

# THÈSE

PRÉSENTÉE A

## L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par **Leslie COUËDELO**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR**

SPÉCIALITÉ : CHIMIE-PHYSIQUE

---

**Biodisponibilité nutritionnelle de systèmes colloïdaux  
riches en acides gras poly-insaturés :  
Etudes *in vivo* et *in vitro***

---

Directeur de recherche : Maud CANSELL

Soutenue le : 14 novembre 2011

*Devant la commission d'examen formée de :*

**M. Erick DUFOURC**, DR, CNRS, Pessac  
**Mme Marie-Caroline MICHALSKI**, CR, INRA, Lyon  
**M. Frédéric CARRIERE**, DR, CNRS, Marseille  
**Mme. Maud CANSELL**, Pr, IPB, Pessac  
**Mme. Carole VAYSSE**, Responsable Nutrition et Santé, ITERG, Pessac  
**M. Fernando LEAL-CALDERON**, Pr, ENSCBP, Pessac  
**Mme Véronique PALLET**, Pr, IPB, Pessac  
**Mme Nicole COMBE**, Expert nutrition, ITERG, Pessac

*Président*  
*Rapporteur*  
*Rapporteur*  
*Directrice de thèse*  
*Co-Directrice de thèse*  
*Examinateur*  
*Examinateur*  
*Examinateur*



# Avant propos

---

Cette thèse a été effectuée en collaboration entre l'école d'ingénieurs de l'Institut Polytechnique de Bordeaux (IPB) de Pessac (33) sous la direction de Maud CANSELL (IPB/ENSCPB) et le Département de Nutrition Métabolisme et Santé de l'ITERG de Bordeaux sous la direction de Carole VAYSSE. Ce travail a été financé par l'Association Nationale Recherche Technologie et le Conseil Régional de l'Aquitaine. Il a reçu également les soutiens de l'ACTIA et de l'ONIDOL. Ce travail a permis d'émettre les communications suivantes :

- **Publications**

Couëdelo L, Vaysse C, Fonseca L, Montesinos E, Djoukitch S, Combe N, Cansell M (2010). Lymphatic absorption of  $\alpha$ -linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion. *British Journal of Nutrition*. 17 : 1026-1035.

Couëdelo L, Vaysse C, Vaique E, Guy A, Gosse I, Durand T, Pinet S, Cansell M, Combe N (2011). The fraction of  $\alpha$ -linolenic acid present in the *sn*-2 position of structured triacylglycerols decreases in lymph chylomicrons and plasma triacylglycerols during the course of lipid absorption in rats. Acceptée à *The Journal of Nutrition*. NUTRITION/2011/139212.

Couëdelo L, Vaysse C, Fonseca L, Montesinos E, Djoukitch S, Combe N, Cansell M (2011). Lysophospholipids enhance fatty acids release by human intestinal Caco-2 cells. En revision

Vaique E, Guy A, Couëdelo L, Gosse I, Durand T, Cansell M, Pinet S (2010). Rapid access to structured triacylglycerols acylated with n-3 polyunsaturated fatty acids for nutritional applications. *Tetrahedron*. 66: 8872-8879.

- **Communications orales**

Couëdelo L, Vaysse C, Combe N, Cansell M "Effet de l'émulsification sur l'absorption lymphatique de l'ALA chez des rats nourris avec de l'huile de lin", Journées scientifiques du CBMN, 03 décembre 2009, Talence, France.

Couëdelo L, Vaysse C, Combe N, Fonseca L, Djoukitch S, Montesinos E, Cansell M "Effect of the emulsification on lymphatic absorption of alpha linolenic acid in rats fed flaxseed oil". Journées scientifiques LISA, 09 novembre 2009, Marseille, France.

Couëdalo L, Vaysse C, Combe N, Fonseca L, Djoukitch S, Montesinos E, Cansell M "Effect of the emulsification on lymphatic absorption of alpha linolenic acid in rats fed flaxseed oil". EuroFedLipid, 20 octobre 2009, Graz, Autriche.

Couëdalo L, Vaysse C, Combe N, Vaique E, Guy A, Durand T, Pinet S, Cansell M "Comparative Metabolic Fate of  $\alpha$ -linolenic Acid from Structured Lipids in Rats". GERLI 06 octobre 2010, Biarritz, France.

Couëdalo L, Vaysse C, Combe N, Vaique E, Guy A, Durand T, Pinet S, Gosse I, Cansell M "Comparative Metabolic Fate of Alpha-linolenic Acid from Natural Oil (Flaxseed Oil) and Structured Lipids in Rats". EuroFedLipid, 19 septembre 2011, Rotterdam, Pays-Bas.

- **Communications par affiche**

Couëdalo L, Vaysse C, Combe N, Vaique E, Guy A, Durand T, Pinet S, Cansell M "Comparative Metabolic Fate of Alpha-linolenic Acid from Natural Oil and Structured Lipids in Rats", IV Congress of the International Society of Nutrigenetics / Nutrigenomics ISNN- Pamplona-Spain.18 novembre 2010 au 20 novembre 2010.

Vaique E, Guy A, Couëdalo L, Gosse I, Durand T, Cansell M, Pinet S "Synthesis of structured triacylglycerols with n-3 polyunsaturated fatty acids for nutritional applications". GERLI, 06 octobre 2010, Biarritz, France.

Vaique E, Pinet S, Couëdalo L, Vaysse C, Fonseca L, Combe N, Cansell M "Synthesis of Structured Triacylglycerols Rich in Alpha Linolenic Acid for the Study of their Metabolic Fate in Rats". EuroFedLipid, 20 octobre 2009, Graz, Autriche.

## Remerciements

---

Je tiens dans un premier temps à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir consenti à évaluer ce travail de thèse. Erick Dufourc pour avoir accepté la présidence de ce jury.

Mes remerciements se dirigent également vers Marie-Caroline Michalski et Frédéric Carrière pour avoir eu l'amabilité d'être rapporteurs de cette thèse.

Je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance à mes directrices de thèse, Maud Cansell et Carole VAYSSE, pour leur encadrement, leur constante disponibilité et les nombreux échanges scientifiques si formateurs. Merci de m'avoir permis de poursuivre ce travail de thèse dans les meilleures conditions possibles.

Enfin je tiens à remercier chaleureusement Nicole COMBE pour tout ce qu'elle a pu m'apporter tout au long de ce travail, son regard avisé d'expert, ses conseils, son soutien et son aide pour la technique de fistulation du canal lymphatique.

A Laurence, (infirmière !!!), pour tes conseils et ton aide, avec le soutien de tes antiques cahiers de labo ! Heureusement que la bonne humeur et l'entente sont parfois là pour alléger ces journées. Merci pour ton aide ces fameux lendemains de chirurgie, à la recherche d'un rat perdu..

Aux techniciennes, Emeline Montesinos, Sandrine Djoukitch pour votre aide et votre implication dans le labo.

A Florent Joffre, pour son soutien dans la dernière ligne droite ; révision oblige, merci pour ce questionnement scientifique à quelques jours de la soutenance ;)

Je ne voudrais pas oublier Julien Monteil, pour son aide sur les techniques d'un sujet si palpitant qu'est la granulométrie ; merci également à sa voiture où même en cas de coup dur, une bouteille d'azote ne lui résiste pas.

Merci à Sandra Pinet, Emilie Vaique, Thierry Durand et Alexandre Guy pour leur aide si précieuse dans la synthèse des TAG structurés. Merci à Caroline VITRAC et Xavier VITRAC pour leur aide en culture cellulaire.

Laurent Caune, pour ton aide sur les rongeurs.

Sans oublier Franck pour m'avoir soutenu, et surtout merci à mes parents pour cet enseignement de la vie, sans qui je n'aurais pu concrétiser mes projets.

Merci enfin à tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin dans ce projet.  
Ce travail reste essentiellement un aboutissement personnel qui me permet de rester convaincue qu'il faut faire ce en quoi on croit.

# Résumé des travaux de thèse

---

## **TITRE : Biodisponibilité nutritionnelle de systèmes colloïdaux riches en acides gras poly-insaturés : Etudes *in vivo* et *in vitro***

Les derniers apports nutritionnels conseillés recommandent une consommation plus importante en acides gras polyinsaturés de la série n-3 que celle actuellement constatée dans l'alimentation française. Dans ce contexte, il convenait d'appréhender les facteurs susceptibles de moduler l'absorption et le devenir de leur chef de file, l'ALA, en faisant appel à deux approches, l'une *in vivo* (rat), l'autre *in vitro* (Caco-2). L'étude relative au devenir métabolique de l'ALA, selon sa forme physique et chimique de présentation, a été réalisée avec des lipides « modèles » (TAG structurés) ou naturels (huile de lin) riches en ALA, et selon différents systèmes lipidiques (huile en phase continue ou en émulsion de type huile dans eau et de composition en phospholipides variables). Les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro* à l'égard de l'huile de lin (émulsionnée ou non) montrent que l'émulsification accélère non seulement le passage intestinal de l'ALA mais améliore également sa concentration lymphatique. L'étude cellulaire a par ailleurs démontré que la présence de lysophospholipides dans les micelles mixtes permet d'améliorer la sécrétion de l'ALA dans les lipoprotéines. D'autre part, le devenir métabolique de l'ALA dépend de sa régiolocalisation sur le triglycéride alimentaire. En effet, les résultats de l'étude faisant appel aux TAG structurés montrent que la position interne n'est que partiellement conservée dans la lymphe, suggérant qu'une hydrolyse des 2-MAG serait opérée par une MG lipase. En conséquence, l'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude montre que l'absorption et le transport de l'ALA seraient uniquement modulés selon la forme physique de l'acide gras alors que son devenir et son utilisation métabolique dépendraient de sa régiolocalisation sur le TAG alimentaire. Ces deux facteurs réunis permettraient dès lors de prévenir l'ALA d'une  $\beta$ -oxydation précoce, en vue de favoriser son élongation en dérivés supérieurs dans les tissus cibles.

**Mots clés :** acide  $\alpha$ -linolénique, biodisponibilité, métabolisme intestinal, structure glycéridique, émulsion, cellules Caco-2, rat.

## - Sommaire-

- LISTE DES FIGURES - .....	10
- LISTE DES TABLEAUX - .....	12
- GLOSSAIRE - .....	14
- INTRODUCTION - .....	17

### **CHAPITRE I - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES -..... 19**

<b>1. BESOINS NUTRITIONNELS EN LIPIDES.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1. RAPPELS SUR LES ACIDES GRAS POLYINSATURÉS N-3 ET LEURS ROLES PHYSIOLOGIQUES .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2. APPORTS NUTRITIONNELS CONSEILLES ET RECOMMANDATIONS EN ACIDE <math>\alpha</math>-LINOLENIQUE .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3. SOURCES ALIMENTAIRES EN ACIDE <math>\alpha</math>-LINOLENIQUE.....</b>	<b>23</b>
1.3.1. HUILES LINOLENIQUES.....	23
1.3.2. HUILE DE LIN ET AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHE FRANÇAIS .....	24
1.3.3. HUILES COMBINEES ET MARGARINES .....	27
1.3.4. PRODUITS ANIMAUX SOURCES D'ACIDE $\alpha$ -LINOLENIQUE .....	29
<b>2. DIGESTION DES LIPIDES ET METABOLISME INTESTINAL .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1. RAPPEL SUR LA DIGESTION DES LIPIDES .....</b>	<b>32</b>
2.1.1. HYDROLYSE ET MICELLISATION DES LIPIDES ALIMENTAIRES.....	32
2.1.2. ABSORPTION ET METABOLISME DES LIPIDES DANS L'ENTEROCYTE .....	36
<b>2.2. APPROCHES EXPERIMENTALES DU METABOLISME DIGESTIF DES LIPIDES .....</b>	<b>39</b>
2.2.1. APPROCHE <i>IN VIVO</i> .....	40
2.2.2. APPROCHE <i>IN VITRO</i> .....	43
2.2.2.1. <i>Digestion in vitro des lipides.....</i>	43
2.2.2.2. <i>Cellules utilisées pour l'étude du métabolisme des lipides.....</i>	44
2.2.2.3. <i>Métabolisme des acides gras dans les cellules Caco-2.....</i>	46
a. <i>Absorption des acides gras par les cellules Caco-2 .....</i>	46
b. <i>Métabolisme des acides gras par les cellules Caco-2 .....</i>	48
c. <i>Assemblage des lipoprotéines dans les cellules Caco-2 .....</i>	49

<b>3. FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES INFLUENÇANT LA BIODISPONIBILITE DIGESTIVE DE L'ACIDE <math>\alpha</math>-LINOLENIQUE.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1. INFLUENCE DE LA FORME CHIMIQUE DE L'ACIDE <math>\alpha</math>-LINOLENIQUE .....</b>	<b>51</b>
3.1.1. INFLUENCE DE LA NATURE DES LIPIDES INGERES .....	51
3.1.2. INFLUENCE DE LA POSITION DE L'ACIDE $\alpha$ -LINOLENIQUE SUR LE SQUELETTE GLYCEROL : UTILISATION D'HUILES COMBINEES.....	52
<b>3.2. INFLUENCE DE LA FORME PHYSIQUE DE PRESENTATION DE L'ACIDE <math>\alpha</math>-LINOLENIQUE.....</b>	<b>52</b>
<b>4. OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>54</b>

---



---

**- CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES - ..... 58**

---



---

<b>1. MATERIEL .....</b>	<b>58</b>
<b>1.1. MOLECULES LIPIDIQUES .....</b>	<b>58</b>
1.1.1. HUILES VEGETALES .....	58
1.1.2. TRIGLYCERIDES STRUCTURES .....	60
1.1.3. LECITHINES .....	61
1.1.4. AUTRES PRODUITS.....	61
<b>1.2. LES MODELES BIOLOGIQUES .....</b>	<b>62</b>
1.2.1. MODELE CELLULAIRE : LES CELLULES CACO-2 .....	62
1.2.1.1. <i>Composition du milieu de culture</i> .....	62
1.2.1.2. <i>Culture des cellules Caco-2</i> .....	63
a. <i>Ensemencement des cellules</i> .....	63
b. <i>Repiquage des cellules</i> .....	63
1.2.2. MODELE ANIMAL : LE RAT .....	64
<b>2. METHODES .....</b>	<b>65</b>
<b>2.1. CARACTERISATION DES LIPIDES .....</b>	<b>65</b>
2.1.1. EXTRACTION DES LIPIDES TOTAUX SELON LA METHODE DE FOLCH .....	65
2.1.2. SEPARATION DES FRACTIONS LIPIDIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE ET EXTRACTION .....	65
2.1.3. DOSAGE DES PHOSPHOLIPIDES PAR LA METHODE DE AMES.....	67
2.1.4. ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES LIPIDES.....	67
2.1.4.1. <i>Technique de Vigneron</i> .....	67
2.1.4.2. <i>Technique de Lepage et Roy</i> .....	68
2.1.4.3. <i>Technique de Morrison et Smith</i> .....	68

2.1.4.4. <i>Conditions chromatographiques pour l'analyse des EMAG .....</i>	69
2.1.5. ANALYSE DE LA STRUCTURE DES TRIGLYCERIDES.....	69
<b>2.2. PREPARATION ET CARACTERISATION DES SYSTEMES LIPIDIQUES.....</b>	<b>71</b>
2.2.1. PREPARATION DES SYSTEMES LIPIDIQUES.....	71
2.2.1.1. <i>Emulsion de type huile dans eau (o/w) .....</i>	71
2.2.1.2. <i>Micelles mixtes lipides/sels biliaires .....</i>	72
2.2.2. SUIVI DE LA MICELLISATION DES SYSTEMES LIPIDIQUES PAR LES SELS BILIAIRES.....	73
2.2.3. CARACTERISATION PHYSIQUE DES EMULSIONS.....	73
2.2.3.1. <i>Microscopie en contraste de phase .....</i>	74
2.2.3.2. <i>Mesure de taille par diffusion de la lumière .....</i>	74
2.2.4. CARACTERISATION CHIMIQUE DES SYSTEMES LIPIDIQUES.....	75
2.2.4.1. <i>Indice de peroxyde.....</i>	75
2.2.4.2. <i>Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'espace de tête .....</i>	75
2.2.5. ACTIVITE DE LA LIPASE PANCREATIQUE SUR LES SYSTEMES LIPIDIQUES.....	77
<b>2.3. ETUDE IN VITRO DU METABOLISME LIPIDIQUE SUR MODELE CELLULAIRE HUMAIN CACO-2.....</b>	<b>78</b>
2.3.1. CONDITIONS DE CULTURE CELLULAIRE SUR FILTRES TRANSWELL® .....	78
2.3.2. VIABILITE CELLULAIRE.....	79
2.3.3. INTEGRITE DES JONCTIONS CELLULAIRES .....	80
2.3.4. PERMEABILITE MEMBRANAIRE.....	81
2.3.5. DOSAGE DES PROTEINES PAR LA TECHNIQUE DE BRADFORD .....	82
2.3.6. TAUX DE PASSAGE ENTEROCYTAIRE DES LIPIDES PAR LES CELLULES CACO-2.....	82
<b>2.4. ETUDE IN VIVO DU METABOLISME LIPIDIQUE SUR MODELE ANIMAL .....</b>	<b>84</b>
2.4.1. ABSORPTION LYMPHATIQUE.....	84
2.4.2. ABSORPTION PLASMATIQUE.....	85
<b>2.5. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES.....</b>	<b>85</b>
<b>- CHAPITRE III - RESULTATS ET DISCUSSION - .....</b>	<b>87</b>

---

<b>1. EFFET DE LA STRUCTURE DES TRIACYLGLYCEROLS ALIMENTAIRES SUR LE DEVENIR LYMPHATIQUE ET PLASMATIQUE DE L'ACIDE A-LINOLENIQUE .....</b>	<b>87</b>
<b>1.1. INTRODUCTION.....</b>	<b>87</b>
<b>1.2. THE FRACTION OF A-LINOLENIC ACID PRESENT IN THE SN-2 POSITION OF STRUCTURED TRIACYLGLYCEROLS DECREASES IN LYMPH CHYLOMICRONS AND PLASMA TRIACYLGLYCEROLS DURING THE COURSE OF LIPID ABSORPTION IN RATS. L. COUËDELO, C. VAYSSE, E. VAIQUE, A. GUY, I. GOSSE, T. DURAND, S. PINET, M. CANSELL, N. COMBE. ACCEPTEE A JOURNAL OF NUTRITION. DOI : NUTRITION/2011/139212.....</b>	<b>90</b>
<b>1.3. PRINCIPAUX RESULTATS ET DEVELOPPEMENT.....</b>	<b>91</b>
1.3.1. EFFET DE LA REGIO DISTRIBUTION DE L'ACIDE A-LINOLENIQUE SUR SON ABSORPTION ET SON TRANSPORT LYMPHATIQUE .....	91

1.3.2. EFFET DE LA REGIODISTRIBUTION SUR L'ABSORPTION ET LE TRANSPORT PLASMATIQUE DE L' A-LINOLENIQUE	91
1.3.2.1. <i>Rappel sur le devenir métabolique des chylomicrons dans le plasma</i>	91
1.3.2.2. <i>Transport plasmatique de l'acide <math>\alpha</math>-linolénique suite à l'absorption des triacylglycérols structurés</i>	93
<b>1.4. CONCLUSION</b>	<b>94</b>
<b>2. EFFET DE LA COMPOSITION DES MICELLES MIXTES SUR LA SECRETION DES ACIDES GRAS PAR LES CELLULES CACO-2</b>	<b>97</b>
<b>2.1. INTRODUCTION</b>	<b>97</b>
<b>2.2. LYSOPHOSPHOLIPIDS ENHANCE FATTY ACID RELEASE BY HUMAN INTESTINAL CACO-2 CELLS. L. COUËDELO, C. BOUE-VAYSSE, L. FONSECA, E. MONTESINOS, S. DJOUKITCH, N. COMBE, M. CANSELL. EN REVISION</b>	<b>99</b>
<b>2.3. PRINCIPAUX RESULTATS ET DEVELOPPEMENT</b>	<b>98</b>
2.3.1. CYTOTOXICITE DES MICELLES MIXTES	98
2.3.2. INFLUENCE DE LA PRESENCE DE LYSO-PL SUR LA SECRETION DES ACIDES GRAS PAR LES CELLULES CACO-2	98
<b>2.4. CONCLUSION</b>	<b>99</b>
<b>3. EFFET DE L'EMULSIFICATION DE L'HUILE DE LIN SUR LA BIO ACCESSIBILITE DE L'ACIDE <math>\alpha</math>-LINOLENIQUE IN VIVO CHEZ LE RAT</b>	<b>101</b>
<b>3.1. INTRODUCTION</b>	<b>101</b>
<b>3.2. LYMPHATIC ABSORPTION OF <math>\alpha</math>-LINOLENIC ACID IN RATS FED FLAXSEED OIL-BASED EMULSION (2010). L. COUËDELO, C. BOUE-VAYSSE, L. FONSECA, E. MONTESINOS, S. DJOUKITCH, N. COMBE, M. CANSELL. BRITISH JOURNAL OF NUTRITION, 17, 1026-1035</b>	<b>103</b>
<b>3.3. RESULTATS ET DEVELOPPEMENTS</b>	<b>104</b>
3.3.1. OXYDABILITE DE L'HUILE DE LIN EN PHASE CONTINUE ET EN EMULSION	104
3.3.1.1. <i>Rappels sur les phénomènes d'oxydation des lipides</i>	104
3.3.1.2. <i>Oxydation de l'huile de lin</i>	108
3.3.2. ETUDE DES EMULSIONS A BASE D'HUILE DE LIN DANS LES CONDITIONS MIMANT CELLES DU MILIEU GASTRO-INTESTINAL	111
3.3.3. ABSORPTION LYMPHATIQUE DE L'ACIDE A-LINOLENIQUE	114
3.3.3.1. <i>Influence de l'émulsification de l'huile de lin sur l'absorption lymphatique de l'acide <math>\alpha</math>-linolénique</i>	114
3.3.3.2. <i>Influence de la formulation des émulsions sur l'absorption lymphatique de l' <math>\alpha</math>-linolénique</i>	115
<b>3.4. CONCLUSION</b>	<b>116</b>
<b>- CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES -</b>	<b>118</b>
<b>- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -</b>	<b>123</b>

**ANNEXES - ..... 141**

<b>Annexe 1 : Synthèse des TAG structurés : Vaique E, Guy A, Couedelo L, Gosse I, Durand T, Cansell M, Pinet S (2010). Rapid access to structured triacylglycerols acylated with n-3 polyunsaturated fatty acids for nutritional applications. <i>Tetrahedron</i> 66: 8872-8879 .....</b>	<b>141</b>
<b>Annexe 2 : Composition en acides gras (moles %) des TAG et structures glycéridiques (moles % par rapport aux trois positions sur le TAG) des triglycérides synthétisés .....</b>	<b>142</b>
<b>Copyrights .....</b>	<b>143</b>

## - Liste des figures -

<b>Figure 1 : Biosynthèse des acides gras polyinsaturés. Abréviations : Δ: désaturase ; ε: élongase (d'après Simopoulos 1991 ; Nakamura &amp; Nara 2004 ; Arterburn et al. 2006) .....</b>	20
<b>Figure 2 : Autorisation de l'utilisation de l'huile de lin pour la consommation française : évolution de la réglementation (sur le marché français) (Décrets et Saisines, Anses).....</b>	26
<b>Figure 3 : Structure 3D du complexe lipase pancréatique-colipase. A) Lipase pancréatique humaine seule avec le volet contrôlant l'accès au site actif dans sa conformation fermée. B) Complexe lipase pancréatique humaine-procolipase de porc, avec le volet dans sa conformation ouverte et un inhibiteur (C11 alkylphosphonate) (adapté de Winkler et al. 1990 et van Tilbeurgh et al. 1993) .....</b>	34
<b>Figure 4 : Représentation schématique du captage et du devenir intra-entérocytaire des acides gras (AG) à moyenne et longue chaînes (AGMC et AGLC). L'absorption des AG peut se décomposer en quatre étapes: 1°) la phase lumineuse qui a lieu dans la couche d'eau non agitée où les acides gras ionisés (AG) sont progressivement protonés (AGH) ; 2°) le captage cellulaire qui se fait par simple diffusion et diffusion facilitée faisant intervenir différentes protéines : FABPpm, plasma membrane fatty acid-binding protein ; FATP4, fatty acid transport protein 4 ; FAT/CD36, fatty acid transporter ; 3°) le trafic intracellulaire avec la I-FABP, intestinal fatty acid-binding protein, la L-FABP liver fatty acid-binding protein, les ACS, Acyl-CoA synthétases et l'ACBP, l'acyl-CoA-binding protein ; 4°) la synthèse des lipoprotéines (CM, chylomicrons ; VLDL, very low density lipoproteins) qui a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi et fait intervenir la MTP, microsomal triglyceride transfert protein. TAG, triglycérides ; PL, phospholipides ; EC, esters de cholestérol (Petit et al. 2007) .....</b>	36
<b>Figure 5 : Voies de métabolisation entérocytaire des lipides. La voie principale des 2 monoacylglycérols (2-MAG) forme des triacylglycérols (TAG), à partir des 2-MAG et des acides gras libres (FA) après 2 acylations successives par la monoglycéride acyltransferase (MGAT) et la diglycéride acyltransferase (DGAT) dans le réticulum endoplasmique. La voie secondaire de synthèse des TAG passe par l'acide phosphatidique formé à partir d'un lyso-phospholipide (LPA) issu du glycérol 3 phosphate, sous l'action de deux acylations successives par la glycérol phosphate acyltransférase (AGPAT), suivie d'une déphosphorylation par la phosphatidate phosphohydrolase et d'une troisième acylation par la DGAT (Shi &amp; Burn 2004). Le cholestérol libre (CL) est estérifié en esters de cholestérol (EC) par l'acyl-coenzyme A-cholesterol-acyltransférase (ACAT) et s'associent aux chylomicrons.....</b>	38
<b>Figure 6 : Représentation schématique et composition en lipides d'un chylomicron. Composition du cœur des chylomicrons : triacylglycérols (TAG) et esters de cholestérol (EC), molécules hydrophobes entourées de molécules amphiphiles qui composent l'interface : phospholipides (PL), cholestérol (Chol) et protéines (Prot). .</b>	39
<b>Figure 7 : Représentation schématique des triglycérides structurés : ALA (18:3 n-3) strictement en position interne sn-2 (a) et strictement en positions externes (sn-1 ou sn-3) (b).....</b>	60
<b>Figure 8 : Observation microscopique optique (x 40) de cellules Caco-2 à confluence ; la barre d'échelle représente 100 µm, source ATCC .....</b>	64
<b>Figure 9 : Action schématique de l'hydrolyse des TAG par la lipase pancréatique humaine .....</b>	70
<b>Figure 10 : Gammes étalon du propanal (---) et de l'hexanal (---) réalisées dans l'huile de tournesol oléique en émulsion .....</b>	77
<b>Figure 11 : Représentation schématique des compartiments accessibles grâce à la technique de culture cellulaire sur filtre Transwell® .....</b>	79
<b>Figure 12 : Observation de la viabilité cellulaire de cellules Caco-2 sur filtres Transwell® après coloration au MTT .....</b>	80

<b>Figure 13 : Schématisation de la structure et composition d'un chylomicron à la sortie de l'entérocyte et d'un « remnant » de chylomicrons à son arrivée au niveau du foie. TAG : triacylglycérols, PL : phospholipides, EC : esters de cholestérol, CHOL : cholestérol, Prot : protéines.....</b>	92
<b>Figure 14 : Schématisation de l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) dès l'entrée des chylomicrons lymphatiques dans la circulation sanguine. Captage des remnants par les hépatocytes avec le récepteur de l'apo E (LRP). TAG : triacylglycérols, PL : phospholipides, CE : esters de cholestérol, CHOL : cholestérol, Prot : protéines (Vaubourdolle 2007) .....</b>	93
<b>Figure 15 : Représentation schématique du devenir et de la sécrétion (Q) de l'ALA dans les chylomicrons lymphatiques selon sa position sur le squelette glycérol du triglycéride structuré chez le rat (MGL : monoglycéride lipase, SB : sels biliaires, Lyso-PL : lysophospholipides) .....</b>	96
<b>Figure 16 : Représentation schématique de la synthèse (S) et de la sécrétion (Q) de lipides synthétisés dans les cellules Caco-2 suite à l'absorption (A) des produits issus de la lipolyse in vitro de l'huile de lin émulsionnée ou non par la lécithine de soja ou de 17:0-PC .....</b>	100
<b>Figure 17 : Schéma général de l'oxydation lipidique (ITERG, 2005).....</b>	104
<b>Figure 18 : Evolution de la concentration en propanal de l'huile de lin (nmoles de propanal/mL d'huile) stockée à 37°C en fonction du temps .....</b>	109
<b>Figure 19 : Evolution de la concentration en propanal de l'huile de lin (nmoles de propanal/mL d'huile) des mélanges huile de lin/α-tocophérol (0-5-6-7et 9 moles %) stockés à 37°C, en fonction du temps. Insert : Concentration en propanal libéré en fonction de l'ajout de différentes concentrations d'α-tocophérol dans l'huile de lin à 24 heures .....</b>	110
<b>Figure 20 : Evolution de la concentration en propanal (nmoles de propanal/mL d'huile) de l'huile de lin en phase continue (—) ou en émulsion (- - -) stabilisée avec la lécithine de soja 1, stockée à 37°C en fonction du temps</b>	111
<b>Figure 21 : Clichés obtenus en microscopie optique en contraste de phase (X 100) des émulsions d'huile de lin à base de lécithine 1 (a) et de lécithine 2 (b).....</b>	112
<b>Figure 22 : Distribution en volume des diamètres des gouttelettes d'huile dans l'eau des émulsions d'huile de lin à base de lécithine 1 (—) et de lécithine 2 (- - -).....</b>	112
<b>Figure 23 : Clichés obtenus en microscopie optique en contraste de phase (X 100) des émulsions d'huile de lin à base de lécithine 1 (a) et de lécithine 2 (b) à pH 1,5 (3 h) et à pH 7,3 (après une incubation 3 heures à pH 1,5)</b>	113
<b>Figure 24 : Cinétique d'hydrolyse de l'huile de lin en phase continue(♦) par la lipase pancréatique, en émulsion avec la lécithine de soja 1 sans colipase (○), en présence de colipase (◇), et en présence de colipase et d'AGL C-17:0 (□) (mmoles de substrat hydrolysé) .....</b>	114
<b>Figure 25 : Concentrations en ALA dans les lipides totaux de la lymphe (mg ALA/mL lymphe) chez le rat pour deux émulsions à base d'huile de lin et stabilisées par deux types de lécithine de soja et pour l'huile de lin en phase continue.....</b>	115
<b>Figure 26 : Schéma récapitulatif du devenir métabolique de l'ALA issu de l'huile de lin selon la forme administrée (émulsifiée ou non) après hydrolyse et micellisation dans la lumière intestinale, la vitesse d'absorption (v), la resynthèse dans l'entérocyte et la sécrétion (Q) des chylomicrons dans le compartiment lymphatique chez le rat</b>	117

## - Liste des tableaux -

<b>Tableau 1 : Estimations des consommations en lipides totaux et en famille d'acides gras chez l'Homme (par rapport à l'apport énergétique total (AET ; % et g/j). Données issues de l'étude INCA 2 (n=2624 adultes de 18-79 ans) et apports nutritionnels conseillés (ANC 2010) (Anses) sur les apports en acides gras mono-insaturés (AGMI), acides gras saturés (AGS) et acides gras polyinsaturés (AGPI) .....</b>	<b>22</b>
<b>Tableau 2 : Consommation en acide linoléique (18:2 n-6) et en acide α-linolénique (18:3 n-3) (g/j) d'après différentes études comparativement aux ANC 2010 .....</b>	<b>23</b>
<b>Tableau 3 : Compositions (moles % par rapport aux acides gras totaux) en acide α-linolénique (18:3 n-3) et en acide linoléique (18:2 n-6) des huiles végétales linoléniques (adaptée selon sources ITERG, Mattson &amp; Volpenheim 1964) et distribution de l'acide alpha linolénique (18:3 n-3) en position interne (sn-2) des triacylglycérols (adaptée selon source ITERG , Hoyle (1963), Brockerhoff (1999), Ichihara (2003) .....</b>	<b>24</b>
<b>Tableau 4 : Rapport acide linoléique / acide α-linolénique (LA/ALA) de différentes margarines enrichies en acides gras n-3 .....</b>	<b>27</b>
<b>Tableau 5 : Composition nutritionnelle de quelques huiles combinées en vente sur le marché français (source www.laNutrition.fr., 2009).....</b>	<b>28</b>
<b>Tableau 6 : Apport alimentaire en acide α-linolénique (ALA en g) et % d'apport nutritionnel quotidien conseillé (ANC sur la base des ANC 2010) pour une ration journalière en lipides visibles estimée à 20 g .....</b>	<b>29</b>
<b>Tableau 7 : Composition en acide α-linolénique (ALA) des graisses animales, viandes, œufs et produits laitiers (moles % par rapport aux acides gras totaux et pour 100g de produit) (Anses, 2003 ; www.lanutrition.fr ) .....</b>	<b>30</b>
<b>Tableau 8 : Caractéristiques des lipases gastrique et pancréatique intervenant dans l'hydrolyse des TAG alimentaires (selon Carrière et al. 2000).....</b>	<b>33</b>
<b>Tableau 9 : Exemples d'études réalisées pour le suivi de la digestion in vitro de systèmes lipidiques.....</b>	<b>44</b>
<b>Tableau 10 : Types cellulaires Caco-2 utilisés pour les études de l'absorption des lipides.....</b>	<b>46</b>
<b>Tableau 11 : Composition en acides gras (moles %) de l'huile de lin et de tournesol oléique .....</b>	<b>59</b>
<b>Tableau 12 : Teneurs en tocophérols de l'huile de lin (mg/Kg d'huile) .....</b>	<b>60</b>
<b>Tableau 13 : Composition en acides gras majoritaires (moles %) des TAG et structures glycéridiques (moles % par rapport aux trois positions sur le TAG) des triglycérides synthétisés (compositions détaillées, Annexe 2) ...</b>	<b>61</b>
<b>Tableau 14 : Composition en phospholipides individuels des lécithines de soja utilisées .....</b>	<b>61</b>
<b>Tableau 15 : Composition en sels biliaires (poids %) de l'extrait de bile porcine (données fournies par Sigma) ..</b>	<b>62</b>
<b>Tableau 16 : Composition des solvants de migration selon les espèces chimiques à séparer .....</b>	<b>66</b>
<b>Tableau 17 : Temps de méthylation à 100°C selon la fraction lipidique considérée .....</b>	<b>68</b>
<b>Tableau 18 : Estimation de la répartition de l'acide gras entre la position interne (sn-2) et les positions externes (sn-1 et sn-3) des triglycérides .....</b>	<b>71</b>
<b>Tableau 19 : Formulation (poids %) des deux émulsions de l'étude .....</b>	<b>72</b>
<b>Tableau 20 : Conditions physico-chimiques testées sur le comportement des émulsions .....</b>	<b>74</b>

**Tableau 21** : Volumes d'huile ou d'émulsion utilisés pour la détermination des composés volatils dans l'espace de tête ..... 76

**Tableau 22** : Formulation des micelles mixtes testées sur les cellules Caco-2 ..... 83

## - Glossaire -

### **Abréviations**

AA	acide arachidonique
ACS	acyl-CoA synthétase
AET	apport énergétique total
AFSSA	agence française de sécurité sanitaire des aliments
AG	acides gras
AGL	acide gras libre
AGMI	acide gras mono-insaturé
AGPAT	glycérol phosphate acyltransférase
AGPI	acide gras poly-insaturé
AGPI-LC	acides gras poly-insaturés à longues chaînes
AGS	acide gras saturé
ALA	acide $\alpha$ -linolénique
ANC	apports nutritionnels conseillés
ANOVA	analyse de variance
AO	acide oléique
AUC	aire sous la courbe
C	concentration
$C_0$	concentration initiale
Caco-2	cellules d'adénocarcinum de colon humain
CCK	cholécystokinine
CCM	chromatographie sur couche mince
CHOL	cholestérol
Cmax	concentration maximale
CPG	chromatographie en phase gazeuse
CSHPF	conseil supérieur d'hygiène publique de France
DAG	diglycérides
DCF	dichlorofluorescéine
DGAT	diacylglycérol acyltransférase

DHA	acide docosahexaenoïque
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DO	densité optique
DPA	acide docosapentaenoïque
EMAG	ester méthylique d'acide gras
EPA	acide eicosapentaenoïque
FABPs	fatty acid binding protein
I-FABP	intestinal fatty acid binding protein
L-FABP	liver fatty acid binding protein
FATP	fatty acid transport protein
G3P	glycérol-3-phosphate
IDL	intermediate density lipoprotein
INCA	étude individuelle nationale des consommations alimentaires
IP	indice de peroxyde
KCl	chlorure de potassium
LA	acide linoléique
LBP	lipid binding proteins
Lip	lipide
LPL	lipoprotéine lipase
Lyso-PL	lyso- phospholipide
Lyso-PC	lyso- phosphatidylcholine
MAG	monoglycéride
MGAT	monoacylglycérol acyltransférase
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
OMS	organisation mondiale de la santé
Papp	perméabilité apparente
PBS	tampon phosphate salin
PC	phosphatidylcholine
PI	phosphatidylinositol
PL	phospholipides
PLA <sub>2</sub>	phospholipase A <sub>2</sub>

PM	poids moléculaire
PNNS	plan national de nutrition et santé
Q	quantité
RE	réticulum endoplasmique
RMN	résonance magnétique nucléaire
SB	sels biliaires
SBF	sérum foetal bovin
SM	sphingomyéline
SUVIMAX	étude de supplémentation en vitamines et minéraux antioxydants
TAG	triglycéride
TEER	résistance électrique transépithéliale
Tmax	temps maximal d'absorption
VLDL	very low density lipoprotein
Vmax	vitesse maximale d'absorption

### ***Symboles***

A	surface de la membrane cellulaire
a	pente moyenne
C	concentration
g	vitesse
Kj	kilojoules
m	masse
mM	millimolaire
µM	micro molaire
P	prise d'essai
V	volume

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-3 (ou  $\omega$ 3) font l'objet de nombreuses études dans la mesure où ils sont associés à des effets positifs dans la prévention d'un certain nombre de pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, les troubles inflammatoires, certains cancers et plus récemment les maladies neuro-dégénératives. Les études épidémiologiques montrent que, dans les pays industrialisés, la valeur moyenne du rapport des AGPI n-6/n-3 dans l'alimentation est proche de 14, avec une insuffisance des apports en AGPI n-3. C'est pourquoi, en France, une des priorités du Programme National Nutrition Santé (PNNS) est d'accroître les apports alimentaires en AGPI  $\omega$ 3 dont celui en acide  $\alpha$ -linolénique (ALA) afin d'atteindre un ratio en acides gras plus proche des recommandations actuelles (AGPI n-6/n-3 = 5) (ANC 2010).

