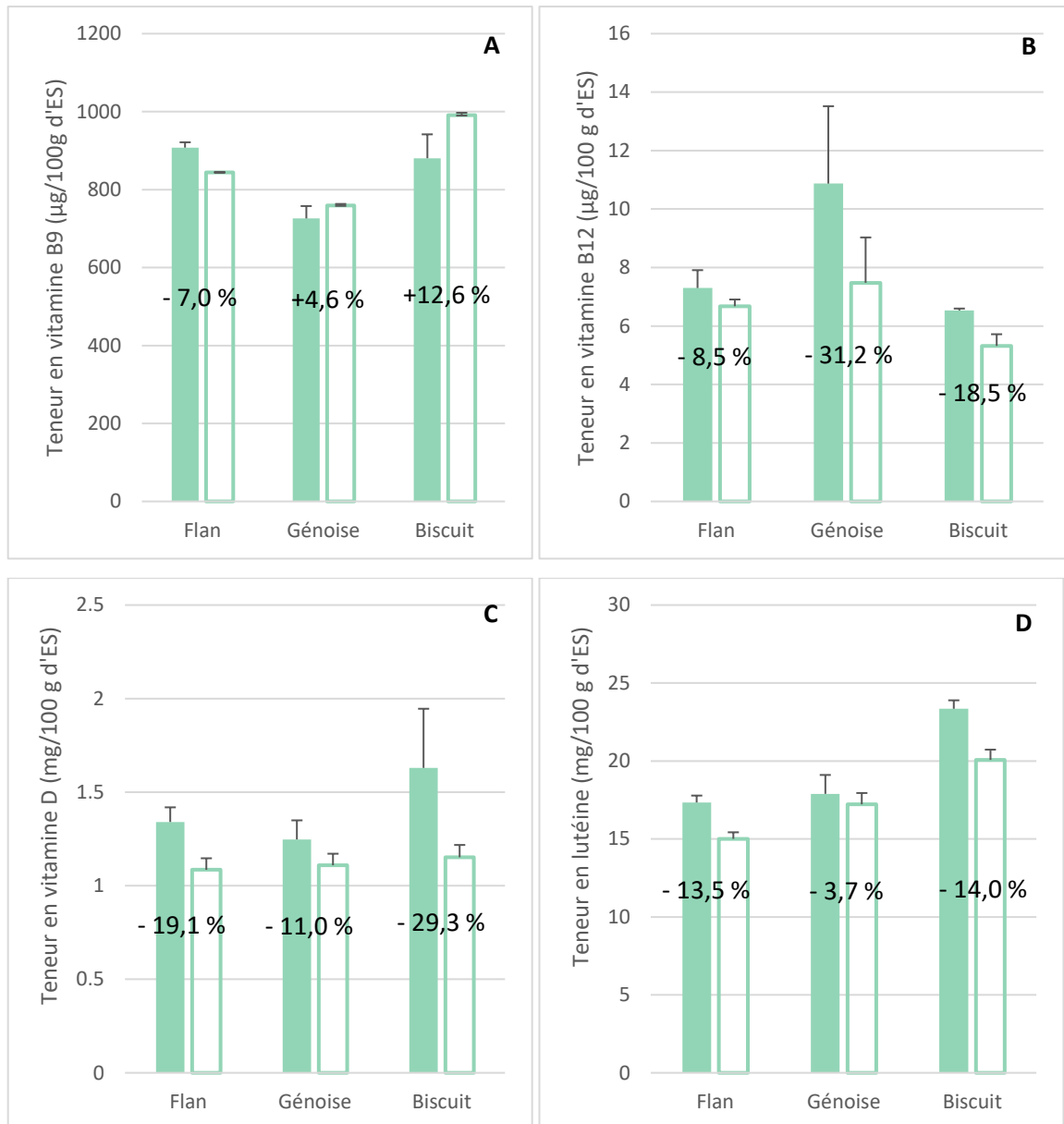


Figure 27 : Pertes en micronutriments lors du procédé de fabrication des matrices (Flan, Génoise et Biscuit), exprimée en pourcentage de la teneur initiale. (A) Perte en vitamine B9. (B) Perte en vitamine B12. (C) Perte en vitamine D. (D) Perte en lutéine. ■ Teneur avant cuisson □ Teneur après cuisson.

Les pertes calculées correspondent aux dégradations des micronutriments durant la totalité de leur cycle de vie, incluant la cuisson, la congélation et le stockage à -20 °C durant 4 mois. Les pertes sont variables selon le micronutriment et la matrice considérés en raison vraisemblablement de leurs différences de répartition dans les matrices en fonction de leur caractère lipophile ou hydrophile, de la durée de cuisson des aliments et des caractéristiques propres aux matrices (teneur en eau, épaisseur, cuisson en moule aluminium, etc.).

Il apparaît notamment que la vitamine B9 ne subit pas de dégradation notable (Figure 27A) dans les trois matrices. Cela est cohérent avec les données de la littérature. En effet, les pertes en

vitamine B9 lors de la cuisson des aliments sont majoritairement occasionnées lors du blanchiment des légumes par le phénomène de transfert des vitamines dans les eaux de cuisson et de trempage (jusqu'à 95 % de pertes pour les épinards hachés bouillis) (Delchier, Herbig, Rychlik, & Renard, 2016). Ainsi, pour les aliments ne subissant pas de cuisson à l'eau, des taux de rétention des folates de 98 % pour les œufs (Bassett & Sammán, 2010), 87 % pour les petits pois (Stea, Johansson, Jägerstad, & Frølich, 2007) et 97 % pour les brocolis (Petersen, 1993) ont été observés.

Des pertes plus élevées ont été constatées pour la vitamine B12, allant de 9% pour le Flan à 31 % pour la Génoise. Des pertes en vitamine de l'ordre de 30 à 40 % ont été observées lors de la cuisson au micro-ondes de viandes de bœuf, de porc ou de lait (Watanabe et al., 1998). Dans une étude ultérieure portant sur la cuisson de la viande de hareng, des taux de rétention variables ont été observés selon le procédé utilisé: 99,5 % lors d'une cuisson sous vide, 98,7% à la vapeur, et seulement 55,7 % lorsque les harengs étaient grillés (Nishioka, Kanosue, Yabuta, & Watanabe, 2011).

Dans le cas de la vitamine D, les tendances sont similaires à celles de la vitamine B12 avec des pertes allant de 11 % pour la Génoise à 29 % pour le Biscuit. Certaines études montrent un effet modéré de la cuisson sur les teneurs en vitamine D des aliments. Une perte de 1 à 6 % a ainsi été observée lors de la cuisson d'œufs (Mattila, Ronkainen, Lehikoinen, & Piironen, 1999). Dans la même étude, la cuisson de différents poissons et de champignons a entraîné une perte en vitamine D inférieure à 10 %. En revanche, un effet plus marqué a été observé dans d'autres études. Des pertes en vitamine d'environ 20 % ont été observées lors de la cuisson de viande de porc (Clausen, Jakobsen, Leth, & Ovesen, 2003), de bœuf et d'agneau (Purchas, Zou, Pearce, & Jackson, 2007). La cuisson d'œufs au four a entraîné des pertes de 55 à 61 % (Jakobsen & Knuthsen, 2014).

En ce qui concerne la lutéine, des pertes plus faibles, de l'ordre de 4 à 14 %, ont été observées lors de la cuisson des matrices. Ces résultats sont en cohérence avec ceux de la littérature. La rétention de la lutéine dans les aliments est habituellement haute, proche de 100 % (Granado, Olmedilla, Blanco, & Rojas-Hidalgo, 1992; Hart & Scott, 1995), hormis lors de cuissons par friture où les pertes seraient expliquées par un transfert dans l'huile de cuisson (Kidmose, Yang, Thilsted, Christensen, & Brandt, 2006; Miglio, Chiavaro, Visconti, Fogliano, & Pellegrini, 2008). Lors de cuissons à l'eau

de différents légumes, des pertes en lutéine de 10 à 15 % ont cependant été observées (Bureau et al., 2015).

Au sein d'un même aliment, les pertes sont variables selon le micronutriment considéré. Le Flan présente des pertes assez faibles en micronutriments hydrophiles, et plus élevés en ce qui concerne la vitamine D et la lutéine. L'hypothèse d'un transfert de ces micronutriments est à exclure puisque cette matrice est cuite dans un moule en aluminium. Cependant ces pertes restent cohérentes avec celles observées dans la littérature.

Dans le cas de la Génoise, les pertes sont minimales pour les vitamines B9 et D et la lutéine. Les pertes en vitamine B12 sont en revanche très conséquentes (31,2 %). À l'instar du Flan, un transfert de la vitamine B12 est à écarter puisque cette matrice est également cuite en moule. Cependant il est à noter que le faible enrichissement en vitamine B12 et l'écart-type important sur ce dosage particulièrement ont peut-être tendance à surestimer les pertes observées. La présence de bulles d'air au sein de la Génoise a pu cependant accroître la dégradation de la vitamine B12, l'air étant supposé être un meilleur conducteur de chaleur que la pâte non cuite des aliments.

Dans le cas du Biscuit, c'est la vitamine D qui présente une perte importante (29,3 %). Cette fois-ci, un transfert de la vitamine D dans l'huile a pu se produire, puisqu'un léger rejet d'huile des Biscuits était observé lors de leur cuisson, avant que cette huile ne soit réabsorbée par le Biscuit lors de son refroidissement. Cette perte n'est toutefois pas observée avec la lutéine.

Finalement, les pertes ainsi mesurées pour chaque micronutriment et chaque matrice, ont été prises en compte de manière à les compenser par des enrichissements initiaux plus importants (Table 11). L'objectif était en effet que toutes les matrices contiennent la même teneur pour un micronutriment donné, lors de sa consommation par les volontaires. Dans le cas des vitamines B9 et B12, devant la forte variabilité des résultats obtenus lors des dosages préliminaires et les faibles pertes constatées au cours du procédé de fabrication, il a été décidé de conserver le même enrichissement pour les quatre matrices (respectivement 1000 et 12 µg).

Table 11 : Valeurs cible et enrichissements réalisés au cours de la fabrication des matrices

Matrice	Micronutriment	Valeur cible (par portion consommée par un volontaire)	Dose théorique d'enrichissement nécessaire pour atteindre la valeur cible	Dose ajoutée	Dose mesurée dans les matrices finales
Biscuit	Vit D (µg)	1250	1930	1930	1524 ± 110
	Lutéine (mg)	20	23,29	23,29	21,58 ± 0,7
	Vit B9 (µg)	1000	868	1000	967 ± 39
	Vit B12 (µg)	12	14,2	12	11,5 ± 0,3
Génoise	Vit D (µg)	1250	1370	1370	1381 ± 62
	Lutéine (mg)	20	20	20	20,79 ± 0,9
	Vit B9 (µg)	1000	952	1000	889 ± 60
	Vit B12 (µg)	12	14,8	12	14,4 ± 1,0
Flan	Vit D (µg)	1250	1540	1540	1506 ± 97
	Lutéine (mg)	20	23,11	23,11	24,41 ± 1,5
	Vit B9 (µg)	1000	1069	1000	1096 ± 35
	Vit B12 (µg)	12	12,9	12	16,6 ± 0,1
Crème	Vit D (µg)	1250	1250	1250	1968 ± 407
	Lutéine (mg)	20	20	20	22,80 ± 2,3
	Vit B9 (µg)	1000	1000	1000	1096 ± 100
	Vit B12 (µg)	12	12	12	19,4 ± 0,7

II.4 CONCLUSION

RESULTATS MAJEURS

- Quatre matrices de même composition sur extrait sec mais différant par leur texture ont été formulées.
- Les matrices respectent les critères impératifs pour une utilisation dans le cadre de l'étude clinique :
 - Enrichissements maîtrisés en vitamines B9, B12, D et lutéine ;
 - Sécurité alimentaire ;
 - Densité calorique et profil nutritionnel adéquat.
- La modulation des procédés de fabrication a permis d'obtenir quatre microstructures très différentes.

L'utilisation de différents procédés de fabrication et la modulation des teneurs en eau ont permis la formulation de quatre matrices différant par leur macrostructure : un Biscuit, une Gênoise, un Flan et une Crème. Ces matrices ont été formulées de façon à assurer une satiété suffisante pour les 8 heures d'étude tout en conservant une taille de portion consommable en un temps limité. Pour cela, leur densité calorique a été augmentée par l'ajout d'ingrédients denses (jaune d'œuf, sucre et huile). Afin d'assurer l'hygiène et la sécurité sanitaire des matrices tout au long de leur durée de vie, un Plan de Maîtrise Sanitaire a été rédigé, incluant des analyses microbiologiques libératoires.

Les niveaux d'enrichissement des matrices ont été décidés sur la base de la bibliographie existante, afin de permettre une augmentation notable de la teneur plasmatique en micronutriment sur un temps court. Les pertes en micronutriments dues au procédé de fabrication ont été évaluées de façon à pouvoir être compensées en amont par un enrichissement plus important.

La caractérisation biochimique des matrices a permis de confirmer leur composition identique en macronutriments alors que leur caractérisation par microscopie confocale a démontré des différences majeures de microstructure, en termes de répartition lipides/protéines et de taille des gouttelettes lipidiques notamment.

Chapitre III. Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments

III.1	Introduction.....	114
III.2	Déroulement de l'étude clinique.....	116
III.2.1	Participants.....	116
III.2.2	Protocole expérimental.....	116
III.3	Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments lipophiles	118
III.3.1	Abstract	119
III.3.2	Introduction.....	120
III.3.3	Material and methods	121
III.3.4	Results	125
III.3.5	Discussion	131
III.3.6	Supplemental data	134
III.4	Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité de la vitamine B9.....	137
III.4.1	Abstract	138
III.4.2	Introduction.....	139
III.4.3	Methods	140
III.4.4	Results	143
III.4.5	Discussion	150
III.4.6	Conclusion	153
III.5	Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité de la vitamine B12	155
III.5.1	Matériels et méthodes	155
III.5.2	Résultats et discussion	156
III.5.3	Conclusion	160
III.6	Conclusion	161

III.1 INTRODUCTION

Le chapitre précédent a présenté comment, en modifiant les conditions de transformation, quatre aliments enrichis en micronutriments ont pu être conçus à composition strictement identique (sur extrait sec), mais avec des structures et textures différentes. Or, comme rappelé dans la synthèse bibliographique, de nombreuses études ont mis en évidence que la structure d'un aliment a un impact sur la digestion des macronutriments, par la modulation des cinétiques de libération et d'absorption. En revanche, en ce qui concerne les micronutriments, si la matrice d'apport est également considérée comme l'un des facteurs les plus importants de variabilité de leur biodisponibilité, la plupart des études ne permettent pas à l'heure actuelle de distinguer les effets structure des effets composition de la matrice.

Ainsi, grâce aux quatre aliments modèles développés au cours de ce projet, notre objectif était d'investiguer spécifiquement l'effet structure des aliments sur la biodisponibilité de quatre micronutriments. Ces derniers ont été choisis pour leur importance en termes de santé publique, soit en raison des risques associés à des apports insuffisants (vitamines D, B9 et B12), soit pour les bienfaits associés à leur consommation (lutéine). Par ailleurs, parce que la digestion des composés hydrosolubles et lipidiques fait appel à des mécanismes différents, nous avons choisi de retenir deux micronutriments hydrosolubles (vitamines B9 et B12) et deux lipophiles (vitamine D et lutéine).

Afin tout d'abord de démontrer en conditions physiologiques la réalité de notre hypothèse, à savoir la possibilité de moduler la biodisponibilité d'un micronutriment par le seul pouvoir de la structure de la matrice alimentaire, le deuxième volet du projet a donc consisté en une étude clinique menée sur 12 volontaires sains.

QUESTIONS DE RECHERCHE

- La structure des aliments impacte-t-elle la biodisponibilité des micronutriments ?
- Cet impact dépend-t-il du caractère lipophile ou hydrophile du micronutriment considéré ?

L'étude clinique s'est déroulée au Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH) de Clermont-Ferrand entre décembre 2017 et avril 2018 ; l'Investigateur Principal de l'étude est le Pr Ruddy Richard et l'Attachée de Recherche Clinique Nathalie Meunier. Le recrutement des volontaires a été effectué par l'équipe de Marie-Agnès Peyron et Cindy Batisse au sein de l'UMR Unité de Nutrition Humaine (UNH) et de la faculté dentaire de Clermont-Ferrand. La réalisation pratique de l'étude clinique sur la biodisponibilité plasmatique en vitamine a été pilotée par Isabelle Savary-Auzeloux et Caroline Buffière de l'UMR UNH, qui ont également réalisé les dosages des vitamines B9 et B12. Les dosages de vitamine D et de lutéine ont été réalisés respectivement par l'équipe d'Emmanuelle Reboul de l'UMR C2VN (Centre de recherche en CardioVasculaire et Nutrition) de Marseille et par celle de Béatrice Gleize de l'UMR SQPOV (Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale) d'Avignon. L'analyse des données issues de l'étude a été réalisée avec l'aide de Bruno Pereira, biostatisticien à l'Université Clermont Auvergne et au CHU de Clermont Ferrand.

Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord le déroulement de l'étude clinique, puis les résultats de cette étude, présentés sous la forme de deux articles scientifiques. Le premier concerne l'étude de la biodisponibilité de la lutéine et de la vitamine D au sein des quatre matrices développées (Biscuit, Génoise, Flan et Crème). Le deuxième présente l'impact de la structure des mêmes quatre matrices sur la biodisponibilité de la vitamine B9. Enfin, une troisième partie traitant de la biodisponibilité de la vitamine B12, qui ne fait pas l'objet d'une publication, est présentée en fin de chapitre.

III.2 DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE CLINIQUE

Tous les résultats présentés dans ce chapitre ayant été obtenus à partir de la même étude clinique, et afin d'éviter les répétitions, les informations présentant l'organisation et le déroulement de l'étude clinique en elle-même ont été rassemblées dans cette section.

III.2.1 PARTICIPANTS

L'étude a été réalisée en conformité avec la Déclaration d'Helsinki et approuvée par le comité d'éthique (IDRCB 2017-A01996-47). Le protocole a été proposé à 12 hommes jeunes non-fumeurs ($22,6 \pm 0,4$ ans) et en bonne santé ($IMC = 22,1 \pm 0,4$ kg/m²), ayant donné leur consentement éclairé après explication du but de l'étude, de la méthodologie employée et des risques potentiels. Ils présentaient un bilan biologique normal et avait une bonne dentition. Ils n'étaient sous aucun traitement médical et ne consommaient pas de compléments nutritionnels (y compris d'Uvédose® de vitamine D) à l'exclusion des produits alimentaires enrichis. Ils ne présentaient pas de pathologies ou d'antécédents médicaux jugés par l'investigateur comme incompatibles avec l'étude. Ils ne s'étaient pas exposés aux UV (au cours de voyages ou de séances d'UV) dans les 2 semaines précédant l'étude ainsi que durant toute l'étude.

III.2.2 PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

III.2.2.1 CONDITIONS DU REPAS

Les quatre matrices ont été proposées à tous les sujets selon un plan expérimental randomisé (sous forme de double carré latin), contrôlé et croisé. Une période de « wash-out » de trois semaines était respecté entre chaque journée de test. Les volontaires devaient éviter de consommer des produits riches en vitamines B9, B12, D et lutéine durant les 48 h précédant chaque journée d'expérimentation. Le repas de la veille au soir était quant à lui standardisé (jambon blanc, pâtes, pain blanc, yaourt, pomme). Les volontaires arrivaient le matin à jeun depuis la veille au soir. Un cathéter leur était posé dans une veine dorsale de la main pour le prélèvement de sang veineux. Après un premier prélèvement à jeun, les volontaires disposaient de 15 minutes pour consommer l'une des quatre matrices, ainsi que 200 mL d'eau. Ils devaient ensuite boire 100 mL d'eau toutes les deux heures (soit 500 mL d'eau au total sur toute la durée de la cinétique).

III.2.2.2 PRÉLÈVEMENTS SANGUINS ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

Des prélèvements sanguins étaient ensuite réalisés dans les 8 heures suivant l'ingestion de la matrice, selon le plan de prélèvement présenté en [Figure 28](#). Le sang était recueilli dans trois tubes contenant

de l'héparine, en vue des dosages sur les chylomicrons (7 prélèvements sur une journée de cinétique), et un tube contenant de l'EDTA pour les dosages sur plasma (11 prélèvements). Les tubes étaient ensuite centrifugés à 1500 g pendant 10 minutes à 4 °C. Les surnageants étaient ensuite divisés en aliquots et conservés à -80 °C jusqu'à analyse du plasma. Les tubes prélevés en vue des dosages sur chylomicrons étaient centrifugés une seconde fois à 33 000 g pendant 33 minutes à 10 °C puis le surnageant contenant les chylomicrons (Figure 29) était conservé à -80°C jusqu'à analyse (Reboul et al., 2007).

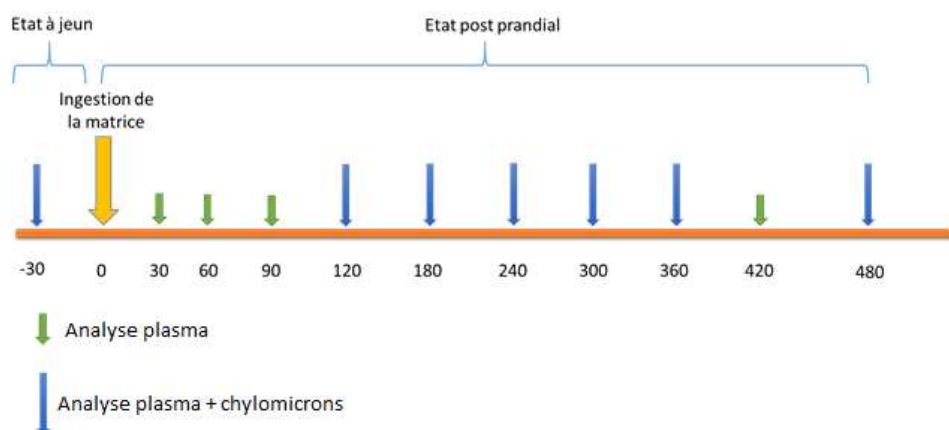


Figure 28 : Répartition des prélèvements sanguins lors d'une journée de cinétique

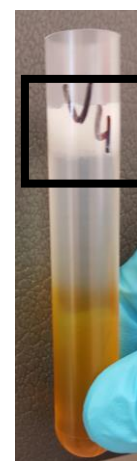


Figure 29 : Séparation des chylomicrons après centrifugation

III.3 IMPACT DE LA STRUCTURE DES ALIMENTS SUR LA BIODISPONIBILITÉ DES MICRONUTRIMENTS LIPOPHILES

Cette partie est basée sur le projet de publication suivant :

Food matrix structure modulates postprandial blood concentrations of triglycerides and dietary vitamin D, and partly that of lutein: a randomized trial with a crossover design in adults

Béatrice Gleize^{1*}, Manon Hiolle^{2*}, Nathalie Meunier³, Bruno Pereira⁴, Ruddy Richard^{3,4}, Isabelle Savary-Auzeloux⁵, Caroline Buffière⁵, Marie-Agnès Peyron⁵, Charlotte Halimi⁶, Catherine Caris-Veyrat¹, Françoise Nau², Emmanuelle Reboul^{6}**

¹ INRAE, Avignon Université, UMR SQPOV, 84914 Avignon, France

² STLO, INRAE, AGROCAMPUS OUEST, 35042, Rennes, France

³ CHU Clermont-Ferrand, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Clermont-Ferrand, France.

⁴ CHU Clermont-Ferrand, DRCI, Clermont-Ferrand, France.

⁵ University Clermont Auvergne, INRAE, Unité de Nutrition Humaine, UMR1019, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France.

⁶ Aix-Marseille Univ, INRAE, INSERM, C2VN, Marseille, France.

* Corresponding author: Emmanuelle.Reboul@univ-amu.fr.

Keywords

Cholecalciferol; lutein; food structure; bioavailability; chylomicrons

Les informations concernant le déroulement de l'étude clinique sont présentées en section III.2.

III.3.1 ABSTRACT

Background: The specific effect of the food matrix structure on fat-soluble micronutrient bioavailability is only partly understood.

Objective: We aimed at evaluating fat-soluble micronutrient release kinetics into the bloodstream in humans after consumption of foods displaying similar composition but different structure.

Design: Two molecules of interest were studied: vitamin D₃ and lutein. To this aim, 12 healthy subjects were enrolled in a randomized, open label, crossover postprandial trial. 4 different model foods were used to deliver the micronutrients: Custard, Pudding, Sponge cake and Biscuit. Vitamin D₃, lutein and triglyceride postprandial chylomicron responses were then assayed.

Results: Custard triglyceride response was significantly higher than Pudding and Biscuit responses (up to +122.7%, $p < 0.0001$). Sponge cake vitamin D₃ response was significantly higher than Biscuit response (+26.6%, $p = 0.047$). No difference between the model foods were observed regarding lutein responses. TG responses peaked at 3h for all conditions, while vitamin D₃ and lutein peaks were delayed of 1h with the Biscuit matrix compared to other model foods.

Conclusions: Our results show that food structure can significantly impact on triglyceride and vitamin D₃ postprandial responses in terms of absorbed amounts and/ or maximum absorption peak time. These results are of particular interest to develop functional foods for population subgroups such as elderly.

III.3.2 INTRODUCTION

The food matrix has long been considered as a key factor modulating the absorption of fat-soluble micronutrients/ phytomicroconstituents (i.e. vitamin A, D, E and K and carotenoids). For instance, the nutritional composition of the food matrix was shown to impact both carotenoid transfer to mixed micelles and carotenoid absorption, as these two parameters can significantly vary from one vegetable matrix to another (Mashurabad *et al.*, 2017; van het Hof *et al.*, 1999). Both vitamin E bioaccessibility (Emmanuelle Reboul *et al.*, 2006) and absorption (Emmanuelle Reboul, 2017) are also influenced by the food sources in which vitamin E is embedded. However, this effect is less clear for vitamin D (Borel, Caillaud, & Cano, 2015). Indeed, a food matrix containing fat (i.e. cheese) did not promote vitamin D bioavailability compared to a supplement in water (Wagner, Sidhom, Whiting, Rousseau, & Vieth, 2008). Similarly, a mushroom matrix did not modulate vitamin D bioavailability compared to a supplement (Keegan *et al.*, 2013). However, fatty acids (Reboul, 2015), phytosterols (Reboul, 2015) and proteins (Cohen *et al.*, 2017) were shown to specifically modulate vitamin D absorption and thus bioavailability.

More specifically, the food matrix structure can also impact micronutrient bioavailability. Although food processing leads to a partial degradation of micronutrients due to thermal and oxidative conditions, processing also leads to a matrix disruption. This disruption can balance the negative effect of micronutrient degradation by increasing micronutrient bioavailability. This effect is particularly important concerning carotenoids. Data obtained in humans highlighted that spinach matrix disruption significantly increased lutein bioavailability (Eriksen *et al.*, 2016). Similarly, tomato matrix disruption by mechanical homogenization and/or heat treatment enhanced lycopene bioavailability (van het Hof, 2000). Finally, when given in similar amount, β -cryptoxanthin absorption efficiency was 1.8-fold higher from orange juice than from fresh oranges (Aschoff *et al.*, 2015). However, these studies are inconsistent with other clinical data. In a first trial, subjects received spinach products including whole leaf spinach with an almost intact food matrix, minced spinach with a partially disrupted matrix and enzymatically liquefied spinach for 3 weeks. Conversely to β -carotene, lutein response was not affected by the disruption of the food matrix (Castenmiller *et al.*, 1999). A second trial showed opposite results, as the consumption of 300 g/d of chopped spinach vs whole leaf spinach during 4 d showed that both matrices led to a similar β -carotene response, while lutein response was significantly improved after chopped spinach consumption (van het Hof *et al.*, 1999).

Overall, the specific effect of the food matrix structure has not been accurately assessed. In particular, there is no clear data on fat-soluble vitamin release kinetics into the bloodstream after consuming foods with similar composition but different structure.

To fill this gap, the aim of the present study was to assess both vitamin D₃ (as a model of fat-soluble vitamin) and lutein (as a model of carotenoid) postprandial responses in healthy subjects after the consumption of 4 model foods presenting similar nutrient composition but different structure, i.e. Custard, Pudding, Sponge cake and Biscuit.

III.3.3 MATERIAL AND METHODS

III.3.3.1 SUBJECT NUMBER AND CHARACTERISTICS

The main objective of the study was to highlight the link between food structure and fat-soluble micronutrient postprandial responses. The primary outcomes were thus lutein and vitamin D₃ postprandial concentrations in chylomicrons. Previous works reported that 10 to 20 subjects would be relevant to perform kinetics studies having a satisfactory statistical power greater than 80% (Ogunbenro & Aarons, 2010b, 2010a). Twelve healthy, non-obese, non-smoking men were thus recruited for the study by the Unité d'Exploration Nutritionnelle (Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Clermont-Ferrand, France). Subjects had no history of chronic disease, hyperlipidemia, or hyperglycemia and they were not taking any medication known to affect vitamin D or lipid metabolism 3 months before the study or during the study period. They had to have at least 28 teeth, stable Angle Class I occlusion, no jaw pain, no current dental treatment and no orthodontic procedure in the 3 years preceding the study. Subjects were also given food instructions for 48-hour meals preceding each kinetics (to avoid foods rich in the studied micronutrients). All subjects consumed each of the 4 model foods in a randomized order during 4 sessions separated by at least 3 weeks of wash-out (random Latin-square design). The study was approved by the regional committee on human experimentation (IDRCB 2017-A01996-47, France). Procedures followed were in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975 as revised in 1983. Objectives and requirements of the study were fully explained to all participants before beginning the study, and written informed consent was obtained from each subject. Subjects baseline characteristics are reported in [Table 12](#). Participant flow chart is presented on [Figure 30](#).

Table 12 : Baseline characteristics of healthy men

Parameter	Value
Age, y	22.6±0.4
Weight, kg	71.2±1.4
BMI, kg/m ²	22.1±0.4
Glucose, mmol/L	4.22±0.12
Hemoglobin, g/dL	15.6±0.3
25-hydroxyvitamin D, nmol/L	22.7±1.1

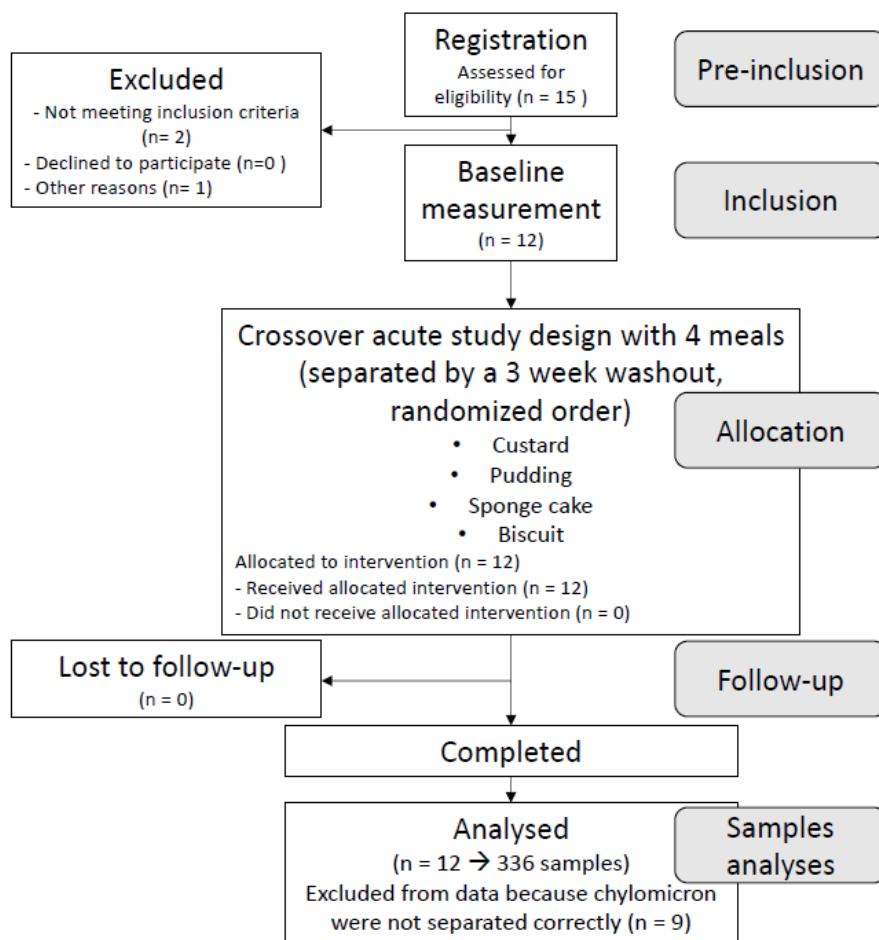


Figure 30 : Participant flow chart

III.3.3.2 MODEL FOOD PREPARATION

The model foods were formulated with wheat flour (Francine T45, Grands Moulins de Paris, Ivry Sur Seine, France), extruded pea flour (Sativa 32/100, Sotexpro, Bermericourt, France), powdered sugar (Saint-Louis Sucre, Paris, France), sunflower oil (Lesieur, Asnières-sur-Seine, France), standard pasteurized egg yolk and granulated pasteurized egg white powders (Liot, Pleumartin, France) and sterilized water. Vitamin D₃ (D₃) was supplied by Nutrilo GmbH (ref 05-052, Cuxhaven, Germany). Lutein was provided from Diet Horizon (ref 2779, Bordeaux, France) as capsules containing a

suspension of about 20 mg lutein in sunflower oil; a homogeneous dispersion of lutein was produced from these capsules and its concentration was determined by spectrophotometry at 445 nm.

Four model foods (one liquid and three solids) enriched with D₃ and lutein were produced according to the flowcharts described in Supplemental data (Figure 35) and the composition was presented in Table 13. Kneading, whisking, mixing steps and heat treatment for Custard were operated with a kitchen robot Thermomix® TM5 (Vorwerk, Wuppertal, Germany). Cooking of Biscuit, Sponge cake and Pudding was operated with a semi-professional convection oven (De Dietrich, Niederbronn-Les-Bains, France). On dry matter, the model foods were all composed of 17% proteins, 52% carbohydrates, and 30% lipids. Custard was prepared as a packed-powder that was rehydrated and heated before use. Pudding, Sponge cake, and Biscuit were stored at -20°C until use and then defrosted at room temperature.

Table 13 : Model food recipes and nutritional composition

		Custard	Pudding	Sponge Cake	Biscuit
Composition (g/portions)	Wheat flour			10.2	
	Pea flour			10.2	
	Egg white powder			54.2	
	Egg yolk powder			30.5	
	Sugar			10.2	
	Sunflower oil			20.3	
	Water	376.3	169.5	118.7	17.0
Nutrient composition (g/ portion)	Proteins	21.49±0.09	22.24±0.20	20.64±0.27	21.06±0.29
	Lipids	39.06±0.94	40.33±0.66	35.75±1.44	35.83±0.53
	Carbohydrates	68.13±0.88	66.47±0.44	72.74±1.66	72.06±0.82
Micronutrient composition (mg/ portion)	Lutein	22.70±2.77	20.30±1.66	17.34±0.98	19.49±1.19
	Vitamin D ₃	1.98±0.40	1.20±0.09	1.06±0.04	1.27±0.14

III.3.3.3 CONFOCAL MICROSCOPY AND IMAGE ANALYSIS OF THE MODEL FOODS

Three hundred µm slices were cut on a cryotome at -20 °C for Biscuit, and on a microtome for Sponge cake and Pudding, and transferred onto slides. Fluorescent probes (Fast Green and Red Nile) were applied to the slides and let to diffuse for 10 min. The two probes were mixed with Custard before incubation for 10 min, and the mixture was applied directly on slides. Slides were covered with a spacer and a cover slide and were imaged using a LSM880 inverted confocal microscope (Carl Zeiss AG,

Oberkochen, Germany). Images were analyzed using Image J software. The results obtained were then analyzed as described previously (Bornhorst, Kostlan, & Singh, 2013) by fitting the cumulative percentage of lipid droplets area to the Rosin-Rammler equation (Vesilind, 1980). This enabled, using linear regression techniques, to extract two parameters to describe the distribution curves of the lipid droplet sizes, namely x_{50} , which is the median particle area (μm^2) and b , a dimensionless constant, which represent the broadness of the distribution.

III.3.3.4 LIPID ANALYSIS

Cholesterol, phospholipids and triglycerides in chylomicrons were analyzed as previously described (Goncalves, Roi, Nowicki, Niot, & Reboul, 2014).

III.3.3.5 MODEL FOOD LUTEIN AND D₃ EXTRACTION AND ANALYSIS

Model foods (~100 mg) were homogenized in 800 μL of saturated NaCl solution with 1-mm-diameter ceramic balls in 2 mL Eppendorf tubes using a FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals, Illkirch, France).

Lutein was extracted following the Bligh and Dyer method (Bligh & Dyer, 1959) and using apo-8'-carotenal as an internal standard. The extract was evaporated to dryness under argon and dissolved in 600 μL of methanol/dichloromethane (65/35, v/v). A final volume of 10 μL was used for HPLC analysis. D₃ was extracted by adding 1 volume of ethanol, which also contained ergocalciferol (D₂) as an internal standard, and vortexing for 30 s. After adding 2 volumes of hexane, the mixture was vortexed for 10 min and centrifuged at 500g for 10 min at 4 °C. The upper phase (containing the different vitamin D forms) was collected and the sample was extracted a second time with hexane following the same procedure. The hexane phases were pooled and completely evaporated under nitrogen gas. The dried residue was dissolved in 200 μL methanol/dichloromethane (65/35, v/v) and a final volume of 100 μL was used for HPLC analysis.

Reverse-phase HPLC was then performed as previously described for lutein (Gleize, Steib, André, & Reboul, 2012) and D₃ (Desmarchelier et al., 2016) quantification.

III.3.3.6 CHYLOMICRON LUTEIN AND D₃ EXTRACTION AND ANALYSIS

Lutein and D₃ from chylomicron samples were extracted by the method previously described (Desmarchelier et al., 2016; Gleize et al., 2012). The whole extracts were evaporated to dryness under argon and dissolved in 100 μL of methanol/dichloromethane (65/35, v/v). A final volume of 90 μL was used for reverse-phase HPLC analysis of lutein (Gleize et al., 2012) and D₃ (Desmarchelier et al., 2016) as previously described.

Lutein was detected at 445 nm and was identified by retention time and spectral analysis (300-500 nm) compared with pure lutein standard. D₃ was detected at 265 nm and was identified by retention time and spectral analysis (200-400 nm) compared with pure vitamin D standard. The two compounds were quantified by comparing peak area with standard calibration curves and were corrected by extraction efficiency based on recovery of internal standard.

III.3.3.7 STATISTICAL ANALYSIS

The trapezoidal approximation method was used to calculate AUC of the postprandial plasma chylomicron triglyceride, lutein, and D₃ concentration over 8 h, henceforth referred to as lutein or D₃ response. Lutein and D₃ responses were corrected for ingested lutein and D₃. Uncorrected curves are presented in Supplemental data ([Figure 36](#) and [Figure 37](#)). All tests were two-sided, with a type I error set at 0.05. Continuous data were expressed as mean \pm standard error of mean. The assumption of normality was assessed by using the Shapiro-Wilk test. Random-effects models for repeated data were performed to compare four ingested matrix (i) considering the following fixed effects: matrix and for longitudinal analyses, time-point evaluation and *time x matrix* interaction, and (ii) taking into account between and within participant variability (subject as random-effect). Furthermore, due to cross-over randomized design, period, matrix order and carry-over were also considered as covariates. When appropriate, a Sidak's type I error correction was applied to perform multiple comparisons. The normality of residuals from these models was studied using the Shapiro-Wilk test. When appropriate, a logarithmic transformation was proposed to achieve the normality of dependent outcome. Statistical dependence between two variables was assessed by Pearson's correlation coefficient. Statistical analyses were performed using Stata software (version13, StataCorp, College Station, US) and R software. For all tests, a p-value <0.05 was considered significant.

III.3.4 RESULTS

III.3.4.1 MODEL FOOD CHARACTERISTICS

The differences in the production process and the water content have resulted in four strongly different model foods in terms of macroscopic aspect ([Figure 31A-D](#)). The Biscuit was a very dry and brittle product. The Sponge cake was a soft and dry gel with a honeycomb structure, while the Pudding was a humid and compact gel. Finally, the Custard consisted in a thick liquid.

Confocal microscopy images of the four model foods are presented in [Figure 31E-H](#). A continuous protein network was observed in Biscuit, Sponge cake and Pudding, as suggested by the uniform green background. In regard to the Custard, protein aggregation was suspected because of the small green particles of about 50 μm . With regard to the lipid phase, fat droplets had different shapes depending

on the model foods: fat globules could be seen in the Custard vs fat flakes in the Biscuit. Moreover, lipid droplets appeared bigger in Custard and Biscuit compared to Sponge cake and Pudding, in which lipids were more diffuse. The distribution curves of lipid droplets area confirmed the bigger size of lipid droplets in the Biscuit (Figure 31I); this matrix presented the higher median droplet size, around 18,000 μm^2 . However, the median droplet size measured for Custard was surprisingly the lowest amongst the four model foods, around 30 μm^2 . Despite large lipid droplets were observed on the confocal images, the Custard was actually mainly composed of very small fat droplets, which cannot be observed on the image presented in Figure 31E. Sponge cake and Pudding presented intermediate median area of lipid droplets, around 3,000 and 600 μm^2 , respectively.

Lastly, for the distribution spread measured by the *b* constant, Custard was found to have the narrowest size distribution (as indicated by the highest *b* value, 1.08), followed by Pudding (0.46), Sponge cake (0.38) and then Biscuit (0.25). As a conclusion, the four designed model foods strongly differed in both microstructure and macrostructure.

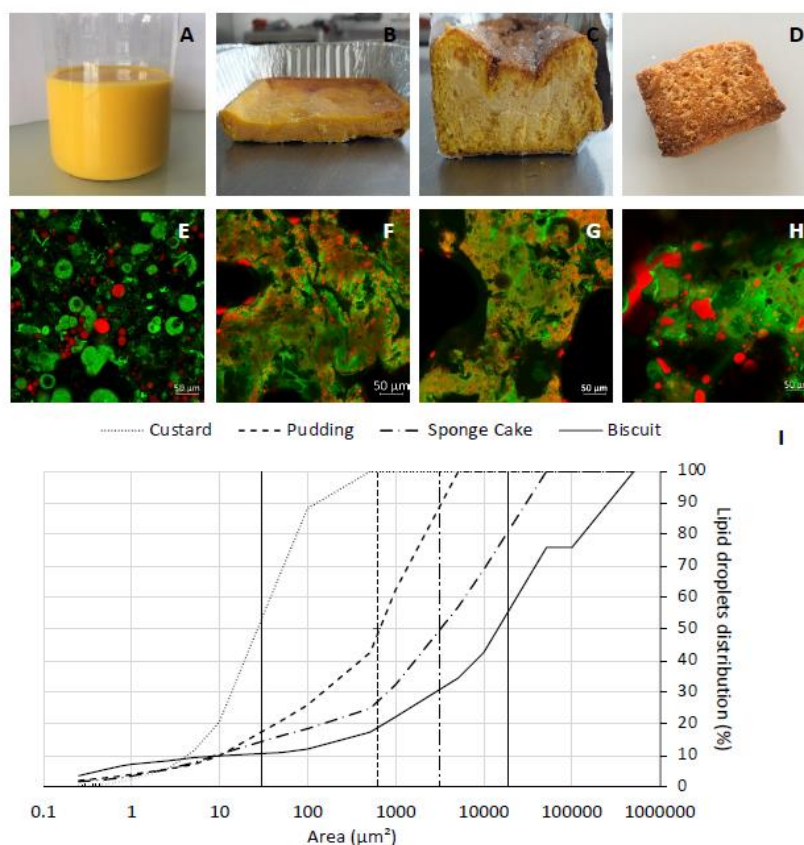


Figure 31 : Model food characteristics

(A-D) Macroscopic image of model foods. (A) Custard (B) Pudding (C) Sponge cake (D) Biscuit

(E-H) Confocal images of model foods at magnification x20. Lipids appear in red and proteins in green. (E) Custard (F) Pudding (G) Sponge cake (H) Biscuit

(I) Lipid size distribution of model foods. Vertical lines correspond to $\times 50$, the median particle area of each distribution (μm^2)

III.3.4.2 CHYLOMICRON TG RESPONSE TO THE 4 DIFFERENT MODEL FOODS

The mean TG response after consumption of the different model foods is shown in [Figure 32A](#). All subjects had extremely low chylomicron TG concentrations (0.109 ± 0.064 mmol/L) at T0, which confirmed that they were at fast at the beginning of the experiment.

The maximal chylomicron TG concentrations after Custard, Pudding, Sponge cake and Biscuit consumption were obtained 3 h after meal intake ([Figure 32B](#)). The chylomicron TG responses ranged as follows: 3.63 ± 0.62 mmol/L.h, 2.77 ± 0.44 mmol/L.h, 2.07 ± 0.33 mmol/L.h and 1.63 ± 0.25 mmol/L.h for Custard, Sponge cake, Pudding and Biscuit, respectively ([Table 14](#)). Custard TG response was significantly higher than Pudding and Biscuit responses (up to + 122.7%, $p < 0.0001$). Sponge cake TG response was significantly higher than Biscuit response ($p = 0.002$) ([Figure 32C](#)). The CV of the TG response was 64.8% and the ratio between the highest and the lowest responder was ≈ 16 .

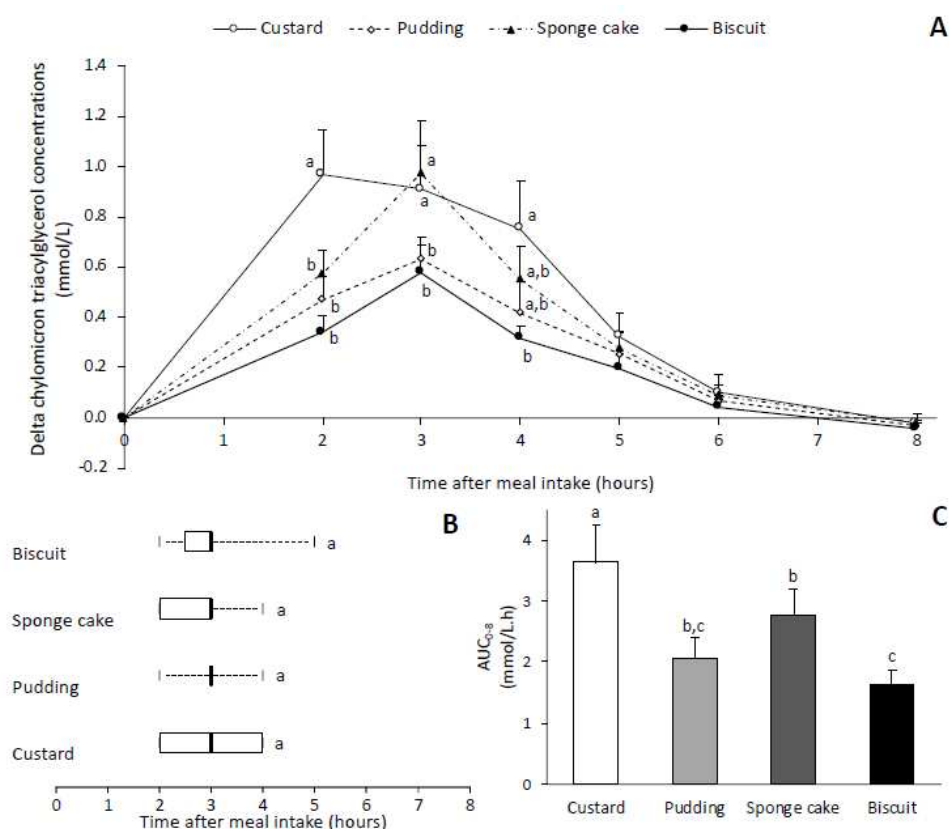


Figure 32 : Chylomicron TG responses.

(A) Baseline-adjusted chylomicron TG concentration over 8 h after consumption of model foods. Data are means \pm SEM ($n=12$). At each time, a different letter indicates a significant difference ($p < 0.05$).

(B) Time of appearance of maximum TG concentration after consumption of model foods. Vertical bars represent medians; boxes represent 25th-75th percentiles and whiskers indicate the maximal and the minimal values. A different letter indicates a significant difference ($p < 0.05$).

(C) AUC of the postprandial chylomicron TG responses (0-8 h AUC) after consumption of model foods. Data are means \pm SEM ($n=12$). A different letter indicates a significant difference ($p < 0.05$).

Table 14 : AUC and time peak

	Triglycerides	Vitamin D ₃	Lutein
<i>AUC</i> ¹	(mmol/L.h)	(nmol/L.h)	(nmol/L.h)
Custard	3.63 ± 0.62 ^a	21.98 ± 3.08 ^{a,b}	108.90 ± 26.45 ^a
Pudding	2.07 ± 0.33 ^{b,c}	23.19 ± 2.83 ^{a,b}	76.08 ± 15.72 ^a
Sponge cake	2.77 ± 0.44 ^b	24.29 ± 3.31 ^a	125.63 ± 25.25 ^a
Biscuit	1.63 ± 0.25 ^c	19.18 ± 1.69 ^b	96.63 ± 19.20 ^a
<i>Time peak (h)</i> ²			
Custard	3.0 (2.0 - 4.0) ^a	3.0 (3.0 - 4.0) ^a	3.0 (3.0 - 4.0) ^a
Pudding	3.0 (3.0 - 3.0) ^a	3.0 (3.0 - 4.0) ^a	3.5 (3.0 - 4.0) ^a
Sponge cake	3.0 (2.0 - 3.0) ^a	3.0 (3.0 - 4.0) ^a	3.0 (3.0 - 4.0) ^a
Biscuit	3.0 (2.75 - 3.0) ^a	4.0 (3.75 - 5.0) ^b	4.0 (3.75 - 5.0) ^b

¹ Data are means ± SEM (n=12)

² Data are medians (25-75 percentile) (n=12)

At each column, a different letter indicates a significant difference (p<0.05)

III.3.4.3 CHYLOMICRON D₃ RESPONSE TO THE 4 DIFFERENT MODEL FOODS

The mean D₃ response after consumption of the different model foods is shown in [Figure 33A](#) and in [Figure 37](#). Ten out of the 12 subjects had D₃ concentrations below our limit of detection in their fasting chylomicron fraction, and the remaining 2 subjects had extremely low D₃ concentrations on one day (0.265 ± 0.073 nmol/L).

The maximal chylomicron D₃ concentrations were obtained 3 h after Custard, Pudding, Sponge cake consumptions and 4 h after Biscuit consumption ([Figure 33B](#)). The chylomicron D₃ responses ranged as follows: 24.29 ± 3.31 nmol/L.h, 23.19 ± 2.83 nmol/L.h, 21.98 ± 3.08 nmol/L.h and 19.18 ± 1.69 nmol/L.h for Sponge cake, Pudding, Custard and Biscuit, respectively ([Table 14](#)). Sponge cake D₃ response was significantly higher than Biscuit response (+26.6%, p=0.047) ([Figure 33C](#)). The CV of the D₃ response was 43.2% and the ratio between the highest and the lowest responder was ≈ 7.

Considering all model foods, the D₃ response correlated positively with chylomicron TG response (Pearson's r = 0.496, p = 0.0003). When model foods were considered separately, the relationship between D₃ and TG responses was still significant for Sponge cake ([Table 15](#)).

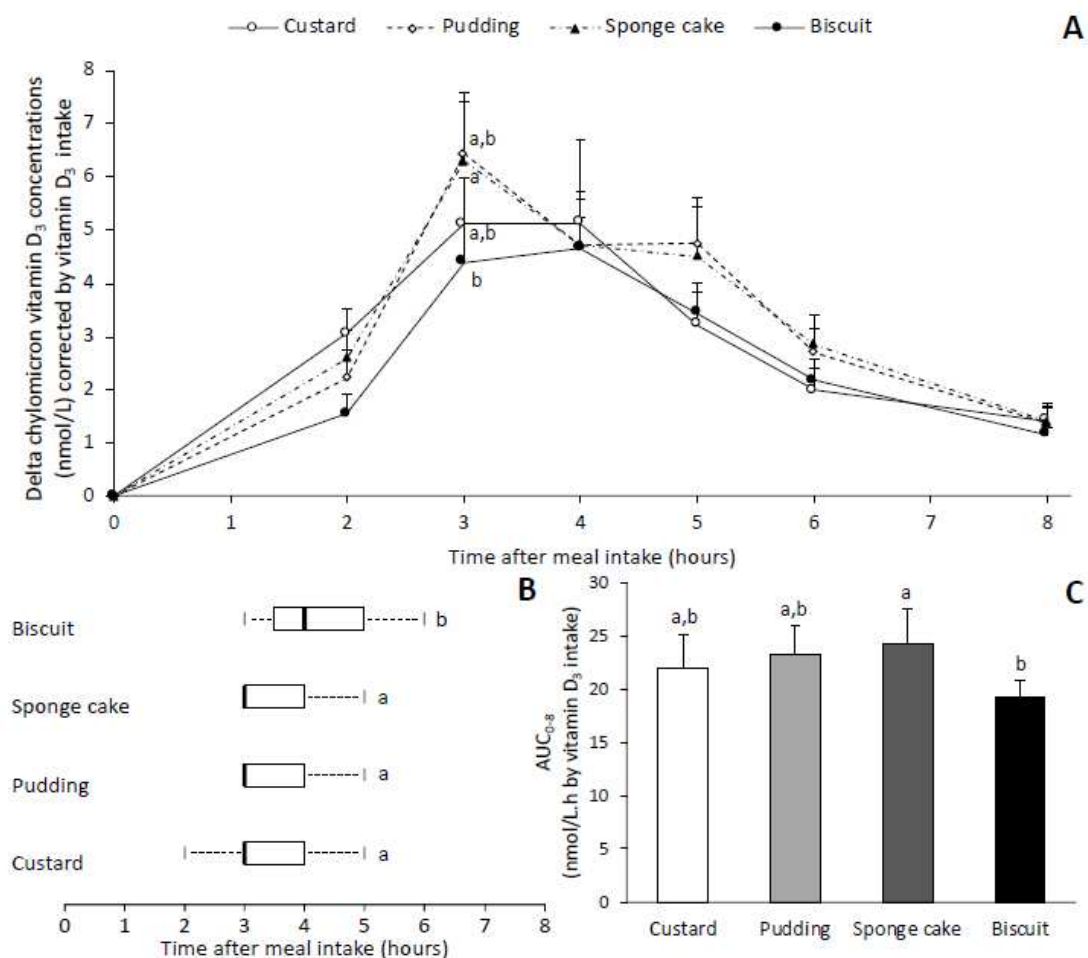


Figure 33 : Chylomicron D3 responses.

(A) Baseline-adjusted chylomicron D₃ concentration over 8 h after consumption of model foods corrected by D₃ intake. Data are means \pm SEM (n=12). At each time, a different letter indicates a significant difference (p<0.05).

(B) Time of appearance of maximum D₃ concentration after consumption of model foods. Vertical bars represent medians; boxes represent 25th-75th percentiles and whiskers indicate the maximal and the minimal values. A different letter indicates a significant difference (p<0.05).

(C) AUC of the postprandial chylomicron D₃ responses (0-8 h AUC) after consumption of model foods corrected by D₃ intake. Data are means \pm SEM (n=12). A different letter indicates a significant difference (p<0.05).

III.3.4.4 CHYLOMICRON LUTEIN RESPONSE TO THE 4 DIFFERENT MODEL FOODS

The mean lutein response after consumption of the different model foods is shown in Figure 34A and in Figure 36. Subjects had low fasting lutein concentrations in the chylomicron fraction (6.419 ± 3.974 nmol/L).

The maximal chylomicron lutein concentrations after Custard, Pudding, Sponge cake and Biscuit consumption were obtained 3 h, 3 h 30, 3 h and 4 h after meal intake, respectively (Figure 34B). The chylomicron lutein responses ranged as follows: 125.63 ± 25.25 nmol/L.h, 108.90 ± 26.45 nmol/L.h, 96.63 ± 19.20 nmol/L.h and 76.08 ± 15.72 nmol/L.h for Sponge cake, Custard, Biscuit and Pudding, respectively (Table 14). Lutein response was not significantly different depending on the model food

(Figure 34C). The CV of the lutein response was 74.9% and the ratio between the highest and the lowest responder was ≈ 69 .

Considering all model foods, the lutein response correlated positively with the chylomicron TG response (Pearson's $r = 0.324$, $p = 0.025$) and the chylomicron D_3 response (Pearson's $r = 0.619$, $p < 0.0001$). When model foods were considered separately, the positive relationship between lutein and TG responses was still significant in the case of Pudding, and the relationship between D_3 and lutein responses was still significant for Custard and Pudding (Table 15).

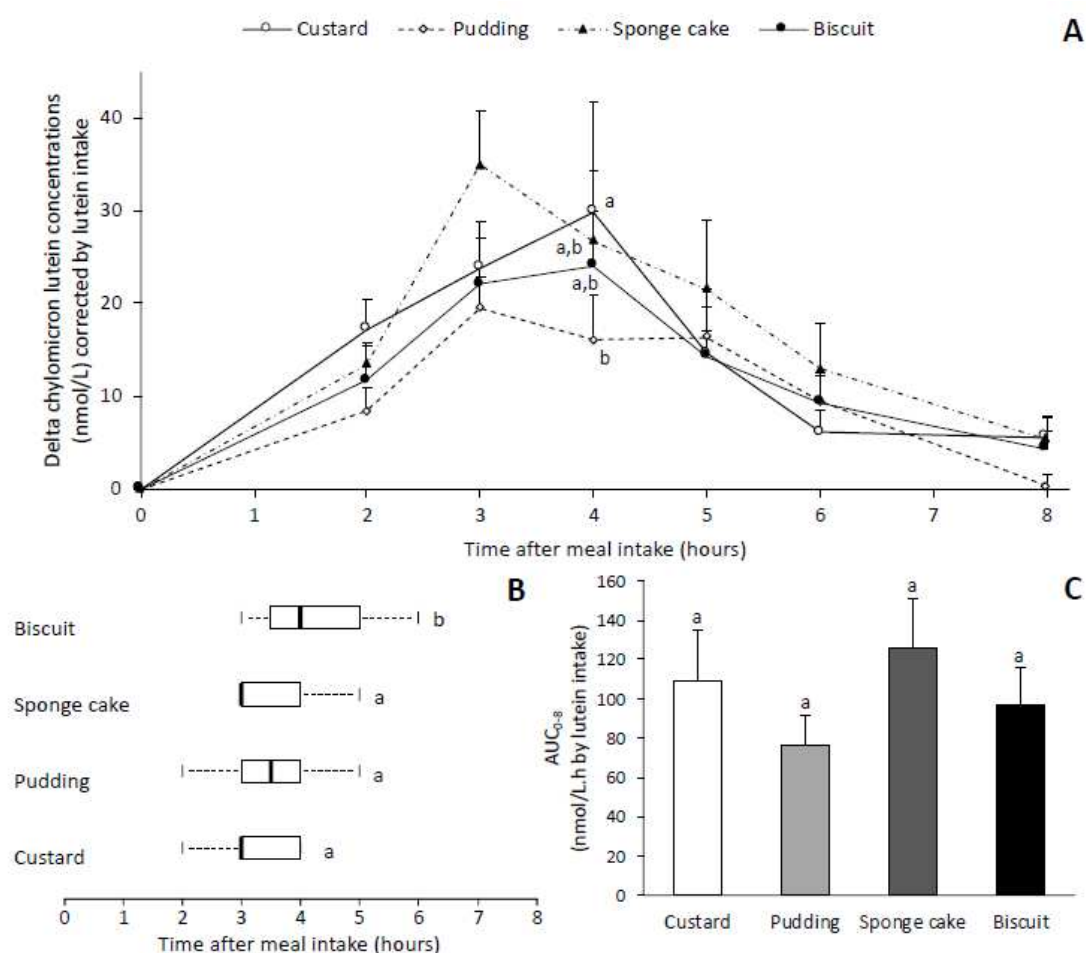


Figure 34 : Chylomicron lutein responses.

(A) Baseline-adjusted chylomicron lutein concentration over 8 h after consumption of model foods corrected by lutein intake. Data are means \pm SEM ($n=12$). At each time, a different letter indicates a significant difference ($p < 0.05$).

(B) Time of appearance of maximum lutein concentration after consumption of model foods. Vertical bars represent medians; boxes represent 25th-75th percentiles and whiskers indicate the maximal and the minimal values. A different letter indicates a significant difference ($p < 0.05$).

(C) AUC of the postprandial chylomicron lutein responses (0-8 h AUC) after consumption of model foods corrected by lutein intake. Data are means \pm SEM ($n=12$). A different letter indicates a significant difference ($p < 0.05$).

Table 15 : Pearson's correlation

	r	
<i>All model foods</i>		
D ₃ vs. triglycerides	0.4965	p=0.0003**
Lutein vs. triglycerides	0.3239	p=0.0247*
D ₃ vs. lutein	0.6191	p<0.0001**
<i>Custard</i>		
D ₃ vs. triglycerides	0.4396	p=0.1527
Lutein vs. triglycerides	0.2605	p=0.4135
D ₃ vs. lutein	0.8768	p=0.0002**
<i>Pudding</i>		
D ₃ vs. triglycerides	0.5252	p=0.079
Lutein vs. triglycerides	0.6075	p=0.036*
D ₃ vs. lutein	0.6501	p=0.022*
<i>Sponge cake</i>		
D ₃ vs. triglycerides	0.7404	p=0.006*
Lutein vs. triglycerides	0.4362	p=0.156
D ₃ vs. lutein	0.4816	p=0.113
<i>Biscuit</i>		
D ₃ vs. triglycerides	0.3551	p=0.257
Lutein vs. triglycerides	-0.0403	p=0.901
D ₃ vs. lutein	0.5206	p=0.083

* Significant at 0.05 level; ** Significant at 0.001 level.

III.3.5 DISCUSSION

Two fat-soluble micronutrients displaying i/ different chemical structures and ii/ specific nutritional interest, have been chosen to perform the study. The first one is vitamin D₃. This sterol-like molecule is essential for health and is involved in many functions including the optimal functioning of the musculoskeletal system (Wimalawansa, 2011). Since sun exposure is not sufficient to reach satisfactory vitamin D status in most people, a complementary dietary intake is generally required. However, vitamin D deficiency and insufficiency remain widespread in the global population, which constitutes a main public health concern (Holick, 2017). Vitamin D dietary intake should thus be optimized. The second “micronutrient” was the carotenoid lutein. This oxygenated tetra-terpenoid is not a

“micronutrient” *per se* because it essentially has not been proven in humans yet. Nevertheless, lutein was shown to selectively accumulate in the retina (Bone et al., 1997; Chan, Leung, Lam, & Tso, 1998) where its presence has been negatively associated with the incidence of age-related macular degeneration (Landrum & Bone, 2001; Snodderly, 1995), which is major cause of visual impairment in elderly. Lutein beneficial effect is likely due to its ability to protect photoreceptors from blue light (Junghans, Sies, & Stahl, 2001; Krinsky, 2002; Rapp, Maple, & Choi, 2000). Recent randomized, placebo-controlled clinical trials have confirmed these data as xanthophyll supplementation improves patient visual function and decreases the risk of progression to late age-related macular degeneration (Scripsema, Hu, & Rosen, 2015). Optimizing dietary lutein intake is thus of great interest in this context as well.

In order to assess lutein and vitamin D₃ bioavailability, we measured the postprandial chylomicron lutein and D₃ response to four different model foods. This approach is commonly used for experimental assessment of vitamin D (Desmarchelier et al., 2016) and carotenoid (Borel et al., 2014; Reboul et al., 2007) neo-absorption. Because it has been shown that season is an important prediction factor for D₃ response variation (Zhao et al., 2012), the postprandial experiments were performed in winter, and more precisely between November 2017 and March 2018.

The effect of the food matrix on micronutrient postprandial response was evaluated in this study by using 4 model foods corresponding to real foods, specifically designed to display contrasted physicochemical properties: Biscuit, Sponge cake, Pudding and Custard. The 4 different model foods were prepared with the same ingredients, and only differed regarding their water content. Water was shown to have a minor effect on gastric emptying (Kroop, Long, Alavi, & Hansell, 1979) and should thus not impact further nutrient digestion. Assays on final products showed slight difference in terms of nutrients content. In particular, moderate difference in terms of lipid content were observed after baking, likely due to lipid “leaching” at high temperature. However, a previous study performed in healthy volunteers showed that no difference was observed in terms of triglyceride postprandial responses between meals containing 30 to 50 g of fat (Dubois et al., 1998). Consequently, the differences observed in terms of (micro)nutrient absorption in our study are thus expected to be mainly due to model food structure.

Previous data showed that supramolecular organization and physical state of lipids in native and formulated food products can modulate both the digestibility and metabolism of dietary fat. In particular, emulsification in small lipid droplets lead to an enhancement of fat absorption (Michalski et al., 2013). This was confirmed in our study as the highest TG postprandial response was observed after Custard consumption, which displayed the smallest fat droplets; while the lowest TG postprandial response was observed after Biscuit, which displayed the biggest fat droplets. Another explanation would be that the Biscuit matrix, due to its solid structure, would reduce the accessibility of the droplets

to enzymes. However, none of the model foods impacted the time of the maximal postprandial TG blood concentration, which was observed at 3 h for all conditions. This observation indicates that food matrix structure likely influenced neither the accessibility of TG to enzymes during digestion process, nor fatty acid absorption and secretion into chylomicrons.

Interestingly, such reduction in absorption after Biscuit matrix ingestion was also observed for D₃. This may also be the consequence of a diminution of absorption due to a lipid emulsion in large-size fat droplets. Additionally, D₃ maximal blood concentration was delayed to 4 h after Biscuit intake. Such difference in terms of maximal postprandial blood concentrations of TG (3h) and of D₃ (4h) after Biscuit ingestion suggest either i) a delay in absorption by intestine of D₃ compared to TG, ii) a differential mechanism for their incorporation into chylomicrons or iii) a differential clearance. Further investigations are required to validate these assumptions.

Conversely to D₃, the model food structure did not significantly modify lutein response, but the Biscuit matrix also led to a delay in lutein peak compared to the TG peak (4h vs 3h). Similar hypotheses could then be advanced, i.e. potentially different mechanisms for lutein and TG absorption and/or clearance. This result is consistent with a recent study in minipigs aiming at comparing lutein response after pure lutein (i.e. without matrix) or spinach lutein ingestion. This study showed no difference in lutein responses, but lutein peak was delayed with spinach (Margier et al., 2018).

Finally, it worth mentioning that the decrease in TG and D₃ responses observed with some matrices may be balanced by increased TG and D₃ in the chylomicron secretion following the next meal. Indeed, the intestine is able to store some lipid molecules such as cholesterol and vitamin E from one meal and to secrete them during subsequent postprandial periods (Reboul, 2019).

Overall, we showed that food structure can influence the absorption of fat-soluble (micro)nutrients in humans. In particular, it can lead to modification in terms of amounts of absorbed TG and vitamin D₃. Thus, food structure might be a technological lever to optimize the bioefficiency of vitamin D-supplemented foods, in a context of deficient populations. Moreover, this study highlighted that food structure can lead to delay both vitamin D₃ and lutein postprandial peaks, despite the physiological consequences of these modulations are not yet known. In any case, this study confirms the importance of further investigation to better understand the impact of food matrix characteristics on food nutritional quality. This may be of particular interest to develop functional foods for population subgroups deficient or sub-deficient in fat-soluble vitamins, such as elderly.

Acknowledgement

All authors have declared that no conflict of interest exists. This project was funded by a grant from the Carnot Institute Qualiment.

FN initiated the project. BG, NM, RR, ISA, CB, MAP, CCV, FN and ER designed the clinical study. MH and FN designed the model foods. NM, RR, ISA and CB conducted the clinical study. ER and CH performed vitamin D analysis. BG performed lutein and triglyceride analysis. BG and BP did the statistical analyses. ER and BG interpreted the data with FN and MH; ER and BG drafted the manuscript; all authors have read and approved the final manuscript; ER has primary responsibility for the final content of the manuscript.