C'est dans ce contexte complexe qui doit prendre en compte, notamment, les habitudes alimentaires et les recommandations nutritionnelles des organismes publics, que les aliments dits « fonctionnels » se sont développés. Ainsi, on a assisté depuis une dizaine d'années à l'émergence d'aliments enrichis directement ou indirectement en AGPI  $\omega$ 3. Leur élaboration repose, en partie, sur une amélioration de la **biodisponibilité** du nutriment lipidique. Outre la prise en compte, dans le produit élaboré, de sa teneur et de ses propriétés biologiques, cette notion implique que le nutriment soit efficacement digéré et assimilé (**bio accessibilité**) pour avoir, une fois absorbé, un effet attendu positif sur la santé (**bio activité**). Ainsi, la biodisponibilité d'un nutriment implique différents processus intervenant dans les phases de digestion, d'absorption, de distribution aux cellules utilisatrices et, enfin, de métabolisme par ces cellules afin d'obtenir la réponse physiologique escomptée. Les études de biodisponibilité font appel à des approches expérimentales variées, basées sur des études *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro*. Malgré l'intérêt de ces études, il est difficile de tirer des conclusions claires quant aux mécanismes métaboliques mis en jeu, soit parce que les résultats *in vivo* ne sont pas aussi concluants que ceux attendus suite aux expériences *in vitro*, soit parce que les résultats semblent parfois contradictoires d'une étude à l'autre, notamment en ce qui concerne l'ALA.

Ce travail de thèse propose d'étudier la **bio accessibilité de l'ALA**, en termes d'absorption lymphatique et de transport vers le plasma, afin de mieux comprendre les paramètres qui influencent la digestion et l'absorption/assimilation de cet acide gras. Pour ce faire, un modèle animal et un modèle de cellules en culture sont utilisés pour l'approche *in vivo* et *in*

*vitro*, respectivement. Dans un premier temps, la partie introductive présente des études relatives au métabolisme digestif et entérocytaire des lipides en insistant plus particulièrement sur les approches méthodologiques utilisées et sur l'influence de la forme d'apport des triglycérides (TAG) alimentaires sur la digestibilité et l'absorption de l'ALA. Dans un deuxième temps, les méthodes utilisées dans ce travail de thèse sont détaillées au sein de la partie Matériel et méthodes. La troisième partie, Résultats et discussion, s'articule autour de trois chapitres. Le premier chapitre présente les résultats de biodisponibilité de l'ALA aux niveaux lymphatique et plasmatique chez le rat, dans le cadre de l'utilisation de TAG structurés. Le deuxième chapitre s'attache à quantifier l'absorption intestinale de l'ALA en utilisant un modèle cellulaire, les cellules Caco 2. Cette étude permet d'appréhender l'influence de la présence des phospholipides sur la digestibilité des TAG. Le troisième chapitre évalue l'influence de la forme de présentation de l'huile de lin (émulsion ou phase continue) sur l'absorption lymphatique de l'ALA chez le rat.

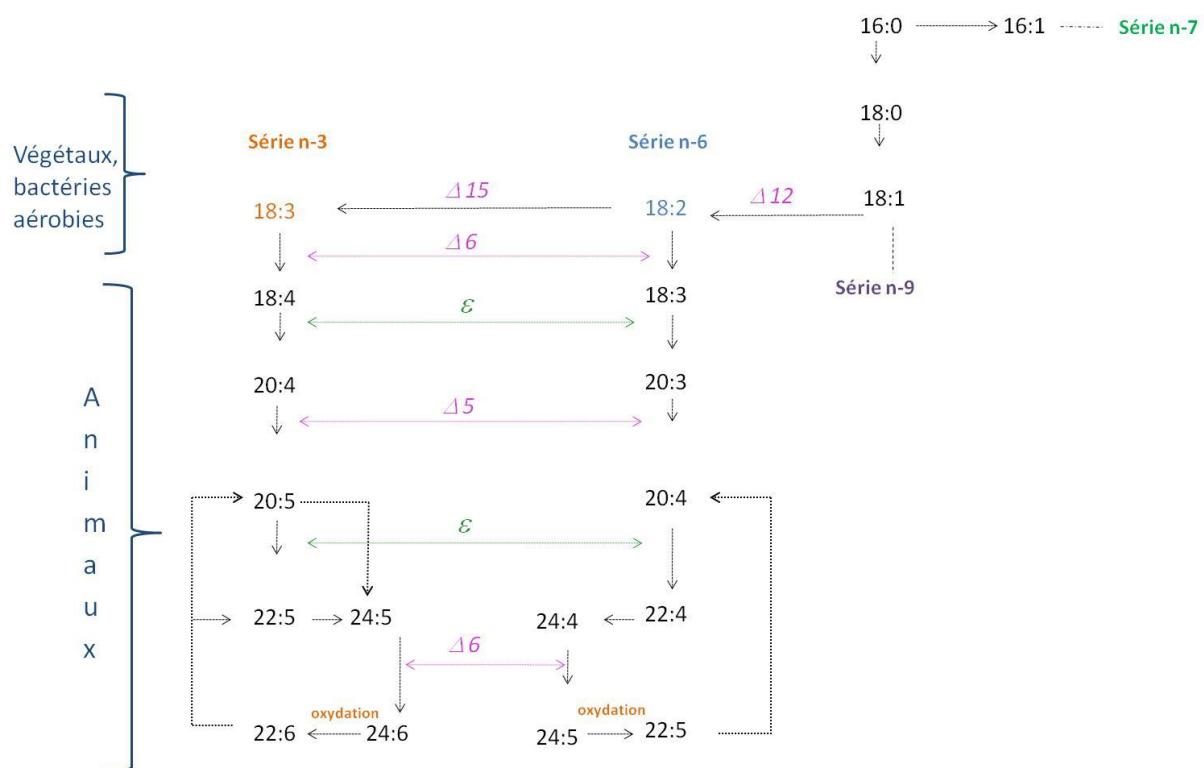
## 1. Besoins nutritionnels en lipides

La fonction principale des lipides consiste à fournir une quantité d'énergie suffisante pour le métabolisme cellulaire. L'oxydation totale des acides gras constitutifs des TAG fournit plus d'énergie (environ 37,6 kJ/g) que l'oxydation des protéines ou des glucides (environ 16,7 kJ/g). Les acides gras sont aussi, les composants de base des phospholipides (PL) membranaires qui jouent un rôle structural et fonctionnel majeur dans les membranes. Les acides gras interviennent également dans les voies de signalisation cellulaire notamment celle des eicosanoïdes. Depuis les années 90, ils sont aussi considérés comme des molécules de signalisation impliquées dans la régulation de la transcription de gènes, notamment des gènes clés du métabolisme lipidique et glucidique (Clarke & Jump 1994).

### 1.1. Rappels sur les acides gras polyinsaturés n-3 et leurs rôles physiologiques

Chez l'Homme, deux familles **d'acides gras polyinsaturés** sont considérées comme importantes de par leurs rôles biologiques : la famille des acides gras de la série n-6 (ou **ω6**) et la famille des acides gras de la série **n-3** (ou **ω3**). Les acides linoléique (LA, 18:2 n-6) et α-linolénique (ALA, 18:3 n-3) sont dits **indispensables**. Ils sont synthétisés dans les tissus végétaux à partir de l'acide oléique grâce à deux désaturases présentes **uniquement dans le règne végétal**, les Δ12- et Δ15-désaturases. Ces enzymes introduisent une double liaison dans la chaîne hydrocarbonée, respectivement, entre les carbones 12 et 13 et les carbones 15 et 16, comptés à partir du groupement carboxyle (Figure 1). Les animaux terrestres ne possèdent pas ces désaturases de sorte qu'ils sont incapables de synthétiser ces deux acides gras. Leur apport chez l'Homme ne peut donc se faire que par le biais de l'alimentation, d'où leur caractère indispensable. D'autres acides gras sont dits **essentiels** de par leurs propriétés structurales et physiologiques déterminantes. Il s'agit des acides eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3), docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) et arachidonique (AA, 20:4 n-6). Le LA est le précurseur de l'AA alors que l'ALA est celui de l'EPA et du DHA via une série d'elongations de la chaîne carbonée de 2 atomes de carbone (à chaque étape) par une élongase, et de désaturations par les Δ5- et Δ6-désaturases (Figure 1). Le degré de conversion de l'ALA en ses dérivés supérieurs à longues chaînes varie de 0,2 à 21% selon l'acide gras dérivé et

l'espèce animale considérés. Ainsi, chez l'Homme, le taux de conversion de l'ALA représenterait 17-21% en EPA et de 1 à 9% pour le DHA (Burdge & Wootton 2002 ; Arterburn et al. 2006 ; Harnack et al 2009). Cette faible conversion est due au fait que l'ALA est rapidement intégré dans la voie de la  $\beta$ -oxydation (Vermunt et al. 2000 ; Burdge et al. 2003). Il est important de noter que ce sont les mêmes enzymes qui participent à la conversion du LA en AA, et de l'ALA en EPA et DHA (Nakamura & Nara 2004) (Figure 1). De ce fait, il existe une compétition entre les voies de synthèse des acides gras des deux séries, qui fait notamment référence au rapport LA/ALA (Rodriguez et al. 1998 ; Nakamura & Nara 2004 ; Brenna et al. 2009). D'autre part, l'affinité de la  $\Delta 6$  désaturase serait plus élevée pour l'ALA (Rodriguez et al. 1998) et ainsi considérée comme une étape limitante de la conversion d'une série par rapport à l'autre (Sprecher 2002). En outre, on peut noter, l'existence d'une rétro conversion du DHA en DPA et EPA (Sprecher 2002) et, celle d'une rétro inhibition de conversion de l'ALA par une supplémentation en EPA ou en DHA (Emken et al. 1999 ; Burdge et al. 2003).



**Figure 1 : Biosynthèse des acides gras polyinsaturés. Abréviations :  $\Delta$  : désaturase ;  $\varepsilon$  : élongase (d'après Simopoulos 1991 ; Nakamura & Nara 2004 ; Arterburn et al. 2006)**

Le caractère indispensable ou essentiel des acides gras provient principalement de l'observation de pathologies ou de symptômes en lien avec des carences induites par un régime inapproprié en acides gras n-3 et/ou n-6, mis en évidence initialement chez l'animal (Burr & Burr 1929 ; Benolken et al. 1973) puis chez l'Homme (Holman et al. 1982). De manière générale, les études épidémiologiques ou d'intervention montrent que les AGPI n-3 jouent un rôle direct en participant à la composition des membranes cellulaires ou en régulant l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des lipides tels que le cholestérol et les triglycérides (Frøyland et al. 1996 ; Jacobson 2008 ; De Lorgeril & Salen 2008) (Tableau 1). Les dérivés de l'ALA, notamment l'EPA, jouent aussi un rôle indirect en entrant dans le métabolisme oxygéné, donnant ainsi naissance à un groupe de substances physiologiquement et pharmacologiquement actives, les eicosanoïdes (prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes) (Mazza et al. 2007 ; Nelson et al. 2007). Ce sont ces molécules qui interviennent dans de nombreux processus physiologiques attribués aux AGPI n-3, notamment la régularisation de la tension artérielle, l'élasticité des vaisseaux, l'agrégation des plaquettes sanguines (Woodman et al. 2003 ; Breslow 2006) ainsi que les réactions immunitaires et inflammatoires (Hwang 2000 ; Murakami et al. 2008). Ces différentes voies d'action font que les AGPI n-3 à longue chaîne participent à la prévention de différentes pathologies, notamment cardiovasculaires, de dysfonctionnements immunitaires et inflammatoires (De Lorgeril et al. 1994 ; Nair et al. 1997 ; Hwang 2000). Plus récemment, leur rôle dans la prévention du déclin cognitif a également été mis en avant (Lauritzen et al. 2001 ; Lukiw & Bazan 2008).

## **1.2. Apports nutritionnels conseillés et recommandations en acide $\alpha$ -linolénique**

Les études réalisées chez l'Homme se partagent entre enquêtes épidémiologiques et études d'intervention. La compilation de ces données est largement répertoriée par l'Agence nationale chargée de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses, ex Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)) qui s'y appuie afin d'établir les apports nutritionnels conseillés (ANC) pour la population française. La plupart des enquêtes nutritionnelles révèle que la consommation en lipides des français est à ce jour conforme aux recommandations puisque elle représente entre 38 et 40% de l'apport énergétique total (AET) comparativement aux 35 à 40% préconisés par l'Anses (ANC 2010)

(Tableau 1). En revanche, la répartition des classes lipidiques (AGPI, acides gras monoinsaturés (AGMI) et acides gras saturés (AGS) est moins bien respectée. En effet, les dernières données épidémiologiques issues de l'étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires INCA 2 (2006-2007) révèlent que la consommation française se caractérise par un trop faible apport en AGMI et une surconsommation des acides gras saturés (Tableau 1).

**Tableau 1 : Estimations des consommations en lipides totaux et en famille d'acides gras chez l'Homme (par rapport à l'apport énergétique total (AET ; % et g/j). Données issues de l'étude INCA 2 (n=2624 adultes de 18-79 ans) et apports nutritionnels conseillés (ANC 2010) (Anses) sur les apports en acides gras mono-insaturés (AGMI), acides gras saturés (AGS) et acides gras polyinsaturés (AGPI)**

		Lipides	AGMI	AGS	AGPI
<b>Consommation actuelle</b>	<b>Homme</b> 10 450 kJ/j	<b>% AET</b> g/j	<b>38,5</b> 105,8	<b>12,9</b> 35,7	<b>15,0</b> 41,2
	<b>Femme</b> 7 754 kJ / j	<b>% AET</b> g/j	<b>39,6</b> 84,6	<b>13,4</b> 28,6	<b>15,0</b> 32,1
<b>ANC 2010</b>	<b>Homme</b> 9 196 kJ / j	<b>% AET</b> g/j	<b>35,0-40,0</b> 85,5-97,8	<b>20,0</b> 49,0	<b>12,0</b> 29,0
	<b>Femme</b> 7 524 kJ / j	<b>% AET</b> g/j	<b>35,0-40,0</b> 70,0-80,0	<b>20,0</b> 40,0	<b>12,0</b> 24,0
					<b>3,0-8,0</b> 13,0
					<b>3,0-8,0</b> 10,5

La consommation française en ALA se situe autour de 1 g/j selon l'étude de SUPplémentation en VItamines et Minéraux AntioXydants (SU.VI.MAX) et 0,6 g/j chez les femmes en Aquitaine selon (Combe & Boué 2001), valeurs qui restent, dans ces deux cas, inférieures aux 2 g/j préconisés (Tableau 2). A l'inverse, on note dans certains pays nordiques un apport moyen en ALA plus proche des valeurs conseillées (1,4 g/j en Suède ; 1,8 g/j en Finlande) (Etude Transfair, Hulshof et al. 1999). Pour mémoire, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) préconise un apport journalier en ALA de 0,8 g à 1,1 g. En revanche, la consommation française en AGPI n-6 est suffisante, voire supérieure à celle qui est préconisée (Tableau 2). L'Anses "recommande" un rapport inférieur à 5 entre le LA et l'ALA. Or, il ressort des nombreuses études de consommation que ce rapport atteint des valeurs supérieures à 10. Le déséquilibre du rapport LA/ALA observé actuellement fait donc

suite à une sous consommation en ALA (Tableau 2). C'est pourquoi, la dernière édition des ANC (2010) souligne la nécessité d'accroître la consommation en ALA. Ainsi, alors que les recommandations de 2001 préconisaient un apport en ALA de 0,8 % de l'AET, celles de 2010 révisent à la hausse la contribution de cet acide gras qui devrait maintenant représenter 1 % de l'AET. En conclusion, selon ces derniers ANC, il faudrait doubler, au minimum, la consommation journalière en ALA.

**Tableau 2 : Consommation en acide linoléique (18:2 n-6) et en acide  $\alpha$ -linolénique (18:3 n-3) (g/j) d'après différentes études comparativement aux ANC 2010**

	SU.VI.MAX	Transfair	INCA 1	Aquitaine	E3N	INCA 2	ANC
Année	1994-1998	1999	1998-1999	2001	2004	2006-2007	2010
Pays	France	Europe	France	France	France	France	
<b>Population</b>	<b>2119</b> hommes <b>2889</b> femmes	<b>300</b> hommes <b>463</b> femmes	<b>1985 adultes</b> <b>1018 enfants</b>	<b>61 femmes</b> <b>parturientes</b> <b>79 femmes</b> <b>non</b> <b>parturientes</b>	<b>66 823</b> femmes <b>françaises</b> <b>adultes</b>	<b>2624 adultes</b> <b>1455 enfants</b>	
<b>18:2 n-6 (g/j)</b>	Homme Femme	10,6 8,1	8,3 6,8	9,8 9	- 13,9	17,6	<b>10,0</b> <b>8,0</b>
<b>18:3 n-3 (g/j)</b>	Homme Femme	0,9 0,7	0,6 0,5	0,8 0,7	- 1,02	1	<b>2,5</b> <b>2,0</b>
<b>18:2/18:3</b>		<b>12</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>4</b>

### 1.3. Sources alimentaires en acide $\alpha$ -linolénique

#### 1.3.1. Huiles linoléniques

Les huiles dites linoléniques sont des huiles dont **la teneur en ALA est supérieure à 5 %**. Parmi elles, on trouve notamment les huiles de lin, d'inca inchi et de périlla qui peuvent renfermer 50% et plus d'ALA (Tableau 3). Outre la teneur en ALA, la position de cet acide gras sur le squelette glycérol (structure glycéridique) est un facteur caractéristique des

propriétés nutritionnelles des huiles. Ainsi, l'ALA est estérifié en proportion équivalente sur les trois positions du TAG dans les huiles de lin, de périlla, de cameline ou de soja, alors qu'il est majoritairement en position interne (*sn*-2) dans les huiles de colza ou de moutarde blanche, par exemple (Tableau 3). On remarque que toutes les huiles possèdent un rapport LA/ALA inférieur à 5 sauf l'huile de soja et de noix.

**Tableau 3 : Compositions (moles % par rapport aux acides gras totaux) en acide  $\alpha$ -linolénique (18:3 n-3) et en acide linoléique (18:2 n-6) des huiles végétales linoléniques (adaptée selon sources ITERG, Mattson & Volpenheim 1964) et distribution de l'acide alpha linolénique (18:3 n-3) en position interne (*sn*-2) des triacylglycérols (adaptée selon source ITERG , Hoyle (1963), Brockerhoff (1999), Ichihara (2003)**

<b>Huile</b>	<b>18:3 n-3</b>		<b>18:2 n-6</b>		<b>LA/ALA</b>
	<b>% total</b>	<b>% sn-2</b>	<b>% total</b>	<b>% sn-2</b>	
<b>Périlla</b>	65	<b>33</b>	13	<b>40</b>	0,2
<b>Inca inchi</b>	48	<b>25</b>	34	<b>46</b>	0,7
<b>Lin</b>	47	<b>28</b>	16	<b>48</b>	0,3
<b>Cameline</b>	27	<b>32</b>	26	<b>56</b>	0,9
<b>Chanvre</b>	18	<b>20</b>	57	<b>38</b>	3,1
<b>Pépins de cassis</b>	13	<b>8</b>	47	<b>53</b>	3,6
<b>Noix</b>	12	<b>24</b>	60	<b>37</b>	5,0
<b>Moutarde blanche</b>	10	<b>74</b>	9	<b>68</b>	0,9
<b>Colza</b>	10	<b>60</b>	20	<b>56</b>	2,0
<b>Soja</b>	7	<b>31</b>	53	<b>44</b>	7,6

### 1.3.2. Huile de lin et autorisation de mise sur le marché français

L'apport en ALA est insuffisant dans l'alimentation française. Il convient donc de faciliter l'accès de cet acide gras aux consommateurs et de trouver des sources riches en 18:3 n-3. Depuis les cinq dernières années, on observe une consommation plus importante de l'huile de colza. L'huile de lin est aussi intéressante en termes : *i*) d'accessibilité, puisque le lin et ses dérivés se cultivent et se commercialisent en France et en Europe ; *ii*) d'apport en ALA (entre

45 et 58% des acides gras totaux selon les huiles de lin considérées) ; *iii)* de rapport LA/ALA ( $R=0,3$ ), qui est un des plus bas des huiles linoléniques (Tableau 3).

Depuis 1973, la consommation de l'huile de lin était proscrite en France. Cette restriction était fondée sur un avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) qui avait considéré (en 1967 puis en 1997) entre autre, que le risque de polymérisation de cette huile (connue pour sa siccavitité) et sa richesse en acide  $\alpha$ -linolénique étaient suffisants pour en interdire l'usage alimentaire. Suite à une réévaluation des données scientifiques disponibles sur la stabilité de l'huile de lin, l'introduction de l'huile de lin a été autorisée, en 2008, en mélange comme complément alimentaire pour l'alimentation humaine courante (avis Anses saisines 2004-SA-0213 et 2004-SA-0409), puis le dernier arrêté de juillet 2010, autorise la consommation de l'huile de lin vierge pure (décret NOR : ECEC0911344A du J.O. du 21 juillet 2010) (Figure 2).

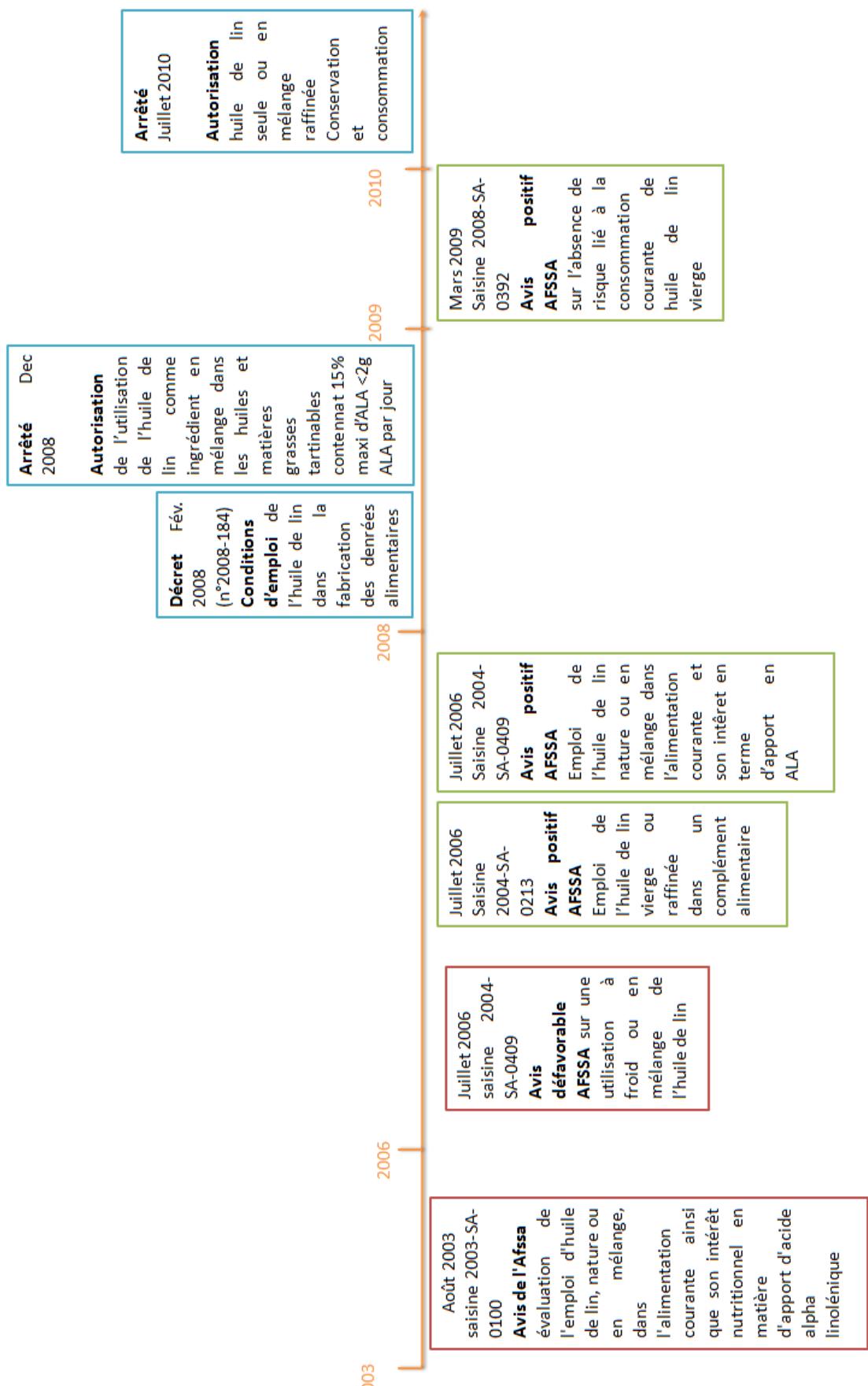


Figure 2 : Autorisation de l'utilisation de l'huile de lin pour la consommation française : évolution de la réglementation (sur le marché français) (Décrets et Saisines, Anses)

### 1.3.3. Huiles combinées et margarines

Afin d'augmenter les apports en AGPI n-3 dans l'alimentation, une stratégie consiste à enrichir des produits alimentaires de consommation courante. Ainsi, depuis quelques années, des mélanges d'huiles (huiles combinées) ou des margarines enrichies ont été mis sur le marché. Le Tableau 4 présente le rapport LA/ALA de quelques margarines enrichies en ALA. Leurs rapports en LA/ALA sont satisfaisants vis-à-vis des ANC. Même si les margarines enrichies en acides gras n-3 peuvent être jusqu'à 400 fois plus riches (4%) en ALA qu'une margarine à base de tournesol (0,01%), leurs teneurs ALA restent inférieures à celle des huiles linoléniques (Tableau 3).

**Tableau 4 : Rapport acide linoléique / acide  $\alpha$ -linolénique (LA/ALA) de différentes margarines enrichies en acides gras n-3**

Margarines enrichies	Rapport LA/ALA
<b>St Hubert oméga 3 doux</b>	4,0
<b>St Hubert 41</b>	2,6
<b>St Hubert oméga 3 huile d'olive</b>	2,7
<b>Primevère double effet cuisson</b>	3,9
<b>Primevère double effet tartine</b>	3,8
<b>Fruit d'or oméga 3 tartine cuisson</b>	4,5

Parallèlement, le marché des huiles combinées s'est largement développé (Tableau 5). L'utilisation d'huiles combinées permet, entre autre, d'avoir au sein d'un même produit, un échantillon des acides gras présents dans différentes huiles. Au niveau du consommateur, cela lui facilite son acte d'achat et limite le nombre de bouteilles à stoker. Ceci est particulièrement important dans le cas des huiles linoléniques sensibles à l'oxydation.

**Tableau 5 : Composition nutritionnelle de quelques huiles combinées en vente sur le marché français (source [www.laNutrition.fr](http://www.laNutrition.fr)., 2009)**

	Composition	Ratio n-6/n-3
<b>Lesieur Epi d'or céréales et fruits cuisson et assaisonnement</b>	germe de maïs, germe de blé , noix, pépins de raisin	46,5
<b>Intermarché bouton d'or Equalio</b>	tournesol, tournesol oléique, colza pépin de raisin	38
<b>Emile Noël Huile vierge Equihuile biologique</b>	tournesol 43%, sésame 22%, cartame 21%, pépin de courge 9%, germe de blé 5%	32
<b>Monoprix bien vivre huile 4 graines</b>	tournesol 55%, tournesol à haute teneur en acide oléique 25%, colza 15%, pépin de raisin 5%	32
<b>U 4 huiles végétales</b>	tournesol, tournesol à haute teneur en acide oléique, colza, pépin de raisin	28,6
<b>Intermarché Bouton d'or oméga-6 et 3</b>	oléine de palme, olive vierge extra 20%, tournesol oléique, colza tournesol, poisson	11,6
<b>Monoprix bio mélange 4 huiles vierges</b>	colza vierge 55%, olive vierge 20%, tournesol vierge 20%, carthame vierge 5%	5,2
<b>Lesieur Isio4 Olive</b>	olive, colza, tournesol, pépin de raisin	4,8
<b>Bio Planète Huile pour salade et crudités</b>	colza, carthame, olive	4,6
<b>Emile Noël Huile vierge colza-olive biologique</b>	colza 60%, olive 40%	3,1 à 4
<b>Emile Noël Huile oméga Saveur</b>	colza 60%, olive 30%, noix 10%	3,4
<b>Emile Noël Huile vierge Oméga mémo</b>	colza 59%, tournesol oléique désodorisé 28%, cameline 6%, chanvre 4%, noix 3%	2,7
<b>Emile Noël Huile vierge oméga 3 biologique</b>	colza 50%, sésame 25%, olive 15%, noix 5%, chanvre 5%	2,7
<b>Lesieur Isio Mémo</b>	colza, oléisol, noisette, huile de poisson riche en DHA	2,5
<b>Huilerie Vigean Biocolive</b>	colza 60%, olive 40%	2,4

En conclusion, si on considère une consommation « normale » de lipides « visibles » (assaisonnement et/ou cuisson), l'apport en ALA d'une margarine enrichie en acides gras oméga 3 ou d'une huile combinée reste malgré tout très inférieur à celui d'une huile linolénique (Tableau 6).

**Tableau 6 : Apport alimentaire en acide  $\alpha$ -linolénique (ALA en g) et % d'apport nutritionnel quotidien conseillé (ANC sur la base des ANC 2010) pour une ration journalière en lipides visibles estimée à 20 g**

Aliments	Apport alimentaire en ALA (g) pour 20 g de produit consommés (environ 2 cuillères à soupe)	% ANC 2010 recouvrés pour un apport de 20 g de produit
<b>Huile de lin</b>	9,4	470
<b>Huile de noix</b>	2,4	120
<b>Huile de colza</b>	2,0	100
<b>Margarine enrichie en acides gras n-3</b>	0,8	40
<b>Huile Isio 4</b>	0,4	20

#### 1.3.4. Produits animaux sources d'acide $\alpha$ -linolénique

Les études de consommation montrent que 40% de l'ALA ingéré sont issus de produits animaux (Tableau 7). Ces chiffres sont atteints grâce à la consommation importante de produits laitiers (46%), notamment, et de viande (27%) (Combe & Boué 2001).