III.3.6 SUPPLEMENTAL DATA

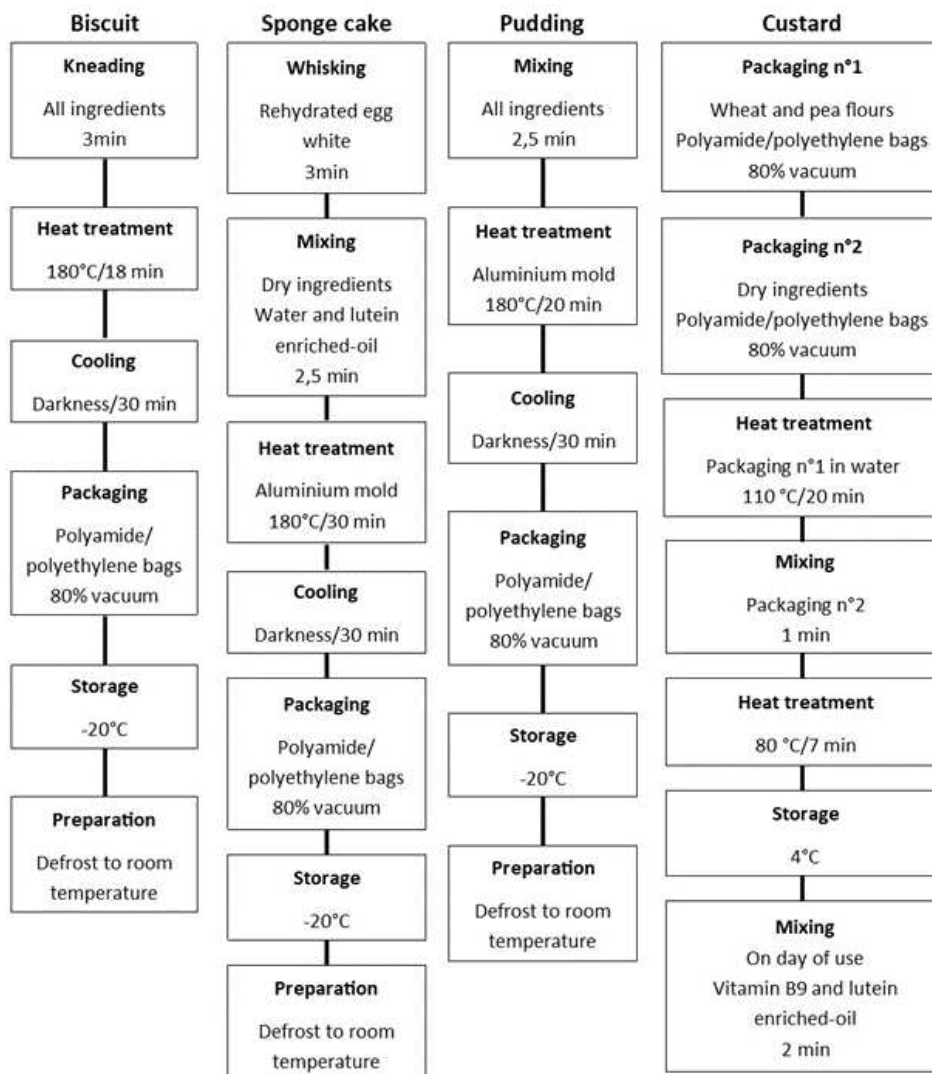


Figure 35 : Production flow chart of model food

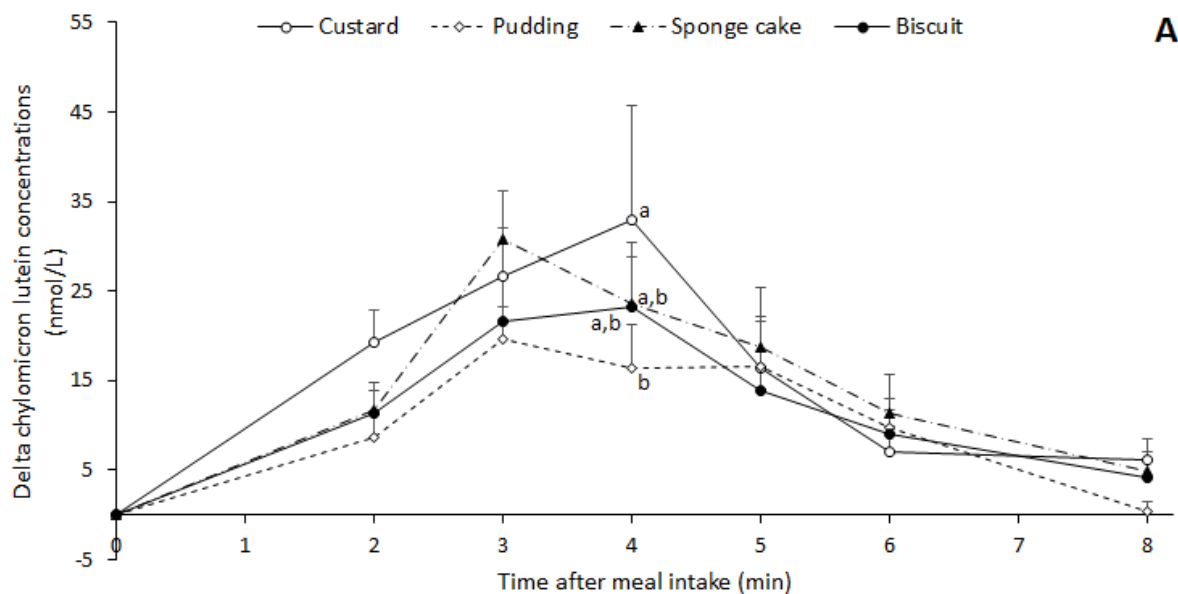


Figure 36 : Baseline-adjusted chylomicron lutein concentration over 8 h after consumption of model foods. Data are means \pm SEM (n=12). At each time, a different letter indicates a significant difference ($p < 0.05$).

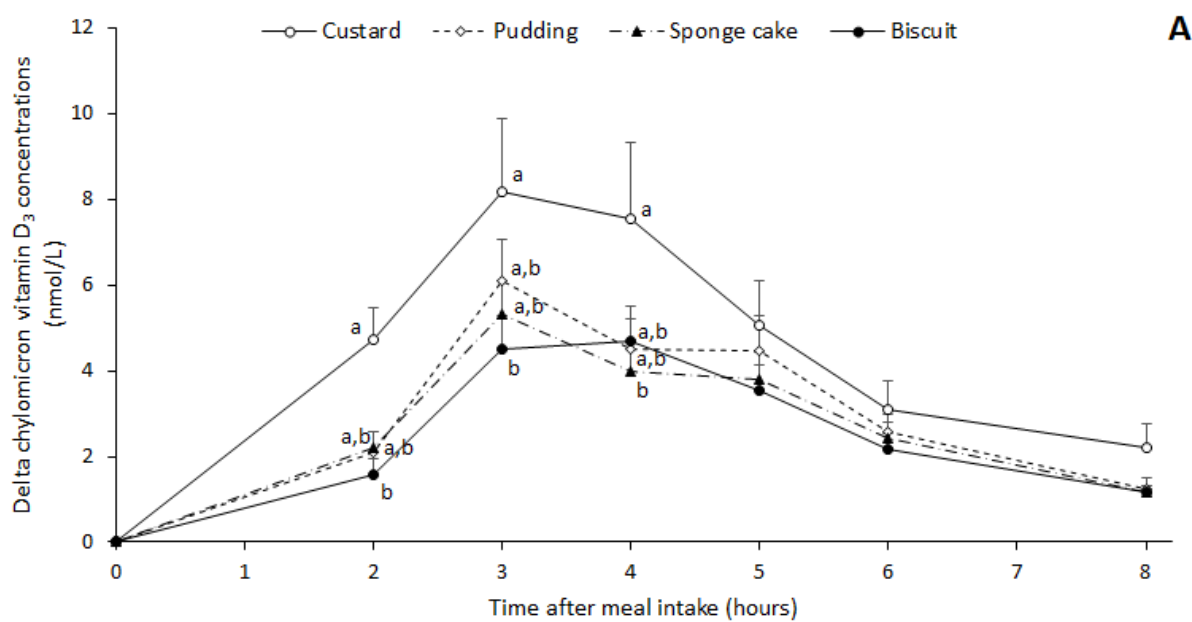


Figure 37 : Baseline-adjusted chylomicron D3 concentration over 8 h after consumption of model foods. Data are means \pm SEM (n=12). At each time, a different letter indicates a significant difference ($p < 0.05$).

III.4 IMPACT DE LA STRUCTURE DES ALIMENTS SUR LA BIODISPONIBILITÉ DE LA VITAMINE B9

Cette partie est basée sur le projet de publication suivant :

Food matrix structure (from Biscuit to Custard) has an impact on folate bioavailability in healthy volunteers

*Caroline Buffière¹, *Manon Hiolle², Ruddy Richard³, Nathalie Meunier³, Bruno Pereira⁴, Cindy Batisse⁵, Didier Rémond¹, Didier Dupont², Françoise Nau², Marie-Agnès Peyron¹, Isabelle Savary-Auzeloux^{1§}

(1) University Clermont Auvergne, INRA, Unité de Nutrition Humaine, UMR1019, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France.

(2) Science et Technologie du lait et de l'oeuf, INRA, AGROCAMPUS OUEST, F-35042, RENNES, France.

(3) CHU Clermont-Ferrand, Centre De Recherche En Nutrition Humaine Auvergne, 58 rue Montalembert, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France.

(4) University Clermont Auvergne Hospital Clermont-Ferrand, Biostatistics Unit (DRCI), 58 rue Montalembert, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France.

(5) University Clermont Auvergne, CROC EA4847, Dental Faculty, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France and CHU Clermont-Ferrand, Dental service, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France.

* The 2 authors collaborated equally to the work

§ Corresponding author: isabelle.savary-auzeloux@inra.fr

En cours d'écriture pour soumission à European Journal on Nutrition

Les informations concernant le déroulement de l'étude clinique sont présentées en section III.2.

Keywords

Food matrix, Folate, Clinical Trial, Bioavailability

III.4.1 ABSTRACT

Purpose

We examined the impact of matrix food structure on post prandial folates bioavailability (and other macronutrients) in human volunteers using a Randomized, Controlled, Crossover experimental design

Methods

Twelve healthy Male volunteers (22.6 +/- 0.4 years old) were offered four food models (differing in matrix structure: Custard, Pudding, Sponge cake and Biscuit) supplemented with 1 mg of folic acid according to a Randomized, Controlled, Crossover experimental design. Plasma folates, glucose, insulin, alpha amino nitrogen and triglycerides were measured over the post prandial period (from T0 to T480 min).

Results and Conclusion

The highest folate availability was observed for Pudding and Sponge cake whereas the lowest was for the two matrices presenting extreme rheological properties: Custard (liquid) and Biscuit (hard solid) ($P < 0.05$). The analysis of plasma kinetics of other nutrients/metabolites suggests that the lower bioavailability of folates when incorporated in Custard and Biscuit probably results from different origins. A least overall efficient bioaccessibility of all nutrients in the gut lumen for Biscuit (lowest availability for Alpha amino N and triglycerides also, $P < 0.05$) has been hypothesized. On the contrary, an overflow of absorption capacities specifically for folates in the case of Custard (highest post prandial insulin peak, alpha amino N and triglycerides post prandial levels within the first hours, $P < 0.05$) is suspected.

III.4.2 INTRODUCTION

Folates belong to a group of water-soluble vitamins and are known to be involved (as coenzymes) in the regulation of various metabolic pathways within the cells such as nucleic acid synthesis and one carbon metabolism (for instance regeneration of methionine from homocysteine) (Bailey & Gregory, 1999). Any alteration of these folate-requiring various metabolic pathways can then impact greatly on cell division and homeostasis, and folate deficiency has been associated with the increased risk to develop megaloblastic anaemia, chronic diseases (vascular diseases), reproductive disorders (impact on incidence of neural tube defects (NTD)) and alteration of cognitive function in the elderly (Bailey & Gregory, 1999; Naderi & House, 2018; Ramos et al., 2005).

As it has been shown that plasma or blood folates concentrations were increased after folic acid supplementation on a short term (Achón, Arrate, Alonso-Aperte, & Varela-Moreiras, 2011; Prinz-Langenohl, Brönstrup, Thorand, Hages, & Pietrzik, 1999) and a long term basis (Crider et al., 2019), food fortification in folic acid in grain products has been mandated by the U.S Food and Drug Administration (but not in several European countries) since 1998. This policy has been intended to target a specific population : women in age to become pregnant (Naderi & House, 2018) to limit the occurrence of NTD in the population. Although several studies have shown that these food fortifications in folic acid have reduced the prevalence of NTD in these populations (Atta et al., 2016; Dwyer et al., 2015; Naderi & House, 2018; Patel & Sobczyńska-Malefora, 2017), potential adverse effects of these supplementations on the overall population's health have also been mentioned (Patel & Sobczyńska-Malefora, 2017; Reynolds, 2016; Swedish Council on Health Technology Assessment, 2007). One of the most documented adverse effect of oversupply of folic acid is the aggravation and/or masking of vitamin B12 deficiency in case of folates oversupply, particularly in elderly population or even during pregnancy. Indeed, B12 deficiency is directly responsible for increased occurrence of various age-related diseases: megaloblastic macrocytic anaemia, cardiovascular diseases, neurological pathologies, and osteoporosis (Hughes, Ward, Hoey, & McNulty, 2013; Patel & Sobczyńska-Malefora, 2017; Reynolds, 2016). In parallel, the impact of oversupply of folic acid on cancers (colorectal cancers in particular) remains a matter of debate (Zhang et al., 2016). To summarize, although folic acid supplementation has been shown to decrease the occurrence of NTD, some side deleterious effects (particularly towards elderly population) are still questioned in the literature as well the dose to be supplied both on the short term and the long term basis (Dolin, Deierlein, & Evans, 2018; Reynolds, 2016).

In this context, the actual assessment of folate bioavailability (i.e. fraction of folates ingested available to the body for utilization or storage in normal physiological conditions) or bioefficacy

(as described by Brouwer *et al.* (2001) and its determinants to the overall or specific populations becomes a key point (Brouwer *et al.*, 2001). In this way, the quantity and conditions of folates supplies (chemical structure, vector, and so on) should be adapted to better fit with population requirements, according to their age or health status. Folate bioavailability is the result of various interacting parameters difficult to individualize : 1/ The chemical structure of folates supplied (mono or polyglutamyl chains), 2/ the vector (food) used for folate supply 3/ the digestion processes of food containing folates and 4/ the efficiency of folates absorption by the intestinal brush border and activity of the carrier-mediated absorption of folates (McKillop *et al.*, 2006). Lastly, plasma folates concentrations in the fasted and fed state (considered as an appropriate for folates bioavailability assessment (Prinz-Langenohl *et al.*, 1999), are also the consequence of the metabolic use of folates within the body, folates plasma/blood concentrations being the result of folates appearance and disappearance within the plasma compartment (Brouwer *et al.*, 2001). Among all these parameters, one factor has been rarely studied but mentioned to impact on folates absorption: interaction of folates with food components (i.e. entrapment within the food matrix) (Ohrvik & Witthoft, 2011). Generally, when the food matrix effect is studied, the comparison is made between synthetic folic acid (supplemented alone or added to grain products) and natural folates (present within variable food matrices rich in folates). However, in such situations, folates supplied are also chemically different, which is also a parameter known to impact on bioavailability (Prinz-Langenohl *et al.*, 1999).

Consequently, to assess whether food matrix alone could significantly have an impact on folates bioavailability, the present work has been designed as follows: four different folic acid-enriched model foods (Biscuit, Sponge cake, Pudding and Custard) have been developed and the folates appearance in plasma of healthy volunteers measured post-prandially (until 8 hours post matrices ingestion) according to a randomized controlled cross over design. To make sure that plasma bioavailability was only conditioned by a matrix effect, the four matrices were designed so that quantity and quality of nutrients in each matrix ingested were similar. The only difference between the four model foods is their water content, which allowed the development of different micro and macrostructures, by modulating the production process. Folate contents in each matrix were also assessed before ingestion.

III.4.3 METHODS

III.4.3.1 PREPARATION OF MATRICES

One liquid (Custard) and three solid (Pudding, Sponge cake and Biscuit) micronutrient-enriched food matrices were developed. Custard was provided as a packed-powder that was rehydrated

and heated before use. Solid matrices were provided not more than 2 months prior using and stored at -20 °C as daily portions.

Each portion of matrix ingested by the volunteers contained 10 g wheat flour, 10 g pea flour, 10 g egg white powder, 31 g egg yolk powder, 54 g sugar and 20 g sunflower oil. Their water content varied as follows: 17 g for the Biscuit, 119 g for the Sponge cake, 170 g for the Pudding and 376 g for the Custard. All preparation steps were carried out with a kitchen robot Thermomix® TM5 (Vorwerk, Wuppertal, Germany) except for the cooking of solid matrices, which was operated with a semi-professional convection oven (De Dietrich, Niederbronn-Les-Bains, France).

On dry matter, the four matrices were all composed of 17% proteins, 52% carbohydrates, and 30% lipids. Food composition was controlled by determining their lipid content by weighing them after Folch extraction and their protein content by Kjeldahl method (data not shown). Before processing (for solid matrices) or on day of use (for Custard), each matrix was supplemented with folic acid and B12 vitamin at a dose of 1000 µg folic acid and 12 µg B12 vitamin (Folic acid, Vitamin B12, Nutrilo GmbH, Germany) per portion ingested by the volunteers.

III.4.3.2 CHARACTERIZATION OF MATRICES MICROSTRUCTURE

CLSM observation of the four matrices was performed using the ZEISS LSM 880 inverted confocal microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) set at the magnification 20× (Plan Apochromat objective, dry, NA 0.80). The protein network and fat components were stained using a 1% (w/v) Fast Green aqueous solution and a 0.1% (w/v) Nile Red 1,2-propanediol solution, respectively (Sigma Aldrich, St Louis, USA). Both fluorescent solutions were first mixed at a ratio 1:4. Then 10 µL of this mix was either deposited on the surface of the slice for solid matrices (Biscuit, Sponge cake and Pudding), or directly added to 100 µL of the Custard, and vortexed. The samples were held at 20 °C for at least 10 min to permit the diffusion of the fluorescent dyes into the solid matrices. One drop of the labelled Custard was deposited on a glass slide. A cover slip sealed with an adhesive frame (Geneframe, ABgene House, UK) was then added on the top of the four different product slices, before observation using 488 and 633 nm excitation wavelengths in sequential beam fluorescent mode, for fat and protein detection respectively, at a 1.32 µs pixel dwell scanning rate. Red Nile and Fast Green were detected using a GaasP between 500 and 585 nm and a PMT between 635 and 735, respectively. Micrographs had a resolution of 0.15 µm/pixel and were recorded in the samples at a constant depth of 10 to 15 µm from the glass slide. Images shown in this paper correspond to superimpositions of images of the same area observed separately with the two markers, with proteins coded in green and fat in red. Aqueous phase and any gas bubbles in the slices may appear as black holes in the micrographs. There were at least

two samples of each product, and for each sample at least 16 micrographs was recorded. The micrographs presented in [Figure 39](#) were considered by the authors to be representative of the different product samples.

III.4.3.3 SAMPLE ANALYSIS

Plasma concentrations in folates were determined before (i.e. in the fasted state) and up to 8 hours post matrix ingestion using a radioimmunological assay (Simultrac B12/Folates SNB kit, MP Biomedicals, Eschwege, Germany) and a gamma counter (Kontron, Augsburg, Germany). Insulin plasma levels were determined using an ELISA test (Insulin Elisa kit, Mercodia, Uppsala, Sweden). Glucose (glucose PAP CP, Horiba, Montpellier, France) and triglycerides (triglycerides CP, Horiba, Montpellier, France) concentrations were assayed using an autoanalyser (Pentra 400, Horiba, Montpellier, France). Total plasma free amino acids were estimated by analysis of circulating total alpha-amino nitrogen according to a spectrophotometric method as previously described (Chacornac, Barnouin, & Houlier, 1993). When unspecified, reagents came from Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallacies, France.

To determine folates content in ingested matrices, frozen matrices were powdered under liquid nitrogen and dry matters were determined. Folates extraction was performed according to Ruggeri *et al.* (1999). A quantity of matrix corresponding to 500 ng of folates was homogenized in 30 mL phosphate buffer 75 mM containing 52 mM ascorbic acid and 0.1% mercaptoethanol. After filling tubes with nitrogen to avoid oxidation, samples stayed 10 minutes in a boiling bath before centrifugation 11000 g 20 minutes. The pellet was washed with buffer, supernatants were pooled, volume was adjusted to 50 mL and analysed by radioassay.

III.4.3.4 CALCULATIONS

Data from all volunteers were expressed as plasma concentrations and measured during 8 hours. The AUC were calculated according the trapezoidal method (Pfeifer et al. 1984). Individual basal concentrations were used as baseline for the calculation of AUC. AUC were calculated for all the duration of kinetics but also for a first part of kinetics (180 min for folates until peak of appearance, 120 minutes for insulin to focus on the transient postprandial peak and 240 min for alpha amino N as the plasma concentration values are back to normal at this time point). For folates, results were expressed corrected or not by total ingested vitamin quantity. Peak plasma value (C_{max}) and time when C_{max} occurs (T_{max}) were also determined.

III.4.3.5 STATISTICAL ANALYSIS

ANOVA tests were used to determine the impact of matrix, time and their interaction on each variable. Differences were considered significant at minimum level of 95%.

III.4.4 RESULTS

III.4.4.1 VOLUNTEERS, MATRICES

The differences in processing conditions and water content resulted in four matrices with very different macroscopic aspects: a hard solid Biscuit, an airy and dry Sponge cake, a humid and compact Pudding and a thick Custard (Figure 38). A continuous protein phase can be observed in confocal microscopy images of Biscuit, Sponge cake and Pudding, whereas small particles of about 50 μm in diameter are seen in those of Custard, suggesting an aggregation of proteins in this matrix (Figure 39). The disruptions of protein phase observed in the four matrices may be attributed to air bubble, non-homogenous mixing, or water phase.

Regarding the lipid phase, Custard and Biscuit present bigger lipid droplets than the two other matrices, in which lipids are more diffuse. In Custard and Biscuit, the shape of lipids droplets is also different since in Biscuit, large flakes of fat can be observed whereas lipids are very globular in Custard. As a conclusion, the four designed food models strongly differ in both microstructure and macrostructure but present a similar macronutrients composition.

The folates content (assayed) in matrices averages 1 mg in all matrices ingested by volunteers. This was expected, as 1 mg folates were supplemented in all matrices. No significant differences were observed in overall folates supplied by the different matrices to the volunteers (Table 16).



Figure 38 : Macroscopic images of the four foods: Biscuit, Sponge Cake, Pudding, and Custard (from left to right).

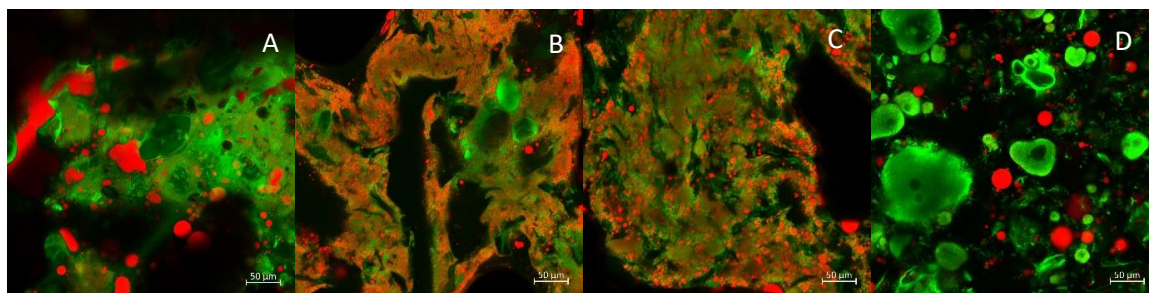


Figure 39 : Confocal images of the Biscuit (A), Sponge cake (B), Pudding (C), and Custard (D) at magnification x20 (lipids appear in red and proteins in green).

III.4.4.2 PLASMA FOLATES

Whatever the matrix considered, plasma folates concentrations strongly increased within the 180 minutes post matrix ingestion ($\times 5.89$ on average between T0 and T180 min) (ANOVA 2 factors Time effect : $P < 0.001$), then the concentrations declined slowly and progressively. At T480 min, the values were still higher than those measured in the fasted state (9.13 ng/mL at T480 vs 3.59 ng/mL at T0) but similar between matrices. Plasma folates differentially increased post prandially (ANOVA 2 factors Time \times matrix effect: $P < 0.001$) with the highest values of plasma folates content for Pudding (Pudding differs from other matrices for plasma concentrations from T120 to T240, $P < 0.05$) (Figure 40). Sponge cake is intermediate with plasma concentrations not different from the group Biscuit/Custard) and Pudding at T120 and T240. This is also illustrated by the folate plasma concentration maximum value that is intermediate between Pudding on one side and Custard/Biscuit on the other side (Table 17) and AUC 180 min when not corrected from ingested folates (Table 16). When AUC was corrected from folates ingested, results are similar except that Sponge cake AUC at 180 minutes becomes significantly higher to Biscuit and Custard and similar to Pudding (ANOVA 1 factor $P = 0.001$, Sponge cake different from Biscuit and Custard, $P < 0.05$, Figure 40). Looking at the AUC over the entire post-prandial period (i.e. 480 min), a similar tendency for a matrix effect was observed (Table 16) with still a difference of 24.8% between Custard and Pudding for AUC480 (but not significant with Post Hoc analysis). Lastly, folates absorption, when supplied in the Biscuit, is delayed by 30 minutes with a T_{max} significantly ($P < 0.05$, ANOVA 1 factor) higher for Biscuit (223 minutes compared to 180, 180 and 196 min for Sponge cake, Pudding and Custard respectively, $P < 0.05$, Table 16).

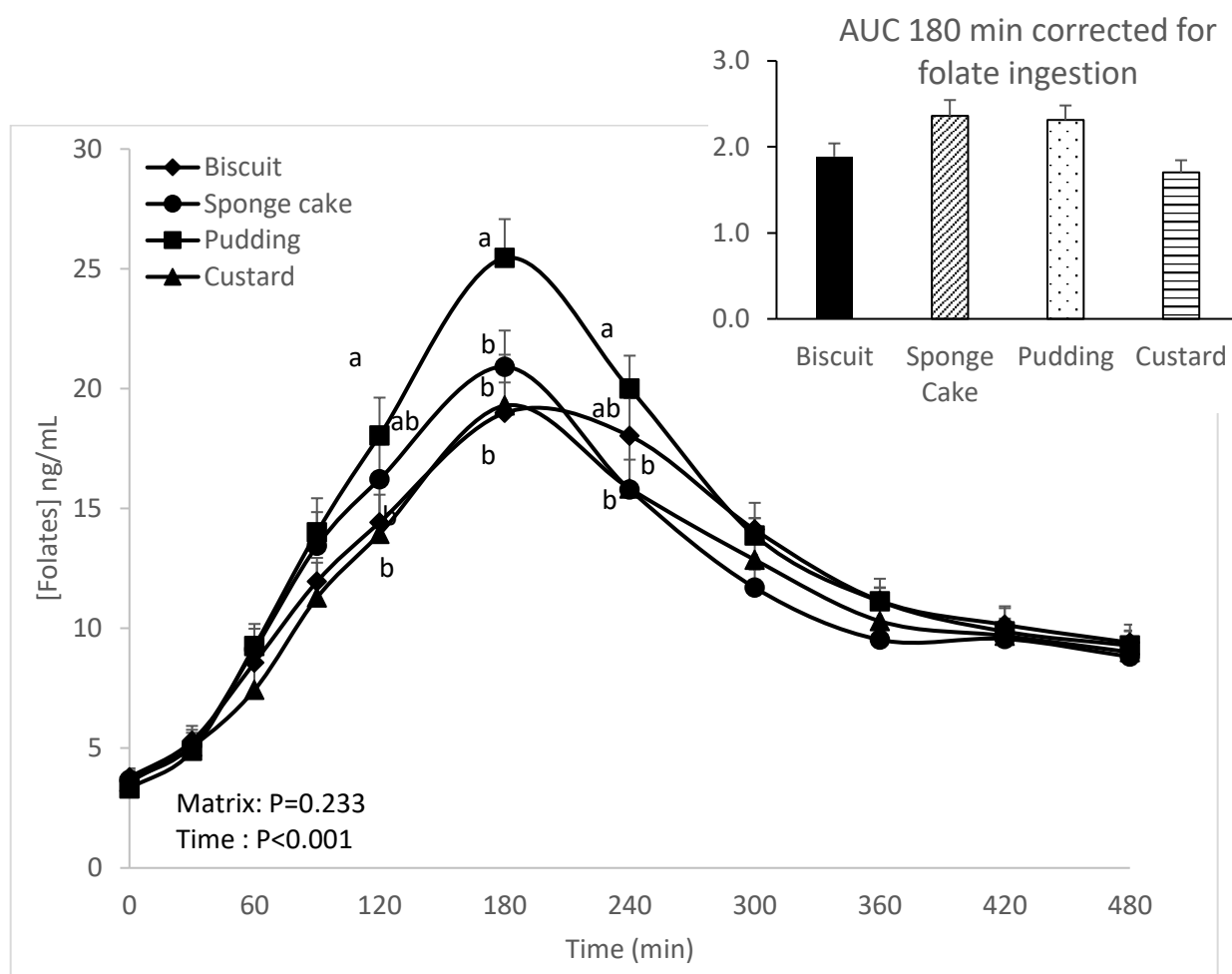


Figure 40 : Folates concentrations (ng/mL) in plasma over the postprandial period and area under the curve (AUC, ng/mL.min) 180 minutes post ingestion for the four tested matrices. Values are means \pm SEM, statistical analysis: 2 ways RM ANOVA for folates concentrations and One way ANOVA for AUC.

Table 16 : Folates content measured in ingested matrices (μg). Area under the curve (AUC, ng/mL.min) for plasma folate concentrations 180 and 480 minutes post ingestion of one of the four tested matrix: Biscuit, Sponge cake, Pudding and Custard. AUC were corrected or not for ingested folates. For each matrix, average maximum values (ng/mL) and time (min) when the maximum value was observed (T_{max}). Values are means \pm SEM, statistical analysis: 1 factor ANOVA.

Food	Folates content in matrices	Not Corrected for ingested folates		Corrected for ingested folates		C_{max}	T_{max}
		AUC 180 min	AUC 480 min	AUC 180 min	AUC 480 min		
Biscuit	967 \pm 39	1826 \pm 153 b	4465 \pm 275	1.89 \pm 0.16 a	4.62 \pm 0.28	20.4 \pm 1.3 b	223 \pm 12 a
Sponge Cake	889 \pm 60	2100 \pm 171 ab	4322 \pm 255	2.36 \pm 0.19 b	4.86 \pm 0.29	21.7 \pm 1.3 ab	180 \pm 8 b
Pudding	1096 \pm 35	2536 \pm 193 a	5390 \pm 266	2.31 \pm 0.18 b	4.92 \pm 0.24	25.5 \pm 1.6 a	180 \pm 8 b
Custard	1096 \pm 100	1797 \pm 225 b	4179 \pm 563	1.70 \pm 0.15 a	3.94 \pm 0.32	19.8 \pm 2.1 b	196 \pm 8 b
ANOVA p-value	0.519	0.005	0.09	0.001	0.06	0.045	0.002

III.4.4.3 OTHER METABOLITES/NUTRIENTS/HORMONES

III.4.4.3.1 Insulin

As generally observed post prandially, insulin plasma concentrations increased rapidly (i.e. within the first 30 minutes after matrix ingestion). Interestingly, and although the quantity of carbohydrates, proteins and lipids ingested are similar between matrices (see M&M section), insulin concentrations were higher 30 minutes after Custard ingestion compared to the other 3 matrices (1.73 µg/L for Custard vs 1.12, 1.01 and 1.15 µg/L for Biscuit, Sponge cake and Pudding respectively, matrix x time effect: $P < 0.001$) (Table 17, Figure 41). This is confirmed by AUC calculation within the first 120 min and 480 min post matrix ingestion with a significant matrix effect ($P < 0.05$) (see Table 17). Because of the increased variability of data following AUC calculation, Custard AUC was only significantly above AUC value for Sponge cake, the 2 other matrices presenting intermediate AUC values.

Table 17 : Area under the curve (AUC, µg/L.min) for insulin concentrations 120 and 480 minutes post ingestion of one of the four tested foods: Biscuit, Sponge cake, Pudding and Custard. For each matrix, average maximum values (µg/L) and time (min) when the maximum value was observed (T_{max}). Values are means \pm SEM, statistical analysis: 1 factor ANOVA.

Food	AUC 120 min	AUC 480 min	C_{max}	T_{max}
Biscuit	71.0 \pm 11.4 ab	89.6 \pm 18.8 ab	1.12 \pm 0.19 a	43.6 \pm 6.2
Sponge Cake	62.8 \pm 7.3 a	56.5 \pm 11.6 a	1.01 \pm 0.10 a	62.7 \pm 15.9
Pudding	75.1 \pm 9.7 ab	91.8 \pm 12.8 ab	1.15 \pm 0.16 a	46.4 \pm 12.6
Custard	94.2 \pm 10.6 b	118.0 \pm 15.6 b	1.73 \pm 0.26 b	32.7 \pm 2.7
ANOVA <i>p-value</i>	0.043	0.018	0.009	0.30

III.4.4.3.2 Glucose

As for insulin, glucose plasma concentrations were increased by 28% between the fasted state and T30 (Time effect $P < 0.001$) (Figure 42). This was followed by a rapid drop of glucose levels back to the values observed in the fasted state at T90. It should be noted that for each matrix, T0 values are not different from T60, except for Custard (for Custard $T_0 \neq T_{60}$, $P = 0.04$) (Figure 42).

III.4.4.3.3 Alpha amino-nitrogen

Total plasma amino-nitrogen (AAN) plasma levels also increased post-prandially (Time effect $P < 0.001$) (Figure 43). The higher postprandial AAN content was observed later than what was observed for glucose and insulin (i.e. between 100 and 180 min). Lastly, a Matrix x Time effect is observed, with AAN concentration in plasma in Biscuit below the values for Custard (Custard and

Biscuit concentrations different at T30 and T60, $P < 0.05$) and to a lesser extend Sponge cake (Sponge cake different from Biscuit at T60 only, $P < 0.05$) (Figure 43). It should be noted that the matrix effect mentioned above is partially due to the fact that the alpha amino N is not strictly the same in the fasted state depending on the matrices (although not significantly different at T0). This explains why AUC (that integrates the basal level in its calculation) is no more significantly different between matrices (Figure 43).

III.4.4.3.4 Triglycerides

Similarly to AAN, plasma triglycerides concentrations follow the same pattern of change with maximum plasma concentration reached at 180 minutes post matrix ingestion (Time effect, $P < 0.001$) (Table 18). Some differences between matrices are also observed (Matrix x Time effect, $P < 0.001$) (Figure 44). Custard ingestion is followed by a higher triglycerides plasma level compared to Biscuit with values higher for Custard at T90, T120 and T180 ($P < 0.05$ Biscuit vs Custard). This effect is confirmed after calculation of the AUC over the entire postprandial period (AUC 480) where Custard significantly differs from Biscuit (Matrix effect: $P = 0.008$, Custard vs Biscuit). Interestingly, Pudding AUC was also below than Custard ($P < 0.05$) (Figure 44, Table 18), Sponge cake presenting intermediate values.

Table 18 : Area under the curve (AUC, mmol/L.min) for triglycerides 480 minutes post ingestion of one of the four tested matrix: Biscuit, Sponge cake, Pudding and Custard. For each matrix, average maximum values ($\mu\text{g/L}$) and time (min) when the maximum value was observed (T_{max}). Values are means \pm SEM, statistical analysis: 1 factor ANOVA.

Food	AUC 480 min	C_{max}	T_{max}
Biscuit	95.0 \pm 35.9 a	2.11 \pm 0.23 a	171.8 \pm 17.2
Sponge Cake	144.9 \pm 42.8 ab	2.40 \pm 0.39 ab	171.8 \pm 11.5
Pudding	100.8 \pm 59.3 a	2.36 \pm 0.27 ab	180 \pm 11.4
Custard	245.0 \pm 59.2 b	2.75 \pm 0.37 b	163.6 \pm 11.70
ANOVA <i>p-value</i>	0.008	0.09	0.68

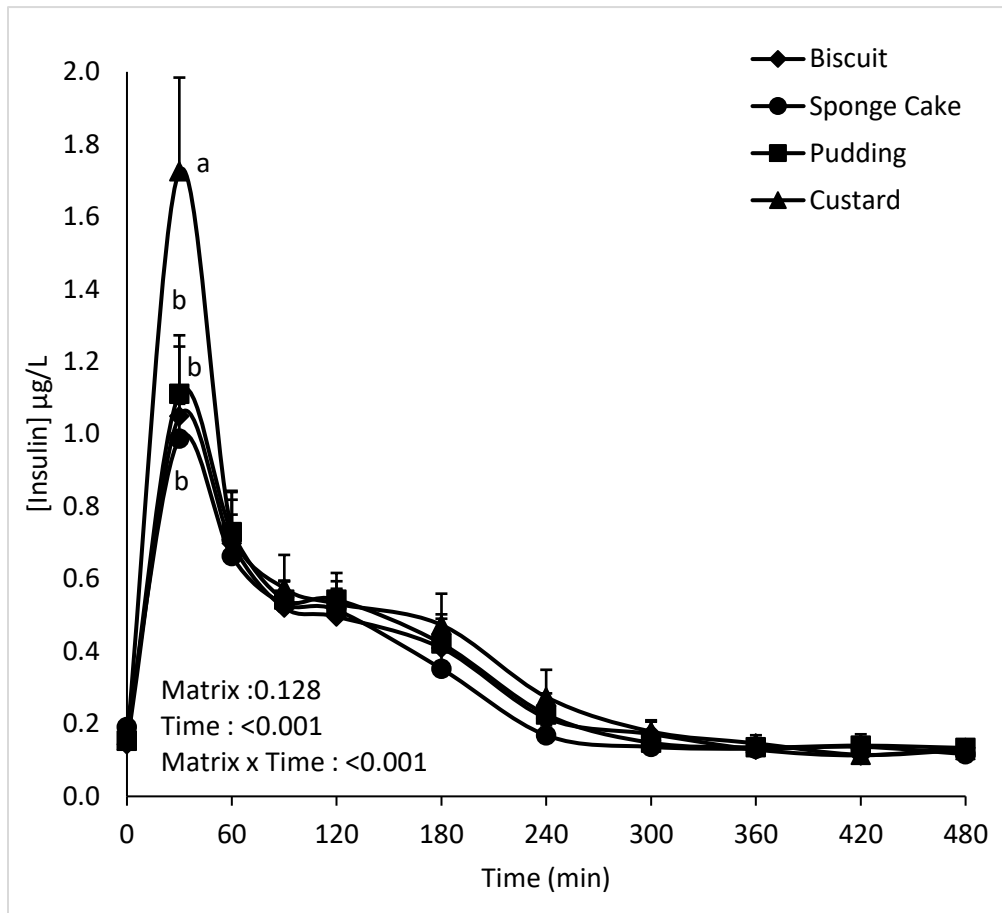


Figure 41 : Insulin concentrations ($\mu\text{g/L}$) in plasma over the post prandial period. Values are means \pm SEM, statistical analysis: 2 ways RM ANOVA

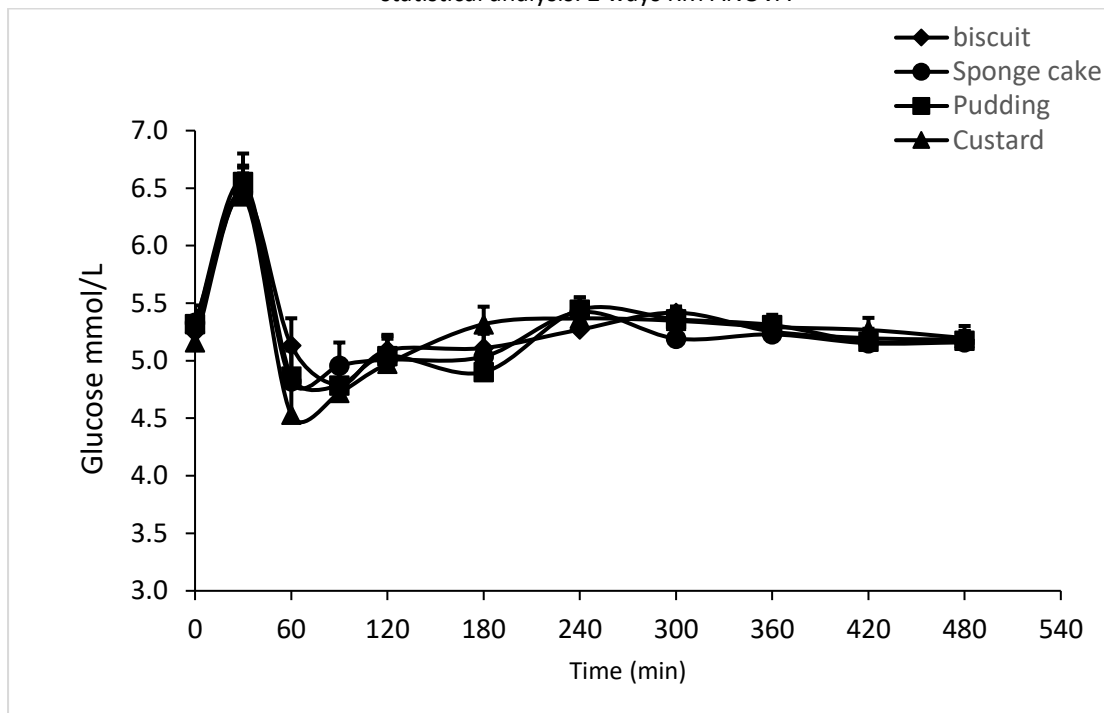


Figure 42 : Glucose concentrations ($\mu\text{g/L}$) in plasma over the post prandial period. Values are means \pm SEM, statistical analysis: 2 ways RM ANOVA

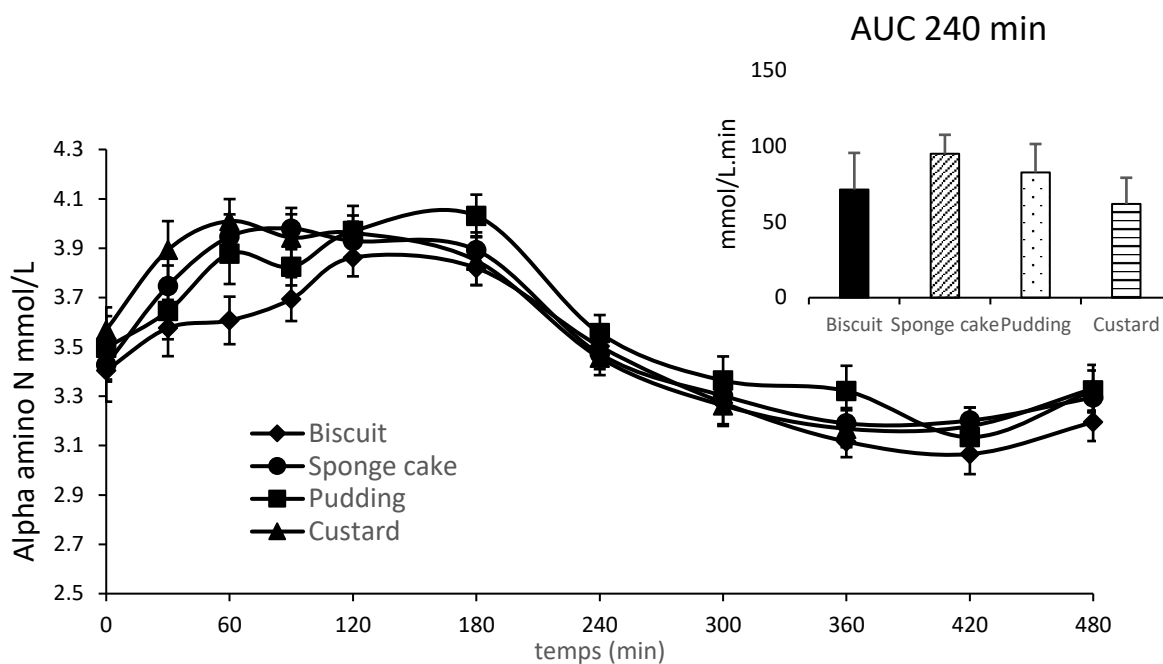


Figure 43 : Alpha amino nitrogen concentrations (mmol/L) in plasma over the post prandial period and area under the curve (AUC, mmol/L.min) 240 minutes post ingestion for the four tested matrices. Values are means \pm SEM, statistical analysis: 2 ways RM ANOVA for alpha amino nitrogen concentrations and One way ANOVA for AUC.

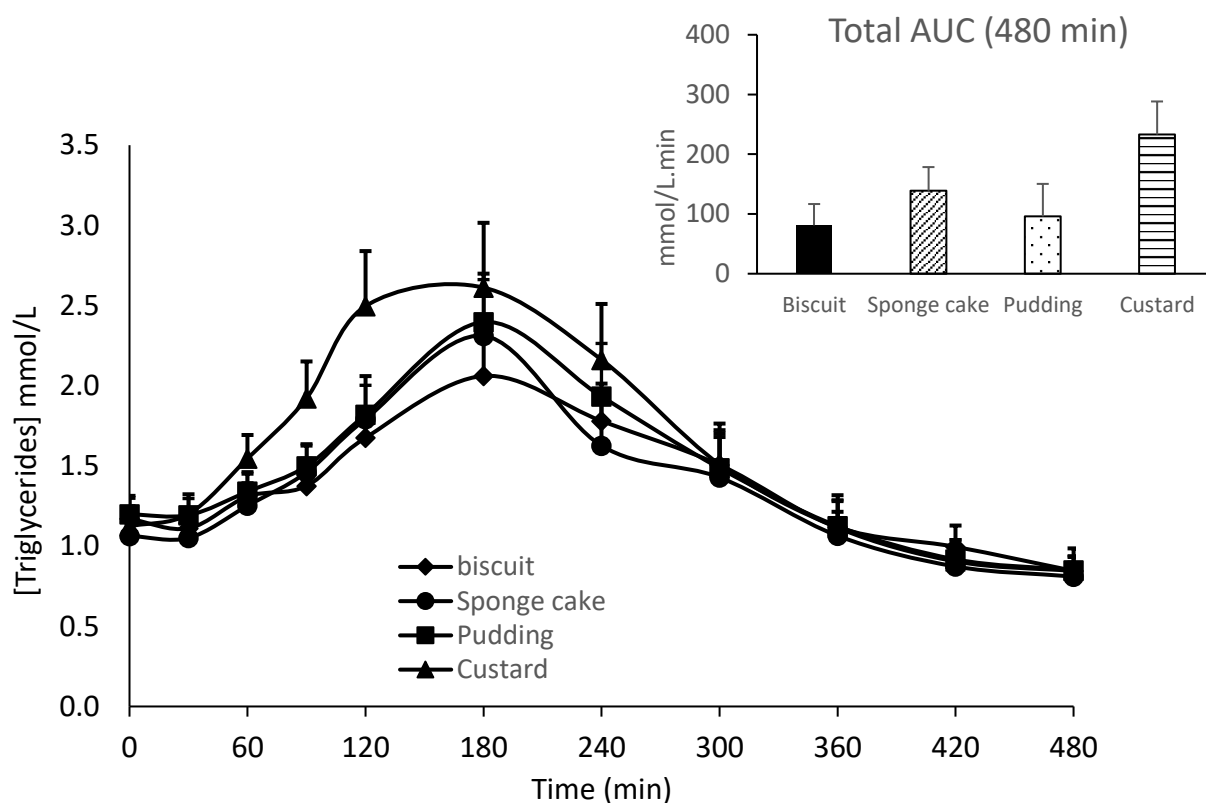


Figure 44 : Triglycerides concentrations (mmol/L) in plasma over the post prandial period and area under the curve (AUC, mmol/L.min) over the entire (480 min) post prandial period for the four tested matrices. Values are means \pm SEM, statistical analysis: 2 ways RM ANOVA for triglycerides concentrations and One way ANOVA for AUC.

III.4.5 DISCUSSION

The aim of the present work was to determine to which extent food structure could have an impact on folates bioavailability (folates appearance in plasma) in humans in vivo. Bioavailability of folates depends on many factors as detailed above (food or host related) (Brouwer et al., 2001; Naderi & House, 2018). Among all the factors capable to influence bioavailability, one of them is less studied and often confused with others: the nature of the food matrix structure in which the micronutrients are incorporated.

III.4.5.1 ASSESSMENT OF FOLATES BIOAVAILABILITY: OUR CHOICE FOR A SHORT-TERM STUDY

Even if a maximum of 1000 µg/d is generally considered as the maximum daily folates intake for adults to avoid any adverse effect, the RDI is settled at 330 µg/d for adults and 600 µg/d for pregnant women by European Food Safety Authority (EFSA, 2014). These recommendations should allow folates requirements to be covered *via* an adequate nutritional supply (Bailey & Gregory, 1999). To fit with the recommendations, various food naturally rich in folates are available (egg, milk products, cabbage...) as well as food products enriched with folic acid in several countries (Atta et al., 2016; Dwyer et al., 2015). Because increasing data suggest deleterious effects of oversupply of folates on health (Dolin et al., 2018; Hughes et al., 2013; Reynolds, 2016; Selhub & Rosenberg, 2016), an appropriate assessment of the quantity of folates available in plasma and a better knowledge of factors most capable to alter both bioaccessibility and bioavailability are key.

As discussed in the literature (Finglas et al., 2002; Gregory, 2001; McNulty & Pentieva, 2004), several methodologies exist to assess folates bioavailability: short term kinetics and long term studies. As the present work addresses the effect of food matrix on digestive processes and ultimately folates bioavailability, a short term protocol was most adapted and the area under the plasma response curve was used (Prinz-Langenohl et al., 1999). In order to obtain a significant increased and measurable area under the curve (these short-term studies are known to be relatively less sensitive techniques), 1 mg of folates was included in food matrices (i.e. the maximum recommended daily intake in Europe). This one shot ingestion of 1 mg of folates by our volunteers (4 repetitions over the experiment) did not have an impact on the basal fasted folate level of the volunteers over time (no period effect and a stable average of 3.97 ± 0.18 ng/mL in folate plasma concentrations in the fasted state). The post-prandial sampling covered the 8 hours post matrix ingestion to make sure that the absorption peak was not missed (Prinz-Langenohl et al., 1999). Using this methodology, and with non-significant differences in folates within the 4 matrices ingested, the Pudding and Sponge cake matrices allowed the most important increase in

plasma levels of total folates. From the analysis of the area under the curve, we have shown that the differences between the extremes AUC (Custard vs Pudding) reached 35.9% for AUC180 ($P < 0.05$) and 24.9% for AUC480 (NS). These differences are far from being marginal and show that the matrix structure is an important factor that could ultimately affect overall bioavailability of folate. To our knowledge, it is the first time that it is demonstrated that folates bioavailability could be significantly impacted by matrix structure alone without potential confounding factors such as macronutrients supplied and nature of folates present in matrices (these confounding factors being controlled and similar between matrices). Data exist in the literature, using the same AUC methodology, but comparisons were made using different quantities of the same food ingested (Prinz-Langenohl et al., 1999), matrices were different in macronutrients composition (Achón et al., 2011) or the nature of folates supplied (natural folates (partially polyglutamates) vs folic acid) were not similar (Carter, Monsivais, & Drewnowski, 2010). Consequently, the differences observed could come from the combined causes and not matrix structure only.

III.4.5.2 INTERACTION OF MATRICES STRUCTURE ON FOLATES AND OTHER NUTRIENTS/METABOLITES BIOAVAILABILITY

The choice of nature of folate (i.e. folic acid) supplementation in matrices from the present study was driven by two main reasons. The first one is that folic acid is known to be more resistant to heat treatment that is applied to some of the matrices we tested during food processing. The second reason is that folic acid is a monoglutamate that can be directly absorbed by brush border cells whereas polyglutamates (high fraction of natural folates) need to be first hydrolysed into monoglutamates before any absorption. The utilization of folic acid could then overcome the “host effect” associated with a potential variability between individuals to hydrolyse polyglutamates and focus more on “matrix effect” we wanted to selectively separate. At this point, it is important to mention that the four matrices tested contained flours (wheat and pea) and egg, that naturally contain folates (not necessarily folic acid) and could present a different kinetics of absorption and lower bioavailability compared to supplemented folic acid (Gregory, 2001). Yet, it is now clearly stated by experts in the field of folates dietary recommendations that natural food folates bioavailability is incomplete relatively to synthetic folic acid (McNulty & Scott, 2008). An assay of the naturally present folates in all matrices processed without folic acid supplementation showed that they represented about 3% of the overall supply of folates and cannot account for the differences of bioavailability observed between matrices and discussed below.

Knowing this, what interactions between folates (and in our particular case folic acid) and matrix structure could explain the fact that folates bioavailability was higher following Sponge cake and

Pudding ingestion compared to Biscuit and Custard. Direct interactions between food components and folates are hypothesized but rarely studied (Ohrvik & Witthoft, 2011). The measurement of urinary excretion ratios of labelled folic acid in urine relatively to the quantity ingested in humans showed a tendency for a higher ratio when folic acid is supplemented alone than when consumed after a light breakfast (Pfeiffer et al., 1997). Similarly, folate fortified skimmed milks presented a faster absorption than fortified whole milk (Achón et al., 2011). These data suggest interactions between folates and the rest of the meal or components of the meal that could limit its overall absorption. At the molecular level, interaction of folates with folate binding proteins (FBP) present in milk for instance have been shown to limit folate bioaccessibility in a model of gut *in vitro* (Arkbåge, Verwei, Havenaar, & Witthöft, 2003; Verwei, Arkbåge, Mocking, Havenaar, & Groten, 2004). In the case of Biscuit and Custard matrices from the present study, an overall lower AUC is observed in the post-prandial state. In the case of Biscuit, the folates plasma peak was delayed (Tmax delayed). These combined data suggest an alteration of digestive processes and a longer digestion time and folate release/uptake within the gut lumen. This can be due to several and maybe combined factors. An alteration of the digestive processes include 1/ altered mastication 2/ delayed gastric emptying 3/ lower accessibility of macronutrients to digestive enzymes in the matrix (Sensoy, 2014). The host related factors are 4/ alteration of transport systems of the folates in the gut or 5/ altered metabolic utilization of folates by metabolic activity of the volunteers.

Because all the volunteers were randomized, host related factors might not be the primary explanatory mechanism capable to explain the variable AUC observed. On the contrary, an altered mastication efficiency (to release folates within the liquid fraction of the bolus) may occur as well as different gastric emptying rates. Both components are known to be highly dependent on micro/macrostructure of the food as well as physical and chemical structure of food (Lentle & Janssen, 2010; McClements et al., 2009). In the case of Custard, it is clear that the lipids and proteins distribution within the matrix was different from other three matrices with small protein particles that are not detected in the other matrices (Figure 39). This particular structure may have allowed the Custard to reach the duodenum rapidly, without any additional need for matrix disruption/degradation within the stomach. Even if we had no access to the digestive processes of the matrices *in vivo*, the macronutrients degradation through the digestive processes can be hypothesized by the analysis of water or lipid soluble metabolites concentrations determined in plasma in the fed state. By inducing a large and significantly higher insulin peak as well as increased triglycerides AUC compared to other matrices, it is again highly probable that gastric retention time for Custard was very low and appearance within the duodenum and jejunum (sites of absorption of lipids, glucose and amino acids), rapid. The fact that glucose concentrations were

only transiently modified, and back to basal values within the first hour following matrices ingestion shows, as repeatedly demonstrated in the literature, the tightly controlled process of blood glucose regulation by insulin following a small meal ingestion. It can be then hypothesized that folates, such as other nutrients appeared very rapidly and in large quantities in the duodenum. This may have overflowed the capacities for folates entry into the cells leading to a loss of folates within the feces. Indeed, folates are absorbed *via* two systems: a specific saturable transport system (reduced folate carrier, RFC) at low folates concentrations ($>10\mu\text{mol/L}$) and passive diffusion at higher concentrations (Luka, 2008; Selhub, Powell, & Rosenberg, 1984). In our conditions, where RFC is probably saturated, folates may be absorbed mainly in a passive way. However, even if passive, the absorption may have reached its limits by the rapid flow of the bolus of Custard.

In the case of Biscuit, the story may be different because the low folate plasma concentrations observed and plasma folates profiles are consistent with the lowest alpha-amino N and triglyceride plasma concentrations and profiles observed within the first 3 hours following Biscuit ingestion. This observation suggests that Biscuit ingestion led to an overall less efficient and delayed digestion process resulting in a lower bioaccessibility of various nutrients/metabolites from the diet. A delayed gastric emptying, an entrapment of folates within the matrix, a decreased digestibility of proteins due to glycation and synthesis of Maillard reaction products may have delayed and reduced digestibility of a wider range of nutrients, including folates. This is in line with the continuous protein phase shown in Biscuit that may be less disrupted during the digestive process compared to Sponge cake and Pudding and may have entrapped the folates for a longer period of time over the digestive process, leading to a delayed bioavailability.

III.4.6 CONCLUSION

Our data show clearly that folates bioavailability and probably accessibility can be altered by food matrix alone. In the present study, highest folate availability was observed for Pudding and Sponge cake whereas the lowest was for the two matrix presenting extreme rheological properties: Custard (liquid) and Biscuit (hard solid). The analysis of plasma kinetics of other nutrients/metabolites showed that the reasons explaining the lower bioavailability of Custard and Biscuit are probably from different origins that could lie in a less overall efficient bioaccessibility of overall nutrients in the gut lumen for Biscuit and an overflow of absorption capacities specifically for folates in the case of Custard. The validation of these hypothesis could be done by an *in vivo* (in appropriate animal models) (Nau et al., 2019) or *in vitro* (Valerie Lechevalier et al., 2015) *via* a fine analysis of the disintegration of the food bolus in the mouth (Bonnet, Batisse,

Peyron, Nicolas, & Hennequin, 2018) and behaviour of the bolus (pH, size of particles, viscosity) within the stomach and the duodenum/ileum (Lentle & Janssen, 2010; Nau, et al., 2019).

Acknowledgements

This work was financially supported by Qualiment Carnot Institute, France; The authors thank J. David and M. Jarzaguet for technical assistance as well as the staff from UEN (F. Laporte, A. Caille, N. Lyon-Belgy, V. Pidou, D. Dumas and H. Parrot) for assistance during human experiments.

III.5 IMPACT DE LA STRUCTURE DES ALIMENTS SUR LA BIODISPONIBILITÉ DE LA VITAMINE B12

La vitamine B12 est une molécule hydrophile, cofacteur de réactions enzymatiques, et est de ce fait nécessaire à de nombreuses fonctions corporelles telles que la synthèse de l'ADN (Selhub et al., 1996) et de la gaine de myéline (Herbert, 2006). Une carence en vitamine B12 est donc associée à un risque accru de perte de la cognition (Morris, Schneider, & Tangney, 2006; Smith, 2008). L'absorption et le transport plasmatique de la vitamine B12 sont des phénomènes complexes, impliquant des protéines de liaison et de transport (Combs & McClung, 2017b). La prévalence des carences en vitamine B12 varie selon les pays mais peut atteindre 40 %, surtout chez les populations à risque (femmes enceintes, enfants et personnes âgées). De nombreux programmes de supplémentation visant à réduire ces carences ont été mis en place mais leur efficacité reste souvent à démontrer, plusieurs facteurs limitant l'absorption réelle de la vitamine B12. Notamment, un fort effet dose gouverne ce phénomène (Herbert, 1987).

L'holotranscobalamine (HTC) représente environ 20 à 30 % de la vitamine B12 plasmatique et correspond à la fraction biologiquement active. Le dosage de l'HTC seule ou en ratio de la vitamine B12 totale est discuté au sein de la communauté scientifique, comme marqueur réel de la biodisponibilité de la vitamine B12 (Allen, 2012; Garrod et al., 2008). En effet, une teneur sérique en vitamine B12 dans les limites basses (154 à 300 pmol/L) et donc classée comme « normale » pourrait en réalité masquer une déficience en vitamine B12 active (Čabarkapa, Stošić, Žeravica, Ilinčić, & Filipović, 2007).

III.5.1 MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les informations concernant le déroulement de l'étude clinique sont présentées en section III.2.

III.5.1.1 DOSAGE DE LA VITAMINE B12

III.5.1.1.1 Dans les matrices

Afin de déterminer la teneur en vitamine B12 dans les matrices, les échantillons congelés ont préalablement été réduits en poudre sous azote liquide. Après homogénéisation dans un tampon acétate (0,1 M, pH 4,6) et hydrolyse par une solution de papaïne à 100 mg/mL (Papain from papaya latex, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), les échantillons ont été incubés avec une solution de cyanide 1 % (Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, United States of America) à 60 °C pendant 1 heure en vue de leur cyanuration (Ortigue-Marty et al., 2006). La teneur en

vitamine B12 a ensuite été quantifiée par dosage radio-immunologique selon le protocole présenté en section III.5.1.1.2.

III.5.1.1.2 Dans le plasma

La teneur en vitamine B12 dans le plasma a été déterminée avant (à jeun) et durant les 8 heures suivant l'ingestion des matrices en utilisant un kit de dosage radio-immunologique (Simultrac B12/Folates SNB kit, MP Biomedicals, Eschwege, Germany) et un compteur gamma (kontron, Augsburg, Germany).

III.5.1.2 DOSAGE DE L'HOLOTRANSCOBALAMINE

Le dosage de l'holotranscobalamine a été effectué directement sur le plasma prélevé sur EDTA à l'aide d'un kit ELISA Human Holo-Transcobalamine (My Biosource, San Diego, USA).

III.5.1.3 ANALYSE STATISTIQUE PAR ANOVA

L'impact des facteurs *Matrice*, *Temps de digestion* et de leur interaction a été évalué par une ANOVA (ANalysis Of VAriance) à deux facteurs, puis l'impact du facteur *Matrice* a été analysé plus en détail par une ANOVA à un facteur à l'aide du logiciel R version 3.5.2. La normalité des résidus et l'homogénéité des variances ont été respectivement testés par un test de Shapiro-Wilk et de Brown-Forsythe. Les différences ont été considérées comme significatives au seuil de 95 %.

III.5.2 RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.5.2.1 TENEUR EN VITAMINE B12 DANS LES MATRICES

Les quantités théoriques d'enrichissement des matrices étaient fixées à 12 µg par portion. Comme montré dans la [Table 19](#), les quantités de vitamine B12 mesurées dans les matrices étaient soit égales, soit supérieures à la valeur cible, notamment pour la Crème et le Flan. Ce décalage entre la valeur théorique et la valeur mesurée peut être expliquée par l'incertitude associée aux quantités de vitamine B12 réellement apportées en raison du faible volume de solution de vitamine B12 (< 20 µL) utilisé pour compléter les matrices. Il pourrait également résulter d'une surestimation de la quantité de vitamine B12 lors du dosage qui fait intervenir un grand nombre d'étapes et pourrait entraîner un phénomène de concentration. Il est à noter que le kit utilisé pour le dosage de la vitamine B12 dans les aliments est un kit normalement utilisé pour les dosages de vitamine B12 dans le plasma. Par conséquent, un effet « matrice » n'est pas à exclure, même si ce kit est largement utilisé pour doser la vitamine B12 dans de nombreux échantillons tels que les tissus animaux (Ortigue-Marty et al., 2006). Cette surestimation ne peut pas provenir du contenu

initial des matrices en vitamine B12 puisque celui-ci a été estimé, par le biais des tables CIQUAL détaillant la composition des aliments, à 0,88 µg, provenant presque exclusivement de la poudre de blanc d'œuf (0,85 µg) (ANSES, 2017).

Table 19 : Teneur en vitamine B12 des matrices de l'étude clinique

Matrice	Teneur en vitamine B12 par portion (µg)
Biscuit	11,5 ± 0,3 (a)
Génoise	14,4 ± 1,0 (b)
Flan	16,6 ± 0,1 (bc)
Crème	19,4 ± 0,7 (c)

Les lettres différentes indiquent une différence significative entre matrices (P < 0,05).

Néanmoins, si l'on admet que les valeurs dosées sont justes, il semblerait que la vitamine B12 ait été dégradée lors des traitements thermiques au-delà de ce qui avait été estimé précédemment (section II.3.5.2). En effet, alors que l'apport en vitamine B12 était identique pour les quatre matrices, la teneur dosée est d'autant plus faible que le traitement thermique est intense. Ces résultats sont toutefois cohérents avec les tendances observées dans la littérature en ce qui concerne l'effet de la cuisson sur les concentrations en vitamines du groupe B dans les aliments, détaillé en section II.3.5.2, où des pertes de 30 à 45 % de la teneur en vitamine B12 avaient été observées selon l'aliment considéré (Nishioka et al., 2011; Prodanov, Sierra, & Vidal-Valverde, 2004; Riccio, Mennella, & Fogliano, 2006; Watanabe et al., 1998).

III.5.2.2 TENEURS PLASMATIQUES POSTPRANDIALES EN VITAMINE B12

Contrairement aux trois autres micronutriments, l'ingestion des matrices enrichies n'a pas entraîné d'augmentation notable de la concentration plasmatique en vitamine B12 chez les 12 volontaires (Figure 45), et ce quelle que soit la matrice considérée (ANOVA facteur Temps, p=0,96). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat.

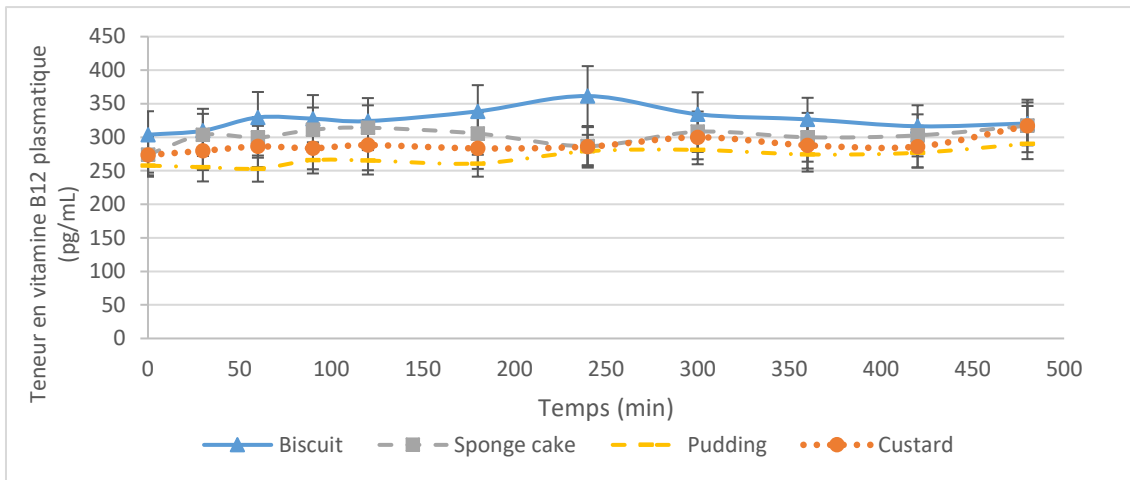


Figure 45 : Évolution de la teneur plasmatique en vitamine B12 postprandiale après ingestion des 4 matrices. Moyenne des cinétiques des 12 volontaires.

La première est liée au fait que les volontaires présentaient des teneurs basales en vitamine B12 dans la moyenne basse de la population, variant entre 257 et 303 pg/mL, la limite de référence basse étant fixée à 0,2 pmol/mL, soit 271 pg/mL (Arendt, Pedersen, Nexø, & Sørensen, 2013). Contrairement à beaucoup d'études portant sur la vitamine B12, qui sont réalisées sur des populations à haut risque de carence ou carencées telles que les personnes âgées, les femmes enceintes ou les végétariens/végétaliens (Millet, Guillard, Fuchs, & Klepping, 1989; Watanabe, Yabuta, Tanioka, & Bito, 2013), la cohorte étudiée ici n'était donc pas en situation de carence. Or, compte tenu des spécificités de l'absorption (intervention de protéines de transport et de liaison) et de la capacité de stockage hépatique de la vitamine B12, une augmentation notable de la teneur plasmatique après ingestion n'est peut-être observable que lorsque l'individu est en situation de carence. De plus, bien que validée lors d'une étude chez la femme enceinte (Dawson, Evans, Conway, & McGanity, 2000), la dose choisie pourrait également être trop faible pour entraîner une élévation de la teneur plasmatique notable chez des sujets sains. En effet, dans une étude récente sur modèle porcin, Bueno Dalto *et al.* ont observé des effets significatifs sur la teneur plasmatique basale à jeun après administration d'une dose deux fois supérieure à celle utilisée dans l'étude présente (Bueno Dalto, Audet, Girard, & Matte, 2018). Des résultats similaires ont été obtenus dans une autre étude au cours de laquelle les doses ingérées par les porcs atteignaient 47 à 86 µg (Matte, Guay, & Girard, 2012). Cependant, une supplémentation équivalente (12 µg) en bolus a montré une élévation des taux plasmatiques de vitamine B12 chez les femmes enceintes (Dawson *et al.*, 2000).

Une deuxième hypothèse pourrait être, à l'inverse, que la dose administrée était trop importante. Les transporteurs de la vitamine B12 auraient été rapidement saturés, égalisant la teneur plasmatique entre toutes les matrices (Carmel, 2008; Lildballe *et al.*, 2012; Matte, Guay, Le Floc'h,

& Girard, 2010). Cependant, dans ce cas, une brusque élévation de la teneur plasmatique aurait dû être observée dans les premiers temps de la cinétique.

Enfin, le fait d'avoir multi-supplémenté les matrices, notamment avec de la vitamine B9, pourrait également avoir modulé l'absorption de la vitamine B12, par des systèmes de rétrocontrôles (Hughes et al., 2013), les métabolismes des vitamines B9 et B12 étant liés (voir sections I.3.5.3 et I.3.6.3).

Des différences significatives entre les matrices ont toutefois été observées tout au long de la cinétique ($p=8.1 \times 10^{-5}$; Biscuit = c, Génoise = bc, Crème = ab, Flan = a), sauf à t0, où les teneurs plasmatiques des volontaires ne diffèrent pas selon la matrice considérée ($p=0.704$). La matrice contenant le moins de vitamine B12 (Biscuit) est ainsi celle qui induit la teneur plasmatique la plus élevée. A l'inverse, les deux matrices les plus riches en vitamine B12 (Crème et Flan) sont celles qui ont conduit aux teneurs plasmatiques les plus faibles. Bien que les différences soient faibles, ces résultats qui pourraient apparaître en première approche incohérents (corrélation inverse entre la teneur en vitamine B12 de la matrice et la teneur plasmatique pendant les 8 heures postprandiales), suggèrent un effet de la structure de la matrice sur la biodisponibilité de la vitamine B12. Aucune hypothèse n'a cependant pu être avancée pour expliquer ce phénomène, d'autant qu'on ne retrouve pas les tendances observées pour l'autre vitamine hydrosoluble de l'étude, à savoir la vitamine B9 (voir section III.4).