**Tableau 7 : Composition en acide  $\alpha$ -linolénique (ALA) des graisses animales, viandes, œufs et produits laitiers (moles % par rapport aux acides gras totaux et pour 100g de produit) (Anses, 2003 ; [www.lanutrition.fr](http://www.lanutrition.fr) )**

Proportion en acide $\alpha$ - linolénique		
	moles % des acides gras totaux	g / 100 g de produit
<b>GRAISSES</b>		
Suif de bœuf	2,0	2,00
Saindoux	1,0	1,00
Matière grasse laitière	1,0	0,80
Suif de mouton	0,2	0,20
<b>VIANDES ET OEUFS</b>		
Cheval	16	0,10 à 0,80
Agneau	2,5	0,10
Porc	3,6	0,07
Bœuf	1,7	0,04
Poulet	1-2	0,03 à 0,2
Lapin	2,5	0,02 à 0,2
Œuf	1,7	0,04
Jaune d'œuf	6,7	0,10
<b>PRODUITS LAITIERS</b>		
Lait de brebis	4,8	0,13
Lait de chèvre	1,4	0,04
Lait de vache entier	0,5	0,02

Parallèlement à la stratégie d'enrichissement des aliments, envisagée pour accroître la consommation en AGPI n-3, une autre approche a été développée qui consiste à augmenter la teneur en acides gras n-3 de produits animaux destinés à l'alimentation humaine *via* un enrichissement en ALA de la nourriture des animaux. Chez les **espèces monogastriques** (volaille, porc), le profil des lipides de carcasse est un bon reflet des lipides alimentaires. Ainsi, chez le porc recevant une alimentation enrichie en huile de colza, graines de lin ou farine de poissons, le taux d'acides gras n-3 peut être augmenté d'un facteur 2 à 6 (Van

Elswyk et al. 1998 ; Bourre 2005). Dans les meilleures conditions, en nourrissant les volailles avec des extraits de graines de lin ou de colza, la teneur en ALA peut être multipliée par 10 (Van Elswyk et al. 1998 ; Combe & Boué 2001 ; Combe & Fenart 2004 ; Bourre 2004, Bourre 2005). Chez les poulets, l'effet d'un enrichissement de l'alimentation en ALA se répercute également au niveau des œufs avec une teneur en ALA qui peut augmenter d'un facteur 40 (Simopoulos & Salem 1989 ; Bourre 2004, Bourre 2005). En revanche, chez **les animaux polygastriques** (bovins, ovins, caprin), le transfert des acides gras polyinsaturés alimentaires vers les tissus est faible en raison de l'hydrogénéation qu'ils subissent par les bactéries du rumen. Ainsi, en nourrissant des boeufs avec des extraits de graines de lin ou de colza, la teneur en ALA est, dans les meilleures conditions, multipliée par 2 environ dans les tissus musculaires (Bourre 2004). Dans le lait de vache, le taux en ALA n'est accru que de 0,6% et donc cette démarche se révèle moins intéressante chez les ruminants que chez les animaux monogastriques (Uauy & Valenzuela 2000 ; Chillard et al. 2001 ; Bourre 2003). Certaines stratégies telles que l'encapsulation des lipides (Fotouhi & Jenkins 1992 ; Chillard et al. 2001), qui consiste à protéger l'ALA de la biohydrogénéation, permettent néanmoins d'accroître le taux d'ALA dans les tissus et le lait issus d'animaux nourris avec ces sources d'acides gras n-3.

En conclusion, les recommandations visant à augmenter les apports nutritionnels en AGPI n-3 et plus particulièrement en ALA sont reprises dans le Programme National de Nutrition et Santé (PNNS-2001 et 2006) qui a pour but de normaliser, entre autres, la consommation des lipides afin d'être en conformité avec les valeurs préconisées par les ANC. Dans ce contexte, il convient de multiplier les sources alimentaires d'AGPI n-3 pour faciliter l'accès de ces nutriments aux consommateurs.

## **2. Digestion des lipides et métabolisme intestinal**

Après un bref rappel des processus de digestion des lipides et de leur métabolisme dans l'entérocyte, nous discuterons des différents modèles susceptibles d'être utilisés pour la compréhension du métabolisme lipidique chez l'Homme.

## 2.1. Rappel sur la digestion des lipides

### 2.1.1. Hydrolyse et micellisation des lipides alimentaires

La digestion consiste en des **réactions d'hydrolyse** qui vont transformer les lipides non absorbables en l'état (TAG, phospholipides, esters de cholestérol), en molécules plus petites, assimilables par la barrière intestinale.

L'hydrolyse des TAG commence dans l'estomac et se poursuit au niveau de l'intestin grêle. La digestion des TAG fait intervenir une **lipase préduodénale**, uniquement d'origine gastrique chez l'homme (Moreau et al. 1988a). En fonction des espèces, cette lipase peut être également d'origine linguale et synthétisée au niveau des glandes séreuses de la langue (rat, souris) ou pharyngiale chez les jeunes ruminants (veau, agneau, cabri) (Moreau et al. 1988b ; De Nigris et al. 1988). La **lipase gastrique humaine** (triacylglycérol acylhydrolase EC 3.1.1.3.) est stéréospécifique de la position *sn*-3 des TAG (Rogalska et al. 1990), elle agit à pH acide dans l'estomac (Carrière et al. 1991 ; Embleton & Pouton 1997 ; Chahinian et al. 2006) où elle hydrolyse partiellement les TAG alimentaires en DAG et AGL (Hamosh 1990 ; Carrière et al. 1993). Le pH optimum d'action de cette enzyme se situe entre 4 et 6 ; son activité ne nécessite pas la présence de cofacteur (Tableau 8). Elle intervient dans l'hydrolyse de 10 à 30% des TAG alimentaires (Hamosh et al. 1985 ; Abrams et al. 1987). La lipase gastrique humaine reste active au niveau duodénal où elle pourrait encore contribuer à 17% de la lipolyse des TAG (Carrière et al. 1993). Globalement, on considère aujourd'hui que la lipase gastrique intervient pour un quart dans la conversion des TAG alimentaires en 2-MAG et AGL. Les particularités de la lipase gastrique sont non seulement sa stabilité et son activité à pH acide, mais aussi l'absence d'inhibition par les sels biliaires contrairement à la plupart des autres lipases (Lengsfeld et al. 2004). La lipase gastrique est une enzyme interfaciale et son adsorption à l'interface huile/eau est favorisée à pH acide, ce qui explique son activité optimale apparente au bas pH (Chahinian et al. 2006). On peut noter que son activité est peu sensible à la présence de PL (Embleton & Pouton 1997). Elle peut notamment hydrolyser directement les TAG du lait ou de l'Intralipide, contrairement à la lipase pancréatique seule (Gargouri et al. 1986). Au-delà de sa stéréospécificité pour la position *sn*-3, la lipase gastrique peut hydrolyser *in vitro* les 3 liaisons esters des TAG, contrairement à la lipase pancréatique qui est régiosélective pour les positions *sn*-1 et *sn*-3 (Carrière et al. 1991). On lui a longtemps attribué une spécificité pour les TAG constitués d'AG à chaîne courte et

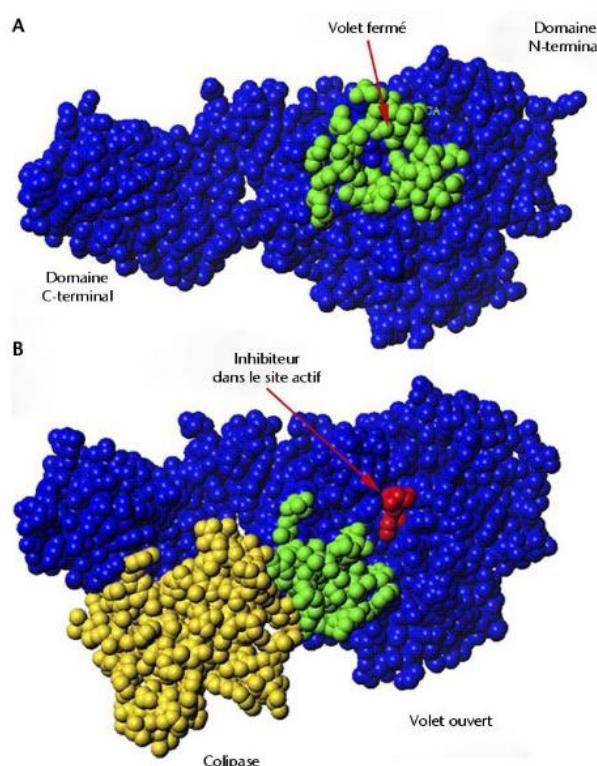
moyenne, mais cela résultait principalement du fait que ces AGL sont trouvés en position *sn*-3 des TAG du lait. Il a été montré par la suite qu'elle possède des activités du même ordre de grandeur sur des TAG à chaînes longues, moyennes et courtes (Gargouri et al. 1986). D'autre part, son activité sur les TAG d'un repas peut être comparable à celle de la lipase pancréatique (Carrière et al. 2000). Elle joue un rôle important chez le nouveau-né quand l'activité de la lipase pancréatique est encore faible.

**Tableau 8 : Caractéristiques des lipases gastrique et pancréatique intervenant dans l'hydrolyse des TAG alimentaires (selon Carrière et al. 2000)**

	Lipase gastrique	Lipase pancréatique
<b>pH optimum</b>	Acide (4-6)	Neutre (6,5-7,5), en présence de sels biliaires et de colipase
<b>Substrats hydrolysés</b>	TAG et DAG, très faiblement les MAG	TAG et DAG
<b>Efficacité d'hydrolyse des TAG</b>	10-30 %	70-90 %
<b>Cofacteur</b>	Non	Colipase
<b>Spécificité</b>	Hydrolyse toutes les positions du glycérol, avec une stéréopréférence pour la position <i>sn</i> -3	Régiosélective pour les positions <i>sn</i> -1 et <i>sn</i> -3
<b>Quantité d'enzyme produite au cours d'un repas</b>		
<i>repas liquide</i>	21,6	253,5
<i>repas solide</i>	15,2	202,9
<b>Inhibition</b>	Trypsine ( <i>in vitro</i> )	pH acide (<4) (inactivation) Sels biliaires (seulement en absence de colipase) Phospholipides

Dans l'estomac, les TAG résiduels, les diacylglycérols (DAG) et acides gras libres (AGL) issus de l'hydrolyse par la lipase gastrique sont brassés avec le jus gastrique pour former une

émulsion grossière qui est évacuée vers le duodénum (Armand 1998). C'est au niveau de cette première partie de l'intestin grêle que le chyme alimentaire s'enrichit en sels biliaires, PL, cholestérol et enzymes lipolytiques par la sécrétion pancréatique. Cet enrichissement participe à la création d'une interface lipides/eau nécessaire à l'adsorption de la **lipase pancréatique**, ainsi qu'à la solubilisation des produits d'hydrolyse des lipides dans des micelles mixtes (Wickham et al. 1998). L'efficacité de la lipolyse dépend de la présence de sels biliaires à l'interface lipides/eau. Ainsi, l'hydrolyse des TAG par la lipase pancréatique est 2 à 4 fois moins efficace en absence de sels biliaires (Borgström 1975 ; Fickers et al. 2008). De plus, l'hydrolyse des TAG nécessite l'intervention de la **colipase**. Il s'agit d'une protéine qui permet l'adsorption de la lipase pancréatique à l'interface lipides/eau où cette dernière est activée. Cette fixation s'accompagne d'une ouverture du site catalytique de l'enzyme aux TAG (Figure 3).

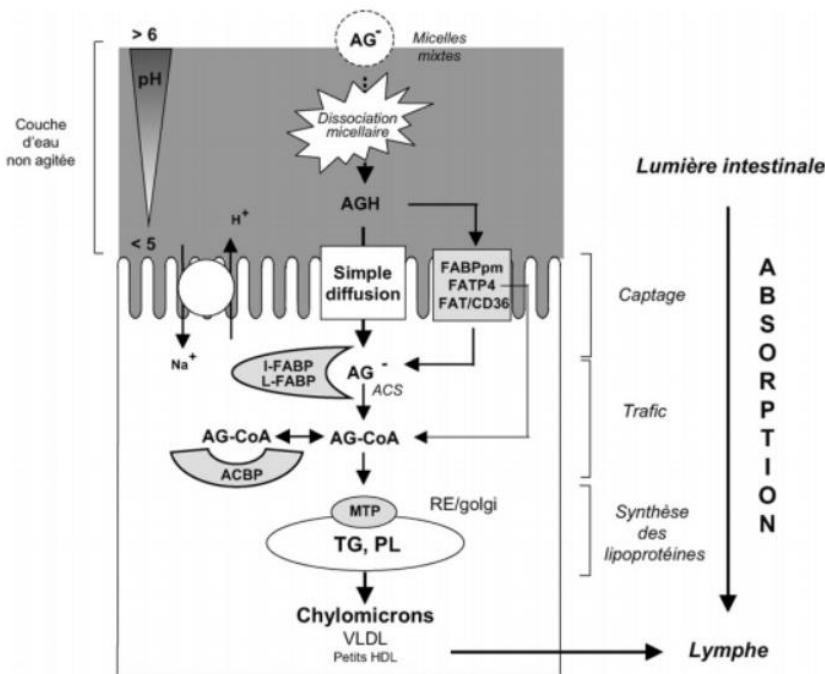


**Figure 3 : Structure 3D du complexe lipase pancréatique-colipase.** A) Lipase pancréatique humaine seule avec le volet contrôlant l'accès au site actif dans sa conformation fermée. B) Complexe lipase pancréatique humaine-procolipase de porc, avec le volet dans sa conformation ouverte et un inhibiteur (C11 alkylphosphonate) (adapté de Winkler et al. 1990 et van Tilbeurgh et al. 1993)

La lipase pancréatique agit aussi bien sur les TAG que sur les DAG libérés par la lipase gastrique. Elle fonctionne à des pH compris entre 6,5 et 9 (Embleton & Pouton 1997). Les

produits de la lipolyse, suite à son action, sont des AGL et des 2-monoacylglycérols (2-MAG) (Desnuelle 1961). *In vitro*, les AGL sont captés par les sels calciques  $\text{Ca}^{2+}$  les maintenant loin du site catalytique de l'enzyme de manière à réduire la rétro-inhibition de l'enzyme par les produits de la réaction (Fatouros & Mullertz 2008). La lipase pancréatique présente une régiosélectivité pour les positions externes de la molécule de glycérol (*sn*-1 et *sn*-3). Toutefois, la lipase pancréatique présente une faible activité vis-à-vis de TAG comportant des AGPI avec un nombre de doubles liaisons *cis* supérieur à 5 du fait de l'encombrement stérique engendré par la présence de ces doubles liaisons (Ikeda et al. 1995). La lipase pancréatique est inhibée en présence de sels biliaires et de phospholipides (Borgström & Erlanson 1973 ; Embleton & Pouton 1997). Les PL d'origine alimentaire et hépatique, essentiellement représentés par la phosphatidylcholine (PC) sont hydrolysés par l'action de la **phospholipase A<sub>2</sub>** (PLA<sub>2</sub>) pancréatique. Cette enzyme attaque la liaison ester en position *sn*-2, libérant ainsi un AGL et un lysophospholipide (Lyso-PL) (Hanahan 1997 ; Wilton 2008).

L'absorption des produits d'hydrolyse des TAG alimentaires et des PL des deux origines, à savoir, AGL, 2-MAG et Lyso-PL ainsi que cholestérol libres sont pris en charge dans des micelles mixtes/sels biliaires. Ce processus permet la solubilisation des produits d'hydrolyse, étape indispensable à leur absorption par le jéjunum (Hofman 1976). En effet, les micelles mixtes permettent d'accroître la quantité de lipides présents au niveau de la bordure en brosse des entérocytes, en formant des agrégats macromoléculaires comparativement à la faible quantité de monomères (acides gras) et de mono/diglycérides capables de se dissoudre dans l'eau. Les produits de lipolyse (AGL protonés, 2-MAG) et les sels biliaires sont adsorbés au niveau de la couche d'eau non agitée présente du côté apical des entérocytes de la bordure en brosse. Il s'agit d'un micro environnement qui présente un gradient de pH (Shiau et al. 1985a) généré par les pompes à protons de la membrane (Figure 4). Ce gradient permet de protoner la part des acides gras qui au pH intestinal sont sous forme  $\text{COO}^-$ . Cette solubilisation micellaire varie selon plusieurs facteurs, notamment la nature de l'acide gras. Ainsi, pour un AG saturé, plus la chaîne hydrocarbonée est longue, plus son coefficient de solubilisation dans les micelles mixtes est faible (Mattson et al. 1979 ; Small 1991 ; Bracco 1994).



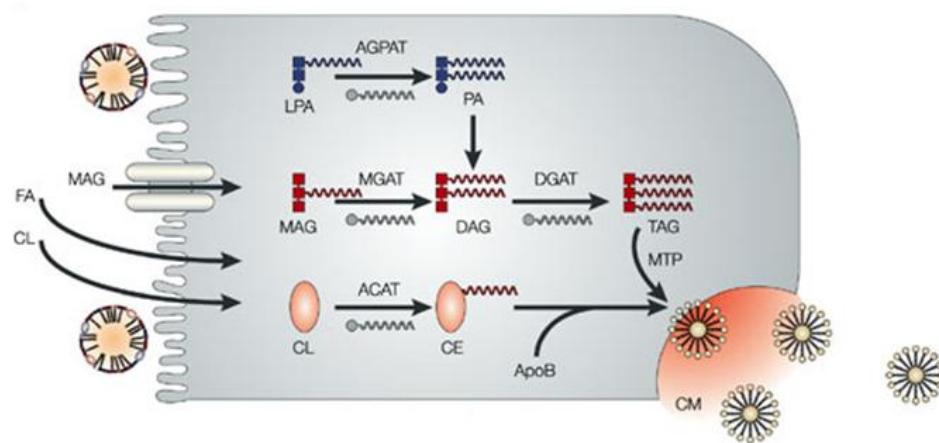
**Figure 4 :** Représentation schématique du captage et du devenir intra-entérocytaire des acides gras (AG) à moyenne et longue chaînes (AGMC et AGLC). L'absorption des AG peut se décomposer en quatre étapes: 1°) la phase lumineuse qui a lieu dans la couche d'eau non agitée où les acides gras ionisés (AG) sont progressivement protonés (AGH) ; 2°) le captage cellulaire qui se fait par simple diffusion et diffusion facilitée faisant intervenir différentes protéines : FABPpm, plasma membrane fatty acid-binding protein ; FATP4, fatty acid transport protein 4 ; FAT/CD36, fatty acid transporter ; 3°) le trafic intracellulaire avec la I-FABP, intestinal fatty acid-binding protein, la L-FABP liver fatty acid-binding protein, les ACS, Acyl-CoA synthétases et l'ACBP, l'acyl-CoA-binding protein ; 4°) la synthèse des lipoprotéines (CM, chylomicrons ; VLDL, very low density lipoproteins) qui a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi et fait intervenir la MTP, microsomal triglyceride transfert protein. TAG, triglycérides ; PL, phospholipides ; EC, esters de cholestérol (Petit et al. 2007)

### 2.1.2. Absorption et métabolisme des lipides dans l'entérocyte

Au contact de la bordure en brosse de l'intestin grêle, les micelles se dissocient libérant ainsi les produits d'hydrolyse des lipides (AGL, cholestérol, 2-MAG, Lyso-PL). Les lipides sont absorbés au niveau des microvillis des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale par diffusion transmembranaire passive et se fait selon leur gradient de concentration. On considère que ce mécanisme prédomine en période postprandiale (Trotter & Storch 1993). Cependant, il existe aussi des transporteurs membranaires ayant une forte affinité pour les lipides : protéines de liaison des acides gras à longue chaîne (fatty acid binding protein (FABPs) et protéines de liaison des lipides (lipid binding proteins (LBP) (Besnard et al. 1996 ; Besnard et al. 2002). Ces protéines membranaires seraient actives en période interprandiale ou de jeûne (transport facilité) (Chow & Hollander 1979).

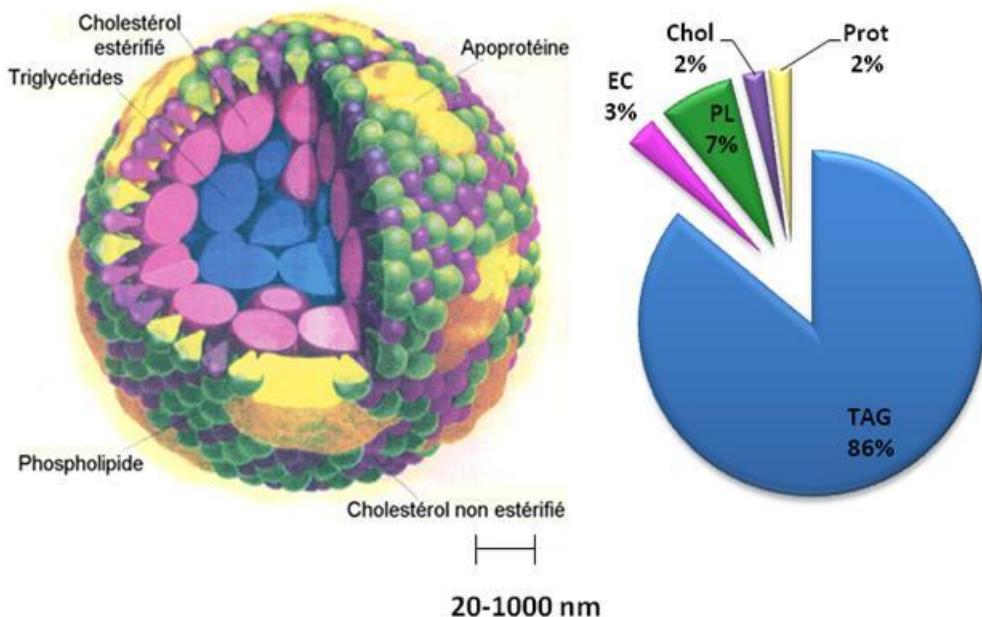
Une fois dans l'entérocyte, les acides gras sont pris en charge par des transporteurs cytosoliques (Fatty Acid Binding Proteins intestinales (I-FABP)) (Hsu & Storch., 1996) et dirigés vers le réticulum endoplasmique (RE) pour participer notamment à la synthèse des TAG. Récemment il a été observé que la protéine Sar1b était impliquée dans le transport des chylomicrons du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. Cette dernière formerait un complexe protéique (COPII) avec deux hétérodimères qui permettrait d'initier le bourgeonnement et la capture puis d'éjecter des vésicules lipidiques du RE vers l'appareil de Golgi (Perretti et al. 2010). Deux voies différentes de synthèse des TAG sont proposées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (Mattson & Volpenhein 1964 ; Johnston & Rao 1967) :

- Dans la **voie des 2-monoacylglycérols** (Figure 5), les acides gras, activés par l'acyl-CoA-synthétase (ACS) sous forme d'acyl-CoA, sont transférés sur le 2-MAG, issus de l'hydrolyse des TAG alimentaires. Les TAG se forment par action successive de deux acyltransférases localisées dans le réticulum endoplasmique lisse, la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT) et la diacylglycérol acyltransférase (DGAT). Cette voie caractéristique des entérocytes est mise en jeu en période postprandiale (Trotter & Storch, 1993). La synthèse et la sécrétion des chylomicrons sont directement liées à la quantité de lipides absorbés (Norum et al. 1983)
- Dans la **voie de l'acide phosphatidique** (glycérophosphate), les TAG sont synthétisés à partir du glycérol-3-phosphate (G3P) provenant de la glycolyse, sous l'action de deux acylations successives par la glycérol phosphate acyltransférase (AGPAT), suivies d'une déphosphorylation par la phosphatidate phosphohydrolase et d'une troisième acylation par la DGAT (Figure 5). Cette voie est prépondérante en période interprandiale ou de jeûne (Petit et al. 2007).



**Figure 5 : Voies de métabolisme entérocytaire des lipides.** La voie principale des 2 monoacylglycérols (2-MAG) forme des triacylglycérols (TAG), à partir des 2-MAG et des acides gras libres (FA) après 2 acylations successives par la monoglycéride acyltransferase (MGAT) et la diglycéride acyltransferase (DGAT) dans le réticulum endoplasmique. La voie secondaire de synthèse des TAG passe par l'acide phosphatidique formé à partir d'un lyso-phospholipide (LPA) issu du glycérol 3 phosphate, sous l'action de deux acylations successives par la glycérol phosphate acyltransférase (AGPAT), suivie d'une déphosphorylation par la phosphatidate phosphohydrolase et d'une troisième acylation par la DGAT (Shi & Burn 2004). Le cholestérol libre (CL) est estérifié en esters de cholestérol (EC) par l'acyl-coenzyme A-cholesterol-acyltransférase (ACAT) et s'associent aux chylomicrons.

Les lipides synthétisés s'associent dans des structures supramoléculaires (pré-chylomicrons) à l'apo B48 au niveau du réticulum endoplasmique lisse. L'apo B48, forme tronquée de l'apo B100 (correspondant à 48% de l'apo B48 à partir de l'extrémité N-terminale), est nécessaire à l'assemblage des chylomicrons (Anant & Davidson 2001). La maturation des chylomicrons est ensuite achevée au niveau de l'appareil de Golgi (Cartwright et al. 2000 ; Hussain et al. 2005), associant les lipides hydrophobes (TAG, esters de cholestérol et vitamines liposolubles) au « cœur » des chylomicrons, puis les molécules amphiphiles (PL, cholestérol) en surface (Figure 6). La Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP) joue un rôle essentiel dans l'assemblage et la sécrétion de lipoprotéines riches en TAG, notamment pour les chylomicrons entérocytaires. Elle permet de transférer les lipides vers l'apo B et de poursuivre sa translocation dans le RE (Lagrost et al. 2003). Après maturation, les chylomicrons fusionnent avec la membrane basolatérale de l'entérocyte pour regagner, par exocytose, la circulation lymphatique.



**Figure 6 : Représentation schématique et composition en lipides d'un chylomicron. Composition du cœur des chylomicrons : triacylglycérols (TAG) et esters de cholestérol (EC), molécules hydrophobes entourées de molécules amphiphiles qui composent l'interface : phospholipides (PL), cholestérol (Chol) et protéines (Prot).**

## 2.2. Approches expérimentales du métabolisme digestif des lipides

Les études du métabolisme des lipides se heurtent à différents obstacles et notamment celui du choix de modèles biologiques dont les résultats peuvent être extrapolés à l'Homme. De plus, si les études chez l'Homme permettent d'observer les effets directs d'une modification d'un régime lipidique sur le profil de biomarqueurs pertinents, préalablement définis, l'accès aux compartiments physiologiques est limité (tissu adipeux, lait maternel, échantillons de sang, urines, air expiré), ce qui rend la compréhension du métabolisme lipidique humain délicate. *A contrario*, le modèle animal permet un accès à des compartiments physiologiques plus variés grâce aux différents types de tissus et une maîtrise totale des conditions expérimentales. Ainsi, en fonction du modèle animal considéré, le devenir métabolique des lipides peut être prédictif de leur devenir chez l'Homme. Dans ce contexte, le rat est considéré comme un bon modèle animal pour tout ce qui concerne la digestion des lipides, alors que le hamster est davantage utilisé pour comprendre le métabolisme des lipoprotéines. Depuis quelques années, un nombre important d'études a mis en œuvre des modèles cellulaires humains qui permettent, outre la maîtrise des conditions expérimentales, d'accéder à des données *in situ*, par exemple pour l'investigation des

mécanismes du métabolisme entérocytaire des lipides. La culture cellulaire complète les données obtenues avec le modèle animal et pourrait le substituer, avec toutefois des « limites » inhérentes à l'utilisation de modèles cellulaires (homogénéité cellulaire, conditions non physiologiques, utilisation de lignées cellulaires immortalisées...).

### 2.2.1. Approche *in vivo*

#### 2.2.1.1. Approche *in vivo* chez l'Homme

Le métabolisme digestif des lipides est étudié *in vivo* chez l'Homme à travers l'analyse des compartiments gastrique et intestinal, soit par des prélèvements grâce à l'utilisation de sondes naso-gastriques et duodénales (Armand et al. 1996 ; Armand et al. 1999 ; Carrière et al. 2000), soit par des mesures obtenues par imagerie médicale (Marciani et al. 2007). Ces deux approches sont utilisées pour appréhender l'influence de la nature et la composition des lipides ingérés sur les phénomènes physico-chimiques et enzymatiques intervenant lors de la lipolyse gastrique et intestinale.

L'utilisation de **sondes** permet d'analyser, après un repas, des échantillons du contenu stomacal et/ou duodénal à différents temps de digestion. L'analyse des aspirats gastriques permet d'estimer le devenir des lipides en termes de stabilité gastro-intestinale, notamment d'un point de vue structural (Armand et al. 1994 ; Armand et al. 1999). De même, le rôle joué par la taille des gouttelettes lipidiques sur la vidange et l'absorption gastriques des lipides a été mis en évidence (Armand 1998 ; Armand et al. 1999). Les prélèvements dans la zone duodénale montrent que la taille initiale des gouttelettes module la vidange gastrique et qu'au niveau du duodénum, l'absorption entérocytaire également est plus rapide avec des émulsions grossières (Carrière et al. 1993 ; Armand et al. 1996).

**L'imagerie médicale**, non invasive, permet de distinguer la phase aqueuse de la phase huileuse grâce à des signaux différents du proton. Des images obtenues par résonance magnétique nucléaire montrent l'influence de la formulation des émulsions sur la vidange gastrique, la contraction de la vésicule biliaire ainsi que son impact sur la décharge de cholécystokinine (CCK), hormone peptidique gastro-intestinale reconnue dans la libération de la bile et d'enzymes pancréatiques (Marciani et al. 2007).

La **biodisponibilité intestinale** des lipides chez l'Homme ne peut être estimée que par l'accès au compartiment plasmatique en comparant la composition des lipides alimentaires à celle des lipides plasmatiques en période postprandiale. L'accès au compartiment sanguin permet de mettre en évidence la notion d'« élimination » ou de « clearance » des chylomicrons et la formation de TAG « résiduels » ou « remnants ». De plus, il permet d'étudier l'influence de la forme d'administration des lipides sur la vitesse d'absorption, le taux de récupération et la concentration plasmatique des acides gras. Par exemple, l'émulsification d'une huile (notamment huile de lin) accroît, non seulement, la vitesse d'apparition de l'ALA dans le sérum mais aussi sa concentration comparativement à la forme non émulsionnée (Garaiova et al. 2007). Chez le nouveau-né, l'utilisation de différentes compositions de laits infantiles montre le rôle de la position de l'acide gras sur les TAG alimentaires sur son absorption plasmatique (Innis et al. 1994 ; Lien 1994).

#### 2.2.1.2. Approche *in vivo* chez l'animal

L'intérêt que suscite la compréhension du métabolisme digestif des lipides a favorisé le développement de modèles animaux pour pallier au modèle humain (Zheng et al. 1998). La méthode de choix pour étudier *in vivo* l'absorption lipidique et le transport lymphatique des lipides consiste à réaliser une fistulation du canal lymphatique (Bollman et al. 1948 ; Combe et al. 1981 ; Boyd et al. 2004). L'intérêt de cette expérience réside dans le fait que les informations recueillies chez l'animal ne peuvent pas être obtenues par les études chez l'Homme. Ce type d'expérimentation est réalisé sur différents modèles animaux tels que le rat (Porter et al. 1996 ; la souris (Zheng et al. 1998) et le chien (Khoo et al. 2001). Le modèle rat est largement utilisé pour estimer l'absorption intestinale des acides gras chez l'Homme et ce, du fait des similarités des processus digestifs (Kararlit 1995). Notamment, les pH gastro-intestinaux observés chez le rat sont similaires à ceux observés chez l'Homme (Moreau et al. 1988). Néanmoins, on note que, chez cet animal, la bile est déversée dans le duodénum en flux continu dû à l'absence de vésicule biliaire alors que chez l'Homme, l'excrétion biliaire est de type pulsatile en réponse à l'alimentation. De plus, l'activité lipasique préduodénale chez le rat est liée essentiellement à l'activité de la lipase linguale, prépondérante par rapport à la lipase gastrique (De Nigris et al 1988 ; Kindel et al. 2010).

Les études relatives à l'absorption des lipides utilisant la collecte de lymphé à partir du canal thoracique ou mésentérique sont basées sur le fait que les acides gras analysés dans la lymphé sont représentatifs des lipides ingérés (Chemenko et al. 1989 ; Christensen et al. 1995 ; Degrace et al. 1996). Cette hypothèse est effectivement vérifiée dès lors que l'on administre des acides gras marqués ou des acides gras absents des lipides endogènes véhiculés par la lymphé (Shiau et al. 1985b). Pour les autres acides gras, les résultats sont surestimés par leur dilution par ces mêmes acides gras d'origine endogène, à savoir acides gras issus de la bile absorbés avec les TAG alimentaires (Mu & Høy 2001) et acides gras issus du pool entérocytaire. Les taux de passage des différents acides gras sont déterminés par référence à l'acide oléique, caractérisé par un taux de passage dans la lymphé proche de 100%. Pour cela, de la trioléine marquée est ajoutée comme traceur aux TAG alimentaires à étudier et on détermine le rapport de l'acide oléique intubé/acides totaux administrés, et ce même rapport dans les lipides lymphatiques (Senior 1964). Cette approche basée sur la comparaison des compositions en acides gras de la lymphé et de l'alimentation a permis d'étudier l'influence de la nature des lipides ingérés (Borel et al. 1994a), de la position de l'acide gras sur le squelette glycérol (De Fouw et al. 1994 ; Porsgaard et al 1999 ; Lien et al. 1997), de la longueur de la chaîne de l'acide gras (Mu & Høy 2001) et de son degré d'insaturation (Christensen et al. 1995). Par exemple, les TAG comportant des AGS à chaîne courte sont préférentiellement digérés au niveau de l'estomac et véhiculés jusqu'au foie par la veine porte (Mu & Høy 2001 ; Straarup & Høy 2001 ; Osborn & Akoh 2002).

Il est important de noter que les études sur la lymphé peuvent faire appel à des méthodologies différentes qui rendent la comparaison des études délicate. Ainsi, plusieurs études utilisent des temps de collecte de lymphé différents ce qui ne permet pas de comparer les données entre elles. En effet, un temps de collecte court (jusqu'à 6 heures) permet de déterminer le taux de transport de chaque acide gras absent des lipides endogènes mais non la quantité réelle absorbée. Par contre, la collecte de la lymphé sur des temps longs (24 heures) augmente la contribution des acides gras d'origine endogène puisque les lipides exogènes ont un maximum d'absorption à environ 4 heures après ingestion des lipides (Vaubourdolle 2007).

### 2.2.2. Approche *in vitro*

Les techniques *in vitro* (dont les techniques basées sur la culture cellulaire) se sont développées afin de proposer des approches alternatives aux modèles animaux et à l'Homme. Cela permet de compléter, d'interpréter et d'étendre les résultats obtenus avec le modèle animal ou humain (O'Driscoll 2002).

#### 2.2.2.1. Digestion *in vitro* des lipides

Les études *in vitro* sont réalisées selon deux approches méthodologiques :

- soit une approche séquentielle des événements de la digestion en faisant intervenir des lipases purifiées et/ou des sels biliaires seuls ou en mélange (dans le cadre d'acides gras libres et de 2-MAG) ;
- soit une approche intégrée avec l'action séquentielle de différents sucs (gastrique, pancréatique, biliaire) (Oomen et al. 2003) ou l'utilisation de digesteurs.