III.5.2.3 TENEURS PLASMATIQUES POSTPRANDIALES EN HOLOTRANSCOBALAMINE

Suite aux résultats peu concluants obtenus lors des dosages de vitamine B12 plasmatique, il a été envisagé de doser uniquement la forme biologiquement active de la vitamine B12 circulante, l'holotranscobalamine (HTC). Les dosages exploratoires réalisés sur les échantillons provenant des cinétiques des quatre matrices pour deux volontaires n'ayant cependant pas donné de résultats significatifs, cette étude n'a pas été poursuivie. Les résultats présentés ci-dessous concernent donc les données pour un seul volontaire.

Les teneurs en HTC plasmatique ne montrent pas non plus d'évolution significative après ingestion des matrices enrichies (Figure 46). Des hypothèses similaires à celles avancées pour la vitamine B12 totale pourraient expliquer ce résultat. La teneur basale de référence en HTC est en effet située entre 40 et 150 pmol/L (Nexo, Christensen, Hvas, Petersen, & Fedosov, 2002), soit 54 à 203 pg/mL. Or, les volontaires présentaient des teneurs sériques à jeun supérieures, d'environ

250 pg/mL. Cela aurait pu résulter d'une consommation d'aliments contenant de la vitamine B12 dans les 48 heures précédant l'étude (Nexo et al., 2002; von Castel-Roberts et al., 2007), mais les volontaires avaient pour consigne de suivre durant cette période un régime alimentaire pauvre en vitamine B12.

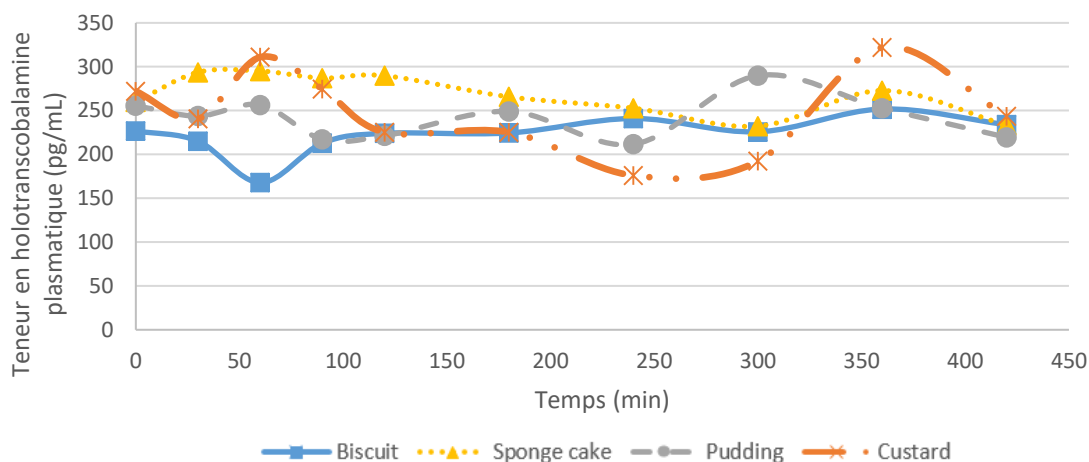


Figure 46 : Évolution de la teneur plasmatique en holotranscobalamine postprandiale après ingestion des 4 matrices. Données pour un volontaire.

III.5.3 CONCLUSION

Le dosage de la vitamine B12 plasmatique après ingestion des quatre matrices enrichies suggère effectivement un effet de la structure des aliments sur la biodisponibilité de ce micronutriment. Cependant, un tel effet nécessite d'être confirmé par de nouvelles études cliniques. Des niveaux d'enrichissement différents mériteraient ainsi d'être testés, de même qu'un enrichissement unique en vitamine B12, contrairement au multi-enrichissement testé dans l'étude présente, pour éviter des interactions potentielles avec la vitamine B9.

Par ailleurs, la carence en vitamine B12 concernant, comme mentionné précédemment, des populations spécifiques, il serait pertinent d'évaluer l'effet de la structure des aliments sur des cohortes de ce type. Si l'effet de la structure des aliments était alors démontré, cela pourrait permettre de formuler des recommandations nutritionnelles non seulement en termes de niveau de supplémentation, mais aussi d'aliments vecteurs pour une supplémentation efficace de ces populations à risque. Enfin, le taux de HTC circulant et/ou le ratio HTC/vitamine B12 seraient des indicateurs intéressants à suivre. L'HTC étant la forme biologiquement active de la vitamine B12, ce marqueur serait plus représentatif du potentiel effet biologique que l'on pourrait observer après absorption (Allen, 2012).

III.6 CONCLUSION

L'étude clinique réalisée au cours du projet MicroNut nous a permis de prouver l'impact de la structure des matrices alimentaires sur la biodisponibilité des micronutriments. Les résultats majeurs obtenus, présentés ci-dessous, fournissent ainsi une preuve de concept sur ce phénomène, auparavant démontré majoritairement dans le cas des macronutriments.

RESULTATS MAJEURS

- La structure des aliments module les cinétiques d'apparition des micronutriments dans le compartiment sanguin, et leur biodisponibilité.
- Les cinétiques de biodisponibilité dépendent du micronutriment considéré.
- Les différences observées semblent découler de mécanismes physiques de la digestion : vidange gastrique, cinétique et/ou intensité d'hydrolyse des macronutriments, etc.

Pour les vitamines B9, D et la lutéine, quelle que soit la matrice considérée, l'ingestion des matrices a entraîné l'augmentation des teneurs plasmatiques en micronutriments dans les 180 minutes suivant le repas. Un impact de la structure de la matrice sur les cinétiques d'absorption des micronutriments a également été observé pour ces trois micronutriments.

Pour la vitamine B9, cela se traduit par un retard du pic d'apparition de 43 minutes pour le Biscuit par rapport à la Génoise et au Flan. La teneur plasmatique en vitamine B9 est également plus élevée au moment de ce pic pour le Flan (25,5 ng/mL) comparée à la Crème (19,8 ng/mL) et au Biscuit (20,4 ng/mL).

En ce qui concerne la vitamine D et la lutéine, le pic d'apparition dans le plasma est également retardé pour le Biscuit (250 minutes) par rapport aux autres matrices (entre 202 et 215 minutes). La biodisponibilité totale de la vitamine D est la plus élevée avec la Génoise, en opposition avec le Biscuit. Au contraire, dans le cas de la lutéine, aucune différence de biodisponibilité n'a été observée entre les quatre aliments.

Il est raisonnable de penser que les différences observées quant à la biodisponibilité des micronutriments découlent de l'impact de la structure des aliments sur les mécanismes de la digestion. Dès la première étape de la digestion, à savoir la mastication, il est en effet bien établi que dans le cas des aliments solides, les caractéristiques structurales et texturales jouent un rôle clé dans le processus de fragmentation (Agrawal, Lucas, Prinz, & Bruce, 1997; Lucas, Prinz, Agrawal, & Bruce, 2002) et donc influencent la taille des morceaux entrant dans l'estomac (Peyron, Mishellany, & Woda, 2004). Ensuite, au niveau gastrique, la taille des morceaux mais aussi leurs caractéristiques propres (structure et microstructure interne, texture) ont un impact sur la diffusion des sécrétions gastriques (enzymes et acide chlorhydrique) (Singh, Ye, & Ferrua, 2015), leur fragmentation (Kong, Oztop, Singh, & McCarthy, 2013; Kong & Singh, 2009) et en ce sens sont également susceptibles d'influencer la cinétique et/ou l'intensité d'hydrolyse des macronutriments (Guo, Ye, Lad, Dalgleish, & Singh, 2014; Wooster et al., 2014). Or, ces paramètres de désintégration des aliments à l'étape gastrique pourraient moduler à la fois les cinétiques et les niveaux de libération des micronutriments dans le chyme et la vitesse de vidange gastrique (Barbé et al., 2013; Guo et al., 2015), et donc au final la vitesse d'absorption et la biodisponibilité de ces nutriments. Si on admet que la structure de l'aliment puisse ainsi influencer le déroulement de la digestion à l'étape gastrique, cela suggère que la digestion se trouverait également modifiée à l'étape intestinale, et des effets sur la vitesse de libération et le taux d'absorption des micronutriments pourraient donc également être observés.

À ce jour, de telles cascades mécanistiques ne sont qu'hypothétiques, même si ponctuellement établies (à tel ou tel niveau spécifique de la digestion), comme en témoignent les quelques publications mentionnées ci-dessus. C'est pour progresser dans la compréhension de ce processus long et complexe qu'est la digestion, et plus particulièrement pour pouvoir proposer des hypothèses à l'appui des observations faites quant à l'effet de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments, que des études de digestion *in vitro* ont été menées. Ces études ont mis en œuvre les mêmes matrices que celles utilisées lors de l'étude clinique présentée dans ce chapitre.

Chapitre IV. Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

IV.1	Introduction.....	164
IV.2	Étude en modèle de digestion <i>in vitro</i> statique	166
IV.2.1	Abstract	166
IV.2.2	Introduction.....	167
IV.2.3	Materials and methods	168
IV.2.4	Results and discussion.....	177
IV.2.5	Conclusions.....	191
IV.2.6	Supplementary materials	193
IV.3	Étude combinant un simulateur de mastication et un modèle de digestion <i>in vitro</i> dynamique paramétrés à partir de données recueillies chez l’homme.....	195
IV.3.1	Abstract	196
IV.3.2	Introduction.....	196
IV.3.3	Materials and methods	197
IV.3.4	Results and discussion.....	204
IV.3.5	Conclusion	217
IV.3.6	Supplementary material.....	218
IV.4	Suivi de la désintégration des matrices au cours des digestions <i>in vitro</i> en modèle dynamique par microscopie confocale	220
IV.4.1	Introduction.....	220
IV.4.2	Matériel et méthodes.....	220
IV.4.3	Résultats	221
IV.4.4	Conclusion	224
IV.5	Conclusion	225

IV.1 INTRODUCTION

Les résultats de l'étude clinique, présentés au chapitre précédent, confortent les données de la littérature quant à l'impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des nutriments, et plus particulièrement ici des micronutriments. Comme cela a déjà été rapporté pour quelques exemples, nous avons pu mettre en évidence des effets en termes quantitatifs (niveaux de biodisponibilité différents), mais aussi en termes qualitatifs (cinétiques d'absorption différentes). Cet impact de la structure de l'aliment est aujourd'hui bien établi dans le cas des macronutriments (Castaneda & Lee, 2019; Lorieau et al., 2018; Nayak, Berrios, & Tang, 2014; Nyemb et al., 2016), mais les études sont moins nombreuses pour ce qui concerne les micronutriments, du moins celles permettant de dissocier clairement l'effet structure de l'effet composition. Mais dans tous les cas, si l'hypothèse générale est que la structure de l'aliment influe sur le déroulement de la digestion, les mécanismes impliqués restent largement incertains.

C'est pour explorer plus avant ces mécanismes que les mêmes matrices alimentaires que celles utilisées pour l'étude clinique ont été soumises à des protocoles de digestion *in vitro*. Par ces études *in vitro*, il est en effet possible d'accéder aux différentes phases de la digestion (phases orale, gastrique et intestinale) et de réaliser des prélèvements en cinétique au cours de chacune de ces étapes. L'objectif était donc d'étudier les cinétiques de digestion *in vitro* des macronutriments et leur impact sur la libération des micronutriments, afin d'identifier quelles caractéristiques de l'aliment et/ou quelles étapes de la digestion permettent d'expliquer les différences observées *in vivo*.

QUESTIONS DE RECHERCHE

- Quel est l'impact de la structure des aliments sur les cinétiques de désintégration de la matrice et d'hydrolyse des macronutriments au cours de la digestion ?
- La structure des aliments impact-t-elle également les cinétiques de libération et la bioaccessibilité des micronutriments ?
- Quelles sont les étapes de la digestion les plus discriminantes entre les matrices quant à leur désintégration et/ou la libération des micronutriments ?

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

Deux modèles de digestion *in vitro* ont été utilisés pour répondre à ces questions. Par le biais d'un modèle statique issu d'un consensus au sein de la communauté scientifique (modèle INFOGEST), une première étude de screening des quatre matrices a été réalisée afin de confirmer l'existence de différences dans leur comportement au cours de la digestion. Seuls deux micronutriments ont été suivis au cours de cette étude : la lutéine (lipophile) et la vitamine B9 (hydrophile).

Une seconde étude mettant en œuvre un modèle de digestion *in vitro* dynamique, plus proche des conditions physiologiques que le modèle statique, a ensuite été conduite afin d'explorer de manière plus réaliste les mécanismes impliqués dans la digestion des aliments. Seules trois matrices ont été soumises à ce protocole de digestion, à savoir le Biscuit, la Génoise et la Crème, en raison de la lourdeur et du coût de ces expérimentations et compte tenu du fait que le Flan et la Crème ont conduit à des résultats similaires lors de l'étude en digestion *in vitro* statique. Les matrices étaient dans ce cas préalablement soumises à une mastication *in vitro* à l'aide d'un simulateur (AM²) paramétré sur la base des données de mastication recueillies lors de l'étude clinique présentée dans le chapitre précédent. Le digesteur dynamique (DIDGI®) était également paramétré sur la base de données *in vivo* issues de la littérature. Seul le devenir de la lutéine et de la vitamine D au cours des digestions *in vitro* dynamiques sera présenté ici. Les résultats de l'étude clinique n'avaient en effet pas permis d'obtenir des cinétiques d'absorption « convaincantes » concernant la vitamine B12 qui n'a donc pas été suivie au cours des expérimentations de digestion *in vitro*. Par ailleurs, la vitamine B9 a été suivie au cours de cette étude mais les résultats étant incohérents, ils n'ont pas été exploités dans ce manuscrit. Ces études ont donné lieu à l'écriture de deux articles scientifiques (respectivement soumis et en préparation) qui composent les deux premières sous-parties de ce chapitre.

IV.2 ÉTUDE EN MODÈLE DE DIGESTION *IN VITRO* STATIQUE

Cette partie est basée sur l'article scientifique suivant :

In vitro digestion of complex foods: how the microstructure influences food disintegration and micronutrient bioaccessibility

Hiolle M.^a, Lechevalier V.^a, Floury J.^a, Boulier-Monthéan N.^a, Prioul C.^b, Dupont D.^a, Nau F.^{a,*}

^a STLO, INRA, AGROCAMPUS OUEST, 35042, Rennes, France

^b Liot SAS, 86450, Pleumartin, France

* Corresponding author: francoise.nau@agrocampus-ouest.fr

Soumis à Food Research International. Manuscrit révisé déposé le 18.09.2019.

Keywords

In vitro digestion; Digestion pathways; Microstructure; Nutrient release; Macronutrient hydrolysis; Micronutrient bioaccessibility; Food disintegration

Highlights

- Complex foods with identical composition but different microstructures were designed
- Food structure strongly influences both the kinetics and final extent of lipid digestion
- The key moments of digestion are highlighted by multidimensional statistical analysis
- The food structure impacts on the micronutrient bioaccessibility
- This impact depends on the hydrophilicity vs hydrophobicity of the micronutrient

IV.2.1 ABSTRACT

Digestion is a mechanical and chemical process only partly understood, and even less so for complex foods. Especially, the issue of the impact of food structure on the digestion process is still open. In this study, the fate of four micronutrient-enriched foods with identical composition but various microstructures (Custard, Pudding, Sponge cake, Biscuit), was investigated using the 3-phase *in vitro* model of human digestion, developed by the INFOGEST network. Matrix

disintegration and hydrolysis of macronutrients (proteins, lipids, and carbohydrates) were monitored during the three phases of digestion using biochemical techniques, size-exclusion chromatography, thin-layer chromatography, and gas chromatography. Micronutrient release (vitamin B9 and lutein) was monitored using reverse-phase chromatography. Food structure did not greatly influence the macronutrient hydrolysis, except lipolysis that was four-times higher for Biscuit compared to Custard. However, the bioaccessibility of both micronutrients depended on the food structure, and on the micronutrient. Vitamin B9 release was faster for Biscuit and Sponge cake during the gastric phase, while lutein release was higher for Custard during the intestinal step. Extensive statistical analysis highlighted the impact of food structure on the digestion process, with different digestion pathways depending on the food matrix. It also permitted to characterise the gastric step as mainly a macronutrient solubilisation phase, and the intestinal step as mainly a hydrolysis phase.

IV.2.2 INTRODUCTION

Food disintegration during digestion is a complex process and despite it has been thoroughly studied, it still contains some gaps of knowledge. Digestion provides nutrients to the body through the release of molecules in the gastrointestinal tract, for further absorption. If the nutritional quality of food was based for a long time on its nutrient profile, this vision no longer applies since the matrix effect has been proven in many studies. Thus, the food matrix structure can modulate the glycaemic response (Haber et al., 1977), satiety (Moorhead et al., 2006) or the glycaemic index (Granfeldt et al., 1991), highlighting its impact on carbohydrate digestion. With respect to proteins, the rate of amino acid absorption was shown depending on the mode of milk gelation (rennet or acidic gels) (Barbé et al., 2014), and the structural properties of egg white gel impacted the nature and kinetics of peptide release (Nyemb-Diop et al., 2016). Similarly, technological treatments of fat, such as emulsification or homogenization, can modulate chylomicron absorption and fatty acid metabolism (Gabert et al., 2011). These studies therefore suggest that, at constant composition, the organization of nutrients within the food directly can affect the digestion process (nutrient bioaccessibility and bioavailability) with potential metabolic consequences. Therefore, understanding the fate of foods during digestion is necessary to know how they affect metabolism (Jacobs & Tapsell, 2007).

Moreover, the food matrix structure can influence micronutrient release. Lutein bioaccessibility increased by about 10% after a previous enzymatic step aiming food structure disruption (Castenmiller et al., 1999). A greater increase in plasma folate levels was also observed after consumption of crushed spinach leaves compared to whole spinach (van het Hof et al., 1999).

However, in most of the studies reported, the food structure is not the only factor that differed between the tested foods, and then likely able to influence the bioaccessibility of micronutrients. Especially, food composition was not constant and could therefore be involved, besides the structure effect (de Pee & West, 1996). In the present study, we focused on the only effect of food structure on food disintegration and micronutrient release, independently of food composition.

The food structure plays a key role from the beginning of food ingestion with the chewing step (in case of solid foods) which impacts the particle size of the food bolus (Peyron, Mishellany, & Woda, 2004). Food density, texture and microstructure are also critical for particle fragmentation and hydrolysis in the gastric phase (Dekkers, Kolodziejczyk, Acquistapace, Engmann, & Wooster, 2016). This could modulate the gastric emptying, leading to difference of nutrient absorption kinetics in the intestine (Kong & Singh, 2008). Furthermore, in the stomach and small intestine compartments, the viscosity and the structure and size of solid particles may affect the enzyme diffusion into the chyme and enzyme accessibility to the substrate, impairing its activity (Blazek & Gilbert, 2010).

In order to investigate the impact of food structure on the digestion process, including an access to each digestion step (oral, gastric, intestinal), an *in vitro* static digestion model, developed by the INFOGEST network, was used (Minekus et al., 2014). The novelty of the present study relies on that complex and realistic foods that only differed in structure, texture and water content, were studied, and that kinetics of macronutrient hydrolysis (proteins, carbohydrates, and lipids) as well as micronutrient release from the matrix were recorded. For this purpose, four micronutrient-enriched food matrices were designed, with identical composition on dry matter. Moreover, Principal Component Analysis and Multiple Factor Analysis were performed to deal with the complexity of the dataset obtained and were in this way a useful tool to study kinetic phenomena (Lechevalier et al., 2015).

IV.2.3 MATERIALS AND METHODS

IV.2.3.1 INGREDIENTS AND REAGENTS

The foods were formulated with wheat flour (Francine T45, Grands Moulins de Paris, Ivry Sur Seine, France), extruded dehulled pea flour (Sativa 32/100, Sotexpro, Bermericourt, France), powdered sugar (Saint-Louis Sucre, Paris, France), sunflower oil (Lesieur, Asnières-sur-Seine, France), standard pasteurized egg yolk and granulated pasteurized egg white powders (Liot, Pleumartin, France) and sterilized water. Vitamin B9 (folic acid) was supplied by Nutrilo GmbH (ref 05-050, Cuxhaven, Germany) as pure powder. A homogeneous dispersion of lutein was prepared

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

from capsules provided by Diet Horizon (ref 2779, Bordeaux, France) and containing about 20 mg lutein suspended in sunflower oil; its concentration was determined by spectrophotometry at 445 nm.

All reagents, unless specified otherwise, were provided by Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) and were of analytical grade.

IV.2.3.2 PREPARATION OF FOODS

Four foods enriched with vitamin B9 and lutein were produced according to the flowcharts and composition presented in [Figure 47](#). Kneading, whisking, mixing steps and heat treatment for Custard were operated with a kitchen robot Thermomix® TM5 (Vorwerk, Wuppertal, Germany). Biscuit, Sponge cake and Pudding (solid foods) were cooked using a semi-professional convection oven (De Dietrich, Niederbronn-Les-Bains, France). On dry matter, the foods were all composed of 17% proteins, 52% carbohydrates, and 30% lipids. Food lipid content was controlled by lipid weighing after Folch extraction and protein content by Kjeldahl method (data not shown). Custard (liquid food) was prepared as a packed-powder for rehydration and heating at the time of use. Pudding, Sponge cake, and Biscuit were stored at -20°C until use and then defrosted at room temperature.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

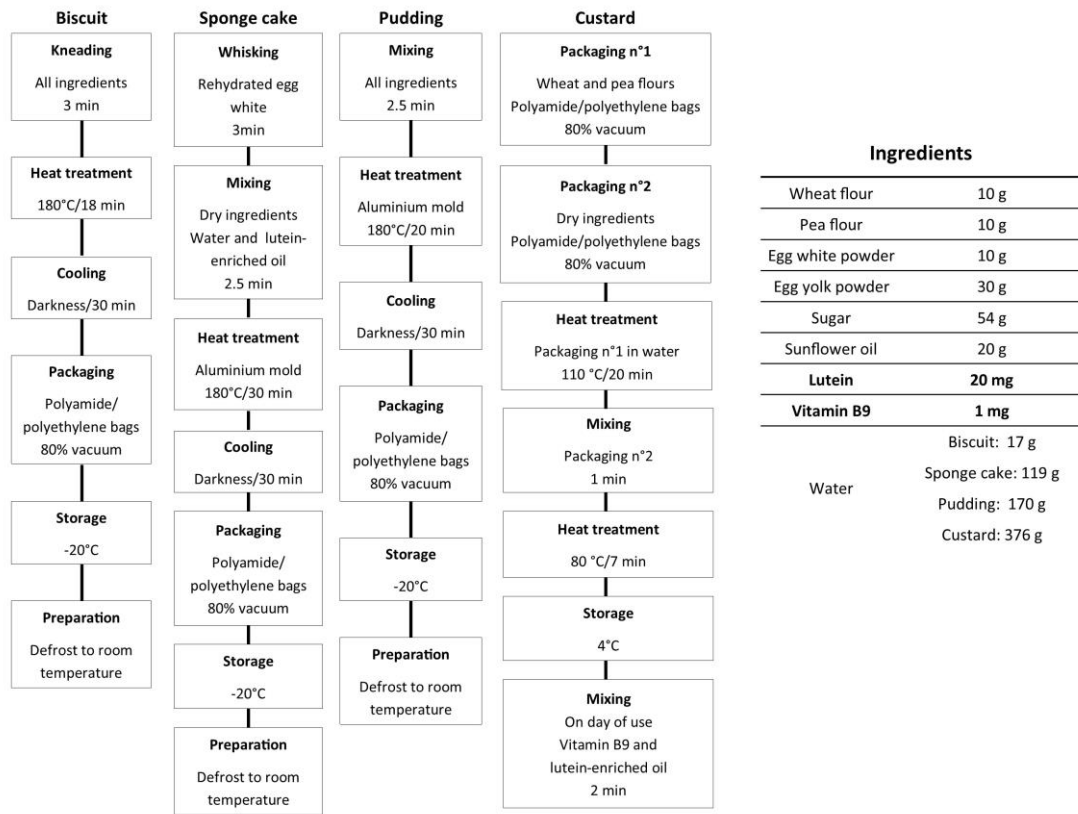


Figure 47 : Production flowcharts and food composition.

IV.2.3.3 CONFOCAL MICROSCOPY AND IMAGE ANALYSIS

For Biscuit, 300 µm thick cryosections mounted in OCT (Optimal Cutting Temperature) compound were transferred onto glass slides. For Sponge cake and Pudding, 300 µm thick microsections mounted in paraffin were cut and transferred onto glass slides. CLSM observation was performed using a ZEISS LSM 880 inverted confocal microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) set at the magnification 20× (Plan Apochromat objective, dry, NA 0.80). The protein network and fat components were stained using a 1% (w/v) Fast Green aqueous solution and a 0.1% (w/v) Nile Red 1,2-propanediol solution, respectively (Sigma Aldrich, St Louis, USA). Both fluorescent solutions were first mixed at a ratio 1:4. Then 10 µL of this mix was either deposited on the surface of the slice for the solid matrices, or directly added to 100 µL of the Custard, and vortexed. The samples were held at 20 °C for at least 10 min to permit the diffusion of the fluorescent dyes into the solid matrices. One drop of the labelled Custard was deposited on a glass slide. A cover slip sealed with an adhesive frame (Geneframe, ABgene House, UK) was then added on the top of the four different product slices, before observation using 488 and 633 nm excitation wavelengths in sequential beam fluorescent mode, for fat and protein detection respectively, at a 1.32 µm pixel

dwelling scanning rate. Red Nile and Fast Green were detected using a GaAsP between 500 and 585 nm and a PMT between 635 and 735, respectively. Micrographs had a resolution of 0.15 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ and were recorded in the samples at a constant depth of 10 to 15 μm from the glass slide. Images shown in this paper correspond to superimpositions of images of the same area observed separately with the two markers, with proteins coded in green and fat in red. Aqueous phase and any gas bubbles in the slices may appear as black holes in the micrographs. There were at least two samples of each product, and for each sample at least 16 micrographs were recorded. The micrographs presented in [Figure 49](#) were considered to be representative of the different product samples.

Confocal micrographs of the Red Nile stained lipid droplets of the different matrices (channel 2) were converted to binary images using the “Otsu” thresholding algorithm of Fiji-win64 software (Image J 1.51n, National Institute of Health, USA). The segmentation procedure was validated by visual comparison of the resulted binary image with its original image. The particle areas and perimeters were measured using the Analyze Particles measurements tool (in μm^2) and the generated data were analysed according to Bornhorst, Kostlan, & Singh (2013). For each product, the cumulative lipid droplet area was calculated for each image, for each predetermined particle size. The cumulative area percentage covered by lipid droplets was then plotted against particle area in order to determine the median particle area.

IV.2.3.4 *IN VITRO* STATIC DIGESTION

In vitro digestions were carried out according to the standardized INFOGEST protocol (Minekus et al., 2014). Triplicates were performed on three batches of each food prepared independently and randomized. The enzymatic activities of individual enzymes and pancreatin, as well as the bile salt concentration in the bovine bile extract were determined according to Minekus et al. (2014).

Foods were either defrosted (Biscuit, Sponge cake or Pudding) or prepared (Custard) before digestion. Water content differences between the foods were offset by water addition up to the Custard water content, so that the digestion proceeds at constant enzyme-to-dry matter ratio for all the foods. For solid foods, a preliminary step of chewing simulation was applied using a stomacher during 2 cycles of 30 s at 380 rpm (Mixwel +, Awel Microbiology). Custard was not subjected to mastication due to its liquid texture.

After chewing, the protocol was the same for all matrices. Oral bolus was prepared by mixing 7.98 g of the liquid or masticated and diluted foods with 2.58 mL of pure liquid human saliva (Lee Biosolutions 991-05-P, amylase activity of 356 U/mL), and was incubated for 2 min at 37 °C in a water bath under constant stirring at 80 rpm.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

Thereafter, the oral bolus was mixed with 8.45 mL simulated gastric fluid (SGF), 5.3 μL of 0.3 M CaCl_2 , 500 μL of 1 M HCl (to adjust pH to 3), and 610 μL distilled water. After addition of 1 mL porcine pepsin solution made up in SGF (42,264 U/mL; Sigma P6887), the solution was incubated for 2 h at 37°C under stirring at 80 rpm. The composition of all electrolyte solutions was based on the literature (Minekus et al., 2014). Intestinal digestion immediately started by adding 8.45 mL simulated intestinal fluid (SIF), 42.3 μL of 0.3 M CaCl_2 , 50 μL of 1M NaOH (to adjust pH to 7), 176.4 μL distilled water and enough bile extract solution (Sigma B3883) to obtain 10 mM bile salts in the final digestion volume. After addition of 8.45 mL pancreatin solution made up in SIF (500 U/mL of trypsin activity, Sigma P7545), the solution was incubated for 2 h at 37°C under stirring at 80 rpm.

During each digestion, samples were taken at the beginning of oral phase (just after saliva addition; sample S0) and at times 0, 30, and 120 min during gastric and intestinal phases (samples G0, G30, G120 and I0, I30, I120, respectively). Ten μL Pepstatin A solution (0.5 mg/mL in methanol; Sigma P5318), and 50 μL Pefabloc solution (0.1 M in distilled water; Sigma P76307) were added per mL of digesta in gastric and intestinal samples, respectively, to stop proteolysis; 50 μL of 4-bromophenylboronic acid (0.1 M in methanol, Sigma B75956) were added per mL of digesta to inhibit lipolysis. All samples were centrifuged at 1,000g at 4°C for 5 min; both supernatants were collected (oil and aqueous phases), vortexed to form an emulsion, henceforth referred to as digesta, and stored at -80 °C until further analysis.

IV.2.3.5 PHYSICOCHEMICAL ANALYSIS

IV.2.3.5.1 Protein analysis and proteolysis

Nitrogen and Free primary amino group quantification

The total nitrogen content of the digesta was determined by micro-Kjeldahl method (Miller & Houghton, 1945). The rate of proteolysis during digestion was assessed by measuring the free primary amino groups in the soluble fraction of digesta using the o-phthaldialdehyde (OPA) spectrophotometric assay in microplate (Darrouzet-Nardi, Ladd, & Weintraub, 2013).

Molecular weight distribution of the soluble fraction of digesta

The molecular weight distribution of the soluble peptides released during digestion was determined by Size Exclusion Chromatography (SEC). Digesta were diluted in phosphate buffer (50 mM, pH 7, 0.2M NaCl) and filtered through 0.2 μm pore-size filters before injection onto a BioSep-SEC-S2000 Phenomenex column connected to a Waters e2695 separation module equipped with a Waters e2489 UV/Visible detector (Waters Inc., Milford, USA). Elution was

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

performed under an isocratic 0.8 ml/min flow of phosphate buffer (50 mM, pH 7, 0.2M NaCl) at 37°C, with detection at 214 nm. Preliminary calibration of the chromatographic system with seven molecular weight markers (bovine thyroglobulin, 670 kDa; IgG from human gamma globulin, 150 kDa; ovalbumin, 44 kDa; myoglobin, 17 kDa; cytochrome from horse heart, 12.38 kDa; aprotinin, 6.51 kDa; angiotensin II human, 1.05 kDa) allowed quantifying the proportion of proteins or peptides (corresponding to the Area Under the Curve (AUC)) in seven molecular weight ranges: >100kDa, 100-50 kDa, 50-25 kDa, 25-10 kDa, 10 -5 kDa, 5-1 kDa and <1 kDa, respectively called classes 1 to 7.

IV.2.3.5.2 Amylolysis characterization

Amylolysis was determined as the quantity of oligosaccharides (polymerization degree of 10 or less) solubilized in the digesta, and estimated as previously described by Freitas & Le Feunteun (2019) .

IV.2.3.5.3 Lipid analysis and lipolysis

Free fatty acid quantification

Lipids from digesta were extracted according to the Folch method, acidified with 160 µL of 0.1M HCl (Folch et al., 1957). Free fatty acids (FFA) were isolated using a solid-phase extraction column (Macherey-Nagel 730033G), and then methylated with BF₃ (14% in methanol) at 70°C for 15 min. Fatty acid methyl esters (FAME) were extracted with pentane and analysed on an Agilent gas chromatograph (7890A) equipped with a BPX70 capillary column and coupled to a flame ionization detector (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Components were identified according to the retention time of authentic FAME standards. FFA concentrations were calculated using an internal standard (80 µg of C17). The lipolysis degree was expressed as the percentage of FFA released at a given time versus the total quantity of FA digested. For this purpose, total lipids from foods were extracted and analysed as described above.

Quantification of lipid classes

The lipid classes (extracted from digesta) were separated on silica thin layer chromatography (TLC) using hexane:diethyl ether:acetic acid (70:30:1, v:v) as eluent. The lipid bands were visualized by spraying the plates with a 10% (w/v) cupric sulfate solution in 8% (w/v) orthophosphoric acid and heating for 10 min at 150°C. After scanning using a Labscan (GEHealthcare, ImageScanner III), the band density was estimated by using Image J software. Six classes were separated: Triglycerides

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

(TAG), Free Fatty Acids (FFA), Cholesterol (CHOL), Diglycerides (DAG), Monoglycerides (MAG) and Phospholipids (PL). Thus, lipolysis could be estimated prior to the ultimate stage of FFA.

Total lipid quantification

The total acyl chains present in residual glycerides (henceforth referred as Total lipids) were quantified from digesta by using a Biomérieux kit (Craponne, France).

IV.2.3.5.4 Vitamin B9 quantification

Vitamin B9 was extracted from digesta with a single-use folic acid immunoaffinity column (R-biopharm P81B). Subsequently, the column was washed with 10 ml distilled water before the vitamin was eluted with first 1 mL of an acetonitrile:trifluoroacetic acid (30%:0.2% v:v) solution, then 1 mL distilled water. The two eluates were pooled together in an amber vial and analysed for vitamin B9 quantification by RP-HPLC using a ThermoScientific system (Dionex Ultimate 3000) equipped with a Symmetry C18 column (150 × 2.1 mm particle size 5 µm, Waters) and a UV spectrophotometer (Dionex Ultimate 3000). A 29 min gradient was applied with solvent A (trifluoroacetic acid 0.1%) and solvent B (acetonitrile + trifluoroacetic acid 0.1%). Gradient conditions were initially 12% B for 2min, increased linearly to 20% B over 2min, holding for 5 min, then increased linearly to 75% B over 1 min, holding for 4 min and returning to 12% B in 15 min. The flow rate was 0.2 mL/min, column temperature 30°C, and injection volume 100 µL. Absorbance was measured at 280 nm and vitamin B9 was quantified using an external calibration curve.

IV.2.3.5.5 Lutein quantification

Lutein was extracted from digesta according to Kopec, Gleize, Borel, Desmarchelier, & Caris-Veyrat (2017). Then, extracts were dissolved in 50 µL dichloromethane and 50 µL methanol for lutein analysis by RP-HPLC using a Thermo Fisher system (Finnigan Surveyor) equipped with a C18 column (250 × 4.6 mm, particle size 5 µm, Grace/Vydac 201TP) and a photodiode array detector (PDA Plus Detector). The composition of solvents was (A) methanol:ammonium acetate 0.05M (80:20, v:v), (B) acetonitrile:distilled water (90:10, v:v) and (C) pure ethyl acetate. Gradient conditions were initially 100% A, increased linearly to 100% B in 2 min, then to 100% C in 22 min, returning to 100% B in 2 min, then to 100% A in 4 min. The flow rate was 1 mL/min and column temperature 25°C.

Absorbance was measured at 445 nm. Lutein and echinenone were quantified using external calibration curves generated from authentic standards (Sigma 07168 and 73341, respectively).

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

Due to the tendency of lutein to degrade under experimental digestion conditions (acidic pH and heat), quantification was performed on both supernatant and total sample at each sampling time (Kopeck et al., 2017). The lutein bioaccessibility was expressed as the percentage of lutein released in the supernatant at a given time versus the total quantity of lutein present in the whole sample at the same given time.

IV.2.3.6 STATISTICAL ANALYSIS

From the analyses described above, a dataset of 21 columns (21 variables described in [Table 20](#)) and 84 rows (84 samples) was obtained.

Table 20 : Details and meaning of variables obtained from supernatant analysis.

Nutrients	Variables	Analysis performed	Result expressed (and meaning)
Micronutrients	Vitamin B9	Reverse phase HPLC	Quantity of vitamin B9 released in the supernatant (bioaccessibility)
	Lutein	Reverse phase HPLC	Ratio of lutein released in the supernatant/total lutein (bioaccessibility)
Carbohydrates	Oligosacc.	UV-visible absorbance	Quantification of oligosaccharides released in the supernatant (degree of amylolysis)
Lipids	Total lipids	UV-visible absorbance	Quantification of total acyl chains solubilised in the supernatant (food disintegration)
	Degree of lipolysis	Gas chromatography	Ratio of free fatty acids released in the supernatant/total fatty acids (degree of lipolysis)
	TAG, FFA, DAG, MAG, PL, CHOL	Thin layer chromatography	Relative content of each lipid class (lipolysis kinetics)
Proteins	Total nitrogen	Kjeldahl quantification	Total quantity of nitrogen solubilised in the supernatant (food disintegration)
	AminoGroup	OPA quantification	Free amino group release in the supernatant (degree of proteolysis)
	Classes 1 to 7	Size Exclusion Chromatography	Quantity of peptides in each size class released in the supernatant (size distribution of peptides)
	AireTot	Size Exclusion Chromatography	Total quantity of peptides in the supernatant (degree of proteolysis)

IV.2.3.6.1 ANOVA

ANOVA tests were used to determine the impact of matrix, time and their interaction on each variable. Linear model procedure of R was applied to determine R^2 and p-value of the following modelling: $Y = \text{Matrix} + \text{Time} + \text{Matrix} * \text{Time}$. Differences were considered significant at minimum level of 95%. Residual normality and variance homogeneity were tested for each variable using a Shapiro-Wilk test and a Brown-Forsythe test (R Development Core team, 2007), respectively.

IV.2.3.6.2 Principal component analysis

A Principal Component Analysis (PCA) was performed on the whole data set to highlight the correlations between the variables and to characterize the evolution of the four foods along digestion in view of these variables. PCA and all the following statistical analyses were performed using the FactoMineR package of the R software 3.5.2 (Lê, Josse, & Husson, 2008 ; R Development Core team, 2007). "Digestion time" was added as supplementary variable. The variables were automatically standardized (mean centred and scaled) by the software to give them all the same importance.

IV.2.3.6.3 Hierarchical clustering analysis

Hierarchical clustering analysis (HCA) is a statistical method designed to highlight the similarities between individuals. It creates clusters of alike individuals by maximizing the differences inter-clusters and minimizing those intra-clusters. HCA was performed on the results of PCA, using the Ward's method for hierarchical clustering with the Euclidean distance as a similarity measure. Only the five first principal components were taken into account to suppress the noise contained in the last principal components.

IV.2.3.6.4 Multiple factor analysis

To overcome the digestion time effect, a Multiple Factor Analysis (MFA) was carried out. Briefly, variables were separated into subgroups depending on digestion time and a PCA was performed on each of these subgroups (see Supplementary materials 2). Results of all these PCA were then represented in a common space that allows to compare them (Valerie Lechevalier et al., 2015).

IV.2.4 RESULTS AND DISCUSSION

IV.2.4.1 FOOD PROCESSING GENERATED STRONG DIFFERENCES IN MACRO AND MICROSTRUCTURES OF THE FOUR FOODS

The differences in processing conditions and water content (Figure 47) resulted in four foods differing by their macroscopic aspect. The Biscuit was a very dry and brittle product. The Sponge Cake was an airy, soft, and dry gel. The Pudding consisted in a humid and compact gel. Finally, the Custard was a thick liquid (Figure 48).



Figure 48 : Macroscopic images of the four foods: Biscuit, Sponge cake, Pudding and Custard (from left to right).

Confocal microscopy images of the four foods showed a uniform green background with Biscuit, Sponge cake and Pudding, suggesting a continuous protein phase in these three foods. It was expected that protein and starch should be the main components of the molecular network of these solid foods. However, the protein phase seems disrupted in several locations in the Sponge cake and Pudding structures, likely due to a non-homogenous mixing. In Custard, small particles of about 50 μm diameter can be seen, which suggested protein aggregation.

With regard to the lipid phase, Custard and Biscuit contain bigger lipid droplets than Sponge cake and Pudding, in which lipids are more diffuse. However, lipids are very globular in Custard whereas puddles of fat are present in Biscuit. The bigger apparent size of lipid droplets for Biscuit is in line with the distribution of lipid droplet area (Figure 49E). With regard to Custard, despite some large lipid droplets exist, most of lipid droplets are much smaller (around 10 μm diameter), thus explaining that Custard had the lowest median area of lipid droplets amongst the four foods. Sponge cake and Pudding are intermediate with regard to median area of lipid droplets. The b constant, indicative of distribution spread, follows the opposite trend of the medians: it is greater in Custard (1.08), followed by Pudding (0.46), Sponge Cake (0.38) and then Biscuit (0.25). Then, Custard has the narrowest size distribution. Therefore, despite the few large lipid droplets observed on confocal images, Custard is in fact mainly composed of very small droplets. Biscuit has the widest size distribution and therefore presents both large and small droplets. As a conclusion, the four designed foods strongly differ in both microstructure and macrostructure.

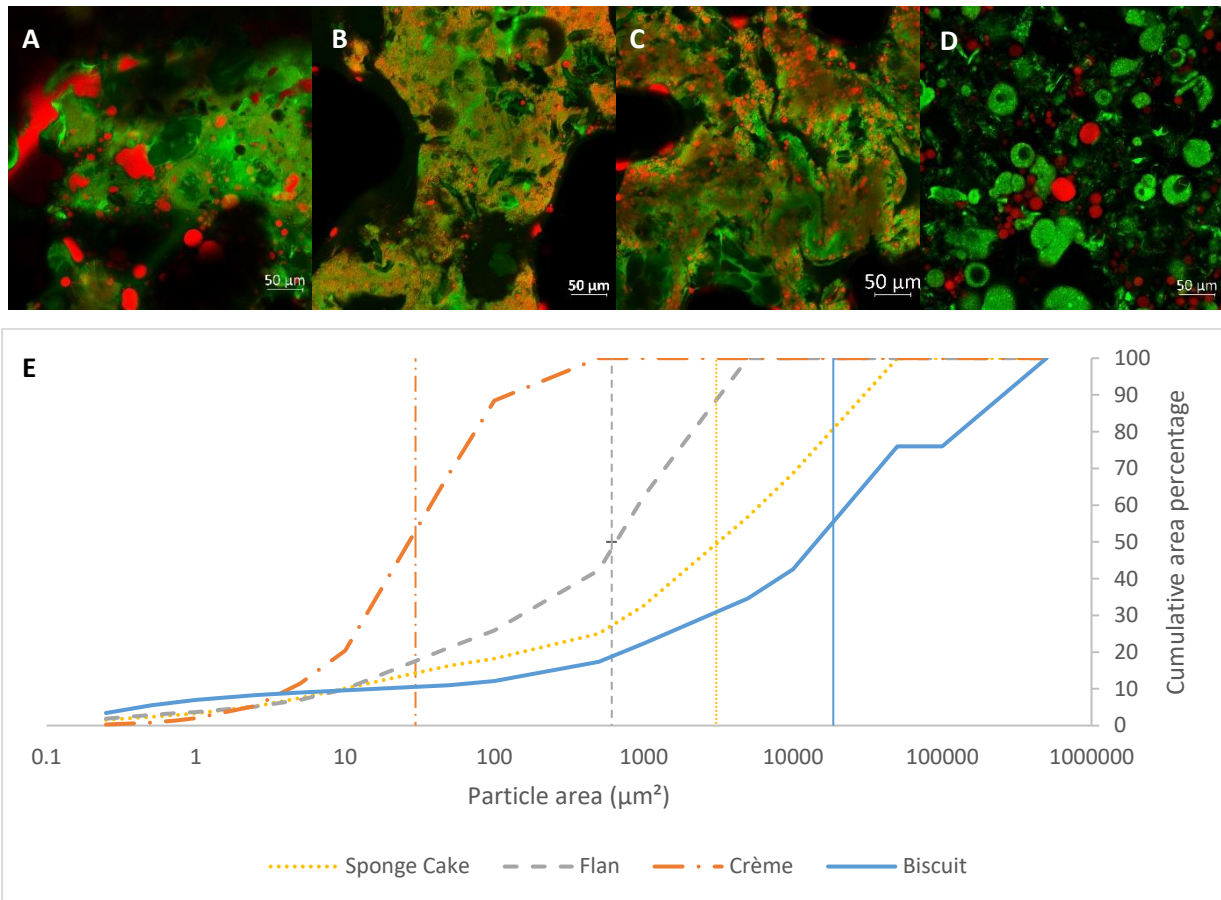


Figure 49 : Confocal images of the Biscuit (A), Sponge cake (B), Pudding (C), and Custard (D) at magnification x20 (lipids appear in red and proteins in green), and size distribution of lipid droplets in the four model foods represented by their cumulative area percentage (E, vertical lines correspond to x_{50} , the median of each distribution).

IV.2.4.2 FOOD DISINTEGRATION ASSESSED THROUGH MACRONUTRIENT RELEASE AND HYDROLYSIS DURING *IN VITRO* DIGESTION

IV.2.4.2.1 Peptide solubilisation and proteolysis mainly occur during the intestinal phase

The kinetics of proteolysis was assessed from the release of soluble proteins and peptides (estimated by total soluble nitrogen) and from free amino groups in the supernatant throughout the three phases of *in vitro* digestion. Kinetics of peptide solubilisation are equivalent for the four foods (Figure 50A). Most of the peptide solubilisation occurs within the first few minutes of intestinal phase, due to the combined effect of bile salts and pancreatin addition (only 28% at the end of the gastric phase). This is typically observed with protein-rich matrices submitted to the INFOGEST protocol (Lorieau et al., 2018; Minekus et al., 2014). Then, peptide solubilisation further increases before a plateau is reached after 160 min digestion.

At the end of the gastric phase, the quantity of free amino groups released constitutes only some 14% of the total free amino groups released at the end of the whole digestion (Figure 50B),

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

whereas 28% of total nitrogen is released at this step (Figure 50A). This suggests that food disintegration (protein solubilisation) more than proteolysis of soluble material (free amino group release) occurs during gastric digestion. On the contrary, free amino groups further increase beyond 160 min digestion, whereas the quantity of soluble peptides remains constant, suggesting that proteolysis of soluble peptides occurs until the end of the intestinal phase.

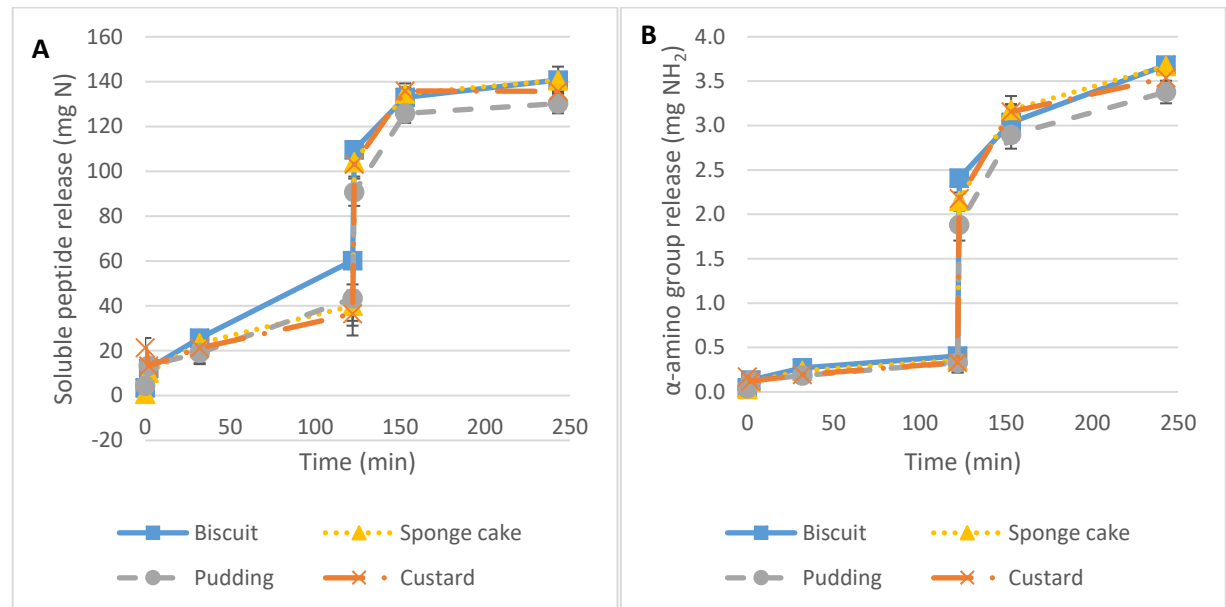


Figure 50 : Protein digestion: Peptide release (a) and free amino group release (b) during *in vitro* digestion of the four foods.

Protein digestibility may depend on their degree of denaturation (Jin et al., 2016), food processing can modify the digestion and absorption kinetics of nutrients (Morell, Fiszman, Llorca, & Hernando, 2017), and food microstructure may affect the rate or extent of protein digestion (Barbé et al., 2013; Nyemb et al., 2016; Rinaldi, Gauthier, Britten, & Turgeon, 2014). However, in the present study, no significant difference between the four foods was observed, neither on proteolysis nor on peptide release from the food matrix. Thus, these results are in agreement with Lorieau et al. (2018) who reported the same rate of proteolysis for whey protein heat-induced gels, differently structured but with identical composition, when submitted to a simulated intestinal digestion. Luo, Boom, & Janssen (2015) observed that the gel structure may alter the reaction rate and mechanisms of pepsinolysis and assumed that the difference in pepsin activity stemmed from the steric hindrance of gel structure to the diffusion of pepsin. Nyemb et al. (2016) suggested similar assumption to explain the discrepancy between four different egg white gels during *in vitro* digestion. Therefore, despite the different microstructures of the four foods studied here, the diffusion of digestive proteases might not be significantly impacted, leading to comparable kinetics of proteolysis.

IV.2.4.2.2 Amylolysis starts during the oral phase but essentially occurs during the intestinal phase

Figure 51 shows the kinetics of oligosaccharide release during *in vitro* digestion, which are similar for the four foods. As expected, oligosaccharide release first occurs during the oral phase despite it is a very short step (2 min) (Figure 51, insert), due to the action of α -amylase from human saliva. Amylase activity stopped when entering the gastric phase due to the pH drop, since this enzyme is no more active at pH lower than 3.8 (Freitas, Le Feunteun, Panouillé, & Souchon, 2018; Nielsen, Borchert, & Vriend, 2001). Immediately after pancreatin addition, oligosaccharide release suddenly increases due to the action of pancreatic α -amylase, as previously observed by Freitas & Le Feunteun (2019). Soluble oligosaccharides further increase until the end of the intestinal phase, despite a slow down after 150 min digestion.

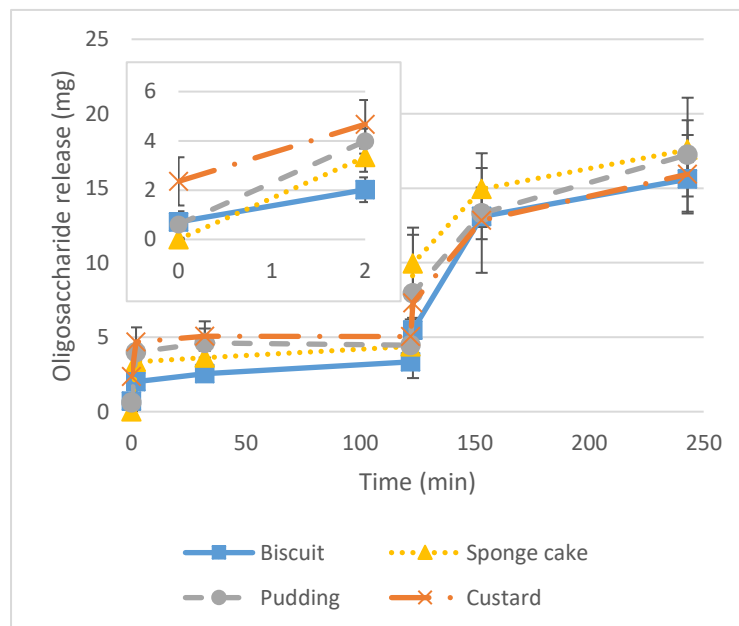


Figure 51 : Carbohydrate digestion: Release of oligosaccharides during *in vitro* digestion of the four model foods; top left insert is a zoom on oral phase.

Previous studies indicate that starch digestion should not be affected by cooking conditions (equivalent to the degree of starch gelatinisation), but rather by natural characteristics of starch microstructure like cell shape, size or wall composition (Singh, Dartois, & Kaur, 2010; Singh, Kaur, & Singh, 2013). However, the increase of digesta viscosity has been shown to impact starch digestion, by hampering interactions between substrates (starch and oligosaccharide) and digestive enzymes (salivary and pancreatic amylases) (Singh et al., 2010, 2013). Proteins in food matrix tend as well to interact with starch, lowering its digestibility (Ezeogu, Duodu, Emmambux, & Taylor, 2008). Finally, FFA released during digestion can interact with starch and form a complex

resistant to amylases (Seligman, Copeland, Appels, & Morell, 1998). The sum of all these effects, potentially conflicting, could explain that similar kinetics of amylolysis were observed here regardless of the food.

IV.2.4.2.3 Lipid release and lipolysis mainly occur during the intestinal phase

The fate of lipids during *in vitro* digestion was approached by means of two variables: the quantity of lipids released in the soluble fraction of digesta, indicative of food disintegration, and the ratio of FFA to the total FA, indicative of lipolysis. The kinetics of both variables are presented in [Figure 52](#).

At 32 min and 153 min of digestion, which corresponded to 30 min of gastric and intestinal phases, respectively, lipid solubilisation significantly differs between the four foods ([Figure 52A](#)). Whereas lipid solubilisation tends to be the highest for Biscuit and the lowest for Sponge cake and Pudding during the gastric phase, an opposite behaviour is observed during the intestinal phase. Moreover, such as for peptide solubilisation ([Figure 50A](#)), lipid solubilisation strongly increases at the very beginning of the intestinal phase, confirming a severe food disintegration early in this phase.

Lipolysis curves are completely different from lipid solubilisation curves since no lipolysis occurs during the gastric phase ([Figure 52B](#)). Moreover, lipolysis rate significantly differs between the four foods during the intestinal phase: Custard presents a much lower lipolysis during all this phase; although Sponge cake, Pudding, and Biscuit present similar lipolysis during the first 30 min, differences progressively increase. At the end of intestinal digestion, Biscuit exhibits 100% lipolysis, vs 65% for Sponge cake, 54% for Pudding and 28% for Custard.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

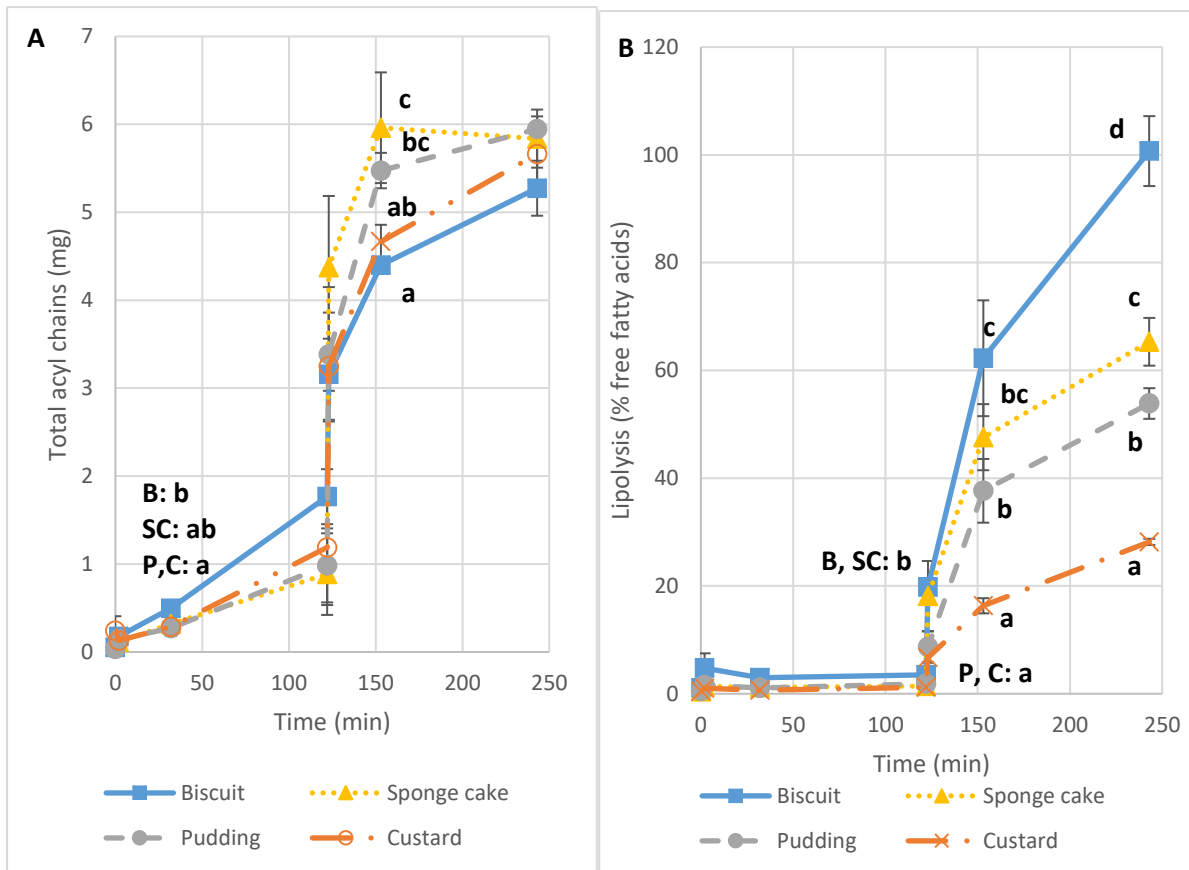


Figure 52 : Lipid digestion: Lipid release (A) and lipolysis (B) during *in vitro* digestion of the four foods. At a given time, the differences between matrices are demonstrated by different letters ($P < 0.05$).

Thus, the present results are not in agreement with those reported by Mat, Le Feunteun, Michon, & Souchon (2016) who observed different kinetics of lipolysis in liquid and solid emulsions, with a faster rate of lipolysis during the first minutes of digestion for the liquid one compared to the solid one. These authors assumed that lipase diffusion to their substrate is slowed down in solid emulsions compared to liquid emulsions, leading to slower lipolysis kinetics. To explain such a difference in digestion kinetics, Luo et al. (2015) introduced the concept of “zipper” mechanism for liquid matrices (fast initial hydrolysis followed by a steadier stage), in opposition to a “one-by-one” mechanism for solid matrices (slow initial rate followed by a more-sustained trend during the intestinal digestion). According to this concept, the kinetics observed in the present study tend to follow the “one-by-one” mechanism, even for the liquid matrix. This could result from some protein aggregation in Custard during the gastric phase because of the acidic conditions, the matrix then acting locally as a solid gel (Alting et al., 2004). Nevertheless, the high rate of lipolysis observed for the Biscuit is still surprising, especially since the lipid droplet size is the highest in this matrix (Figure 49), meaning a lower surface/volume ratio in comparison with the other foods which is unfavourable for lipolysis (Golding et al., 2011). In fact, recent studies demonstrated that the homogenisation of milk resulted in a higher rate of lipolysis (Islam et al., 2017). However, the

slower lipolysis kinetics of the three other foods could be due to some lipid coalescence or flocculation during the digestion process, thus decreasing the interface area effectively available for the lipase action, despite initial smaller fat globules (Day et al., 2014; Giang et al., 2015). This hypothesis is compatible with the puddles of fat observed at the surface of digesta during the experimentations (data not shown).

In a similar study implementing a semi-dynamic system, similar observations have been made regarding the rate of lipolysis in liquid vs. solid food matrices. In the liquid sample, a phase separation occurred during gastric phase due to creaming, whereas it was very limited in the semi-solid matrix, resulting in a lower lipolysis at the end of digestion of the liquid emulsion (Mulet-Cabero, Rigby, Brodkorb, & Mackie, 2017).

IV.2.4.3 MICRONUTRIENT BIOACCESSIBILITY DEPENDS ON FOOD CHARACTERISTICS AND ON THE CONSIDERED MICRONUTRIENT

Kinetics of vitamin B9 release during digestion are slightly different for the four foods (Figure 53A). During the oral phase, a sharp increase of soluble vitamin B9 is observed, but without any difference between the foods. Then, two types of behaviour occur in the gastric phase: vitamin B9 release is higher for Biscuit and Sponge cake during the first 30 min before reaching a plateau, whereas a continuous increase occurs for the 120 min for Custard and Pudding. At the end, no difference of total vitamin B9 release exists between the four foods. When entering the intestinal phase, a brutal and substantial decrease of soluble vitamin B9 is noted for Biscuit, Pudding, and Custard, as well as for Sponge cake to a lesser extent. The insolubilisation of vitamin B9 is likely due to the pH rise from 3 to 7, since vitamin B9 is very poorly soluble at neutral pH (Wu, Li, Hou, & Qian, 2010).

With regard to lutein, similar kinetics of release in the soluble fraction of digesta are noted for the three solid foods, whereas the liquid food behaves differently during the oral and intestinal phases (Figure 53B). The difference already exists in the products before digestion: around 20% of lutein is in the soluble fraction for Custard, when lutein is almost completely entrapped in the solid fraction for Biscuit, Sponge cake and Pudding. Then, the release of lutein during the oral phase is limited in all cases, resulting in a higher percentage of soluble lutein in Custard compared to the solid foods. When entering the gastric phase, the percentage of soluble lutein decreases during the first 30 min for Custard, to reach similar value as for the three solid foods; at the end of the gastric phase, bioaccessibility of lutein reaches about 25% for the four foods. During the intestinal phase, the rate of lutein bioaccessibility continues to increase up to 55% for Custard, while remaining constant at 25% for the three solid foods.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

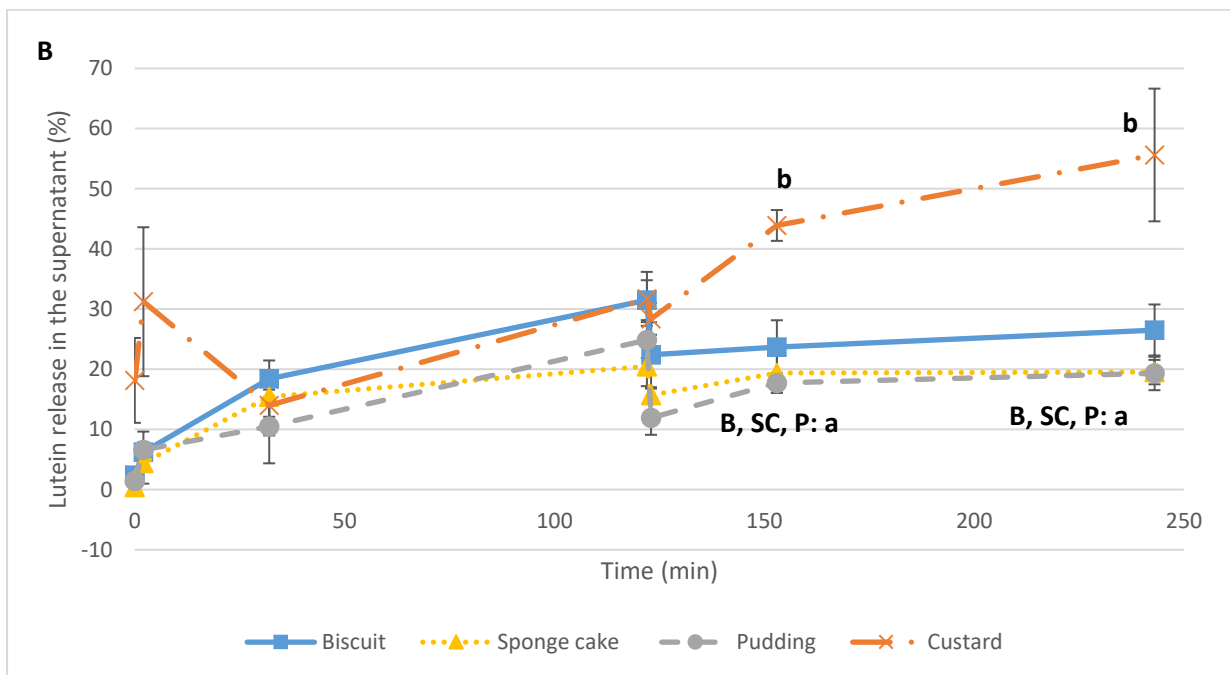
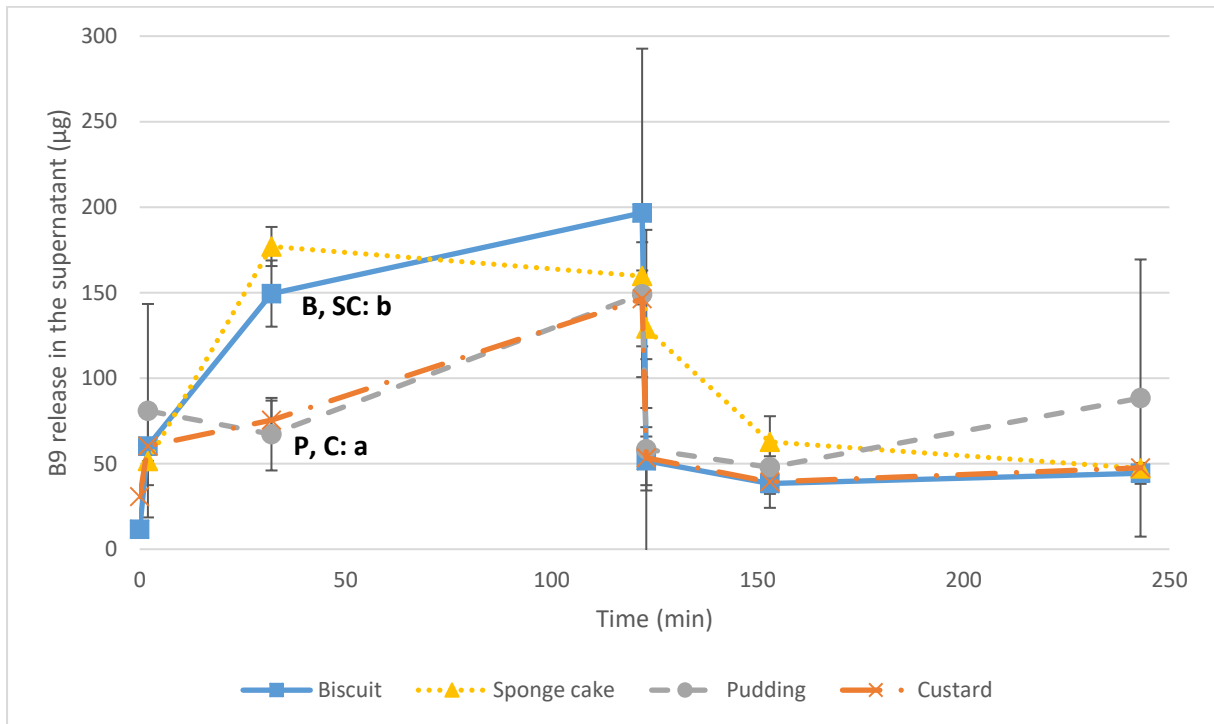


Figure 53 : Micronutrient bioaccessibility: vitamin B9 (A) and lutein (B) release in the supernatant during *in vitro* digestion of the four foods. Lutein release is expressed as the percentage of the total amount quantified at each digestion time to account for the progressive degradation of lutein under *in vitro* digestion conditions. Top left insert (A) is a zoom on the oral phase.

The food matrix is known to play a role in folate absorption. Castenmiller et al. (2000) reported that the disruption of spinach matrix by mincing improves folate bioavailability. Similar results

were found for microwaved chopped compared with microwaved whole spinach (van het Hof et al., 1999). The network formed by dietary fibers might be responsible for these differences (Ristow et al., 1982). However, in the present study, there is no fiber network likely to hinder vitamin B9 release, which could explain that no difference was observed between the four foods regarding vitamin B9 bioaccessibility, despite apparently different behaviours in the gastric phase.

Gleize *et al.* observed that lutein bioaccessibility was greater when provided by diet containing mainly short FA rather than mono- or poly-unsaturated FA, because the first one produced smaller mixed micelles (Gleize et al., 2013). Although the four foods studied here contained initially the same FA composition, the differences of lipolysis observed (the highest for Biscuit, the lowest for Custard, see [Figure 52B](#)) may lead to some difference in terms of FA released, with potential consequences on the size of the mixed micelles produced, and consequently on lutein bioaccessibility. Another hypothesis is that the lipid droplet size, and thus the surface area for exchange between oil and aqueous phases, could affect the transfer efficiency of lutein from the food matrix to the soluble phase (Reboul et al., 2006). Although Custard present the smallest lipid droplets amongst the four foods ([Figure 49E](#)), the evolution of the lipid size distribution during *in vitro* digestion remains unknown, making the validation of this hypothesis impossible. A third hypothesis is a potential effect of lipolysis on the lutein transfer into the soluble phase. Indeed, carotenoids like lutein need the presence of lipids in the soluble phase in order to be released from the food matrix (Tyssandier et al., 2003). This hypothesis seems here reasonable as a significant matrix effect was observed on lipolysis and a strong relationship exists between the total lipid content in the soluble phase during digestion and lutein release (correlation coefficient = 0.60, p-value < 0.0001).

IV.2.4.4 THE FOOD MATRIX STRONGLY INFLUENCES THE MARKERS OF DIGESTION

The effect of food matrix and digestion time on the different characteristics of the digesta was tested by ANOVA. Based on the linear model analysis ([Table 21](#)), all the variables tested significantly changed with food matrix, except vitamin B9 release, and with digestion time, except cholesterol release and a specific class of peptide molecular size. Therefore, if food matrix may be a determining variable at certain given time of digestion for almost all the characteristics of the *in vitro* digesta, differences are made on the digestion kinetics on top of the expected effect of digestion time. It is then reasonable to assume that food matrix has an impact on the digestion process.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

Table 21 : Statistical significance of the variables “Food matrix” and “Digestion time” on the characteristics of *in vitro* digesta, model R² and the p-value of the linear model.

	Matrix	Time	Matrix * Time	R ²	p-value
Lutein	***	***	***	0.844	2.10 ⁻¹⁶
Vitamin B9	NS	***	NS	0.505	4.10 ⁻⁵
Oligosacc.	*	***	NS	0.900	2.10 ⁻¹⁶
Total lipids	**	***	***	0.974	2.10 ⁻¹⁶
Degree of Lipolysis	***	***	***	0.983	2.10 ⁻¹⁶
TAG	*	***	**	0.730	1.10 ⁻¹²
FFA	**	***	**	0.980	2.10 ⁻¹⁶
DAG	*	***	**	0.979	2.10 ⁻¹⁶
MAG	**	***	*	0.914	2.10 ⁻¹⁶
CHOL	*	NS	NS	0.174	0.058
PL	***	***	*	0.810	2.10 ⁻¹⁶
Total proteins	**	***	*	0.982	2.10 ⁻¹⁶
AminoGroup	***	***	**	0.996	2.10 ⁻¹⁶
Class1	***	***	NS	0.437	7.10 ⁻⁵
Class2	***	***	***	0.618	1.10 ⁻⁸
Class3	**	NS	NS	0.237	0.019
Class4	***	***	NS	0.934	2.10 ⁻¹⁶
Class5	**	***	NS	0.881	2.10 ⁻¹⁶
Class6	***	***	NS	0.891	2.10 ⁻¹⁶
Class7	**	***	NS	0.918	2.10 ⁻¹⁶
AireTot	***	***	NS	0.890	2.10 ⁻¹⁶

* Significant effect at p < 0.05; ** significant effect at p < 0.01; *** significant effect at p < 0.001; NS, no significant effect. Variable meanings are indicated in [Table 20](#).

IV.2.4.5 GASTRIC PHASE IS PRIMARILY A MACRONUTRIENT SOLUBILISATION STEP, WHILE INTESTINAL PHASE IS A HYDROLYSIS STEP

In order to highlight correlations between food matrix, digestion time, and all the characteristics measured on the digesta, a principal component analysis (PCA) was completed ([Figure 54A](#)). The first two principal components (PCs) account for a cumulative variability of 72%. A significant portion of the information provided by the dataset could thus be plotted in 2D defined by PC1 and PC2.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

PC1 (60.74% of the variability) is positively correlated to markers of food disintegration (total lipids and peptides released in the soluble fraction), but also to markers of lutein release and of macronutrient hydrolysis: lipolysis (FFA, MAG, DAG measured by TLC and lipolysis degree measured by GC), amylolysis (oligosaccharides released), proteolysis (free amino groups and all classes of peptides <25 kDa); PC1 is negatively correlated to triglycerides. PC2 (11.78% of the variability) is positively correlated to TAG, cholesterol, proteins >100 kDa and vitamin B9 release, all of which are markers of food disintegration. According to the matrix of Pearson's correlation (Supplementary Material 1), markers of food disintegration and those of macronutrient hydrolysis are strongly correlated. Furthermore, these two phenomena are correlated with the time of digestion indicating they take place at the same time.

The graph of the individuals on PC1 and PC2 does not enable to show any impact of food matrix on the digestion process, as confirmed by the barycentre's of the four matrices, which are very close to each other and to the centre of the graph (Figure 54B). However, when analysed from the point of digestion time, PC1 and PC2 make it possible to split the samples according to the phases of *in vitro* digestion (Figure 54C). Digesta collected at the very beginning of the salivary phase (S0) have the lowest coordinates on PC1 and PC2, indicating the lowest food disintegration, macronutrient hydrolysis and micronutrient release. During the gastric phase (from G0 to G120), the sample coordinates increase on PC2, meaning that *in vitro* gastric phase mainly consists of solubilizing the macronutrients. In this way, TAG and high molecular weight peptides become more and more abundant in the soluble fraction of the digesta, and then accessible for further hydrolysis by digestive enzymes. Then, during the intestinal phase (from I0 to I120), sample coordinates decrease on PC2 and increase on PC1, indicating progressive disappearance of TAG and high molecular weight peptides in the soluble fraction in favour of markers of macronutrient hydrolysis, as evidenced by the increase in oligosaccharides, FFA and peptides of low molecular weight. Vitamin B9 positively correlates with PC1, i.e. its release mainly occurs during the gastric phase, whereas lutein positively correlates with PC2, i.e. its release mainly occurs during the intestinal phase, consistently with results reported above (section 3.3).

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

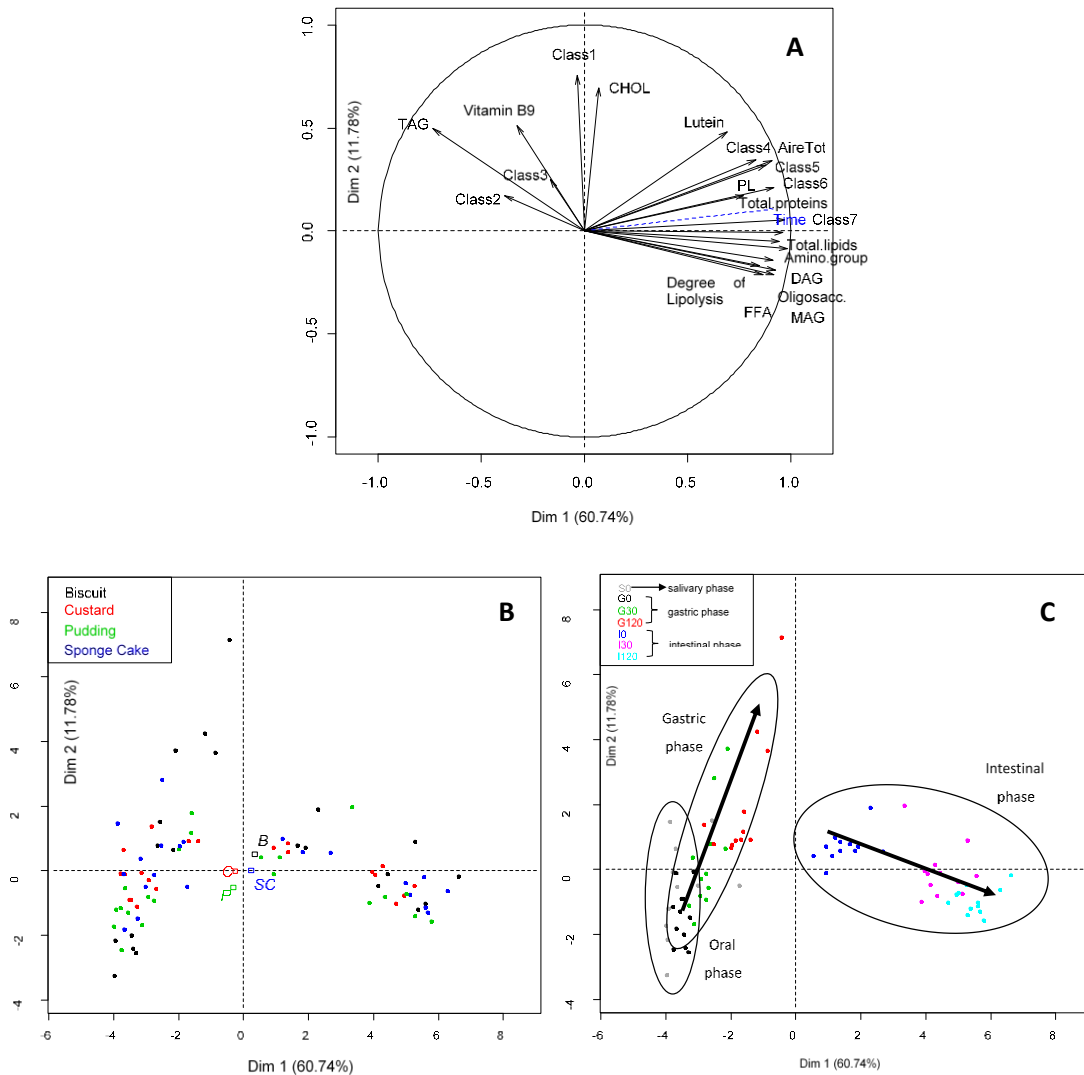


Figure 54 : Projection of the variables (A) and of the individuals (B, C) on the first two dimensions (PC1 and PC2) of the principal component analysis (PCA). (A) Active variables (in black) correspond to the characteristics measured on the *in vitro* digesta. Digestion time was added as an illustrative variable (in blue). Individuals are identified according to the food matrix (B) or to the digestion time (C). (B) Empty squares correspond to the barycentre of each of the four foods. (C) Black arrows represent the direction of the digestion process during the gastric and intestinal phases.

To complete PCA, a hierarchical clustering analysis (HCA) was completed in order to visualize and highlight the similarities between individuals. It defined four clusters (Figure 55). The first cluster gathers 83% of the digesta collected at the beginning of salivary phase and 100% of digesta from the beginning of gastric phase. Most of the remaining samples collected during gastric phase (58% of G30 and 100% of G120 samples) constitute the second cluster. The third cluster contains almost all the digesta collected at the beginning of intestinal phase (92% of I0 samples). Finally, the fourth cluster gathers the digesta from the rest of the intestinal phase (100% of I30 and I120). Thus, HCA analysis makes it possible to determine the key events of *in vitro* digestion: addition of pepsin (switch from cluster 1 to cluster 2), rise of pH from 3 to 7 (from cluster 2 to 3) and addition of

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

pancreatin (from cluster 3 to 4). Some events seemed to have no or few impact on the digestion process, like the addition of amylase at the beginning of the oral phase, or the drop of pH from 6.5 to 3 when entering the gastric phase.

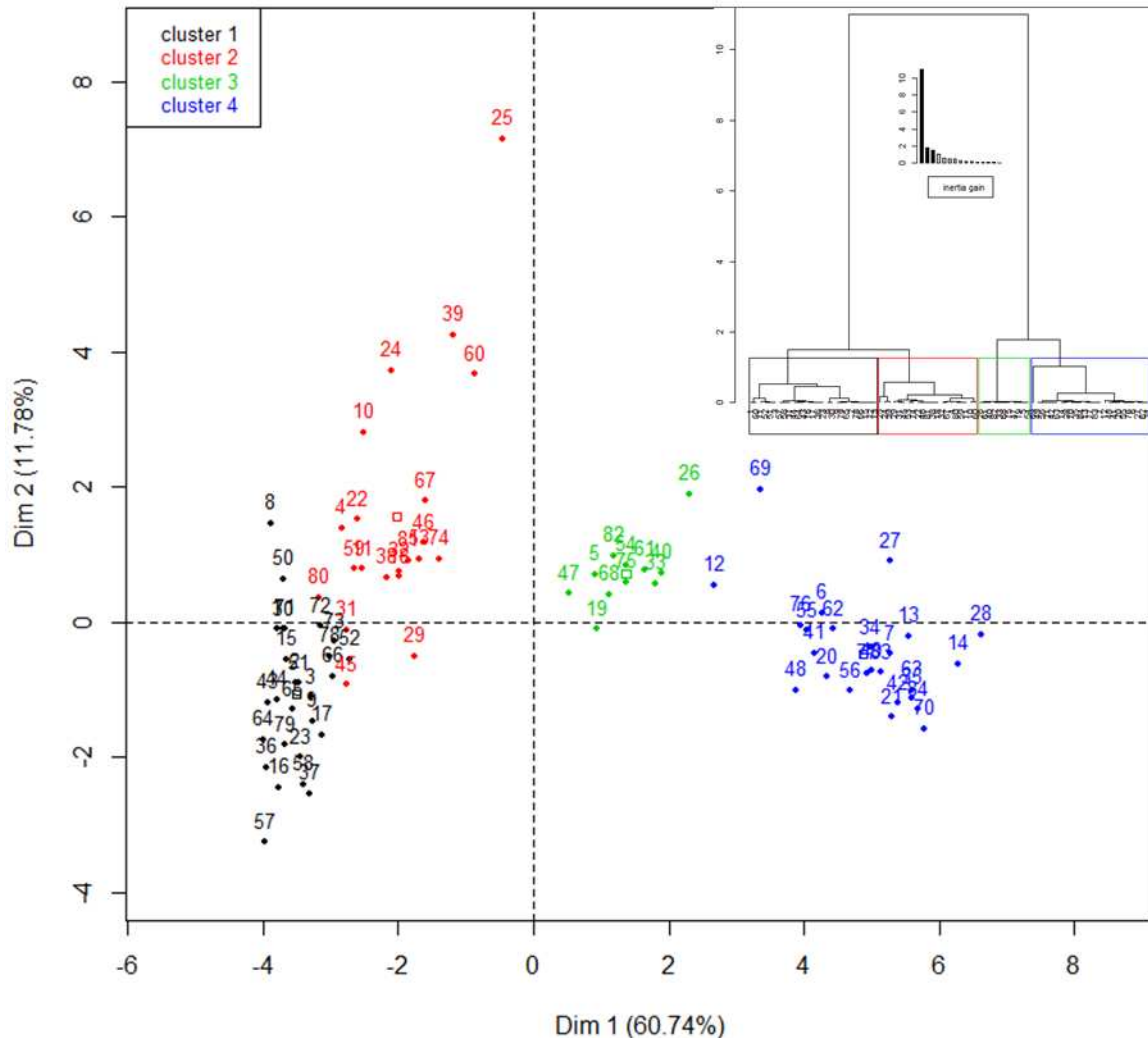


Figure 55 : Hierarchical clustering analysis (HCA) applied to the first two principal components of the PCA.

IV.2.4.6 IMPACT OF FOOD ON DIGESTION PATHWAYS INVESTIGATED BY MFA

Multiple factor analysis (MFA) was completed on the dataset in order to complement the representation of the barycentre's of the food matrices with seven partial points for each food matrix (Figure 56). Each partial point corresponds to the considered food described by all the variables at a given digestion time (S0, G0, G30, G120, I0, I30 or I120).

The first two PCs explain a cumulative variability of 77%. PC1 (48.97%) is positively correlated to markers of matrix disintegration (total soluble peptides and lipids), proteolysis (peptides of molecular weight <25 kDa and free amino groups released), degree of lipolysis and lutein release. It is negatively correlated to amylolysis (oligosaccharides) and PL. PC2 (27.98%) is negatively

correlated to vitamin B9 release and lipolysis (FFA, DAG, MAG) and positively correlated to peptides of high molecular weight (> 25 kDa). The significant correlation coefficients of variables at a given digestion time with the two first PCs are given in Supplementary material 3.

The barycentre of the Biscuit cluster is located on the right side of PC1 whereas the 3 other foods are on the left side. This could result from lipolysis, since considering the variables correlated to PC1, lipolysis is the main phenomenon discriminating the four foods (Figure 52). Regarding Custard, Pudding and Sponge cake, these three food matrices are separated along PC2. Considering the variables correlated to PC2, it is not possible to provide an explanation for this observation. Nonetheless, the positions of the four matrix barycentres, representative of the global matrix effect, are relatively distant between each other (Figure 56), demonstrating that food matrix strongly impacts the digestion process.

The digestion patterns, as described by the pathway of partial points throughout the digestion, show that the four foods have different behaviours during *in vitro* digestion. Taking the example of Custard, at the beginning of digestion (S0), the partial point coordinates are high on PC2 meaning a high macronutrient content in the supernatant, consistently with the liquid texture and high solubility in this food. The macronutrients are then already accessible for digestive enzymes from the start of digestion. During the gastric phase, the partial point coordinates decrease on PC2, indicating some insolubilisation, likely due pH decrease which could induce protein precipitation; some aggregation was actually observed. Between the end of the gastric phase and the beginning of the intestinal phase, the partial point coordinates increase on PC2, suggesting a new step of protein solubilisation. Then, during the intestinal phase, partial point coordinates increase on PC1, indicative of significant lipolysis and proteolysis during this step of digestion, consistently with the results reported above (Figure 50 and Figure 52).

Pudding presents a different pathway, with partial point coordinates on PC2 which are lower at the beginning of the oral phase and increase during the gastric phase, indicating that the acidic pH and/or pepsin activity may lead to macronutrient solubilisation. Partial point coordinates for Custard and Pudding are very close at this step of digestion, meaning that the gastric stage tends to standardize the samples. However, the intestinal phase increases the dispersion of partial points for Pudding and Custard. Hence, although Pudding and Custard seem to be the closest matrices in terms of texture, their fate throughout digestion is very different. Digestion pathways are also very different for Sponge cake and Biscuit, meaning that food structure influence on food disintegration and nutrient release results from a global and complex process.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

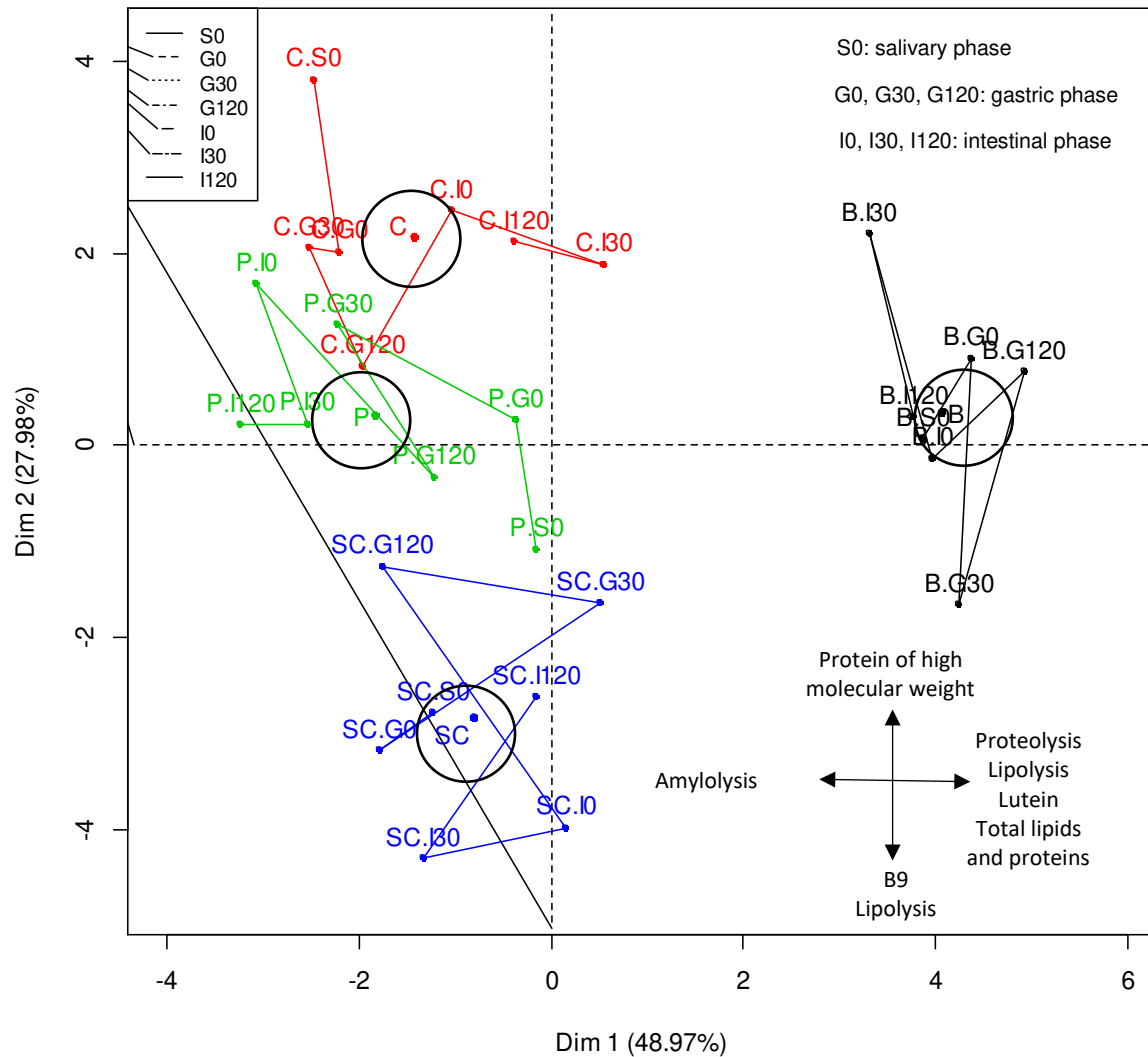


Figure 56 : MFA map of the individuals for the four model foods during *in vitro* digestion. Lines illustrate the changes of the individuals' coordinates throughout digestion; circles indicate the barycentres for each food.

IV.2.5 CONCLUSIONS

This work highlights the influence of the food matrix structure (from liquid to hard solid) on *in vitro* digestion using a simulated gastro-intestinal model. Through different processing conditions, four foods (Custard, Pudding, Sponge cake, Biscuit) have been prepared with identical composition but with strong differences in terms of macro- and microstructure, especially regarding the size distribution of lipid droplets. The release and hydrolysis of all macronutrients (starch, proteins, lipids) mainly occurred during the intestinal step of the *in vitro* digestion. Moreover, the different matrix structures did not seem to have a great influence on macronutrient hydrolysis kinetics, except for the rates of lipolysis which was almost four times higher for the harder matrix (Biscuit) in comparison with the liquid one (Custard). However, the matrix structure influenced the bioaccessibility of both micronutrients, but in a different way. Kinetics of vitamin

B9 release was impacted during the gastric phase only, with a faster release for Biscuit and Sponge cake, while kinetics of lutein release was impacted during the intestinal phase only, resulting in a higher bioaccessibility for Custard.

In the end, ANOVA highlighted the overall impact of food structure on digestion kinetics, therefore suggesting an impact on the digestion process itself. This result was supported by Multiple Factor Analysis which brought out very different digestion pathways from one food matrix to another. By using a Principal Component Analysis, the digestion process could also be decomposed into the gastric step during which the major phenomenon was macronutrient solubilisation, and the intestinal step during which mainly hydrolysis occurred.

However, the static model of digestion used here does not take into account the dynamics of gastric emptying, acid and enzyme secretions. These important physiological parameters will be studied in future *in vitro* digestion studies using a dynamic model.

Acknowledgement

The authors thank J.-J. Dubois and S. Wiart-Letort for conducting part of the experiments; as well as Liot (Pleumartin, France) and Sotexpro (Bermericourt, France) for providing raw ingredients (egg powders and pea flour respectively); and Nutrinov (Noyal-sur-Vilaine, France) for the lending of analytical equipment.

This work was supported by Brittany Council, National Institute of Agricultural Research and Carnot Qualiment.

IV.2.6 SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material 1. Matrix of Pearson's correlations: significant correlation coefficients between variables. In green = high positive correlation ($R^2 > 0.7$). In red = high negative correlation ($R^2 < -0.7$). In black: $-0.7 < R^2 < 0.7$.

Vitamin B9	0,12																			
Oligosacc.	0,48	-0,36																		
Total lipids	0,60	-0,35	0,91																	
Degree of lipolysis	0,52	-0,35	0,80	0,79																
TAG	-0,22	0,45	-0,79	-0,78	-0,74															
FFA	0,51	-0,39	0,93	0,92	0,87	-0,84														
DAG	0,51	-0,41	0,93	0,93	0,84	-0,83	0,98													
MAG	0,44	-0,31	0,88	0,89	0,77	-0,83	0,95	0,94												
CHOL	0,36	0,26	-0,05	0,02	-0,04	0,44	-0,01	-0,01	-0,03											
PL	0,46	-0,32	0,66	0,76	0,51	-0,40	0,62	0,63	0,58	0,19										
Total proteins	0,66	-0,34	0,87	0,97	0,78	-0,70	0,86	0,88	0,80	0,06										
Amino group	0,58	-0,43	0,91	0,97	0,82	-0,79	0,92	0,93	0,85	-0,03										
Class1	0,22	0,33	-0,28	-0,15	-0,14	0,32	-0,21	-0,22	-0,18	0,47										
Class2	-0,19	0,04	-0,26	-0,33	-0,34	0,33	-0,31	-0,28	-0,26	0,00										
Class3	-0,07	0,06	-0,07	-0,10	-0,18	0,14	-0,11	-0,07	-0,07	-0,01										
Class4	0,61	-0,22	0,59	0,78	0,52	-0,44	0,54	0,59	0,49	0,14										
Class5	0,65	-0,21	0,69	0,84	0,63	-0,54	0,68	0,73	0,64	0,16										
Class6	0,69	-0,19	0,72	0,86	0,72	-0,59	0,75	0,76	0,69	0,17										
Class7	0,61	-0,36	0,80	0,92	0,79	-0,73	0,84	0,84	0,78	0,03										
AireTot	0,71	-0,20	0,70	0,86	0,69	-0,56	0,73	0,74	0,68	0,21										
	Lutein	Vitamin B9	Oligosacc.	Total lipids	Degree of lipolysis	TAG	FFA	DAG	MAG	CHOL										

Total proteins	0,80																			
Amino group	0,78	0,98																		
Class1	-0,16	-0,12	-0,21																	
Class2	-0,13	-0,34	-0,36	0,10																
Class3	-0,02	-0,11	-0,14	0,14	0,86															
Class4	0,76	0,86	0,78	0,11	-0,20	0,06														
Class5	0,72	0,88	0,83	0,15	-0,11	0,20	0,94													
Class6	0,65	0,90	0,86	0,09	-0,53	-0,32	0,80	0,81												
Class7	0,72	0,94	0,94	-0,11	-0,52	-0,34	0,76	0,77	0,96											
AireTot	0,70	0,90	0,85	0,26	-0,29	-0,05	0,90	0,92	0,94	0,89										
	PL	Total proteins	Amino group	Class1	Class2	Class3	Class4	Class5	Class6	Class7										

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

Supplementary material 2. Table used to generate data set considered for MFA, consisting of the 21 variables for each of the 7 digestion times. Values are the same as those used for the statistical analysis but organized in a different way.

Foods	Variables of S0	Variables of G0	Variables of G30	Variables of G120	Variables of I0	Variables of I30	Variables of I120
	Lutein ... AireTot	Lutein ... AireTot	Lutein ... AireTot	Lutein ... AireTot	Lutein ... AireTot	Lutein ... AireTot	Lutein ... AireTot
Biscuit							
Sponge Cake							
Pudding							
Custard							

Supplementary material 3. Multiple Factor Analysis: significant correlation coefficients of variables at a given sampling time with PC1 (left part) and PC2 (right part). Blank = non-significant. In green = high positive correlation ($R^2 > 0.7$). In red = high negative correlation ($R^2 < -0.7$). In black: $-0.7 < R^2 < 0,7$.

	PC1							PC2						
	S0	G0	G30	G120	I0	I30	I120	S0	G0	G30	G120	I0	I30	I120
Lutein	-0,56		0,75	0,81	0,90	0,95	0,70	0,66	0,78	-0,66				0,68
Vitamin B9	-0,82		0,52	0,99			-0,51			-0,78		-0,92	-0,91	
Oligosacc.		-0,91	-0,90	-0,91	-0,71		-0,64	0,88				-0,69	-0,97	-0,72
Total.lipids		0,82	1,00	0,91		-0,61	-0,92					-0,91	-0,78	
Degree of Lipolysis	0,98	0,97	0,98	0,93	0,75	0,77	0,88					-0,66	-0,55	
TAG	-0,66	-0,81		0,96	-0,51	0,68	0,62			-0,85		0,82	0,73	0,66
FFA												-0,74	-0,87	-0,63
DAG					0,52	-0,64						-0,72	-0,74	-0,70
MAG						-0,60	-0,93					-0,95	-0,69	
CHOL		-0,71	0,60	0,99				-0,71		-0,68		-0,63	-0,76	-0,66
PL	-0,73	-0,76		0,86	-0,93	-0,89								-0,73
Total.proteins			0,87	0,94	0,73		0,65	0,78	0,91					
Amino.group		0,68	0,89	0,97	0,85		0,66	0,74						
Class1	0,95	0,77	0,99	0,97	0,91		0,75							
Class2	-0,56	-0,57				-0,54		0,68	0,71	0,70	0,85	0,76		
Class3		-0,61				-0,51		0,72	0,76	0,68	0,88	0,76		0,65
Class4			0,98	0,86	0,98	0,96	0,76	0,84	0,84					
Class5	0,97	0,83	0,97	0,89	0,91		0,84							
Class6	0,98	0,95	0,86	0,88	0,84		0,80							
Class7	0,91	0,98	0,93	0,86	0,77		0,79							
AireTot			0,99	0,90	0,91	0,67	0,86	0,88	0,89					

IV.3 ÉTUDE COMBINANT UN SIMULATEUR DE MASTICATION ET UN MODÈLE DE DIGESTION *IN VITRO* DYNAMIQUE PARAMÉTRÉS À PARTIR DE DONNÉES RECUEILLIES CHEZ L'HOMME

Cette deuxième partie est basée sur le projet de publication suivant :

Impact of food structure on macronutrient digestion and micronutrient release: *in vitro* study using mastication and dynamic digestion simulators set up based on *in vivo* data

M. Hiolle ^a, O. Menard ^a, V. Lechevalier ^a, J. Ossemond ^a, C. Batisse ^b, M.-A. Peyron ^c, B. Gleize ^d, E. Reboul ^e, D. Dupont ^a, F. Nau ^{a*}

^a STLO, INRA, AGROCAMPUS OUEST, 35042, Rennes, France

^b Université Clermont Auvergne, CROC EA4847, Dental Faculty, Clermont-Ferrand, France

^c Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, CRNH Auvergne, F-63000, Clermont-Ferrand, France

^d UMR 408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Avignon University, Avignon, France

^e C2VN, INRA, INSERM, Aix-Marseille Univ, Marseille, France

* Corresponding author: francoise.nau@agrocampus-ouest.fr

En préparation pour soumission à Food Chemistry

Keywords

In vitro digestion, Complex foods, Microstructure, Micronutrient bioaccessibility, Dynamic digestion simulator, Mastication simulator

IV.3.1 ABSTRACT

Food structure is regarded as a key factor to the digestion process, although it is not completely understood. The aim of this study was to gain knowledge about its impact on the kinetics of food disintegration, macronutrient hydrolysis, and micronutrient release. For that purpose, three complex foods (Biscuit, Sponge cake, Custard) with identical composition on dry matter but various structures, and enriched with lutein and vitamin D, were submitted to *in vitro* digestion. The mastication simulator AM² was used to reproduce the characteristics of realistic *in vivo* masticated bolus, and dynamic *in vitro* digestion was carried out using the DIDGI simulator, set up based on *in vivo* data. Gastric emptying half-times significantly differed according to food structure. Starch release from the matrix strongly depended on food structure during the entire digestion, as well as lipolysis during the intestinal phase. Lutein release during intestinal step was six-times higher for Biscuit compared to Custard. In contrast, a trend for a higher vitamin D release was observed during intestinal digestion of Custard. During gastric phase, both micronutrient releases were affected by food structure but to a lesser extent. A Multiple Factor Analysis highlighted that Custard was characterized by a higher lipid release than Biscuit and Sponge cake, whereas Sponge cake was characterized by higher starch release, lipolysis and amylolysis compared to Custard and Biscuit, and lastly, Biscuit and Sponge cake were associated with a high lutein release, whereas Custard was characterized by a higher vitamin D release.

IV.3.2 INTRODUCTION

Understanding the mechanisms of food disintegration in the gastrointestinal tract is a key step for developing food structures with specific target delivery. Several studies have investigated the effect of food structure on nutrient digestion but many of them consisted in the digestion of very simple foods and focused on proteins (Barbé et al., 2013; Nyemb et al., 2016), lipids (Armand et al., 1999; Innocente et al., 2009) or carbohydrates (Englyst et al., 1996; Freitas & Le Feunteun, 2019) only. Even if the resulting knowledge contribution is essential, it is crucial to evaluate the behaviour of complex food systems to understand the links between food composition and nutrient delivery because synergistic or antagonistic effects can modulate the results observed on isolated nutrients.

The static *in vitro* digestion model, elaborated by the INFOGEST network (Minekus et al., 2014), is useful in this way. It has been largely used to study the mechanisms of food disintegration and nutrient release, on nutrient emulsion (Armand et al., 1992; Cohen et al., 2017; Giang et al., 2015), food models (Barbé et al., 2013; Lorieau et al., 2018; Nyemb et al., 2016) or complex foods (Hiolle et al., submitted 2020; Calvo-Lerma, Fornés-Ferrer, Heredia, & Andrés, 2018). However, despite

the many advantages of this model, static digestion model is a very simplified way to mimic the complex and physiological process of digestion. It thus does not take into account dynamic factors such as enzyme secretion, gastric and intestinal emptying, or pH variations during the gastric step. To overcome these challenges, dynamic *in vitro* digestion simulators have been developed. These computer-controlled systems reproduce the gastric and intestinal transit, the continuous addition of digestive secretions, and the kinetics of gastric acidification, in order to be more physiologically realistic (Dupont et al., 2019).

Before the gastric step, mastication is the first transformation process of food during digestion. It plays an important role as it prepares the food for safely swallowing by reducing the particle size, lubricating, and compacting the bolus (Peyron et al., 2019). Though, this step is not widely considered in typical *in vitro* digestion studies and often relegated to a simple grinding process. *In vitro* mastication using a mastication simulator is a valuable alternative to an *in vivo* approach. By controlling the particle size, its distribution, and the saliva action, a food bolus produced by a masticator is supposed to be more realistic, closer to the material passing through the oesophagus and arriving in the stomach (Peyron & Woda, 2016). It can be subsequently subjected to *in vitro* digestion, in static or dynamic model.

The objective of this study was to assess the dynamic gastrointestinal digestive behaviour of complex and realistic foods with identical composition on dry matter but different in structure and texture, in order to determine the impact of food structure on the macro- and micronutrients fate. For this purpose, three micronutrient-enriched foods were designed. The novelty of the present study relies on that mastication, gastric and intestinal digestion simulators, set up based on *in vivo* human data, were successively implemented to reproduce the physiological digestion process (Blanquet-Diot et al., 2013). Aliquots of digesta were sampled over the three phases of digestion, and analysed to determine the kinetics of macronutrient (proteins, lipids and carbohydrates) release and hydrolysis, and lipophilic micronutrient release (vitamin D and lutein). A multidimensional statistical analysis allowed us to establish correspondences between matrix degradation and micronutrient bioaccessibility.

IV.3.3 MATERIALS AND METHODS

IV.3.3.1 MATERIALS

The three foods were formulated with wheat flour (Francine T45, Grands Moulins de Paris, Ivry Sur Seine, France), extruded dehulled pea flour (Sativa 32/100, Sotexpro, Bermericourt, France), powdered sugar (Saint-Louis Sucre, Paris, France), sunflower oil (Lesieur, Asnières-sur-Seine, France), standard pasteurized egg yolk and granulated pasteurized egg white powders (Liot,

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

Pleumartin, France) and sterilized water. Vitamin D₃ (100 000 UI/g) was obtained from Nutrilo GmbH (ref 05-052, Cuxhaven, Germany). A homogeneous dispersion of lutein was prepared from capsules provided by Diet Horizon (ref 2779, Bordeaux, France) and containing about 20 mg lutein suspended in sunflower oil; its concentration was determined by spectrophotometry at 445 nm. All reagents, unless specified otherwise, were provided by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and were of analytical grade.

IV.3.3.2 PREPARATION OF MICRONUTRIENT-ENRICHED FOODS

Three foods enriched with vitamin D and lutein were produced according to the flowcharts and composition presented in [Figure 57](#). Kneading, whisking, mixing steps and heat treatment for Custard were operated with a kitchen robot Thermomix® TM5 (Vorwerk, Wuppertal, Germany). Biscuit and Sponge cake (solid foods) were cooked using a semi-professional convection oven (De Dietrich, Niederbronn-Les-Bains, France). On dry matter, the foods were all composed of 17% proteins, 52% carbohydrates, and 30% lipids. Food lipid content was controlled by lipid weighing after Folch extraction and protein content by Kjeldahl method (data not shown). Micronutrient enrichments were adjusted in order to compensate for losses due to the process. The three foods were in this way isocaloric, and of the same lipid, protein, and carbohydrate contents. Their structure and texture was the main factor of differentiation.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

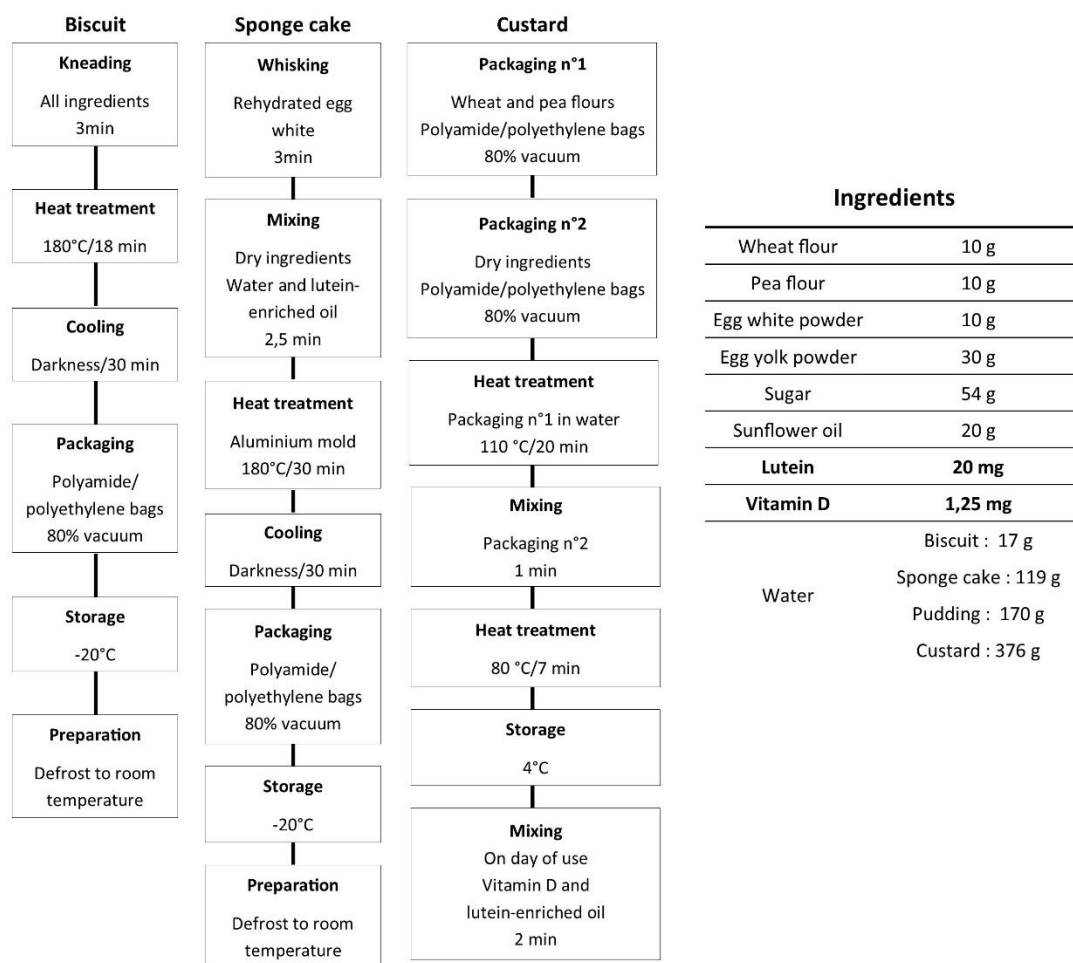


Figure 57 : Production flowcharts and composition of the model foods.

IV.3.3.3 PREPARATION OF *IN VITRO* FOOD BOLUSES

In order to introduce in the digester food samples as representative of *in vivo* boluses as possible, each solid food matrix was subjected to *in vitro* mastication. Practical constraints, imposed by the time required for the chewing phase or the sample transport, resulted in the dissociation between mastication and saliva incorporation, in order to better control enzyme activity.

IV.3.3.3.1 Mastication

In vitro mastication was performed on the two solid foods (Biscuit and Sponge Cake) with the AM² mastication simulator. This apparatus was designed to produce food boluses of granulometric characteristics similar to those observed in boluses collected after *in vivo* normal mastication (Mishellany-Dutour et al., 2011). In the present work, the programming was based on the *in vivo* mastication data collected during a previous clinical study involving twelve healthy young subjects (IDRCB 2017-A01996-47) on the same two hard foods (Biscuit and Sponge cake). The subjects were

invited to naturally chew 4 g samples and to expectorate the food bolus at the moment of the need of swallowing was perceived (5 repetitions per subject for each food). This clinical study provided data on the dynamic parameters of the masticatory sequence (number of masticatory cycles) and on the mean particle size distribution of the *in vivo* collected boluses. To produce *in vitro* food boluses of particle size distribution similar to *in vivo* ones, the parameters set up on the masticator were the number of masticatory cycles: 15 and 20 cycles for the Sponge cake and the Biscuit, respectively. For both foods, the masticatory force was managed using the spring of 13.8 N/mm of resistance (Mishellany et al, 2011). Each masticatory sequence was operated for a 4 g sample with 2 mL pure water (Volvic®, France) to simulate only the role of lubrication by saliva and avoid uncontrolled action of enzyme during bolus formation, freezing and defrosting. The food bolus formed was collected at the end of the complete sequence.

Due to their different rheology when masticated, it was not possible to use the same method for the particle size analysis of the two *in vitro* food boluses. Particle size analysis was then performed by dry manual sieving for Biscuit and image analysis for Sponge cake. The programming of AM² apparatus was validated when the particle size distribution curves were not significantly different between the *in vivo* boluses and the one produced *in vitro* using the mastication simulator. Since the *in vivo* boluses were significantly different in median particle size and size distribution curves (data not shown), it was then assumed that the *in vitro* boluses were significantly different as well. Briefly, the Biscuit produced *in vivo* smaller particles ($0.71 \text{ mm}^2 \pm 0.05$) than the Sponge cake ($0.94 \text{ mm}^2 \pm 0.20$).

To prepare an entire meal for further digestion, seven *in vitro* food boluses were pooled (42 g) and immediately frozen at -20°C. Three entire meals were prepared for each solid food to enable three repetitions of digestion.

IV.3.3.3.2 Saliva incorporation

To simulate oral digestion step, human saliva was added to the *in vitro* food boluses just after defrosting at room temperature. On the day of *in vitro* digestion, water content differences between the masticated bolus were offset by water addition up to Custard water content, so that all the bolus contained the same dry matter. Thus, 9.4 g of dry extract was digested, equivalent to 30.00 g Custard, 16.48 g Sponge cake and 9.71 g Biscuit.

Prior to incorporation, human saliva (Lee Biosolutions 991-05-P, amylase activity of 1117 U/mL, lipase activity of 15 U/mL) was heated at 37°C in a water bath. Food boluses were then prepared by mixing 30 g masticated food with 9.4 mL saliva and were incubated for 2 min at 37 °C in a water bath under constant stirring, in order to perform the oral phase of digestion.

IV.3.3.4 *IN VITRO* GASTRO-INTESTINAL DIGESTION

IV.3.3.4.1 Calculation of the gastric emptying rate

In an attempt to better match human digestion, the gastric emptying rate was determined based on data obtained from a previous clinical study (IDRCB 2017-A01996-47; data being published) during which twelve healthy male subjects ate the same enriched foods as studied here. The kinetics of vitamin B9, vitamin D and lutein appearance in the bloodstream after consumption of the three foods were recorded. Assuming that micronutrient appearance in the bloodstream is directly related to their absorption in the intestine, and therefore could be a good reflection of gastric emptying, these data have been used to determine the settings for the gastric emptying of the digestion simulator.

For this purpose, the proportional cumulative area under the curve (PC_{AUC}) method, as described by van Wyk, Sommers, Snyman, & Moncrieff (1995), was used. Gastric emptying was calculated from the quantification of each micronutrient (vitamin B9, vitamin D and lutein) at given time intervals after food consumption, expressed as a proportion of the total amount of each micronutrient absorbed over the entire period of the study. The half-time of gastric emptying was extrapolated by linear regression from the cumulative curves of micronutrient appearance generated by this method.

IV.3.3.4.2 Conducting the *in vitro* dynamic digester

The gastro-intestinal digestion was performed using the DIDGI® digester (INRA, Paris, France), a dynamic *in vitro* gastro-intestinal digestion simulator (Ménard et al., 2014). The system was set up to simulate the adult gastro-intestinal digestion conditions according to Egger et al. (2019) with slight modifications. Fluid secretions, pH, and emptying were continuously monitored using the STORM® software (INRA, France). When available, data from human studies were used to choose the parameters. The composition of all electrolytes and enzymes solutions was based on the standardised INFOGEST method for *in vitro* digestion (Minekus et al., 2014). In order to mimic the fasted gastric conditions, 24 mL of simulated gastric fluid were added in the gastric bowl pre-heated at 37°C, prior to the beginning of the digestion (Lentner, 1973). Each bolus was introduced entirely in the gastric compartment after 2 min incubation corresponding to the enzymatic part of the oral phase. Pepsin (Sigma P6887), pancreatin (Sigma P7545), and bile (Sigma B3883) solutions were prepared extemporaneously and kept on ice.

[Table 22](#) summarizes the parameters used in the digestion experiments. Gastric and intestinal emptying followed the model described by Elashoff, Reedy, & Meyer (1982). Gastric emptying

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

half-time was determined as described above (Section IV.3.3.4.1) and the β parameter was set to 2. Intestinal emptying half-time was based on literature data (Lvova et al., 2012), set to 250 min for the three foods, and the β parameter was set to 2.5.

Gastric acidification curve was obtained from data collected by Malagelada *et al.* in adults (Malagelada, Longstreth, Summerskill, & Go, 1976) and controlled using HCl 0.5M to follow the equation:

$$\text{pH} = 1.68 + 4.32^{(-t/65)} \quad [\text{Eq. 1}]$$

Intestinal pH was set to 6.5 with NaHCO₃ 1M. Secretion flow rates were decided in accordance with literature (Minekus et al., 1995).

Table 22 : Gastro-intestinal conditions for the *in vitro* digestion of food matrix simulating adult conditions.

Parameters	Gastric conditions	Intestinal conditions
Temperature	37 °C	
Fasted state	24 mL SGF (pH 2)	-
Enzymes	- Porcine pepsin 2000 U/mL 0-10 min : 1 mL/min 10-330 min : 0.5 mL/min	- Porcine pancreatin 7 % 0-330 min : 0.25 mL/min - Bovine bile 4 % 0-30 min : 0.5 mL/min - Bovine bile 2 % 30-330 min : 0.5 mL/min
pH	pH = 1.68 + 4.32 ^(-t/65) with HCl 0.5 M	6.5 with NaHCO ₃ 1M
Half-time emptying (t _{1/2})	Custard : 215 min Sponge cake : 220 min Biscuit : 242 min	250 min
Elashoff fitting (β)	2	2.5

IV.3.3.4.3 Sampling and digesta preparation

During each digestion, samples were taken at the beginning of oral phase (just before saliva addition; sample 0) and at times 90 (only in gastric compartment, sample G90), 120, 180, 240, and 330 min in gastric (G120, G180, G240, G330) and intestinal (I120, I180, I240, I330) compartments. Ten μ L Pepstatin A solution (0.5 mg/mL in methanol; Sigma P5318), and 50 μ L Pefabloc solution (0.1 M in distilled water; Sigma P76307) were added per mL of gastric and intestinal samples, respectively, to stop proteolysis; 50 μ L of 4-bromophenylboronic acid (0.1 M in methanol, Sigma B75956) were added per mL of sample to inhibit lipolysis. All samples were centrifuged at 1,000g at 4°C for 5 min; both supernatants (oil and aqueous phases) were collected together, vortexed to form an emulsion, and stored at -80 °C until further analysis. The samples thus prepared are

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

henceforth referred to as digesta. Intestinal samples intended for lutein and vitamin D quantification were centrifuged at 2,200g at 10°C for 1h; the mixed micelles were collected and stored at -80 °C until further analysis.

For each food, the entire *in vitro* digestion was conducted in triplicate, using three independently prepared batches of food bolus.

IV.3.3.5 MEASUREMENT OF FOOD MATRIX DISINTEGRATION

Matrix disintegration was assessed based on the release of proteins, lipids, and starch in the soluble fraction. Protein release was determined with the total soluble nitrogen content by micro-Kjeldahl method (Miller & Houghton, 1945). Lipid release was estimated as the total acyl chains present in residual glycerides, which were quantified from digesta by using a Biomérieux kit (Craponne, France). Released starch referred to all solubilised starch fractions and products of starch hydrolysis, and was determined as described by Freitas & Le Feunteun (2019).

IV.3.3.6 MEASUREMENT OF MACRONUTRIENT HYDROLYSIS

Proteolysis during digestion was determined by measuring the free primary amino groups in the soluble fraction of digesta using the o-phthaldialdehyde (OPA) spectrophotometric assay in microplate (Darrouzet-Nardi et al., 2013). Lipolysis was quantified - after lipid extraction according to the Folch method, acidified with 160 µL of 0.1M HCl (Folch et al., 1957) – as described by Hiolle et al. (submitted 2020). Amylolysis was determined as the quantity of oligosaccharides (polymerization degree of 10 or less) solubilized in the digesta, and estimated as previously described by Freitas & Le Feunteun (2019).

IV.3.3.7 MICRONUTRIENT QUANTIFICATION

Lutein and vitamin D quantifications were performed by Emmanuelle Reboul (UMR C2VN) and Béatrice Gleize (UMT SQPOV) research team, respectively. The methods used will therefore be discussed briefly in this section.

Micronutrients were quantified in the whole boluses before the beginning of digestion, and then in the soluble phase of digestas. The contents thus determined in the gastric and intestinal digestas corresponded to the bioaccessible parts of micronutrients while the contents measured at time 0 corresponded to the total content of micronutrients in the bolus.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

IV.3.3.7.1 Vitamin D

After extraction with hexane repeated twice, vitamin D content of digesta was determined by HPLC analysis on a C18 Zorbax column (250x4.6mm, 5µm), connected to a diode rod detector with an Acetonitrile/Methanol/Water (60/38/2) mixture for mobile phase at a rate of 1.5 mL/min. Vitamin D and apo-8'-carotenal (used as an internal standard) were quantified using external calibration ranges, by comparing their absorbances at 265 and 450 nm respectively.

IV.3.3.7.2 Lutein

Lutein was extracted from digesta according to Gleize et al. (2013). Briefly, lutein was extracted twice using hexane, then evaporated to dryness and dissolved in methanol:dichloromethane (65:35, v/v). Lutein was then quantified by HPLC according to Gleize et al. (2012).

IV.3.3.8 STATISTICAL ANALYSIS

IV.3.3.8.1 ANOVA

ANOVA tests were used to determine the effect of *Food*, *Time*, and their *Interaction* on each variable. Linear model procedure of R was applied to determine R^2 and p-value of the following modelling:

$$Y = \text{Food} + \text{Time} + \text{Food} * \text{Time} \quad [\text{Eq. 2}]$$

Differences were considered significant at minimum level of 95%. Residual normality and variance homogeneity were tested for each variable using a Shapiro-Wilk test and a Brown-Forsythe test (R Development Core team, 2007), respectively.

IV.3.3.8.2 Multiple factor analysis

To overcome the expected *Time* effect and have a look at the *Food* effect only, a Multiple Factor Analysis (MFA) was carried out. All the variables characterizing the digestion were separated into three subgroups, according to their bolus, gastric or intestinal type. A PCA was performed on each of these subgroups and results of all these PCA were then represented in a common space. This analysis provides an overview of the effects of each phase on food digestion and allows in this way to compare them (Valerie Lechevalier et al., 2015).

IV.3.4 RESULTS AND DISCUSSION

IV.3.4.1 DETERMINATION OF GASTRIC EMPTYING BASED ON A PRELIMINARY HUMAN STUDY

Gastric emptying half-times were assessed by quantification of micronutrient appearance in the bloodstream of twelve volunteers. In the clinical study, consumption of Biscuit caused a

significantly lower PC_{AUC} compared with Custard and Sponge cake (Figure 58A). Consequently, the $t_{1/2}$ calculated for Biscuit (242 minutes) was significantly higher ($p < 0.05$) than that for the two other foods (215-220 minutes) (Supplementary material 1). However, no significant difference was found between Sponge cake and Custard for the $t_{1/2}$ parameter. Furthermore, it should be noted that for each food, the $t_{1/2}$ calculated for the three micronutrients were not significantly different ($p < 0.05$).

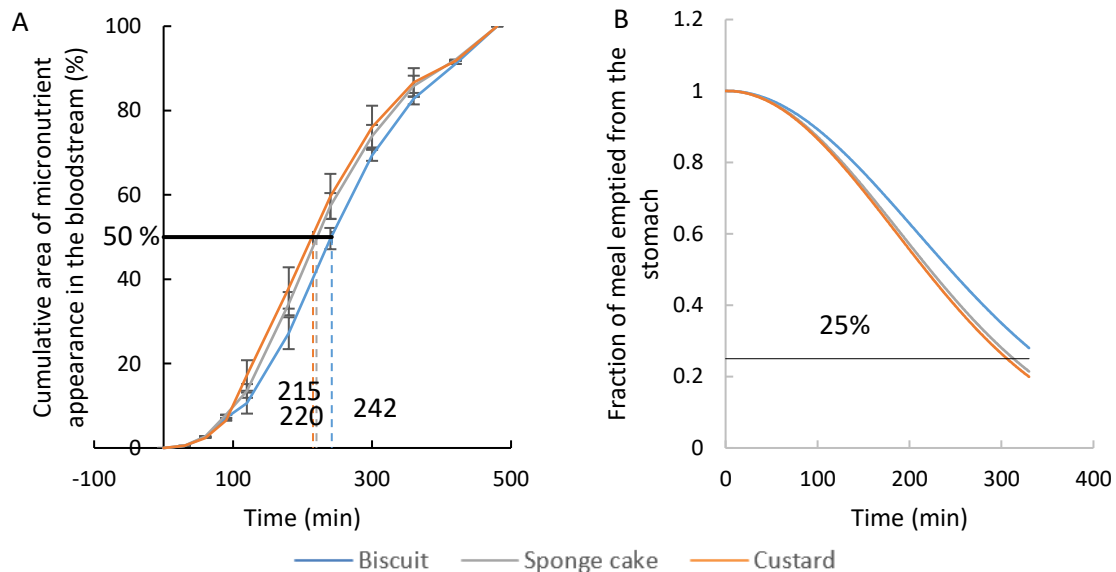


Figure 58 : Kinetics of micronutrient appearance in the bloodstream for the three foods (A) and gastric emptying curves set on the digestion system (B).

It was already widely shown that the gastric emptying half-time is lower for liquid foods than for solid foods (Elashoff et al., 1982; Rao & Schulze-Delrieu, 1993), even with relatively constant composition. As an example, Minekus et al. (1995) showed that milk and yogurt emptying half-times were 35 and 70 minutes, respectively; regarding another even firmer dairy product, namely cheese, the gastric emptying half-time was estimated at about 85 minutes (Lvova et al., 2012). In two different studies, the viscosity of the meal was also found to increase its gastric retention (Barbé et al., 2013; Ménard et al., 2018). In this way, the results found in the present study are consistent with those reported in the literature, the gastric emptying half-times being ordered according to the increasing hardness of the food : Custard \leq Sponge cake < Biscuit. Moreover, in the preliminary human study from which these data were calculated, the high quantities consumed by the volunteers (from 512 g for Custard to 135 g for Biscuit) may have delayed gastric emptying, as the volume of the meal influences this parameter (Hunt & Macdonald, 1954). This might explain why the gastric emptying half-times were high compared to those from the studies cited above.

The gastric emptying half-times calculated for the three food matrices were used to determine the curves of gastric emptying for monitoring the DIDGI system, following the Elashoff equation:

$$f = 1 - 2 \left(\frac{t}{t_{1/2}} \right)^\beta \quad [\text{Eq. 3}]$$

where f represents the fraction of meal delivered, $t_{1/2}$ is the half-time delivery calculated, t is the time and β is a constant describing the shape of the curve; β was set to 2 due to the thick (Custard) or solid (Biscuit and Sponge cake) consistence of the food digested (Elashoff et al., 1982). The resulting gastric emptying curves are presented in [Figure 58B](#). It was decided to stop the digestions when 75 % of the meal has been emptied from the gastric compartment, i.e. 330 minutes.

IV.3.4.2 FOOD MATRIX DISINTEGRATION

The kinetics of matrix disintegration was assessed from the release of soluble proteins and peptides (estimated by total soluble nitrogen), of total lipids (assessed by total acyl chains) and of starch during digestion.

Kinetics of protein and peptide solubilisation were equivalent for the three foods, in both gastric and intestinal compartments ([Figure 59A](#) and [55B](#)). In gastric compartment, peptide content strongly decreased in the first 90 minutes ([Figure 59A](#)), suggesting that either the rate of peptide emptying was higher than the one of peptide solubilisation, or some protein aggregation occurred because of the acidic conditions. The second hypothesis seems unlikely because no aggregation was visible during the digestion. However, the first one is in agreement with the acceleration of the gastric emptying between the beginning and 90 min digestion ([Figure 58B](#)). Subsequently, the peptide content increased until 120 minutes ([Figure 59A](#)), indicating a strong acceleration of matrix disintegration, since gastric emptying did not slow down during this period ([Figure 58B](#)). Then, peptide content further decreased until the end of the digestion ([Figure 59A](#)), likely due to the slowdown of matrix disintegration whereas the gastric emptying remained high. Concomitantly, in the intestinal compartment, peptide content rapidly increased between 120 and 180 minutes ([Figure 59B](#)), likely due to the pancreatic protease activity that extensively disintegrated the protein network. A plateau was then reached until 240 minutes, which means that the rate of matrix disintegration was compensated by intestinal emptying. After 240 minutes, the food transfer from the gastric compartment into the intestinal compartment would not be sufficient to balance the intestinal emptying rate, thus leading to a decrease in the peptide content in the intestinal compartment ([Figure 59B](#)).

Kinetics of lipid release are roughly identical as well for the three foods, and follow the same pattern as the protein and peptide solubilisation ones. After a strong decrease in the first 90

minutes, the released lipids increased in the gastric compartment during the next 30 minutes (except for Biscuit), before slowly decreasing (Figure 59C). In the intestinal compartment, the lipid content in the supernatant increased between 120 and 180 minutes, reaching a plateau before decreasing as well (Figure 59D). However, the increase was less marked for Biscuit, which had a significantly lower released lipid content than Custard at 180 minutes ($p = 0,025$).

The curves of starch release in the gastric compartment looked different from those observed for the two other macronutrients (Figure 59E). In this way, the solubilised starch content strongly increased during the first 90 minutes. This was likely due to the action of the salivary α -amylase during the oral phase. It would have measured released starch at the end of the oral phase to prove that starch solubilisation observed in the gastric compartment actually occurred during this very short step (2 minutes). However, since the salivary α -amylase is deemed inactive at acidic pH (Freitas & Le Feunteun, 2019), this assumption seems very likely. These results also highlight that the oral step had a huge effect on the food matrix integrity, even though it is the shortest phase of digestion. Moreover, the increase in lipid and protein release between 90 and 120 minutes could then also result from the preliminary action of the amylase. Indeed, by destabilizing the starch network, lipases and proteases may have acted more easily to solubilize lipids and peptides. Furthermore, differences could be observed between the three foods: starch solubilisation was significantly higher for Sponge cake during most of the gastric phase, whereas Biscuit presented the lower values above all (Figure 59E). At the peak (i.e. 90 minutes), the starch content in the soluble phase was more than 1.5 times higher for Sponge cake than for Biscuit, but this gap gradually disappeared during digestion. In the intestinal compartment, starch content in the soluble phase increased from 120 to 240 minutes, where it reached a peak, before decreasing rapidly (Figure 59F). Accordingly with the gastric compartment, Sponge cake presented the higher starch content in the soluble phase, as well 1.5 times the one of Biscuit after 240 minutes digestion.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

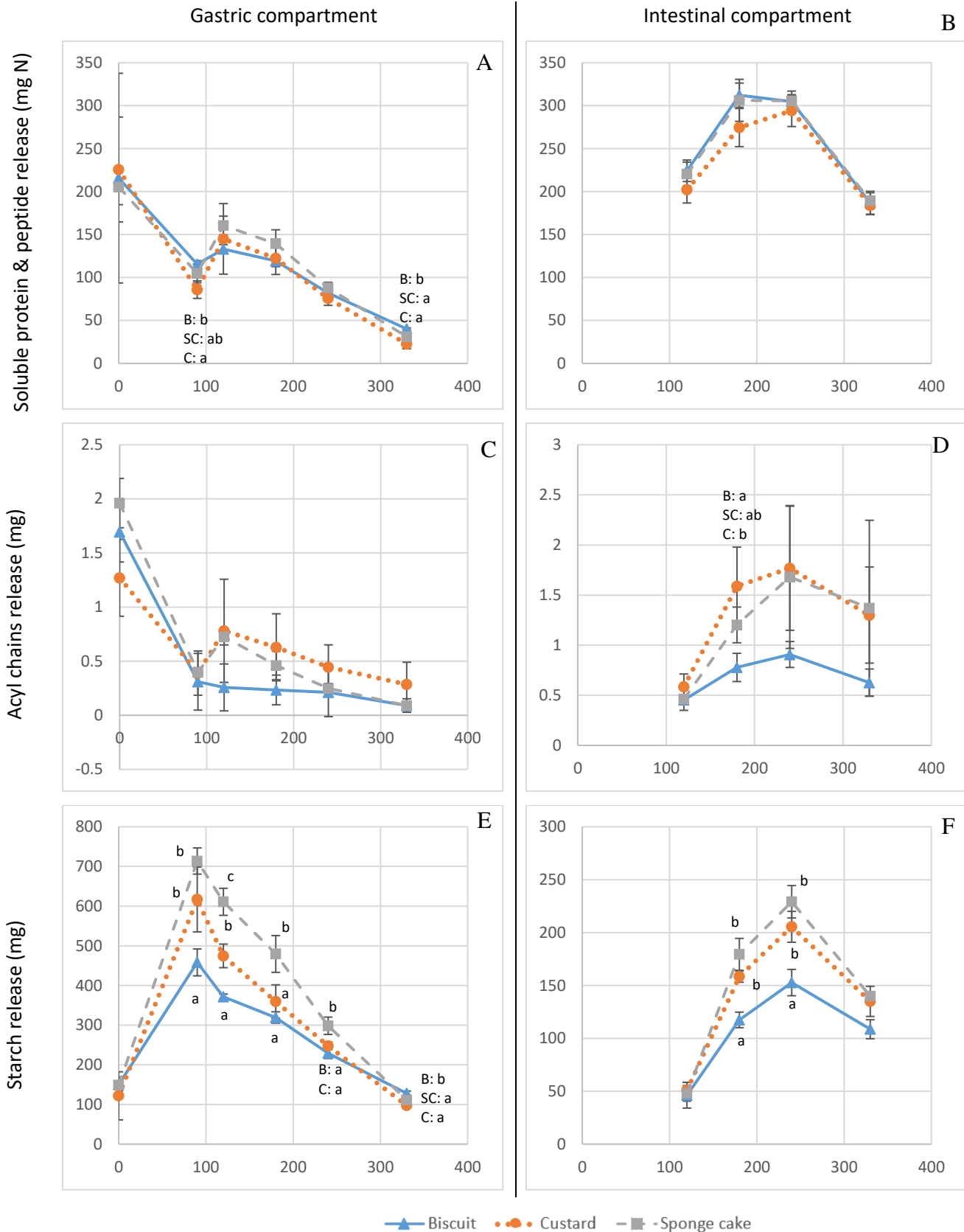


Figure 59 : Kinetics of matrix disintegration during *in vitro* dynamic digestion, as estimated by protein and peptide release (A and B), lipid release (C and D), and starch release (E and F) in the gastric (A, C and E) and intestinal (B, D and F) compartments. X-axis: Time (min). B = Biscuit, SC = Sponge cake, C = Custard. At a given time, significant differences between matrices are evidenced by different letters ($p < 0.05$).

IV.3.4.3 MACRONUTRIENT HYDROLYSIS DURING DIGESTION

The kinetics of macronutrient hydrolysis were assessed from the release of free amino groups, free fatty acids (FFA) and oligosaccharides (polymerization degree of 10 or less) in the supernatant throughout the two phases of *in vitro* digestion.

The amino group release curves were very similar in appearance to those of protein solubilisation, in both the gastric and intestinal compartments (Figure 60A and 52B), suggesting that protein solubilisation and hydrolysis are contemporaneous phenomena. A significant increase in the amino group content of the solubilized fraction from the first stage of the intestinal phase could be explained by the combined effect of bile salts and pancreatin addition. Such increase is typically observed during *in vitro* digestion (Minekus et al., 1995). However, regarding the proteolysis, the present results are not in agreement with literature in that, as for protein solubilisation, no significant difference was observed between the three food matrices, whereas kinetics of proteolysis or protein absorption are reported to be influenced by food microstructure (Barbé et al., 2013; Nyemb et al., 2016) and processing (Morell et al., 2017). Then, in this case, despite the strongly different structures generated by food processing, the action of gastric and pancreatic enzymes may have not be impacted, as it has already been observed by Luo et al. (2015).

A slight increase in FFA content was observed at the beginning of gastric digestion, which could be explained by the action of salivary lipase, after that FFA content tended to stagnate before decreasing (Figure 60C). No difference was observed between the three matrices in the gastric compartment. On contrast, most of FFA release occurred in the intestinal compartment, leading to a strong increase in FFA content at the beginning of the intestinal phase (Figure 60D), such as for free amino groups. This confirms a severe macronutrient hydrolysis during the intestinal phase due to the pancreatic enzymes, as observed by Corstens et al. (2018) and Giang et al. (2016). Moreover, lipolysis rate significantly differed between the three foods during the entire intestinal phase: Sponge cake presented significantly higher values of FFA content than Biscuit, Custard showing intermediate values. This suggests a lower accessibility of intestinal lipases to their substrates for Biscuit than for Custard and Sponge cake, since intestinal emptying rate was the same for all foods. The low lipolysis in Biscuit is in agreement with the results reported by Mat et al. (2016) who observed a slower rate of lipolysis in solid emulsions compared to liquid ones. However, it should be noted that the highest lipolysis was not observed for the liquid matrix (Custard), as one would be expected. The smaller median diameter of lipid droplets in Custard compared to Sponge cake (data not shown) does not allow to presume a higher accessibility of

the lipases to their substrate in Sponge cake compared with Custard. However, a recent *in vitro* digestion study carried out in a semi-dynamic model showed that the digestion of a liquid sample resulted in a phase separation due to creaming, unfavourable to lipolysis in comparison with a solid sample (Mulet-Cabero et al., 2017). Indeed, this could explain the slightly lower rate of lipolysis in Custard, since some creaming was actually observed in the gastric compartment.

Kinetics of oligosaccharide release differed from one food to another in the gastric phase (Figure 60E). For Sponge cake, a very significant increase of oligosaccharide content was observed after 90 minutes digestion, as a likely result of salivary amylase action during the oral phase, whereas the two other foods showed a slight (Custard) or strong (Biscuit) decrease. Although no hypothesis could be formulated to explain these discrepancies, this result was consistent with the starch release kinetics, in that the lowest starch release was observed for Biscuit, and the highest one for Sponge cake (Figure 60E). In the intestinal compartment, the oligosaccharide release curves (Figure 60F) were strictly similar to those of starch release (Figure 59F). An increase of oligosaccharide content was observed from 120 to 240 minutes digestion, meaning that the rate of amylolysis was higher than the one of gastric emptying (Figure 60F). The trend was reversed after 240 minutes digestion likely due to the acceleration of the intestinal emptying rate. Moreover, the kinetics differed between the foods. At 240 minutes digestion, as for lipolysis, Sponge cake presented significantly higher values of oligosaccharide release, whereas Biscuit had the lowest values.