Les systèmes lipidiques étudiés concernent des TAG modèles, des huiles alimentaires ou des repas tests (Tableau 9). Dans le cas de la digestion *in vitro* des lipides, la température généralement utilisée dans les expériences est de 37°C. Le temps de digestion (généralement défini à 2 h) ainsi que les variations de pH sont des facteurs à prendre en compte, notamment selon la nature de l'échantillon analysé. En effet, seule une partie des TAG à longues chaînes est hydrolysée après 12 minutes de digestion *in vitro* (Reymond & Sucker 1988). Plusieurs études menées sur le devenir gastro-intestinal des lipides alimentaires avant leur arrivée au site d'absorption ont mis en évidence des changements notamment structuraux en lien avec les conditions physiologiques (Hur et al. 2011). En ce qui concerne l'hydrolyse des lipides par les enzymes digestives, il est possible d'utiliser soit les jus gastrique et pancréatique soit les lipases gastrique et pancréatique purifiées (Carrière et al. 2000).

Outre l'intérêt de ces études pour mieux appréhender l'influence de la physico-chimie des lipides sur les mécanismes de la digestion, ces différentes approches permettent de préparer des systèmes lipidiques qui sont ensuite mis en contact avec les cellules en culture. Toutefois, les différentes approches utilisées pour préparer les systèmes mettent en avant les difficultés pour reproduire les conditions observées *in vivo* de par la difficulté à mimer

précisément le degré de complexité des évènements physico-chimiques du tractus gastro intestinal chez l'Homme et l'animal.

**Tableau 9 : Exemples d'études réalisées pour le suivi de la digestion *in vitro* de systèmes lipidiques**

Echantillon	Analyses réalisées	Chimie ou enzyme utilisée	Temps de digestion	Références
<b>Emulsion d'huile de maïs</b>	Microscopie optique Potentiel $\xi$ Taille des particules	Lipase pancréatique	2h	Mun et al. 2005
<b>Emulsion de Solutol et de glycérides à chaînes moyennes</b>	Microscopie optique Taille des particules	Sels biliaires Pancréatine		Abdalla et al. 2008
<b>Emulsion d'huile de maïs</b>	Microscopie optique Potentiel $\xi$ Taille des particules Taux de lipolyse	Sels biliaires, Pancréatine	2-24h	Sandra et al. 2008
<b>Galette de Bœuf</b>	Microscopie optique Microscopie confocale Potentiel $\xi$ Taille des particules	$\alpha$ -amylase mucine BSA Pepsine Pancréatine Lipase Sels biliaires	5 - 2h	Hur et al. 2009
<b>Emulsion d'huile de matière grasse laitière</b>	Microscopie optique Potentiel $\xi$ Taille des particules	Pancréatine Sels biliaires	2h	Beysseriat et al. 2006
<b>Tricapryline, trioléine</b>	Concentration lipidique	Lipase pancréatique Colipase	30 min	Sek et al. 2001
<b>Repas test normocalorique équilibré à 30% de lipide</b>	Taux de lipolyse	Jus gastrique humain Jus pancréatique humain	15 et 30 min 5, 10, 15, 30, 60 min	Carrière et al. 2000

#### 2.2.2.2. Cellules utilisées pour l'étude du métabolisme des lipides

Idéalement, l'étude *in vitro* du métabolisme lipidique utilisant une approche par culture cellulaire devrait passer par des cellules de l'épithélium intestinal en culture primaire.

Cependant, leur viabilité limitée et une perte importante de leurs fonctionnalités anatomiques et biochimiques font que le développement de cultures primaires issues de cellules humaines reste limité. Pour pallier à ces inconvénients, des lignées de cellules issues d'adénocarcinome humain (Caco-2) ont été mises au point. Ces lignées reproduisent un ensemble de caractéristiques des cellules intestinales différenciées et permettent d'étudier les fonctionnalités entérocytaires, et notamment celles impliquées dans le métabolisme des lipides (Kedinger 1987).

Les cellules Caco-2 sont des cellules isolées d'un adénocarcinome colique humain. Elles ont la particularité de se différencier spontanément en culture avec des caractéristiques structurales et fonctionnelles similaires à celles observées pour les entérocytes matures sains (Hidalgo et al. 1989). Elles forment à confluence une monocouche de cellules polarisées présentant, à leur pôle apical, des jonctions serrées et une bordure en brosse dont la structure qui présente des microvillosités est en tout point comparable à celle observée dans l'intestin humain normal. Un grand nombre de passages peut contribuer à l'hétérogénéité et à l'expression de caractéristiques différentes par rapport à celles de la culture initiale (Briske-Anderson et al. 1997 ; Walter & Kissel 1994 ; Yu et al. 1997), notamment en termes d'altération des activités et fonctions cellulaires (Lu et al. 1996 ; Briske-Anderson et al. 1997). D'autres lignées cellulaires ont été développées (TC7, PD7 et PF11) (Tableau 10). Parmi les clones de Caco-2, les cellules TC7 seraient tout aussi intéressantes dans l'étude du métabolisme lipidique (Tranchant et al. 1997 ; Salvini et al. 2002). Ce constat fait suite à l'observation selon laquelle la viabilité cellulaire des cellules TC7 après incubation avec des micelles mixtes est supérieure à celle des autres clones cellulaires.

**Tableau 10 : Types cellulaires Caco-2 utilisés pour les études de l'absorption des lipides**

Cellules utilisées	Systèmes lipidiques	Auteurs
Caco-2	Métabolisme d'absorption du palmitate	Trotter & Storch. 1991
Caco-2	Trafic des lipides exogènes	Levin et al. 1992
Caco-2	Désaturases et élongases dans le système caco-2	Chen & Nilsson. 1993
Caco-2	Métabolisme des n-3 et n-6	Huang et al. 1995
Caco-2	Métabolisme d'absorption de l'oléate, du palmitate, et du 8 :0	Trotter et al. 1996
Caco-2	Synthèse et sécrétion de lipoprotéines intestinales	Levy et al. 1995
	Analyse comparative du transport des lipides	Levy et al. 1999
Caco-2 et TC7	Métabolisme d'absorption du palmitate et de l'ALA	Tranchant et al. 1998
TC7, PF 11, PD 7, PD 10	Mécanisme et cinétique d'absorption de l'ALA dans les TC7	Tranchant et al. 1997
Caco-2	Métabolisme des lipides structurés	Spalinger et al. 1998
TC 7	Etude de l'influence de la composition du milieu sur absorption de l'ALA	Tranchant et al. 1998
Caco-2	Assemblage et synthèse des CM	Luchoomun & Hussain. 1999
Caco-2	Cinétique de transport selon la nature des lipides	Ho & Storch. 2001
TC7, PF 11, PD7	Caractérisation de trois clones dans les process lipidiques	Salvini et al. 2002
Caco-2	Effets des AG sur les jonctions serrées	Usami et al. 2003
Caco-2	Absorption des LC dans les AGL et 2MAG	Murota & Storch. 2005
Caco-2	Absorption paracellulaire selon différents acides gras	Aspenström-Fagerlund et al. 2007
Caco-2	Propriétés d'absorption des micelles lipidiques	Tsuzuki. 2007
Caco-2	Effet de la nature des lipides sur la synthèse et la sécrétion des lipoprotéines	Jackson et al. 2009

2.2.2.3. Métabolisme des acides gras dans les cellules Caco-2a. *Absorption des acides gras par les cellules Caco-2*

Comme mentionné précédemment (§ I-2.1.2), il existe deux mécanismes d'absorption des acides gras à longues chaînes par les entérocytes : la diffusion passive à travers la membrane lipidique et le transport médié par une protéine membranaire. L'utilisation des cellules Caco-2 a montré l'existence d'un transporteur grâce au phénomène de saturation lors de l'absorption des lipides. Les caractéristiques cinétiques (affinité, vitesse de transport, inhibition...) du fonctionnement de ce transporteur ont aussi été déterminées. Ce transporteur est spécifique des acides gras à longues chaînes (Trotter et al. 1996 ; Tranchant et al. 1997), dans les cellules Caco-2 ainsi que pour les 4 clones (Ho & Storch 2001 ; Murota & Storch 2005). Il a été rapporté que les I-FABP (intestinal) et L-FABP (liver) sont impliquées dans les processus d'absorption et de compartmentalisation métabolique des acides gras. Toutefois seule la L-FABP a été identifiée dans les cellules Caco-2 (Levin et al. 1992 ; Trotter & Storch 1991). Pour certains auteurs, une FABP plasmique, identifiée dans les cellules Caco-2 pourrait être également impliquée dans le transport des AGL et des 2-MAG ainsi que l'activité d'un transporteur d'acides gras (FATP 1,2 et 4) (Trotter & Storch 1991 ; Sandoval et al. 2008). Des études montrent qu'il existe un phénomène de compétition entre la forme AGL et la forme estérifiée MAG au niveau du transporteur membranaire (Spalinger et al. 1998 ; Ho & Storch 2001), mais aussi entre différents acides gras (Tranchant et al. 1997).

Par ailleurs, l'utilisation des cellules Caco-2 permet d'affiner l'influence de la nature de l'acide gras (longueur de chaîne, degré d'insaturation), de sa forme chimique (AGL ou 2-MAG) et des conditions expérimentales (concentration, acides gras solubilisés par des sels biliaires, acides gras véhiculés par des protéines ..). En ce qui concerne **la nature des acides gras**, la longueur de chaîne hydrocarbonée influence le mode d'absorption. Les acides gras (AG) à longue chaîne traversent la membrane des cellules *via* un transporteur alors que les AG à chaîne courte passent par la membrane apicale par diffusion passive (Trotter et al. 1996). Les résultats obtenus pour les AG à chaîne longue sont controversés. Par exemple, la vitesse de transport de l'acide oléique est supérieure à celle de l'acide palmitique alors que l'affinité des deux acides gras pour le transporteur est similaire (Ho & Storch 2001). Des résultats inverses sont reportés par ailleurs (Trotter et al. 1996 ; Tsuzuki 2007). De plus, il existe un phénomène de compétition pour l'absorption de l'ALA en présence d'autre AG à courtes ou longues chaînes (Tranchant et al. 1997 ; Tranchant et al. 1998).

**La forme chimique de l'AG module son devenir entérocytaire.** En effet, une meilleure incorporation de l'acide oléique dans les cellules Caco-2 est observée (Tsuzuki 2007), (Murota & Storch 2005) lorsqu'il est sous forme de monoglycéride (44% d'incorporation) par rapport à la forme acide gras libre (38%). Ce résultat serait dû à une meilleure affinité de la membrane apicale des cellules Caco-2 et une plus grande vitesse de transport pour l'acide oléique sous forme de monoglycéride (Ho & Storch 2001). La position de l'acide gras sur le MAG, *sn*-1-MAG ou *sn*-2-MAG, ne semble pas affecter son passage à travers l'entérocyte (Spalinger et al. 1998) dans les cellules Caco-2.

Les études de Levin et al 1992 et de Ho & Storch 2001 mettent en avant **l'influence des conditions expérimentales**. Solubilisés dans des micelles mixtes, les AG ou les 2-MAG sont mieux captés par la membrane apicale des entérocytes que liés à une protéine sérique (Tsuzuki 2007). Par exemple, la monooléine est totalement assimilée quand elle est associée à la lyso-phosphatidylcholine (Lyso-PC) et au taurocholate, comparativement à un apport de l'ester associé à la sérum albumine bovine (54%).

*b. Métabolisme des acides gras par les cellules Caco-2*

Les travaux de (Trotter & Storch 1993 ; Trotter et al. 1996) montrent que, dans les cellules Caco-2, les acides gras suivent des voies de conversion et d'elongation comparables à celles présentes dans les entérocytes sains matures. Ainsi, la présence dans le milieu basolatéral d'acides gras à longues chaînes marqués ( $^{14}\text{C}$ -EPA et de  $^{14}\text{C}$  et  $^3\text{H}$ -DPA) suite à l'ajout d'ALA marqué, démontre la présence des  $\Delta 6$  et  $\Delta 5$  désaturases. Néanmoins, l'absence de DHA suggère que la  $\Delta 6$  désaturase serait moins active que dans les entérocytes sains. Concernant la synthèse des TAG dans les entérocytes humains, il existe deux voies de synthèse : la voie du 2-monoglycérol phosphate qui intervient à 70% en conditions physiologiques normales et la voie de l'acide phosphatidique qui prend place surtout en période de jeûne. Le métabolisme des acides gras dans les cellules Caco-2 emprunte aussi ces deux voies de synthèse. Néanmoins, certaines études suggèrent que la voie de l'acide phosphatidique est prédominante (Levin et al. 1992 ; Levy et al. 1995). La voie du 2-monoglycérol phosphate serait moins active car l'activité de la monoacylglycerol acyltransferase serait faible voir absente (Trotter & Storch 1991). D'autre part, il existerait une lipase endogène localisée majoritairement au niveau du cytosol dont la sécrétion au niveau de la membrane apicale

engendrerait l'hydrolyse des triglycérides exogènes (Spalinger et al. 1998). Cette lipase endogène a été observée dans la muqueuse intestinale chez le rat (Rao & Mansbach 1993). Les acides gras qui ne participent pas à la synthèse des TAG pourraient être  $\beta$ -oxydés et estérifiés dans les phospholipides (Levin et al. 1992).

c. *Assemblage des lipoprotéines dans les cellules Caco-2*

De nombreuses études montrent que les cellules Caco-2 sont capables de synthétiser les lipides (TAG, PL et esters de cholestérol) et les apoprotéines (dont les majoritaires A-I, A-IV, B-100, C, E) pour produire les lipoprotéines (Levy et al. 1995 ; van Greenvenbroeck et al. 1996 ; Field et al. 1998 ; Luchoomun & Hussain 1999 ; Hussain 2000). Le ratio TAG/PL, caractéristique de la composition des lipoprotéines se situe, pour les cellules Caco 2, entre 7 et 12 (Luchoomun & Hussain 1999), ce qui est comparable au ratio observé dans les CM lymphatiques en période postprandiale (Whyte et al. 1963 ; Fraser et al. 1968; Redgrave & Dunne 1975; Renner et al. 1986). Les apoprotéines B-100, B-48 et E ont été identifiées dans les cultures de Caco-2 (Luchoomun & Hussain 1999) alors que l'apo B-48 est majoritairement représentée dans les entérocytes sains (Levy et al. 1995 ; Levy et al. 1999). La synthèse de lipoprotéines est fonctionnelle dans les cellules Caco-2 (van Greenvenbroeck et al. 1996) marquée par une prépondérance des HDL et VLDL comparativement aux chylomicrons (Ciubotariu et al. 2003) et est fortement influencée par la nature des acides gras déposés au pôle apical des cellules (Field et al. 1988 ; van Greenvenbroeck et al. 1996 ; Tranchant et al. 1997 ; Luchoomun & Hussain 1999 ; Tsuzuki 2007 ; Jackson et al. 2009). La présence d'AGMI favorise la synthèse et la sécrétion de lipoprotéines riches en TAG ce qui est cohérent avec les études chez l'Homme (Zheng et al. 2008 ; Jackson et al. 2009), notamment pour des concentrations en acide oléique représentatives des conditions postprandiales (supérieures à 0,8 mM) (Luchoomun & Hussain 1999). La sécrétion de chylomicrons et de VLDL prédomine en présence d'acides gras insaturés (18:1 et 18:2), alors qu'une exposition à des AGS (16:0 et 18:0) induit la synthèse de lipoprotéines intermédiaires de faible densité IDL/VLDL (Field et al. 1988).

L'ensemble de ces caractéristiques métaboliques et physiologiques confère aux cellules Caco-2, un intérêt certain pour l'étude du métabolisme entérocytaire des acides gras (Hur et

al. 2011). La capacité des cellules Caco-2 à absorber les acides gras et à sécréter des lipoprotéines, dont les chylomicrons, en fait un modèle intéressant. Certaines limites inhérentes au modèle sont toutefois à prendre en considération si l'on souhaite extrapoler les résultats obtenus *in vitro* à l'Homme :

- l'absence d'hétérogénéité cellulaire avec la culture cellulaire contrairement à l'épithélium de l'intestin grêle ;
- le fait que les cellules Caco-2 sont des cellules immortalisées et non des cellules primaires ;
- l'absence de la contribution de la couche d'eau non agitée présente *in vivo* ainsi que de la couche de mucine au niveau de la barrière intestinale pouvant compliquer le mécanisme d'absorption cellulaire ;
- les gammes de concentrations en lipides qui ne sont pas toujours réalistes par rapport aux concentrations utilisées dans les études *in vivo* ou retrouvées dans les conditions physiologiques ;
- le fait que la voie de l'acide phosphatidique est majoritairement impliquée dans la synthèse des TAG alors qu'en période de digestion *in vivo*, c'est principalement la voie des 2-monoglycérides qui est activée ;
- un métabolisme cellulaire notamment en termes de synthèse des lipoprotéines et de leur excrétion très dépendant des conditions expérimentales (clones cellulaires utilisés, stade de différentiation, concentration et type de lipides exogènes).

### **3. Facteurs physico-chimiques influençant la biodisponibilité digestive de l'acide $\alpha$ -linolénique**

La biodisponibilité se définit comme la fraction totale des nutriments ingérés que l'organisme assimile et utilise de manière ciblée. Elle constitue un facteur fondamental à prendre en considération pour adapter la quantité d'un nutriment à ingérer au rôle santé qui lui est attribué. La biodisponibilité fait intervenir la notion d'efficacité nutritionnelle avec laquelle l'organisme utilise les nutriments (Fernandez-Garcia et al. 2009). Elle dépend, notamment, de la digestibilité des nutriments (notion de bio accessibilité), de leurs

caractéristiques d'absorption (notion de perméabilité intestinale) et des capacités de l'organisme à les métaboliser (Fernandez-Garcia et al. 2009)

### **3.1. Influence de la forme chimique de l'acide $\alpha$ -linolénique**

De nombreuses études étudient l'influence de la forme chimique de présentation des acides gras, à savoir forme libre ou forme estérifiée (esters éthylique et méthylque, diacylglycérol, triacylglycérol, phospholipide...) sur leur biodisponibilité (Ramirez et al. 2001). De même, la position de l'acide gras sur le squelette glycérol et la nature de cet acide gras (longueur de chaîne et degré d'insaturation) modulent aussi cette biodisponibilité (Ramirez et al. 2001). L'influence de ces paramètres repose en premier lieu sur l'une et l'autre des deux étapes qui conditionnent l'absorption intestinale : l'hydrolyse enzymatique et la solubilisation micellaire des produits d'hydrolyse. Nous avons déjà indiqué l'importance de ces paramètres vis-à-vis de la spécificité des enzymes digestives (§ I-2.1.1), en relation avec la nature de l'acide gras et sa position dans les TAG, ainsi que de la solubilisation par les sels biliaires (§ I-2.1.1). Dans ce qui suit, nous focaliserons notre attention uniquement sur les études faisant intervenir l'ALA.

#### **3.1.1. Influence de la nature des lipides ingérés**

Alors que de nombreux travaux de la littérature se concentrent sur les formes chimiques de l'EPA et du DHA, seules deux études, à notre connaissance, montrent l'influence de la nature des lipides et leur impact en termes d'absorption ou d'intégration cellulaire, essentiellement en ce qui concerne les AGPI n-3 à longues chaînes. Seules deux équipes ont montré, l'influence de la présentation chimique de l'ALA sur son absorption. Ainsi, même si les résultats sont obtenus sur un nombre restreint d'enfants ( $n=4$ ), l'absorption de l'ALA est meilleure lorsqu'il est fourni sous forme de PL (comparativement à la forme TAG (Carnielli et al. 1998). Chez le rat, l'absorption des lipides est similaire quelle que soit la source d'origine, lécithine de cerveau de porc ou TAG (Amate et al. 2001). Par ailleurs, l'excrétion de l'ALA dans les fèces est supérieure suite à l'ingestion des PL comparativement à celle des TAG. Néanmoins, selon l'origine des PL, l'excrétion de l'ALA, est supérieure pour les PL extraits de cerveau de porc par rapport à la lécithine d'œuf (Amate et al. 2001).

### **3.1.2. Influence de la position de l'acide $\alpha$ -linolénique sur le squelette glycérol : utilisation d'huiles combinées**

Les données relatives à l'influence de la position de l'ALA dans la structure glycérique s'appuient principalement sur une étude utilisant des huiles en mélange (Boulos & Combe 2000). Lorsque l'ALA est réparti à hauteur de 30% en position *sn*-2 dans des huiles alimentaires naturelle (soja) et huiles en mélange (Isio4-soja), cette distribution est parfaitement conservée dans les chylomicrons lymphatiques. En utilisant l'huile de colza seule ou en mélange (56 à 58% de l'ALA en position *sn*-2 des TAG), la distribution de l'ALA dans les TAG lymphatiques est relativement conservée, avec toutefois une proportion moindre de l'ALA en position *sn*-2 (40 à 44%). Même si le maintien de la position interne est avéré pour l'ALA, il n'en reste pas moins que certains auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle une partie des 2-MAG pourrait être hydrolysée par des hydrolases intestinales (Christensen et al. 1995), expliquant que le maintien soit quelquefois partiel.

## **3.2. Influence de la forme physique de présentation de l'acide $\alpha$ -linolénique**

Contrairement à la plupart des enzymes qui agissent en phase aqueuse, les lipases agissent en milieu hétérogène, à l'interface lipide/eau, où elles s'y adsorbent. Il en résulte que les propriétés biochimiques de ces enzymes dépendent autant de la "qualité" de cette interface que des paramètres plus classiques tels que le pH ou la force ionique. Les activités catalytiques des lipases sont aussi étroitement dépendantes de la présence d'agents tensioactifs tels que les sels biliaires et certaines protéines alimentaires. Cette modulation peut s'exercer soit sur l'étape d'adsorption de l'enzyme à l'interface soit sur l'étape de catalyse interfaciale. *In vivo*, la dispersion des lipides sous forme de gouttelettes lipidiques permet d'augmenter cette interface et serait une étape limitante de la lipolyse (Sarda & Desnuelle 1958 ; Desnuelle & Benzonana 1965). Ainsi, l'émulsification préalable des lipides alimentaires pourrait favoriser leur digestion. Des revues récentes recensent les principales études montrant comment la composition, la structure et les propriétés de l'émulsion

peuvent influencer la digestion des lipides qui la constituent (Hur et al. 2011 ; Golding & Wooste 2010 ; McClements & Li 2010).

Pour améliorer la digestion des TAG, il est possible d'intervenir sur différents paramètres caractérisant les émulsions :

- **la nature des tensioactifs** utilisés pour stabiliser l'interface huile/eau. Nous avons mentionné (§ I-2.1) que l'activité de la lipase pancréatique est inhibée par certains tensioactifs. Parmi ceux-ci, on peut citer les PL (Borgström & Erlanson 1973 ; Embleton & Pouton 1997), le polyoxyéthylène sorbitan monooléate ou les sels biliaires (Borgström 1980). Si les émulsions sont stabilisées avec ces tensioactifs, il est donc nécessaire d'ajouter des molécules qui vont permettre l'ancrage de la lipase pancréatique. La colipase et les acides gras peuvent jouer ce rôle. L'influence de la nature des phospholipides utilisés dans les formulations a fait l'objet de plusieurs études de biodisponibilité. Chez le rat, la présence de lécithine ou hydrolysat de soja dans l'émulsion favorise la synthèse de TAG lymphatiques (Nishimukai et al. 2003 ; Nishimukai & Hara 2007) ;
- **la charge de surface des émulsions.** Les variations de pH entre l'estomac et l'intestin peuvent déstabiliser les systèmes colloïdaux *via* des phénomènes de flocculation/coalescence aboutissant à une disparition plus ou moins totale de l'interface initiale. Cette déstabilisation apparaît notamment lorsque des protéines sont utilisées pour stabiliser les interfaces. Le pH acide étant souvent proche de leur pH isoélectrique, il favorise l'agrégation des protéines et donc des gouttelettes d'huile (Halling 1981 ; Dickinson 1996) ;
- **la taille des globules gras.** Des études *in vitro* montrent que la granulométrie des émulsions gouverne la fixation à l'interface lipidique puis l'activité des lipases gastrique (Borel et al. 1994b), pancréatique (Armand 1998) et plasmatiques (Lutz et al. 1989). Ainsi, chez le rat, une émulsion fine (0,6 µm) est deux fois plus vite hydrolysée dans l'estomac et le duodénum qu'une émulsion grossière (22 µm) (Borel et al. 1994b). Des aspirats gastriques recueillis 4 heures après digestion, montrent que, chez l'Homme, la lipolyse gastrique d'une émulsion fine (0,7 µm) est supérieure (36%) à celle d'une émulsion grossière de 10 µm (16%). Toutefois, le pic d'absorption des TAG plasmatiques est retardé d'une heure avec l'émulsion fine comparativement

à celui de l'émulsion grossière (Armand et al. 1999). Les travaux de (Michalski et al. 2006) montrent que, chez le rat, lorsque les lipides de la matière grasse laitière sont émulsifiés, la sécrétion des TAG dans le plasma est retardée. De même, l'enrichissement en TAG serait amoindrit comparativement à la forme non émulsionnée ;

- **la stabilité des émulsions.** Il a été montré qu'une émulsion stable physiquement à pH acide est associée, chez l'Homme, à une vidange gastrique plus lente et une absorption plasmatique des lipides plus rapide que lorsqu'une émulsion instable est utilisée (Goetze et al. 2007 ; Marciani et al. 2007).

En ce qui concerne spécifiquement l'effet de l'émulsification sur l'absorption et le devenir de l'acide  $\alpha$ -linolénique, une seule étude a été réalisée chez l'Homme. L'ALA apparaît plus précocement dans le plasma et sa teneur est plus élevée lorsque les lipides (mélange d'huiles de lin, de bourrache et de poisson) sont ingérés sous forme émulsifiée comparativement à la forme non émulsionnée (Garaiova et al. 2007).

#### 4. Objectifs de la thèse

L'importance des acides gras n-3 dont l'ALA a été soulignée à travers leurs rôles physiologiques (§ I-1.1). La nécessité d'un apport optimum en AGPI au niveau des cellules est clairement démontrée, notamment dans des situations physiologiques particulières (grossesse, allaitement, développement pré et post-natal, vieillissement) et dans le cadre de la prévention d'un certain nombre de pathologies. Compte-tenu des consommations actuelles en AGPI n-3, des recommandations par des organismes publics sont préconisées (§ I-1.2). Parmi celles-ci, une supplémentation en ALA est fortement conseillée, tout en respectant un apport équilibré entre les deux familles d'acides gras n-6 et n-3.

Si les grandes étapes de la digestion/assimilation entérocytaire des lipides sont bien connues (§ I-2.1), les résultats de bio accessibilité des lipides restent très dépendants de l'approche méthodologique utilisée (§ I-2.2). Ainsi, les études *in vivo* chez l'Homme sont limitées car essentiellement basées sur des mesures de concentrations plasmatiques ou, quand le nutriment le permet, sur des bilans entre une quantité ingérée et une quantité excrétée. De

ce fait, les résultats sont peu interprétables en termes de mécanismes de digestion/absorption. Les études *in vivo* chez l'animal et chez l'Homme renseignent un peu plus précisément sur les phénomènes de digestion, notamment les études de composition de la lymphé (chez l'animal). L'utilisation de modèles cellulaires en culture paraît intéressante puisqu'elle donne directement accès au taux de passage d'un nutriment à travers la barrière intestinale. Elle permet, aussi, de mettre en évidence, de manière systématique, l'influence de la composition et de la concentration en lipides des micelles mixtes sur l'absorption des nutriments d'intérêt. En revanche, cette approche nécessite la formulation des micelles mixtes qui ne prend pas en compte l'étape stomachale ni l'environnement complet de l'intestin. En particulier, l'approche *in vitro* ne permet pas de tester l'influence de la forme physique d'apport des TAG (émulsion) sur la bio accessibilité des acides gras. Il ressort de ces observations que la bio accessibilité des lipides devrait être abordée en croisant les informations obtenues à partir de différentes approches méthodologiques. C'est pourquoi, l'un des objectifs de ce travail de thèse est de **déterminer quelles informations pertinentes relatives à la digestion/absorption de l'ALA peuvent être obtenues à partir de chaque modèle *in vivo* (rat) et *in vitro* (cellules Caco-2)**.

De nombreuses études démontrent que les formes physique et/ou chimique des lipides sont des paramètres importants qui régissent leur biodisponibilité. En ce qui concerne la forme chimique, la plupart des études se focalise sur les AGPI n-3 à très longues chaînes tels que l'EPA et le DHA. En effet, outre par les effets biologiques avérés de ces acides gras, ces études sont aussi motivées par le risque d'hydrolyse limitée des TAG qui les contiennent, ce qui modère leur digestibilité. En revanche, peu d'études ont été consacrées à l'ALA (§ I-3). En ce qui concerne la forme physique, les études en relation avec l'ALA, montrant l'influence de la forme émulsionnée par rapport à une phase continue liquide sont encore peu nombreuses. En ce qui concerne l'influence de la position de l'ALA dans les TAG, l'utilisation de TAG structurés purs contenant de l'ALA en positions interne ou externes est un outil performant pour suivre sans ambiguïté son assimilation et son devenir au niveau lymphatique et plasmatique. Par ailleurs, les résultats obtenus pour la digestion/assimilation de l'huile de lin permettent, d'une part, de les comparer à ceux obtenus avec une huile synthétique et, d'autre part, d'aborder l'influence de la forme physique d'apport alimentaire de l'huile (forme émulsifiée *versus* phase continue). Le choix de l'huile de lin est motivé par

sa teneur importante en ALA et le fait que la législation à l'égard de son utilisation a récemment changé (§ I-1.3.2). L'un des objectifs de ce travail de thèse est donc de déterminer dans quelle mesure il est possible d'extrapoler à une huile naturelle les mécanismes de digestion/absorption/métabolisme entérocytaire de l'ALA obtenus grâce aux TAG synthétiques.

L'objectif final de ce travail de thèse est de pouvoir **préconiser une ou des formes d'apports de l'ALA qui optimisent sa bio accessibilité**. L'originalité de cette étude repose, d'une part, sur l'utilisation d'approches expérimentales du métabolisme intestinal complémentaires et, d'autre part, sur l'utilisation de formes d'apport d'ALA différentes (huile naturelle, huile synthétique, huile en émulsion, huile en phase continue). Ces études s'intègrent dans la démarche qui consiste à prouver la fonctionnalité des aliments enrichis en ALA.

Afin de répondre à ces objectifs, trois études, constituant les trois chapitres de la partie Résultats et discussion, sont menées :

- la première partie s'attache à étudier, chez le rat, l'influence de la structure des TAG alimentaires contenant de l'ALA strictement en positions interne ou externes. Il s'agit d'une approche cinétique d'absorption de l'ALA à la fois au niveau lymphatique et au niveau plasmatique, sur une période de 24 heures ;
- la deuxième partie porte sur les mécanismes d'absorption intestinale de l'ALA déterminés grâce au modèle des cellules Caco-2. Cette étude nécessite la formulation de micelles mixtes. Elle permet d'évaluer la toxicité cellulaire des lipides et d'étudier l'influence de la composition des micelles sur l'absorption des lipides. Les études cinétiques sont réalisées sur 6 heures ;
- la troisième partie consiste à évaluer l'influence de la forme de présentation physique de l'huile de lin (émulsion, phase continue) sur l'absorption lymphatique de l'ALA, chez le rat, sur une cinétique de 24 heures.

Les résultats relatifs à l'absorption intestinale et plasmatique des acides gras *in vivo*, chez le rat, ont été obtenus grâce à une collaboration réalisée avec l'Institut des Corps Gras (ITERG). La partie de la thèse portant sur l'utilisation des TAG structurés a permis le développement d'une collaboration avec S. Pinet de l'Institut des Sciences Moléculaires (Université Bordeaux

1, CNRS, UMR-5255) et T. Durand de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron (Université Montpellier 1, Université Montpellier 2, CNRS, UMR-5247) pour la synthèse et caractérisation des différentes molécules. Les expériences de culture cellulaire avec les cellules Caco-2 ont été réalisées avec l'appui de X. Vitrac (Polyphénols Biotech) dans le cadre de l'appel à projets « mobilité jeune chercheur » soutenu par l'Association de Coordination Technique pour l'Industrie Agro-alimentaire (ACTIA).

## **1. Matériel**

### **1.1. Molécules lipidiques**

#### **1.1.1. Huiles végétales**

L'**huile de lin** fournie par Vandeputte Oleochemicals (Belgique) est une huile raffinée. Dès réception, l'huile de lin est aliquotée en flacon de 50 mL, passée sous flux d'azote puis conservée à 4°C afin d'éviter tout risque d'oxydation. Après chaque prélèvement, l'huile est systématiquement passée sous flux d'azote et un indice de peroxyde est déterminé régulièrement afin de vérifier l'état d'oxydation primaire de la matière première. L'**huile de tournesol oléique** provient de chez Mme Josiane Mondon (France) et l'huile arachidonique de chez Lesieur.

Les compositions en acides gras des huiles utilisées sont présentées dans le Tableau 11.

**Tableau 11 : Composition en acides gras (moles %) de l'huile de lin et de tournesol oléique**

<b>Acides gras (moles %)</b>	<b>Huile de lin</b>	<b>Huile de tournesol oléique</b>
<b>12:0</b>	0,02	0,00
<b>14:0</b>	0,32	0,02
<b>15:0</b>	0,07	0,00
<b>16:0</b>	5,08	3,14
<b>16:1 t</b>	0,00	0,00
<b>17:iso</b>	0,08	0,00
<b>16:1 n-9</b>	0,08	0,06
<b>16:1 n-7</b>	1,21	0,10
<b>17:0</b>	0,06	0,00
<b>17:1</b>	0,02	0,00
<b>18:0 iso</b>	0,00	0,00
<b>18:0</b>	4,05	1,88
<b>18:1 t</b>	0,00	0,00
<b>18:1 n-9</b>	18,53	89,26
<b>18:1 n-7</b>	0,78	1,51
<b>18:2 tt + 9c13t</b>	0,11	0,00
<b>18:2 ct</b>	0,33	0,00
<b>18:2 tc</b>	0,18	0,00
<b>18:2 n-6</b>	15,52	2,73
<b>18:3 n-6</b>	0,35	0,00
<b>18:3 t n-3</b>	6,27	0,00
<b>18:3 n-3</b>	46,03	0,03
<b>20:0</b>	0,13	0,15
<b>20:1 n-9</b>	0,16	0,24
<b>20:1 n-7</b>	0,04	0,00
<b>20:2 n-9</b>	0,05	0,00
<b>20:2 n-6</b>	0,05	0,00
<b>20:3 n-9</b>	0,22	0,00
<b>20:3 n-6</b>	0,02	0,00
<b>20:4 n-6</b>	0,04	0,00
<b>22:0</b>	0,11	0,69
<b>22:1 n-9</b>	0,03	0,00
<b>20:5 n-3</b>	0,00	0,00
<b>22:4 n-6</b>	0,00	0,00
<b>24:0</b>	0,07	0,19
<b>22:5 n-6</b>	0,00	0,00
<b>22:5 n-3</b>	0,00	0,00
<b>22:6 n-3</b>	0,00	0,00
<b>Σ AGS</b>	9,98	6,07
<b>Σ AGMI</b>	20,85	91,17
<b>Σ AGPI</b>	62,28	2,76
<b>Σ AGPI n-6</b>	15,98	2,73
<b>Σ AGPI n-3</b>	46,03	0,03
<b>Σ AGT</b>	6,89	0,00

AGS = acides gras saturés ; AGMI = acides gras monoinsaturés cis, AGPI = acides gras polyinsaturés cis ; AGT = acides gras insaturés trans.