In their native form, amylose and amylopectin chains lead to the build-up of pseudo-crystalline regions inside the starch granule that may sterically inhibit amylase access (Mishra, Hardacre, & Monro, 2012). Under the effect of technological treatments, starch can undergo physico-chemical modifications such as gelatinization that affect the organisation degree of starch, its subsequent ability to retrograde, and at the end its digestibility (Ai & Jane, 2018). The difference of amylolysis observed between Sponge cake and Biscuit could be explained by this biochemical mechanism as it has already been observed in various studies (Leeman, Östman, & Björck, 2005; Monro & Mishra, 2009; Nayak, Berrios, & Tang, 2014). The starch could indeed be in its more or less native form in the case of Biscuit due to the very low water content, whereas it could be gelatinized and retrograded in the Sponge cake. The slight difference between Sponge cake and Custard could then be explained by higher retrogradation in Custard.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

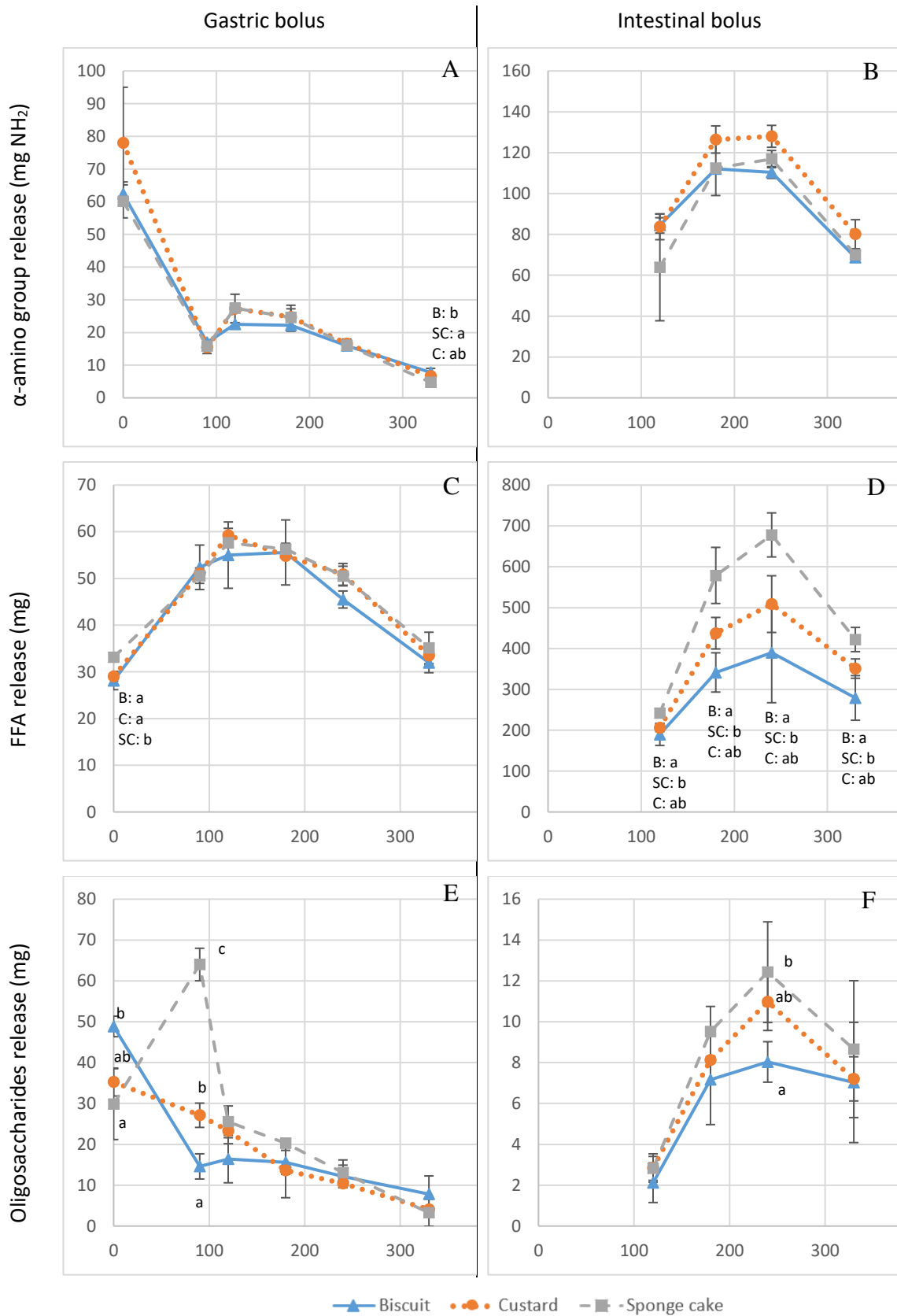


Figure 60. Kinetics of macronutrient hydrolysis during *in vitro* dynamic digestion, as estimated by free amino group release (A and B), free fatty acids release (C and D), and oligosaccharides release (E and F), in the gastric (A, C and E) and intestinal (B, D and F) compartments. X-axis: Time (min). B = Biscuit, SC = Sponge cake, C = Custard. At a given time, significant differences between matrices are evidenced by different letters ($p < 0.05$).

IV.3.4.4 MICRONUTRIENT RELEASE

Although both lutein and vitamin D are lipophilic, there were some differences in the kinetics of release of these two micronutrients. Lutein and vitamin D contents decreased during the gastric phase for the three foods, indicating that the amount of micronutrient released was low, or at least that it did not compensate for the loss caused by gastric emptying (Figure 61A and 57C). However, the strongest decreases for lutein and vitamin D were not observed for the same food. Lutein content in the soluble phase was significantly higher for Sponge cake than for Custard throughout all the gastric phase, whereas Biscuit presented overall intermediate values (Figure 61A). In contrast, the highest vitamin D content in the soluble phase was observed for Custard at 120 and 180 minutes, whereas the lowest values were observed for Biscuit, Sponge cake showing intermediate values (Figure 61C).

Different behaviours were observed between lutein and vitamin D during the intestinal phase as well (Figure 61B and 57D). Biscuit presented a much higher lutein release during all this phase and Custard the lowest values (Figure 61B); Sponge cake presented intermediate values during all the phase but was significantly lower than Biscuit at two digestion times (180 and 330 minutes). The ratios Biscuit/Custard and Sponge Cake/Custard in terms of lutein release were about 6.6 and 2.1, respectively. Regarding vitamin D, an opposite trend was observed with the lowest values of vitamin D release for Biscuit, and the highest ones for Custard, even if the three matrices did not significantly differ (Figure 61D). Throughout all the intestinal phase, the vitamin D release for Custard was 1.5 times the one of Biscuit, and 1.2 times the one of Sponge cake.

According to the matrix of Pearson's correlation (Supplementary Material 2), lutein release was strongly correlated with oligosaccharides (i.e. amylolysis) ($R^2 = 0.86$), whereas vitamin D release was positively correlated to lipid release and oligosaccharides ($R^2 = 0.50$ and 0.91 , respectively). Vitamin D and lutein releases were therefore obviously strongly correlated ($R^2 = 0.89$).

A recent review reported that the food matrix had no marked effect on the bioavailability of vitamin D (Borel et al., 2015). This is in agreement with the present results for *in vitro* bioaccessibility of vitamin D. To the best of our knowledge, few studies have been carried out on the impact of food microstructure on vitamin D bioaccessibility. One stated that the homogenisation of fresh cheese (i.e. the reduction of lipid droplet size) led to a decrease in vitamin D bioaccessibility, because of the formation of a strong protein network (Tosh & Dalglish,

1998) and so a lower accessibility of lipases to their substrate (Castaneda & Lee, 2019). In the present study, the trend was a higher vitamin D bioaccessibility for Custard, i.e. for the liquid food, compared to the solid ones. It could then be assumed that the presence of solid networks in these both Sponge cake and Biscuit could explain a lower vitamin D release. However, one must remember that difference between the food matrices was not statistically significant.

Regarding lutein, some parameters are known to improve its bioaccessibility, such as a smaller lipid droplet size (Reboul et al., 2006), a higher lipolysis, or the presence of lipids in the soluble phase (Tyssandier et al., 2003). However, none is in accordance with the present results. Therefore, it could be assumed that the lower bioaccessibility of lutein in Custard result from mechanisms of flocculation during the gastric phase, delaying lutein release. The lower bioaccessibility of lutein in Sponge cake compared with Biscuit could be explain by their difference in median particle size. The Biscuit producing smaller particles than the Sponge cake, this could have had an impact on the subsequent stages of digestion, as it was already observed by Cassady et al. (2009).

Furthermore, despite their common fat-solubility, the two micronutrients studied behave differently during the digestion. This could result from their vehicle substance. Indeed, vitamin D bioavailability has been proved inferior when provided in a powder-vehicle rather than in an oil form, without explanation about the mechanisms leading to this conclusion (Grossmann & Tangpricha, 2010). Since vitamin D supplementation in the three foods is in powder form while the one of lutein is in oily form, this could explain why the two fat-soluble micronutrients studied here showed different behaviour during their digestion

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

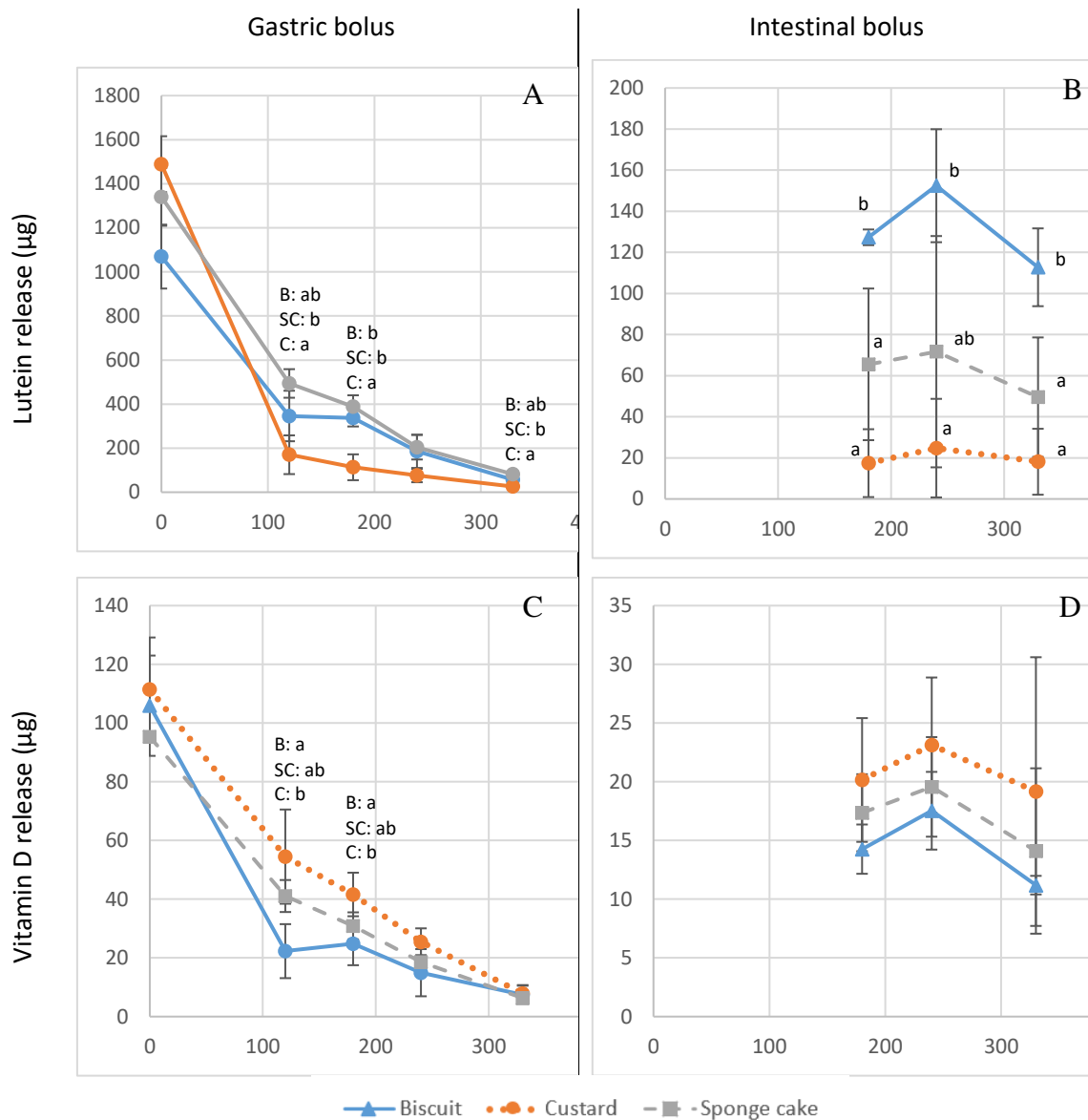


Figure 61 : Kinetics of lutein (A and B) and vitamin D (C and D) release during *in vitro* dynamic digestion in the supernatant in gastric (A and C) and intestinal (B and D) compartments. X-axis: Time (min). B = Biscuit, SC = Sponge cake, C = Custard. At a given time, significant differences between matrices are evidenced by different letters ($p < 0.05$).

IV.3.4.5 FOOD MATRIX EFFECT ON DIGESTION

The effect of food matrix and digestion time on macronutrient release and hydrolysis, and micronutrient release was tested by ANOVA. Based on the linear model analysis, all the variables tested significantly changed with food matrix, except protein release, and as expected with digestion time (Table 23). These data thus strengthen the analysis of the kinetics curves presented above, and demonstrate that food matrix had an impact on the digestion process. Since the three food matrices only differed in their structure, it is then reasonable to assume that the differences highlighted in the present study, regarding food disintegration and nutrient release, resulted from the effect of food structure on the digestion process.

Table 23 : Statistical significance of variables “Food” and “Time” on characteristics of the *in vitro* digesta, model R², and p-value of the linear model.

	Food	Time	Food * Time	R ²	p-value
Lutein	***	***	***	0.9803	<2.2e ⁻¹⁶
Vitamin D	***	***	NS	0.9329	<2.2e ⁻¹⁶
Proteins	NS	***	NS	0.8961	<2.2e ⁻¹⁶
Amino group	***	***	*	0.9711	<2.2e ⁻¹⁶
Lipids	***	***	NS	0.728	3.7e ⁻¹³
FFA	***	***	***	0.9648	<2.2e ⁻¹⁶
Starch	***	***	***	0.9774	<2.2e ⁻¹⁶
Oligosaccharides	***	***	***	0.9512	<2.2e ⁻¹⁶

* Significant effect at p < 0.05; *** significant effect at p < 0.001; NS, no significant effect.

In order to highlight correlations between food matrix and all the characteristics measured on the digestas, a Multiple Factor Analysis (MFA) was completed (Figure 62). Given the small number of individuals, the first two principal components (PCs) account for a cumulative variability of 100%. PC1 (55.06 % of the variability) is positively correlated to vitamin D release, proteolysis and lipid release, and negatively correlated to lutein and protein release. PC2 (44.94 % of the variability) is positively correlated to lutein, protein and starch release, lipolysis and amylolysis, and negatively correlated to proteolysis. The significant correlation coefficients of variables at a given digestion time with the two first PCs are given in Supplementary material 3.

This multifactorial analysis highlights the major differences between the three foods (Figure 62). Regarding the variables that are indicators of matrix disintegration, the food coordinates on PC1 show that Custard is characterized by a higher lipid release than Sponge cake and Biscuit, whereas Biscuit and Sponge cake are characterized by a higher protein release than Custard. As indicated by coordinates on PC2, Sponge cake is characterized by a higher starch release than Biscuit and Custard. Regarding the variables that are indicators of macronutrient hydrolysis, the food coordinates on PC1 and PC2 indicate that Custard is characterized by a higher proteolysis than Sponge cake and Biscuit, whereas Sponge cake is characterized by higher lipolysis and amylolysis than Biscuit and Custard. Lastly, regarding the micronutrient release, Biscuit, and to a lesser extent Sponge cake, is characterized by a high lutein release, whereas Custard is rather associated with a high vitamin D release. All these conclusions are consistent with the kinetics curves shown in Figure 59, Figure 60 and Figure 61.

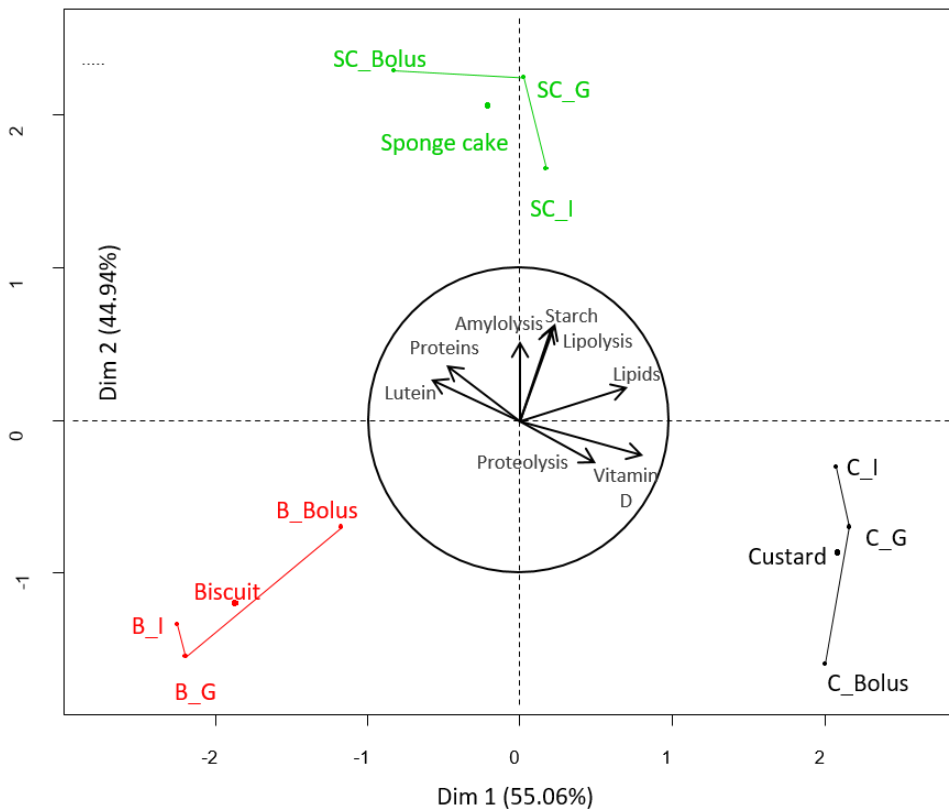


Figure 62 : MFA map of the individuals for the three foods during *in vitro* digestion. Lines illustrate the changes of individuals coordinates throughout the three phases of digestion: oral (Bolus), gastric (G) and intestinal (I) for Biscuit (B), Sponge cake (SC) and Custard (C). G and I coordinates are mean of food behaviour during all the corresponding phase. The circle in the middle of the map represents the projection of the reduced centred variables on the plane defined by the first two principal components of the PCA.

The bolus points for the three foods are placed far apart (Figure 62). As the bolus only differed by their mastication and their structure, it could mean that the food structure has an impact already during the oral phase. The distance between the partial points for a given food matrix, especially between the bolus point (Bolus) and the gastric point (G) shows that significant changes occurred during the first period of digestion, including the oral phase and the beginning of the gastric phase (Figure 62). The first moments of digestion then appear as an important step of the digestion process, impacting the subsequent phases. There is also a certain distance between the gastric point (G) and the intestinal point (I) for a given food that highlights the changes are continuing throughout the digestion process. Moreover, it should be noted that the changes from one point to the next, i.e. from one step of digestion to the next, do not follow the same pattern for the three food matrices. This confirms that the digestion process does not go similarly for the three foods. Then, as previously assumed, it can be concluded that the food structure impacts the

process digestion. However, the multiplicity of correlations with the two PCs does not make it possible to describe more precisely the digestion pathways for the three foods.

IV.3.5 CONCLUSION

The objective of this study was to compare the behaviour, over dynamic *in vitro* digestion, of three food products with identical composition but produced using different processes, leading to a range of structural properties, from a hard solid to a thick liquid. In order to investigate the fate of lipophilic micronutrients embedded in these food matrices, the products were enriched with vitamin D and lutein. The progress of digestion was assessed by measuring (i) matrix disintegration (release of proteins, lipids, and starch), (ii) macronutrient hydrolysis (proteolysis, lipolysis, and amylolysis), and (iii) micronutrient release. The use of *in vivo* data to set up both the mastication and digestion simulators has allowed imitating as closely as possible the process of human digestion.

Taken together, the results demonstrate a clear effect of the food matrix on both the kinetics of food disintegration and macronutrient hydrolysis, and on micronutrient release as well. Since the three food products tested only differed in structure, it can be said that the impact of food structure on the digestion process is thus established, at least for the three specific food products in question. However, another conclusion is that the food effect depends on the digestion step and on the criterion. As an example, lipolysis significantly differed for the three foods during the intestinal phase, but not during the gastric phase. Likewise, the lutein release significantly differed for the three foods during the intestinal phase, but not the vitamin D release. Therefore, the underlying mechanisms are very likely complex, digestion step-dependent, and nutrient-dependent. The way ahead is then still long until the behaviour during digestion of a given food can be predicted based on its characteristics.

Acknowledgement

The authors thank Liot (Pleumartin, France) and Sotexpro (Bermericourt, France) for providing raw ingredients (egg powders and pea flour respectively). This work was supported by Brittany Council, National Institute of Agricultural Research and Carnot Qualiment.

IV.3.6 SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material 1. Gastric emptying half-time ($t_{1/2}$) calculated for the three foods for each micronutrient.

	Vitamin B9 (min)	Vitamin D (min)	Lutein (min)	Mean (min)
Biscuit	234 ± 24 ^a	250 ± 35 ^a	243 ± 44 ^a	242 ± 35 ^b
Sponge cake	217 ± 16 ^a	229 ± 38 ^a	218 ± 39 ^a	220 ± 32 ^a
Custard	229 ± 26 ^a	221 ± 45 ^a	196 ± 48 ^a	215 ± 42 ^a

Differences between foods are evidenced by different letters ($p < 0.05$).

Supplementary material 2. Matrix of Pearson's correlations: significant correlation coefficients between variables. In green = high positive correlation ($R^2 > 0.5$).

Amino Group	0.03						
FFA	-0.32	0.86					
Lipids	0.50	0.66	0.52				
Oligosaccharides	0.91	-0.08	-0.37	0.36			
Proteins	0.15	0.94	0.76	0.65	0.08		
Starch	0.14	-0.38	-0.33	-0.23	0.32	-0.19	
Lutein	0.89	-0.07	-0.42	0.32	0.86	0.08	0.15
Vitamin D		Amino Group	FFA	Lipids	Oligosaccharides	Proteins	Starch

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

Supplementary material 3. Multiple Factor Analysis: significant correlation coefficients of variables at a given sampling time with PC1 and PC2. Blank = non-significant. In green = high positive correlation ($R^2 > 0.75$). In red = high negative correlation ($R^2 < -0.75$). In black: $-0.75 < R^2 < -0.5$ and $0.5 < R^2 < 0.75$

		Lutein	Vitamin D	Amino Group	Proteins	FFA	Lipids	Oligosaccharides	Starch
PC1	Bolus	0,97		0,85	0,57		-0,68	-0,63	-0,92
	G90			-0,92	-1,00	-0,63	0,78		0,54
	G120	-0,62	0,98	0,80		0,98	0,87	0,66	
	G180	-0,82	1,00	0,84		-0,58	0,98		
	G240	-0,84	1,00	0,98	-0,58	0,85	0,96	-0,72	
	G330	-0,63			-0,99		0,91	-0,84	-0,99
	I120				-0,97		0,93	0,83	1,00
	I180	-0,99	0,99	0,92	-0,96		0,99		0,58
	I240	-0,97	1,00	1,00	-0,88		0,87	0,59	0,60
	I330	-0,96	1,00	0,95	-0,60		0,77		0,72
PC2	Bolus		-0,91	-0,52	-0,82	1,00	0,73	-0,78	
	G90					-0,77	0,63	0,99	0,84
	G120	0,79		0,60	0,94		0,50	0,75	0,94
	G180	0,57		0,54	1,00	0,82		0,93	0,99
	G240	0,54			0,82	0,53		0,70	0,99
	G330	0,78	-0,93	-0,95		0,91		-0,55	
	I120			-1,00		0,98		0,56	
	I180					0,95		0,95	0,82
	I240					0,95	0,50	0,81	0,80
	I330				0,80	0,91	0,64	1,00	0,69

IV.4 SUIVI DE LA DÉSINTÉGRATION DES MATRICES AU COURS DES DIGESTIONS *IN VITRO* EN MODÈLE DYNAMIQUE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE

IV.4.1 INTRODUCTION

La microscopie confocale (ou CLSM, Confocal Laser Scanning Microscopy) est une technique d'imagerie permettant de visualiser des composants de l'ordre d'une dizaine de micromètres dans un plan précis à l'intérieur de l'échantillon, toute lumière parasite située hors de ce plan focal étant défocalisée. Il est ainsi possible de faire varier ce plan focal pour obtenir une succession de coupes optiques, donnant des informations dans les trois dimensions de l'objet étudié. La lumière d'un laser est focalisée par une lentille sur l'objet à étudier, et la lumière réfléchie (ou fluorescente) est focalisée sur un photodétecteur après passage dans un séparateur de faisceau. Les signaux électriques générés par le détecteur sont traités électroniquement et stockés. Les données peuvent ensuite être manipulées à l'aide d'un logiciel spécialement conçu à cet effet (Sheppard, 1999).

La CLSM est utilisée en sciences des aliments depuis les années 80 pour étudier la relation entre la composition, la transformation et les propriétés finales d'un produit alimentaire (Blonk & van Aalst, 1993). Puisque les images sont converties en données numériques, le traitement de ces dernières par le biais d'algorithmes et de logiciels spécialisés tels qu'Image J permet de mesurer des composants tels que les gouttelettes lipidiques, les bulles d'air ou bien les agrégats de protéines. De nombreuses études ont ainsi montré que cette technique était un outil performant pour observer et quantifier la microstructure des aliments (Dürrenberger, Handschin, Conde-Petit, & Escher, 2001; Lynn & Cochrane, 1997). Elle est de ce fait de plus en plus utilisée pour suivre la désintégration de la structure des aliments durant des processus dynamiques tels que la digestion (de Oliveira et al., 2017), le séchage (Sootitawat et al., 2007) ou la fermentation (Jha et al., 2015), en appui aux méthodes de dosages biochimiques usuelles.

Afin de pouvoir étudier de manière visuelle l'impact de la structure des matrices sur leurs cinétiques de désintégration, la désintégration des matrices a été suivie par CLSM au cours de leur digestion *in vitro* dynamique.

IV.4.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les observations CLSM ont été réalisées avec un microscope confocal LSM 880 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) avec un objectif 63x (objectif Plan Apochromat, 1,4 Oil DIC M27).

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

Deux cents μL d'échantillon ont été incubés durant 10 minutes à 20 °C avec 18 μL de Red Nile 0,1 % et 6 μL de Fast Green 1 % (Sigma Aldrich, St Louis, USA), marquant respectivement les protéines et les lipides. Afin de figer l'échantillon, 20 μL d'échantillons marqués ont été mélangés avec 20 μL d'agarose LMP 0,5 %, puis 20 μL de ce mélange ont été déposés sur une lame de microscopie.

Les images présentées dans cette section correspondent à la superposition de deux images provenant de la même zone et observées séparément avec les deux sondes. Les protéines apparaissent en vert et les lipides en rouge. Les zones noires traduisent la présence d'air (bulles) ou de phase aqueuse. Les images présentées sont des mosaïques composées de 16 images chacune.

Des échantillons prélevés à cinq temps de digestion ont été observés au cours de chaque digestion : le bol juste avant ajout de la salive et des échantillons prélevés en sortie des compartiments gastrique et intestinal à 180 et 330 minutes de digestion, respectivement nommés B, G180, G330, I180 et I330. Les échantillons ont été observés immédiatement après prélèvement, sans aucun traitement de centrifugation ou congélation. Pour chaque matrice, les 3 répétitions de digestion ont été suivies par microscopie. Les images présentées ci-dessous ont été considérées comme représentatives des 3 digestions.

Les photos représentant les matrices sont extraites de la section IV.2.4.1.

IV.4.3 RÉSULTATS

Les images de microscopie confocale sont présentées en [Figure 63](#). Les différences entre les trois aliments au stade Matrice ont été détaillées en section IV.2.4.1. Brièvement, le Biscuit et la Génoise présentent un tapis protéique suggérant la présence d'un réseau de protéines, probablement mêlé à l'amidon, alors que la Crème présente des particules d'environ 50 μm de diamètre, suggérant une agrégation des protéines au cours de son procédé de cuisson. De larges flaques de lipides sont observées dans le cas du Biscuit, alors que les lipides semblent être diffus dans la Génoise. Dans la Crème on observe une majorité de petites gouttelettes lipidiques, même si quelques grosses gouttelettes sont également visibles.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion *in vitro*

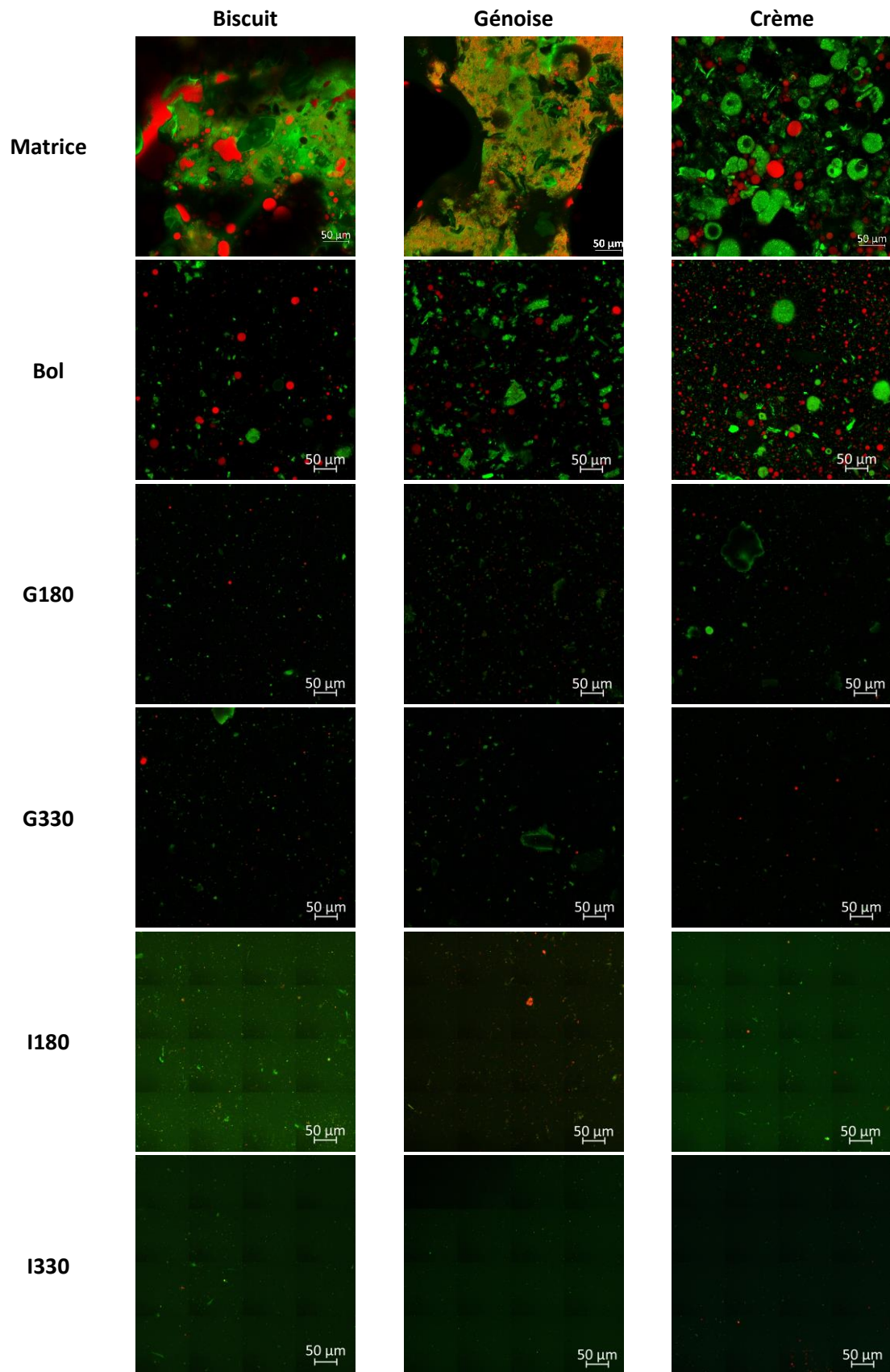


Figure 63 : Images en microscopie confocale des trois matrices (Biscuit, Génoise et Crème) avant digestion (Matrice), après mastication (Bol) et au cours de leur digestion *in vitro* dynamique dans les compartiments gastrique (G180, G330) et intestinal (I180 et I330). Les protéines apparaissent en rouge, les lipides en vert.

Approche mécanistique de la digestion : impact de la structure des matrices sur leur désintégration et la libération des micronutriments au cours de la digestion in vitro

La structure de la Crème dans le Bol est semblable à celle observée au stade Matrice. En effet, du fait de sa nature liquide, la Crème n'a pas été soumise à la mastication. On observe en revanche des différences de structure pour la Génoise et le Biscuit. Notamment, le réseau protéique est rompu dans ces deux matrices et les lipides qui semblaient diffus dans la Génoise forment maintenant des gouttelettes éparses. Les flaques de lipides observées dans le Biscuit forment également des gouttelettes plus petites. Les particules protéiques sont de taille plus importante dans la Génoise par rapport au Biscuit. Cela pourrait résulter d'une différence de fragmentation lors de la mastication, le Biscuit, plus dur et friable que la Génoise, ayant en effet produit des particules de taille plus petite lors de la mastication.

À partir de la phase gastrique, on observe un nombre considérablement plus faible de gouttelettes lipidiques et de particules protéiques, et ce pour les trois matrices. Cette diminution globale du signal résulte de la forte dilution des aliments dès le compartiment gastrique, les points de prélèvements étant de plus tardifs (3h et 5h30 de digestion). Toutefois, alors que des agrégats protéiques de très petite taille sont encore visibles après 180 minutes de digestion (G180), on peut noter une quasi disparition des gouttelettes lipidiques. Cela pourrait résulter du phénomène de crémage qui a été observé dans le compartiment gastrique dès les premières minutes de digestion dynamique (non présenté ici).

Aucune différence n'est observée entre les photos du Biscuit et de la Génoise, que ce soit au stade G180 ou G330. Pour une même matrice, on observe également peu de différences entre les échantillons G180 et G330. Il semblerait en revanche que les agrégats protéiques soient de taille plus importante à G180 dans la Crème par rapport aux deux autres matrices. On observe ensuite une diminution de la taille de ces agrégats entre les points G180 et G330. Il semblerait également que la teneur en protéines soit plus faible à G330 dans le cas de la Crème par rapport au Biscuit. Cela pourrait être une conséquence de la vidange gastrique plus rapide pour cette matrice ($t_{1/2}$ plus faible dans le cas de la Crème).

En phase intestinale, on observe une disparition des lipides identique à celle observée durant la phase gastrique. Pour les protéines, un tapis diffus semble exister pour les trois matrices à I180. Ce tapis pourrait être constitué de petits peptides, résultant de l'hydrolyse des protéines par la pepsine puis la trypsine et chymotrypsine.

À l'instar de ce qui a été observé en phase gastrique, peu de différences sont observées entre les photos des trois matrices, que ce soit en I180 ou en I330, ni même pour une matrice entre les deux points de prélèvements intestinaux.

Ces images sont malgré tout très difficiles à interpréter, en raison du faible nombre de particules observées dès le premier point gastrique, et ce malgré le fait qu'une mosaïque de 16 photos soit présentée ici pour chaque échantillon. Cela n'a pas permis de réaliser une analyse d'image par algorithme. Les observations décrites ici sont donc uniquement qualitatives.

IV.4.4 CONCLUSION

L'étape de mastication a, comme on pouvait s'y attendre, un fort impact sur la structure des bols par rapport aux matrices à partir desquelles ils ont été préparés. Cet impact pourrait se perpétuer tout au long de la digestion, en modulant en premier lieu la fragmentation des particules résiduelles dans l'estomac (Kong, Oztop, Singh, & McCarthy, 2013; Kong & Singh, 2009), la diffusion des enzymes gastriques (Singh et al., 2015) ou bien le temps de vidange gastrique (Barbé et al., 2013; Guo et al., 2015), comme cela a pu être observé dans les études précédentes.

Hormis pour les échantillons *Matrice* et *Bol*, peu de différences ont été observées entre les trois matrices tout au long du déroulement de la digestion. Les observations n'ont donc pas pu être reliées aux résultats observés par les dosages biochimiques.

Le faible nombre d'éléments observables, dû à la dilution importante des échantillons par les enzymes et fluides digestifs, ne permet en outre pas de conclure quant à la représentativité des photos réalisées par rapport à la totalité de l'échantillon. Afin de contourner cette difficulté, on pourrait envisager d'augmenter la taille de la mosaïque, afin de couvrir une surface plus importante de l'échantillon et donc observer plus d'éléments. Une autre solution pourrait être de prélever des échantillons dans les phases plus précoces de la digestion, où la dilution sera donc moins importante. Dans tous les cas, il sera difficile, voire impossible d'analyser les échantillons de milieu et fin de digestion par la technique de CLSM, sauf à envisager de les concentrer par lyophilisation par exemple. Mais cela nécessiterait d'étudier préalablement l'impact de cette technique sur la structure des agrégats protéiques et gouttelettes lipidiques dans nos échantillons.

IV.5 CONCLUSION

Les études de digestion *in vitro* réalisées au cours de ce travail de thèse, l'une en conditions statiques et l'autre en conditions dynamiques, visent à reproduire autant que faire se peut les conditions physiologiques de la digestion humaine, par un paramétrage des outils sur la base de données collectées *in vivo* extraites soit de la littérature (digestion statique), soit plus spécifiquement de l'étude clinique conduite avec les mêmes matrices alimentaires que celles étudiées *in vitro* (digestion dynamique). Elles nous ont permis d'une part de confirmer l'effet de la matrice sur le déroulement de la digestion, et d'autre part de mettre en lumière certains comportements spécifiques à certaines matrices et/ou à certaines phases de la digestion et/ou à certains nutriments. Ces résultats viennent ainsi fournir un éclairage complémentaire aux résultats obtenus *in vivo* en termes de biodisponibilité des micronutriments incorporés à ces mêmes matrices (Chapitre III). Les résultats majeurs issus de ces études *in vitro* sont rappelés ci-dessous.

RESULTATS MAJEURS

- La structure des aliments module la cinétique de libération et d'hydrolyse des macronutriments.
- La bioaccessibilité des micronutriments est influencée par la matrice-vecteur de façon quantitative et cinétique.
- Le comportement et le devenir d'un aliment au cours de la digestion sont influencés par sa structure.
- L'utilisation conjointe de simulations de mastication et de digestion dynamique a permis de reproduire de manière plus physiologique les conditions de la digestion humaine.

La nature des matrices alimentaires étudiées s'est avérée avoir un impact majeur sur les cinétiques à la fois de désintégration de ces aliments et d'hydrolyse des macronutriments. Dans notre étude, les matrices ne se distinguaient que par leur structure, leur composition sur extrait sec étant identique et les différences de teneurs en eau ayant été compensées par ajout d'eau

dans les bols de digestion. On peut donc en conclure que les différences observées tout au long des digestions *in vitro* découlent de ces différences de structure. Toutefois, toutes les classes de macronutriments ne semblent pas impactées au même niveau. Ainsi, dans le cas spécifique des produits modèles étudiés ici, la désintégration de la trame amylacée des matrices, ainsi que l'hydrolyse des lipides paraissent particulièrement impactées par la structure de l'aliment, et dans tous les cas beaucoup plus que ne le sont les protéines. Ainsi, dans la première étude sur modèle statique, la lipolyse était quatre fois plus élevée pour le Biscuit que pour la Crème. En modèle dynamique, la lipolyse était particulièrement impactée par la structure de l'aliment en phase intestinale, alors que les cinétiques de libération de l'amidon et d'amylolyse montraient un impact de la structure de l'aliment à la fois en phases gastrique et intestinale.

La bioaccessibilité des micronutriments incorporés dans les aliments est également influencée par la matrice-vecteur, à la fois de façon quantitative et cinétique. Ces différences dépendent toutefois du micronutriment en question, et de l'étape de la digestion considérée. Pour la vitamine B9, une libération plus rapide a été observée en modèle statique dans le cas du Biscuit et de la Génoise alors que la lutéine présentait une bioaccessibilité finale plus élevée avec la Crème (55 % contre 25 % pour les trois autres matrices). En modèle dynamique cette fois, la bioaccessibilité de la lutéine était 6,6 fois plus élevée pour le Biscuit par rapport à la Crème, alors que la Crème présentait une bioaccessibilité de la vitamine D 1,5 fois supérieure à celle du Biscuit.

L'analyse statistique multidimensionnelle des données collectées au cours des digestions *in vitro* a permis par ailleurs de caractériser chacune des étapes de la digestion, en cohérence avec les données de la littérature et de déterminer les moments-clés ayant le plus d'impact sur la digestion des aliments. Ainsi, l'étape gastrique apparaît essentiellement comme une étape de solubilisation des macronutriments, alors que leur hydrolyse intervient surtout à l'étape intestinale. Mais le comportement et le devenir des aliments au cours de leur digestion n'en sont pas moins fortement influencés par leur structure initiale. En d'autres termes, tous les aliments ne suivent pas exactement le même « chemin » au cours de la digestion, ce qui aboutit, au-delà des aspects quantitatifs de bioaccessibilité, à des cinétiques variables de libération des nutriments.

Chapitre V. Discussion générale et perspectives

V.1	La structure des aliments influence effectivement le processus de digestion et la biodisponibilité des nutriments.....	228
V.2	Quelques pistes d'amélioration des modèles de digestion <i>in vitro</i>	231
V.2.1	Rendre la phase de mastication plus réaliste.....	231
V.2.2	Des systèmes de digestion gastro-intestinale <i>in vitro</i> encore loin de la réalité physiologique	232
V.2.3	Développement de modèles mathématiques	235
V.3	Des divergences marquées entre les différents modèles d'étude.....	237
V.4	Encore trop peu d'études <i>in vivo</i> disponibles pour valider la pertinence des modèles <i>in vitro</i>	241
V.4.1	Les glucides.....	241
V.4.2	Les lipides	241
V.4.3	Les protéines	242
V.4.4	La vitamine B12	242
V.4.5	La vitamine B9	242
V.4.6	La lutéine	243
V.4.7	La vitamine D	243
V.5	Vers une plus grande pertinence globale des modèles de digestion.....	245

V.1 LA STRUCTURE DES ALIMENTS INFLUENCE EFFECTIVEMENT LE PROCESSUS DE DIGESTION ET LA BIODISPONIBILITÉ DES NUTRIMENTS

Le projet MicroNut visait à explorer l'impact de la structure d'aliments complexes enrichis en micronutriments sur leur devenir au cours de la digestion, et notamment sur la biodisponibilité des micronutriments. L'originalité de ce projet réside dans le fait d'avoir utilisé plusieurs modèles de digestion (*in vivo*, *in vitro* statique et dynamique) afin d'exploiter les avantages de chacun et d'obtenir une vision globale des mécanismes de digestion. Les résultats obtenus confirment l'intérêt de coupler ces différentes approches afin de concourir à un objectif commun : observer et décrypter une partie des phénomènes de digestion des macronutriments et de libération des micronutriments.

Pour mener à bien cette étude, il a tout d'abord fallu développer quatre aliments de composition identique sur matière sèche et enrichis de manière à ce qu'une portion consommée lors de l'étude clinique apporte 20 mg de lutéine, 1250 µg de vitamine D, 1000 µg de vitamine B9 et 12 µg de vitamine B12. L'utilisation de différents schémas technologiques, associée à des teneurs en eau variables, a permis d'obtenir quatre structures/textures très différentes : un Biscuit, une Génoise, un Flan et une Crème. Leur observation par microscopie confocale a mis en évidence leurs différences en termes de microstructure, notamment en ce qui concerne la répartition protéines/lipides et la taille des gouttelettes lipidiques. Au-delà de notre étude, nous pensons que ces quatre matrices modèles pourraient s'avérer finalement de bons outils pour approfondir la question du lien entre structure de l'aliment et déroulement de la digestion, quel que soit l'angle d'observation et d'analyse choisi. Ces produits offrent en effet plusieurs avantages : ils couvrent une large gamme de structures très différentes, ils sont très proches d'aliments réels, ils contiennent les trois classes de macronutriments, ils peuvent aisément inclure des composés d'intérêt variés (micronutriments autres que ceux étudiés ici, composés bioactifs, probiotiques...), et sont faciles à produire.

La stratégie employée a consisté ensuite à établir la « preuve de concept », c'est-à-dire démontrer *in vivo* l'impact de la structure de l'aliment sur la biodisponibilité des micronutriments. Cela a pu être fait grâce à l'étude clinique réalisée sur un panel de douze jeunes hommes sains. Ainsi, la biodisponibilité de la vitamine D est plus élevée avec la Génoise qu'avec le Biscuit. Ces résultats pourraient s'expliquer par la taille des gouttelettes lipidiques, observée sur les images de microscopie confocale. Dans le cas de la Crème, les gouttelettes lipidiques de petite taille seraient

plus facilement lipolysées, ce qui permettrait donc une meilleure absorption des triglycérides et de la vitamine D. Au contraire, dans le Biscuit, les gouttelettes lipidiques de plus grand diamètre seraient lipolysées plus lentement, ce qui ralentirait l'absorption de la vitamine D. Ces différences en termes d'absorption maximale suggèreraient un phénomène d'absorption ou de clairance des chylomicrons différent.

En ce qui concerne la vitamine B9, on constate que les biodisponibilités les plus faibles sont obtenues avec les deux aliments les plus extrêmes en terme de rhéologie, à savoir le Biscuit et la Crème, ce qui pourrait résulter respectivement d'une plus faible désintégration de la matrice et d'une vitesse accrue de la vidange gastrique. Quant à l'absence de résultats probants sur la biodisponibilité de la vitamine B12, elle pourrait résulter de plusieurs phénomènes : une dose d'enrichissement trop faible pour une population non carencée ou bien encore une modulation du mécanisme d'absorption de la vitamine B12 dans le cas d'un apport multi-supplémenté en vitamines B9 et B12. Mais si la démonstration de l'effet de la structure de l'aliment a été faite, au moins pour trois des quatre micronutriments étudiés ici, il n'en reste pas moins que cette étude clinique, comme la plupart des études *in vivo* chez l'Homme, a un fonctionnement en « boîte noire » : on ne peut que constater les conséquences métaboliques finales (ici la biodisponibilité des micronutriments et quelques marqueurs physiologiques globaux), sans accès aux différentes étapes de la digestion. On ne peut donc qu'émettre des hypothèses sur les mécanismes qui se sont opérés au cours de la digestion, et il est difficile de conclure quant à leur pertinence.

La partie de l'étude portant sur l'aspect masticatoire a permis par ailleurs de caractériser les bols alimentaires formés par les volontaires lors de la mastication de deux des aliments solides et de mettre ainsi en évidence l'effet de la structure des aliments sur la première étape de la digestion qu'est la phase orale. Les différences observées portaient en particulier sur la taille médiane des particules et leurs courbes de distribution de taille. Cette partie de l'étude souligne ainsi qu'il est nécessaire de porter attention à cette première étape de la digestion, lorsqu'on cherche à la reproduire *in vitro*.

Dans un deuxième temps, deux approches de digestion *in vitro* (en modes statique et dynamique) ont été utilisées pour caractériser de manière approfondie le devenir des nutriments aux différents stades du processus de digestion (phases orale, gastrique et intestinale). Combinées à un grand nombre de techniques d'analyse portant sur l'ensemble des classes de nutriments, à différentes échelles (macro ou microscopique) et de manière quantitative ou qualitative, elles ont permis d'approfondir l'impact de la structure des aliments sur les cinétiques de libération des

macronutriments dans la phase soluble, d'hydrolyse des macronutriments et de libération des micronutriments.

La première étude *in vitro*, en mode statique, a permis de faire un screening entre les quatre matrices afin de choisir celles qui présentaient le plus d'intérêt pour l'étude en digestion dynamique. En effet, pour des raisons budgétaires et logistiques, seuls trois aliments ont pu être digérés sur modèle *in vitro* dynamique. C'est ainsi que le Flan, dont les résultats étaient proches de ceux de la Crème en digestion *in vitro* statique, n'a pas été conservé pour la suite de l'étude. L'étude sur modèle statique a également permis de décomposer le processus de digestion, de caractériser chacune de ses étapes (la phase gastrique se définit avant tout par la solubilisation des macronutriments, alors que la phase intestinale est essentiellement une phase d'hydrolyse) et de mettre en avant les moments-clés ayant le plus d'impact sur le devenir du repas.

Pour les expérimentations de digestion *in vitro* en mode dynamique, nous avons choisi d'utiliser les résultats de l'étude clinique pour paramétrer les simulateurs. Au stade de la mastication, nous nous sommes attachés à reproduire des bols alimentaires à l'identique des bols *in vivo*. Au stade de la digestion gastro-intestinale, nous avons choisi d'imposer des vitesses de vidange gastrique estimées à partir des données *in vivo*. Au travers de ces paramétrages, nous avons pour objectif de reproduire le plus fidèlement possible la digestion humaine, et d'affiner ainsi les résultats obtenus en mode statique. À notre connaissance, c'est ainsi la première fois qu'un simulateur de mastication a été associé à un simulateur de digestion dynamique pour étudier la digestion d'aliments complexes. L'impact de la structure des aliments sur la libération des micronutriments dans le surnageant de digestion, et donc leur bioaccessibilité, a été effectivement confirmé par l'étude de digestion *in vitro* dynamique, tout comme elle l'avait d'ailleurs été en modèle statique. De plus, les différences de comportement entre les quatre matrices au cours de leur digestion ont été mises en avant, à la fois en modèles statique et dynamique. Toutefois, les différences observées entre les résultats de ces deux approches *in vitro* montrent l'importance, pour le devenir digestif des aliments, de certains des phénomènes physiologiques de régulation qu'on peut essayer de reproduire en digestion *in vitro* dynamique, comme l'acidification progressive dans le compartiment gastrique ou la vidange gastrique. Quoiqu'il en soit, les modèles de digestion *in vitro* actuels, comme ceux que nous avons mis en œuvre, restent perfectibles. Et certaines observations que nous avons pu faire au cours de ce travail nous conduisent à émettre quelques pistes pour leur amélioration.

V.2 QUELQUES PISTES D'AMÉLIORATION DES MODÈLES DE DIGESTION *IN VITRO*

V.2.1 RENDRE LA PHASE DE MASTICATION PLUS RÉALISTE

La conduite d'études de digestion *in vitro* d'aliments solides nécessite préalablement une étape de fragmentation visant à réduire la taille des particules alimentaires. Cette étape est primordiale pour pouvoir simuler correctement le processus de mastication et la digestion gastro-intestinale subséquente. À ce jour, peu d'études ont été menées pour investiguer l'effet d'une moindre fragmentation de l'aliment sur l'efficacité digestive. On peut citer l'étude clinique réalisée par Cassady et al. (2009) sur treize individus sains, et portant sur l'impact du nombre de cycles de mastication sur la bioaccessibilité des lipides, la satiété et la réponse hormonale au repas. Ces auteurs ont montré qu'après un nombre limité de cycles de mastication (mastication incomplète), la bioaccessibilité des lipides, déterminée à partir du contenu énergétique fécal, était inférieure à celle mesurée après un nombre de cycles de mastication optimal. Le niveau de satiété des volontaires était également plus faible. De la même façon, l'ingestion de viande de bœuf sous forme émincée augmente la biodisponibilité des acides aminés par rapport à un steak de viande, signe d'une meilleure digestion protéique (Pennings et al., 2013). Enfin, une étude menée sur une population de personnes âgées, appareillées ou non, a démontré que le métabolisme protéique pouvait être altéré par une diminution de l'efficacité masticatoire (Rémond et al., 2007). L'étape de mastication est donc primordiale puisqu'elle semble avoir des conséquences sur le devenir digestif des aliments, du point de vue de la lipolyse et de la protéolyse au moins. Il convient donc de la simuler de manière optimale dans les dispositifs expérimentaux de digestion *in vitro*. Par son action amylolytique (Freitas et al., 2018), mais également par son rôle dans la lubrification et la viscosité du bol (Pushpass et al., 2019), la salive tient tout autant une place primordiale dans la phase orale et la digestion gastro-intestinale qui s'ensuit. La phase orale est pourtant omise dans de nombreuses études de digestion *in vitro*. On peut le comprendre lorsque les aliments étudiés sont sous forme liquide, n'étant alors pas concernés par la mastication et leur temps de séjour dans la cavité orale étant très court. Mais la situation est toute différente dans le cas d'aliments solides ou semi-solides. Or, dans de nombreuses études sur ce type d'aliments, la phase orale est largement minimisée et remplacée par un simple broyage des aliments, sans maîtrise ni contrôle de la taille des particules formées, en présence de fluides digestifs censés reproduire le rôle de lubrification de la salive mais ne contenant pas d'enzymes (Arkbåge et al., 2003; Egger et al., 2019; Ménard et al., 2018; Pineda-Vadillo et al., 2016). Le risque est alors de masquer, voire de faire disparaître les différences entre aliments.

Dans notre étude, les bols produits *in vivo* suite à la mastication étaient très différents entre les deux matrices solides concernées (« masticables »), par leur taille médiane de particules et leur distribution notamment. Il paraissait donc pertinent d'ajouter cette étape aux modèles *in vitro*, ce que nous avons fait de manière assez « grossière » dans le cas du protocole de digestion *in vitro* statique harmonisé (Minekus et al., 2014), par homogénéisation des matrices au stomacher (Mixwel +, Awel Microbiology), mais de manière plus pertinente physiologiquement dans le cas du protocole de digestion dynamique initialement développé par Ménard & Dupont (2014). En effet, en amont des digestions *in vitro* sur modèle dynamique, l'étape de mastication a été reproduite en utilisant le simulateur de mastication AM² (Peyron et al., 2019), paramétré à partir des caractéristiques observées sur les bols produits *in vivo* par les volontaires ayant participé à l'étude clinique mettant en œuvre les mêmes matrices alimentaires. Les étapes de mastication et d'ajout de salive ont cependant dû être découplées pour des raisons pratiques, afin de pouvoir maîtriser le temps d'action des enzymes salivaires. Les bols ont ainsi été congelés après mastication, puis transportés et conservés à l'état congelé jusqu'au moment de leur mise en œuvre pour les expériences de digestion *in vitro* qui ont par conséquent débuté par l'ajout de salive et une courte incubation de 2 min à 37°C. Les effets de la congélation sur la structure des bols n'ont toutefois pas été évalués. De plus, le fait d'avoir ajouté la salive en une fois, et non progressivement au cours de la mastication comme c'est le cas *in vivo*, pourrait avoir modifié le déroulement de la mastication et la lubrification. Le protocole mis en place n'était donc sans doute pas optimal, même s'il était *a priori* plus fidèle aux conditions physiologiques que les protocoles classiquement suivis, sans maîtrise de la mastication. Cependant, il faut souligner que la mise en place de cette étape de mastication *in vitro* nécessite de disposer de données *in vivo*, souvent lourdes à recueillir et très matrice-dépendantes. Pour réaliser l'étape de mastication de manière à la fois représentative de la situation *in vivo* et compatible avec les contraintes techniques et économiques des études *in vitro*, cette étape pourrait être simplifiée par la définition de protocoles de broyage et de mélange adaptés à différents types de texture ou différentes catégories d'aliments. Il s'agirait là d'un travail conséquent, mais qui pourrait permettre d'améliorer la simulation de la phase orale, tout en conservant les caractéristiques originelles des protocoles de digestion *in vitro* : facilité de maîtrise et de mise en œuvre.

V.2.2 DES SYSTÈMES DE DIGESTION GASTRO-INTESTINALE *IN VITRO* ENCORE LOIN DE LA RÉALITÉ PHYSIOLOGIQUE

Plusieurs modèles de digestion *in vitro* statique ont été développés au cours des années, variant notamment en fonction du type d'aliment, de l'objectif de l'étude, du nombre d'étapes mimées

et de la cible physiologique (Almaas et al., 2006; Chatterton, Rasmussen, Heegaard, Sørensen, & Petersen, 2004; Dupont et al., 2010; Hur, Decker, & McClements, 2009; Moreno, Quintanilla-López, Lebrón-Aguilar, Olano, & Sanz, 2008). Devant l'hétérogénéité des paramètres utilisés et donc l'impossibilité de comparer les résultats entre les différentes études, il est apparu nécessaire de développer un protocole harmonisé de digestion *in vitro* statique. Un consensus a donc été établi au sein d'un réseau de chercheurs européens spécialisés dans le domaine de la digestion (réseau INFOGEST) autour d'un processus harmonisé s'appuyant sur des paramètres physiologiques simplifiés (Ménard & Dupont, 2014; Minekus et al., 2014). Ce modèle est particulièrement adapté pour des étapes de screening (comparaison de produits avant sélection de certains d'entre eux pour des études plus complexes), ou bien des études de digestion de produits modèles simplifiés, voire de molécules seules en solution (allergénicité des protéines, lipolyse).

Pour l'étude de matrices complexes, ou lorsqu'il s'agit de caractériser de manière plus fine le déroulement de la digestion, des modèles de digestion dynamique ont été développés. Contrairement aux modèles statiques, ils prennent en compte l'évolution de certains phénomènes physico-chimiques qui existent *in vivo*. Ces systèmes artificiels sont donc plus proches physiologiquement de ce qui se passe chez l'Homme. Il est ainsi possible de reproduire l'acidification progressive en phase gastrique, l'apport en flux continu d'enzymes et de sécrétions, ainsi que les vidanges gastrique et intestinale. Mais pour être pertinents physiologiquement, ces simulateurs doivent être paramétrés à partir de données obtenues au cours d'études *in vivo*, et des corrélations basées sur des comparaisons *in vitro/in vivo* de ces systèmes s'avèrent indispensables.

Au cours de notre étude, nous avons ainsi choisi de paramétrer le digesteur dynamique à l'aide des données récoltées durant l'étude clinique pour ce qui concernait les temps de demi-vidange gastrique. Néanmoins, ces temps n'ont pu être qu'estimés à partir des cinétiques d'apparition des micronutriments dans le compartiment sanguin, au prix de certaines approximations. Le délai entre la sortie de l'estomac (et donc l'entrée dans l'intestin grêle) et l'apparition dans le compartiment sanguin n'est en effet pas précisément connu. Il aurait fallu recourir à des méthodes plus lourdes, coûteuses et/ou invasives pour déterminer plus précisément les cinétiques d'acidification gastrique et le temps de demi-vidange gastrique, par gammascintigraphie (Ménard et al., 2018) ou IRM (Gaudichon, 2013) par exemple.

Malgré tous les efforts entrepris afin de mimer fidèlement la digestion gastrique, un paramètre est souvent oublié dans les modèles actuels : les contractions gastriques. Or, ces contractions sont essentielles à la conduite de la digestion, leur rôle étant de mélanger le contenu gastrique et de broyer les particules alimentaires jusqu'à ce que leur taille leur permette de passer à travers le pylore. Un système de mélangeur à pâles est couramment utilisé dans les modèles de digestion, couplé à un tamis, mais cela ne reflète pas correctement l'aspect physiologique des contractions. C'est ce type de système qui équipe le digesteur DIDGI® que nous avons utilisé dans cette étude. Un modèle reproduisant plus fidèlement les contractions gastriques a été développé récemment : le DIVHS (dynamic *in vitro* human stomach). Ce dispositif, constitué de rouleaux excentrés, comprime périodiquement un estomac souple en silicone (Figure 64) avec un mouvement de va-et-vient reproduisant les contractions péristaltiques de l'estomac (Wang et al., 2019).

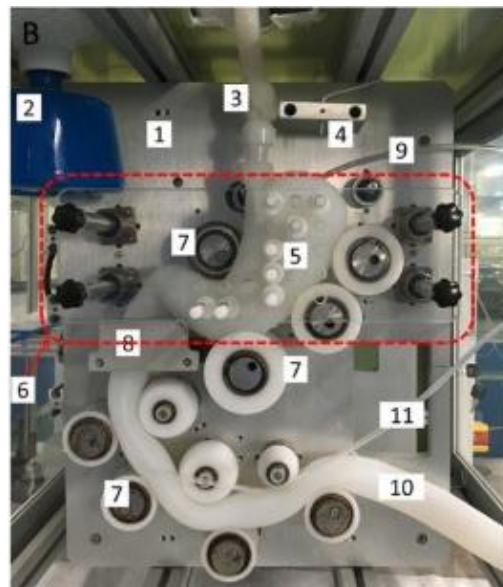


Figure 64 : Modèle stomacal de digestion *in vitro* dynamique (DIVHS, Soochow). Les éléments majeurs sont (5) l'estomac modèle en silicone souple imprimé en 3D, (7) les rouleaux excentrés mimant le péristaltisme.

De même, le compartiment intestinal est lui aussi largement simplifié dans la plupart des modèles de digestion *in vitro* où il est souvent limité à la seule fonction enzymatique. Or, l'intestin possède une deuxième fonction majeure : l'absorption des nutriments. Pour mimer cette fonction, des membranes de dialyse sont parfois ajoutées afin de reproduire le phénomène d'absorption passive au travers de l'épithélium intestinal. Ce type de dispositif existe par exemple depuis quelques années sur le digesteur dynamique TIM-2 (Minekus, 2015) et a été récemment installé sur la nouvelle version du digesteur dynamique DIDGI® utilisé dans le cadre de cette étude (Figure 65). Il est également possible de coupler un système de digestion dynamique avec un modèle de

culture cellulaire Caco-2 afin d'estimer la biodisponibilité des nutriments (Chitchumroonchokchai, Schwartz, & Failla, 2004; Cohen et al., 2017; Déat et al., 2009). Il ne sera pour autant jamais possible de mimer l'entièreté du processus d'absorption, celui-ci faisant appel à des mécanismes de rétrocontrôle complexes. Il est également possible d'ajouter des fermenteurs à la suite du compartiment intestinal et de lesensemencer avec des souches humaines afin de reproduire l'action du microbiote dans le côlon, tel que cela a été fait dans le cas du digesteur SHIME (Booijink et al., 2010; Van de Wiele, Van den Abbeele, Ossieur, Possemiers, & Marzorati, 2015). Le côlon est en effet un lieu important dans le processus de digestion de la vitamine B12 par exemple.

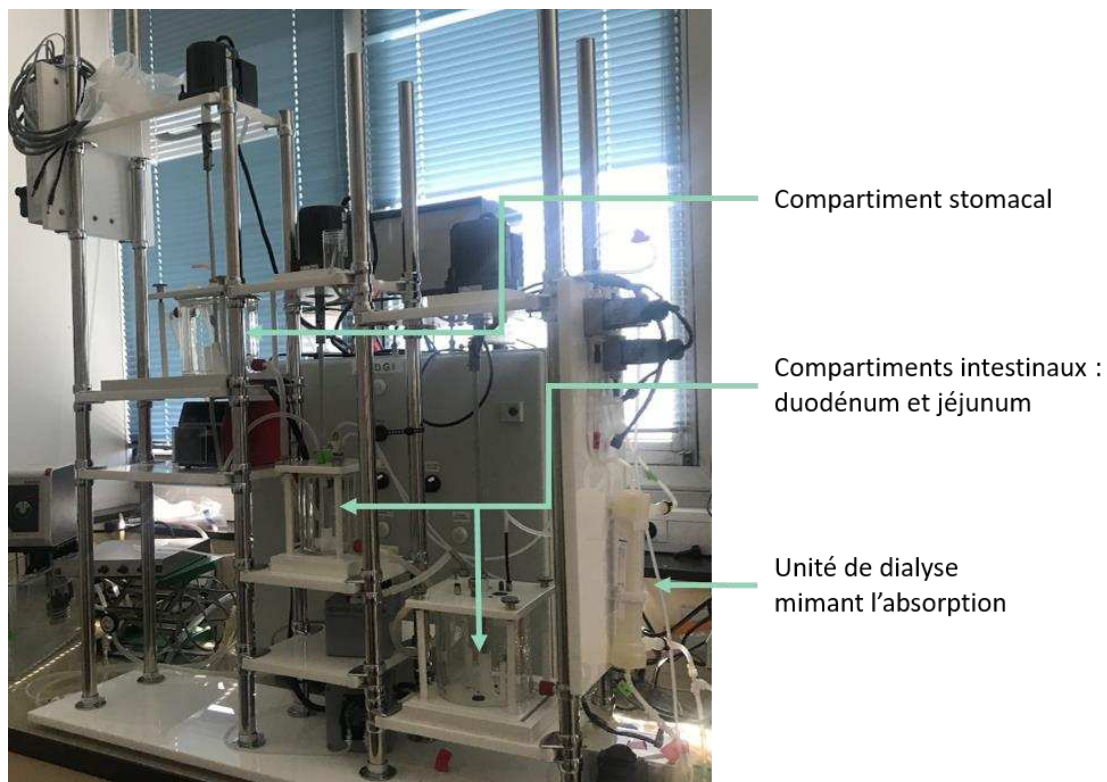


Figure 65 : Digesteur dynamique gastro-intestinal (DIDGI®, Rennes)

V.2.3 DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES MATHÉMATIQUES

Au-delà des outils d'expérimentation *in vivo* et *in vitro*, la modélisation mathématique constituera certainement un progrès majeur dans l'analyse et la compréhension de la digestion. Les études *in vivo* permettent en effet d'effectuer des observations physiologiques et donc d'obtenir les résultats les plus réalistes. Néanmoins, l'appareil digestif n'est pas accessible en tout point de façon simultanée pour des raisons pratiques et éthiques évidentes. Les données expérimentales collectées sont donc souvent incomplètes. En résumé, ces études permettent d'obtenir des jeux de données parcellaires entre lesquels demeurent le plus souvent des zones « noires » ou « grises », dans la mesure où l'ensemble des mécanismes intervenant au cours de la digestion

n'ont pas pu être observés. L'utilisation de modèles *in vitro* permet de pallier en partie ce manque de données « intermédiaires » (aux différents stades de la digestion), mais ces méthodes restent inadaptées pour traiter des questions physiologiques (sécrétions digestives, transit, rétrocontrôle, etc.).

La modélisation mathématique des mécanismes de la digestion apparaît comme un outil complémentaire intéressant dans ce contexte. Les modèles « mécanistiques » ou « phénoménologiques » peuvent être utilisés pour tester des hypothèses sur les mécanismes, estimer l'influence de différents paramètres, ou encore recalculer *a posteriori* des données non observées expérimentalement. Ces approches peuvent ainsi permettre de relier entre elles des données expérimentales, *via* des hypothèses sur les mécanismes intermédiaires. Par exemple, un modèle mathématique de la digestion des protéines qui tient compte des propriétés des aliments étudiés (6 matrices laitières) a été élaboré sur la base d'observations *in vivo* (Le Feunteun et al., 2014) pour reconstruire les cinétiques de vidange gastrique les plus à même d'expliquer les résultats obtenus sur des échantillons collectés en sortie d'estomac et dans le plasma sanguin. D'autres modèles sur la digestion des lipides (Giang, 2015) et des glucides (Moorthy, Brooks, Kalmokoff, & Eberl, 2015) ont été proposés. Un modèle basé sur les différentes familles de constituants classiquement rencontrés dans les aliments a également été développé, au travers de quatre segments anatomiques (estomac, duodénum, jéjunum distal et iléum, cæcum et côlon). Ce dernier ne prend toutefois pas en compte la structure initiale des aliments ou leur évolution au cours de la digestion (Strathe, Danfær, & Chwalibog, 2008).

Compte tenu de la complexité des jeux de données engendrés par l'étude d'aliments réels, il serait intéressant de pouvoir construire des modèles de type mécanistique pour pouvoir tester les hypothèses d'interprétation précédemment énoncées. Un tel modèle, capable de rendre compte des effets structure des matrices et d'intégrer l'ensemble des nutriments, n'existe toutefois pas encore. La poursuite d'études du type de celle que nous avons conduite serait bien entendu nécessaire afin de collecter un nombre plus conséquent de données et mieux caractériser les impacts des différentes structures de la macro à la micro-échelle, sur les cinétiques de digestion des nutriments, leurs interactions et leurs devenir digestifs. À plus long terme, il serait alors envisageable d'optimiser les caractéristiques structurales d'une matrice pour lui conférer les propriétés souhaitées : cinétique et lieu de libération des nutriments, maîtrise des degrés d'hydrolyse et des conditions d'absorption, etc. Mais le chemin est encore long avant d'atteindre ce niveau de modélisation.

V.3 DES DIVERGENCES MARQUÉES ENTRE LES DIFFÉRENTS MODÈLES D'ÉTUDE

Malgré toutes les « imperfections » des modèles de digestion *in vitro* utilisés au cours de cette étude, et grâce aux données originales collectées *in vivo*, ce travail a permis de conforter l'hypothèse selon laquelle la structure des aliments est un élément majeur pour le déroulement même de la digestion et pour la mise à disposition et/ou l'utilisation des nutriments par l'organisme. De plus, les phénomènes spécifiques à chacune des étapes de la digestion ont pu être explorés.

L'association des différentes approches de digestion a notamment permis d'acquérir de nombreuses données sur la libération, l'hydrolyse, la bioaccessibilité et la biodisponibilité des nutriments. Il est toutefois difficile de comparer les résultats obtenus de manière quantitative, car les analyses n'ont pas toutes été faites sur les mêmes compartiments (compartiment sanguin dans l'étude *in vivo*, compartiments gastrique et intestinal dans les études *in vitro*), ou ne sont pas le reflet des mêmes phénomènes physiologiques (biodisponibilité vs bioaccessibilité). Certaines tendances ont cependant pu être observées ([Table 24](#)).