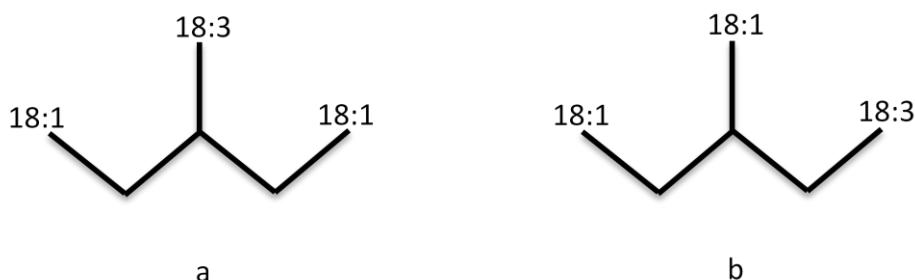
Les teneurs en différents tocophérols de l'huile de lin sont données dans le Tableau 12.

**Tableau 12 : Teneurs en tocophérols de l'huile de lin (mg/Kg d'huile)**

Tocophérols	Teneur (mg/Kg d'huile)
α	10
β	-
γ	329
δ	5

### 1.1.2. Triglycérides structurés

Les TAG structurés ont été synthétisés par E. Vaique (Institut des Sciences Moléculaires, Université Bordeaux 1, CNRS, UMR-5255, Groupe Nanosystèmes Analytiques) et T. Durand (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Université Montpellier 1, Université Montpellier 2, CNRS, UMR-5247) de manière à disposer de TAG dans lesquels l'ALA est greffé strictement en position interne (*sn*-2) du triglycéride ou strictement en positions externes (Figure 7). Les principaux résultats relatifs à la mise au point des étapes de synthèse sont présentés en Annexe 1. Les acides gras utilisés pour les synthèses sont purs à 99% pour l'ALA (18:3 n-3) et supérieur à 80% pour l'acide oléique (AO) (18:1 n-9). Les structures glycéridiques sont déterminées par RMN du C<sup>13</sup>, chromatographie liquide haute performance et dosage des acides gras après action de la lipase pancréatique (§ II- 2.1.5). La composition en acides gras est présentée dans le Tableau 13.



**Figure 7 : Représentation schématique des triglycérides structurés : ALA (18:3 n-3) strictement en position interne *sn*-2 (a) et strictement en positions externes (*sn*-1 ou *sn*-3) (b)**

**Tableau 13 : Composition en acides gras majoritaires (moles %) des TAG et structures glycéridiques (moles % par rapport aux trois positions sur le TAG) des triglycérides synthétisés (compositions détaillées, Annexe 2)**

	TAG	sn-2	TAG	sn-2
<i>moles % des acides gras totaux</i>				
<b>18:1 n-9</b>	66,92	0,00	67,30	49,79
<b>18:3 n-3</b>	33,06	100,00	32,50	0,00

### 1.1.3. Lécithines

Deux types de lécithine de soja sont utilisés pour la formulation des émulsions d'huile de lin. La lecimulthin (lécithine 1) provient de chez Cargil et Centrolex D (lécithine 2) de Central Soya. Les compositions en phospholipides des deux lécithines (Tableau 14) sont déterminées selon les protocoles décrits respectivement (§ II-2.1.3 et II-2.1.4.3).

**Tableau 14 : Composition en phospholipides individuels des lécithines de soja utilisées**

Phospholipides (poids %)	Lécithine 1	Lécithine 2
<b>Phosphatidylcholine</b>	12,0	13,2
<b>Phosphatidyléthanolamine</b>	44,5	29,6
<b>Phosphatidylinositol</b>	0,0	24,6
<b>Lysophospholipides</b>	43,5	23,0
<b>Autres</b>	-	9,6

### 1.1.4. Autres produits

Les différents solvants organiques utilisés pour cette étude (isoctane, chloroforme, méthanol...) sont de grade HPLC et proviennent de chez Fisher Scientific (France). Les enzymes utilisées lors des réactions hydrolytiques appliquées aux différents systèmes lipidiques (lipase pancréatique de porc et phospholipase A<sub>2</sub> de *Naja Naja Mossambica*) et la

colipase de pancréas de porc proviennent de chez Sigma (France). Le 1,2 diheptadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphatidylcholine (17:0-PC) de pureté >99%, utilisé pour l'étude relative aux Caco-2 provient de chez Larodan (France). L'α-tocophérol (pureté 95%) provient de chez Sigma (France). Les sels biliaires utilisés pour la micellisation des lipides sont issus d'extrait de bile de porc (Sigma), la composition est présentée Tableau 15.

**Tableau 15 : Composition en sels biliaires (poids %) de l'extrait de bile porcine (données fournies par Sigma)**

Sels biliaires	Poids %
<b>Acide cholique</b>	8-9,5%
<b>Acide déoxycholique</b>	0,9-1,1%
<b>Acide cholique conjugué</b>	32-36%
<b>Acide deoxycholique conjugué</b>	11-13%

## 1.2. Les modèles biologiques

### 1.2.1. Modèle cellulaire : les cellules Caco-2

Les cellules utilisées sont des cellules épithéliales intestinales issues d'un adénocarcinome iléo-caecal humain (Caco-2) fournies par l'ATCC (Molsheim, France), réceptionnées au passage 18 (P<sub>18</sub>).

#### 1.2.1.1. Composition du milieu de culture

Le milieu de culture employé est un milieu synthétique d'Eagle Modifié par Dulbecco « Dulbecco's Modified Eagle's Medium » (DMEM) supplémenté par 25 mM de glucose. Ce milieu est complété à 10% (v/v) par du sérum de bœuf fœtal (SBF) indispensable à la croissance et à la multiplication cellulaire. Le SBF est préalablement incubé 1 heure à 56°C afin d'inactiver le système du complément (décomplémentation). En effet, ce dernier pourrait détruire les cellules dans le cas où le SBF contiendrait des anticorps pouvant reconnaître les cellules cultivées (activation de la voie classique). Un mélange de pénicilline (100 U/ml)/streptomycine (100 µg/mL) (1%) est ajouté afin de se prémunir de toute contamination microbienne, ainsi qu' 1% d'une solution de L- Glutamine 200 mM (Sigma,

France) nécessaire à la multiplication cellulaire. Le milieu est alors dénommé « milieu complet ».

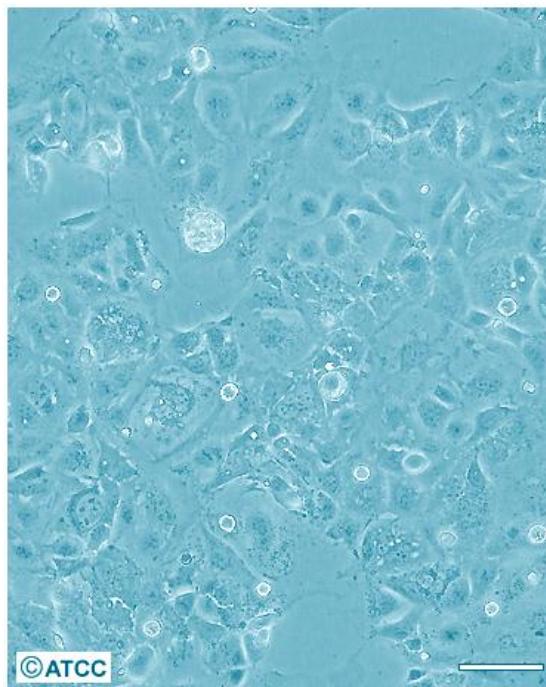
#### **1.2.1.2. Culture des cellules Caco-2**

##### *a. Ensemencement des cellules*

Dès réception, les cellules Caco-2 de 18 passages ( $P_{18}$ ) conservées dans 1:10 de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 20% de SBF, sont stockées à -80°C en attente des manipulations. La décongélation des cellules s'effectue à 37°C puis les cellules sont récupérées après deux rinçages à l'aide d'1 mL d'une solution tampon Phosphate Salin (PBS ; 0,01M ; pH 7,4). Les cellules sont, après centrifugation (Sorval ST 40R, Thermo ; 2°C, 5 min, 1120 g) resuspendues dans 20 mL de milieu complet supplémenté à 20% de SBF. Les cellules sont alors cultivées pour leur multiplication en monocouche, dans des boîtes en polystyrène 25 ou 75 cm<sup>2</sup> de surface dans du milieu complet (10 ou 20 mL, respectivement), à 37°C, sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.

##### *b. Repiquage des cellules*

Les repiquages sont réalisés tous les 2 jours correspondant au temps maximal où les cellules arrivent à confluence (Figure 8). Pour cela, les cellules sont rincées avec une solution tampon Phosphate Salin sans magnésium ni calcium (PBS ; 0,1 M ; pH 7,2) puis détachées par trypsination (trypsine/EDTA ; 0,5 g/mL/0,2 mg/mL) 7 minutes sous incubation à 37°C. La réaction enzymatique est stoppée par ajout de PBS. Les cellules détachées sont centrifugées (Sorval ST 40R, Thermo ; 2°C, 5 min, 1120 g) puis remises en suspension dans du milieu complet. La suspension cellulaire est répartie dans des boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> contenant 20 mL de milieu complet, placées dans l'incubateur pour que les cellules adhèrent au support et se multiplient.



**Figure 8 : Observation microscopique optique (x 40) de cellules Caco-2 à confluence ; la barre d'échelle représente 100 µm, source ATCC**

Au cours de cette étude, nous nous sommes limités à un nombre de passages inférieur à 40. En effet, au-delà de 40 passages, différentes activités et fonctions cellulaires peuvent être altérées (Lu et al. 1996 ; Briske-Anderson et al. 1997).

### 1.2.2. Modèle animal : le rat

Les études relatives à l'absorption intestinale et plasmatique de l'ALA sont menées sur des rats mâles Wistar âgés de 8 semaines (300 g) (Elevage Janvier). À réception, les rats sont placés à raison de deux animaux par cage et mis sous régime normocalorique et normolipidique pendant 4 jours pour acclimatation. Ils sont ensuite placés sous alimentation alipidique pendant les 24 heures précédant les interventions pour les études d'absorption au niveau de la lymphe ou du plasma postprandial ; et disposent d'eau à volonté. Les cages sont entreposées dans une pièce prévue à cet effet où les conditions de température et d'hygrométrie sont contrôlées quotidiennement par un thermo-hygromètre. L'éclairage est contrôlé afin d'établir un cycle jour/nuit de 12 h/12 h.

## 2. METHODES

### 2.1. Caractérisation des lipides

#### 2.1.1. Extraction des lipides totaux selon la méthode de Folch

Les lipides totaux contenus dans les milieux biologiques (lymphé et plasma) sont extraits selon la méthode de Folch (Folch et al. 1957) en utilisant un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) à raison de 20 volumes par volume de matériel. Au terme d'une heure d'agitation, 0,2 volume de KCl (0,8% dans l'eau) par volume du mélange d'extraction est ajouté pour permettre la séparation des phases hydroalcoolique et chloroformique. Le mélange est mis sous agitation pendant 5 minutes avant d'être centrifugé (Sorval ST 40R, Thermo ; 4°C, 5 min, 1120 g). La phase chloroformique est récupérée et lavée trois fois par un volume équivalent de la phase hydroalcoolique précédemment éliminée ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{KCl}$  à 0,8% (3/48/47 ; v/v/v)). La phase chloroformique finale est "éclaircie" par ajout de méthanol puis filtrée sur papier pasteur en utilisant un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Le filtrat est séché par un évaporateur rotatif, mis en solution dans du chloroforme, refiltré en utilisant du chloroforme sur un filtre Whatmann afin d'éliminer toute trace d'eau puis évaporé sous courant d'azote. L'extrait sec est remis en solution dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) et conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'aux analyses.

#### 2.1.2. Séparation des fractions lipidiques par chromatographie sur couche mince et extraction

Les différentes fractions lipidiques contenues dans les lipides totaux sont séparées par chromatographie sur couche mince (CCM). Des plaques en verre de 20 x 20 cm sont recouvertes d'un film Silicagel 60H (Merck) d'épaisseur 0,35 mm, activées dans une étuve à  $110^{\circ}\text{C}$  pendant 1 h puis stockées à  $80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. La CCM est utilisée pour séparer différents types de fractions lipidiques et les mélanges de solvants sont adaptés selon les espèces de lipides à séparer (Tableau 16).

**Tableau 16 : Composition des solvants de migration selon les espèces chimiques à séparer**

Solvants	Mélange solvants (vol)	Séparation
<b>Hexane/oxyde d'éthyle/acide acétique</b>	80/20/1	PL, Stérols, 2-MAG, DAG, AGL, TAG, esters de cholestérol
<b>Chloroforme/méthanol/eau distillée</b>	65/25/4	Lyso-PL et AGL
<b>Chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau distillée</b>	50/20/10/10/5 (1 <sup>ère</sup> migration)	Classes de phospholipides individuels dont PI
<b>Butanol/acide acétique/eau distillée</b>	60/20/20 (2 <sup>ème</sup> migration)	
<b>Chloroforme/méthanol/acide acétique/eau distillée</b>	75/45/12/6	Classes de phospholipides individuels sauf PI
<b>Hexane/oxyde d'éthyle/acide formique</b>	70/30/1	AGL, 2-MAG, DAG, TAG

AGL = acides gras libres, MAG = monoacylglycérols, DAG = diacylglycérols; TAG = triacylglycérols, PL : phospholipides, PI : phosphatidylinositol

Les différentes fractions lipidiques sont visualisées sous lampe UV à 254 nm après vaporisation préalable d'une solution éthanolique de 2,7-dichlorofluorescéine (DCF ; 0,2% en poids). Les zones fluorescentes correspondant aux différentes fractions lipidiques sont identifiées à l'aide des rapports de front des standards lipidiques chromatographiés dans les mêmes conditions et sur la même plaque.

Les fractions lipidiques d'intérêt sont extraites du gel de silice par deux fois en utilisant un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Les phases organiques sont regroupées, puis évaporées sous azote. Les extraits secs sont ensuite repris par 2 mL de chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) et 0,4 mL de solution aqueuse de KCl à 0,8%. La phase chloroformique est récupérée puis lavée par un mélange chloroforme/méthanol/KCl à 0,8% (3/48/47 ; v/v/v) en vue d'éliminer la DCF. La phase chloroformique finale contenant les

lipides est séchée sous azote, reprise dans un volume de chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) puis stockée à –20 °C sous azote en attente des analyses.

### 2.1.3. Dosage des phospholipides par la méthode de Ames

La teneur en PL est obtenue par dosage colorimétrique du phosphore selon la méthode de Ames (Ames 1966). Une partie aliquote des extraits lipidiques, correspondant à 1 à 40 nano-atomes de phosphore est introduite dans un tube en verre Pyrex. Après évaporation du solvant sont ajoutés 100 µL d'eau bi-distillée et 60 µL de nitrate de magnésium éthanolique (10% ; poids/v) pour une minéralisation à la flamme. Afin de décomposer les pyrophosphates éventuellement formés lors de la minéralisation, 300 µL d'HCl 0,5 N sont ajoutés, les tubes sont ensuite placés au bain marie à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, la coloration est obtenue par addition de 700 µL d'un mélange (1/6 ; v/v) d'acide ascorbique (10% dans l'eau ; poids/v)/molybdate d'aluminium (3,4 mM dans l'acide sulfurique 1 N). Les échantillons sont placés au bain marie dont la température est fixée à 45°C. Après 20 minutes, la densité optique (DO) est lue au spectrophotomètre (Lambda Bio-20, Perkin Elmer) à une longueur d'onde de 820 nm, contre un "blanc" (même traitement sans extrait lipidique).

La quantité de PL est déterminée à partir d'une gamme étalon d'une solution de phosphate de potassium (1 mM) minéralisée et dosée dans les mêmes conditions que les échantillons.

### 2.1.4. Analyse de la composition en acides gras des lipides

#### 2.1.4.1. Technique de Vigneron

Cette technique dite « rapide » permet l'analyse de la composition en acides gras totaux issus directement de l'huile contenant exclusivement des TAG (Vigneron et al. 1973). Un échantillon correspondant à 10 mg de corps gras est dissout dans 3 mL d'isooctane et 0,2 mL de soude 2 N. L'échantillon est chauffé 3 fois, 30 secondes à 50°C afin d'hydrolyser et de méthyler en totalité les acides gras des TAG. La réaction est stoppée par acidification (ajout de 0,2 mL d' HCl méthanolique 2 N). Après centrifugation, la phase organique contenant les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) est prélevée, lavée par 1 mL d'eau, puis analysée directement par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (§ II-2.1.4.4).

#### 2.1.4.2. Technique de Lepage et Roy

La technique de Lepage et Roy (Lepage & Roy 1986) est utilisée préférentiellement sur des échantillons aqueux. Un volume équivalent à 100 µL d'échantillon est placé dans un tube à fermeture hermétique. 2 mL d'un mélange méthanol/isooctane (4/1 ; v/v) et 0,2 mL de chlorure d'acetyl sont ajoutés, et le tube fermé. Au terme d'1 heure d'incubation à 100°C, 5 mL d'une solution de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 6% en poids) sont lentement introduits dans le tube refroidi dans la glace. Après centrifugation (Sorval ST 40R, Thermo ; 4°C, 5 min, 1120 g), la phase organique contenant les EMAG est prélevée puis analysée directement par CPG (§ II-2.1.4.4).

#### 2.1.4.3. Technique de Morrison et Smith

La technique de Morrison et Smith (Morrison & Smith 1964) est utilisée sur des extraits de Folch contenant différentes espèces lipidiques. L'extrait de Folch est séché sous flux d'azote, additionné de 0,5 mL d'isooctane puis vortexé, et enfin traité par 1 mL d'une solution de trifluorure de bore à 14% dans le méthanol (poids/v). Après fermeture hermétique des tubes, la transméthylation des échantillons est réalisée dans un bain d'huile à 100°C dont le temps d'incubation varie selon la fraction lipidique considérée (Tableau 17). Après refroidissement, et ajout d'1 mL d'eau, les EMAG sont extraits par trois fois par 2 mL d'isooctane. L'ensemble des phases organiques est concentré puis lavé par 1 mL d'eau distillée. Les EMAG contenus dans la phase organique finale sont stockés à -20°C en attente de leur analyse par CPG.

**Tableau 17 : Temps de méthylation à 100°C selon la fraction lipidique considérée**

Fraction lipidique	Temps de méthylation (min)
Acides gras libres	10
Triglycérides	60
Monoglycérides	45
Phospholipides sans sphingomyéline	20
Phospholipides avec sphingomyéline	90

#### 2.1.4.4. Conditions chromatographiques pour l'analyse des EMAG

Les EMAG sont analysés par CPG. Le chromatographe (Trace, Thermo électron) est équipé d'une colonne capillaire BPX 70 (SGE) de silice greffée hautement polaire (longueur = 60 m, diamètre interne = 0,25 mm, épaisseur film = 0,25 µm) et d'un détecteur à ionisation de flamme couplé à un intégrateur-enregistreur chromjet SP-4400 (Spectra Physics). L'injecteur et le détecteur sont soumis à une température de 250°C et 280°C, respectivement, la pression d'entrée du gaz vecteur (hydrogène débit = 1 mL/min) est fixée à 1 Bar. Le volume de solution injecté varie de 1 à 3 µL en mode split (rapport de fuite = 1/80). La programmation de température de colonne est la suivante : de 150°C, la température augmente à 1,3°C/min jusqu'à 200°C. Cette température est maintenue 30 minutes avant de ré-augmenter à raison de 20°C/min jusqu'à 225°C, température maintenue pendant 30 minutes.

L'identification des acides gras des échantillons est obtenue par comparaison des temps de rétention avec ceux d'étalons Sigma chromatographiés dans les mêmes conditions et sur le même chromatographe que ceux des échantillons. La quantification pondérale des EMAG issus des TAG est obtenue à partir de trimyristoléine (tri 14:1), standard interne additionné à l'échantillon, en quantité précisément mesurée, avant toute manipulation. Dans le cas de la quantification des EMAG des PL, le standard interne est la 1,2 dipentadecanoyl-glycero-phosphocholine (C15:0-PC).

#### 2.1.5. Analyse de la structure des triglycérides

La détermination du profil en acides gras de la position *sn*-2 et des positions *sn*-1+ *sn*-3 des TAG est obtenue par méthode enzymatique. La lipase pancréatique est une glycéro-ester-hydrolase spécifique des liaisons esters carboxyliques en position *sn*-1 et *sn*-3 des triglycérides. A partir de l'hydrolyse complète d'une molécule de TAG, deux molécules d'acides gras libres, et une molécule de 2-monoglycéride sont libérées. Des molécules de diglycérides sont présentes si l'hydrolyse est incomplète (Figure 9).

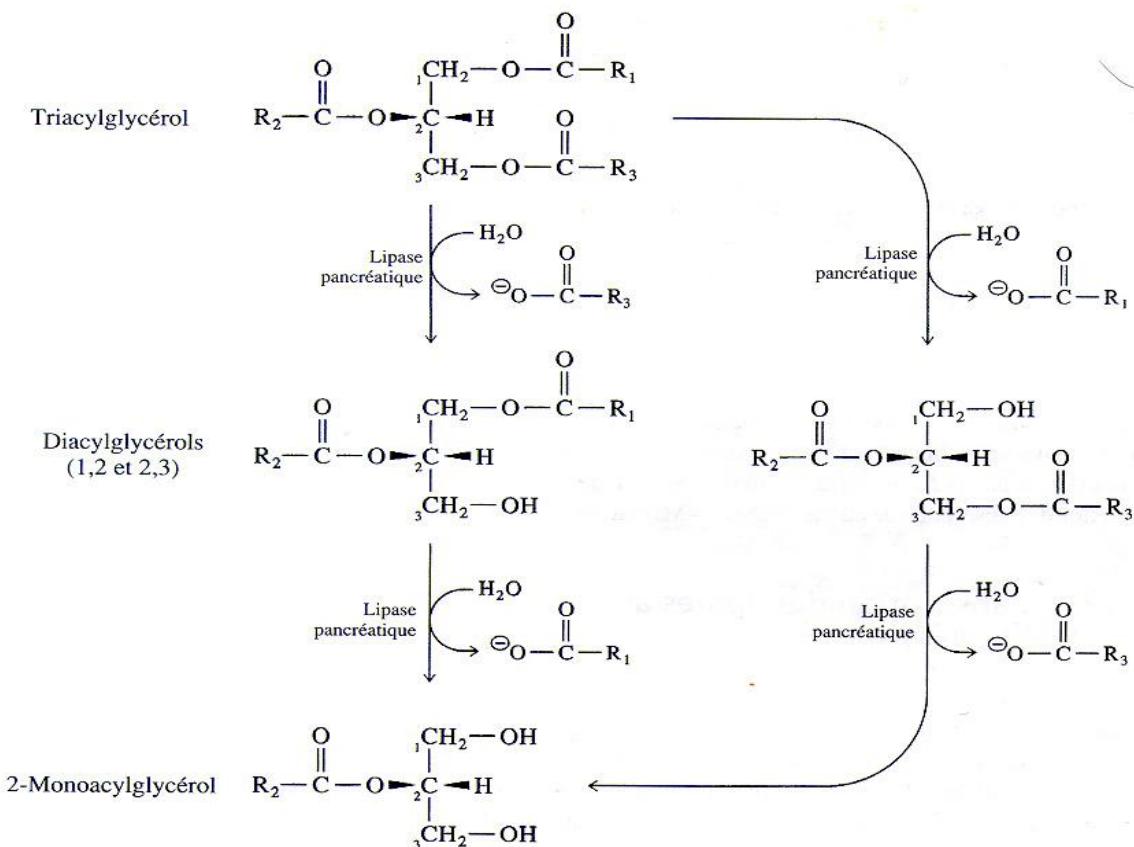


Figure 9 : Action schématique de l'hydrolyse des TAG par la lipase pancréatique humaine

Un équivalent de 15 mg d'huile est soumis à 2 mL de solution lipasique (lipase pancréatique de porc ( $1U=1 \mu Eq AG/h$ ) pH 7,4 à 37°C ; Sigma), 0,5 g de lipase/mL de solution tampon Tris/HCl (1 M, pH 8), en présence de 0,5 mL de déoxycholate de sodium (1 g/L) et de 0,2 mL de  $CaCl_2$  (220 g/L). Le mélange est incubé 1 minute à 40°C puis 2 minutes à température ambiante sous agitation manuelle continue. La réaction est stoppée par acidification (1 mL d'HCl 6 N) et le déphasage initié par l'addition de 3 mL d'oxyde d'éthyle. La phase éther contenant les produits de dégradation des TAG (2-MAG, AGL, et DAG) est prélevée puis déposée sur CCM après concentration (§ II-2.1.2). Après séparation des 2-MAG (Tableau 16), les EMAG correspondants sont obtenus selon la technique de Morrison et Smith (§ II-2.1.4.3) et analysés par CPG (§ II-2.1.4.4).

Les proportions (moles %) de l'acide gras sur les positions interne et externes des TAG sont calculées à partir de l'acide gras considéré présent dans les 2-MAG et dans les TAG totaux (Tableau 18).

**Tableau 18 : Estimation de la répartition de l'acide gras entre la position interne (*sn*-2) et les positions externes (*sn*-1 et *sn*-3) des triglycérides**

Répartition*	Formule
<b>En position <i>sn</i>-2</b>	$\frac{x \times 100}{X \times 3}$
<b>En position <i>sn</i>-1 + <i>sn</i>-3</b>	100- (% en <i>sn</i> -2)

Où *x* représente le pourcentage de l'acide gras au sein des 2-MAG  
et *X* le pourcentage de l'acide gras dans les TAG

---

\*: en % par rapport à l'ensemble des positions *sn*-2 + (*sn*-1 + *sn*-3)

## 2.2. Préparation et caractérisation des systèmes lipidiques

### 2.2.1. Préparation des systèmes lipidiques

#### 2.2.1.1. Emulsion de type huile dans eau (o/w)

L'émulsification est le procédé de préparation des émulsions dont le but est d'obtenir, à partir de deux liquides non miscibles, une dispersion de gouttes fines d'un liquide dans l'autre. Ceci implique la déformation puis la fragmentation d'une goutte en plusieurs autres gouttes plus petites. L'émulsion réalisée dans cette étude utilise le système turbulent. Il permet de fragmenter les gouttes par cisaillement (homogénéiseur Ultra-Turrax, T25-Janke & Kunkel) mais les collisions très énergétiques peuvent provoquer des phénomènes de recombinaison (coalescence) ce qui implique une large fenêtre de distribution de la taille des gouttelettes. Les émulsions de type huile dans eau sont stabilisées chacune par un type de lécithine ou de la 17:0-PC et du déoxycholate de sodium. Le Tableau 19 présente la composition des trois formulations. Les émulsifiants sont préalablement dissous dans la phase huileuse.

Une émulsion brute est obtenue manuellement en versant l'huile dans l'eau sous agitation. Le diamètre des globules gras est ensuite affiné à l'Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, équipé d'un axe générateur (10 mm S25-N-10G - IKA)). La vitesse d'agitation est fixée à 9,5 tours/min pendant 5 minutes. Cette étape d'émulsification est réalisée sous courant d'azote pour éviter tout risque d'oxydation pour limiter les phénomènes d'oxydation.

**Tableau 19 : Formulation (poids %) des deux émulsions de l'étude**

Poids %	Emulsion 1	Emulsion 2	Emulsion 3
	Lécithine de soja	Lécithine de soja	17:0-PC
<b>Huile de lin</b>	43	46	46
<b>Déoxycholate de sodium</b>	19	21	21
<b>Emulsifiant</b>	15	8	8
<b>Eau distillée</b>	23	25	25

#### 2.2.1.2. Micelles mixtes lipides/sels biliaires

**Dans le cas de l'huile de lin en phase continue,** les micelles mixtes lipides/sels biliaires (SB) sont obtenues après une digestion *in vitro* reproduisant les conditions *in vivo* lors de la digestion intestinale des globules gras selon le protocole de Glahn (Glahn et al. 1998). Quinze mg d'huile de lin sont, dans un premier temps, soumis à une hydrolyse enzymatique par la lipase pancréatique selon le protocole décrit § II-2.1.5. Les produits d'hydrolyse issus de l'action enzymatique sont séchés sous azote avant mise en contact avec les sels biliaires pour les expériences de micellisation.

**Dans le cas des émulsions d'huile de lin,** la présence de lécithine de soja ou de 17:0-PC nécessite une étape de digestion enzymatique par la PLA<sub>2</sub>. Cette enzyme hydrolytique est spécifique de la position interne (*sn*-2) des PL, libérant un acide gras et un lyso-phospholipide (Lyso-PL). Cette étape enzymatique est réalisée avant celle de la lipase pancréatique car en sa présence, l'activité *in vitro* de la PLA<sub>2</sub> est inhibée (Borgström 1980). Nous avons donc dans un premier temps hydrolysé 80 mg d'émulsion par 300 µg de PLA<sub>2</sub> (19 unités/mL d'émulsion) de *Naja Mosambica Mosambica* (Sigma 1900 UI/mg de produit ; pureté 80%) en présence d'éther pur (1 mL) à 30°C. Après 50 minutes, l'éther est évaporé sous azote et les extraits lipidiques secs repris dans de l'isoctane. Après l'hydrolyse des PL en Lyso-PL et AGL, celle des TAG peut alors être réalisée par action de la lipase pancréatique. Les produits d'hydrolyse issus de l'action enzymatique sont séchés sous azote avant mise en contact avec les sels biliaires pour les expériences de micellisation.

### 2.2.2. Suivi de la micellisation des systèmes lipidiques par les sels biliaires

La micellisation des produits issus de la lipolyse de l'huile ou des émulsions huile dans eau est suivie par turbidimétrie. Cette méthode est basée sur la propriété des systèmes colloïdaux à diffuser la lumière et rend compte de la morphologie des agrégats (taille et forme) par spectrophotométrie. Les mesures de DO sont réalisées à une longueur d'onde de 400 nm (Lambda Bio-20, Perkin Elmer). Cette longueur d'onde correspond à l'absence de bande d'absorption des lipides (Glick & Ryder 1987). Les mélanges de lipides/sels biliaires sont préparés par l'ajout de 10 mL d'une solution de sels biliaires (PM = 480 g/mol) de concentrations variant de 5 à 70 mM et ce pour différentes concentrations de lipides (PM = 775 g/mol) variant de 0,5 à 5 mM. Les mélanges lipides/sels biliaires sont mis à l'équilibre, sous agitation, à 25 ou 37°C, de manière à obtenir des valeurs de turbidité stables. L'état micellaire est considéré comme atteint lorsque la mesure de la turbidité est quasi-nulle.

Pour chaque concentration lipidique ( $[lip]_{tot}$ ), une courbe de solubilisation est obtenue par le tracé de la DO en fonction de la concentration totale en sels biliaires ( $[SB]_{tot}$ ). Le point de solubilisation correspond à la quantité de sels biliaires telle que l'addition de tensioactif n'affecte plus la valeur de turbidité (Lichtenberg et al. 1979). À ce stade de solubilisation, la concentration de molécules de sels biliaires qui n'est pas associée aux lipides ( $[SB]_{bulk}$ ) et le rapport moléculaire des sels biliaires et des lipides dans les micelles mixtes ( $[SB / lip]_{mic}$ ) sont donnés par l'équation suivante :

$$[SB]_{tot} = [SB]_{bulk} + [SB/Lip]_{mic} \times [lip]_{tot}$$

Par analyse de régression linéaire, la concentration en SB dans la phase aqueuse continue ( $[SB]_{bulk}$ ) est déterminée par l'extrapolation au zéro de la concentration totale en lipides en phase continue et  $[SB / Lip]_{mic}$  à partir de la pente des courbes.

### 2.2.3. Caractérisation physique des émulsions

Les émulsions sont soumises à des variations de pH (entre 1,5 et 7,3), des temps de séjour gastriques (2 - 3 h) et deux températures (25 et 37°C) (Tableau 20).

**Tableau 20 : Conditions physico-chimiques testées sur le comportement des émulsions**

Milieu	Initial	Gastrique	Intestinal
pH	pH 7,2	pH 1,5	pH 7,3
Temps de séjour (h)	0	3	2
Températures (°C)	25	25	25
	-	37	37

#### 2.2.3.1. Microscopie en contraste de phase

L'homogénéité de la taille des globules gras et la stabilité des gouttelettes lipidiques en termes de coalescence ou d'agrégation des globules lipidiques, sont évaluées de manière qualitative en microscopie optique en contraste de phase. Cette technique est pertinente dès lors que la taille des objets à observer est supérieure à 200 nm. Le microscope utilisé est un microscope inversé IM35 (Karl Zeiss), équipé d'un dispositif à contraste de phase de Zernicke. Le contraste de phase permet l'observation d'objets peu absorbants, présentant un indice de réfraction différent de celui du milieu environnant. Un objectif de grossissement 100 et d'ouverture numérique de 1,25 est utilisé. Une caméra vidéo équipée d'un dispositif à augmentation analogique de contraste C2400-7 (Hamatsu Photonics) permet de visualiser et d'enregistrer les images vidéo qui sont ensuite numérisées (DEC3000, Digital).

#### 2.2.3.2. Mesure de taille par diffusion de la lumière

Le diamètre moyen des globules d'huile de l'éulsion huile dans eau et des micelles mixtes lipides/sels biliaires est déterminé par diffusion statique de la lumière (granulomètre Mastersize S.Ver.215, Malvern) doté d'un laser Hélium-Néon. Le principe de cette mesure est basé sur la théorie de Mie selon laquelle « *une lumière laser qui éclaire une particule n'est pas seulement diffractée mais aussi réfléchie et diffusée* ». La quantité de lumière déviée et l'importance de l'angle de déviation permettent de mesurer la taille des particules.

## 2.2.4. Caractérisation chimique des systèmes lipidiques

### 2.2.4.1. Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde (IP) est une mesure des produits d'oxydation primaires, les peroxydes (ROOH). L'indice de peroxyde est réalisé selon le protocole décrit dans la méthode de l'union internationale de chimie pure et appliquée (IUPAC) 2.501. Il correspond à la masse d'oxygène actif ( $O^{\circ}$ ) contenue dans un gramme de corps gras et oxydant l'iodure de potassium avec libération d'iode, selon la réaction suivante :



Pour chaque dosage, 2 g d'huile sont solubilisés dans 10 mL de chloroforme et 15 mL d'acide acétique. La réaction est initiée par l'ajout d'1 mL d'une solution aqueuse d'iodure de potassium à 1,5 g/mL. L'ensemble est agité 1 minute vigoureusement et placé 5 minutes à l'obscurité. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout d'eau distillée puis le dosage est réalisé en présence d'un indicateur coloré (Iotect). La titration est réalisée par une solution de thiosulfate de sodium à 0,01 N ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ). Le volume correspondant au virage de l'indicateur coloré du violet au blanc opaque permet de déterminer la concentration en peroxydes.

L'IP est calculé en fonction du volume (V) de la solution de thiosulfate de potassium (mL) versée, de la concentration C du titrant (mol/L) et de la quantité de matière (m) lipidique (g) :

$$\text{IP} = \frac{V \times C}{m} \times 1000$$

Le volume V tient compte de la présence éventuelle d'oxygène actif dans les réactifs utilisés pour le dosage.

### 2.2.4.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à l'espace de tête

Les étapes de terminaison des réactions d'oxydation radicalaire génèrent des produits secondaires dont des aldéhydes volatils. Ces aldéhydes sont détectables et quantifiables par CPG couplée à l'espace de tête. Parmi ces aldéhydes volatils, le propanal dérive

spécifiquement de l'oxydation des acides gras n-3. D'autres aldéhydes comme l'hexanal ou le pentanal dérivent de l'oxydation des acides gras n-6.

Un volume correspondant à 1 mL (huile de lin émulsionnée ou non) est placé dans un flacon de 10 mL hermétiquement scellé de sorte que le rapport entre le volume d'huile et celui de l'air (espace de tête) soit similaire ( $R \approx 0,1$ ) pour chaque échantillon (Tableau 21). Les aldéhydes mesurés dans l'espace de tête représentent la part à l'équilibre entre la phase liquide et la phase air.

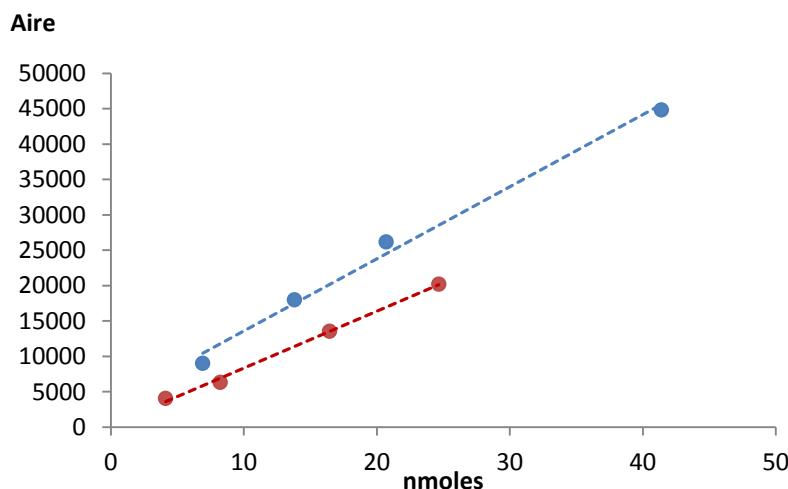
**Tableau 21 : Volumes d'huile ou d'émulsion utilisés pour la détermination des composés volatils dans l'espace de tête**

	Huile	Emulsion à 46% d'huile (poids)
<b>Volume de produit (mL)</b>	1,00	2,00
<b>Volume d'huile correspondant (mL)</b>	1,00	1,00
<b>Volume d'air (mL)</b>	9,00	8,00
<b>Rapport <math>V_{\text{huile}} / V_{\text{air}}</math></b>	<b>0,11</b>	<b>0,12</b>

Le flacon est incubé à 37°C pendant des temps variant de 0 à 48 h. Au terme du temps d'incubation imparti, un volume de 2 mL de l'espace de tête est prélevé puis injecté automatiquement dans le chromatographe CPG-HS (Triplus Serial TP100, Thermo Fisher scientific) couplé à un injecteur Triplus. Les aldéhydes sont séparés sur colonne capillaire polaire (DB 1701, Agilent ; longueur = 30 m, diamètre interne = 0,32 mm, épaisseur film = 1 µm). Le rapport de fuite est de 1/80. Les températures de l'injecteur et du détecteur à ionisation de flamme sont fixées à 250°C et 280°C respectivement. Le programme de température appliqué à la colonne est le suivant : la température est maintenue à 40°C pendant 5 minutes. Elle augmente ensuite à 10°C/min jusqu'à 150°C, puis directement, à 20°C/min jusqu'à 250°C, température maintenue pendant 10 minutes. La pression d'entrée du gaz vecteur (hydrogène débit = 1 mL/min) est fixée à 0,4 Bar. Les résultats obtenus sont exploités à l'aide du logiciel Chromquest inhérent à la CPG où, pour chaque échantillon, aldéhydes sont identifiés par leur temps de rétention et leurs aires respectives quantifiées à

l'aide de gammes d'étalonnage. Ces gammes sont réalisées dans les mêmes conditions que les échantillons, excepté leur temps d'incubation (30 minutes), à partir de solutions standards d'aldéhydes purs (propanal et hexanal) dissous dans une phase huileuse de tournesol oléique (Figure 10).

D'autre part, les effets d'une supplémentation en  $\alpha$ -tocophérol (0, 5, 6, 7 et 9 moles %) sont étudiés sur la stabilité oxydative de l'huile de lin en phase continue, sur une période d'incubation de 24 heures à 37°C.



**Figure 10 : Gammes étalon du propanal (---) et de l'hexanal (- - -) réalisées dans l'huile de tournesol oléique en émulsion**

Les analyses sont réalisées sur les échantillons suivants :

- L'huile de lin en phase continue
- L'huile de lin en phase continue supplémentée en différentes concentrations d' $\alpha$ -tocophérol (0 à 9 moles %)
- L'huile de lin en émulsion (45% d'huile dans l'eau)

#### 2.2.5. Activité de la lipase pancréatique sur les systèmes lipidiques

L'activité de la lipase pancréatique vis-à-vis de son substrat est déterminée par la technique du pHstat (Desnuelle 1961). La technique consiste à mesurer, en fonction du temps, le volume d'une solution de soude qu'il est nécessaire d'ajouter au système réactionnel pour neutraliser les acides gras libérés par l'hydrolyse enzymatique des TAG et, ainsi, maintenir le pH constant (pH 8, pH optimal de l'enzyme).

L'activité de la lipase se produisant à l'interface lipides/eau, les TAG de l'huile de lin en phase continue sont préalablement émulsionnés par une solution de NaCl (100 mmol/L) en présence de 33% (v/v) d'une solution de cellulose méthylée (Méthocel à 2% ; poids/v). Dans le cas de l'huile de lin émulsionnée, l'interface nécessaire à l'adsorption de l'enzyme étant déjà présente, l'activité catalytique est mesurée directement. L'influence de l'addition de colipase (2, 9, 23 et 45 mg/mL) au milieu réactionnel est également testée en présence ou non d'acide gras libres.

La mesure d'activité enzymatique est réalisée à 37°C et à pH 8 en présence de la lipase pancréatique (0,1 g), d'un activateur, le CaCl<sub>2</sub> (5 mmol/L) et de 10 mL d'émulsion (50 % de lipides). Le pHstat (pHstat - Titroline *alpha 10 plus* ; Schott Instrument) est équipé d'un pH-mètre muni d'une électrode combinée et d'une seringue de 50 mL contenant une solution de soude (0,1 N). Le déplacement du piston de la seringue est commandé par le pH-mètre qui détecte la variation de pH qui se produit dans le milieu par la libération des acides gras libres. Le volume de soude versé pour le maintien du milieu réactionnel à pH 8 est intégré toutes les 2 minutes sur 30 minutes de temps de réaction (logiciel Titrisoft, Schott). La courbe de la cinétique enzymatique représente la quantité de soude versée en fonction du temps. La pente de la droite à l'origine permet de calculer le nombre de micromoles de soude ajouté par minute et de définir l'activité lipasique selon la formule suivante :

$$Ac = \frac{C \times a}{P}$$

Avec : Ac : activité lipasique à pH 8 mesurée en mEq/min/g d'enzyme, C : concentration de la solution de soude utilisée pour la titration (mEq/mL), a : pente moyenne (mL soude/min), P : prise d'essai (lipase) en g.

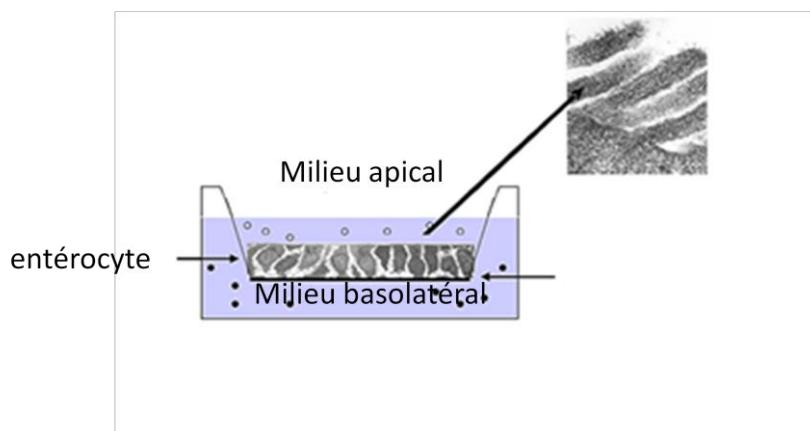
### **2.3. Etude *in vitro* du métabolisme lipidique sur modèle cellulaire humain Caco-2**

#### **2.3.1. Conditions de culture cellulaire sur filtres Transwell®**

La culture des cellules Caco-2 sur filtre semi-perméable permet d'avoir une sécrétion polarisée des lipoprotéines et de délimiter deux compartiments, l'un au pôle apical

correspondant à la lumière intestinale, l'autre au pôle basolatéral représentant le milieu lymphatique/plasmatique (Figure 11). Ce système permet de mimer la situation "*in vivo*" en fournissant des lipides sous forme de micelles, au pôle apical, et de mesurer la sécrétion sous forme de lipoprotéines, du côté basolatéral.

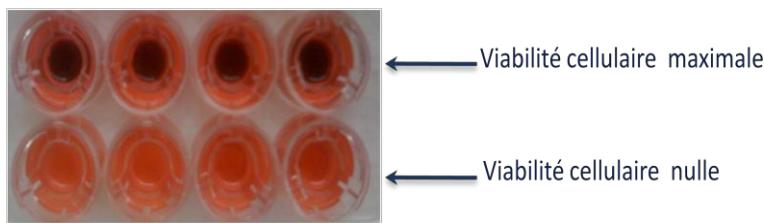
Les cellules Caco-2 sont ensemencées à raison de  $9.10^4$  cellules par  $\text{cm}^2$  dans des boîtes de 12 puits contenant des filtres Transwell® en polycarbonate de 12 mm de diamètre correspondant à  $1,13 \text{ cm}^2$  de surface et de porosité  $0,4 \mu\text{m}$  (PolyLabo-Nunc, Strasbourg, France) contenant 0,5 mL de milieu complet au pôle apical et 1,5 mL au pôle basolatéral. Les milieux sont changés tous les 2 jours. La densité cellulaire est estimée par comptage au bleu de trypan (0,05 % dans du PBS) en cellule de Nauebauer : les cellules viables ne fixent pas le colorant.



**Figure 11 : Représentation schématique des compartiments accessibles grâce à la technique de culture cellulaire sur filtre Transwell®**

### 2.3.2. Viabilité cellulaire

La viabilité des cellules Caco-2 est déterminée à l'aide d'un test colorimétrique selon la technique de Mosmann (Mosmann 1983). Le réactif utilisé est le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tétrazolium). Le cycle de tétrazolium qu'il contient (jaune) est réduit par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes actives, en formazan (bleu) (Figure 12). L'intensité de la coloration mesurée par l'absorbance à 595 nm est proportionnelle à leur activité métabolique.



**Figure 12 : Observation de la viabilité cellulaire de cellules Caco-2 sur filtres Transwell® après coloration au MTT**

Un volume de 0,5 mL d'une solution de MTT (0,5% dans un mélange DMEM) est additionné au pôle apical des cellules et 1,5 mL au pôle basolatéral. Après 4 heures d'incubation à 37°C, les puits sont rincés au PBS et l'insert déposé dans une nouvelle plaque de 12 puits contenant 1,5 mL d'isopropanol au niveau du pôle basolatéral et 0,5 mL au niveau du pôle apical des cellules. La plaque scellée au parafilm est entreposée à l'obscurité et à température ambiante. Après une nuit sous agitation douce, 200 µL de la solution d'extraction sont prélevés au travers de l'insert et transférés dans des puits d'une microplaquette (96 puits). Trois prélèvements par puits sont analysés. L'absorbance est mesurée à 595 nm (Lamba Bio 20, Perkin Elmer). La viabilité cellulaire correspond à la différence entre l'absorbance mesurée pour le puits témoin (viabilité 100%) et celle des puits à analyser, en considérant un nombre de cellules par puits similaire.

### 2.3.3. Intégrité des jonctions cellulaires

Lors de la formation du tapis cellulaire, les cellules Caco-2 expriment des complexes de jonction. La mise en place des jonctions cellulaires après 3 semaines de culture est contrôlée par la mesure de la résistance électrique transépithéliale (TEER).

La mesure de la TEER rend compte des mouvements d'eau, d'électrolytes et de solutés variés, en l'absence de potentiel transmembranaire. La résistance résulte de la capacité de la monocouche cellulaire à former une membrane plus ou moins perméable. L'utilisation d'un ohmmètre (Millicell ERS, Millipore, USA) permet la détermination de la résistance qui dépend du degré de confluence et du degré d'interaction entre les cellules.

La mesure de la TEER est effectuée tous les deux jours sur des cellules à confluence. Les électrodes de mesure sont stérilisées avant chaque mesure par immersion dans de l'éthanol (70%) durant 1 h. Avant la mesure, les cellules sont sorties de l'incubateur et placées sous la

hotte à flux laminaire durant 20 min à température ambiante. Cette étape est nécessaire pour s'affranchir, en partie, de la variabilité de la résistance induite par des changements de température et de pH. En effet, durant ce laps de temps, la température du milieu passe de 37°C à 25 ± 1°C et le pH de la solution tampon bicarbonate varie en fonction de la teneur en CO<sub>2</sub> de l'atmosphère. Les électrodes de mesure sont placées de part et d'autre de la paroi de l'insert qui délimite deux milieux. La résistance mesurée résulte de la différence de conductivités de ces deux milieux, dont l'une (conductivité du milieu apical) reste constante et l'autre (conductivité du milieu basolatéral) est fonction de l'état des cellules (degré de confluence, perméabilité membranaire et interactions intercellulaires).

Pour chaque puits, 3 mesures sont effectuées puis moyennées. Après chaque mesure, le milieu des cellules est changé avant de les remettre dans l'incubateur. La valeur minimale pour un épithélium intestinal correctement reconstitué est supérieure à 300 ohm x cm<sup>2</sup>.

#### 2.3.4. Perméabilité membranaire

Lors de la formation du tapis cellulaire, les cellules Caco-2 développent une imperméabilité relative. Cette intégrité est contrôlée par la mesure de la perméabilité membranaire au [<sup>14</sup>C]-mannitol avant expérimentation.

La perméabilité membranaire est évaluée par le passage du mannitol à travers la monocouche de cellules. 0,5 mL d'une solution de [<sup>14</sup>C]-mannitol (0,1 mCi/mL) sont déposés du côté apical des cellules. Après 1 heure d'incubation à 37°C, le milieu côté basolatéral est récupéré dans des fioles de comptage puis complété à 10 mL avec du liquide scintillant (Ready Value, Beckmann). Un témoin est réalisé avec 1,5 mL de milieu complet seul. Un autre témoin contient 1,5 mL de la solution de [<sup>14</sup>C]-mannitol. Les fioles sont entreposées à 4°C pendant 12 heures avant le comptage. La mesure de la radioactivité est réalisée sur 5 minutes dans un compteur de scintillation (Tri-Carb 2800TR, PerkinElmer). La perméabilité apparente ( $P_{app}$ ) du tapis cellulaire est calculée selon la formule suivante :

$$P_{app} = \frac{V}{A \times C_0} \times \frac{dC}{dt}$$

Avec :  $P_{app}$  : perméabilité apparente (cm/sec), V : volume de la solution dans le compartiment basolatéral (1,5 mL), A : surface de la membrane cellulaire ( $1,13 \text{ cm}^2$ ),  $C_0$  : concentration initiale dans le compartiment apical ( $\mu\text{M}$ ),  $dC$  : concentration finale dans le compartiment basolatéral ( $\mu\text{M}$ ),  $dt$  : temps d'incubation (s).

### 2.3.5. Dosage des protéines par la technique de Bradford

La teneur en protéines totales des cellules caco-2 est déterminée selon la méthode colorimétrique au bleu de Coomassie (Bradford 1976) sur chaque puits. Les protéines en présence d'une solution acide de bleu de Coomassie forment un complexe caractérisé par le déplacement du maximum d'absorption du colorant de 465 à 595 nm. Chaque puits cellulaire est rincé avec du PBS puis mis en contact avec 2 mL d'isopropanol. Après 24 heures sous agitation, la solution d'isopropanol de chaque puits cellulaire est séchée sous azote puis reprise par 2 mL d'eau distillée. Un volume correspondant à 30  $\mu\text{L}$  est transféré vers une microplaquette de 96 puits contenant 170  $\mu\text{L}$  de réactif de Bradford®. Trois prélèvements par puits sont analysés. Deux témoins, l'un correspondant à de l'eau distillée seule, l'autre au réactif de Bradford® en présence d'eau distillée, sont réalisés pour chaque microplaquette. L'absorbance est lue à l'aide d'un spectrophotomètre de plaque à 595 nm (Multiskan Ascent, Labsystems). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines dans l'échantillon calculée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée à partir d'une solution à 1 mg/mL de sérum albumine bovine (BSA).

### 2.3.6. Taux de passage entérocytaire des lipides par les cellules Caco-2

L'étude du transport transcellulaire des acides gras à travers une monocouche de cellules Caco-2 est réalisée avec des cellules d'un même lot et pour un nombre de passages compris entre 28 et 35 ( $P_{28} \dots P_{35}$ ). Le milieu de culture est remplacé par du milieu complet dépourvu de SBF 24 heures avant la mise en contact des cellules avec les micelles mixtes de différentes formulations lipidiques. Les micelles mixtes sont préparées selon le protocole décrit § II-2.2.1.2. Le Tableau 22 reporte les formulations et concentrations en lipides testées. Les cellules sont rincées avec du PBS et 0,5 mL de milieu complet contenant les micelles mixtes sont déposés au niveau du pôle apical. Après incubation avec les micelles mixtes, les milieux apical et basolatéral sont récupérés pour analyse.

Deux types d'expériences sont réalisés :

- Une étude en fonction de la concentration en lipides de 0,25 à 5 mM pour un temps d'incubation de 4 heures
- Une étude en fonction du temps (30 minutes à 24 heures) pour une concentration de lipides de 0,25 mM

**Tableau 22 : Formulation des micelles mixtes testées sur les cellules Caco-2**

Système initial							
Huile de lin						Huile de lin / lécithine de soja émulsion	Huile de lin / 17:0-PC émulsion
Concentration	0,25	0,5	1	1,5	2	5	0,25
Micellaire en lipides totaux (mM)	0,25	0,5	1	1,5	2	5	0,25
Déoxycholate de sodium (mM)	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
Lyso-PL (mM)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
2-MAG (mM)	0,08	0,16	0,32	0,48	0,64	1,60	0,07
AGL (mM)	0,17	0,34	0,68	1,02	1,36	3,40	0,18

Après chaque incubation, un test de viabilité cellulaire et de TEER est réalisé. Les cellules de chaque puits sont analysées pour leur teneur en protéines. Les milieux, apical et basolatéral, sont récupérés et analysés pour leur composition en lipides. Les lipides totaux contenus dans les deux milieux sont extraits selon la méthode de Folch (§ II-2.1.1). Les EMAG sont obtenus selon la méthode de Morrison et Smith (§ II-2.1.4.3) et analysés en CPG dans les conditions expérimentales précédemment décrites (§ II-2.1.4.4).

## **2.4. Etude *in vivo* du métabolisme lipidique sur modèle animal**

### **2.4.1. Absorption lymphatique**

La technique de fistulation du canal lymphatique mésentérique s'appuie sur la technique de Bolman (Bollman et al. 1948). Des rats mâles adultes Wistar de 300 g âgés de 8 semaines sont maintenus sous régime alipidique UAR, 24 h avant l'opération à raison de 25 gr/rat/jour. La technique consiste à dégager sous anesthésie générale (kétamine/xylazine ; 100 ; 10/g de masse corporelle) la zone thoracique et à fistuler le canal lymphatique thoracique au dessus de la citerne de Pecquet. Un cathéter en polyéthylène (diamètre = 0,95 mm) est inséré dans le canal afin de dériver la circulation lymphatique vers un tube à hémolysé de recueil entreposé dans la glace où la lymphe est récoltée pendant 24 h après intubation des différentes formules lipidiques. Après administration des lipides, l'animal est placé dans une cage à contention où il dispose d'eau à volonté.

Deux types d'expériences sont réalisés :

- Une étude avec de l'huile de lin émulsifiée ou non ;
- Une étude avec des TAG structurés.

Dans tous les cas, 0,3 mL d'huile (huile de lin émulsifiée ou non, TAG structurés) sont administrés ce qui correspond à un apport de 100 mg d'ALA.

La lymphe est recueillie sur 24 heures séquentiellement (toutes les heures pendant les six premières heures) ou en un seul prélèvement. Une partie aliquote (100 µL) est utilisée pour déterminer la composition et la teneur en AG totaux selon la technique de Lepage et Roy (§ II-2.1.4.2). Sur le reste de la lymphe, les lipides totaux de la lymphe sont extraits par la méthode de Folch (§ II-2.1.1). Les différentes fractions lipidiques sont séparées par CCM (§ II-2.1.2). Les teneurs et compositions en acides gras des TAG lymphatiques sont obtenues à partir de leur EMAG (technique de Morrison et Smith, § II-2.1.4.3) par analyse CPG (§ II-2.1.4.4). L'analyse de la structure des TAG est réalisée après action de la lipase pancréatique.

#### 2.4.2. Absorption plasmatique

Pour l'étude de l'absorption plasmatique de l'ALA, les animaux reçoivent préalablement une alimentation normolipidique à base de 5% d'huile d'arachide. L'huile d'arachide a été sélectionnée de par sa pauvreté en acides gras n-3. La nourriture est restreinte la veille de l'étude afin d'éviter tout risque d'engorgement des animaux lors de l'intubation. Les TAG structurés sont administrés aux rats vigiles à l'aide d'une canule d'intubation 16 X 2 " (50,8 mm, Popper®). Après intubation, les rats sont placés dans leur cage avec un libre accès à l'eau. Ils sont ensuite sacrifiés par décapitation suivant une cinétique postprandiale de 0, 2, 4 et 6 heures. Le sang est recueilli dans des tubes héparinés (Venoject, Terumo) et le plasma est séparé des globules rouges par centrifugation (Sorval ST 40R, Thermo ; 4°C, 20 min, 2 870 g). Les deux compartiments biologiques sont stockés à -80°C en attente de leurs analyses. La composition en acides gras et la structure des TAG du plasma sont établis selon les méthodes décrites ci-dessus (§ II-2.1).

#### 2.5. Traitement statistique des données

Les traitements statistiques des données sont réalisés grâce au logiciel Statgraphics Plus version 5.0 (Rockville, Maryland, USA). Les données sont exprimées par des valeurs moyennes avec leurs écarts types. Après s'être assuré que les échantillons indépendants suivent une loi normale par le test de Shapiro et Wilk et un test d'égalité des variances, les comparaisons intergroupes sont réalisées sur la base de leurs moyennes respectives. Dans le cas de **deux groupes indépendants** (cinétiques de concentration lymphatique en ALA suite à l'administration d'huile de lin sous forme émulsionnée ou non, ou concentrations lymphatiques en AG suite à l'ingestion de TAG structurés), le test *t* de Student est appliqué. Dans le cas de **plus de deux moyennes**, la significativité est vérifiée par une analyse de variance (ANOVA). L'ANOVA à un facteur est utilisée pour tester : *i)* les compositions en AG des chylomicrons lymphatiques suite à l'administration d'huile de lin sous ses différentes formes, *ii)* les compositions en AG des lipides plasmatiques suite à l'administration de TAG structurés, *iii)* la sécrétion basolatérale des acides gras par les cellules Caco-2 (pour une même fraction horaire). L'ANOVA à un facteur est utilisée pour discriminer : *i)* les Vmax observées lors de l'hydrolyse par la lipase pancréatique de porc des systèmes lipidiques (émulsion, huile de lin en présence ou non de colipase), *ii)* les compositions lymphatiques en

AG chez le rat ayant reçu les TAG structurés (pour une même fraction horaire donnée). Les groupes sont ensuite comparés deux à deux par le test post-hoc approprié (Tukey ou Fisher). Les données sont considérées comme différentes pour une p-value <0,05 et signalées par un astérisque ou des lettres différentes.

Les aires sous la courbe (AUC) sont calculées par la méthode des trapèzes et comparées entre elles par le test de Mann-Withney.

## **1. Effet de la structure des triacylglycérols alimentaires sur le devenir lymphatique et plasmatique de l'acide $\alpha$ -linolénique**

### **1.1. Introduction**

La biodisponibilité digestive des TAG dépend d'un certain nombre de facteurs dont la répartition des acides gras entre les positions **interne (*sn*-2)** et **externes (*sn*-1 et *sn*-3)** du squelette glycérol. Ainsi, des études conduites chez l'animal et plus rarement chez l'Homme suggèrent que le positionnement d'un acide gras au sein des TAG alimentaires influence son devenir métabolique *in vivo* (Ikeda et al. 1991 ; Innis et al. 1994 ; Porsgaard et al. 2005).

Lorsque des **AG à chaînes courtes** sont estérifiés en positions externes, les TAG sont plus rapidement hydrolysés par les lipases gastrique et pancréatique (§ I-2.1.1). L'hydrolyse de ces TAG dans l'estomac permet une absorption directe des AG à chaînes courtes à ce niveau. Les acides gras sont ensuite pris en charge par l'albumine qui les transporte *via* la veine porte jusqu'au foie où ils sont métabolisés (Decker 1996). Ainsi, les TAG contenant des AG à chaînes courtes en positions externes sont caractérisés par une digestion plus rapide puisqu'elle ne nécessite pas l'étape de solubilisation de l'acide gras à chaîne courte dans les micelles mixtes.

Lorsque des **AGPI à très longues chaînes** (EPA et DHA) sont estérifiés en positions externes, les TAG sont hydrolysés plus lentement par la lipase pancréatique du fait de l'encombrement stérique généré par le nombre important de doubles liaisons (Porsgaard et al. 2005 ; Christensen et al. 1994 ; Christensen & Høy 1996 ; Straarup & Høy 2001). L'hydrolyse incomplète des TAG et/ou le maintien des lipides dans la lumière intestinale conduisent à une bio accessibilité de ces TAG inférieure à 100% (Cansell et al. 2003).

Dans le cas des TAG estérifiés par des **AG à longues chaînes saturées** (16:0 et 18:0) en positions externes, leur biodisponibilité digestive est réduite en raison d'une capacité limitée de solubilisation de ces acides gras dans les micelles mixtes comparée aux acides gras insaturés, à point de fusion plus faible (Filer et al. 1969).

Ainsi, dans le cas des AG à chaînes insaturées très longues ou à chaînes saturées longues, leur position en *sn*-2 au sein des TAG semble privilégiée pour améliorer leur coefficient

d'absorption intestinale, en se présentant au site d'absorption sous forme de 2-MAG plutôt que d'acide gras libre (Jensen 1989 ; Yang & Kuksis 1991 ; Innis et al. 1994). Outre ces données relatives à l'étape digestive, certaines études suggèrent que la position *sn*-2 des TAG plasmatiques pourrait protéger l'ALA d'une  $\beta$ -oxydation précoce, préjudiciable à sa fonction de précurseur d'acides gras essentiels (EPA et DHA) (Boulos & Combe 2000).

Les données relatives à l'absorption digestive de l'ALA sont rares ou s'appuient sur les données obtenues à partir des acides oléique (18:1) et linoléique (18:2). Nous nous proposons, donc, de déterminer et de comparer l'absorption intestinale et le transport plasmatique de l'ALA selon sa position dans les TAG alimentaires, chez le rat. Pour s'affranchir de réponses parasites dues à l'utilisation de mélanges de TAG, des TAG structurés purs ont été synthétisés. La voie de synthèse de ces TAG est décrite dans la thèse d'E. Vaique (Vaique, 2009). Les principaux résultats ainsi que la caractérisation des TAG obtenus sont reportés dans l'article de Vaique et al. 2010 (Annexe 1). Deux TAG structurés sont donc utilisés pour les études *in vivo*, l'un portant l'ALA exclusivement en position interne, l'autre portant l'ALA exclusivement en positions externes (*sn*-1 ou *sn*-3). Dans les deux cas, l'ALA est associé à l'acide oléique qui occupe les deux autres positions du TAG structuré. Deux études sont réalisées :

- l'une concerne **la cinétique d'absorption lymphatique** de l'ALA chez le rat porteur d'une fistulation du canal lymphatique mésentérique ;
- l'autre repose sur l'étude de **la cinétique d'absorption plasmatique** de l'ALA après intubation gastrique des TAG structurés.

Ainsi les objectifs de cette étude visent à :

- i) quantifier l'absorption de l'ALA selon sa régio localisation sur le squelette glycérol du TAG alimentaire, et ce, au niveau des compartiments lymphatique et plasmatique ;
- ii) suivre le devenir de l'ALA dans les TAG et PL lymphatiques et son maintien éventuel en position *sn*-2 des TAG re-synthétisés par l'entérocyte ;
- iii) suivre le devenir de l'ALA en position *sn*-2 dans les TAG du compartiment plasmatique ;

- iv) proposer grâce aux études cinétiques, un modèle d'absorption intestinale de l'ALA, dans nos conditions expérimentales, en fonction de sa position sur les TAG alimentaires.

- 1.2. The fraction of  $\alpha$ -linolenic acid present in the *sn*-2 position of structured triacylglycerols decreases in lymph chylomicrons and plasma triacylglycerols during the course of lipid absorption in rats.** L. Couëdelo, C. Vaysse, E. Vaique, A. Guy, I. Gosse, T. Durand, S. Pinet, M. Cansell, N. Combe. Acceptée à Journal of Nutrition. DOI : NUTRITION/2011/139212.

# The Fraction of $\alpha$ -Linolenic Acid Present in the *sn*-2 Position of Structured Triacylglycerols Decreases in Lymph Chylomicrons and Plasma Triacylglycerols during the Course of Lipid Absorption in Rats<sup>1–3</sup>

Leslie Couëdèlo,<sup>4,5</sup> Carole Vaysse,<sup>4</sup> Emilie Vaique,<sup>6</sup> Alexandre Guy,<sup>7</sup> Isabelle Gosse,<sup>6</sup> Thierry Durand,<sup>7</sup> Sandra Pinet,<sup>6</sup> Maud Cansell,<sup>5</sup> and Nicole Combe<sup>4\*</sup>

<sup>4</sup>ITERG, Unité de Nutrition, Métabolisme et Santé, Talence, France; <sup>5</sup>Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets, CNRS, UMR 5248, Université de Bordeaux, IPB, Pessac, France; <sup>6</sup>Université de Bordeaux, CNRS, ISM UMR 5255, ENSCBP, Pessac, France; and <sup>7</sup>Institut des Biomolécules Max Mousseron, CNRS, UMR 5247, Universités Montpellier I et II Faculté de Pharmacie, Montpellier, France

## Abstract

Little is known about the ability of  $\alpha$ -linolenic acid (Ln) to remain in the *sn*-2 position of TG during the absorption process. The goal of this study was to determine the Ln distribution in the lymph (Study 1) and plasma (Study 2) TG of rats fed a single i.g. load of structured TG [300 mg/rat of either oleic acid (O)/Ln/O TG (OLnO) or Ln/O/O TG (LnOO),  $n = 7$  rats]. In an early fraction (3–4 h) of lymph (OLnO group; 100% Ln in the *sn*-2 position), 46 ± 2% Ln was maintained in this position in lymph TG. There was even less (29 ± 6%) in the last fraction (7–24 h) ( $P < 0.05$ ). Ln was also found (9 ± 3%) in the *sn*-2 position of lymph TG in the LnOO group. The Ln content in lymph phospholipids was twice as high in rats when they were fed LnOO (4.2 ± 0.1%) than OLnO (2.3 ± 0.2%) ( $P < 0.005$ ). Six hours postprandially (Study 2), 21 ± 3% of the Ln incorporated into plasma TG was located in the *sn*-2 position in the OLnO group compared to 13 ± 2% in the LnOO group ( $P < 0.001$ ). Overall, these results indicate that the amount of Ln that moved from the *sn*-2 position of structured TG to the *sn*-1(3) position of lymph TG increased during absorption. This may account for a substantial hydrolysis of the 2-monolinolenylglycerols in enterocytes, leading to the intramolecular redistribution of Ln in lymph TG and, consequently, in plasma TG. J. Nutr. 142: 70–75, 2012.

## Introduction

Ln<sup>8</sup> [18:3(n-3)] is an essential fatty acid in the human diet and the principal (n-3) PUFA present in the Western diet. The major dietary sources of Ln are vegetable oils and green leaves. Ln accounts for 10% of total fatty acids in rapeseed oil and soybean oil and up to 60% in flaxseed oil. These oils also differ by the positional distribution of Ln on the glycerol backbone of the TG. For instance, the proportion of Ln in the *sn*-2 position of the TG is higher in rapeseed (58%) than in soybean (31%) oil.

<sup>1</sup> Supported in part by grants from the National Association for Technological Research, the Aquitaine Regional Council, and National Inter-professional Oilseed Organization through a Ph.D. research grant (L.C.).

<sup>2</sup> Author disclosures: L. Couëdèlo, C. Vaysse, E. Vaique, A. Guy, I. Gosse, T. Durand, S. Pinet, M. Cansell, and N. Combe have no conflicts of interest.

<sup>3</sup> Supplemental Table 1 is available from the "Online Supporting Material" link in the online posting of this paper at <http://jn.nutrition.org>.