Table 24 : Résumé des résultats obtenus par les différentes approches de l'étude

Nutriment considéré	Étude <i>in vivo</i>	Étude <i>in vitro</i> en modèle statique	Étude <i>in vitro</i> en modèle dynamique
Glucides	Pas d'effet de la structure sur la biodisponibilité du glucose	Pas d'effet de la structure sur l'amylolyse	Effet marqué de la structure sur la libération de l'amidon : quantité libérée supérieure pour la Génoise, suivie de la Crème puis du Biscuit, tout au long de la digestion. Tendance identique pour l'amylolyse : très importante pour la Génoise en phase gastrique comparée aux deux autres matrices. Différence également observée en phase intestinale, mais moins marquée.
Lipides	Biodisponibilité des lipides plus élevée pour la Crème par rapport au Flan et au Biscuit.	Effet mineur de la structure sur la libération des lipides Effet majeur sur la lipolyse en phase intestinale : vitesse de lipolyse plus élevée pour le Biscuit et degré de lipolyse supérieur pour le Biscuit (100 %) par rapport à la Crème (28 %) en fin de digestion ; Génoise et Flan intermédiaires.	Pas d'effet de la structure sur la libération des lipides ou la lipolyse en phase gastrique. Effet mineur en phase intestinale : libération de lipides et lipolyse supérieures pour la Crème et la Génoise comparée au Biscuit.
Protéines	Effet mineur de la matrice sur les cinétiques d'apparition de l'azote dans le plasma.	Pas d'effet de la structure sur la libération des peptides ou la protéolyse	Pas d'effet de la structure sur la libération des peptides, ni sur la protéolyse.
Vitamine B12	Effet très mineur de la structure sur la biodisponibilité de la vitamine B12	Non évalué	Non évalué
Vitamine B9	Biodisponibilité supérieure pour le Flan et la Génoise par rapport aux deux autres matrices.	Vitesse de libération supérieure en phase gastrique pour le Biscuit et la Génoise, sans effet sur la quantité totale libérée en fin de phase. Aucun effet matrice en phase intestinale.	Non évalué
Lutéine	Pas de différence de biodisponibilité	Pas d'effet structure en phase gastrique. Effet marqué en phase intestinale : 55 % de lutéine bioaccessible pour la Crème contre 25 % pour les trois autres matrices.	Effet mineur de la structure en phase gastrique. Fort effet en phase intestinale : quantité de lutéine libérée pour le Biscuit six fois supérieure à celle de la Crème ; la Génoise est intermédiaire.
Vitamine D	Biodisponibilité de la vitamine D supérieure pour la Génoise par rapport au Biscuit ; Flan et Crème intermédiaires.	Non évalué	Effet mineur de la structure en phase gastrique. Tendance à une bioaccessibilité supérieure en phase intestinale pour la Crème par rapport au Biscuit ; Génoise intermédiaire.

■ Tendance similaire entre deux modèles de digestion ■ Tendance contraire

Le premier résultat marquant du bilan présenté dans la [Table 24](#) est, qu'à l'exception des protéines pour lesquelles aucun effet matrice n'a été observé ni *in vivo*, ni *in vitro*, nous n'avons jamais observé de parfaite concordance entre les trois approches. De plus, les modèles concordants ne sont pas toujours les mêmes, selon la classe de nutriments considérée.

En ce qui concerne les glucides, un fort effet matrice en faveur de la Génoise (libération importante d'amidon et forte amylolyse) a été observé en modèle *in vitro* dynamique, alors qu'aucune différence entre les matrices n'a été observée ni durant l'étude *in vivo*, ni en modèle *in vitro* statique.

Les résultats de l'étude *in vivo* et du modèle *in vitro* dynamique concordent pour les lipides, avec une bioaccessibilité et une lipolyse maximale pour la Crème dans l'étude *in vitro* dynamique, en accord avec une biodisponibilité supérieure mesurée *in vivo*. Le Biscuit confirme également cette tendance avec une bioaccessibilité et une lipolyse inférieure, en accord avec une biodisponibilité inférieure. En revanche, le modèle *in vitro* statique a conclu à des tendances totalement inversées : c'est le Biscuit qui a subi la lipolyse la plus importante dans ce modèle de digestion.

A l'instar de l'étude clinique, aucun effet matrice n'a été constaté durant les études *in vitro* sur les deux modèles en ce qui concerne la digestion des protéines.

Les matrices n'ont pas été discriminées par l'étude *in vivo* en ce qui concerne la lutéine. L'étude *in vitro* statique montre en revanche que la Crème présente la plus forte bioaccessibilité. En revanche, les tendances observées en modèle dynamique sont inversées : la Crème présente une bioaccessibilité de la lutéine plus faible que le Biscuit.

Enfin pour la vitamine D, les résultats tirés des modèles *in vivo* et *in vitro* dynamique semblent coïncider, avec des valeurs de biodisponibilité/bioaccessibilité inférieures pour le Biscuit par rapport aux autres matrices. Il faut toutefois souligner que le modèle *in vitro* dynamique ne permet d'observer que des tendances, sans significativité statistique.

Il ressort de cette analyse un certain nombre de divergences entre les trois modèles d'étude qui ne peuvent donc pas simplement se substituer l'un à l'autre. Cependant, comme déjà évoqué plus haut, il faut garder en mémoire que les mesures réalisées dans chacun des modèles ne traduisent pas toujours les mêmes phénomènes. En particulier, alors que les modèles *in vitro* permettent

d'accéder à des valeurs de bioaccessibilité, ne faisant appel qu'aux phénomènes de désintégration de l'aliment et de libération des nutriments sous l'effet des enzymes digestives, les études *in vivo* fournissent des valeurs de biodisponibilité, qui intègrent en plus les phénomènes d'absorption et de transport des nutriments vers le compartiment sanguin. Il n'est donc pas possible de comparer strictement ces deux types d'études. En revanche, on aurait pu s'attendre à plus de convergence entre les deux modèles *in vitro*. Ce résultat souligne l'importance du choix des modèles de digestion *in vitro* à mettre en œuvre, en fonction des objectifs (screening vs approche mécanistique), mais aussi des contraintes (coût, facilité de mise en œuvre). Dans tous les cas, il apparaît clairement que la pertinence des modèles de digestion *in vitro* reste une question d'actualité.

V.4 ENCORE TROP PEU D'ÉTUDES *IN VIVO* DISPONIBLES POUR VALIDER LA PERTINENCE DES MODÈLES *IN VITRO*

Les modèles de digestion *in vitro* ont été validés sur la base de nutriments simples, tels que les protéines (Caugant et al., 1994; Egger et al., 2019; Vachon, Gauthier, Charbonneau, & Savoie, 1987), les lipides (Scheuble et al., 2018) ou les glucides (Weurding, Veldman, Veen, van der Aar, & Verstegen, 2001; Wiseman, Nicol, & Norton, 2000). Mais, probablement du fait du faible nombre d'études sur la digestion d'aliments complexes, il n'y a pas à notre connaissance d'étude publiée établissant la corrélation entre digestions *in vitro* et *in vivo* pour simultanément les trois classes de macronutriments et certains micronutriments. Des études de corrélations basées sur un seul macro- ou micronutriment ont en revanche été publiées. On peut donc imaginer que les paramètres des modèles *in vitro* que nous avons utilisés n'étaient pas les plus pertinents pour suivre simultanément une telle diversité de nutriments.

V.4.1 LES GLUCIDES

L'index glycémique est couramment calculé pour caractériser la digestion des produits amylacés. Il correspond à l'augmentation d'aire sous la courbe de la réponse glycémique générée par la consommation d'un aliment contenant 50 g de glucides (ISO, 2010). Des corrélations ont été établies entre l'index glycémique et la quantité d'oligosaccharides libérée à 1h et 5h de digestion *in vitro* en modèle statique (Jenkins et al., 1982). De même, il existe une corrélation entre le degré d'hydrolyse et l'index glycémique (Granfeldt, Björck, Drews, & Tovar, 1992), ou encore entre l'impact glycémique relatif (basé sur la consommation d'une portion usuelle d'un aliment, et non 50 g) et la libération de glucose *in vitro* (Monro & Mishra, 2010). Cependant, certaines études tendent à réfuter la corrélation entre index glycémique et libération de glucose durant la digestion (Berti, Riso, Monti, & Porrini, 2004; Brand-Miller & Holt, 2004; Casiraghi, Brighenti, & Testolin, 1992).

V.4.2 LES LIPIDES

À notre connaissance, aucune étude à ce jour ne s'est attachée à comparer les résultats obtenus lors de digestions d'aliments de nature lipidique en modèle *in vitro* adulte et *in vivo*. Cependant, la digestion d'émulsions lipidiques est souvent étudiée dans le domaine pharmaceutique afin de prédire la libération de molécules médicamenteuses, sans requérir l'intervention d'études cliniques. Les modèles utilisés permettent de déterminer avec précision l'impact de la lipolyse gastrique, la taille des gouttelettes ou bien encore la viscosité de l'émulsion sur la libération des

constituants (Amidon, Lennernäs, Shah, & Crison, 1995; Anby et al., 2012; Scheuble et al., 2018; Shi, Gao, Gong, & Ping, 2010). Certains modèles incluent de surcroît une phase d'absorption chez le rat (Crum, Trevaskis, Williams, Pouton, & Porter, 2016). Cependant, ces modèles sont basés sur des émulsions simples et ne prennent donc pas en compte les interactions entre macronutriments au sein d'un aliment complexe. Il est par conséquent difficile d'interpréter les divergences observées entre nos trois modèles d'étude pour ce qui concerne la digestion des lipides.

V.4.3 LES PROTÉINES

L'étude *in vitro* de la digestibilité des protéines montre généralement de bonnes corrélations avec les digestibilités obtenues par des modèles *in vivo* (Kitabatake & Kinekawa, 1998; Rozan et al., 1997; Saunders, Connor, Booth, Bickoff, & Kohler, 1973). Une étude basée sur la digestion des cinq protéines majoritaires du lait a également démontré que les points finaux des phases gastrique et intestinale étaient similaires lors de la digestion sur un modèle porc et sur le modèle harmonisé INFOGEST (Egger et al., 2016). Les modèles *in vitro* semblent par ailleurs performants pour discriminer les aliments solides selon leur degré de digestion (Bax, Buffière, et al., 2013; Bax, Sayd, et al., 2013). En ce sens, nos résultats semblent être en accord avec ces différentes études.

V.4.4 LA VITAMINE B12

La vitamine B12 nécessitant la présence de protéines salivaires et stomacales pour sa libération de la matrice alimentaire, il existe peu d'études portant sur la corrélation entre bioaccessibilité et biodisponibilité. Par une méthode indirecte de coloration au bleu Dextran, une mesure de biodisponibilité de la vitamine B12 en modèle *in vitro* a été publiée. Mais les résultats semblent incertains (Miyamoto, Yabuta, Kwak, Enomoto, & Watanabe, 2009). Quoi qu'il en soit, l'absence de pic d'absorption lors de l'étude clinique nous a conduits à ne pas suivre ce micronutriment au cours des digestions *in vitro*. Il ne nous a donc pas été possible d'évaluer la qualité de nos modèles *in vitro* pour ce micronutriment.

V.4.5 LA VITAMINE B9

De nombreuses études se sont intéressées à la bioaccessibilité des folates ou de l'acide folique (Arkbåge et al., 2003; Öhrvik, Öhrvik, Tallkvist, & Witthöft, 2010; Öhrvik & Witthöft, 2008; Verwei et al., 2003). Des études incluant l'action des enzymes de la bordure en brosse ont également permis d'évaluer *in vitro* un indice de biodisponibilité des folates (Babu & Srikantia, 1976; Seyoum & Selhub, 1998; Tamura & Stokstad, 1973). En comparant cet indice avec les valeurs obtenues sur des modèles *in vivo*, un bon coefficient de corrélation a été trouvé. Cependant, cet indice de

biodisponibilité ne reflète pas une biodisponibilité vraie, car les conditions physiologiques de contact entre enzymes et folates diffèrent dans un modèle *in vivo* vrai (production et libération des déconjugases, rencontre entre enzyme et substrat, etc.) (Seyoum & Selhub, 1998).

V.4.6 LA LUTÉINE

Une corrélation positive a été observée entre le transfert de caroténoïdes (dont la lutéine) dans les micelles *in vitro* et leur biodisponibilité durant l'étude *in vivo* complémentaire, portant sur plusieurs sources alimentaires (Reboul et al., 2006; Tyssandier et al., 2003). Il semble donc que les modèles de digestion *in vitro* soient pertinents pour évaluer la bioaccessibilité de la lutéine. Toutefois, la bioaccessibilité de la lutéine provenant d'épinards était environ cinq fois plus élevée *in vitro* que la biodisponibilité mesurée dans les études *in vivo* (Reboul et al., 2006). Cela a été attribué à une sous-estimation de cette dernière valeur au cours de l'étude clinique, du fait d'une interférence avec la chlorophylle au cours du dosage. Cette corrélation entre études *in vitro* et *in vivo* a été confirmée par d'autres équipes sur des lait enrichis en lutéine (Granado-Lorencio, Herrero-Barbudo, Olmedilla-Alonso, Blanco-Navarro, & Pérez-Sacristán, 2010), des brocolis (Granado et al., 2006) et autres légumes (Chitchumroonchokchai et al., 2004; Garrett, Failla, & Sarama, 1999, 2000).

Cependant, les résultats obtenus au cours de notre étude clinique diffèrent de ceux des deux études *in vitro*. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces différences observées. Il a été démontré récemment que l'absorption de la lutéine, et des caroténoïdes en général, dépend de polymorphismes individuels, facteur non pris en compte dans les études *in vitro* (Borel, 2012b; Borel et al., 2014). De plus, les modèles de digestion utilisés ici ne font pas intervenir de lipase gastrique. Or, cette enzyme est responsable d'environ 10 à 30 % de l'hydrolyse des triglycérides du repas *in vivo* (Gallier & Singh, 2012). Il est donc raisonnable de penser que son absence a modifié le déroulement de la digestion de la fraction lipidique du repas et donc la libération des micronutriments lipophiles, sans que nous puissions savoir ni dans quelle mesure, ni si celle-ci a été compensée par les lipases de la pancréatine en phase intestinale.

V.4.7 LA VITAMINE D

Peu d'études comparant des résultats *in vivo* et *in vitro* ont été recensées. L'influence de la taille des gouttelettes lipidiques sur la bioaccessibilité *in vitro* et l'absorption *in vivo* de la vitamine D₂ a montré des résultats contraires dans les deux parties d'une étude conduite par Salvia-Trujillo, Fumiaki, Park, & McClements (2017). La faible corrélation entre les résultats observés a été

expliquée par ces auteurs par le choix en premier lieu d'un mauvais modèle de digestion *in vitro* et enfin d'une étude en point final de digestion, sans tenir compte des aspects cinétiques.

Dans notre cas, nous n'avons pas réellement observé de divergence entre *in vivo* et *in vitro* dynamique. Mais l'absence de différence significative entre les matrices dans l'étude *in vitro* ne nous permet pas de conclure plus avant quant à la pertinence du modèle utilisé.

V.5 VERS UNE PLUS GRANDE PERTINENCE GLOBALE DES MODÈLES DE DIGESTION

La complexité des phénomènes impliqués dans la digestion humaine amène à se poser une question centrale lorsque l'emploi de modèles *in vitro* est envisagé : dans quelle mesure le modèle choisi doit-il être pertinent ou corrélé avec les mesures *in vivo* ?

Dans le cas des macronutriments, lorsque l'objet d'étude est un aliment modèle (gel de blanc d'œuf, de protéines laitières ou émulsion simple), les modèles de digestion *in vitro* s'avèrent être de bons prédicteurs du comportement des aliments durant leur digestion. Cela découle du fait que les modèles ont pour la plupart été créés ou validés sur la base de ces études. Toutefois, lorsque la complexité de l'aliment étudié s'accroît, lorsque plusieurs types de macronutriments sont considérés simultanément par exemple, les corrélations entre les observations *in vitro* et *in vivo* s'amenuisent. On peut y voir l'effet de la structure des matrices ou bien de l'interaction entre les macronutriments. Par ailleurs, dans le cas des micronutriments, la pertinence des modélisations de la digestion est très variable d'un micronutriment à l'autre. Si les modèles sont relativement bien établis et validés pour les caroténoïdes par exemple (Reboul et al., 2006; Tyssandier et al., 2003), d'autres micronutriments – tels que la vitamine D – n'ont été que peu étudiés.

Les modèles de digestion *in vitro* dynamique génèrent évidemment des données plus réalistes que les modèles statiques. Mais ces derniers, par leur simplicité, restent de bons modèles pour effectuer un screening d'aliments par exemple. De manière globale, il semble que les modèles *in vitro* soient appropriés lorsque l'étape d'absorption intestinale n'offre que peu de variabilité individuelle (Bohn et al., 2018; Etcheverry, Grusak, & Fleige, 2012). Dans l'optique d'améliorer la pertinence des modèles *in vitro*, il apparaît de toute manière nécessaire de se focaliser sur les étapes de la digestion qui semblent actuellement engendrer des différences entre les modèles *in vitro* mis en place et les observations *in vivo*.

Dans notre étude, nous avons choisi de baser les paramètres du simulateur de digestion à partir des données observées *in vivo*. Nous avons ainsi déterminé le temps de demi-vidange gastrique sur la base d'une observation indirecte, l'apparition dans le sang des micronutriments. Ce parti pris, choisi afin de mimer de manière la plus fidèle possible la digestion de nos trois aliments, peut être remis en question. Ainsi, nous avons choisi de négliger le temps écoulé entre la libération des nutriments de la matrice, leur solubilisation dans la phase liquide du contenu intestinal, le passage

de la barrière entérocytaire et enfin l'arrivée dans le sang, au regard de l'absence de données fiables dans la littérature sur ces différents phénomènes. Nous avons également transposé directement les données obtenues lors de l'étude clinique, sans prendre en compte les biais éventuels engendrés par les différences de volume des repas ; l'impact du volume d'un repas sur la vidange gastrique a pourtant été démontrée dans plusieurs études (Doran et al., 1998; Hunt & Macdonald, 1954; Lin et al., 2008). Les différences de volume des repas n'ont également pas été compensées lors de l'étude clinique de façon à ne pas masquer l'effet structure. Or, comme indiqué plus haut, le volume du repas impacte la vitesse de vidange gastrique et pourrait également influencer sur les quantités d'enzymes libérées, comme cela a été démontré au niveau intestinal (Dooley & Valenzuela, 1984).

Ne disposant pas d'observation sur la vidange intestinale au cours de notre étude clinique et afin de ne pas inclure un facteur supplémentaire de variabilité non maîtrisé dans notre modèle de digestion *in vitro* dynamique, nous avons également choisi de considérer un temps de demi-vidange intestinale identique entre les trois matrices, estimant que l'impact majoritaire de la structure sur les cinétiques de digestion avait lieu dans le compartiment gastrique. Certaines études ont cependant montré que la structure d'un aliment avait un impact sur le déroulement de la digestion jusqu'au niveau intestinal, le temps de demi-vidange intestinale étant plus élevé dans le cas de la digestion d'un yaourt (160 minutes) par rapport à celle d'un lait (85 minutes) (Marteau, Pochart, & Mahé, 1991 (abstract uniquement); repris dans Minekus et al., 1995).

Le modèle *in vitro* dynamique découlant du modèle statique proposé par INFOGEST, les enzymes utilisées étaient identiques. Dans le modèle INFOGEST, les enzymes ont été choisies pour être peu coûteuses et facilement disponibles de façon à ce que le modèle puisse être adopté dans un grand nombre d'études, sans barrière financière. Ainsi, nous avons mis en œuvre une pepsine en phase gastrique et une pancréatine en phase intestinale toutes les deux d'origine porcine. Ce choix a été fait en raison de la grande similitude entre les systèmes digestifs humain et porcin. Néanmoins on peut supposer que leurs activités présentent quelques différences. En outre, nous n'avons pas ajouté de lipase en phase gastrique. Or, il est connu que cette enzyme joue un rôle important dans la digestion lipidique. Une lipase gastrique extraite du lapin et dont l'activité est semblable à celle d'origine humaine a été commercialisée récemment par la société française Lipolytech. Son utilisation pourrait être une amélioration significative à apporter au modèle *in vitro* lors de digestions d'aliments riches en lipides (Lipolytech, 2017).

De même, l'intestin grêle dispose au sein de sa bordure en brosse d'un nombre conséquent d'enzymes aux rôles variés : glycohydrolases, lipases, peptidase, etc. (Van Beers, Büller, Grand, Einerhand, & Dekker, 1995). La proportion de ces enzymes est variable en fonction du segment de l'intestin considéré, du type de régime alimentaire de l'hôte, de ses caractéristiques génétiques et physiologiques. Cet aspect de la digestion intestinale est donc souvent omis dans les digestions *in vitro* en raison d'un manque d'enzymes commerciales disponibles et pertinentes.

Une méthode de collecte des enzymes de la bordure en brosse à partir du jéjunum de porcs a été proposée. Les enzymes sont alors récupérées après plusieurs lavages sous forme de vésicules qui peuvent être directement ajoutées au cours de la phase intestinale (Boutrou, Jardin, Blais, Tomé, & Léonil, 2008). L'utilisation d'enzymes recombinantes pourrait être une autre solution pour pallier ce manque (Hernandez-Hernandez, Olano, Rastall, & Moreno, 2019; Holmes & Lobley, 1989). Toutefois, le coût ou la nécessité de recourir à un modèle animal ne devrait pas être un frein à l'utilisation du modèle standardisé de digestion. De plus, les conditions physiologiques d'utilisation de ces enzymes (quantité, activité et temps de contact) sont encore à définir.

Dans tous les cas, il est évident que des études additionnelles sont nécessaires pour pouvoir en premier lieu corroborer (ou non) les modèles actuellement utilisés, et dans un second temps pouvoir étendre leurs domaines d'application. On peut ainsi imaginer des modèles adaptés à des populations d'âge spécifique, comme c'est le cas par exemple avec le modèle nourrisson développé par Ménard et al. (2014), en tenant compte de particularités anatomiques et/ou physiologiques, de maladies ou troubles ayant un impact sur la digestion. De plus, compte tenu du contexte sociétal et de la grande prise de conscience de la souffrance animale par la société civile, la conduite d'études sur modèle animal devient très controversée, et ce malgré l'énonciation par Russel et Burch en 1959 de la règle des « 3R » concernant l'expérimentation animale : réduire, raffiner et remplacer, traduit en France en 1989 dans le décret n°87-848 relatif aux expériences pratiquées sur les animaux vertébrés (Russell & Burch, 1992). Le récent tollé suite à l'intrusion d'activistes de la cause animale dans le centre d'expérimentation de Sourches, appartenant au groupe Avril, et en réaction aux vidéos qui en ont fuité, montre l'ampleur de cette prise de conscience (Groupe Avril, 2019). Alors que la seule mise en place du règlement REACH au sein de l'Union Européenne en 2007, visant à évaluer la toxicité des molécules commercialisées avant 1981, a nécessité le sacrifice de 54 millions d'animaux de laboratoire sur 10 ans (Morin & Ricard, 2009), il devient urgent de développer des modèles de digestion *in vitro* fiables et réalistes afin de pouvoir limiter à court terme le recours aux modèles d'étude animaux et s'en passer dès que possible.

Liste des références bibliographiques

- Aaron, J. E., Stasiak, L., Gallagher, J. C., Longton, E. B., Nicholson, M., Anderson, J., & Nordin, B. E. C. (1974). Frequency of osteomalacia and osteoporosis in fractures of the proximal femur. *The Lancet*, *303*(7851), 229–233.
- Abdel-Aal, E.-S. M., Akhtar, H., Zaheer, K., & Ali, R. (2013). Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*, *5*(4), 1169–1185.
- Abrams, C. K., Hamosh, M., Hubbard, V. S., Dutta, S. K., & Hamosh, P. (1984). Lingual lipase in cystic fibrosis. Quantitation of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency. *The Journal of Clinical Investigation*, *73*(2), 374–382.
- ACC/SCN. (2000). *Fourth Report on the World Nutrition Situation* (p. 132). Genève Retrieved from <http://ebrary.ifpri.org/utils/getfile/collection/p15738coll2/id/125335/filename/125336.pdf>.
- Achón, M., Arrate, Á., Alonso-Aperte, E., & Varela-Moreiras, G. (2011). Plasma folate concentrations after a single dose ingestion of whole and skimmed folic acid fortified milks in healthy subjects. *European Journal of Nutrition*, *50*(2), 119–125.
- AFSSA. (2003). *Enrichissement de la farine en vitamines B en France - proposition d'un programme pilote* (p. 71) Retrieved from <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT-Ra-vitamineB.pdf>.
- Age-Related Eye Disease Study 2 Research Group. (2013). Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA*, *309*(19), 2005–2015.
- Agrawal, K. R., Lucas, P. W., Prinz, J. F., & Bruce, I. C. (1997). Mechanical properties of foods responsible for resisting food breakdown in the human mouth. *Archives of Oral Biology*, *42*(1), 1–9.
- Aguilera, J. M. (2005). Why food microstructure? *Journal of Food Engineering*, *67*(1–2), 3–11.
- Aguilera, J. M. (2006). Food product engineering: building the right structures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *86*(8), 1147–1155.
- Aguilera, J. M., & Stanley, D. W. (1999). *Microstructural principles of food processing and engineering* (2nd ed). Gaithersburg, MD: Aspen Publishers.
- Akuffo, K. O., Nolan, J. M., Howard, A. N., Moran, R., Stack, J., Klein, R., ... Beatty, S. (2015). Sustained supplementation and monitored response with differing carotenoid formulations in early age-related macular degeneration. *Eye (London, England)*, *29*(7), 902–912.

- Al-Ali, H., & Fuleihan, G. E. (2000). Nutritional osteomalacia: substantial clinical improvement and gain in bone density posttherapy. *Journal of Clinical Densitometry: The Official Journal of the International Society for Clinical Densitometry*, 3(1), 97–101.
- Allen, L. (2006). *Guidelines on food fortification with micronutrients*. Geneva: World Health Organization [u.a.
- Allen, L. H. (2012). Vitamin B-12. *Advances in Nutrition*, 3(1), 54–55.
- Allen, R. H., Seetharam, B., Podell, E., & Alpers, D. H. (1978). Effect of Proteolytic Enzymes on the Binding of Cobalamin to R Protein and Intrinsic Factor. *Journal of Clinical Investigation*, 61(1), 47–54.
- Almaas, H., Cases, A.-L., Devold, T. G., Holm, H., Langsrud, T., Aabakken, L., ... Vegarud, G. E. (2006). In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International Dairy Journal*, 16(9), 961–968.
- Alonso, R., Orúe, E., & Marzo, F. (1998). Effects of extrusion and conventional processing methods on protein and antinutritional factor contents in pea seeds. *Food Chemistry*, 63(4), 505–512.
- Alting, A. C., Weijers, M., de Hoog, E. H. A., van de Pijpekamp, A. M., Cohen Stuart, M. A., Hamer, R. J., ... Visschers, R. W. (2004). Acid-Induced Cold Gelation of Globular Proteins: Effects of Protein Aggregate Characteristics and Disulfide Bonding on Rheological Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 623–631.
- Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413–420.
- Anby, M. U., Williams, H. D., McIntosh, M., Benameur, H., Edwards, G. A., Pouton, C. W., & Porter, C. J. H. (2012). Lipid digestion as a trigger for supersaturation: evaluation of the impact of supersaturation stabilization on the in vitro and in vivo performance of self-emulsifying drug delivery systems. *Molecular Pharmaceutics*, 9(7), 2063–2079.
- ANSES. (2015). *AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des apports en vitamines et minéraux issus de l'alimentation non enrichie, de l'alimentation enrichie et des compléments alimentaires dans la population française : estimation des apports usuels, des prévalences d'inadéquation et des risques de dépassement des limites de sécurité* (No. 2012- SA- 0142) Retrieved from <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2012sa0142.pdf>.
- ANSES. (2017). Table de composition nutritionnelle Ciqual Retrieved from <https://pro.anses.fr/tableciqual/>.
- ANSES. (2019, March 6). Vitamine B9 ou acide folique Retrieved from <https://www.anses.fr/fr/content/vitamine-b9-ou-acide-folique>.

- Apukhovskaia, L. I., Khrestovaia, N. L., Antonenko, L. V., Omel'chenko, L. I., & Dotsenko, L. A. (1990). Effect of varying vitamin D status in the body on intestinal absorption and metabolism of vitamin D in the rat liver. *Ukrainskii Biokhimičeskii Zhurnal (1978)*, 62(6), 88–92.
- Arendt, J. F. B., Pedersen, L., Nexø, E., & Sørensen, H. T. (2013). Elevated Plasma Vitamin B12 Levels as a Marker for Cancer: A Population-Based Cohort Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 105(23), 1799–1805.
- Arkbåge, K., Verwei, M., Havenaar, R., & Witthöft, C. (2003). Bioaccessibility of folic acid and (6S)-5-methyltetrahydrofolate decreases after the addition of folate-binding protein to yogurt as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 3678–3683.
- Armand, M., Borel, P., Dubois, C., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., ... Lairon, D. (1994). Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *The American Journal of Physiology*, 266(3 Pt 1), G372-381.
- Armand, M., Pasquier, B., André, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., ... Lairon, D. (1999). Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(6), 1096–1106.
- Armand, Martine, Borel, P., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., ... Lairon, D. (1992). Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase: an in vitro study. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 3(7), 333–341.
- Aschoff, J. K., Rolke, C. L., Breusing, N., Bosy-Westphal, A., Högel, J., Carle, R., & Schweiggert, R. M. (2015). Bioavailability of β -cryptoxanthin is greater from pasteurized orange juice than from fresh oranges - a randomized cross-over study. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59(10), 1896–1904.
- Assmann, K. E., Touvier, M., Andreeva, V. A., Deschasaux, M., Constans, T., Hercberg, S., ... Kesse-Guyot, E. (2015). Midlife plasma vitamin D concentrations and performance in different cognitive domains assessed 13 years later. *The British Journal of Nutrition*, 113(10), 1628–1637.
- Atta, C. A. M., Fiest, K. M., Frolkis, A. D., Jette, N., Pringsheim, T., St Germaine-Smith, C., ... Metcalfe, A. (2016). Global Birth Prevalence of Spina Bifida by Folic Acid Fortification Status: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Public Health*, 106(1), e24-34.
- Babu, S., & Srikantia, S. G. (1976). Availability of folates from some foods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 29(4), 376–379.
- Bailey, L. B., & Gregory, J. F. (1999). Folate metabolism and requirements. *The Journal of Nutrition*, 129(4), 779–782.

- Bailey, R. L., Durazo-Arvizu, R. A., Carmel, R., Green, R., Pfeiffer, C. M., Sempos, C. T., ... Yetley, E. A. (2013). Modeling a methylmalonic acid–derived change point for serum vitamin B-12 for adults in NHANES. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *98*(2), 460–467.
- Bailey, R. L., Looker, A. C., Lu, Z., Fan, R., Eicher-Miller, H. A., Fakhouri, T. H., ... Mills, J. L. (2015). B-vitamin status and bone mineral density and risk of lumbar osteoporosis in older females in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *102*(3), 687–694.
- Bailey, R. L., West Jr., K. P., & Black, R. E. (2015). The Epidemiology of Global Micronutrient Deficiencies. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *66*(2), 22–33.
- Baker, D. H. (2008). Animal models in nutrition research. *The Journal of Nutrition*, *138*(2), 391–396.
- Ball, G. F. M. (2008). Folate. In *Vitamins Their Role in the Human Body* (pp. 347–382). New York, NY: John Wiley & Sons.
- Barbé, F., Ménard, O., Gouar, Y. L., Buffière, C., Famelart, M.-H., Laroche, B., ... Dupont, D. (2014). Acid and rennet gels exhibit strong differences in the kinetics of milk protein digestion and amino acid bioavailability. *Food Chemistry*, *143*, 1–8.
- Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M.-H., Laroche, B., ... Rémond, D. (2013). The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry*, *136*(3–4), 1203–1212.
- Barger-Lux, M. J., Heaney, R. P., Dowell, S., Chen, T. C., & Holick, M. F. (1998). Vitamin D and its Major Metabolites: Serum Levels after Graded Oral Dosing in Healthy Men. *Osteoporosis International*, *8*(3), 222–230.
- Barragry, J. M., France, M. W., Corless, D., Gupta, S. P., Switala, S., Boucher, B. J., & Cohen, R. D. (1978). Intestinal cholecalciferol absorption in the elderly and in younger adults. *Clinical Science and Molecular Medicine*, *55*(2), 213–220.
- Bassett, M. N., & Sammán, N. C. (2010). Folate content and retention in selected raw and processed foods. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion*, *60*(3), 298–305.
- Baugh, C. M., & Krumdieck, C. L. (1971). Naturally occurring folates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *186*, 7–28.
- Bax, M.-L., Buffière, C., Hafnaoui, N., Gaudichon, C., Savary-Auzeloux, I., Dardevet, D., ... Rémond, D. (2013). Effects of meat cooking, and of ingested amount, on protein digestion speed and entry of residual proteins into the colon: a study in minipigs. *PLoS One*, *8*(4), e61252.
- Bax, M.-L., Sayd, T., Aubry, L., Ferreira, C., Viala, D., Chambon, C., ... Santé-Lhoutellier, V. (2013). Muscle composition slightly affects in vitro digestion of aged and cooked meat: identification of associated proteomic markers. *Food Chemistry*, *136*(3–4), 1249–1262.

- Beatty, S., Chakravarthy, U., Nolan, J. M., Muldrew, K. A., Woodside, J. V., Denny, F., & Stevenson, M. R. (2013). Secondary outcomes in a clinical trial of carotenoids with coantioxidants versus placebo in early age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, *120*(3), 600–606.
- Bellmann, S., Lelieveld, J., Gorissen, T., Minekus, M., & Havenaar, R. (2016). Development of an advanced in vitro model of the stomach and its evaluation versus human gastric physiology. *Food Research International*, *88*, 191–198.
- Benini, L., Brighenti, F., Castellani, G., Brentegani, M. T., Casiraghi, M. C., Ruzzenente, O., ... Vantini, I. (1994). Gastric emptying of solids is markedly delayed when meals are fried. *Digestive Diseases and Sciences*, *39*(11), 2288–2294.
- Berg, H. (2009). Carotenoid Interactions. *Nutrition Reviews*, *57*(1), 1–10.
- Bernstein, P. S., Li, B., Vachali, P. P., Gorusupudi, A., Shyam, R., Henriksen, B. S., & Nolan, J. M. (2016). Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, *50*, 34–66.
- Berrow, E. J., Bartlett, H. E., Eperjesi, F., & Gibson, J. M. (2013). The effects of a lutein-based supplement on objective and subjective measures of retinal and visual function in eyes with age-related maculopathy -- a randomised controlled trial. *The British Journal of Nutrition*, *109*(11), 2008–2014.
- Berti, C., Riso, P., Monti, L. D., & Porrini, M. (2004). In vitro starch digestibility and in vivo glucose response of gluten-free foods and their gluten counterparts. *European Journal of Nutrition*, *43*(4), 198–204.
- Bhandari, S. D., & Gregory, J. F. (1990). Inhibition by selected food components of human and porcine intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase activity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *51*(1), 87–94.
- Bikle, D. D. (2011). Vitamin D metabolism and function in the skin. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *347*(1–2), 80–89.
- Bikle, D. D. (2014). Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications. *Chemistry & Biology*, *21*(3), 319–329.
- Bird, A. J. (2003). Zinc fingers can act as Zn²⁺ sensors to regulate transcriptional activation domain function. *The EMBO Journal*, *22*(19), 5137–5146.
- Bischoff-Ferrari, H. A. (2012). Relevance of vitamin D in muscle health. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *13*(1), 71–77.
- Bischoff-Ferrari, H. A., Dietrich, T., Orav, E. J., Hu, F. B., Zhang, Y., Karlson, E. W., & Dawson-Hughes, B. (2004). Higher 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with better lower-

- extremity function in both active and inactive persons aged > or =60 y. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 752–758.
- Bishu, S., & Quigley, E. M. M. (2015). Nutrient Digestion, Absorption, and Sensing. In D. K. Podolsky, M. Camilleri, J. G. Fitz, A. N. Kalloo, F. Shanahan, & T. C. Wang (Eds.), *Yamada's Textbook of Gastroenterology* (pp. 538–555). Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Digestion - Absorption. In *Medical Biochemistry* (pp. 251–273). Elsevier.
- Blanquet-Diot, S., Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Denis, S., Peyron, M.-A., & Alric, M. (2013). Les modèles in vitro. In *Structure des aliments et effets nutritionnels* (Quae, pp. 321–335).
- Blazek, J., & Gilbert, E. P. (2010). Effect of Enzymatic Hydrolysis on Native Starch Granule Structure. *Biomacromolecules*, 11(12), 3275–3289.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
- Blonk, J. C. G., & van Aalst, H. (1993). Confocal scanning light microscopy in food research. *Food Research International*, 26(4), 297–311.
- Bloom, D. E., Cafiero, E. T., Jané-Llopis, E., Abrahams-Gessel, S., Bloom, L. R., Fathima, S., ... Weinstein, C. (2011). *The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases* (p. 48). Genève: World Economic Forum Retrieved from http://www3.weforum.org/docs/WEF_Harvard_HE_GlobalEconomicBurdenNonCommunicableDiseases_2011.pdf.
- Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., ... Dupont, D. (2018). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), 2239–2261.
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M. P., Maubois, J. L., & Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14930–14935.
- Bolondi, L., Bortolotti, M., Santi, V., Calletti, T., Gaiani, S., & Labò, G. (1985). Measurement of gastric emptying time by real-time ultrasonography. *Gastroenterology*, 89(4), 752–759.
- Bone, R. A., Landrum, J. T., Friedes, L. M., Gomez, C. M., Kilburn, M. D., Menendez, E., ... Wang, W. (1997). Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Experimental Eye Research*, 64(2), 211–218.
- Booijink, C. C. G. M., El-Aidy, S., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G. H. J., Troost, F. J., Smidt, H., ... Zoetendal, E. G. (2010). High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environmental Microbiology*, 12(12), 3213–3227.

- Borel, P., Caillaud, D., & Cano, N. J. (2015). Vitamin D Bioavailability: State of the Art. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(9), 1193–1205.
- Borel, P., Grolier, P., Armand, M., Partier, A., Lafont, H., Lairon, D., & Azais-Braesco, V. (1996). Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. *Journal of Lipid Research*, 37(2), 250–261.
- Borel, P., Pasquier, B., Armand, M., Tyssandier, V., Grolier, P., Alexandre-Gouabau, M. C., ... Azais-Braesco, V. (2001). Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(1), G95–G103.
- Borel, Patrick. (2012a). Gènes et absorption intestinale des microconstituants lipidiques (vitamines liposolubles, caroténoïdes et phytostérols). *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 19(4), 209–215.
- Borel, Patrick. (2012b). Genetic variations involved in interindividual variability in carotenoid status. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(2), 228–240.
- Borel, Patrick, Desmarchelier, C., Nowicki, M., Bott, R., Morange, S., & Lesavre, N. (2014). Interindividual variability of lutein bioavailability in healthy men: characterization, genetic variants involved, and relation with fasting plasma lutein concentration. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100(1), 168–175.
- Borel, Patrick, Moussa, M., Reboul, E., Lyan, B., Defoort, C., Vincent-Baudry, S., ... Lairon, D. (2007). Human Plasma Levels of Vitamin E and Carotenoids Are Associated with Genetic Polymorphisms in Genes Involved in Lipid Metabolism. *The Journal of Nutrition*, 137(12), 2653–2659.
- Bornet, F. R. (1994). Undigestible sugars in food products. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(3 Suppl), 763S–769S.
- Bornhorst, G. M., Ferrua, M. J., & Singh, R. P. (2015). A Proposed Food Breakdown Classification System to Predict Food Behavior during Gastric Digestion: Food breakdown classification system.... *Journal of Food Science*, 80(5), R924–R934.
- Bornhorst, G. M., Kostlan, K., & Singh, R. P. (2013). Particle Size Distribution of Brown and White Rice during Gastric Digestion Measured by Image Analysis. *Journal of Food Science*, 78(9), E1383–E1391.
- Bornhorst, G. M., Roman, M. J., Rutherford, S. M., Burri, B. J., Moughan, P. J., & Singh, R. P. (2013). Gastric Digestion of Raw and Roasted Almonds *In Vivo*. *Journal of Food Science*, 78(11), H1807–H1813.
- Bornhorst, G. M., & Singh, R. P. (2013). Kinetics of in Vitro Bread Bolus Digestion with Varying Oral and Gastric Digestion Parameters. *Food Biophysics*, 8(1), 50–59.

- Bornhorst, G. M., & Singh, R. P. (2014). Gastric digestion in vivo and in vitro: how the structural aspects of food influence the digestion process. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 111–132.
- Boulby, P., Moore, R., Gowland, P., & Spiller, R. C. (1999). Fat delays emptying but increases forward and backward antral flow as assessed by flow-sensitive magnetic resonance imaging. *Neurogastroenterology and Motility: The Official Journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 11(1), 27–36.
- Bourlieu, C., Ménard, O., De La Chevasnerie, A., Sams, L., Rousseau, F., Madec, M.-N., ... Dupont, D. (2015). The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during in vitro gastric digestion. *Food Chemistry*, 182, 224–235.
- Boutrou, R., Jardin, J., Blais, A., Tomé, D., & Léonil, J. (2008). Glycosylations of κ -Casein-Derived Caseinomacropptide Reduce Its Accessibility to Endo- but Not Exointestinal Brush Border Membrane Peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 8166–8173.
- Bowen, P. E., Herbst-Espinosa, S. M., Hussain, E. A., & Stacewicz-Sapuntzakis, M. (2002). Esterification Does Not Impair Lutein Bioavailability in Humans. *The Journal of Nutrition*, 132(12), 3668–3673.
- Brady, W. E., Mares-Perlman, J. A., Bowen, P., & Stacewicz-Sapuntzakis, M. (1996). Human Serum Carotenoid Concentrations Are Related to Physiologic and Lifestyle Factors. *The Journal of Nutrition*, 126(1), 129–137.
- Brand-Miller, J., & Holt, S. (2004). Testing the glycaemic index of foods: in vivo, not in vitro. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(4), 700–701.
- Brandon, E. F. A., Oomen, A. G., Rempelberg, C. J. M., Versantvoort, C. H. M., van Engelen, J. G. M., & Sips, A. J. A. M. (2006). Consumer product in vitro digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44(2), 161–171.
- Breithaupt, D. E., Weller, P., Wolters, M., & Hahn, A. (2004). Comparison of plasma responses in human subjects after the ingestion of 3R,3R'-zeaxanthin dipalmitate from wolfberry (*Lycium barbarum*) and non-esterified 3R,3R'-zeaxanthin using chiral high-performance liquid chromatography. *British Journal of Nutrition*, 91(05), 707.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014.
- Brouwer, I. A., van Dusseldorp, M., West, C. E., Meyboom, S., Thomas, C. M., Duran, M., ... Steegers-Theunissen, R. P. (1999). Dietary folate from vegetables and citrus fruit decreases plasma homocysteine concentrations in humans in a dietary controlled trial. *The Journal of Nutrition*, 129(6), 1135–1139.

- Brouwer, I. A., van Dusseldorp, M., West, C. E., & Steegers-Theunissen, R. P. (2001). Bioavailability and bioefficacy of folate and folic acid in man. *Nutrition Research Reviews*, *14*(2), 267–294.
- Brown, L., Rimm, E. B., Seddon, J. M., Giovannucci, E. L., Chasan-Taber, L., Spiegelman, D., ... Hankinson, S. E. (1999). A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *70*(4), 517–524.
- Bruin, S., & Jongen, Th. R. G. (2003). Food Process Engineering: The Last 25 Years and Challenges Ahead. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *2*(2), 42–81.
- Bry, L., Falk, P. G., Midtvedt, T., & Gordon, J. I. (1996). A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. *Science (New York, N.Y.)*, *273*(5280), 1380–1383.
- Bryant, C. M., & McClements, D. J. (1998). Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology*, *9*(4), 143–151.
- Bueno Dalto, D., Audet, I., Girard, C. L., & Matte, J.-J. (2018). Bioavailability of Vitamin B12 from Dairy Products Using a Pig Model. *Nutrients*, *10*(9) doi:10.3390/nu10091134.
- Bureau, S., Mouhoubi, S., Touloumet, L., Garcia, C., Moreau, F., Bédouet, V., & Renard, C. M. G. C. (2015). Are folates, carotenoids and vitamin C affected by cooking? Four domestic procedures are compared on a large diversity of frozen vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, *64*(2), 735–741.
- Burton, P., & Lightowler, H. J. (2006). Influence of bread volume on glycaemic response and satiety. *British Journal of Nutrition*, *96*(05) doi:10.1017/BJN20061900.
- Buscemi, S., Corleo, D., Di Pace, F., Petroni, M. L., Satriano, A., & Marchesini, G. (2018). The Effect of Lutein on Eye and Extra-Eye Health. *Nutrients*, *10*(9) doi:10.3390/nu10091321.
- Čabarkapa, V., Stošić, Z., Žeravica, R., Ilinčić, B., & Filipović, A. (2007). The Importance of Holotranscobalamin Measurement. *Journal of Medical Biochemistry*, *26*(3), 227–230.
- Calvo-Lerma, J., Fornés-Ferrer, V., Heredia, A., & Andrés, A. (2018). In Vitro Digestion of Lipids in Real Foods: Influence of Lipid Organization Within the Food Matrix and Interactions with Nonlipid Components. *Journal of Food Science*, *83*(10), 2629–2637.
- Camilleri, M., Malagelada, J. R., Brown, M. L., Becker, G., & Zinsmeister, A. R. (1985). Relation between antral motility and gastric emptying of solids and liquids in humans. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *249*(5), G580–G585.
- Camilleri, Michael, Brown, M. L., & Malagelada, J.-R. (1986). Relationship between impaired gastric emptying and abnormal gastrointestinal motility. *Gastroenterology*, *91*(1), 94–99.

- Cardinault, N., Tyssandier, V., Grolier, P., Winklhofer-Roob, B. M., Ribalta, J., Bouteloup-Demange, C., ... Borel, P. (2003). Comparison of the postprandial chylomicron carotenoid responses in young and older subjects. *European Journal of Nutrition*, *42*(6), 315–323.
- Cardwell, G., Bornman, J. F., James, A. P., & Black, L. J. (2018). A Review of Mushrooms as a Potential Source of Dietary Vitamin D. *Nutrients*, *10*(10) doi:10.3390/nu10101498.
- Carmel, R. (2008). Efficacy and safety of fortification and supplementation with vitamin B12: biochemical and physiological effects. *Food and Nutrition Bulletin*, *29*(2 Suppl), S177-187.
- Carpenter, K. J. (2000). *Beriberi, white rice, and vitamin B: a disease, a cause, and a cure*. Berkeley, CA: University of California Press.
- Carter, B., Monsivais, P., & Drewnowski, A. (2010). Absorption of Folic Acid and Ascorbic Acid from Nutrient Comparable Beverages. *Journal of Food Science*, *75*(9), H289–H293.
- Carter, E. G., & Carpenter, K. J. (1982). The bioavailability for humans of bound niacin from wheat bran. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *36*(5), 855–861.
- Casiraghi, M. C., Brighenti, F., & Testolin, G. (1992). Lack of effect of high temperature drying on digestibility of starch in spaghetti. *Journal of Cereal Science*, *15*(2), 165–174.
- Cassady, B. A., Hollis, J. H., Fulford, A. D., Considine, R. V., & Mattes, R. D. (2009). Mastication of almonds: effects of lipid bioaccessibility, appetite, and hormone response. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *89*(3), 794–800.
- Castaneda, N., & Lee, Y. (2019). Microstructure of a Model Fresh Cheese and Bioaccessibility of Vitamin D₃ Using In Vitro Digestion. *Gels (Basel, Switzerland)*, *5*(1) doi:10.3390/gels5010016.
- Castenmiller, J. J., van de Poll, C. J., West, C. E., Brouwer, I. A., Thomas, C. M., & van Dusseldorp, M. (2000). Bioavailability of folate from processed spinach in humans. Effect of food matrix and interaction with carotenoids. *Annals of Nutrition & Metabolism*, *44*(4), 163–169.
- Castenmiller, J. J., West, C. E., Linssen, J. P., van het Hof, K. H., & Voragen, A. G. (1999). The food matrix of spinach is a limiting factor in determining the bioavailability of beta-carotene and to a lesser extent of lutein in humans. *The Journal of Nutrition*, *129*(2), 349–355.
- Castillo-Lancellotti, C., Tur, J. A., & Uauy, R. (2013). Impact of folic acid fortification of flour on neural tube defects: a systematic review. *Public Health Nutrition*, *16*(5), 901–911.
- Caugant, I., Petit, H. V., Ivan, M., Bard, C., Savoie, L., Toullec, R., ... Yvon, M. (1994). In vivo and in vitro gastric emptying of milk replacers containing soybean proteins. *Journal of Dairy Science*, *77*(2), 533–540.
- Cavadini, C., Siega-Riz, A. M., & Popkin, B. M. (2000). US adolescent food intake trends from 1965 to 1996. *The Western Journal of Medicine*, *173*(6), 378–383.

- Černá, J., & Káš, J. (1983). New conception of folacin assay in starch or glycogen containing food samples. *Food / Nahrung*, 27(10), 957–964.
- Chacornac, J. P., Barnouin, J., & Houlier, M. L. (1993). [Automated micro-determination by transfer analyzer of circulating alpha-amino nitrogen]. *Reproduction, Nutrition, Development*, 33(2), 99–108.
- Chan, C., Leung, I., Lam, K. W., & Tso, M. O. (1998). The occurrence of retinol and carotenoids in human subretinal fluid. *Current Eye Research*, 17(9), 890–895.
- Chang, J., Zhang, Y., Li, Y., Lu, K., Shen, Y., Guo, Y., ... Zhang, S. (2018). NrF2/ARE and NF- κ B pathway regulation may be the mechanism for lutein inhibition of human breast cancer cell. *Future Oncology (London, England)*, 14(8), 719–726.
- Chantarojanasiri, T., Hirooka, Y., Ratanachu-Ek, T., Kawashima, H., Ohno, E., & Goto, H. (2015). Evolution of pancreas in aging: degenerative variation or early changes of disease? *Journal of Medical Ultrasonics (2001)*, 42(2), 177–183.
- Chapuy, M. C., Schott, A. M., Garnero, P., Hans, D., Delmas, P. D., & Meunier, P. J. (1996). Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. EPIDOS Study Group. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(3), 1129–1133.
- Chatterton, D. E. W., Rasmussen, J. T., Heegaard, C. W., Sørensen, E. S., & Petersen, T. E. (2004). In vitro digestion of novel milk protein ingredients for use in infant formulas: Research on biological functions. *Trends in Food Science & Technology*, 15(7–8), 373–383.
- Chen, J. (2009). Food oral processing—A review. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 1–25.
- Chen, L., Xu, Y., Fan, T., Liao, Z., Wu, P., Wu, X., & Chen, X. D. (2016). Gastric emptying and morphology of a ‘near real’ in vitro human stomach model (RD-IV-HSM). *Journal of Food Engineering*, 183, 1–8.
- Cheng, L. K., O’Grady, G., Du, P., Egbuji, J. U., Windsor, J. A., & Pullan, A. J. (2010). Gastrointestinal system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(1), 65–79.
- Chew, B. P., Parks, J. S., Wong, T. S., Weng, B. B. C., Kim (Jun), H., Byrne, K. M., ... Reinhart, G. A. (1998). Role of dietary β -carotene in modulating cell-mediated and humoral immune response in dogs. *FASEB*, 12(A967).
- Chitchumroonchokchai, C., Schwartz, S. J., & Failla, M. L. (2004). Assessment of Lutein Bioavailability from Meals and a Supplement Using Simulated Digestion and Caco-2 Human Intestinal Cells. *The Journal of Nutrition*, 134(9), 2280–2286.
- Cho, E., Hankinson, S. E., Rosner, B., Willett, W. C., & Colditz, G. A. (2008). Prospective study of lutein/zeaxanthin intake and risk of age-related macular degeneration. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(6), 1837–1843.

- Chong, E. W.-T., Wong, T. Y., Kreis, A. J., Simpson, J. A., & Guymer, R. H. (2007). Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *335*(7623), 755.
- Christakos, S., Ajibade, D. V., Dhawan, P., Fechner, A. J., & Mady, L. J. (2010). Vitamin D: Metabolism. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, *39*(2), 243–253.
- Chung, H.-Y., Rasmussen, H. M., & Johnson, E. J. (2004). Lutein Bioavailability Is Higher from Lutein-Enriched Eggs than from Supplements and Spinach in Men. *The Journal of Nutrition*, *134*(8), 1887–1893.
- Chung, R. W. S., Leanderson, P., Lundberg, A. K., & Jonasson, L. (2017). Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, *262*, 87–93.
- Cifuentes, A. (2012). Food Analysis: Present, Future, and Foodomics. *ISRN Analytical Chemistry*, *2012*, 1–16.
- Clark, R. M., Yao, L., She, L., & Furr, H. C. (2000). A comparison of lycopene and astaxanthin absorption from corn oil and olive oil emulsions. *Lipids*, *35*(7), 803–806.
- Clausen, I., Jakobsen, J., Leth, T., & Ovesen, L. (2003). Vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in raw and cooked pork cuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *16*(5), 575–585.
- Clemente, G., Mancini, M., Nazzaro, F., Lasorella, G., Riviaccio, A., Palumbo, A. M., ... Giacco, R. (2003). Effects of different dairy products on postprandial lipemia. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, *13*(6), 377–383.
- Clevidence, B. A., & Bieri, J. G. (1993). Association of carotenoids with human plasma lipoproteins. In *Methods in Enzymology* (Vol. 214, pp. 33–46). Elsevier.
- Cohen, Y., Levi, M., Lesmes, U., Margier, M., Reboul, E., & Livney, Y. D. (2017). Re-assembled casein micelles improve in vitro bioavailability of vitamin D in a Caco-2 cell model. *Food & Function*, *8*(6), 2133–2141.
- Combs, G. F., & McClung, J. P. (2017a). Folate. In *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health* (Fifth edition, pp. 399–429). Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP.
- Combs, G. F., & McClung, J. P. (2017b). Vitamin B12. In *The Vitamins* (pp. 431–452). Elsevier.
- Combs, G. F., & McClung, J. P. (2017c). Vitamin D. In *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health* (Fifth edition, pp. 161–206). Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP.
- Concern Worldwide. (2019). 2019 Global Hunger Index Results Retrieved from <https://www.globalhungerindex.org/results.html>.

- Corstens, M. N., Berton-Carabin, C. C., Schroën, K., Viau, M., & Meynier, A. (2018). Emulsion encapsulation in calcium-alginate beads delays lipolysis during dynamic in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, *46*, 394–402.
- Costill, D. L., & Saltin, B. (1974). Factors limiting gastric emptying during rest and exercise. *Journal of Applied Physiology*, *37*(5), 679–683.
- Crider, K. S., Bailey, L. B., & Berry, R. J. (2011). Folic acid food fortification-its history, effect, concerns, and future directions. *Nutrients*, *3*(3), 370–384.
- Crider, K. S., Devine, O., Qi, Y. P., Yeung, L. F., Sekkarie, A., Zaganjor, I., ... Berry, R. J. (2019). Systematic Review and Bayesian Meta-analysis of the Dose-response Relationship between Folic Acid Intake and Changes in Blood Folate Concentrations. *Nutrients*, *11*(1) doi:10.3390/nu11010071.
- Crowe, K. M. (2013). Designing functional foods with bioactive polyphenols : highlightning lessons learned from original plant matrices. *Journal of Human Nutrition and Food Science*, *1*(3) Retrieved from <https://www.jscimedcentral.com/Nutrition/nutrition-1-1018.pdf>.
- Crum, M. F., Trevaskis, N. L., Williams, H. D., Pouton, C. W., & Porter, C. J. H. (2016). A new in vitro lipid digestion – in vivo absorption model to evaluate the mechanisms of drug absorption from lipid-based formulations. *Pharmaceutical Research*, *33*(4), 970–982.
- Cuskelly, G. J., McNulty, H., & Scott, J. M. (1996). Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. *Lancet (London, England)*, *347*(9002), 657–659.
- Dagnelie, G., Zorge, I. S., & McDonald, T. M. (2000). Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the Internet. *Optometry (St. Louis, Mo.)*, *71*(3), 147–164.
- Dali-Youcef, N., & Andres, E. (2009). An update on cobalamin deficiency in adults. *QJM*, *102*(1), 17–28.
- Darrouzet-Nardi, A., Ladd, M. P., & Weintraub, M. N. (2013). Fluorescent microplate analysis of amino acids and other primary amines in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, *57*, 78–82.
- Dawczynski, J., Jentsch, S., Schweitzer, D., Hammer, M., Lang, G. E., & Strobel, J. (2013). Long term effects of lutein, zeaxanthin and omega-3-LCPUFAs supplementation on optical density of macular pigment in AMD patients: the LUTEGA study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, *251*(12), 2711–2723.
- Dawson, E. B., Evans, D. R., Conway, M. E., & McGanity, W. J. (2000). Vitamin B12 and folate bioavailability from two prenatal multivitamin/multimineral supplements. *American Journal of Perinatology*, *17*(4), 193–199.

- Day, L., Golding, M., Xu, M., Keogh, J., Clifton, P., & Wooster, T. J. (2014). Tailoring the digestion of structured emulsions using mixed monoglyceride–caseinate interfaces. *Food Hydrocolloids*, *36*, 151–161.
- de Almeida, P. D. V., Grégio, A. M. T., Machado, M. A. N., de Lima, A. A. S., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, *9*(3), 72–80.
- de Oliveira, S. C., Bellanger, A., Ménard, O., Pladys, P., Le Gouar, Y., Dirson, E., ... Bourlieu, C. (2017). Impact of human milk pasteurization on gastric digestion in preterm infants: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *105*(2), 379–390.
- de Pee, S., & West, C. E. (1996). Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature. *European Journal of Clinical Nutrition*, *50 Suppl 3*, S38-53.
- de Pee, S., West, C. E., Karyadi, D., & Hautvast, J. G. (1995). Lack of improvement in vitamin A status with increased consumption of dark-green leafy vegetables. *Lancet (London, England)*, *346*(8967), 75–81.
- de Wijk, R. A., & Prinz, J. F. (2005). The role of friction in perceived oral texture. *Food Quality and Preference*, *16*(2), 121–129.
- de Wijk, R. A., Prinz, J. F., Engelen, L., & Weenen, H. (2004). The role of alpha-amylase in the perception of oral texture and flavour in custards. *Physiology & Behavior*, *83*(1), 81–91.
- Déat, E., Blanquet-Diot, S., Jarrige, J.-F., Denis, S., Beyssac, E., & Alric, M. (2009). Combining the dynamic TNO-gastrointestinal tract system with a Caco-2 cell culture model: application to the assessment of lycopene and alpha-tocopherol bioavailability from a whole food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(23), 11314–11320.
- Debry, G. (1994). *Coffee and health*. Paris: John Libbey Eurotext.
- Décret n°87-848 du 19 octobre 1987 relatif aux expériences pratiquées sur les animaux vertébrés., 87-848 (1987).
- Deglaire, A., Fromentin, C., Fouillet, H., Airinei, G., Gaudichon, C., Boutry, C., ... Bos, C. (2009). Hydrolyzed dietary casein as compared with the intact protein reduces postprandial peripheral, but not whole-body, uptake of nitrogen in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *90*(4), 1011–1022.
- Deglaire, A., Oliveira, S. D., Jardin, J., Briard-Bion, V., Kroell, F., Emily, M., ... Dupont, D. (2019). Impact of human milk pasteurization on the kinetics of peptide release during in vitro dynamic digestion at the preterm newborn stage. *Food Chemistry*, *281*, 294–303.
- Dekkers, B. L., Kolodziejczyk, E., Acquistapace, S., Engmann, J., & Wooster, T. J. (2016). Impact of gastric pH profiles on the proteolytic digestion of mixed β lg-Xanthan biopolymer gels. *Food Funct.*, *7*(1), 58–68.

- Delchier, N., Herbig, A.-L., Rychlik, M., & Renard, C. M. G. C. (2016). Folates in Fruits and Vegetables: Contents, Processing, and Stability: Folates in fruits and vegetables.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(3), 506–528.
- Delie, F., & Rubas, W. (1997). A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 14(3), 221–286.
- Della Valle, G., Souchon, I., & Anton, M. (2013). La matrice alimentaire : définition, classification et caractérisation. In *Structure des aliments et effets nutritionnels* (Editions Quae, pp. 13–32). Versailles.
- DeSesso, J. M., & Jacobson, C. F. (2001). Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 39(3), 209–228.
- Desmarchelier, C., Borel, P., Goncalves, A., Kopec, R., Nowicki, M., Morange, S., ... Reboul, E. (2016). A Combination of Single-Nucleotide Polymorphisms Is Associated with Interindividual Variability in Cholecalciferol Bioavailability in Healthy Men. *Journal of Nutrition*, 146(12), 2421–2428.
- Desmarchelier, Charles, & Borel, P. (2017). Overview of carotenoid bioavailability determinants: From dietary factors to host genetic variations. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 270–280.
- Dessirier, J. M., Simons, C. T., Carstens, M. I., O'Mahony, M., & Carstens, E. (2000). Psychophysical and neurobiological evidence that the oral sensation elicited by carbonated water is of chemogenic origin. *Chemical Senses*, 25(3), 277–284.
- Devahastin, S. (Ed.). (2018). *Food microstructure and its relationship with quality and stability*. Duxford, United Kingdom ; Cambridge, MA: Woodhead Publishing.
- Dhonukshe-Rutten, R. A. M., van Dusseldorp, M., Schneede, J., de Groot, L. C. P. G. M., & van Staveren, W. A. (2005). Low bone mineral density and bonemineral content are associated with low cobalamin status in adolescents. *European Journal of Nutrition*, 44(6), 341–347.
- Dill, K. A., & Shortle, D. (1991). Denatured States of Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 60(1), 795–825.
- Diogo, R., Muchlinski, M. N., & Hartstone-Rose, A. (2015). Comparative Anatomy of Primates. In *Basics in Human Evolution* (pp. 43–55). Elsevier.
- Diwadkar-Navsariwala, V., Novotny, J. A., Gustin, D. M., Sosman, J. A., Rodvold, K. A., Crowell, J. A., ... Bowen, P. E. (2003). A physiological pharmacokinetic model describing the disposition of lycopene in healthy men. *Journal of Lipid Research*, 44(10), 1927–1939.

- Dolin, C. D., Deierlein, A. L., & Evans, M. I. (2018). Folic Acid Supplementation to Prevent Recurrent Neural Tube Defects: 4 Milligrams Is Too Much. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 44(3), 161–165.
- Dooley, C. P., & Valenzuela, J. E. (1984). Duodenal volume and osmoreceptors in the stimulation of human pancreatic secretion. *Gastroenterology*, 86(1), 23–27.
- Doran, S., Jones, K. L., Andrews, J. M., & Horowitz, M. (1998). Effects of meal volume and posture on gastric emptying of solids and appetite. *The American Journal of Physiology*, 275(5), R1712-1718.
- Dorey, C. K., Thomson, L., Kinert, K., Finger, M., Nichols, C., Cheng, K., & Craft, N. (1998). Effect of dietary zeaxanthin on age related changes in quail retinas. *Ophthalmol Vis Sci*, 39(164).
- Doscherholmen, A., McMahon, J., & Economon, P. (1981). Vitamin B12 Absorption from Fish. *Experimental Biology and Medicine*, 167(4), 480–484.
- Doscherholmen, A., McMahon, J., & Ripley, D. (1978). Vitamin B12 assimilation from chicken meat. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 31(5), 825–830.
- Drewnowski, A. (2005). Concept of a nutritious food: toward a nutrient density score. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(4), 721–732.
- Drincic, A. T., Armas, L. A. G., Van Diest, E. E., & Heaney, R. P. (2012). Volumetric Dilution, Rather Than Sequestration Best Explains the Low Vitamin D Status of Obesity. *Obesity*, 20(7), 1444–1448.
- Drouin-Chartier, J.-P., Tremblay, A. J., Maltais-Giguère, J., Charest, A., Guinot, L., Rioux, L.-E., ... Couture, P. (2017). Differential impact of the cheese matrix on the postprandial lipid response: a randomized, crossover, controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 106(6), 1358–1365.
- Dubois, C., Beaumier, G., Juhel, C., Armand, M., Portugal, H., Pauli, A. M., Borel, P., Latgé, C., & Lairon, D. (1998). Effects of graded amounts (0-50 g) of dietary fat on postprandial lipemia and lipoproteins in normolipidemic adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(1), 31–38. <https://doi.org/10.1093/ajcn/67.1.31>
- Dupont, D., Alric, M., Blanquet-Diot, S., Bornhorst, G., Cueva, C., Deglaire, A., ... Van den Abbeele, P. (2019). Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(10), 1546–1562.
- Dupont, Didier, Mandalari, G., Mollé, D., Jardin, J., Rolet-Répécaud, O., Duboz, G., ... Mackie, A. R. (2010). Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(11), 1677–1689.
- Durga, J., van Boxtel, M. P., Schouten, E. G., Kok, F. J., Jolles, J., Katan, M. B., & Verhoef, P. (2007). Effect of 3-year folic acid supplementation on cognitive function in older adults in the FACIT trial: a randomised, double blind, controlled trial. *The Lancet*, 369(9557), 208–216.

- During, A., Doraiswamy, S., & Harrison, E. H. (2008). Xanthophylls are preferentially taken up compared with beta-carotene by retinal cells via a SRBI-dependent mechanism. *Journal of Lipid Research*, *49*(8), 1715–1724.
- Dürrenberger, M. B., Handschin, S., Conde-Petit, B., & Escher, F. (2001). Visualization of Food Structure by Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM). *LWT - Food Science and Technology*, *34*(1), 11–17.
- Dusso, A. S., Brown, A. J., & Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *289*(1), F8–F28.
- Dwyer, J. T., Wiemer, K. L., Dary, O., Keen, C. L., King, J. C., Miller, K. B., ... Bailey, R. L. (2015). Fortification and health: challenges and opportunities. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, *6*(1), 124–131.
- Eastwood, M., & Mowbray, L. (1976). The binding of the components of mixed micelle to dietary fiber. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *29*(12), 1461–1467.
- Edes, T. E., Walk, B. E., Thornton, W. H., & Fritsche, K. L. (1991). Essential fatty acid sufficiency does not preclude fat-soluble-vitamin deficiency in short-bowel syndrome. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *53*(2), 499–502.
- EFSA. (2014). Scientific opinion on Dietary Reference Values for folate. *EFSA Journal*, *12*(11), 3893.
- EFSA Panel. (2010). Scientific Opinion on the re-evaluation of lutein (E 161b) as a food additive. *EFSA Journal*, *8*(7) Retrieved from <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2010.1678>.
- Egger, L., Ménard, O., Baumann, C., Duerr, D., Schlegel, P., Stoll, P., ... Portmann, R. (2019). Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic in vitro digestion systems with in vivo data. *Food Research International*, *118*, 32–39.
- Egger, L., Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., ... Portmann, R. (2016). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, *88*, 217–225.
- Egger, L., Schlegel, P., Baumann, C., Stoffers, H., Guggisberg, D., Brügger, C., ... Portmann, R. (2017). Physiological comparability of the harmonized INFOGEST in vitro digestion method to in vivo pig digestion. *Food Research International*, *102*, 567–574.
- Elashoff, J. A., Reedy, T. J., & Meyer, J. H. (1982). Analysis of Gastric Emptying Data, *83*(6), 1306–1312.
- Emami, J. (2006). In vitro-in vivo correlation : from theory to applications. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, *9*(2), 169–189.

- Englyst, H. N., Kingman, S. M., & Cummings, J. H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, *46 Suppl 2*, S33-50.
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., Hudson, G. J., & Cummings, J. H. (1996). Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. *The British Journal of Nutrition*, *75*(5), 749–755.
- Erdman, J. W., Fahey, G. C., & White, C. B. (1986). Effects of purified dietary fiber sources on beta-carotene utilization by the chick. *The Journal of Nutrition*, *116*(12), 2415–2423.
- Eriksen, J. N., Luu, A. Y., Dragsted, L. O., & Arrigoni, E. (2016). In vitro liberation of carotenoids from spinach and Asia salads after different domestic kitchen procedures. *Food Chemistry*, *203*, 23–27.
- Etcheverry, P., Grusak, M. A., & Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, *3* doi:10.3389/fphys.2012.00317.
- European Parliament. (2011, October 25). Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004 (Text with EEA relevance) Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02011R1169-20111212>.
- Evans, P., & Halliwell, B. (2001). Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *British Journal of Nutrition*, *85*(S2), S67.
- Evenepoel, P., Claus, D., Geypens, B., Hiele, M., Geboes, K., Rutgeerts, P., & Ghos, Y. (1999). Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. *The American Journal of Physiology*, *277*(5), G935-943.
- Ezeogu, L. I., Duodu, K. G., Emmambux, M. N., & Taylor, J. R. N. (2008). Influence of Cooking Conditions on the Protein Matrix of Sorghum and Maize Endosperm Flours. *Cereal Chemistry Journal*, *85*(3), 397–402.
- Fain, O. (2013). Carence en vitamine C et scorbut, *19*(3), 179–188.
- Fallingborg, J., Pedersen, P., & Jacobsen, B. A. (1998). Small intestinal transit time and intraluminal pH in ileocecal resected patients with Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences*, *43*(4), 702–705.