<sup>8</sup> Abbreviations used: DR, dilution rate; Ln,  $\alpha$ -linolenic acid, C18:3 (n-3); LnOO,  $\alpha$ -linolenic acid/oleic acid/oleic acid TG; LPL, lipoprotein lipase; 2-MAG, 2-monoacyl *sn* glycerol; NEFA, nonesterified fatty acid; O, oleic acid; OLnO, oleic acid/ $\alpha$ -linolenic acid/oleic acid TG; PL, phospholipid.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: n.combe@iterg.com.

Numerous studies have shown that the molecular species or structure of dietary TG influence the absorption and metabolism of their fatty acids in animals and humans (1,2). Namely, the metabolic fate of fatty acids esterified in the *sn*-2 position of the TG may be different from that of fatty acids esterified in the *sn*-1 (3) positions. Indeed, during the digestion process and lipid transport in blood, TG are hydrolyzed by different lipases with specific properties in terms of unsaturation and chain length of the fatty acids as well as their distribution on the three positions of the glycerol backbone (3–6). A first possible preduodenal hydrolysis of dietary TG occurs in the stomach, by gastric lipase, which exhibits a stereospecificity for the *sn*-3 position (7,8). Nevertheless, the major digestion step occurs in the small intestine, where dietary TG are hydrolyzed to FFA and 2-MAG by pancreatic lipase. As a result of the stereoselective hydrolysis of both gastric and pancreatic lipases, the lipolysis products enter the 2-MAG pathway, which is the predominant route for TG biosynthesis in the enterocyte (9,10). This observation is supported by several studies showing that most of the 2-MAG form the backbone of a new population of TG, with 60–72% of the fatty acyl chains originally located in the *sn*-2 position in the

dietary TG maintained in the same position (4,11–13). The newly synthesized TG are packed into chylomicrons, secreted into the lymph, and then into the blood. During clearance of plasma chylomicrons in the endothelial wall, TG are hydrolyzed by LPL, which exhibits regiospecificity for fatty acids in the *sn*-1 (3) positions, similarly to pancreatic lipase, leading to FFA and 2-MAG (14,15). The FFA enter the extrahepatic tissues, whereas the 2-MAG are transferred to albumin or HDL, particles on which LPL is less active to degrade 2-MAG. This suggests that fatty acids acylated in the *sn*-2 position of TG may be preferentially transported to the liver as 2-MAG, where they provide suitable substrates for the MAG acyltransferase located on the surface of the hepatocytes (16).

In a previous rat study, we reported higher enrichment in Ln esterified in the *sn*-2 position of the lymph TG and PL following administration of rapeseed compared to soybean oil (17). However, this study suggested that the intramolecular Ln composition of the dietary TG was not exactly reflected in the chylomicron TG. Indeed, the proportion of Ln in the *sn*-2 position was 44 and 29% following consumption of rapeseed and soybean oil, respectively, whereas the initial values in these oils were 58% (rapeseed oil) and 31% (soybean oil). A similar approach using flaxseed oil showed that 18% of Ln was present in the *sn*-2 position in the lymph TG when a flaxseed oil containing 28% Ln esterified in this position (18). In this study, we used two chemically synthesized, pure, structured TG models containing Ln exclusively in the *sn*-2 or *sn*-1(3) positions (19) to investigate the metabolic fate of Ln in terms of intramolecular distribution in dietary TG, thus eliminating possible interferences between Ln esterified in the *sn*-2 and *sn*-1(3) positions of TG. To the best of our knowledge, no previous studies used chemically pure, structured TG to precisely quantify the distribution of Ln in lymph and plasma lipids and the remaining Ln in the *sn*-2 position of the chylomicron TG.

## Methods

**Fatty acid composition of the structured TG.** Two kinds of chemically pure, structured TG with Ln specifically esterified in the *sn*-2 or *sn*-1(3) positions were synthesized by esterifying a mixture of glycerol molecules protected as dioxane and dioxolane, followed by one-pot acetal hydrolysis and esterification of the hydroxyl groups by either Ln or O [18:1(n-9)] (19). LnOO and OLNO were formulated to contain the same amount of  $\alpha$ -linolenic (33.3 mol/100 mol total fatty acids) and oleic (66.6 mol/100 mol total fatty acids) acids. The Ln location on the glycerol backbone was assayed by NMR, HPLC, and pancreatic lipase hydrolysis (19). Ln was distributed in the *sn*-2 position at 0 and 100% in LnOO and OLNO, respectively.

**Animals and surgical procedures.** This study was conducted in accordance with European Community Council Directives (861609/EEC). All experiments complied with the Guidelines for the Handling and Training of Laboratory Animals (local committee no. B33522-1). Male Wistar rats (8 wk old, body weight 300–350 g) were purchased from Elevage Janvier. The rats were acclimated to a controlled environment for 2 wk with constant temperature and humidity as well as free access to water and food, i.e., a standard rodent diet (SAFE). Three days before the i.g. administration of a single load of structured TG, the standard diet was replaced by an 18:3(n-3)-deficient diet (Supplemental Table 1) to study the absorption of Ln supplied solely by structured TG (OLNO and LnOO). The standard and Ln-deficient diets provided 1890 mg 18:3(n-3)/kg diet and 45 mg 18:3(n-3)/kg diet, respectively.

To collect their lymph, the rats were feed deprived for 14 h before the main mesenteric lymph duct was cannulated, as previously described (20,21). After surgery, the rats were placed in individual restraining cages in a warm environment, with tap water freely available, and basal lymph was collected from conscious rats for 1 h before 0.3 mL of either LnOO or

OLNO structured TG ( $100 \pm 10$  mg Ln/rat), followed by 0.5 mL water, was administered via a gastric feeding cannula (16 $\times$ ; 50.8 mm; Popper). For the next 6 h, lymph was collected hourly in tared tubes maintained in an ice bath. A combined fraction was obtained from 7 to 24 h. The tubes were frozen immediately after collection and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further analysis. The study was performed on 7 cannulated rats for each structured TG. For postprandial studies, 35 rats were feed deprived for 14 h before the experiment. Seven rats were killed by decapitation to obtain the baseline values and the other rats were randomly assigned to one of the two dietary groups (LnOO and OLNO). In each group ( $n = 14$ ), a single 0.3-mL load of either LnOO or OLNO structured TG was supplied through a gastric feeding cannula (16  $\times$  2; 50.8 mm; Popper). Ln supply was  $100 \pm 10$  mg/rat. After lipid intubation, the rats were placed in cages with free access to water. At the 4-h postprandial time point, 7 rats/group were killed and blood was collected in heparinized tubes. The same procedure was applied to the rest of rats ( $n = 7$ ) at 6 h. Plasma was separated from blood by centrifugation at  $4^{\circ}\text{C}$  and 3000  $\times$  g for 15 min.

**Analysis of lymph and plasma lipids.** An aliquot fraction (200  $\mu\text{L}$ ) of the lymph samples with trimyristolein (Sigma) added as an internal standard was transmethylated, as described by Lepage and Roy (22), for fatty acid quantification of total lipids. In parallel, the total lipids were extracted from lymph and plasma samples as described by Folch et al. (23). Polar lipids, NEFA, and neutral lipids from lymph and plasma lipid extracts were separated by preparative TLC, as previously described (24). The FAME were prepared according to the method described by Morrison and Smith (25). Trimyristolein and diheptadecanoyl-glycero-phosphoethanolamine were added as internal standards for quantification of TG and PL, respectively. FAME were analyzed by GC, as previously described (18). Fatty acids from Sigma France and natural extracts of known composition were used as standards for column calibration. The variation in peak area between two injections was <2%. The DR of dietary fatty acids by endogenous fatty acids was calculated from the lymph recovery of Ln, considering that it mainly originated from an exogenous source, as follows:

$$\text{DR} = [(\% \text{ Ln in dietary lipids} - \% \text{ Ln in lymph lipids}) \\ \times 100]/\% \text{ Ln in dietary lipids}$$

**Analysis of TG intramolecular structure.** The intramolecular distribution of fatty acids in TG from lymph and postprandial plasma was determined by lipase hydrolysis, as previously described (18). The proportion of Ln esterified in the *sn*-2 position compared with the total amount of Ln in the 3 positions (*sn*-1 + *sn*-2 + *sn*-3) of the TG was obtained by the following equation:

$$\% \text{ Ln } (\text{i}.\text{n}.\text{2}) = (\% \text{ Ln in 2-MAG} \times 100)/(\% \text{ Ln in TG} \times 3)$$

**Statistical analysis.** Data are expressed as means  $\pm$  SD for three replicates. The AUC was calculated according to the trapezoidal method and the data were compared with the Mann-Whitney test. Differences between the two independent groups, LnOO and OLNO, in terms of the concentrations of total fatty acids, Ln, and palmitic acid as well as the proportion of Ln in TG and its proportion and distribution in 2-MAG were analyzed within the same hourly fraction of lymph by using the parametric Student's *t* test. The significance of differences in Ln composition and the distribution of lymph TG in the same dietary group (baseline, 3–4 h and 7–24 h) was determined using 2-way ANOVA followed by a Fisher's LSD post hoc test. In plasma, the fatty acid composition of NEFA and TG as well as the fatty acid distribution in 2-MAG were analyzed by 1-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. For all tests, differences were considered significant at  $P < 0.05$ . All analyses were performed using Statgraphics plus software version 5.0.

## Results

**Lymph transport of total fatty acids.** Lymph collection was performed up to 24 h after feeding and AUC<sub>(0–24h)</sub> corresponding to the lymph fatty acid concentration against time were

determined. AUC<sub>(0–24h)</sub> values did not differ between the LnOO ( $363 \pm 69.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$ ) and OLNO ( $286 \pm 77.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$ ) groups.

The lymph flow of the rats during the first 6 h after feeding with structured TG was  $0.30 \pm 0.03 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ . The fatty acid concentrations in the lymph fractions from 1 to 6 h after feeding with structured TG (either LnOO or OLNO) were compared (Fig. 1A). In both groups of rats, the peak total fatty acid concentration occurred 5 h postprandially. The maximal concentrations did not differ between the LnOO ( $86.1 \pm 22.5 \text{ mmol} \cdot \text{L} \text{ lymph}^{-1}$ ) and OLNO ( $66.8 \pm 27.1 \text{ mmol} \cdot \text{L} \text{ lymph}^{-1}$ ) groups.

**Lymph transport of Ln.** AUC<sub>(0–24h)</sub> values for Ln did not differ between rats fed OLNO ( $49.6 \pm 17.9 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$ ) and LnOO ( $63.6 \pm 21.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}$ ).

The increase in Ln from 1 to 6 h after feeding with structured TG (Fig. 1B) followed the same kinetics as that of total fatty acids (Fig. 1A), with an absorption peak at the same time (~5 h), irrespective of the type of structured TG. The proportion of Ln increased from baseline ( $0.7 \pm 0.5\%$ ) to the absorption peak ( $21.5 \pm 4.5\%$ ) ( $P < 0.001$ ). Collection of lymph revealed mixing of exogenously and endogenously derived fatty acids. For instance, palmitic acid (16:0), which represented  $24.1 \pm 1.4\%$  of the total fatty acid composition in lymph lipids of feed-deprived rats, was slowly diluted over time until it represented

only  $8.6 \pm 3.4\%$  after 5 h (Fig. 1B). Thus, the dilution of dietary fatty acids by endogenous fatty acids was minimal at the absorption peak (DR = 40%): dietary fatty acids accounted for 60% of the lymph fatty acids.

The Ln contents of both lymph TG and PL were compared at the 4-h point, corresponding to lymph collection between 3 and 4 h postprandially. The Ln percentage in TG was almost identical for both groups of rats (Table 1). The Ln percentage in PL was twice as high in rats fed LnOO ( $4.2 \pm 0.1\%$ ) than in the OLNO group ( $2.3 \pm 0.2\%$ ) ( $P < 0.005$ ). Moreover, the TG:PL ratios did not differ between the LnOO ( $9.0 \pm 2.7$ ) and OLNO ( $9.1 \pm 2.4$ ) groups. As a result, the Ln content of TG was 4 times (LnOO group) and 8 times (OLNO group) higher than the Ln content of PL ( $P < 0.001$ ).

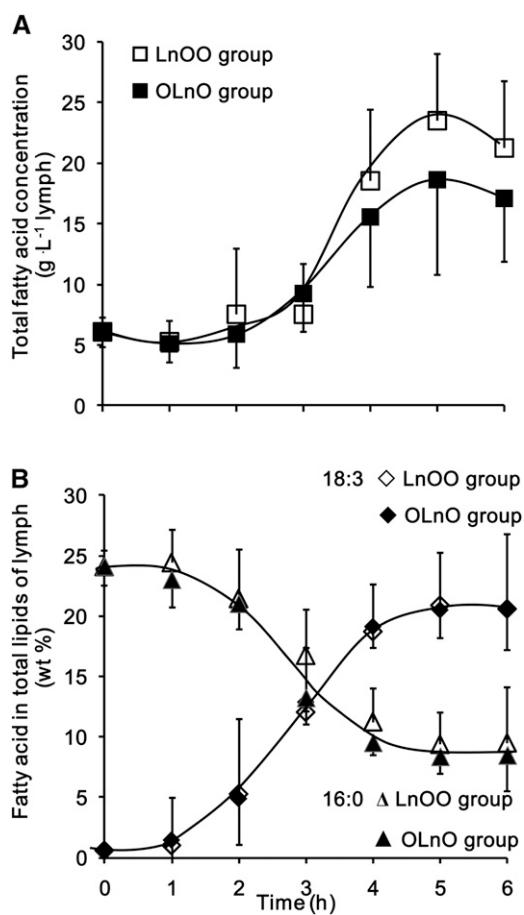
**Intramolecular distribution of Ln in lymph TG.** The intramolecular distribution of Ln was determined in the 3- to 4-h and 7- to 24-h lymph fractions. In these two fractions, the Ln content in the *sn*-2 position (2-MAG) of TG was 8 times greater (3- to 4-h fraction) and 3 times greater (7- to 24-h fraction) in the OLNO than in the LnOO group; all values in both groups were higher than the baseline value (Table 1). In the OLNO group, the Ln content in the *sn*-2 position was lower in the 7- to 24-h than in the 3- to 4-h fraction ( $P < 0.01$ ), leading to a difference in the intramolecular distribution of Ln between the two fractions ( $P < 0.05$ ). In the group of rats fed LnOO, TG from the two lymph fractions contained similar amounts of Ln in the *sn*-2 position.

**Ln transport in plasma.** After ingestion of a single load of either LnOO or OLNO, a similar 3-fold increase in the Ln content of plasma TG was observed from baseline to 4 h, followed by a significant decrease at 6 h in both groups of rats and a simultaneous increase in the Ln content in the *sn*-2 position (2-MAG) of TG (Table 2). When we compared the intramolecular distribution of Ln in plasma TG at 6 h, the percent Ln (*sn*-2) was higher in the OLNO ( $21 \pm 3\%$ ) than in the LnOO group ( $13 \pm 2\%$ ) ( $P < 0.001$ ). The O content of TG remained stable over time and did not differ between the 2 groups (Table 2). The proportion of O in the *sn*-2 position (2-MAG) of TG increased from the baseline to 4 and 6 h in the LnOO group but remained stable in the OLNO group. In parallel, the linoleic acid concentrations [18:2(n-6)] of both TG and 2-MAG decreased from the baseline to 4 and 6 h in both groups.

The NEFA fraction in rats fed either LnOO or OLNO exhibited a similar increase in the proportion of Ln at 4 and 6 h postprandially (Table 3). In contrast, the O content of the plasma NEFA fraction did not change.

## Discussion

In adult rats, neither the brain nor the heart is able to synthesize sufficient DHA from Ln to maintain DHA homeostasis. In both organs, DHA supply depends on fatty acid metabolism in the liver, when EPA and/or DHA are deficient in the diet (26). Preferential transport of Ln to the liver as 2-MAG may facilitate its conversion to very long-chain PUFA. The aim of this study, performed using structured TG, was to further investigate the impact of the positioning of Ln in dietary TG on its structural distribution in lymph and plasma lipids as well as its ability to remain in the *sn*-2 position during the absorption process. This study showed that: 1) the proportion of Ln in the *sn*-2 position of lymph TG decreased over time and did not exactly reflect the structure of the initial lipids; 2) part of the Ln initially located in



**FIGURE 1** Total fatty acid concentration (A) and Ln and palmitic acid percentages (B) in the lymph of rats fed either LnOO or OLNO. Values are means  $\pm$  SD,  $n = 7$ . Ln,  $\alpha$ -linolenic acid; LnOO,  $\alpha$ -linolenic acid/oleic acid/oleic acid TG; OLNO, oleic acid/ $\alpha$ -linolenic acid/oleic acid TG.

**TABLE 1** Composition and intramolecular distribution of Ln in rat lymph TG at baseline and 3–4 h and 7–24 h after administration of OLnO and LnOO<sup>1</sup>

	LnOO			OLnO		
	Baseline	3–4 h	7–24 h	Baseline	3–4 h	7–24 h
TG Ln, g/100 g total fatty acids	0.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	17.7 ± 0.9 <sup>a</sup>	19.8 ± 4.9 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	18.1 ± 0.5 <sup>a</sup>	17.9 ± 4.0 <sup>a</sup>
2-MAG Ln, g/100 g total fatty acids	0.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.0 <sup>a*</sup>	5.6 ± 2.0 <sup>a*</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>c</sup>	25.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	15.9 ± 6.7 <sup>b</sup>
Ln (sn-2), % of total Ln	16.3 ± 3.0 <sup>a</sup>	6.2 ± 0.5 <sup>b*</sup>	9.4 ± 2.6 <sup>b*</sup>	15.3 ± 2.1 <sup>c</sup>	46.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	28.7 ± 6.4 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Values are mean ± SD, n = 7. Within a group, means in a row without a common letter differ, P < 0.05. \*Different from OLnO group at that time, P < 0.05. Ln, α-linolenic acid; LnOO, α-linolenic acid/oleic acid/oleic acid TG; 2-MAG, 2-monoacyl sn glycerol; OLnO, oleic acid/α-linolenic acid/oleic acid TG.

the sn-1(3) position in the structured TG was incorporated into the sn-2 position in lymph TG; and 3) during the blood clearance phase, Ln was partially maintained in the sn-2 position of plasma TG.

**Lymph absorption of OLnO and LnOO.** Both groups of rats were similar in terms of the total transport of fatty acids over 24 h and the absorption kinetics during the first 6 h. This indicated that absorption of Ln and O did not depend on their initial distribution in dietary TG. Moreover, these results were consistent with the data obtained for vegetable oils characterized by different Ln and O proportions and distributions after 24-h lymph collection (17,18). It is worth noting that similar DR of the structured TG fatty acids by endogenous fatty acids, like palmitic acid (Fig. 1B), were reported for natural and synthetic dietary oils (21,27,28). Therefore, the TG used in this study did not modify the mobilization of the endogenous fatty acid pool.

The TG of the two hourly fractions (3–4 h and 7–24 h) reflected changes in the Ln regio-distribution during the absorption process. In the early stages, only one-half of the Ln esterified in the sn-2 position of the structured TG had remained in this position in the OLnO group (Table 1). This finding may be explained by two mechanisms. First, in the intestinal lumen,

part of the sn-2 MAG (Ln) was isomerized to sn-1 MAG (Ln) and then hydrolyzed by pancreatic lipase, generating free Ln. This pathway may account for at least 20% of the fatty acids esterified in the sn-2 position in dietary TG (11). Second, part of the remaining 2-MAG (Ln), which entered the enterocyte, may have been hydrolyzed by a MAG lipase, active in the intestine (29). These two mechanisms generate FFA that become available for TG synthesis. In our case, this represented 50% of the Ln initially esterified in the sn-2 position that joined the NEFA pool. In the second stage of absorption, the proportion of Ln in the sn-2 position in lymph TG was even lower than 50% (Table 1). The difference between the two hourly fractions may be explained by increased enterocyte hydrolysis of the 2-MAG (Ln) after the absorption peak of a single dose of structured TG. Indeed, it has been shown that MAG lipase protein expression and activity are induced by a high-fat diet, suggesting that MAG catabolism was stimulated by increased lipid flux to the enterocyte (29). Finally, we hypothesized that these two processes (isomerization in the intestinal lumen and hydrolysis by MAG lipase in the enterocytes) resulted in a partial shift from the 2-MAG pathway for TG resynthesis to the glycerophosphate-phosphatidic acid pathway for de novo TG synthesis, leading to the incorporation of a large part of Ln into the sn-1(3) positions of lymph TG. The

**TABLE 2** Fatty acid composition of plasma TG (total TG and sn-2 MAG) collected in feed-deprived rats (baseline) or collected 4 and 6 h after administration of the structured lipids (OLnO and LnOO)<sup>1</sup>

Fatty acid	Baseline <sup>2</sup>	LnOO			OLnO	
		4 h	6 h	g/100 g total fatty acids	4 h	6 h
TG						
Total SFA	25.9 ± 1.9 <sup>a</sup>	22.8 ± 0.9 <sup>b</sup>	24.3 ± 2.6 <sup>a</sup>	20.8 ± 3.5 <sup>b</sup>	22.8 ± 1.8 <sup>b</sup>	
Total MUFA	29.5 ± 5.1	37.9 ± 4.6	38.4 ± 3.6	38.5 ± 3.3	37.1 ± 2.4	
18:1(n-9)	23.4 ± 4.1	31.5 ± 4.4	31.2 ± 2.6	31.8 ± 3.8	29.7 ± 2.1	
Total (n-3) PUFA	8.3 ± 1.1 <sup>c</sup>	13.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	12.7 ± 1.7 <sup>b</sup>	14.9 ± 2.3 <sup>a</sup>	11.3 ± 1.4 <sup>b</sup>	
18:3(n-3)	2.8 ± 0.3 <sup>c</sup>	8.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	7.3 ± 1.5 <sup>b</sup>	9.3 ± 2.5 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.7 <sup>b</sup>	
Total (n-6) PUFA	36.0 ± 3.5 <sup>a</sup>	24.8 ± 3.8 <sup>b</sup>	23.9 ± 2.9 <sup>b*</sup>	25.3 ± 2.0 <sup>b</sup>	28.1 ± 2.0 <sup>b</sup>	
18:2(n-6)	29.2 ± 2.8 <sup>a</sup>	18.1 ± 2.8 <sup>b</sup>	17.7 ± 3.1 <sup>b*</sup>	19.3 ± 1.3 <sup>c</sup>	22.5 ± 2.0 <sup>b</sup>	
2-MAG						
Total SFA	17.4 ± 3.6	21.7 ± 5.7	18.0 ± 5.8	28.2 ± 7.5	17.0 ± 7.8	
Total MUFA	36.3 ± 3.4 <sup>b</sup>	48.9 ± 8.6 <sup>a</sup>	49.8 ± 5.1 <sup>a</sup>	41.2 ± 6.8 <sup>a</sup>	45.1 ± 6.9 <sup>a</sup>	
18:1(n-9)	34.1 ± 8.0 <sup>b</sup>	42.5 ± 9.8 <sup>a*</sup>	44.2 ± 4.9 <sup>a</sup>	34.0 ± 7.5 <sup>b</sup>	39.6 ± 6.6 <sup>b</sup>	
Total (n-3) PUFA	2.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	3.9 ± 1.3 <sup>ab</sup>	5.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	5.7 ± 2.4 <sup>a</sup>	5.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	
18:3(n-3)	1.4 ± 0.4 <sup>b</sup>	2.5 ± 1.2 <sup>a</sup>	2.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	3.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	3.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	
Total (n-6) PUFA	42.6 ± 2.6 <sup>a</sup>	23.8 ± 4.5 <sup>b</sup>	25.4 ± 5.8 <sup>b*</sup>	23.3 ± 3.7 <sup>c</sup>	30.5 ± 5.2 <sup>b</sup>	
18:2(n-6)	37.2 ± 6.7 <sup>a</sup>	17.6 ± 5.3 <sup>b</sup>	22.2 ± 6.8 <sup>b*</sup>	19.0 ± 3.3 <sup>c</sup>	27.6 ± 5.0 <sup>b</sup>	

<sup>1</sup> Values are means ± SD, n = 7. Within a group (including baseline), means in a row with superscripts without a common letter differ, P < 0.05. \*Different from OLnO group at that time, P < 0.05. LnOO, α-linolenic acid/oleic acid/oleic acid TG; 2-MAG, 2-monoacyl sn glycerol; OLnO, oleic acid/α-linolenic acid/oleic acid TG.

<sup>2</sup> Rats that had consumed the 18:3 (n-3)-deficient diet but did not receive structured TG.

**TABLE 3** Fatty acid composition of plasma NEFA collected 1 h before (baseline) or 4 and 6 h after administration of the structured lipids (OLnO and LnOO)<sup>1</sup>

Fatty acid	Baseline <sup>2</sup>	LnOO		OLnO	
		4 h	6 h	4 h	6 h
g/100 g total fatty acids					
Total SFA	44.1 ± 5.7	39.7 ± 4.0	35.9 ± 7.7	45.2 ± 2.3	38.9 ± 3.7
Total MUFA	24.8 ± 6.4	28.6 ± 1.3	30.0 ± 3.5	26.5 ± 2.1	30.6 ± 2.2
18:1(n-9)	18.5 ± 5.1	20.9 ± 1.0	21.4 ± 4.2	19.4 ± 2.3	21.7 ± 2.3
Total (n-3)	4.4 ± 1.1 <sup>b</sup>	8.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	9.7 ± 4.4 <sup>a*</sup>	7.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	6.1 ± 0.6 <sup>a</sup>
PUFA					
18:3(n-3)	2.5 ± 0.8 <sup>b</sup>	5.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	6.0 ± 2.7 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	4.0 ± 0.3 <sup>a</sup>
Total (n-6)	25.8 ± 3.0 <sup>a</sup>	22.0 ± 3.4 <sup>a</sup>	23.0 ± 3.0 <sup>a</sup>	20.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	23.5 ± 2.0 <sup>ab</sup>
PUFA					
18:2(n-6)	20.3 ± 2.9 <sup>a</sup>	15.9 ± 3.1 <sup>a</sup>	16.5 ± 3.0 <sup>a</sup>	14.6 ± 0.6 <sup>b</sup>	17.9 ± 1.7 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are means ± SD, n = 7. Within a group (including baseline), means in a row with superscripts without a common letter differ, P < 0.05. \*Different from OLnO group at that time, P < 0.05. LnOO, α-linolenic acid/oleic acid/oleic acid TG; NEFA, nonesterified fatty acid; OLnO, oleic acid/α-linolenic acid/oleic acid TG.

<sup>2</sup> Rats that had consumed the 18:3 (n-3)-deficient diet but that did not receive structured TG.

results obtained in the LnOO group indicated the presence of Ln in the *sn*-2 position of lymph TG, although it was not present in this position in the TG supplied to the rats (Table 1). The only way for a fatty acid that was originally in the *sn*-1(3) positions in dietary TG to enter the *sn*-2 position in lymph TG is by de novo TG synthesis, via the glycerophosphate-phosphatidic acid pathway. Our results indicated that de novo TG synthesis occurred early (3–4 h postprandially) in the enterocytes. Finally, we found that the lymph PL in the LnOO group contained more Ln compared to that of the OLnO group. This accounted for the major contribution of the glycerophosphate-phosphatidic acid pathway to PL synthesis and the minor utilization of *sn*-2 MAG as the backbone for gut PL synthesis (30).

**Ln transport in plasma lipids.** It is worth noting that the lymph and plasma study protocols were different, so any comparison of the kinetics was unreliable. The results indicated that LPL activity toward Ln was higher from the *sn*-1(3) than the *sn*-2 positions of TG; indeed, the Ln content of TG decreased, whereas the Ln content in the *sn*-2 position (2-MAG) remained stable from 4 to 6 h (Table 2). This also suggested that spontaneous isomerization of 2-monolinolenin to 1-monolinolenin was limited, as reported for 2-monoolein and 2-monopalmitin (31), which may favor the entry of Ln into the liver as 2-MAG. Specific Ln uptake by the liver is likely to be favorable to the conversion of Ln to EPA and DHA, in contrast with Ln uptake by extrahepatic tissues (26,32). This factor would account for the results obtained in rats by Renaud et al. (33), revealing that only linoleic acid in the *sn*-2 position in dietary fats was correlated with the plasma concentration of arachidonic acid after a 2-mo feeding.

On the whole, the present study using two chemically structured TG revealed a strong hydrolysis of 2-monolinolenyl-glycerols during the absorption process, leading to redistribution of Ln between the *sn*-2 and *sn*-1(3) positions of TG synthesized in enterocytes. Nevertheless, our results showed that the Ln distribution in dietary TG influenced the proportion of Ln that remained in the *sn*-2 position in plasma TG during the blood clearance phase. This may favor preferential hepatic uptake for Ln as 2-MAG, potentially contributing to an improvement in Ln

conversion to very long-chain PUFA. However, the nutritional interest of dietary fats that contain a major proportion of Ln in the *sn*-2 position of TG may be restricted by the enzymatic process involved in TG synthesis by enterocytes.

### Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Laurence Fonseca, Sandrine Djoukitch, and Emeline Montesinos for their expert technical assistance and Fernando Leal Calderon for his assistance with English. L.C., C.V., M.C. and N.C. designed and conducted research; L.C. analyzed data; E.V., A.G., I.G., T.D., and S.P. synthesized structured TG; and N.C. wrote the paper and had primary responsibility for final content. All authors read and approved the final manuscript.

### Literature Cited

- Hunter JE. Studies on the effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids*. 2001;36:655–68.
- Karupaiah T, Sundram K. Effects of stereospecific positioning of fatty acids in triacylglycerol structures in native and randomized fats: a review of their nutritional implications. *Nutr Metab (Lond)*. 2007;4:16.
- Bernard A, Carlier H. Absorption and intestinal catabolism of fatty acids in the rat: effect of chain length and unsaturation. *Exp Physiol*. 1991;76:445–55.
- Akesson B, Gronowitz S, Hersløf B, Ohlson R. Absorption of synthetic, stereochemically defined acylglycerols in the rat. *Lipids*. 1978;13:338–43.
- Paltauf F, Esfandi F, Holasek A. Stereospecificity of lipases. Enzymic hydrolysis of enantiomeric alkyl diacylglycerols by lipoprotein lipase, lingual lipase and pancreatic lipase. *FEBS Lett*. 1974;40:119–23.
- Christensen MS, Høy CE, Becker CC, Redgrave TG. Intestinal absorption and lymph transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure. *Am J Clin Nutr*. 1995;61:56–61.
- Rogalska E, Ransac S, Verger R. Stereoselectivity of lipase. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *J Biol Chem*. 1990;265:20271–6.
- Carrière F, Rogalska E, Cudrey C, Ferrato F, Laugier R, Verger R. In vitro and in vivo studies on the stereoselective hydrolysis of tri- and diglycerides by gastric and pancreatic lipases. *Bioorg Med Chem*. 1997;5:429–35.
- Mattson FH, Beck LW. The specificity of pancreatic lipase for the primary hydroxyl groups of glycerides. *J Biol Chem*. 1956;219:735–40.
- Savary P, Constantin MJ, Desnuelle P. On the structure of the triglycerides of the lymph chylomicrons in the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1961;48:562–71.
- Mattson FH, Volpenhein RA. The digestion and absorption of triglycerides. *J Biol Chem*. 1964;239:2772–7.
- Mu H, Høy CE. The digestion of dietary triacylglycerols. *Prog Lipid Res*. 2004;43:105–33.
- Pufal DA, Quinlan PT, Salter AM. Effect of dietary triacylglycerol structure on lipoprotein metabolism: a comparison of the effects of dioleoylpalmitoylglycerol in which palmitate is esterified to the 2- or 1-(3)-position of the glycerol. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1258:41–8.
- Wang CS, Kuksis A, Manganaro F. Studies on the substrate specificity of purified human milk lipoprotein lipase. *Lipids*. 1982;17:278–84.
- Scow RO, Blanchette-Mackie EJ. Transport of fatty acids and monoacylglycerols in white and brown adipose tissues. *Brain Res Bull*. 1991;27:487–91.
- El Maghrabi R, Waite M, Rudel LL. Monoacylglycerol accumulation in low and high density lipoproteins during the hydrolysis of very low density lipoprotein triacylglycerol by lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1978;81:82–8.
- Boulos P, Combe N. Biodisponibilité de l'acide α-linolénique: intérêt d'une huile combinée. *Oléag Corps Gras Lipides*. 2000;7:101–4.
- Couëdelo L, Boué-Vaysse C, Fonseca L, Montesinos E, Djoukitch S, Combe N, Cansell M. Lymph absorption of α-linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion. *Br J Nutr*. 2011;105:1026–35.
- Vaque E, Guy A, Couëdelo L, Gosse I, Durand T, Cansell M, Pinet S. Rapid access to structured triacylglycerols acylated with n-3 polyun-

- saturated fatty acids for nutritional applications. *Tetrahedron*. 2010;66:8872–9.
- 20. Bollman JL, Cain JC, Grindlay JH. Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine, or thoracic duct of rat. *J Lab Clin Med*. 1948;33:1349–52.
  - 21. Combe N, Constantin MJ, Entressangles B. Lymph absorption of nonvolatile oxidation products of heated oils in the rat. *Lipids*. 1981; 16:8–14.
  - 22. Lepage G, Roy CC. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J Lipid Res*. 1984;25:1391–6.
  - 23. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226:497–509.
  - 24. Cansell MS, Battin A, Degrace P, Gresti J, Clouet P, Combe N. Early dissimilar fates of liver eicosapentaenoic acid in rats fed liposomes or fish oil and gene expression related to lipid metabolism. *Lipids*. 2009; 44:237–47.
  - 25. Morisson WR, Smith L. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *J Lipid Res*. 1964;5:600–8.
  - 26. Rapoport SI, Igarashi M, Gao F. Quantitative contributions of diet and liver synthesis to docosahexaenoic acid homeostasis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2010;82:273–6.
  - 27. Porsgaard T, Høy CE. Lymph transport in rats of several dietary fats differing in fatty acid profile and triacylglycerol structure. *J Nutr*. 2000;130:1619–24.
  - 28. Vistisen B, Mu H, Høy CE. Recoveries of rat lymph FA after administration of specific structured 13C-TG. *Lipids*. 2003;38:903–11.
  - 29. Chon SH, Zhou YX, Dixon JL, Storch J. Intestinal monoacylglycerol metabolism developmental and nutritional regulation of monoacylglycerol lipase and monoacylglycerol acyltransferase. *J Biol Chem*. 2007;282:33346–57.
  - 30. Hayes KC. Synthetic and modified glycerides: effects on plasma lipids. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12:55–60.
  - 31. Lyubachevskaya G, Boyle-Roden E. Kinetics of 2-monoacylglycerol acyl migration in model chylomicra. *Lipids*. 2000;35:1353–8.
  - 32. Poumès-Ballihaut C, Langelier B, Houlier F, Alessandri JM, Durand G, Latge C, Guesnet P. Comparative bioavailability of dietary  $\alpha$ -linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat. *Lipids*. 2001;36:793–800.
  - 33. Renaud SC, Ruf JC, Petithory D. The positional distribution of fatty acids in palm oil and lard influences their biologic effects in rats. *J Nutr*. 1995;125:229–37.