- FAO (Ed.). (1998). *Carbohydrates in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation, Rome, 14-18 April 1997*. Rome: World Health Organization : Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2017). *The State of Food Security and nutrition in the World 2017. Building resilience for peace and food security*. (p. 132). Rome Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i7695e.pdf>.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, & WHO. (2019). *State of food security and nutrition in the world 2019 : safeguarding against economic slowdowns and downturns*. Rome: FOOD & AGRICULTURE ORG.
- Fardet, A. (2017). L'effet matrice des aliments, un nouveau concept. *Pratiques en nutrition*, 13(52), 37–40.
- Fardet, A., Lakhssassi, S., & Briffaz, A. (2018). Beyond nutrient-based food indices: a data mining approach to search for a quantitative holistic index reflecting the degree of food processing and including physicochemical properties. *Food & Function*, 9(1), 561–572.
- Fardet, A., Méjean, C., Labouré, H., Andreeva, V. A., & Feron, G. (2017). The degree of processing of foods which are most widely consumed by the French elderly population is associated with satiety and glycemic potentials and nutrient profiles. *Food & Function*, 8(2), 651–658.
- Fardet, A., Souchon, I., & Dupont, D. (2013). *Structure des aliments et effets nutritionnels*. Versailles: Éditions Quæ.
- Farraye, F. A., Nimitphong, H., Stucchi, A., Dendrinou, K., Boulanger, A. B., Vijjeswarapu, A., ... Holick, M. F. (2011). Use of a novel vitamin D bioavailability test demonstrates that vitamin D absorption is decreased in patients with quiescent Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(10), 2116–2121.
- Faulks, R. M., & Southon, S. (2005). Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1740(2), 95–100.
- Favé, G., Peyrot, J., Hamosh, M., & Armand, M. (2007). Digestion des lipides Alimentaires : intérêt de la lipase gastrique humaine ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42(4), 183–190.
- Feeney, J., O'Leary, N., Moran, R., O'Halloran, A. M., Nolan, J. M., Beatty, S., ... Kenny, R. A. (2017). Plasma Lutein and Zeaxanthin Are Associated With Better Cognitive Function Across Multiple Domains in a Large Population-Based Sample of Older Adults: Findings from The Irish Longitudinal Study on Aging. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 72(10), 1431–1436.
- Feldman, M., Cryer, B., McArthur, K. E., Huet, B. A., & Lee, E. (1996). Effects of aging and gastritis on gastric acid and pepsin secretion in humans: a prospective study. *Gastroenterology*, 110(4), 1043–1052.

- Fernandes-Costa, F., & Metz, J. (1982). Vitamin B12 binders (transcobalamins) in serum. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 18(1), 1–30.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751–760.
- Feron, G., & Poette, J. (2013). In-mouth mechanism leading to the perception of fat in humans: from detection to preferences. The particular role of saliva. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 20(2), 102–107.
- Feron, G., & Salles, C. (2013). Rôle de la sphère orale. In *Structure des aliments et effets nutritionnels* (Quae).
- Ferraro, S., Panzeri, A., & Panteghini, M. (2017). Tackling serum folate test in European countries within the health technology assessment paradigm: request appropriateness, assays and health outcomes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 55(9) doi:10.1515/cclm-2016-0804.
- Fielding, J. M., Rowley, K. G., Cooper, P., & O' Dea, K. (2005). Increases in plasma lycopene concentration after consumption of tomatoes cooked with olive oil. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 14(2), 131–136.
- Finglas, P. M., Witthöft, C. M., Vahteristo, L., Wright, A. J. A., Southon, S., Mellon, F. A., ... Maunder, P. (2002). Use of an Oral/Intravenous Dual-Label Stable-Isotope Protocol to Determine Folic Acid Bioavailability from Fortified Cereal Grain Foods in Women. *The Journal of Nutrition*, 132(5), 936–939.
- Fletcher, W. (1993). Rice and beriberi. A preliminary report on an experiment performed in the Asylum for the Insane of Kuala Lumpur. 1907. *Salud Publica De Mexico*, 35(4), 425–433.
- Florey, H. W. (1962). The Secretion and Function of Intestinal Mucus. *Gastroenterology*, 43(3), 326–329.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Forges, T., Pellanda, H., Diligent, C., Monnier, P., & Guéant, J.-L. (2008). Do folates have an impact on fertility? *Gynecologie, Obstetrique & Fertilité*, 36(9), 930–939.
- Fraser, W. D., Taggart, D. P., Fell, G. S., Lyon, T. D., Wheatley, D., Garden, O. J., & Shenkin, A. (1989). Changes in iron, zinc, and copper concentrations in serum and in their binding to transport proteins after cholecystectomy and cardiac surgery. *Clinical Chemistry*, 35(11), 2243.
- Freitas, D., & Le Feunteun, S. (2019). Oro-gastro-intestinal digestion of starch in white bread, wheat-based and gluten-free pasta: Unveiling the contribution of human salivary α -amylase. *Food Chemistry*, 274, 566–573.

- Freitas, D., Le Feunteun, S., Panouillé, M., & Souchon, I. (2018). The important role of salivary α -amylase in the gastric digestion of wheat bread starch. *Food & Function*, *9*(1), 200–208.
- Fujimura, S., Ueda, K., Nomura, Y., & Yanagi, Y. (2016). Preliminary analysis of the relationship between serum lutein and zeaxanthin levels and macular pigment optical density. *Clinical Ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, *10*, 2149–2155.
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(6), 1583–1606.
- Furness, J. B., Cottrell, J. J., & Bravo, D. M. (2015). Comparative gut physiology symposium : Comparative physiology of digestion. *Journal of Animal Science*, *93*(2), 485–491.
- Gabert, L., Vors, C., Louche-Pélissier, C., Sauvinet, V., Lambert-Porcheron, S., Draï, J., ... Michalski, M.-C. (2011). ^{13}C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1- ^{13}C]tripalmitin and [1,1,1- ^{13}C]triolein. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, *25*(19), 2697–2703.
- Gallaher, D. D., Hassel, C. A., Lee, K. J., & Gallaher, C. M. (1993). Viscosity and fermentability as attributes of dietary fiber responsible for the hypocholesterolemic effect in hamsters. *The Journal of Nutrition*, *123*(2), 244–252.
- Gallier, S., & Singh, H. (2012). Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion. *Food & Function*, *3*(5), 547–555.
- Garcia, R. (2016, October). *Proteases as tools to generate pea protein hydrolysates with interesting antioxidant and functional properties*. Congrès presented at the Food Chemistry Conference, Amsterdam Retrieved from <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01531718>.
- Garrett, D. A., Failla, M. L., & 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.
- Garrett, D. A., Failla, M. L., & Sarama, R. J. (2000). Estimation of carotenoid bioavailability from fresh stir-fried vegetables using an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *11*(11–12), 574–580.
- Garrod, M. G., Green, R., Allen, L. H., Mungas, D. M., Jagust, W. J., Haan, M. N., & Miller, J. W. (2008). Fraction of total plasma vitamin B12 bound to transcobalamin correlates with cognitive function in elderly Latinos with depressive symptoms. *Clinical Chemistry*, *54*(7), 1210–1217.
- Gärtner, C., Stahl, W., & Sies, H. (1996). Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to beta-carotene in the human. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*, *66*(2), 119–125.

- Gaudichon, C. (2013). Les modèles humains. In *Structure des aliments et effets nutritionnels* (Quae, pp. 299–306).
- Gernand, A. D., Schulze, K. J., Stewart, C. P., West Jr, K. P., & Christian, P. (2016). Micronutrient deficiencies in pregnancy worldwide: health effects and prevention. *Nature Reviews Endocrinology*, *12*, 274.
- Giang, T. M. (2015). *Compréhension et modélisation de la libération et de l'absorption des acides gras au cours de digestions in vitro et in vivo d'émulsion*. AgroParisTech, Paris.
- Giang, T. M., Gaucel, S., Brestaz, P., Anton, M., Meynier, A., Trelea, I. C., & Le Feunteun, S. (2016). Dynamic modeling of in vitro lipid digestion: individual fatty acid release and bioaccessibility kinetics. *Food Chemistry*, *194*, 1180–1188.
- Giang, T. M., Le Feunteun, S., Gaucel, S., Brestaz, P., Anton, M., Meynier, A., & Trelea, I. C. (2015). Dynamic modeling highlights the major impact of droplet coalescence on the in vitro digestion kinetics of a whey protein stabilized submicron emulsion. *Food Hydrocolloids*, *43*, 66–72.
- Gilbody, S., Lightfoot, T., & Sheldon, T. (2007). Is low folate a risk factor for depression? A meta-analysis and exploration of heterogeneity. *Journal of Epidemiology and Community Health*, *61*(7), 631–637.
- Gleize, B., Steib, M., André, M., & Reboul, E. (2012). Simple and fast HPLC method for simultaneous determination of retinol, tocopherols, coenzyme Q10 and carotenoids in complex samples. *Food Chemistry*, *134*(4), 2560–2564.
- Gleize, B., Tourniaire, F., Depezay, L., Bott, R., Nowicki, M., Albino, L., ... Borel, P. (2013). Effect of type of TAG fatty acids on lutein and zeaxanthin bioavailability. *British Journal of Nutrition*, *110*(1), 1–10.
- Golding, M., Wooster, T. J., Day, L., Xu, M., Lundin, L., Keogh, J., & Clifton, P. (2011). Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. *Soft Matter*, *7*(7), 3513.
- Goltz, S. R., Campbell, W. W., Chitchumroonchokchai, C., Failla, M. L., & Ferruzzi, M. G. (2012). Meal triacylglycerol profile modulates postprandial absorption of carotenoids in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*(6), 866–877.
- Goltz, S. R., Sapper, T. N., Failla, M. L., Campbell, W. W., & Ferruzzi, M. G. (2013). Carotenoid bioavailability from raw vegetables and a moderate amount of oil in human subjects is greatest when the majority of daily vegetables are consumed at one meal. *Nutrition Research*, *33*(5), 358–366.
- Gomez, L., Lallès, J. P., Bogaërt, C., & Poncet, C. (1992). Kinetics of particulate and solute marker passage in sheep supplemented with cationomycin and lasalocid antibiotics. Comparisons among methods for calculating mean retention time. *Reproduction, Nutrition, Development*, *32*(2), 173–190.

- Goncalves, A., Gleize, B., Bott, R., Nowicki, M., Amiot, M.-J., Lairon, D., ... Reboul, E. (2011). Phytosterols can impair vitamin D intestinal absorption in vitro and in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55 Suppl 2*, S303-311.
- Goncalves, A., Roi, S., Nowicki, M., Dhaussy, A., Huertas, A., Amiot, M.-J., & Reboul, E. (2015). Fat-soluble vitamin intestinal absorption: absorption sites in the intestine and interactions for absorption. *Food Chemistry*, *172*, 155–160.
- Goncalves, A., Roi, S., Nowicki, M., Niot, I., & Reboul, E. (2014). Cluster-determinant 36 (CD36) impacts on vitamin E postprandial response. *Molecular Nutrition & Food Research*, *58*(12), 2297–2306.
- Graham, R. D., Welch, R. M., & Bouis, H. E. (2001). Addressing micronutrient malnutrition through enhancing the nutritional quality of staple foods: Principles, perspectives and knowledge gaps. In *Advances in Agronomy* (Vol. 70, pp. 77–142). Elsevier.
- Granado, F., Olmedilla, B., & Blanco, I. (2003). Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *The British Journal of Nutrition*, *90*(3), 487–502.
- Granado, F., Olmedilla, B., Herrero, C., Pérez-Sacristán, B., Blanco, I., & Blázquez, S. (2006). Bioavailability of carotenoids and tocopherols from broccoli: in vivo and in vitro assessment. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *231*(11), 1733–1738.
- Granado, Fernando., Olmedilla, Begona., Blanco, Inmaculada., & Rojas-Hidalgo, Enrique. (1992). Carotenoid composition in raw and cooked Spanish vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(11), 2135–2140.
- Granado-Lorenzo, F., Herrero-Barbudo, C., Olmedilla-Alonso, B., Blanco-Navarro, I., & Pérez-Sacristán, B. (2010). Lutein bioavailability from lutein ester-fortified fermented milk: in vivo and in vitro study☆☆☆. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *21*(2), 133–139.
- Granfeldt, Y., Björck, I., Drews, A., & Tovar, J. (1992). An in vitro procedure based on chewing to predict metabolic response to starch in cereal and legume products. *European Journal of Clinical Nutrition*, *46*(9), 649–660.
- Granfeldt, Y., Björck, I., & Hagander, B. (1991). On the importance of processing conditions, product thickness and egg addition for the glycaemic and hormonal responses to pasta: a comparison with bread made from 'pasta ingredients'. *European Journal of Clinical Nutrition*, *45*(10), 489–499.
- Granfeldt, Y., Hagander, B., & Björck, I. (1995). Metabolic responses to starch in oat and wheat products. On the importance of food structure, incomplete gelatinization or presence of viscous dietary fibre. *European Journal of Clinical Nutrition*, *49*(3), 189–199.
- Grasset, L. (2014). *Les bourrelets de l'évolution : être gros est-il un avantage ? - DBY #5*. DirtyBiology Retrieved from <https://www.youtube.com/watch?v=vrRUZAewUXM>.

- Gregory, J. F. (1989). Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Advances in Food and Nutrition Research*, 33, 1–101.
- Gregory, J. F. (2001). Case study: folate bioavailability. *The Journal of Nutrition*, 131(4 Suppl), 1376S–82S.
- Gregory, J. F., Bhandari, S. D., Bailey, L. B., Toth, J. P., Baumgartner, T. G., & Cerda, J. J. (1991). Relative bioavailability of deuterium-labeled monoglutamyl and hexaglutamyl folates in human subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(3), 736–740.
- Gregory, Jesse F., Quinlivan, E. P., & Davis, S. R. (2005). Integrating the issues of folate bioavailability, intake and metabolism in the era of fortification. *Trends in Food Science & Technology*, 16(6–7), 229–240.
- Griffith, G. H., Owen, G. M., Kirkman, S., & Shields, R. (1966). Measurement of rate of gastric emptying using Chromium-51. *The Lancet*, 287(7449), 1244–1245.
- Grolier, P., Duszka, C., Borel, P., Alexandre-Gouabau, M. C., & Azais-Braesco, V. (1997). In vitro and in vivo inhibition of beta-carotene dioxygenase activity by canthaxanthin in rat intestine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 348(2), 233–238.
- Gropper, S. S., & Smith, J. L. (2012). The digestive system : mechanism for nourishing the body. In *Advanced Nutrition and Human Metabolism* (6th ed., pp. 33–62). USA: Wadsworth Cengage Learning.
- Grossmann, R. E., & Tangpricha, V. (2010). Evaluation of vehicle substances on vitamin D bioavailability: a systematic review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(8), 1055–1061.
- Groupe Avril. (2019, June 20). Diffusion d'une enquête sur le centre d'expérimentation de Souches Retrieved from <https://www.groupeavril.com/fr/communiqués/diffusion-dune-enquete-sur-le-centre-dexperimentation-de-souches>.
- Guéant, J. L., Gérard, A., Monin, B., Champigneulle, B., Gérard, H., & Nicolas, J. P. (1988). Radioautographic localisation of iodinated human intrinsic factor in the guinea pig ileum using electron microscopy. *Gut*, 29(10), 1370–1378.
- Guéant-Rodriguez, R. M., Rendeli, C., Namour, B., Venuti, L., Romano, A., Anello, G., ... Guéant, J. L. (2003). Transcobalamin and methionine synthase reductase mutated polymorphisms aggravate the risk of neural tube defects in humans. *Neuroscience Letters*, 344(3), 189–192.
- Guérin-Dubiard, C., Anton, M., Gautron, J., Nys, Y., & Nau, F. (2010). Composition de l'oeuf. In *Science et technologie de l'œuf. De l'œuf aux ovoproduits* (Vol. 2). Paris: Tec & Doc : Lavoisier.

- Guerra, A., Denis, S., le Goff, O., Sicardi, V., François, O., Yao, A.-F., ... Blanquet-Diot, S. (2016). Development and validation of a new dynamic computer-controlled model of the human stomach and small intestine. *Biotechnology and Bioengineering*, *113*(6), 1325–1335.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, *30*(11), 591–600.
- Guillaume, J. (2014). *Ils ont domestiqué plantes et animaux prélude à la civilisation*. Versailles: Éditions Quae.
- Guilloteau, P., Zabielski, R., Hammon, H. M., & Metges, C. C. (2010). Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? *Nutrition Research Reviews*, *23*(1), 4–22.
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D., & Singh, H. (2014). Behaviour of whey protein emulsion gel during oral and gastric digestion: effect of droplet size. *Soft Matter*, *10*(23), 4173.
- Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Ferrua, M., Dalgleish, D., & Singh, H. (2015). Disintegration kinetics of food gels during gastric digestion and its role on gastric emptying: an in vitro analysis. *Food Funct.*, *6*(3), 756–764.
- Haber, G. B., Heaton, K. W., Murphy, D., & Burroughs, L. F. (1977). Depletion and disruption of dietary fibre. *The Lancet*, *310*(8040), 679–682.
- Hagander, B., Björck, I., Asp, N. G., Efendić, S., Holm, J., Nilsson-Ehle, P., ... Scherstén, B. (1987). Rye products in the diabetic diet. Postprandial glucose and hormonal responses in non-insulin-dependent diabetic patients as compared to starch availability in vitro and experiments in rats. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *3*(2), 85–96.
- Hammon, H. M., Frieten, D., Gerbert, C., Koch, C., Dusel, G., Weikard, R., & Kühn, C. (2018). Different milk diets have substantial effects on the jejunal mucosal immune system of pre-weaning calves, as demonstrated by whole transcriptome sequencing. *Scientific Reports*, *8*(1), 1693.
- Hamosh, M. (2008). The Role of Lingual Lipase in Neonatal Fat Digestion. In K. Elliott & J. Whelan (Eds.), *Novartis Foundation Symposia* (pp. 69–98). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Handelman, G. J., Snodderly, D. M., Adler, A. J., Russett, M. D., & Dratz, E. A. (1992). Measurement of carotenoids in human and monkey retinas. *Methods in Enzymology*, *213*, 220–230.
- Hansen, W. E. (1987). Effect of dietary fiber on pancreatic lipase activity in vitro. *Pancreas*, *2*(2), 195–198.
- Harikumar, K. B., Nimita, C. V., Preethi, K. C., Kuttan, R., Shankaranarayana, M. L., & Deshpande, J. (2008). Toxicity profile of lutein and lutein ester isolated from marigold flowers (*Tagetes erecta*). *International Journal of Toxicology*, *27*(1), 1–9.

- Harris, S. S., & Dawson-Hughes, B. (2002). Plasma vitamin D and 25OHD responses of young and old men to supplementation with vitamin D3. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(4), 357–362.
- Harrison, E. H., & Kopec, R. E. (2018). Digestion and Intestinal Absorption of Dietary Carotenoids and Vitamin A ☆. In *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (pp. 1133–1151). Elsevier.
- Hart, D. J., & Scott, K. J. (1995). Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54(1), 101–111.
- Hedrén, E., Mulokozi, G., & Svanberg, U. (2002). In vitro accessibility of carotenes from green leafy vegetables cooked with sunflower oil or red palm oil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 53(6), 445–453.
- Herbert, V. (1962). Experimental nutritional folate deficiency in man. *Transactions of the Association of American Physicians*, 75, 307–320.
- Herbert, V. (1987). Recommended dietary intakes (RDI) of vitamin B-12 in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 45(4), 671–678.
- Herbert, V. (2006). Vitamin B12. In *Present Knowledge in Nutrition*. (pp. 191–205). Intl Life Science Inst.
- Hermansson, G., & Sivertsson, R. (1996). Gender-related differences in gastric emptying rate of solid meals. *Digestive Diseases and Sciences*, 41(10), 1994–1998.
- Hernandez-Hernandez, O., Olano, A., Rastall, R. A., & Moreno, F. J. (2019). In vitro Digestibility of Dietary Carbohydrates: Toward a Standardized Methodology Beyond Amylolytic and Microbial Enzymes. *Frontiers in Nutrition*, 6, 61.
- Herron, K. L., McGrane, M. M., Waters, D., Lofgren, I. E., Clark, R. M., Ordovas, J. M., & Fernandez, M. L. (2006). The ABCG5 Polymorphism Contributes to Individual Responses to Dietary Cholesterol and Carotenoids in Eggs. *The Journal of Nutrition*, 136(5), 1161–1165.
- Hertz, A. F. (1910). The motor functions of the stomach. *QJM: An International Journal of Medicine*, 3(4), 373–394.
- Hesdorffer, C. S., & Longo, D. L. (2015). Drug-Induced Megaloblastic Anemia. *New England Journal of Medicine*, 373(17), 1649–1658.
- Heyssel, R. M., Bozian, R. C., Darby, W. J., & Bell, M. C. (1966). Vitamin B12 turnover in man. The assimilation of vitamin B12 from natural foodstuff by man and estimates of minimal daily dietary requirements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 18(3), 176–184.
- Hiolle M., Lechevalier V., Flourey J., Boulier-Monthéan N., Prioul C, Dupont D., Nau F., 2020. *In vitro* digestion of complex foods: how the microstructure influences food disintegration and micronutrient bioaccessibility. Submitted in Food Research International, FOODRES-D-19-02281.

- Ho, Q. T., Carmeliet, J., Datta, A. K., Defraeye, T., Delele, M. A., Herremans, E., ... Nicolaï, B. M. (2013). Multiscale modeling in food engineering. *Journal of Food Engineering*, *114*(3), 279–291.
- Hodgkin, D. C., Pickworth, J., ROBERTSON, J. H., TRUEBLOOD, K. N., PROSEN, R. J., & WHITE, J. G. (1955). Structure of Vitamin B12 : The Crystal Structure of the Hexacarboxylic Acid derived from B12 and the Molecular Structure of the Vitamin. *Nature*, *176*(4477), 325–328.
- Hoebler, C., Lecannu, G., Belleville, C., Devaux, M.-F., Popineau, Y., & Barry, J.-L. (2002). Development of an in vitro system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *53*(5), 389–402.
- Hogben, C. A., Schanker, L. S., Tocco, D. J., & Brodie, B. B. (1957). Absorption of drugs from the stomach. II. The human. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *120*(4), 540–545.
- Holick, M. F. (1981). The Cutaneous Photosynthesis of Previtamin D3: A Unique Photoendocrine System. *Journal of Investigative Dermatology*, *77*(1), 51–58.
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D Deficiency. *New England Journal of Medicine*, *357*(3), 266–281.
- Holick, M. F. (2017). The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, *18*(2), 153–165.
- Hollander, D., & Ruble, P. E. (1978). beta-carotene intestinal absorption: bile, fatty acid, pH, and flow rate effects on transport. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *235*(6), E686.
- Hollander, D., & Tarnawski, H. (1984). Influence of aging on vitamin D absorption and unstirred water layer dimensions in the rat. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *103*(3), 462–469.
- Hollander, D., & Truscott, T. C. (1976). Mechanism and site of small intestinal uptake of vitamin D3 in pharmacological concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *29*(9), 970–975.
- Hollis, B. W., Lowery, J. W., Pittard, W. B., Guy, D. G., & Hansen, J. W. (1996). Effect of age on the intestinal absorption of vitamin D3-palmitate and nonesterified vitamin D2 in the term human infant. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *81*(4), 1385–1388.
- Holm, J., Lundquist, I., Björck, I., Eliasson, A. C., & Asp, N. G. (1988). Degree of starch gelatinization, digestion rate of starch in vitro, and metabolic response in rats. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *47*(6), 1010–1016.
- Holmes, R., & Lobley, R. W. (1989). Intestinal brush border revisited. *Gut*, *30*(12), 1667–1678.

- Holst, B., & Williamson, G. (2008). Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(2), 73–82.
- Hooshmand, B., Solomon, A., Kareholt, I., Leiviska, J., Rusanen, M., Ahtiluoto, S., ... Kivipelto, M. (2010). Homocysteine and holotranscobalamin and the risk of Alzheimer disease: A longitudinal study. *Neurology*, *75*(16), 1408–1414.
- Hosseini-nezhad, A., & Holick, M. F. (2013). Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clinic Proceedings*, *88*(7), 720–755.
- Houston, D. K., Johnson, M. A., Nozza, R. J., Gunter, E. W., Shea, K. J., Cutler, G. M., & Edmonds, J. T. (1999). Age-related hearing loss, vitamin B-12, and folate in elderly women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *69*(3), 564–571.
- Hu, J., Zou, X., He, Y., Chen, F., & Deng, Z. (2016). Esterification of Quercetin Increases Its Transport Across Human Caco-2 Cells: Synthesize quercetin ester to improve bioavailability.... *Journal of Food Science*, *81*(7), H1825–H1832.
- Hu, Y., & Xu, Z. (2008). Effects of lutein on the growth and migration of bovine lens epithelial cells in vitro. *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, *28*(3), 360–363.
- Huang, Y.-M., Dou, H.-L., Huang, F.-F., Xu, X.-R., Zou, Z.-Y., & Lin, X.-M. (2015). Effect of supplemental lutein and zeaxanthin on serum, macular pigmentation, and visual performance in patients with early age-related macular degeneration. *BioMed Research International*, *2015*, 564738.
- Huang, Y.-M., Dou, H.-L., Huang, F.-F., Xu, X.-R., Zou, Z.-Y., Lu, X.-R., & Lin, X.-M. (2015). Changes following supplementation with lutein and zeaxanthin in retinal function in eyes with early age-related macular degeneration: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The British Journal of Ophthalmology*, *99*(3), 371–375.
- Hughes, C. F., Ward, M., Hoey, L., & McNulty, H. (2013). Vitamin B12 and ageing: current issues and interaction with folate. *Annals of Clinical Biochemistry*, *50*(Pt 4), 315–329.
- Hunt, J. N., & Macdonald, I. (1954). The influence of volume on gastric emptying. *The Journal of Physiology*, *126*(3), 459–474.
- Hur, S.J., Lim, B. O., Park, G. B., & Joo, S. T. (2009). Effects of Various Fiber Additions on Lipid Digestion during *In Vitro* Digestion of Beef Patties. *Journal of Food Science*, *74*(9), C653–C657.
- Hur, Sun Jin, Decker, E. A., & 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.

- Hur, Sun Jin, Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry*, *125*(1), 1–12.
- Innocente, N., Biasutti, M., Venir, E., Spaziani, M., & Marchesini, G. (2009). Effect of high-pressure homogenization on droplet size distribution and rheological properties of ice cream mixes. *Journal of Dairy Science*, *92*(5), 1864–1875.
- Institute of Medicine (US) Committee. (1993). *Iron Deficiency Anemia: Recommended Guidelines for the Prevention, Detection, and Management Among U.S. Children and Women of Childbearing Age*. (R. Earl & C. E. Woteki, Eds.). Washington (DC): National Academies Press (US) Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK236488/>.
- Islam, M. A., Devle, H., Comi, I., Ulleberg, E. K., Rukke, E.-O., Vegarud, G. E., & Ekeberg, D. (2017). Ex vivo digestion of raw, pasteurised and homogenised milk – Effects on lipolysis and proteolysis. *International Dairy Journal*, *65*, 14–19.
- ISO. (2010). ISO 26642–2010. In *Food Products—Determination of the Glycaemic Index (GI) and Recommendation for Food Classification*.
- Iyer, R., & Tomar, S. K. (2009). Folate: a functional food constituent. *Journal of Food Science*, *74*(9), R114-122.
- Jackson, J., Jambrina, E., Li, J., Marston, H., Menzies, F., Phillips, K., & Gilmour, G. (2019). Targeting the Synapse in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 735.
- Jacobs, D. R., & Tapsell, L. C. (2007). Food, not nutrients, is the fundamental unit in nutrition. *Nutrition Reviews*, *65*(10), 439–450.
- Jakobsen, J., & Knuthsen, P. (2014). Stability of vitamin D in foodstuffs during cooking. *Food Chemistry*, *148*, 170–175.
- Jayarajan, P., Reddy, V., & Mohanram, M. (1980). Effect of dietary fat on absorption of beta carotene from green leafy vegetables in children. *The Indian Journal of Medical Research*, *71*, 53–56.
- Jenkins, D. J. A., Ghafari, H., Wolever, T. M. S., Taylor, R. H., Jenkins, A. L., Barker, H. M., ... Bowling, A. C. (1982). Relationship between rate of digestion of foods and post-prandial glycaemia. *Diabetologia*, *22*(6), 450–455.
- Jha, R., Woyengo, T. A., Li, J., Bedford, M. R., Vasanthan, T., & Zijlstra, R. T. (2015). Enzymes enhance degradation of the fiber–starch–protein matrix of distillers dried grains with solubles as revealed by a porcine in vitro fermentation model and microscopy. *Journal of Animal Science*, *93*(3), 1039.
- Jin, Y., Yu, Y., Qi, Y., Wang, F., Yan, J., & Zou, H. (2016). Peptide profiling and the bioactivity character of yogurt in the simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Proteomics*, *141*, 24–46.

- Johnson, E. J., McDonald, K., Caldarella, S. M., Chung, H.-Y., Troen, A. M., & Snodderly, D. M. (2008). Cognitive findings of an exploratory trial of docosahexaenoic acid and lutein supplementation in older women. *Nutritional Neuroscience*, *11*(2), 75–83.
- Johnson, E. J., Vishwanathan, R., Johnson, M. A., Hausman, D. B., Davey, A., Scott, T. M., ... Poon, L. W. (2013). Relationship between Serum and Brain Carotenoids, α -Tocopherol, and Retinol Concentrations and Cognitive Performance in the Oldest Old from the Georgia Centenarian Study. *Journal of Aging Research*, *2013*, 951786.
- Johnson, J. L., Mistry, V. V., Vukovich, M. D., Hogie-Lorenzen, T., Hollis, B. W., & Specker, B. L. (2005). Bioavailability of vitamin D from fortified process cheese and effects on vitamin D status in the elderly. *Journal of Dairy Science*, *88*(7), 2295–2301.
- Johnson Jr, J. E., Reyes, F. E., Polaski, J. T., & Batey, R. T. (2012). B12 cofactors directly stabilize an mRNA regulatory switch. *Nature*, *492*, 133.
- Junghans, A., Sies, H., & Stahl, W. (2001). Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *391*(2), 160–164.
- Kanhere, M., Chassaing, B., Gewirtz, A. T., & Tangpricha, V. (2018). Role of vitamin D on gut microbiota in cystic fibrosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *175*, 82–87.
- Karel, L. (1948). Gastric absorption. *Physiological Reviews*, *28*(4), 433–450.
- Karim, M. A., Rahman, M. M., Pham, N. D., & Fawzia, S. (2018). Food Microstructure as affected by processing and its effect on quality and stability. In *Food Microstructure and Its Relationship with Quality and Stability* (pp. 43–57). Elsevier.
- Keane, J., Elangovan, H., Stokes, R., & Gunton, J. (2018). Vitamin D and the Liver—Correlation or Cause? *Nutrients*, *10*(4), 496.
- Kearney, J. (2010). Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *365*(1554), 2793–2807.
- Keegan, R.-J. H., Lu, Z., Bogusz, J. M., Williams, J. E., & Holick, M. F. (2013). Photobiology of vitamin D in mushrooms and its bioavailability in humans. *Dermato-Endocrinology*, *5*(1), 165–176.
- Kelly, P., McPartlin, J., Goggins, M., Weir, D. G., & Scott, J. M. (1997). Unmetabolized folic acid in serum: acute studies in subjects consuming fortified food and supplements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *65*(6), 1790–1795.
- Kelsay, J. L. (2011). Effects of fiber on vitamin bioavailability. In *Dietary fiber - chemistry, physiology and health effects*. Springer Verlag Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4613-0519-4.pdf>.
- Kennel, K. A., Drake, M. T., & Hurley, D. L. (2010). Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clinic Proceedings*, *85*(8), 752–757; quiz 757–758.

- Kettaneh, A., Stirnemann, J., Fain, O., Letellier, E., & Thomas, M. (2004). Le statut en micronutriments des Franciliens. Revue de la littérature. *La Revue de Médecine Interne*, 25(7), 507–513.
- Khachik, F., Beecher, G. R., Goli, M. B., Lusby, W. R., & Smith, J. C. (1992). Separation and identification of carotenoids and their oxidation products in the extracts of human plasma. *Analytical Chemistry*, 64(18), 2111–2122.
- Khachik, F., Spangler, C. J., Smith, J. C., Canfield, L. M., Steck, A., & Pfander, H. (1997). Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Analytical Chemistry*, 69(10), 1873–1881.
- Khachik, Frederick. (2003). An Efficient Conversion of (3 R, 3 ' R, 6 ' R)-Lutein to (3 R, 3 ' S, 6 ' R)-Lutein (3'-Epilutein) and (3 R, 3 ' R)-Zeaxanthin [†]. *Journal of Natural Products*, 66(1), 67–72.
- Khachik, Frederick, Englert, G., Beecher, G. R., & Cecil Smith, J. (1995). Isolation, structural elucidation, and partial synthesis of lutein dehydration products in extracts from human plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 670(2), 219–233.
- Khan, N. A., Roman, S., Peulen, O., & Mion, F. (2009). Physiologie digestive. In H. Guénard (Ed.), *Physiologie humaine* (pp. 341–382). Paris: Éditions Pradel.
- Kidmose, U., Yang, R.-Y., Thilsted, S. H., Christensen, L. P., & Brandt, K. (2006). Content of carotenoids in commonly consumed Asian vegetables and stability and extractability during frying. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 562–571.
- Kiela, P. R., & Ghishan, F. K. (2016). Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 30(2), 145–159.
- Kim, H. W., Chew, B. P., Wong, T. S., Park, J. S., Weng, B. B. C., Byrne, K. M., & Hayek, M. G. (1998). Modulation of cell-mediated immunity by dietary lutein in dogs. *FASEB*, 12(A966).
- Kim, H. W., Chew, B. P., Wong, T. S., Park, J. S., Weng, B. B. C., Byrne, K. M., ... Reinhart, G. A. (2000). Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 73(3–4), 331–341.
- Kim, J. E., Gordon, S. L., Ferruzzi, M. G., & Campbell, W. W. (2015). Effects of egg consumption on carotenoid absorption from co-consumed, raw vegetables. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 102(1), 75–83.
- Kim, S. R., Nakanishi, K., Itagaki, Y., & Sparrow, J. R. (2006). Photooxidation of A2-PE, a photoreceptor outer segment fluorophore, and protection by lutein and zeaxanthin. *Experimental Eye Research*, 82(5), 828–839.

- King, W. E., Campbell, G., Gonis, T., Henshall, G., Lesuer, D., Zywick, E., & Foiles, S. (1995). Theory, simulation, and modeling of interfaces in materials—bridging the length-scale gap: a workshop report. *Materials Science and Engineering: A*, *191*(1–2), 1–16.
- Kitabatake, N., & Kinekawa, Y.-I. (1998). Digestibility of Bovine Milk Whey Protein and β -Lactoglobulin in Vitro and in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(12), 4917–4923.
- Kittaka-Katsura, H., Ebara, S., Watanabe, F., & Nakano, Y. (2004). Characterization of Corrinoid Compounds from a Japanese Black Tea (Batabata-cha) Fermented by Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(4), 909–911.
- Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *Journal of Food Science*, *73*(5), R67–R80.
- Kong, Fanbin, Oztop, M. H., Paul Singh, R., & McCarthy, M. J. (2013). Effect of boiling, roasting and frying on disintegration of peanuts in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology*, *50*(1), 32–38.
- Kong, Fanbin, & Singh, R. P. (2009). Modes of Disintegration of Solid Foods in Simulated Gastric Environment. *Food Biophysics*, *4*(3), 180–190.
- Kopec, R. E., Gleize, B., Borel, P., Desmarchelier, C., & Caris-Veyrat, C. (2017). Are lutein, lycopene, and β -carotene lost through the digestive process? *Food & Function*, *8*(4), 1494–1503.
- Korkor, A. B., & Bretzmann, C. (2009). Effect of Fish Oil on Vitamin D Absorption. *American Journal of Kidney Diseases*, *53*(2), 356.
- Kostic, D., White, W. S., & Olson, J. A. (1995). Intestinal absorption, serum clearance, and interactions between lutein and beta-carotene when administered to human adults in separate or combined oral doses. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *62*(3), 604–610.
- Kotake-Nara, E., & Nagao, A. (2011). Absorption and metabolism of xanthophylls. *Marine Drugs*, *9*(6), 1024–1037.
- Krinsky, N. I., Mathews-Roth, M. M., Welankiwar, S., Sehgal, P. K., Lausen, N. C., & Russett, M. (1990). The metabolism of [^{14}C]beta-carotene and the presence of other carotenoids in rats and monkeys. *The Journal of Nutrition*, *120*(1), 81–87.
- Krinsky, Norman I. (2002). Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *The Journal of Nutrition*, *132*(3), 540S-542S.
- Kronenberg, G., Colla, M., & Endres, M. (2009). Folic acid, neurodegenerative and neuropsychiatric disease. *Current Molecular Medicine*, *9*(3), 315–323.
- Kroop, H. S., Long, W. B., Alavi, A., & Hansell, J. R. (1979). Effect of water and fat on gastric emptying of solid meals. *Gastroenterology*, *77*(5), 997–1000.

- Lacroix, M., Bon, C., Bos, C., Léonil, J., Benamouzig, R., Luengo, C., ... Gaudichon, C. (2008). Ultra high temperature treatment, but not pasteurization, affects the postprandial kinetics of milk proteins in humans. *The Journal of Nutrition*, *138*(12), 2342–2347.
- Lactel. (2014). La gamme Lactel Classique Retrieved from <https://www.lactel.fr/nos-produits/lactel-vitamine-d/la-gamme-lactel-classique>.
- Lakshminarayana, R., Raju, M., Krishnakantha, T. P., & Baskaran, V. (2007). Lutein and Zeaxanthin in Leafy Greens and Their Bioavailability: Olive Oil Influences the Absorption of Dietary Lutein and Its Accumulation in Adult Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(15), 6395–6400.
- Lamberti, P., Zoccolella, S., Armenise, E., Lamberti, S. V., Fraddosio, A., Mari, M., ... Livrea, P. (2005). Hyperhomocysteinemia in L-dopa treated Parkinson's disease patients: effect of cobalamin and folate administration. *European Journal of Neurology*, *12*(5), 365–368.
- Landrum, J. T., & Bone, R. A. (2001). Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *385*(1), 28–40.
- Landrum, J. T., Bone, R. A., Joa, H., Kilburn, M. D., Moore, L. L., & Sprague, K. E. (1997). A one year study of the macular pigment: the effect of 140 days of a lutein supplement. *Experimental Eye Research*, *65*(1), 57–62.
- Lark, R. K., Lester, G. E., Ontjes, D. A., Blackwood, A. D., Hollis, B. W., Hensler, M. M., & Aris, R. M. (2001). Diminished and erratic absorption of ergocalciferol in adult cystic fibrosis patients. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *73*(3), 602–606.
- Lascari, A. D. (1981). Carotenemia: A Review. *Clinical Pediatrics*, *20*(1), 25–29.
- Latimer, G. W., & AOAC International (Eds.). (2016). *Official methods of analysis of AOAC International* (20th Edition). Gaithersburg, Md: AOAC International.
- Le Feunteun, S., Barbé, F., Rémond, D., Ménard, O., Le Gouar, Y., Dupont, D., & Laroche, B. (2014). Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig In Vivo Data. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(4), 1099–1113.
- Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, *25*(1) doi:10.18637/jss.v025.i01.
- Lechevalier, Valérie, Croguennec, T., Anton, M., & Desfougères, Y. (2010). L'oeuf ingrédient alimentaire. In *Science et technologie de l'œuf. De l'œuf aux ovoproduits* (Vol. 2, p. 349). Paris: Tec & Doc : Lavoisier.
- Lechevalier, Valerie, Musikaphun, N., Gillard, A., Pasco, M., Guérin-Dubiard, C., Husson, F., & Nau, F. (2015). Effects of dry heating on the progression of in vitro digestion of egg white proteins: contribution of multifactorial data analysis. *Food & Function*, *6*(5), 1578–1590.

- Lee, C. M., Lederman, J. D., Hofmann, N. E., & Erdman, J. W. (1998). The mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) is an appropriate animal model for evaluation of the conversion of beta-carotene to vitamin A. *The Journal of Nutrition*, *128*(2), 280–286.
- Leermakers, E. T., Darweesh, S. K., Baena, C. P., Moreira, E. M., Melo van Lent, D., Tielemans, M. J., ... Franco, O. H. (2016). The effects of lutein on cardiometabolic health across the life course: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *103*(2), 481–494.
- Lefebvre, D. E., Venema, K., Gombau, L., Valerio, L. G., Raju, J., Bondy, G. S., ... Stone, V. (2015). Utility of models of the gastrointestinal tract for assessment of the digestion and absorption of engineered nanomaterials released from food matrices. *Nanotoxicology*, *9*(4), 523–542.
- Lehmann, B., Genehr, T., Knuschke, P., Pietzsch, J., & Meurer, M. (2001). UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in an in vitro human skin equivalent model. *The Journal of Investigative Dermatology*, *117*(5), 1179–1185.
- Lemmens, L., Colle, I., Van Buggenhout, S., Palmero, P., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2014). Carotenoid bioaccessibility in fruit- and vegetable-based food products as affected by product (micro)structural characteristics and the presence of lipids: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *38*(2), 125–135.
- Lentle, R. G., & Janssen, P. W. M. (2010). Manipulating digestion with foods designed to change the physical characteristics of digesta. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *50*(2), 130–145.
- Leo, M. A., Ahmed, S., Aleynik, S. I., Siegel, J. H., Kasmin, F., & Lieber, C. S. (1995). Carotenoids and tocopherols in various hepatobiliary conditions. *Journal of Hepatology*, *23*(5), 550–556.
- Leser, M. E., Michel, M., & Watzke, H. J. (2007). Food goes nano— New horizons for food structure research. In E. Dickinson & T. Van Vliet (Eds.), *Special Publications* (pp. 3–14). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Lesser, S., Cermak, R., & Wolfram, S. (2004). Bioavailability of quercetin in pigs is influenced by the dietary fat content. *The Journal of Nutrition*, *134*(6), 1508–1511.
- Levine, A. S., & Doscherholmen, A. (1983). Vitamin B12 bioavailability from egg yolk and egg white: relationship to binding proteins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *38*(3), 436–439.
- Levitt, A. J., Wesson, V. A., & Joffe, R. T. (1998). Impact of suppression of thyroxine on folate status during acute antidepressant therapy. *Psychiatry Research*, *79*(2), 123–129.
- Li, S., Ding, Y., Niu, Q., Xu, S., Pang, L., Ma, R., ... Guo, S. (2015). Lutein has a protective effect on hepatotoxicity induced by arsenic via Nrf2 signaling. *BioMed Research International*, *2015*, 315205.

- Li, Y., & McClements, D. J. (2010). New Mathematical Model for Interpreting pH-Stat Digestion Profiles: Impact of Lipid Droplet Characteristics on in Vitro Digestibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(13), 8085–8092.
- Liel, Y., Edwards, J., Shary, J., Spicer, K. M., Gordon, L., & Bell, N. H. (1988). The Effects of Race and Body Habitus on Bone Mineral Density of the Radius, Hip, and Spine in Premenopausal Women*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *66*(6), 1247–1250.
- Lildballe, D. L., Mutti, E., Birn, H., & Nexo, E. (2012). Maximal load of the vitamin B12 transport system: a study on mice treated for four weeks with high-dose vitamin B12 or cobinamide. *PloS One*, *7*(10), e46657.
- Lin, H. C., Elashoff, J. D., Gu, Y.-G., & Meyer, J. H. (2008). Effect of meal volume on gastric emptying. *Neurogastroenterology and Motility*, *4*(3), 157–163.
- Lindenbaum, J., Healton, E. B., Savage, D. G., Brust, J. C. M., Garrett, T. J., Podell, E. R., ... Allen, R. H. (1988). Neuropsychiatric Disorders Caused by Cobalamin Deficiency in the Absence of Anemia or Macrocytosis. *New England Journal of Medicine*, *318*(26), 1720–1728.
- Lipolytech. (2017). Gastric enzymes Retrieved from <http://www.lipolytech.com/products-services/index>.
- Litvak, Y., Byndloss, M. X., & Bäumlér, A. J. (2018). Colonocyte metabolism shapes the gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, *362*(6418) doi:10.1126/science.aat9076.
- Liu, R., Wang, T., Zhang, B., Qin, L., Wu, C., Li, Q., & Ma, L. (2014). Lutein and zeaxanthin supplementation and association with visual function in age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *56*(1), 252–258.
- Liu, T., Liu, W.-H., Zhao, J.-S., Meng, F.-Z., & Wang, H. (2017). Lutein protects against β -amyloid peptide-induced oxidative stress in cerebrovascular endothelial cells through modulation of Nrf-2 and NF- κ B. *Cell Biology and Toxicology*, *33*(1), 57–67.
- Liuzzi, J. P., Bobo, J. A., Lichten, L. A., Samuelson, D. A., & Cousins, R. J. (2004). Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(40), 14355–14360.
- Lobo, G. P., Hessel, S., Eichinger, A., Noy, N., Moise, A. R., Wyss, A., ... von Lintig, J. (2010). ISX is a retinoic acid-sensitive gatekeeper that controls intestinal β , β -carotene absorption and vitamin A production. *The FASEB Journal*, *24*(6), 1656–1666.
- Lorieau, L., Halabi, A., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D., & Floury, J. (2018). Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino acid bioaccessibility during in vitro digestion. *Food Hydrocolloids*, *82*, 399–411.

- Lucas, Peter W., Ang, K. Y., Sui, Z., Agrawal, K. R., Prinz, J. F., & Dominy, N. J. (2006). A brief review of the recent evolution of the human mouth in physiological and nutritional contexts. *Physiology & Behavior*, *89*(1), 36–38.
- Lucas, P.W., Prinz, J. F., Agrawal, K. R., & Bruce, I. C. (2002). Food physics and oral physiology. *Food Quality and Preference*, *13*(4), 203–213.
- Lucas, R., Prüss-Üstün, A., & World Health Organization. (2006). *Solar ultraviolet radiation global burden of disease from solar ultraviolet radiation*. Geneva: World Health Organization, Public Health and the Environment.
- Luka, Z. (2008). Methyltetrahydrofolate in folate-binding protein glycine N-methyltransferase. *Vitamins and Hormones*, *79*, 325–345.
- Luo, Q., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2015). Digestion of protein and protein gels in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(1), 161–168.
- Lvova, L., Denis, S., Barra, A., Mielle, P., Salles, C., Vergoignan, C., ... Feron, G. (2012). Salt release monitoring with specific sensors in “in vitro” oral and digestive environments from soft cheeses. *Talanta*, *97*, 171–180.
- Lynn, A., & Cochrane, M. P. (1997). An Evaluation of Confocal Microscopy for the Study of Starch Granule Enzymic Digestion. *Starch - Stärke*, *49*(3), 106–110.
- Mahé, S., Messing, B., Thuillier, F., & Tomé, D. (1991). Digestion of bovine milk proteins in patients with a high jejunostomy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *54*(3), 534–538.
- Maiani, G., Castón, M. J. P., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., ... Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53 Suppl 2*, S194-218.
- Mak, T. N., & Caldeira, S. (2014). *The role of nutrition in active and healthy ageing for prevention and treatment of age-related diseases: evidence so far*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Makin, H. L. J., & Gower, D. B. (2010). *Steroid Analysis*. Springer Netherlands : Springer e-books : Imprint: Springer : Springer e-books.
- Malagelada, J.-R., Longstreth, G. F., Summerskill, W. H. J., & Go, V. L. W. (1976). Measurement of Gastric Functions During Digestion of Ordinary Solid Meals in Man. *Gastroenterology*, *70*(2), 203–210.
- Maltz, A. (2013). Casimer Funk, Nonconformist Nomenclature, and Networks Surrounding the Discovery of Vitamins. *The Journal of Nutrition*, *143*(7), 1013–1020.
- Mandalari, G., Adel-Patient, K., Barkholt, V., Baro, C., Bennett, L., Bublin, M., ... Mills, E. N. C. (2009). In vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human

- gastric and duodenal conditions: a multi-laboratory evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 55(3), 372–381.
- Mandalari, Giuseppina, Parker, M. L., Grundy, M. M.-L., Grassby, T., Smeriglio, A., Bisignano, C., ... Wilde, P. J. (2018). Understanding the Effect of Particle Size and Processing on Almond Lipid Bioaccessibility through Microstructural Analysis: From Mastication to Faecal Collection. *Nutrients*, 10(2) doi:10.3390/nu10020213.
- Marchetti, C., Palaia, I., Giorgini, M., De Medici, C., Iadarola, R., Vertechy, L., ... Benedetti Panici, P. (2014). Targeted drug delivery via folate receptors in recurrent ovarian cancer: a review. *OncoTargets and Therapy*, 7, 1223–1236.
- Marciani, L., Gowland, P. A., Fillery-Travis, A., Manoj, P., Wright, J., Smith, A., ... Spiller, R. C. (2001). Assessment of antral grinding of a model solid meal with echo-planar imaging. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(5), G844-849.
- Marciani, L., Gowland, P. A., Spiller, R. C., Manoj, P., Moore, R. J., Young, P., & Fillery-Travis, A. J. (2001). Effect of meal viscosity and nutrients on satiety, intragastric dilution, and emptying assessed by MRI. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(6), G1227-1233.
- Marciani, Luca, Wickham, M. S. J., Bush, D., Faulks, R., Wright, J., Fillery-Travis, A. J., ... Gowland, P. A. (2006). Magnetic resonance imaging of the behaviour of oil-in-water emulsions in the gastric lumen of man. *The British Journal of Nutrition*, 95(2), 331–339.
- Mares, J. (2016). Lutein and Zeaxanthin Isomers in Eye Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, 36(1), 571–602.
- Maret, W. (2013). Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Advances in Nutrition (Bethesda, Md.)*, 4(1), 82–91.
- Margier, M., Buffière, C., Goupy, P., Remond, D., Halimi, C., Caris-Veyrat, C., ... Reboul, E. (2018). Opposite Effects of the Spinach Food Matrix on Lutein Bioaccessibility and Intestinal Uptake Lead to Unchanged Bioavailability Compared to Pure Lutein. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(11), e1800185.
- Marieb, E. N., Hoehn, K., Moussakova, L., & Lachaine, R. (2015). *Anatomie et physiologie humaines*. Montreuil: Pearson.
- Marteau, P., Pochart, P., & Mahé, S. (1991). Gastric emptying but not orocecal transit time differs between milk and yoghurt in lactose digesters. *Gastroenteology*, 100, A353.
- Marze, S. (2017). Modeling of Food Digestion. In *Modeling of Microscale Transport in Biological Processes* (pp. 353–374). Elsevier.
- Mashurabad, P. C., Palika, R., Jyrwa, Y. W., Bhaskarachary, K., & Pullakhandam, R. (2017). Dietary fat composition, food matrix and relative polarity modulate the micellarization and

- intestinal uptake of carotenoids from vegetables and fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 333–341.
- Mason, J. B., Dickstein, A., Jacques, P. F., Haggarty, P., Selhub, J., Dallal, G., & Rosenberg, I. H. (2007). A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(7), 1325–1329.
- Mat, D. J. L., Cattenoz, T., Souchon, I., Michon, C., & Le Feunteun, S. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*, 239, 268–275.
- Mat, D. J. L., Le Feunteun, S., Michon, C., & Souchon, I. (2016). In vitro digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids. *Food Research International*, 88, 226–233.
- Matsuno, T., Hirono, T., Ikuno, Y., Maoka, T., Shimizu, M., & Komori, T. (1986). Isolation of three new carotenoids and proposed metabolic pathways of carotenoids in hen's egg yolk. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 84(4), 477–481.
- Matte, J. J., Guay, F., Le Floc'h, N., & Girard, C. L. (2010). Bioavailability of dietary cyanocobalamin (vitamin B12) in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 88(12), 3936–3944.
- Matte, J. Jacques, Guay, F., & Girard, C. L. (2012). Bioavailability of vitamin B₁₂ in cows' milk. *British Journal of Nutrition*, 107(1), 61–66.
- Mattila, P., Ronkainen, R., Lehtikoinen, K., & Piironen, V. (1999). Effect of Household Cooking on the Vitamin D content in Fish, Eggs, and Wild Mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12(3), 153–160.
- Maurya, V. K., & Aggarwal, M. (2017). Factors influencing the absorption of vitamin D in GIT: an overview. *Journal of Food Science and Technology*, 54(12), 3753–3765.
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Park, Y. (2009). Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 48–67.
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, 1(1), 32–59.
- McCollum, E. V., Simmonds, N., & Becker, E. (1922). Studies on experimental rickets. *Journal of Biological Chemistry*, 53, 293–312.
- McCormick, C. C. (2002). Passive Diffusion Does Not Play a Major Role in the Absorption of Dietary Calcium in Normal Adults. *The Journal of Nutrition*, 132(11), 3428–3430.

- McKillop, D. J., McNulty, H., Scott, J. M., McPartlin, J. M., Strain, J. J., Bradbury, I., ... Pentieva, K. (2006). The rate of intestinal absorption of natural food folates is not related to the extent of folate conjugation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(1), 167–173.
- McNulty, H., & Pentieva, K. (2004). Folate bioavailability. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *63*(4), 529–536.
- McNulty, H., & Scott, J. M. (2008). Intake and status of folate and related B-vitamins: considerations and challenges in achieving optimal status. *British Journal of Nutrition*, *99*(S3) doi:10.1017/S0007114508006855.
- Ménard, O., Cattenoz, T., Guillemin, H., Souchon, I., Deglaire, A., Dupont, D., & Picque, D. (2014). Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion. *Food Chemistry*, *145*, 1039–1045.
- Ménard, O., & Dupont, D. (2014). Atouts et limites des modèles de digestion gastro-intestinale : de l'in vitro à l'in vivo. *Innovatios Agronomiques*, (36), 27–41.
- Ménard, O., Famelart, M.-H., Deglaire, A., Le Gouar, Y., Guérin, S., Malbert, C.-H., & Dupont, D. (2018). Gastric Emptying and Dynamic In Vitro Digestion of Drinkable Yogurts: Effect of Viscosity and Composition. *Nutrients*, *10*(9), 1308.
- Meullenet, J.-F., & Gandhapuneni, R. K. (2006). Development of the BITE Master II and its application to the study of cheese hardness. *Physiology & Behavior*, *89*(1), 39–43.
- Micha, R., & Mannar, V. (2018). *Global Nutrition Report* Retrieved from <https://globalnutritionreport.org/>.
- Michael, H. (2011). Vitamin D: a d-lightful solution for health. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, *59*(6), 872–880.
- Michalski, M. C., Genot, C., Gayet, C., Lopez, C., Fine, F., Joffre, F., ... Steering Committee of RMT LISTRAL. (2013). Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. *Progress in Lipid Research*, *52*(4), 354–373.
- Michalski, M.-C. (2009). Specific molecular and colloidal structures of milk fat affecting lipolysis, absorption and postprandial lipemia. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *111*(5), 413–431.
- Michalski, M.-C., & Januel, C. (2006). Does homogenization affect the human health properties of cow's milk? *Trends in Food Science & Technology*, *17*(8), 423–437.
- Miglio, C., Chiavaro, E., Visconti, A., Fogliano, V., & Pellegrini, N. (2008). Effects of different cooking methods on nutritional and physicochemical characteristics of selected vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(1), 139–147.
- Miller, B. D. D., & Welch, R. M. (2013). Food system strategies for preventing micronutrient malnutrition. *Food Policy*, *42*, 115–128.

- Miller, D. D., Schrickler, B. R., Rasmussen, R. R., & Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2248–2256.
- Miller, D. R., Specker, B. L., Ho, M. L., & Norman, E. J. (1991). Vitamin B-12 status in a macrobiotic community. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(2), 524–529.
- Miller, E. R., & Ullrey, D. E. (1987). The pig as a model for human nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 7, 361–382.
- Miller, L., & Houghton, J. A. (1945). The Micro-Kjeldahl Determination of the Nitrogen Content of Amino Acids and Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 159, 373–383.
- Millet, P., Guillaud, J. C., Fuchs, F., & Klepping, J. (1989). Nutrient intake and vitamin status of healthy French vegetarians and nonvegetarians. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 50(4), 718–727.
- Minekus, M. (2015). The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, ... H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 37–46). Cham: Springer International Publishing.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113.
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R., & Huis in't Veld, J. H. J. (1995). A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine., 23(2), 197–209.
- Mishellany-Dutour, A., Peyron, M.-A., Croze, J., François, O., Hartmann, C., Alric, M., & Woda, A. (2011). Comparison of food boluses prepared in vivo and by the AM2 mastication simulator. *Food Quality and Preference*, 22(4), 326–331.
- Miyamoto, E., Yabuta, Y., Kwak, C. S., Enomoto, T., & Watanabe, F. (2009). Characterization of vitamin B12 compounds from Korean purple laver (*Porphyra* sp.) products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2793–2796.
- Monin, E. (1895). *L'Hygiène de l'estomac*. Paris: Octave Doin Retrieved from <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k408590n>.
- Monro, J. A., & Mishra, S. (2010). Glycemic impact as a property of foods is accurately measured by an available carbohydrate method that mimics the glycemic response. *The Journal of Nutrition*, 140(7), 1328–1334.
- Montagne, L., Crévieu-Gabriel, I., Toullec, R., & Lallès, J. P. (2003). Influence of dietary protein level and source on the course of protein digestion along the small intestine of the veal calf. *Journal of Dairy Science*, 86(3), 934–943.

- Moore, J. G., Christian, P. E., Brown, J. A., Brophy, C., Datz, F., Taylor, A., & Alazraki, N. (1984). Influence of meal weight and caloric content on gastric emptying of meals in man. *Digestive Diseases and Sciences*, *29*(6), 513–519.
- Moorhead, S. A., Welch, R. W., Barbara, M., Livingstone, E., McCourt, M., Burns, A. A., & Dunne, A. (2006). The effects of the fibre content and physical structure of carrots on satiety and subsequent intakes when eaten as part of a mixed meal. *The British Journal of Nutrition*, *96*(3), 587–595.
- Moorthy, A. S., Brooks, S. P. J., Kalmokoff, M., & Eberl, H. J. (2015). A Spatially Continuous Model of Carbohydrate Digestion and Transport Processes in the Colon. *PLOS ONE*, *10*(12), e0145309.
- Morell, P., Fiszman, S., Llorca, E., & Hernando, I. (2017). Designing added-protein yogurts: Relationship between in vitro digestion behavior and structure. *Food Hydrocolloids*, *72*, 27–34.
- Moreno, F. J., Quintanilla-López, J. E., Lebrón-Aguilar, R., Olano, A., & Sanz, M. L. (2008). Mass spectrometric characterization of glycated beta-lactoglobulin peptides derived from galacto-oligosaccharides surviving the in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *19*(7), 927–937.
- Morin, H., & Ricard, P. (2009, August 31). Polémique sur l'expérimentation animale en Europe. *Le Monde.fr* Retrieved from https://www.lemonde.fr/planete/article/2009/08/31/polemique-sur-l-experimentation-animale-en-europe_1233738_3244.html.
- Morris, M. C., Schneider, J. A., & Tangney, C. C. (2006). Thoughts on B-vitamins and dementia. *Journal of Alzheimer's Disease*, *9*(4), 429–433.
- Morris, M. S., Jacques, P. F., Rosenberg, I. H., & Selhub, J. (2007). Folate and vitamin B-12 status in relation to anemia, macrocytosis, and cognitive impairment in older Americans in the age of folic acid fortification. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(1), 193–200.
- Mosca, A. C., & Chen, J. (2017). Food-saliva interactions: Mechanisms and implications. *Trends in Food Science & Technology*, *66*, 125–134.
- Motilva, M.-J., Serra, A., & Rubió, L. (2015). Nutrikinetic studies of food bioactive compounds: from *in vitro* to *in vivo* approaches. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *66*(sup1), S41–S52.
- Motoi, L., Morgenstern, M. P., Hedderley, D. I., Wilson, A. J., & Balita, S. (2013). Bolus Moisture Content of Solid Foods during Mastication: Bolus Moisture Content of Solid Foods. *Journal of Texture Studies*, *44*(6), 468–479.
- Moukayed, M., & Grant, W. B. (2013). Molecular link between vitamin D and cancer prevention. *Nutrients*, *5*(10), 3993–4021.

- Moussa, M., Landrier, J.-F., Reboul, E., Ghiringhelli, O., Coméra, C., Collet, X., ... Borel, P. (2008). Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *The Journal of Nutrition*, *138*(8), 1432–1436.
- Moxon, T. E., & Bakalis, S. (2016). Simulation-Based Food Process Design. In *Computer Aided Chemical Engineering* (Vol. 39, pp. 393–415). Elsevier.
- Moxon, T. E., Gouseti, O., & Bakalis, S. (2016). In silico modelling of mass transfer & absorption in the human gut. *Journal of Food Engineering*, *176*, 110–120.
- Mulet-Cabero, A.-I., Rigby, N. M., Brodkorb, A., & Mackie, A. R. (2017). Dairy food structures influence the rates of nutrient digestion through different in vitro gastric behaviour. *Food Hydrocolloids*, *67*, 63–73.
- Mulligan, G. B., & Licata, A. (2010). Taking vitamin D with the largest meal improves absorption and results in higher serum levels of 25-hydroxyvitamin D. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *25*(4), 928–930.
- Munialo, C. D., Euston, S. R., & de Jongh, H. H. J. (2018). Protein gels. In *Proteins in Food Processing* (pp. 501–521). Elsevier.
- Myles, S., Hradetzky, E., Engelken, J., Lao, O., Nürnberg, P., Trent, R. J., ... Stoneking, M. (2007). Identification of a candidate genetic variant for the high prevalence of type II diabetes in Polynesians. *European Journal of Human Genetics*, *15*(5), 584–589.
- Naderi, N., & House, J. D. (2018). Recent Developments in Folate Nutrition. *Advances in Food and Nutrition Research*, *83*, 195–213.
- Nagao, A. (2011). Absorption and metabolism of dietary carotenoids. *BioFactors*, *37*(2), 83–87.
- Natri, A.-M., Salo, P., Vikstedt, T., Palssa, A., Huttunen, M., Kärkkäinen, M. U. M., ... Lamberg-Allardt, C. J. (2006). Bread fortified with cholecalciferol increases the serum 25-hydroxyvitamin D concentration in women as effectively as a cholecalciferol supplement. *The Journal of Nutrition*, *136*(1), 123–127.
- Nau, F., Nyemb-Diop, K., Lechevalier, V., Flourey, J., Serrière, C., Stroebinger, N., ... Rutherford, S. M. (2019). Spatial-temporal changes in pH, structure and rheology of the gastric chyme in pigs as influenced by egg white gel properties. *Food Chemistry*, *280*, 210–220.
- Nayak, B., De J. Berríos, J., & Tang, J. (2014). Impact of food processing on the glycemic index (GI) of potato products. *Food Research International*, *56*, 35–46.
- Nexo, E., Christensen, A.-L., Hvas, A.-M., Petersen, T. E., & Fedosov, S. N. (2002). Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B12 deficiency. *Clinical Chemistry*, *48*(3), 561–562.

- Neyraud, E., Heinzerling, C. I., Bult, J. H. F., Mesmin, C., & Dransfield, E. (2009). Effects of Different Tastants on Parotid Saliva Flow and Composition. *Chemosensory Perception*, 2(2), 108–116.
- Nicholl, C. G., Polak, J. M., & Bloom, S. R. (1985). The hormonal regulation of food intake, digestion, and absorption. *Annual Review of Nutrition*, 5, 213–239.
- Nicolas, J. P., & Guéant, J. L. (1994). Absorption, distribution and excretion of vitamin B12. *Annales De Gastroenterologie Et D'hepatologie*, 30(6), 270–276, 281; discussion 281–282.
- Nielsen, J. E., Borchert, T. V., & Vriend, G. (2001). The determinants of α -amylase pH-activity profiles. *Protein Engineering, Design and Selection*, 14(7), 505–512.
- Nielsen, M. J., Rasmussen, M. R., Andersen, C. B. F., Nexø, E., & Moestrup, S. K. (2012). Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 9(6), 345–354.
- Nirarnitmahapanya, S., Harris, S. S., & Dawson-Hughes, B. (2011). Type of dietary fat is associated with the 25-hydroxyvitamin D3 increment in response to vitamin D supplementation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(10), 3170–3174.
- Nishioka, M., Kanosue, F., Yabuta, Y., & Watanabe, F. (2011). Loss of vitamin B(12) in fish (round herring) meats during various cooking treatments. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 57(6), 432–436.
- Nouffert, R., & Renaudin, N. (2010). *Charte d'engagements volontaires de progrès nutritionnels proposée par lesieur (Huiles, sauces et mayonnaises)* Retrieved from https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Lesieur_Publique_0210.pdf.
- Nyemb, K., Guérin-Dubiard, C., Pézenec, S., Jardin, J., Briard-Bion, V., Cauty, C., ... Nau, F. (2016). The structural properties of egg white gels impact the extent of in vitro protein digestion and the nature of peptides generated. *Food Hydrocolloids*, 54, 315–327.
- Nyemb-Diop, K., Causeur, D., Jardin, J., Briard-Bion, V., Guérin-Dubiard, C., Rutherford, S. M., ... Nau, F. (2016). Investigating the impact of egg white gel structure on peptide kinetics profile during in vitro digestion. *Food Research International*, 88, 302–309.
- Nyman, M. (1995). Effects of processing on dietary fibre in vegetables. *European Journal of Clinical Nutrition*, 49 Suppl 3, S215–218.
- Nys, Y. (2000). Dietary carotenoids and egg yolk coloration. *Archiv Fur Geflugelkunde*, 64(2), 45–54.
- Oaks, B. M., Dodd, K. W., Meinhold, C. L., Jiao, L., Church, T. R., & Stolzenberg-Solomon, R. Z. (2010). Folate intake, post-folic acid grain fortification, and pancreatic cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(2), 449–455.

- Obersby, D., Chappell, D. C., Dunnett, A., & Tsiami, A. A. (2013). Plasma total homocysteine status of vegetarians compared with omnivores: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, *109*(5), 785–794.
- Ogungbenro, K., & Aarons, L. (2010a). Sample size/power calculations for repeated ordinal measurements in population pharmacodynamic experiments. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, *37*(1), 67–83. <https://doi.org/10.1007/s10928-009-9144-6>
- Ogungbenro, K., & Aarons, L. (2010b). Sample-size calculations for multi-group comparison in population pharmacokinetic experiments. *Pharmaceutical Statistics*, *9*(4), 255–268. <https://doi.org/10.1002/pst.388>
- Ohrvik, V. E., & Witthoft, C. M. (2011). Human folate bioavailability. *Nutrients*, *3*(4), 475–490.
- Öhrvik, V., Öhrvik, H., Tallkvist, J., & Witthöft, C. (2010). Folates in bread: retention during bread-making and in vitro bioaccessibility. *European Journal of Nutrition*, *49*(6), 365–372.
- Ohrvik, V., & Witthöft, C. (2008). Orange juice is a good folate source in respect to folate content and stability during storage and simulated digestion. *European Journal of Nutrition*, *47*(2), 92–98.
- Olmedilla, B., Granado, F., Southon, S., Wright, A. J. A., Blanco, I., Gil-Martinez, E., ... Hininger, I. (2002). A European multicentre, placebo-controlled supplementation study with alpha-tocopherol, carotene-rich palm oil, lutein or lycopene: analysis of serum responses. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *102*(4), 447–456.
- Oltean, S., & Banerjee, R. (2005). A B₁₂-responsive Internal Ribosome Entry Site (IRES) Element in Human Methionine Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(38), 32662–32668.
- OMS. (2011). *Directives Sur L'enrichissement Des Aliments En Micronutriments*. World Health Organization.
- OMS. (2017). *10 faits sur l'obésité*. Retrieved from <https://www.who.int/features/factfiles/obesity/fr/>.
- O'Neill, M. E., Carroll, Y., Corridan, B., Olmedilla, B., Granado, F., Blanco, I., ... Thurnham, D. I. (2001). A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *The British Journal of Nutrition*, *85*(4), 499–507.
- Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., & 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), 281–287.
- Ortigue-Marty, I., Thomas, E., Prévéraud, D. P., Girard, C. L., Bauchart, D., Durand, D., & Peyron, A. (2006). Influence of maturation and cooking treatments on the nutritional value of bovine meats: Water losses and vitamin B12. *Meat Science*, *73*(3), 451–458.

- Öste, R., & Sjödin, P. (1984). Effect of Maillard Reaction Products on Protein Digestion. In Vivo Studies on Rats. *The Journal of Nutrition*, 114(12), 2228–2234.
- Öste, R., Sjödin, P., Jägerstad, M., Björck, I., & Dahlqvist, A. (1985). Effect of Maillard reaction products on carbohydrate utilization—Studies in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, 16(1), 37–47.
- Outila, T. A., Mattila, P. H., Piironen, V. I., & Lamberg-Allardt, C. J. (1999). Bioavailability of vitamin D from wild edible mushrooms (*Cantharellus tubaeformis*) as measured with a human bioassay. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(1), 95–98.
- Pafumi, Y., Lairon, D., de la Porte, P. L., Juhel, C., Storch, J., Hamosh, M., & Armand, M. (2002). Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 28070–28079.
- Panda, D. K., Miao, D., Bolivar, I., Li, J., Huo, R., Hendy, G. N., & Goltzman, D. (2004). Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16754–16766.
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21–R32.
- Parks, J. S., Chew, B. P., Hayek, M. G., Massimino, S., & Reinhart, G. A. (2004). Dietary B-carotene enhances cell-mediated and humoral immune response in cats. *FASEB*.
- Parrish, D. B. (1979). Determination of vitamin D in foods: a review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12(1), 29–57.
- Pasquier, B., Armand, M., Castelain, C., Guillon, F., Borel, P., Lafont, H., & Lairon, D. (1996). Emulsification and lipolysis of triacylglycerols are altered by viscous soluble dietary fibres in acidic gastric medium in vitro. *The Biochemical Journal*, 314 (Pt 1), 269–275.
- Pasquier, Bérengère, Armand, M., Guillon, F., Castelain, C., Borel, P., Barry, J.-L., ... Lairon, D. (1996). Viscous soluble dietary fibers alter emulsification and lipolysis of triacylglycerols in duodenal medium in vitro. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 7(5), 293–302.
- Patel, K. R., & Sobczykńska-Malefora, A. (2017). The adverse effects of an excessive folic acid intake. *European Journal of Clinical Nutrition*, 71(2), 159–163.
- Patterson, J. K., Lei, X. G., & Miller, D. D. (2008). The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 233(6), 651–664.
- Pennings, B., Groen, B. B. L., van Dijk, J.-W., de Lange, A., Kiskini, A., Kuklinski, M., ... van Loon, L. J. C. (2013). Minced beef is more rapidly digested and absorbed than beef steak, resulting in greater postprandial protein retention in older men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(1), 121–128.

- Pérez-Barbería, F. J., & Gordon, I. J. (1998). Factors affecting food comminution during chewing in ruminants: a review. *Biological Journal of the Linnean Society*, *63*(2), 233–256.
- Pérez-Gálvez, A., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2005). Esterification of xanthophylls and its effect on chemical behavior and bioavailability of carotenoids in the human. *Nutrition Research*, *25*(7), 631–640.
- Pérez-Gálvez, A., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2002). Degradation of non-esterified and esterified xanthophylls by free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1569*(1–3), 31–34.
- Perry, A., Rasmussen, H., & Johnson, E. J. (2009). Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis*, *22*(1), 9–15.
- Petersen, M. A. (1993). Influence of sous vide processing, steaming and boiling on vitamin retention and sensory quality in broccoli florets. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, *197*(4), 375–380.
- Peyron, M.-A., Mishellany, A., & Woda, A. (2004). Particle size distribution of food boluses after mastication of six natural foods. *Journal of Dental Research*, *83*(7), 578–582.
- Peyron, M.-A., Santé-Lhoutellier, V., Dardevet, D., Hennequin, M., Rémond, D., François, O., & Woda, A. (2019). Addressing various challenges related to food bolus and nutrition with the AM2 mastication simulator. *Food Hydrocolloids*, *97*, 105229.
- Peyron, Marie-Agnès, Gierczynski, I., Hartmann, C., Loret, C., Dardevet, D., Martin, N., & Woda, A. (2011). Role of physical bolus properties as sensory inputs in the trigger of swallowing. *PLoS One*, *6*(6), e21167.
- Peyron, Marie-Agnès, & Woda, A. (2016). An update about artificial mastication. *Current Opinion in Food Science*, *9*, 21–28.
- Pfeiffer, C. M., Rogers, L. M., Bailey, L. B., & Gregory, J. F. (1997). Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *66*(6), 1388–1397.
- Pineda-Vadillo, C., Nau, F., Dubiard, C. G., Cheynier, V., Meudec, E., Sanz-Buenhombre, M., ... Dupont, D. (2016). In vitro digestion of dairy and egg products enriched with grape extracts: Effect of the food matrix on polyphenol bioaccessibility and antioxidant activity. *Food Research International*, *88*, 284–292.
- Pinto, J. T., & Zempleni, J. (2016). Riboflavin. *Advances in Nutrition*, *7*(5), 973–975.

- Plotnikoff, G. A., & Quigley, J. M. (2003). Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(12), 1463–1470.
- Poette, J., Mekoué, J., Neyraud, E., Berdeaux, O., Renault, A., Guichard, E., ... Feron, G. (2014). Fat sensitivity in humans: oleic acid detection threshold is linked to saliva composition and oral volume: Fat taste in humans. *Flavour and Fragrance Journal*, 29(1), 39–49.
- Pollack, J., Campbell, J. M., Potter, S. M., & Erdman, J. W. (1994). Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) absorb beta-carotene intact from a test meal. *The Journal of Nutrition*, 124(6), 869–873.
- Popkin, B. M., Horton, S., Kim, S., Mahal, A., & Shuigao, J. (2001). Trends in diet, nutritional status, and diet-related noncommunicable diseases in China and India: the economic costs of the nutrition transition. *Nutrition Reviews*, 59(12), 379–390.
- Popkin, Barry M. (2006). Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(2), 289–298.
- Poti, J. M., Mendez, M. A., Ng, S. W., & Popkin, B. M. (2015). Is the degree of food processing and convenience linked with the nutritional quality of foods purchased by US households? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(6), 1251–1262.
- Prince, M. R., & Frisoli, J. K. (1993). Beta-carotene accumulation in serum and skin. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(2), 175–181.
- Prinz-Langenohl, R., Brönstrup, A., Thorand, B., Hages, M., & Pietrzik, K. (1999). Availability of Food Folate in Humans. *The Journal of Nutrition*, 129(4), 913–916.
- Prodanov, M., Sierra, I., & Vidal-Valverde, C. (2004). Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes. *Food Chemistry*, 84(2), 271–277.
- Purchas, R., Zou, M., Pearce, P., & Jackson, F. (2007). Concentrations of vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in raw and cooked New Zealand beef and lamb. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(2), 90–98.
- Pushpass, R.-A. G., Daly, B., Kelly, C., Proctor, G., & Carpenter, G. H. (2019). Altered Salivary Flow, Protein Composition, and Rheology Following Taste and TRP Stimulation in Older Adults. *Frontiers in Physiology*, 10, 652.
- R Development Core Team (2007) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org>

- Rafi, M. M., & Shafaie, Y. (2007). Dietary lutein modulates inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene and protein expression in mouse macrophage cells (RAW 264.7). *Molecular Nutrition & Food Research*, *51*(3), 333–340.
- Raikos, V. (2010). Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces. A review. *Food Hydrocolloids*, *24*(4), 259–265.
- Ramos, M. I., Allen, L. H., Mungas, D. M., Jagust, W. J., Haan, M. N., Green, R., & Miller, J. W. (2005). Low folate status is associated with impaired cognitive function and dementia in the Sacramento Area Latino Study on Aging. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *82*(6), 1346–1352.
- Rampersaud, G. C., Bailey, L. B., & Kauwell, G. P. A. (2002). Relationship of folate to colorectal and cervical cancer: review and recommendations for practitioners. *Journal of the American Dietetic Association*, *102*(9), 1273–1282.
- Rao, A. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, *55*(3), 207–216.
- Rao, J., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2013). Nutraceutical nanoemulsions: influence of carrier oil composition (digestible versus indigestible oil) on β -carotene bioavailability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(13), 3175–3183.
- Rapp, L. M., Maple, S. S., & Choi, J. H. (2000). Lutein and zeaxanthin concentrations in rod outer segment membranes from perifoveal and peripheral human retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *41*(5), 1200–1209.
- Ravikrishnan, R., Rusia, S., Ilamurugan, G., Salunkhe, U., Deshpande, J., Shankaranarayanan, J., ... Soni, M. G. (2011). Safety assessment of lutein and zeaxanthin (Lutemax 2020): subchronic toxicity and mutagenicity studies. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *49*(11), 2841–2848.
- Ray, J. G., & Blom, H. J. (2003). Vitamin B12 insufficiency and the risk of fetal neural tube defects. *QJM: An International Journal of Medicine*, *96*(4), 289–295.
- Reboul, E. (2015). Intestinal absorption of vitamin D: from the meal to the enterocyte. *Food & Function*, *6*(2), 356–362.
- Reboul, E. (2017). Vitamin E Bioavailability: Mechanisms of Intestinal Absorption in the Spotlight. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *6*(4) doi:10.3390/antiox6040095.
- Reboul, Emmanuelle. (2019). The gut: a regulatory hall governing fat-soluble micronutrient absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *110*(5), 1045–1046. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz199>
- Reboul, E., Goncalves, A., Comera, C., Bott, R., Nowicki, M., Landrier, J.-F., ... Borel, P. (2011). Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: evidences for

- involvement of cholesterol transporters. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(5), 691–702.
- Reboul, E., Richelle, M., Perrot, E., Desmoulins-Malezet, C., Pirisi, V., & Borel, P. (2006). Bioaccessibility of Carotenoids and Vitamin E from Their Main Dietary Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8749–8755.
- Reboul, E., Thap, S., Perrot, E., Amiot, M.-J., Lairon, D., & Borel, P. (2007). Effect of the main dietary antioxidants (carotenoids, gamma-tocopherol, polyphenols, and vitamin C) on alpha-tocopherol absorption. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(10), 1167–1173. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602635>
- Reboul, E., Thap, S., Tourniaire, F., André, M., Juhel, C., Morange, S., ... Borel, P. (2007). Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamins C and E) on lutein absorption. *British Journal of Nutrition*, 97(3), 440–446.
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., & da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588–602.
- Rémond, D., Machebeuf, M., Yven, C., Buffière, C., Mioche, L., Mosoni, L., & Patureau Mirand, P. (2007). Postprandial whole-body protein metabolism after a meat meal is influenced by chewing efficiency in elderly subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5), 1286–1292.
- Reynolds, E. H. (2016). What is the safe upper intake level of folic acid for the nervous system? Implications for folic acid fortification policies. *European Journal of Clinical Nutrition*, 70(5), 537–540.
- Riccio, F., Mennella, C., & Fogliano, V. (2006). Effect of cooking on the concentration of Vitamins B in fortified meat products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5), 1592–1595.
- Richardson, M. (2006). Gastrointestinal tract. Part 4: the small intestine. *Nursing Times*, 102(9), 24–25.
- Rinaldi, L., Gauthier, S. F., Britten, M., & Turgeon, S. L. (2014). In vitro gastrointestinal digestion of liquid and semi-liquid dairy matrixes. *LWT - Food Science and Technology*, 57(1), 99–105.
- Ristow, K. A., Gregory, J. F., & Damron, B. L. (1982). Effects of dietary fiber on the bioavailability of folic acid monoglutamate. *The Journal of Nutrition*, 112(4), 750–758.
- Ritchie, H., & Roser, M. (2017, August). Micronutrient deficiency Retrieved from <https://ourworldindata.org/micronutrient-deficiency>.
- Rogers, K. (2011). *The digestive system*. New York, NY: Britannica Educational Pub., in association with Rosen Educational Services.

- Roodenburg, A. J., Leenen, R., van het Hof, K. H., Weststrate, J. A., & Tijburg, L. B. (2000). Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of α -carotene, β -carotene, and vitamin E in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *71*(5), 1187–1193.
- Rosen, C. J., Abrams, S. A., Aloia, J. F., Brannon, P. M., Clinton, S. K., Durazo-Arvizu, R. A., ... Taylor, C. L. (2012). IOM committee members respond to Endocrine Society vitamin D guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *97*(4), 1146–1152.
- Ross, A. C. (Ed.). (2014). *Modern nutrition in health and disease* (11th ed). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Rozan, P., Lamghari, R., Linder, M., Villaume, C., Fanni, J., Parmentier, M., & Méjean, L. (1997). *In Vivo* and *in Vitro* Digestibility of Soybean, Lupine, and Rapeseed Meal Proteins after Various Technological Processes †. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(5), 1762–1769.
- Ruggeri, S., Vahteristo, L. T., Aguzzi, A., Finglas, P., & Carnovale, E. (1999). Determination of folate vitamers in food and in Italian reference diet by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, *855*(1), 237–245.
- Russ, J. C. (2005). *Image analysis of food microstructure*. Boca Raton: CRC Press.
- Russell, T. L., Berardi, R. R., Barnett, J. L., Dermentzoglou, L. C., Jarvenpaa, K. M., Schmaltz, S. P., & Dressman, J. B. (1993). Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, North American men and women. *Pharmaceutical Research*, *10*(2), 187–196.
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1992). *The principles of humane experimental technique* (Special ed). Potters Bar: UFAW.
- Russell-Jones, G. J., & Alpers, D. H. (1999). Vitamin B12 transporters. *Pharmaceutical Biotechnology*, *12*, 493–520.
- Sager, M., Jedamzik, P., Merdivan, S., Grimm, M., Schneider, F., Kromrey, M.-L., ... Weitschies, W. (2018). Low dose caffeine as a salivary tracer for the determination of gastric water emptying in fed and fasted state: A MRI validation study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *127*, 443–452.
- Salles, C., Tarrega, A., Mielle, P., Maratray, J., Gorria, P., Liaboeuf, J., & Liodenot, J.-J. (2007). Development of a chewing simulator for food breakdown and the analysis of in vitro flavor compound release in a mouth environment. *Journal of Food Engineering*, *82*(2), 189–198.
- Salvia-Trujillo, L., Fumiaki, B., Park, Y., & McClements, D. J. (2017). The influence of lipid droplet size on the oral bioavailability of vitamin D₂ encapsulated in emulsions: an in vitro and in vivo study. *Food & Function*, *8*(2), 767–777.
- Sanaka, M., & Nakada, K. (2010). Stable isotope breath tests for assessing gastric emptying: A comprehensive review. *Journal of Smooth Muscle Research = Nihon Heikatsukin Gakkai Kikanshi*, *46*(6), 267–280.

- Sasamoto, Y., Gomi, F., Sawa, M., Tsujikawa, M., & Nishida, K. (2011). Effect of 1-year lutein supplementation on macular pigment optical density and visual function. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 249(12), 1847–1854.
- Sauberlich, H. E., Kretsch, M. J., Skala, J. H., Johnson, H. L., & Taylor, P. C. (1987). Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 46(6), 1016–1028.
- Saunders, R. M., Connor, M. A., Booth, A. N., Bickoff, E. M., & Kohler, G. O. (1973). Measurement of digestibility of alfalfa protein concentrates by in vivo and in vitro methods. *The Journal of Nutrition*, 103(4), 530–535.
- Scheuble, N., Schaffner, J., Schumacher, M., Windhab, E. J., Liu, D., Parker, H., ... Fischer, P. (2018). Tailoring Emulsions for Controlled Lipid Release: Establishing in vitro–in Vivo Correlation for Digestion of Lipids. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(21), 17571–17581.
- Schiffman, S. (1977). Food recognition by the elderly. *Journal of Gerontology*, 32(5), 586–592.
- Schiffman, Susan, Nash, M. L., & Dackis, C. (1978). Reduced olfactory discrimination in patients on chronic hemodialysis. *Physiology & Behavior*, 21(2), 239–242.
- Schron, C. M. (1991). pH modulation of the kinetics of rabbit jejunal, brush-border folate transport. *The Journal of Membrane Biology*, 120(2), 192–200.
- Schulze, K. (2006). Imaging and modelling of digestion in the stomach and the duodenum. *Neurogastroenterology and Motility*, 18(3), 172–183.
- Schüth, F., & Schmidt, W. (2002). Microporous and Mesoporous Materials. *Advanced Materials*, 14(9), 629–638.
- Schwartz, J., & Shklar, G. (1987). Regression of experimental hamster cancer by beta carotene and algae extracts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 45(6), 510–515.
- Sciascia, Q., Daş, G., & Metges, C. C. (2016). The pig as a model for humans: Effects of nutritional factors on intestinal function and health. *Journal of Animal Science*, 94(suppl_3), 441–452.
- Scott, J. M., & Molloy, A. M. (2012). The Discovery of Vitamin B12. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(3), 239–245.
- Scrinis, G. (2013). *Nutritionism: the science and politics of dietary advice*. New York, NY: Columbia Univ. Press.
- Scripsema, N. K., Hu, D.-N., & Rosen, R. B. (2015). Lutein, Zeaxanthin, and meso-Zeaxanthin in the Clinical Management of Eye Disease. *Journal of Ophthalmology*, 2015, 865179.

- Seetharam, B., Bose, S., & Li, N. (1999). Cellular import of cobalamin (Vitamin B-12). *The Journal of Nutrition*, 129(10), 1761–1764.
- Seiquer, I., Díaz-Alguacil, J., Delgado-Andrade, C., López-Frías, M., Muñoz Hoyos, A., Galdó, G., & Navarro, M. P. (2006). Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11–14 y. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(5), 1082–1088.
- Selhub, J., & Miller, J. W. (1992). The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by S-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(1), 131–138.
- Selhub, J., Powell, G. M., & Rosenberg, I. H. (1984). Intestinal transport of 5-methyltetrahydrofolate. *The American Journal of Physiology*, 246(5 Pt 1), G515-520.
- Selhub, J., & Rosenberg, I. H. (1981). Folate transport in isolated brush border membrane vesicles from rat intestine. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(9), 4489–4493.
- Selhub, Jacob, Jacques, P. F., Bostom, A. G., D'Agostino, R. B., Wilson, P. W. F., Belanger, A. J., ... Rosenberg, I. H. (1996). Relationship between Plasma Homocysteine, Vitamin Status and Extracranial Carotid-Artery Stenosis in the Framingham Study Population. *The Journal of Nutrition*, 126(suppl_4), 1258S-1265S.
- Selhub, Jacob, & Rosenberg, I. H. (2016). Excessive folic acid intake and relation to adverse health outcome. *Biochimie*, 126, 71–78.
- Seligman, S., Copeland, L., Appels, R., & Morell, M. (1998). Analysis of lipids binding to starch. In *Cereals* (pp. 87–90). Australia, North Melbourne: Royal Australian Chemical Institute.
- Sensoy, I. (2014). A review on the relationship between food structure, processing, and bioavailability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(7), 902–909.
- Sernka, T. J., & Jacobson, E. D. (1983). *Gastrointestinal physiology, the essentials* (2nd ed). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Seyoum, E., & Selhub, J. (1998). Properties of food folates determined by stability and susceptibility to intestinal pteroylpolyglutamate hydrolase action. *The Journal of Nutrition*, 128(11), 1956–1960.
- Shampo, M. A., & Kyle, R. A. (2001). Adolf Windaus—Nobel Prize for Research on Sterols. *Mayo Clinic Proceedings*, 76(2), 119.
- Sharavana, G., Joseph, G. S., & Baskaran, V. (2017). Lutein attenuates oxidative stress markers and ameliorates glucose homeostasis through polyol pathway in heart and kidney of STZ-induced hyperglycemic rat model. *European Journal of Nutrition*, 56(8), 2475–2485.

- Shemesh, Z., Attias, J., Ornan, M., Shapira, N., & Shahar, A. (1993). Vitamin B12 deficiency in patients with chronic-tinnitus and noise-induced hearing loss. *American Journal of Otolaryngology*, *14*(2), 94–99.
- Shenkin, A. (2008). Basics in clinical nutrition: Trace elements and vitamins in parenteral and enteral nutrition. *E-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, *3*(6), e293–e297.
- Sheppard, C. J. R. (1999). Confocal Microscopy – Principles, Practice and Options. In *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity* (pp. 303–309). Elsevier.
- Shi, J., & Le Maguer, M. (2000). Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Biotechnology*, *20*(4), 293–334.
- Shi, Y., Gao, P., Gong, Y., & Ping, H. (2010). Application of a biphasic test for characterization of in vitro drug release of immediate release formulations of celecoxib and its relevance to in vivo absorption. *Molecular Pharmaceutics*, *7*(5), 1458–1465.
- Sijbesma, F., & Sheeran, J. (2012). *Micronutrients, Macro Impact : The story of vitamins and a hungry world* (p. 168) Retrieved from <https://alimentation-sante.org/documents/micronutrients-macro-impact-the-story-of-vitamins-and-a-hungry-world/>.
- Singh, H., Ye, A., & Ferrua, M. J. (2015). Aspects of food structures in the digestive tract. *Current Opinion in Food Science*, *3*, 85–93.
- Singh, J., Dartois, A., & Kaur, L. (2010). Starch digestibility in food matrix: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(4), 168–180.
- Singh, J., Kaur, L., & Singh, H. (2013). Food Microstructure and Starch Digestion. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 70, pp. 137–179). Elsevier.
- Singh, S., Gamlath, S., & Wakeling, L. (2007). Nutritional aspects of food extrusion: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, *42*(8), 916–929.
- Slattery, M. L. (2008). Defining dietary consumption: is the sum greater than its parts? *The American Journal of Clinical Nutrition*, *88*(1), 14–15.
- Slifka, K. A., Bowen, P. E., Stacewicz-Sapuntzakis, M., & Crissey, S. D. (1999). A survey of serum and dietary carotenoids in captive wild animals. *The Journal of Nutrition*, *129*(2), 380–390.
- Smith, A. D. (2008). The Worldwide Challenge of the Dementias: A Role for B Vitamins and Homocysteine? *Food and Nutrition Bulletin*, *29*(2_suppl1), S143–S172.
- Snodderly, D. M. (1995). Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *62*(6 Suppl), 1448S-1461S.

- Snodderly, D. M., Handelman, G. J., & Adler, A. J. (1991). Distribution of individual macular pigment carotenoids in central retina of macaque and squirrel monkeys. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32(2), 268–279.
- Snodderly, D. M., Russett, M. D., Land, R. I., & Krinsky, N. I. (1990). Plasma carotenoids of monkeys (*Macaca fascicularis* and *Saimiri sciureus*) fed a nonpurified diet. *The Journal of Nutrition*, 120(12), 1663–1671.
- Soottitantawat, A., Peigney, J., Uekaji, Y., Yoshii, H., Furuta, T., Ohgawara, M., & Linko, P. (2007). Structural analysis of spray-dried powders by confocal laser scanning microscopy. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 2(1), 41–46.
- Spallanzani, L. (1777). *Expériences sur la digestion de l'Homme et de différentes espèces d'animaux*. Retrieved from <http://nordnum.univ-lille.fr/ark:/72505/a011516897674jlxOY1/e264e9761c>.
- Stahl, W. (2002). Bioavailability and metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*, 23(1–3), 39–100.
- Stanley, D. W. (2017). Food texture and microstructure. In *Food Texture*. Retrieved from <https://www.taylorfrancis.com/books/9781351447508>.
- Stea, T. H., Johansson, M., Jägerstad, M., & Frølich, W. (2007). Retention of folates in cooked, stored and reheated peas, broccoli and potatoes for use in modern large-scale service systems. *Food Chemistry*, 101(3), 1095–1107.
- Strathe, A. B., Danfær, A., & Chwalibog, A. (2008). A dynamic model of digestion and absorption in pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 143(1–4), 328–371.
- Subar, A. F., Block, G., & James, L. D. (1989). Folate intake and food sources in the US population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 50(3), 508–516.
- Subczynski, W. K., Wisniewska, A., & Widomska, J. (2010). Location of macular xanthophylls in the most vulnerable regions of photoreceptor outer-segment membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504(1), 61–66.
- Sugawara, T., Kushiro, M., Zhang, H., Nara, E., Ono, H., & Nagao, A. (2001). Lysophosphatidylcholine Enhances Carotenoid Uptake from Mixed Micelles by Caco-2 Human Intestinal Cells. *The Journal of Nutrition*, 131(11), 2921–2927.
- Sun, J., Giraud, D. W., Moxley, R. A., & Driskell, J. A. (1997). beta-Carotene and alpha-tocopherol inhibit the development of atherosclerotic lesions in hypercholesterolemic rabbits. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*, 67(3), 155–163.
- Svanberg, S. J. M., Nyman, E. M. G. L., Andersson, R., & Nilsson, T. (1997). Effects of boiling and storage on dietary fibre and digestible carbohydrates in various cultivars of carrots. *Science of Food and Agriculture*, 73(2), 245–254.

- Swedish Council on Health Technology Assessment. (2007). *Benefits and Risks of Fortifying Flour with Folic Acid to Reduce the Risk of Neural Tube Defects: A Systematic Review*. Stockholm: Swedish Council on Health Technology Assessment (SBU) Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK447975/>.
- Sy, C., Gleize, B., Dangles, O., Landrier, J.-F., Veyrat, C. C., & Borel, P. (2012). Effects of physicochemical properties of carotenoids on their bioaccessibility, intestinal cell uptake, and blood and tissue concentrations. *Molecular Nutrition & Food Research*, *56*(9), 1385–1397.
- Tako, M., Tamaki, Y., Teruya, T., & Takeda, Y. (2014). The Principles of Starch Gelatinization and Retrogradation. *Food and Nutrition Sciences*, *05*(03), 280–291.
- Tamura, T., & Stokstad, E. L. (1973). The availability of food folate in man. *British Journal of Haematology*, *25*(4), 513–532.
- Tang, G., Dolnikowski, G. G., Blanco, M. C., Fox, J. G., & Russell, R. M. (1993). Serum carotenoids and retinoids in ferrets fed canthaxanthin. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *4*(1), 58–63.
- Tangpricha, V., Koutkia, P., Rieke, S. M., Chen, T. C., Perez, A. A., & Holick, M. F. (2003). Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *77*(6), 1478–1483.
- Tanprasertsuk, E. J., Li, B., Bernstein, P. S., Vishwanathan, R., Johnson, M. A., Poon, L., & Johnson, E. J. (2016). Correction: Relationship between Concentrations of Lutein and StARD3 among Pediatric and Geriatric Human Brain Tissue. *PLoS One*, *11*(7), e0159877.
- Tanumihardjo, S. A., Li, J., & Dosti, M. P. (2005). Lutein absorption is facilitated with cosupplementation of ascorbic acid in young adults. *Journal of the American Dietetic Association*, *105*(1), 114–118.
- Tebben, P. J., Singh, R. J., & Kumar, R. (2016). Vitamin D-Mediated Hypercalcemia: Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Endocrine Reviews*, *37*(5), 521–547.
- Tenovuo, J. (2002). Antimicrobial Agents in Saliva—Protection for the Whole Body. *Journal of Dental Research*, *81*(12), 807–809.
- Thatcher, A. J., Lee, C. M., & Erdman, J. W. (1998). Tissue stores of beta-carotene are not conserved for later use as a source of vitamin A during compromised vitamin A status in mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *The Journal of Nutrition*, *128*(7), 1179–1185.
- The Emerging Risk Factors Collaboration. (2010). Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet*, *375*(9733), 2215–2222.
- The World Bank. (2013). *The State of World's Poor: Where are the Poor and where are they the Poorest ?* Retrieved from

https://www.worldbank.org/content/dam/Worldbank/document/State_of_the_poor_aper_April17.pdf.

- Thévenot, J. (2014). *Etude en systèmes digestifs artificiels de la survie et de la pathogénicité des Escherichia Coli entérohémorragiques (EHEC). Influence de la matrice alimentaire et de l'administration de souches probiotiques*. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, Clermont-ferrand Retrieved from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01657398/document>.
- Thielemans, M.-F., François, E., Bodart, C., Thewis, A., Dupont, F., Lallemand, L., & Malburny, C. (1978). Mesure du transit gastrointestinal chez le porc à l'aide des radiolanthanides. Comparaison avec le mouton. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, *18*, 237–247.
- Thomas, N., Holm, R., Rades, T., & Müllertz, A. (2012). Characterising lipid lipolysis and its implication in lipid-based formulation development. *The AAPS Journal*, *14*(4), 860–871.
- Tian, Y., Kijlstra, A., van der Veen, R. L. P., Makridaki, M., Murray, I. J., & Berendschot, T. T. J. M. (2015). Lutein supplementation leads to decreased soluble complement membrane attack complex sC5b-9 plasma levels. *Acta Ophthalmologica*, *93*(2), 141–145.
- Torgersen, J. (1946). The Muscular Build and Movements of the Stomach and Duodenal Bulb, Especially with Regard to the Problem of the Segmental Divisions of the Stomach in the Light of Comparative Anatomy and Embryology. *Radiology*, *46*(4), 416–416.
- Trang, H. M., Cole, D. E., Rubin, L. A., Pierratos, A., Siu, S., & Vieth, R. (1998). Evidence that vitamin D3 increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *68*(4), 854–858.
- Tripkovic, L., Lambert, H., Hart, K., Smith, C. P., Bucca, G., Penson, S., ... Lanham-New, S. (2012). Comparison of vitamin D2 and vitamin D3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *95*(6), 1357–1364.
- Tso, P., & Fujimoto, K. (1991). The absorption and transport of lipids by the small intestine. *Brain Research Bulletin*, *27*(3–4), 477–482.
- Tuddenham, S., & Sears, C. L. (2015). The intestinal microbiome and health. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *28*(5), 464–470.
- Tulchinsky, T. H. (2010). Micronutrient Deficiency Conditions: Global Health Issues. *Public Health Reviews*, *32*(1), 243–255.
- Turgeon, S. L., & Rioux, L.-E. (2011). Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. *Food Hydrocolloids*, *25*(8), 1915–1924.
- Tyczkowski, J. K., & Hamilton, P. B. (1986). Evidence for differential absorption of zeacarotene, cryptoxanthin, and lutein in young broiler chickens. *Poultry Science*, *65*(6), 1137–1140.

- Tyssandier, V., Cardinault, N., Caris-Veyrat, C., Amiot, M.-J., Grolier, P., Bouteloup, C., ... Borel, P. (2002). Vegetable-borne lutein, lycopene, and β -carotene compete for incorporation into chylomicrons, with no adverse effect on the medium-term (3-wk) plasma status of carotenoids in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(3), 526–534.
- Tyssandier, V., Reboul, E., Dumas, J.-F., Bouteloup-Demange, C., Armand, M., Marcand, J., ... Borel, P. (2003). Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 284(6), G913–G923.
- Unlu, N. Z., Bohn, T., Clinton, S. K., & Schwartz, S. J. (2005). Carotenoid Absorption from Salad and Salsa by Humans Is Enhanced by the Addition of Avocado or Avocado Oil. *The Journal of Nutrition*, 135(3), 431–436.
- Urbain, P., Singler, F., Ihorst, G., Biesalski, H.-K., & Bertz, H. (2011). Bioavailability of vitamin D₂ from UV-B-irradiated button mushrooms in healthy adults deficient in serum 25-hydroxyvitamin D: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 65(8), 965–971.
- USDA. (2018). Definitions of Food Security Retrieved from <https://www.ers.usda.gov/topics/food-nutrition-assistance/food-security-in-the-us/definitions-of-food-security.aspx>.
- Vachon, C., Gauthier, S., Charbonneau, R., & Savoie, L. (1987). Relationship between in vitro digestion of proteins and in vivo assessment of their nutritional quality. *Reproduction, Nutrition, Développement*, 27(3), 659–672.
- Van Beers, E. H., Büller, H. A., Grand, R. J., Einerhand, A. W. C., & Dekker, J. (1995). Intestinal Brush Border Glycohydrolases: Structure, Function, and Development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(3), 197–262.
- van Bennekum, A., Werder, M., Thuahnai, S. T., Han, C.-H., Duong, P., Williams, D. L., ... Hauser, H. (2005). Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry*, 44(11), 4517–4525.
- Van de Wiele, T. R., Oomen, A. G., Wragg, J., Cave, M., Minekus, M., Hack, A., ... Sips, A. J. A. M. (2007). Comparison of five in vitro digestion models to in vivo experimental results: Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 42(9), 1203–1211.
- Van de Wiele, T., Van den Abbeele, P., Ossieur, W., Possemiers, S., & Marzorati, M. (2015). The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). In K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, ... H. Wichers (Eds.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* (pp. 305–317). Cham: Springer International Publishing.

- Van Der Bilt, A. (2011). Assessment of mastication with implications for oral rehabilitation: a review: mastication and oral rehabilitation. *Journal of Oral Rehabilitation*, 38(10), 754–780.
- van der Schaft, J., Koek, H. L., Dijkstra, E., Verhaar, H. J. J., van der Schouw, Y. T., & Emmelot-Vonk, M. H. (2013). The association between vitamin D and cognition: a systematic review. *Ageing Research Reviews*, 12(4), 1013–1023.
- van het Hof, K. H. (2000). *Carotenoid bioavailability from tomatoes processed in different ways. Comparaison of carotenoid response in triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption of tomato products and in plasma after four days of consumption.*
- van het Hof, K., Tijburg, L., Pietrzik, K., & Weststrate, J. (1999). Influence of feeding different vegetables on plasma levels of carotenoids, folate and vitamin C. Effect of disruption of the vegetable matrix, 3(82), 203–212.
- van Vliet, T., van Schaik, F., Schreurs, W. H., & van den Berg, H. (1996). In vitro measurement of beta-carotene cleavage activity: methodological considerations and the effect of other carotenoids on beta-carotene cleavage. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition*, 66(1), 77–85.
- van Wyk, M., Sommers, D. K., Snyman, J. R., & Moncrieff, J. (1995). The proportional cumulative area under the curve of paracetamol used as an index of gastric emptying in diabetic patients with symptoms of gastroparesis. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 22(9), 637–640.
- Vernay, M., Sponga, M., Salanave, B., Oléko, A., Deschamps, V., Malon, A., & Castetbon, K. (2012). Statut en vitamine D de la population adulte en France : l'Étude nationale nutrition santé (ENNS, 2006-2007). *Institut de Veille Sanitaire*, (16–17).
- Verwei, M., Arkbåge, K., Havenaar, R., van den Berg, H., Witthöft, C., & Schaafsma, G. (2003). Folic acid and 5-methyltetrahydrofolate in fortified milk are bioaccessible as determined in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *The Journal of Nutrition*, 133(7), 2377–2383.
- Verwei, M., Arkbåge, K., Mocking, H., Havenaar, R., & Groten, J. (2004). The binding of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate to folate-binding proteins during gastric passage differs in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *The Journal of Nutrition*, 134(1), 31–37.
- Vesilind, P. A. (1980). The Rosin-Rammler particle size distribution. *Resource Recovery and Conservation*, 5(3), 275–277.
- Veujoz, M., Gaudineau, A., Sananes, N., Fritz, G., & Langer, B. (2013). Folates et grossesse. *Médecine Thérapeutique*, 19(4), 275–284.

- Vieth, R. (1999). Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(5), 842–856.
- Visser, M., Deeg, D. J. H., Lips, P., & Longitudinal Aging Study Amsterdam. (2003). Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia): the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(12), 5766–5772.
- von Castel-Roberts, K. M., Morkbak, A. L., Nexø, E., Edgemon, C. A., Maneval, D. R., Shuster, J. J., ... Bailey, L. B. (2007). Holo-transcobalamin is an indicator of vitamin B-12 absorption in healthy adults with adequate vitamin B-12 status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(4), 1057–1061.
- Vors, C., Pineau, G., Gabert, L., Drai, J., Louche-Pélissier, C., Defoort, C., ... Michalski, M.-C. (2013). Modulating absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal: a randomized crossover clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(1), 23–36.
- Wagner, D., Sidhom, G., Whiting, S. J., Rousseau, D., & Vieth, R. (2008). The bioavailability of vitamin D from fortified cheeses and supplements is equivalent in adults. *The Journal of Nutrition*, 138(7), 1365–1371.
- Wang, J., Wu, P., Liu, M., Liao, Z., Wang, Y., Dong, Z., & Chen, X. D. (2019). An advanced near real dynamic *in vitro* human stomach system to study gastric digestion and emptying of beef stew and cooked rice. *Food & Function*, 10(5), 2914–2925.
- Wang, M.-X., Jiao, J.-H., Li, Z.-Y., Liu, R.-R., Shi, Q., & Ma, L. (2013). Lutein supplementation reduces plasma lipid peroxidation and C-reactive protein in healthy nonsmokers. *Atherosclerosis*, 227(2), 380–385.
- Wang, X., Jiang, C., Zhang, Y., Gong, Y., Chen, X., & Zhang, M. (2014). Role of lutein supplementation in the management of age-related macular degeneration: meta-analysis of randomized controlled trials. *Ophthalmic Research*, 52(4), 198–205.
- Watanabe, F. (2007). Vitamin B12 Sources and Bioavailability. *Experimental Biology and Medicine*, 232(10), 1266–1274.
- Watanabe, F., Abe, K., Fujita, T., Goto, M., Hiemori, M., & Nakano, Y. (1998). Effects of Microwave Heating on the Loss of Vitamin B₁₂ in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 206–210.
- Watanabe, F., Yabuta, Y., Tanioka, Y., & Bito, T. (2013). Biologically active vitamin B12 compounds in foods for preventing deficiency among vegetarians and elderly subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), 6769–6775.
- Wei, M., & Gregory, J. (1998). Organic Acids in Selected Foods Inhibit Intestinal Brush Border Pteroylpolyglutamate Hydrolase *In Vitro*: Potential Mechanism Affecting the

- Bioavailability of Dietary Polyglutamyl Folate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 211–219.
- Weikel, K. A., Garber, C., Baburins, A., & Taylor, A. (2014). Nutritional modulation of cataract. *Nutrition Reviews*, 72(1), 30–47.
- Welch, R. M., & Graham, R. D. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 353–364.
- West, C. E., & Poortvliet, E. J. (1993). *The carotenoid content of food with special referece to developing countries* (p. 211). Arlington (Virginia): International Science and Technology Institute Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.474.1142&rep=rep1&type=pdf>.
- Weurding, R. E., Veldman, A., Veen, W. A. G., van der Aar, P. J., & Verstegen, M. W. A. (2001). In Vitro Starch Digestion Correlates Well with Rate and Extent of Starch Digestion in Broiler Chickens. *The Journal of Nutrition*, 131(9), 2336–2342.
- Whipple, G. H. (1922). The origins and signifiance of the constituents of the bile. *Physiological Reviews*, 2(3), 440–459.
- White, W. S., Peck, K. M., Ulman, E. A., & Erdman, J. W. (1993). The ferret as a model for evaluation of the bioavailabilities of all-trans-beta-carotene and its isomers. *The Journal of Nutrition*, 123(6), 1129–1139.
- WHO. (2013). Optimal blood folate concentrations in women of reproductive age for prevention of neural tube defects Retrieved from https://www.who.int/nutrition/events/2013_WHO_guidelinemeetinggroup_folate_NTD/en/.
- Wickham, M., Faulks, R., & Mills, C. (2009). In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(8), 952–958.
- Widjaja-Adhi, M. A. K., Lobo, G. P., Golczak, M., & Von Lintig, J. (2015). A genetic dissection of intestinal fat-soluble vitamin and carotenoid absorption. *Human Molecular Genetics*, 24(11), 3206–3219.
- Wijayanti, H. B., Bansal, N., & Deeth, H. C. (2014). Stability of Whey Proteins during Thermal Processing: A Review: Thermal stability of whey proteins.... *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1235–1251.
- Williams, J. D., Jacobson, E. L., Kim, H., Kim, M., & Jacobson, M. K. (2012). Folate in skin cancer prevention. *Sub-Cellular Biochemistry*, 56, 181–197.

- Williams, V. J., & Senior, W. (1985). The effects of coprophagy in the adult rat on rate of passage of digesta and on digestibility of food fed ad libitum and in restricted amounts. *The Journal of Nutrition*, *115*(9), 1147–1153.
- Wimalawansa, S. J. (2011). Vitamin D: an essential component for skeletal health. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1240*, E1-12.
- Wiseman, J., Nicol, N. T., & Norton, G. (2000). Relationship between apparent metabolisable (AME) values and *in vivo/in vitro* starch digestibility of wheat for broilers. *World's Poultry Science Journal*, *56*(4), 305–318.
- Wisker, E., Bach Knudsen, K. E., Daniel, M., Feldheim, W., & Eggum, B. O. (1996). Digestibilities of energy, protein, fat and nonstarch polysaccharides in a low fiber diet and diets containing coarse or fine whole meal rye are comparable in rats and humans. *The Journal of Nutrition*, *126*(2), 481–488.
- Woda, A., Mishellany-Dutour, A., Batier, L., François, O., Meunier, J.-P., Reynaud, B., ... Peyron, M.-A. (2010). Development and validation of a mastication simulator. *Journal of Biomechanics*, *43*(9), 1667–1673.
- Wooster, T. J., Day, L., Xu, M., Golding, M., Oiseth, S., Keogh, J., & Clifton, P. (2014). Impact of different biopolymer networks on the digestion of gastric structured emulsions. *Food Hydrocolloids*, *36*, 102–114.
- Wortsman, J., Matsuoka, L. Y., Chen, T. C., Lu, Z., & Holick, M. F. (2000). Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *72*(3), 690–693.
- Wu, Z., Li, X., Hou, C., & Qian, Y. (2010). Solubility of Folic Acid in Water at pH Values between 0 and 7 at Temperatures (298.15, 303.15, and 313.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, *55*(9), 3958–3961.
- Yap, S. C., Choo, Y. M., Hew, N. F., & Goh, S. H. (1997). Distribution of dietary palm carotenes and their metabolites in the rabbit. *Nutrition Research*, *17*(11–12), 1721–1731.
- Yasumaru, F., & Lemos, D. (2014). Species specific *in vitro* protein digestion (pH-stat) for fish: method development and application for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), cobia (*Rachycentron canadum*), and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, *426–427*, 74–84.
- Yonekura, L., & Nagao, A. (2007). Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Molecular Nutrition & Food Research*, *51*(1), 107–115.
- Zasloff, M. (2005). Sunlight, vitamin D, and the innate immune defenses of the human skin. *The Journal of Investigative Dermatology*, *125*(5), xvi–xvii.
- Zhang, S.-L., Chen, T.-S., Ma, C.-Y., Meng, Y.-B., Zhang, Y.-F., Chen, Y.-W., & Zhou, Y.-H. (2016). Effect of vitamin B supplementation on cancer incidence, death due to cancer, and total

mortality: A PRISMA-compliant cumulative meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*, 95(31), e3485.

Zhao, L.-J., Zhou, Y., Bu, F., Travers-Gustafson, D., Ye, A., Xu, X., ... Lappe, J. M. (2012). Factors predicting vitamin D response variation in non-Hispanic white postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(8), 2699–2705.

Ziegler, G. R., & Foegeding, E. A. (1990). The Gelation Of Proteins. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 34, pp. 203–298). Elsevier.

Zittermann, A., Frisch, S., Berthold, H. K., Götting, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., ... Koerfer, R. (2009). Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 89(5), 1321–1327.

Annexes

Annexe 1 : Table des matières du Plan de Maîtrise Sanitaire pour la fabrication des matrices en vue de l'étude clinique MicroNut

Plan de Maîtrise Sanitaire

Objet : Fabrication des matrices en vue de l'étude clinique – Projet MICRONUT

Définitions et abréviations	2
Introduction	3
1. Présentation de l'établissement	3
2. Bonnes Pratiques d'Hygiène	3
2.1 Locaux et matériels	4
2.1.1 Règles générales	4
2.1.2 Nettoyage et désinfection	4
2.2 Personnel	4
2.2.1 Tenue de travail	5
2.2.2 Sur la chaîne de production	5
2.2.3 Formations	5
2.2.4 État de santé	5
2.3 Chaîne de production	6
2.3.1 Réception et Stockage des matières premières	6
2.3.2 Production	6
2.3.3 Expédition	6
2.3.4 Maintenance	7
2.4 Enregistrements	7
3. Mise en place du plan HACCP	8
3.1 Définition de l'HACCP	8
3.2 Contexte du projet	9
3.3 Mise en place de l'HACCP	9
4. Traçabilité	10
4.1 Définition de la traçabilité	10
4.2 Mise en place du système de traçabilité	10
4.2.1 Définition du projet	10

4.2.2 Éléments du système	10
4.2.3 Communication et Formation	11
4.2.4 Évaluation du système de traçabilité	11
4.3 Système de traçabilité	12
4.3.1 Enregistrements	12
4.4 Gestion des rappels et retraits	12
Annexe 1 : Protocole de lavage hygiénique des mains.	13
Annexe 2 : Certificat de formation des opérateurs.	14
Annexe 3 : Méthode HACCP appliquée au Biscuit.	15
Annexe 4 : Fiche de suivi de production – Biscuit.	21
Annexe 5 : Méthode HACCP appliquée à la Génoise.	22
Annexe 6 : Fiche de suivi de production – Génoise.	29
Annexe 7 : Méthode HACCP appliquée au Flan.	30
Annexe 8 : Fiche de suivi de production – Flan.	36
Annexe 9 : Méthode HACCP appliquée à la préparation sèche pour Crème.	37
Annexe 10 : Fiche de suivi de production – Kit de préparation sèche pour Crème.	43
Annexe 11 : Plan de nettoyage et enregistrements.	44
Annexe 12 : Fiches techniques des ingrédients	46
Annexe 13 : Fiches techniques des composés bioactifs	49
Annexe 14 : Fiches techniques des emballages	61
Annexe 15 : Devis pour les analyses microbiologiques des matrices	65
Annexe 16 : Certificat ISO 9001 de la Plateforme Lait	68

Valorisations scientifiques

PUBLICATIONS

PUBLICATION SOUMISE

Hiolle M., Lechevalier V., Flourey J., Boulier-Monthéan N., Prioul C, Dupont D., Nau F., 2020. *In vitro* digestion of complex foods: how the microstructure influences food disintegration and micronutrient bioaccessibility. Food Research International.

PUBLICATIONS EN COURS DE RÉDACTION

Buffière C., Hiolle M., Richard R., Meunier N., Pereira B., Batisse C., Rémond D., Dupont D., Nau F., Peyron M.-A., Savary-Auzeloux I., (in redaction). Food matrix structure (from Biscuit to Custard) has an impact on folate bioavailability in healthy volunteers. Target journal: European Journal on Nutrition

Hiolle M., Ménard O., lechevalier V., Ossemond J., Batisse C., Peyron M.-A., Gleize B., Reboul E., Dupont D., Nau F., (in redaction). Impact of food structure on macronutrient digestion and micronutrient release: *in vitro* study on mastication and digestion simulators configured with *in vivo* data. Target journal: Food Chemistry

Béatrice Gleize, Manon Hiolle, Nathalie Meunier, Bruno Pereira, Ruddy Richard, Isabelle Savary-Auzeloux, Caroline Buffière, Charlotte Halimi, Catherine Caris-Veyrat, Françoise Nau, Emmanuelle Reboul, (in redaction). Food matrix structure controls postprandial blood concentrations of triglycerides and dietary vitamin D, and partly that of lutein, in humans

COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

Nom souligné = orateur

- Bioavailability 2018, Septembre 2018, Norwich, Angleterre.

« Impact of food structure on lipophilic micronutrient bioavailability: a human study ».

Gleize B., Hiolle M., Meunier N., Pereira B., Richard R., Savary-Auzeloux I., Buffière C., Caris-Veyrat C., Nau F., Reboul E.

A major challenge in the next years will consist in producing healthy and sustainable foods with optimized nutritional quality. Whereas the prevalence of overweight and obesity is still increasing in Western countries, micronutrient deficiencies continue to rise in developing countries. In particular, regardless of vitamin D crucial role for health and its major involvement in many biological functions, vitamin D deficiency still affects 50% of the world's population. Similarly, age-related macular degeneration is the first cause of visual handicap over 50 years old, while it was recently confirmed that xanthophyll supplementation decreases the risk of progression of this pathology.

Food fortification to increase micronutrient intakes is a strategy currently used to overcome these (sub)deficiencies. Since the structural characteristics of food influence disintegration process during digestion, it appears relevant to assess the impact of food structure on micronutrients bioavailability.

To address this issue, a clinical trial has been set up, using four model foods enriched in both lutein and vitamin D. These products were designed with identical composition (on dry matter) but with different structures and textures (Custard, Pudding, Sponge cake and Biscuit) obtained by modulating the production process. A multiscale characterization of these products was carried out by confocal microscopy and texture analysis. Twelve healthy male subjects were recruited for this monocentric, controlled and randomized study, in a cross experimental design. After an overnight fast, kinetics of micronutrient responses in plasma were recorded for 8 hours following each product consumption. Vit D and lutein were measured in chylomicrons.

Preliminary results suggest that food structure modulate the kinetics of micronutrient appearance in plasma, opening the way for the concept of « fast vs slow micronutrients ». If this concept is confirmed, further studies using an *in vitro* digestion model will aim to determine which food characteristics can influence micronutrient bioavailability.

- Journées Francophones de Nutrition, Novembre 2018, Nice, France.

« Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments lipophiles : étude in vivo chez l'Homme ».

Gleize B., Hiolle M., Meunier N., Pereira B., Richard R., Savary-Auzeloux I., Buffière C., Caris-Veyrat C., Dupont D., Nau F., Reboul E.

Dans les années à venir, un des défis majeurs auquel sera confrontée l'industrie agroalimentaire consistera à produire des aliments sains et durables tout en optimisant leur qualité nutritionnelle. Alors que la prévalence de la surcharge pondérale et de l'obésité s'accroît, les carences en micronutriments continuent elles aussi d'augmenter. En particulier, et indépendamment du rôle crucial de la vitamine D pour la santé et de son implication majeure dans de nombreuses fonctions biologiques, la carence en cette vitamine touche encore 50 % de la population mondiale. De même, la dégénérescence maculaire liée à l'âge est la première cause de handicap visuel chez les plus de 50 ans, alors qu'il a récemment été confirmé que la supplémentation en composés xanthophylles diminue le risque de progression de cette pathologie.

Afin de pallier ces carences, une des stratégies utilisées actuellement est l'enrichissement des aliments pour augmenter l'apport en micronutriments. Étant donné que les caractéristiques structurelles des aliments influencent le processus de désintégration pendant la digestion, il semble pertinent d'évaluer l'impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments qu'ils contiennent.

Une étude clinique a été réalisée en utilisant quatre aliments modèles enrichis en lutéine et en vitamine D. Ces produits ont été conçus avec une composition strictement identique (sur matière sèche) mais avec des structures et des textures différentes (Crème, Flan, Génoise et Biscuit) obtenues en modulant le processus de production. Une caractérisation multi-échelle de ces produits a été réalisée par microscopie confocale et analyse de texture. Douze sujets mâles en bonne santé ont été recrutés pour cette étude monocentrique, contrôlée et randomisée, selon un plan expérimental croisé. Après un jeûne d'une nuit, l'absorption des micronutriments a été enregistrée par leur dosage dans les chylomicrons du plasma durant les 8 heures suivant la consommation de chaque produit.

Deux paramètres ont été déterminés à partir des cinétiques d'absorption des micronutriments : le temps du pic d'absorption maximale et l'aire totale sous la courbe.


Matrices	Temps du pic d'absorption maximale (min)		Aire sous la courbe (nmol.h/L par mg de micronutriment ingéré)	
	Lutéine	Vitamine D	Lutéine	Vitamine D
Biscuit	250 ± 56 (a)	250 ± 56 (a)	260 ± 172 (a,b)	768 ± 232 (a)
Génoise	210 ± 48 (b)	215 ± 48 (b)	318 ± 226 (a)	891 ± 418 (a,b)
Flan	215 ± 54 (b)	215 ± 48 (b)	191 ± 135 (b)	881 ± 366 (a,b)
Crème	202 ± 40 (b)	207 ± 41 (b)	319 ± 260 (a)	1037 ± 420 (b)

Dans chaque colonne, les matrices associées à une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,05$).


Le Biscuit présente le pic d'absorption le plus tardif pour les deux micronutriments étudiés (250 vs. 202 à 215 min). L'aire sous la courbe, indicative de la biodisponibilité, la plus élevée est quant à elle obtenue avec la Crème à la fois pour la lutéine et la vitamine D, et avec la Génoise pour la lutéine.

Les résultats suggèrent que la structure des aliments module l'apparition des micronutriments dans le plasma, du point de vue cinétique (vitesse d'absorption) et quantitatif (quantité absorbée). Cela pourrait être dû à des différences de désintégration des matrices durant leur digestion. Une étude complémentaire utilisant un modèle de digestion *in vitro* visera à déterminer quelles caractéristiques des aliments peuvent influencer leur désintégration et ainsi la bioaccessibilité des micronutriments.


- Poster de présentation du sujet de thèse lors des portes ouvertes du laboratoire (STLOpen Days, 19-21/03/2019, Rennes)



Manon HIOLLE



Funders :
INRA and Regional Council of Brittany
2016-2019



Vitamins D, B12 and lutein in egg
© Michael W. Davidson - The Florida State University

UMR INRA - Agrocampus Ouest
Dairy and Egg Science and Technology

Research team
Bioactivity and Nutrition

Key words
Bioavailability
Bioaccessibility
Micronutrients
Texture
Structure
In vivo/in vitro digestion

Funders
Région BRETAGNE
INRA SCIENCE & IMPACT

Contributors
CRNH CENTRE DE RECHERCHE EN NUTRITION HUMAINE AUVERGNE
INRA PACA
STLO
AGRO CLASSE
INRA SCIENCE & IMPACT
Qualiment

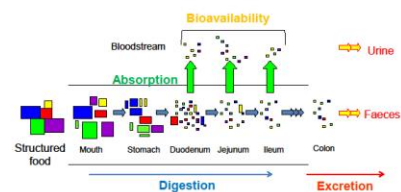
Impact of food structure on micronutrient bioavailability

Social and economic context

- Micronutrients are requested for many biological functions: hematopoiesis and DNA synthesis (vitamins B9), calcium absorption and bone consolidation (vitamin D), antioxidant properties (lutein), etc.
- Foods enriched with micronutrients are an usual vector for increasing micronutrient intakes in the population and thus avoiding deficiencies.

Scientific context

- On the other hand, food texture could have an influence on matrix desintegration and the bioavailability of macro and micronutrients

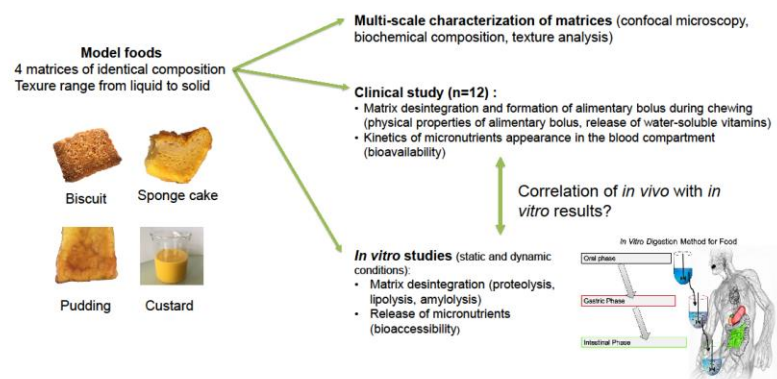


Research question

Which impact of food structure on its desintegration during digestion and on the bioavailability of micronutrients?

Expected results

- To determine the effect of food structure on vitamins B9, B12, D and lutein bioavailability through clinical and *in vitro* studies
- To evaluate the respective impacts of the different steps of digestion on matrix desintegration



Perspectives

- To establish recommendations for optimal structure or texture to be used in nutritional strategies or for the development of fortified foods
- To acquire knowledge on the link between biochemical and nutritional properties of foods

- 6th International Conference on Food Digestion, Avril 2019, Grenade, Espagne.

« Investigating in vitro digestion of food models to explain in vivo micronutrient bioavailability. »

Hiolle M., Gleize B., Meunier N., Pereira B., Richard R., Savary-Auzeloux I., Buffière C., Peyron M.-A., Caris-Veyrat C., Menard O., Boulier-Monthean N., Ossemond J., Dupont D., Nau F., Reboul E.

Introduction

A major challenge in the next years will consist in producing healthy and sustainable foods with optimized nutritional quality. Food fortification to increase micronutrient intakes is a strategy currently used to overcome deficiencies. Since the structural characteristics of food influence disintegration process during digestion, it appears relevant to assess the impact of food structure on micronutrient bioavailability.

Methodology

Four model foods have been developed and enriched in lutein and vitamin D. These products were designed such as their composition was identical but their structures and textures were different. Custard, Pudding, Sponge cake and Biscuit were thus produced by modulating the production process.

A clinical trial has been set up, involving twelve healthy male subjects for a monocentric, controlled and randomized study, in a cross experimental design. After an overnight fast, kinetics of plasma micronutrient levels were recorded for 8 hours following each product consumption. In a second phase, the model foods have been digested using the INFOGEST *in vitro* model. Kinetics of matrix disintegration and micronutrients release have been recorded.

Main findings

The micronutrient absorption curves depended on the matrix. Especially, the Biscuit resulted in a significantly later peak of maximal absorption for both micronutrients, and a lower total bioavailability for vitamin D. *In vitro*, digestion might enable to determine which food characteristics influence matrix disintegration, thereby affecting micronutrient bioaccessibility. Indeed, markers of matrix disintegration, namely proteolysis and lipolysis kinetics, suggested differences amongst the four model foods.

Conclusion

The *in vivo* results highlight that food structure modulates the kinetics of micronutrient appearance in plasma. Correspondences might be established between the kinetics of food matrix disintegration during *in vitro* digestion and the kinetics of micronutrient absorption during the clinical study. Using the DIDGI, a dynamic *in vitro* digestion model, further studies will aim to refine the quality of the model and the results obtained.

Key words

bioavailability, clinical study, human digestion, *in vitro* digestion, micronutrient, food structure

- 6th International Conference on Food Digestion, Avril 2019, Grenade, Espagne.

Food matrix structure (from Biscuit to Custard) impacts on folate bioavailability in healthy volunteers.

Buffière C., Hiolle M., Richard R., Meunier N., Pereira B., Batisse C., Rémond D., Nau F., Peyron M.-A., Savary-Auzeloux I.

Introduction

Because folate deficiency has been associated with an increased risk of development of neural tube defect, depression... folate fortification is recommended for populations at risk (pregnant, frail population), including supplementation within food-matrix. However, this hydrosoluble vitamin is known to interact with food matrix components. This could ultimately impact on bioavailability of folates in plasma.

Objective

The aim of the present work is to measure folate plasma levels of volunteers following ingestion of different matrices (Custard, Pudding, Sponge cake and Biscuit) similar in terms of macronutrients and overall folate content but different in texture and potentially digestibility rate.

Methodology

Twelve healthy young volunteers were offered the matrices according to a randomized, controlled cross over design. Plasma folate concentrations were determined before and up to 8 hours post matrix ingestion. Results for folate overall bioavailability (corrected for ingested folate) correspond to area under the curve (AUC) and expressed in arbitrary units (UA).

Main findings

Folate bioavailability over the entire postprandial period was significantly ($P < 0.05$) superior for Pudding and Sponge cake (4.81 ± 0.23 and 4.62 ± 0.26 AU respectively) compared to Custard (3.81 ± 1.0 AU) whereas Biscuit was intermediary (4.34 ± 0.29 AU). The kinetics of evolution of folate levels in plasma were different between matrices with a maximum folate concentration significantly ($P < 0.05$) delayed for Biscuit (220 min) vs other matrices.

Conclusion

Although macronutrients and folate content were similar between the four matrices tested, overall bioavailability (AUC) and plasma appearance rate of folates were conditioned by food structure. In Custard, overall folate released in plasma was significantly reduced whereas the folate plasma postprandial peak was delayed with Biscuit. An altered and/or delayed dissolution of folates in the alimentary bolus depending on the matrix structure in the mouth then the gut is hypothesized and is currently under investigation.

Key words

Folate, clinical study, food matrix, bioavailability



Food matrix structure (from biscuit to custard) impacts on folate bioavailability in healthy volunteers

* Caroline Buffière¹, *Manon Hiolle², Ruddy Richard³, Nathalie Meunier³, Bruno Pereira⁴, Cindy Batisse⁴, Didier Rémond¹, Françoise Nau⁵, Marie-Agnès Peyron¹, Isabelle Savary-Auzeloux¹

¹UMR, INRA, Clermont-Fd; ²STLO, INRA, Rennes; ³CRNH Auvergne, Clermont-Fd; ⁴Université Clermont Auvergne, Clermont-Fd (France)

* The 2 authors participated equally to the study

Introduction

Because folate deficiency has been associated with an increased risk of development of neural tube defect, depression... folate fortification is recommended for populations at risk (pregnant, frail population), including supplementation within food-matrix. However, folates, when incorporated within a food matrix, can differently interact with food components. This could ultimately impact on bioavailability of folates in plasma. The aim of the present study is to assess, in human volunteers, the impact of folic acid supplementation within 4 different food models characterized by similar composition (ingredients and chemical composition) but 4 various structures (Biscuit, Sponge cake, Pudding, Custard) on plasma folates appearance postprandially.

Material & Methods

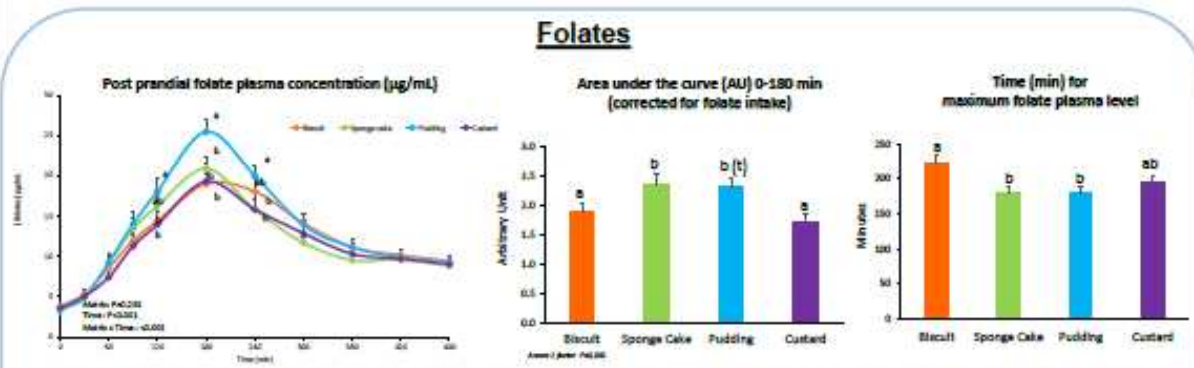
Eleven young adult volunteers (22.5 ± 0.4 years old) were offered the four tested matrix according to a randomized, controlled cross over design. Plasma folate concentrations were determined before and up to 8 hours post matrix ingestion (Simultrac SNB kit, MP Bio). The concentration of other major macronutrients were also determined both in the fasted and the fed states (glucose, insulin, alpha amino nitrogen, triglycerides) to be compared to folate data. Data were presented as means ± SEM. Comparisons between groups determined using 1 or 2 factors repeated measures ANOVA and Holm-Sidak post-hoc analysis. Difference considered significant for P<0.05; tendency (P<0.10)

Folates ingestion (µg)

µg	Mean	SEM
Biscuit	966.8	38.7
Sponge cake	889.3	59.8
Pudding	1096.1	35.4
Custard	1095.9	100.0

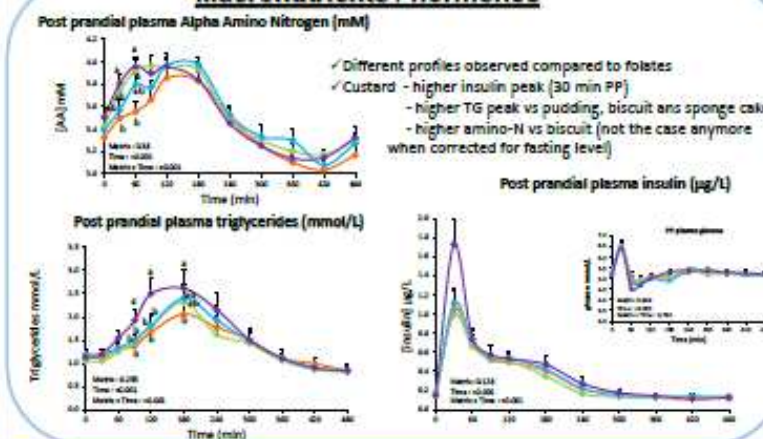
Folates ingestion is not statistically different between matrix ANOVA 1 factor : P=0.04

Folates



- ✓ Plasma folates are more in plasma following pudding ingestion. This is also the case after calculation of the area under the curve and correction for folate ingested in the first 3 hours post matrix ingestion. The AUC calculation also showed that Sponge cake allows a better plasma bioavailability, within the first 3 hours following matrix ingestion.
- ✓ Biscuit and Custard : lowest plasma PP levels; 28.9% difference in AUC 480 min (i.e. total availability) between Custard and Pudding
- ✓ Plasma folate peak delayed with Biscuit

Macronutrients / hormones



- ✓ Different profiles observed compared to folates
- ✓ Custard - higher insulin peak (30 min PP)
 - higher TG peak vs pudding, biscuit and sponge cake
 - higher amino-N vs biscuit (not the case anymore when corrected for fasting level)

Conclusion

- For macronutrients, Custard ingestion (liquid matrix) leads to the highest plasma levels, but it is not true for folates
 - Matrix impacts greatly on overall folates availability : 28.9% difference between Biscuit and Pudding
 - Folates levels in plasma post prandially are the consequence of different digestive/metabolic processes compared to what happens for amino nitrogen, triglycerides or glucose/insulin.
- Custard :
Macronutrients
(glucose, TG, amino N)**

Rapidly available for digestion and absorption at duodenum/jejunum levels

**Pudding and sponge cake :
Folates**

- Specific interaction with diet components ?

- Is custard reaches too rapidly duodenum for an appropriate absorption of folates?

- Specific metabolism of folates / interaction with insulin ?



- Journées Francophones de Nutrition, Novembre 2019, Rennes, France.

Influence de la texture des aliments sur la digestion des macronutriments et la libération de micronutriments : étude *in vitro* sur masticateur et digesteur dynamique paramétrés à partir de données *in vivo*

Manon Hiolle, Olivia Ménard, Jordane Ossemond, Cindy Batisse, Marie-Agnès Peyron, Béatrice Gleize, Emmanuelle Reboul, Didier Dupont, Françoise Nau

Introduction et but de l'étude

Dans les années à venir, un des défis majeurs de l'optimisation nutritionnelle consistera à lutter contre les carences en micronutriments. Une des stratégies couramment utilisée pour cela est l'enrichissement des aliments, mais sa pertinence reste à prouver au regard de son efficacité réelle. Alors que les caractéristiques structurales des aliments influencent le processus de désintégration pendant la digestion, il semble pertinent d'évaluer l'impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments.

Matériel et méthodes

Trois aliments enrichis en lutéine et vitamine D ont été conçus à composition strictement identique (sur matière sèche) mais avec des structures et textures différentes (Crème, Gênoise et Biscuit). Lors d'une étude préliminaire *in vivo* chez l'Homme, les caractéristiques des bols alimentaires produits à partir de ces matrices et leurs cinétiques de digestion avaient été étudiées. Après reproduction des bols alimentaires à l'identique des bols *in vivo* par le simulateur de mastication AM², ceux-ci ont été soumis à une digestion *in vitro* à l'aide du simulateur de digestion dynamique DIDGI (n=3). Les cinétiques de désintégration de la matrice (protéolyse, lipolyse et amylolyse) et la libération des micronutriments dans la phase soluble (marqueur de la bioaccessibilité) ont été suivies. Une Analyse en Composantes Principales a ensuite permis de déterminer les corrélations entre variables.

Résultats et Analyse statistique

Les cinétiques de désintégration de la matrice sont influencées par l'aliment, en particulier en ce qui concerne la destruction du réseau amylicé : elle est ainsi significativement plus faible pour le Biscuit par rapport aux deux autres matrices. En outre, des différences en termes de lipolyse et d'amylolyse ont été observées. Le Biscuit montre ainsi une libération d'acides gras libres et d'oligosaccharides significativement plus faible que les deux autres matrices en phase intestinale de digestion, la Gênoise présentant quant à elle les valeurs les plus élevées. La structure de la matrice ne semble toutefois avoir aucun effet sur la protéolyse.

Les cinétiques de libération des micronutriments sont également distinctes mais les tendances ne sont pas les mêmes selon le micronutriment considéré. En phase gastrique, les différences entre matrices sont peu marquées que ce soit pour la lutéine ou la vitamine D. En revanche, en phase intestinale, la teneur en lutéine bioaccessible est 6 fois plus importante pour le Biscuit que pour la Crème après 240 minutes de digestion. La teneur en vitamine D bioaccessible tend à l'inverse à être moins élevée pour le Biscuit que pour les deux autres matrices en phase intestinale.

Conclusion

Les résultats de digestion *in vitro* dynamique montrent que la structure des aliments module la cinétique de digestion des lipides et de l'amidon, et consécutivement la cinétique de libération des micronutriments.

Titre : Impact de la structure des aliments sur la biodisponibilité des micronutriments

Mots clés : Micronutriment, Biodisponibilité, Bioaccessibilité, Structure des aliments, Étude clinique, Digestion *in vitro*

Résumé : Un tiers de la population mondiale souffrirait d'une carence en micronutriments entraînant des conséquences à court et long terme sur la vie des individus. L'enrichissement des aliments est une des pistes de l'optimisation nutritionnelle visant à lutter contre ces carences, mais les conditions de son efficacité maximale restent à définir au regard de la biodisponibilité réelle de ces micronutriments.

L'impact de la structure des aliments sur la cinétique de digestion des macronutriments a été largement démontré. En revanche, en ce qui concerne les micronutriments, les études ne permettent pas toujours de distinguer les effets composition et structure de la matrice sur leur biodisponibilité. L'objectif principal de cette thèse est d'évaluer l'impact de la seule structure d'aliments réels sur le processus de digestion et la biodisponibilité des micronutriments.

Quatre aliments de même composition mais de structures et textures variables ont été conçus et enrichis en micronutriments (lutéine et vitamines D, B9 et B12). La structure de la matrice alimentaire a effectivement influencé la biodisponibilité de la lutéine et des vitamines D et B9 chez l'Homme, et ce de manière quantitative et cinétique, apportant ainsi une preuve de concept. Les études *in vitro* ont permis de confirmer l'effet structure observé *in vivo* et d'étudier en détail la dégradation de la matrice alimentaire, la libération des micronutriments et donc leur bioaccessibilité. Ce travail souligne l'importance de l'effet matrice dans la digestion des aliments. Il suggère aussi que la compréhension fine des mécanismes de digestion pourrait permettre, à terme, la maîtrise du déroulement de la digestion par un design ciblé des aliments.

Title : Impact of food structure on micronutrient bioavailability

Keywords : Micronutrient, Bioavailability, Bioaccessibility, Food structure, Clinical study, *In vitro* digestion

Abstract: About one third of the world's population suffers from micronutrient deficiencies with short and long-term consequences on individual life. Food fortification is one of the solutions for nutritional optimization to overcome these deficiencies, but the conditions for its maximum effectiveness remain to be defined regarding the actual bioavailability of these micronutrients.

The impact of food structure on the kinetics of macronutrient digestion has been widely documented. However, with regard to micronutrients, studies do not always distinguish the matrix structure effect from the composition effect on their bioavailability. The main objective of this thesis is to evaluate the impact of food structure only on the digestion process and on the bioavailability of micronutrients, using real complex foods.

Four foods with identical composition but different structures and textures have been designed, and enriched with micronutrients (lutein and vitamins D, B9 and B12). The structure of the food matrix had actually an impact on the bioavailability of lutein, and vitamins D and B9 in adult healthy men, in both quantitative and kinetics terms, thus providing proof of concept. The *in vitro* studies confirmed the food structure effect observed *in vivo* and allowed to study in depth the degradation of the food matrix, the release of micronutrients from the matrix, and thus their bioaccessibility.

This work highlights the importance of the matrix effect for food digestion. It also suggests that a deep understanding of the digestion mechanisms could enable, in the future, the control over the digestion process with a targeted food design.