### **1.3. Principaux résultats et développement**

#### **1.3.1. Effet de la régio distribution de l'acide $\alpha$ -linolénique sur son absorption et son transport lymphatique**

Les résultats obtenus indiquent que lorsque l'ALA est associé, au sein des TAG alimentaires, à un acide gras insaturé (acide oléique), sa position sur le squelette glycérol de ces TAG n'a pas d'influence significative sur :

- l'absorption lymphatique de l'ALA sur 24 h (18 versus 14 mg.h/mL lymph pour l'ALA en positions externes et interne, respectivement) ;
- la cinétique de transport de l'ALA de la lumière intestinale vers la lymphe aussi bien au niveau du temps, correspondant au pic d'absorption lymphatique (*Tmax*) qui se situe à 5 h, que de la concentration lymphatique maximale (*Cmax*) (21,5 mg/mL lymph pour l'ALA en positions externes et interne, respectivement).

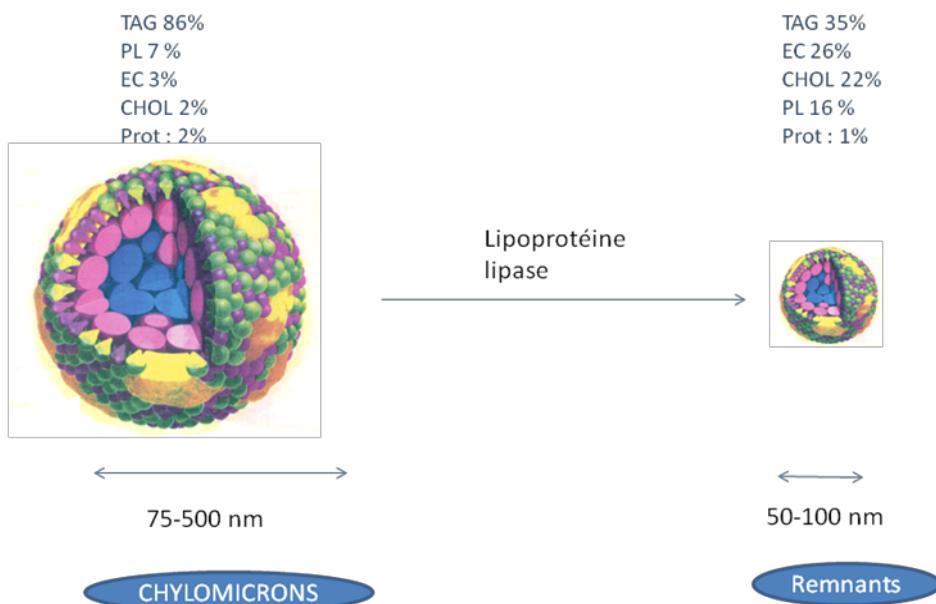
En revanche, la structure des TAG alimentaires n'est pas totalement conservée dans les TAG lymphatiques. En effet, 4 heures après administration de l'ALA estérifié à 100% en position *sn*-2, seuls 46% sont conservés à cette position dans les TAG lymphatiques. Cette proportion diminue au cours de la cinétique pour ne représenter que 29%, à 24 heures. Une proportion plus importante d'ALA est retrouvée dans les PL lymphatiques des rats intubés avec les TAG structurés présentant l'ALA en position externe.

#### **1.3.2. Effet de la régiodistribution sur l'absorption et le transport plasmatique de l' $\alpha$ -linolénique**

##### **1.3.2.1. Rappel sur le devenir métabolique des chylomicrons dans le plasma**

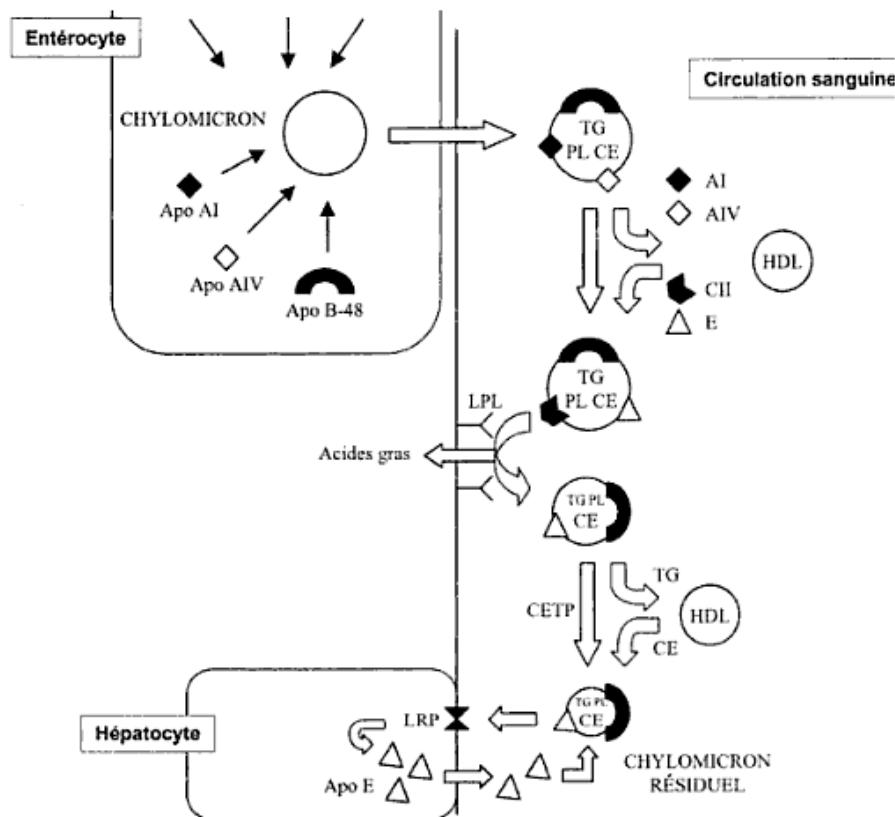
Les chylomicrons transportés par les canaux lymphatiques (Van Greevenbroek & Bruin 1998) regagnent la circulation systémique par le canal thoracique au niveau de la veine sous-clavière. Au cours de leur transit dans le sang, les TAG des chylomicrons sont alors hydrolysés sous l'action de la lipoprotéine lipase (LPL, EC 3.1.1.34) au niveau de l'endothélium des tissus qui capte ainsi les acides gras nécessaires au métabolisme cellulaire. Les chylomicrons se transforment alors en particules résiduelles ou « remnents » de chylomicrons qui sont de plus petites tailles, relativement plus riches en protéines, cholestérol et phospholipides (Figure 13).

La LPL, ancrée dans l'endothélium vasculaire est associée à son activateur/cofacteur, l'apo CII (Scanu 1966). La LPL catalyse l'hydrolyse des positions externes des TAG, pour libérer des acides gras libres et un 2-MAG (Wang et al. 1992), rapidement métabolisés.



**Figure 13 : Schématisation de la structure et composition d'un chylomircron à la sortie de l'entérocyte et d'un « remnant » de chylomircrons à son arrivée au niveau du foie. TAG : triacylglycérols, PL : phospholipides, EC : esters de cholestérol, CHOL : cholestérol, Prot : protéines**

Dès leur entrée dans la circulation sanguine, les chylomircrons vont rapidement acquérir de l'apo-C2 et de l'apo E provenant des lipoprotéines de haute densité (HDL) (Figure 14). Grâce à l'interaction de l'apo-C2 avec les récepteurs membranaires des cellules, les chylomircrons sont reconnus par la LPL des tissus périphériques. Les acides gras libérés suite à l'hydrolyse des TAG sont stockés (tissu adipeux) ou métabolisés (muscles striés squelettique, cœur et cerveau). Les remnants restant dans la circulation sanguine sont captés par le foie grâce à des récepteurs spécifiques de l'apo E permettant leur absorption dans les hépatocytes par endocytose (Hussain et al. 1996) pour leur épuration (Figure 14). Ce processus métabolique est rapide et, en conditions physiologiques, les chylomircrons sont présents dans le plasma uniquement 4 à 6 heures suivant un repas gras (Vaubourdolle 2007). La disparition des chylomircrons peut être estimée en suivant l'évolution de leur profil lipoprotéique (Sultan 1995 ; Roche & Gibney 2000 ; Lairon 2008).



**Figure 14 :** Schématisation de l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) dès l'entrée des chylomicrons lymphatiques dans la circulation sanguine. Captage des remnants par les hépatocytes avec le récepteur de l'apo E (LRP). TAG : triacylglycérols, PL : phospholipides, CE : esters de cholestérol, CHOL : cholestérol, Prot : protéines (Vaubourdolle 2007)

#### 1.3.2.2. Transport plasmatique de l'acide $\alpha$ -linolénique suite à l'absorption des triacylglycérols structurés

Les résultats obtenus indiquent que la position de l'ALA sur le squelette glycérol des TAG alimentaires n'a pas d'influence significative sur :

- la cinétique de transport de l'ALA de la lumière intestinale qui est maximale à 4 h, dans nos conditions expérimentales ;
- les concentrations plasmatiques de l'ALA mesurées à 4 ou 6 heures après l'intubation ;
- la teneur plasmatique en ALA post-prandial

En revanche, l'analyse des structures des TAG du plasma post-prandial au point 6 h révèle que la proportion d'ALA en position sn-2 est deux fois plus importante lorsqu'il est fourni en position interne plutôt qu'externe dans les TAG alimentaires (21% vs 12%, respectivement).

#### 1.4. Conclusion

L'utilisation de TAG structurés purs et de composition maîtrisée permet de mettre en évidence que, **la bio accessibilité intestinale de l'ALA n'est pas affectée par sa localisation sur le TAG alimentaire ni en termes de vitesse d'absorption, ni de teneur lymphatique.** Ceci suggère que : i) l'hydrolyse des deux types de TAG par la lipase pancréatique se fait avec la même affinité et à la même vitesse vis à vis des positions externes occupées par l'ALA ou l'acide oléique ; ii) la solubilité micellaire de l'ALA n'est pas significativement différente qu'il se présente sous forme d'acide gras libre ou de 2-MAG. En outre, l'analyse de la structure des TAG lymphatiques montre : i) une conservation relativement bonne de l'ALA estérifié en positions externes des TAG alimentaires et ii) une conservation de l'ALA estérifié en position interne des TAG alimentaires qui diminue avec le temps, passant de 46 % à 29 % dans les fractions lymphatiques 3-4h et 7-24h, respectivement. Cette redistribution de l'ALA dans les TAG lymphatiques indique que deux voies différentes de synthèse des TAG sont sollicitées : la voie des 2-MAG, qui reste prépondérante, et la voie secondaire de l'acide phosphatique. Ces résultats suggèrent aussi une isomérisation de la position interne du 2-MAG vers les positions externes (Akesson et al. 1978) puis une hydrolyse intestinale complète des TAG alimentaires par une MAG-lipase (Christensen & Høy 1996 ; Chon et al. 2007). L'administration d'une quantité importante de lipides en une seule dose pourrait stimuler la MAG-lipase et participer à la diminution de la proportion d'ALA en position *sn*-2 dans les TAG lymphatiques. Cette stimulation permettrait à l'organisme de maintenir une « homéostasie » des compositions et/ou distributions en AG des lipides lymphatiques. La Figure 15 propose un schéma récapitulatif de synthèse pour les TAG et les PL issus des 2 types de TAG structurés utilisés.

Les données relatives au compartiment plasmatique mettent en évidence que la bio disponibilité plasmatique de l'ALA n'est pas affectée par sa localisation sur le TAG alimentaire ni en termes de vitesse d'apparition dans les lipides, ni de teneur plasmatique. La structure des TAG plasmatiques reflète le remaniement de structure observé au niveau des TAG lymphatiques. Néanmoins, le maintien partiel, mais significatif, de l'ALA en position interne jusque dans le compartiment plasmatique permettrait de le préserver d'une  $\beta$ -oxydation précoce. Il pourrait être ainsi dirigé spécifiquement vers le foie et servir de

substrat aux acyltransférases. Enfin, la concentration d'ALA dans les AGL du plasma 6 heures après l'intubation tend à être supérieure dans le groupe de rats intubés avec les TAG contenant l'ALA en position externe. Ceci est en accord avec la régiosélectivité de la LPL (Wang et al. 1992).

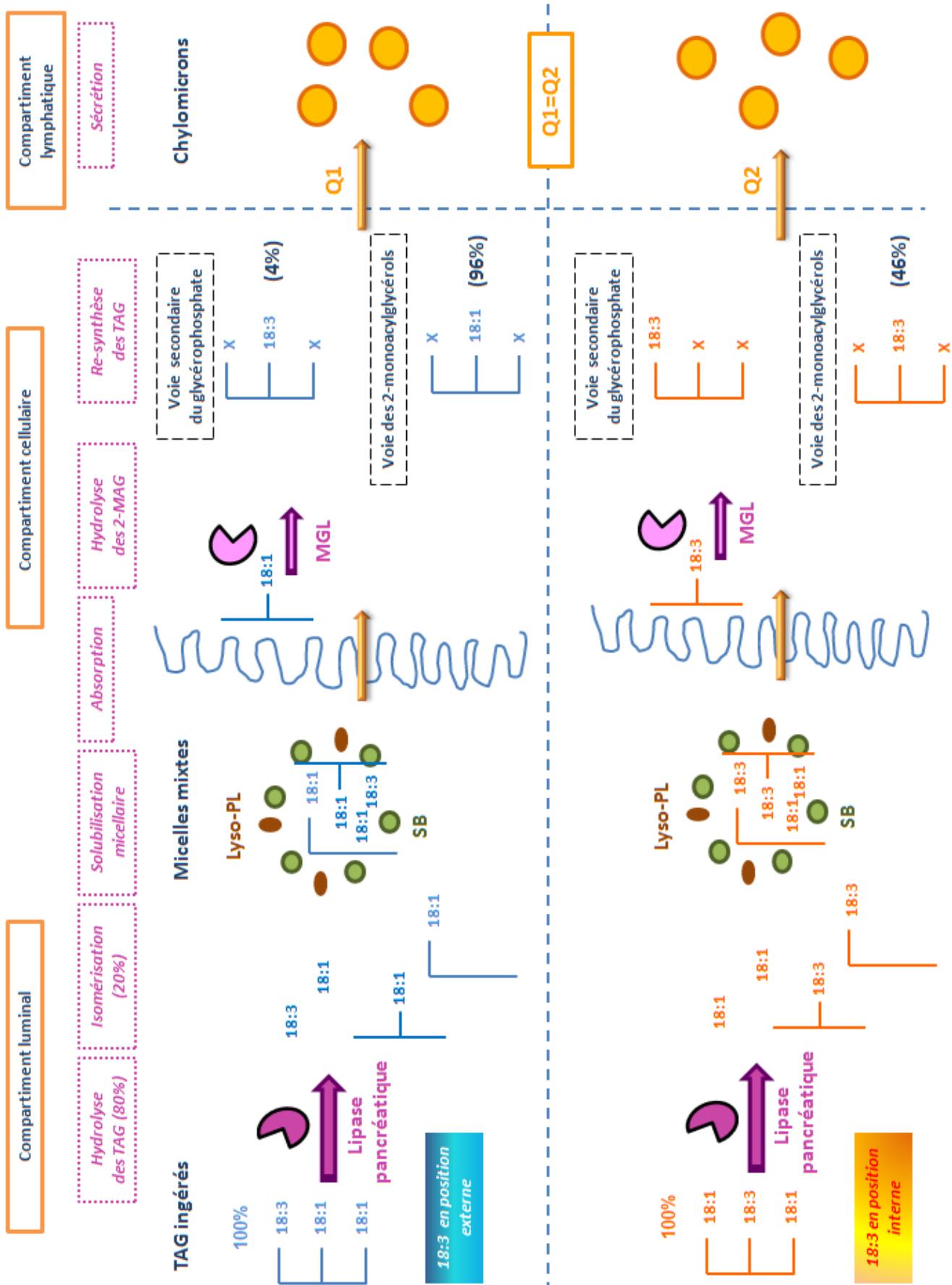


Figure 15 : Représentation schématique du devenir et de la sécrétion (Q) de l'ALA dans les chylomicrons lymphatiques selon sa position sur le squelette glycérol du triglycéride structuré chez le rat (MGL : monoglycéride lipase, SB : sels biliaires, Lys-PL : lysophospholipides)

## 2. Effet de la composition des micelles mixtes sur la sécrétion des acides gras par les cellules Caco-2

### 2.1. Introduction

La morphologie et le mécanisme du modèle cellulaire Caco-2 sont comparables à ceux de l'entérocyte sain (§ I-2.2.2.2). Leur utilisation permet donc d'étudier l'absorption et la sécrétion de molécules lipidiques variées. Néanmoins, pour être efficacement absorbés, les acides gras (sous forme libre ou 2-MAG) doivent préalablement être, soit solubilisés dans des micelles mixtes lipides/sels biliaires, soit couplés à l'albumine. Certaines études mettent en avant que la composition en lipides des micelles mixtes module l'absorption des acides gras par les cellules Caco-2 (Jackson et al. 2009 ; van Greenenbroek et al. 1996) et la synthèse des lipoprotéines sécrétées par ce modèle cellulaire (Tsuzuki 2007). Nous avons indiqué (§ I-2.2.2.3) que l'absorption intestinale des acides gras peut être médiée par une protéine membranaire localisée au niveau apical des entérocytes. Ce transporteur est saturable et son affinité est fonction de l'acide gras considéré (Tranchant et al. 1998). Par ailleurs, l'accès direct aux cellules entérocytaires permet d'étudier précisément la cytotoxicité des lipides. Ainsi, la nature et la concentration des acides gras et des tensioactifs composant les micelles mixtes induisent des modifications physiologiques (perméabilité membranaire) et morphologiques (altération des jonctions serrées de la monocouche cellulaire et de la structure des microvillosités). En ce qui concerne l'ALA, seule une équipe (Tranchant et al. 1997) a étudié les mécanismes cellulaires mis en jeu dans le cadre de son absorption. Toutefois, ces travaux font référence à l'utilisation d'un clone des cellules Caco-2 (cellules TC7) et n'utilisent qu'un même acide gras. Aucune étude n'a étudié précisément les mécanismes impliqués dans l'absorption de l'ALA en mélange avec d'autres acides gras. De plus, si un certain nombre d'études a montré l'importance de la présence des PL (sous forme native ou sous forme de Lyso-PL) sur l'absorption des TAG chez l'homme et l'animal (Nishimukai et al. 2003 ; Nishimukai et al. 2007; Garaiova et al. 2007 ; Raatz et al. 2009), peu de travaux portent sur l'influence des PL sur l'absorption des acides gras par les cellules Caco-2 (Jackson et al. 2009).

Dans ce contexte, nous nous sommes attachés à suivre, sur une cinétique de 24 heures, les mécanismes de sécrétion des acides gras et notamment de l'ALA par les cellules Caco-2.

L'originalité de cette étude repose sur l'utilisation de micelles mixtes composées des produits d'hydrolyse de l'huile de lin non émulsionnée ou émulsionnée avec deux types de PL (lécithine de soja ou 17:0-PC). Un extrait purifié de bile est utilisé pour la préparation des micelles mixtes alors que classiquement seul du taurocholate de sodium est utilisé. Cette démarche permet de s'approcher autant que possible des conditions de digestion et d'absorption des lipides *in vivo*.

Les objectifs de cette étude visent à :

- i) Déterminer, pour chaque type de micelles mixtes étudié, la concentration en lipides non toxique pour les cellules Caco-2 ;
- ii) Etablir la cinétique de sécrétion des acides gras et notamment de l'ALA, issu de l'hydrolyse des TAG de l'huile de lin ;
- iii) Evaluer l'impact de la nature des Lyso-PL présents dans les micelles sur la sécrétion des acides gras.

**2.2. Lysophospholipids enhance fatty acid release by human intestinal Caco-2 cells.** L. Couëdelo, C. Boué-Vaysse, L. Fonseca, E. Montesinos, S. Djoukitch, N. Combe, M. Cansell. En révision.

## **Lysophospholipids enhance fatty acid release by human intestinal Caco-2 cells**

Leslie Couëdelo<sup>a,b</sup>, Carole Boué-Vaysse<sup>b</sup>, Laurence Fonseca<sup>b</sup>, Emeline Montesinos<sup>b</sup>, Sandrine Djoukitch<sup>b</sup>, Nicole Combe<sup>b</sup>, Maud Cansell<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Chimie et Biologie des Membranes et des Nanoobjets (CBMN), CNRS, UMR 5248,  
Université de Bordeaux, IPB, Allée Geoffroy Saint Hilaire, 33600 Pessac, France

<sup>b</sup> ITERG, Unité de Nutrition, Métabolisme & Santé, Avenue des Facultés, 33405 Talence  
Cedex, France

Running title: Fatty acid uptake by Caco-2 cells

\* To whom correspondence should be addressed: Maud Cansell,

CBMN, CNRS, UMR 5248, Université de Bordeaux, IPB, Allée Geoffroy Saint Hilaire,  
33600 Pessac, France

Tel: 33 (0)5 40 00 68 19

Fax: 33 (0)5 56 37 03 36

e-mail: [mcansell@enscbp.fr](mailto:mcansell@enscbp.fr)

## **Abstract**

Little is known about the effect of dietary fat composition on food intake. The aim of this study was to investigate the influence of the presence and/or composition of lyso-phospholipid (lyso-PL) in mixed micelles on fatty acid release, using Caco-2 cells as a model of nutrient absorption in intestinal epithelium. Bile salt/lipid mixed micelles were prepared from bile extract and lipid products obtained by *in vitro* digestion of flaxseed oil and two flaxseed oil emulsions, one stabilized by sodium deoxycholate and soya lecithin and the other stabilized by sodium deoxycholate and 1,2 diheptadecanoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidylcholine (17:0-PC). Total fatty acid release at the basolateral side of Caco-2 cells was monitored from 30 min to 6 h. After 6-h incubation, the highest total fatty acid release was observed with mixed micelles containing 17:0-lyso-PC > soya lyso-PL > no PL.  $\alpha$ -linolenic acid release was strongly promoted by the presence of lyso-PL in the mixed micelles provided to Caco-2 cells (9.83 and 7.12 nmol/mg prot for 17:0-lyso-PC and soya lyso-PL, respectively) compared with the case where no lyso-PL was present (3.82 nmol/mg prot). On the whole, these results highlight the interest of dietary fat emulsions in healthy food.

**Key words:** Lysophospholipids, flaxseed oil,  $\alpha$ -linolenic acid uptake and release, Caco-2 cells

## **Introduction**

The term “bioavailability” is defined as the fraction of a nutrient ingested that is available for physiological functions or storage. It covers two concepts: bioaccessibility and bioactivity<sup>(1)</sup>. Bioaccessibility refers to the fraction of a nutrient released from a food matrix in the gastrointestinal tract and available for intestinal absorption<sup>(1)</sup>. Thus, understanding lipid digestion is a key factor in monitoring lipid bioaccessibility. Several *in vitro* studies have been developed to explore this aspect<sup>(1)</sup>. *In vitro* test-tube digestion methods are based on mimicking the biochemical environment and the biomechanical processes that take place during the digestion process<sup>(2)</sup>. This physicochemical approach simulates the sequence of events that occur during digestion in the human gastrointestinal tract. In particular, structural changes, digestibility, and release of food components may be studied under simulated gastrointestinal conditions. The different steps implied in lipid digestion involve: (a) hydrolysis of the lipids into simpler molecules (i.e., free fatty acids, monoacylglycerols (MAG), lyso-phospholipids (lyso-PL)) by lipolytic enzymes such as gastric and pancreatic lipases and phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), and (b) the solubilisation of the hydrolysis products into bile-salt mixed micelles<sup>(3,4)</sup>. The influence of the chemical and physical state of the lipids on their digestibility has been extensively studied *in vitro*<sup>(5-9)</sup>. Enzyme hydrolysis (catalysis and kinetics) and mixed micelle formation are influenced by the type and structure of the lipids provided in the diet and, in particular, oil emulsification and the associated parameters (droplet size, emulsion interface composition, etc.)<sup>(8)</sup>. Thus, emulsification may be responsible for increased fatty acid absorption compared with oil in bulk phase as observed *in vivo* in both human<sup>(10,11)</sup> and animal studies<sup>(12)</sup>. Moreover, PL in bile or present in the diet and/or lyso-PL resulting from the action of PLA<sub>2</sub> play an active role in lipid micellization with bile salts.

However, few studies have investigated the role of dietary PL on lipid absorption<sup>(11,13)</sup>. In rats, PL enhanced lymphatic absorption of TAG<sup>(14,15)</sup> but decreased that of cholesterol<sup>(16)</sup>.

Cell cultures are also widely used to elucidate the lipid absorption stage by modeling the passage of dietary lipids through the intestinal mucosa. The data obtained from this type of *in vitro* studies make it possible to characterize the bioaccessibility of a nutrient. Enterocyte cultures are impractical due to the loss of the normal basolateral membrane organization, so Caco-2 cells are widely used to model lipid uptake and metabolism. Indeed, these cells derived from human colonic adenocarcinoma differentiate into enterocyte-like cells with microvillus and basolateral membranes separated by tight junctions<sup>(17)</sup>. Moreover, they are capable of lipoprotein synthesis and secretion<sup>(18,19)</sup>. Cell culture studies examining the impact of dietary fat composition on chylomicron synthesis and secretion use different types of lipids: (1) fatty acids either single species<sup>(20-22)</sup> or mixtures<sup>(18,19)</sup>, (2) *sn*-1 or *sn*-2 MAG<sup>(23)</sup>; (3) mixed micelles similar to those found during the digestion of a diet consisting of two or more lipids: fatty acids, 2-MAG, phosphatidylcholine (PC), lyso-PC, and cholesterol<sup>(24,25)</sup>. Another approach consists of using pure TAG subjected to lipase hydrolysis prior to incubation with cells<sup>(26)</sup>. In Caco-2 cells, it was shown that PC alone promoted the secretion of newly synthesized TAG<sup>(27)</sup>. A similar effect was also reported for phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylserine<sup>(27)</sup>. The effect of PC occurred at later stages in the secretory pathway, mobilizing intracellular TAG pools. Indeed, both PC<sup>(27)</sup> and lyso-PC<sup>(25)</sup> increased TAG synthesis in Caco-2 cells. It is worth noting that the presence of surfactants in the culture medium may affect cell viability. Lyso-PC was shown to perturb cytoplasmic membrane integrity depending on the concentration and length of the hydrophobic moiety<sup>(28)</sup>.

The purpose of this study was twofold. First, we investigated the effect of the presence or absence of lyso-PL and the impact of the composition of lyso-PL on fatty acid release by Caco-2 cells. Two types of lyso-PL from PLA<sub>2</sub> digestion were considered: one from pure 1,2

diheptadecanoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidylcholine (17:0-PC), and the other one from a soya lecithin consisting of a mixture of PL, more similar to dietary food. Second, this study was designed to enhance our understanding of some recent observations concerning the *in vivo* bioavailability of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) from flaxseed oil delivered in emulsified or non-emulsified forms, in rats. Oil emulsification was found to significantly promote the rate and extent of ALA recovery in lymph<sup>(12)</sup>. Several hypotheses were put forward to explain this result. First, physicochemical data suggested that the emulsification of flaxseed oil enhanced its digestibility, due to faster TAG hydrolysis resulting from the preexisting oil/water interface and better solubilisation of hydrolysis products in mixed micelles<sup>(12)</sup>. Second, dietary PC may favour the formation and/or secretion of chylomicrons. In order to collect specific data on the absorption step, Caco-2 cells were incubated with mixed micelles consisting of the digestion products of flaxseed oil in bulk phase or emulsified with soya lecithin. A third composition of mixed micelles consisting of the digestion products of flaxseed oil emulsified with 17:0-PC was also used to assess the influence of the lyso-PL type. This study revealed that the three mixed micelle compositions, which differed mainly by lyso-PL presence or composition had different effects on fatty acid release.

## **Experimental methods**

### **Materials**

Flaxseed oil was supplied by ITERG (Pessac, France). An average molecular weight of 870 g/mole was considered for flaxseed oil TAG. Soya lecithin (Lecimulthin) was kindly provided by Cargill (Baupre, France). The lecithin was mainly composed of PC (13% w/w), PE (30% w/w), phosphatidylinositol (25% w/w) and lyso-PL (23% w/w). The average molecular weight was assumed to be 788 g/mole for determining the PL concentration. 17:0-PC (purity

99%, MW = 762 g/mole) was purchased from CIL (Ste Foy la Grande, France). Sodium deoxycholate (MW = 414 g/mole), PLA<sub>2</sub> from *Naja mossambica mossambica*, lipase from porcine pancreas, and porcine bile extract were purchased from Sigma (Sigma, St Quentin Fallavier, France). Porcine bile extract was purified from coloured pigments on activated charcoal as previously described<sup>(29)</sup>. All the solvents used in this study were of analytical grade. Radioactive <sup>14</sup>C-mannitol (specific activity 0.1 mCi/mL mannitol) was obtained from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) cell culture reagent as well as PEST (Penicillin 100 IU/mL, Streptomycin 100 µg/mL), nonessential amino acids, trypsin, EDTA and decomplemented foetal bovine serum (FBS) were purchased from Sigma (Sigma, St Quentin Fallavier France). Plastic polystyrene flasks (175 cm<sup>2</sup>) and 12 mm polycarbonate Transwell® filter inserts with 0.4 µm pores were from Corning (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) and Costar, (Costar, Cambridge, MA, USA), respectively.

### **Oil emulsification and *in vitro* digestion**

Oil-in-water (O/W) emulsions were prepared at room temperature, under nitrogen bubbling to prevent lipid oxidation as previously described<sup>(12)</sup>. Two O/W formulations were prepared containing flaxseed oil (55% w/w), sodium deoxycholate (0.5% w/w) and either soya lecithin (10% w/w) or 17:0-PC (10% w/w), dispersed in distilled water. Mixed micelles with total lipid concentrations ranging from 0.25 to 5 mM were prepared following a protocol based on Couëdelo et al.<sup>(12)</sup>. Digestion was performed using pancreatic lipase (0.5 mg/mL) in the case of flaxseed oil or pancreatic lipase and PLA<sub>2</sub> (1.0 mg/mL) in the case of emulsions. The digestion conditions ensured that neither intact TAG nor intact PL remained in the medium as demonstrated in Couëdelo et al.<sup>(12)</sup>. The digestion products, i.e. free fatty acids and 2-MAG from TAG hydrolysis by lipase action, and free fatty acids and lyso-PL from soya

lecithin or 17:0-PC hydrolysis by PLA<sub>2</sub> action were mixed with a bile-salt solution in DMEM. The mixtures were homogenized using an ultraturax blender (IKA, Staufen, Germany) equipped with a generator axis (10 mm S25-N-10G, IKA, Staufen, Germany) under nitrogen gas flow. Finally, they were stirred at room temperature, overnight. The amount of bile salts required to obtain the micellar stage was calculated according to Couëdelo et al.<sup>(12)</sup>. Micellization was achieved when the resultant solutions were optically clear<sup>(30)</sup>. This was verified by turbidity measurements (optical density at 400 nm) performed in a thermostat-controlled cell support using a Perkin Elmer Lambda Bio 20 spectrophotometer (Waltham, MA, USA). The full medium obtained after enzyme hydrolysis was kept to incubate on Caco-2 cells, i.e. unfiltered, in order to mimic *in vivo* conditions. Tables 1 and 2 present lipid composition and fatty acid proportions in the three types of mixed micelles, respectively. Before incubation with Caco-2 cells, the mixed micelles were diluted with DMEM containing 20 mM bile salts. Just after dilution, mean particle diameter and particle size distributions of the aggregates were determined using a laser diffraction particle size analyzer (Coulter LS 230, Beckman, Brea, CA, USA). Irrespectively of their composition, the mixed micelles exhibited extensive size distribution, with mean diameters around 3-5 µm (Results not shown). These large sizes may account for an aggregation phenomenon due to electrostatic interactions between the mixed micelles and the salts and/or amino acids present in the culture medium.

### **Cell culture**

The Caco-2 human colon adenocarcinoma cell line was provided by the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% (by vol) FBS, 1% (by vol) nonessential amino acids, and 1% (by vol) PEST. Cells were grown at 37°C, in a humidified incubator (90% humidity) with a 95% air-5% CO<sub>2</sub>

atmosphere. The medium was changed every second day. Cells were plated at a density  $\geq 1.0 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> in 175-cm<sup>2</sup> flasks and split with 0.05% trypsin-0.5 nM EDTA when they reached confluence. For experiments, Caco-2 cells at passages 28 - 35 were seeded at a cell density of  $1.3 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> onto 12 mm polycarbonate Transwell® filter inserts with 0.4  $\mu\text{m}$  pores in DMEM, supplemented with 5% (by vol) FBS, 1% (by vol) nonessential amino acids and 1% (by vol) PEST. The inserts were placed in 12-well culture plates, allowing separated access to the apical and basolateral surfaces of the cell monolayers. Cells were allowed to grow and differentiate for 24 to 28 days. The culture medium was changed both apically and basolaterally every second day. Transepithelial electric resistance (TEER) measurements were taken twice weekly using a TEER voltohmmeter (MillicelERS apparatus, Millipore, Bedford, MA, USA). The TEER value of monolayers in each Transwell chamber was above  $300 \pm 20$   $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , indicating cell confluence and tight junction formation<sup>(22)</sup>. The apparent permeability (Papp) of Caco-2 cell monolayers was assessed by the passage of <sup>14</sup>C-mannitol through the monolayer. The Papp value was calculated as the percentage of mannitol retrieved on the basolateral side, following the addition of 50  $\mu\text{M}$  <sup>14</sup>C-mannitol to the apical side of the monolayer. <sup>14</sup>C-mannitol was quantified in a scintillation beta-counter (Tri Carb 2800 TR, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Scintillation liquid (9.5 mL, Ready value, Beckman, Brea, CA, USA) was added to the samples (500  $\mu\text{L}$ ), kept overnight for equilibration before counting. The Papp value for the paracellular transport of mannitol was less than 0.1% per hour, corresponding to an apparent permeability coefficient of  $0.1 \times 10^6$  cm/s, in agreement with values reported for Caco-2 cells at confluence<sup>(31)</sup>.

### Cellular release: time and dose effects

Twenty-four hours before the experiments, the spent culture medium was aspirated from the apical and basolateral chambers and the Caco-2 monolayers were washed with PBS. Then, 0.5

and 1.5 mL serum-free DMEM at 37°C were added to the apical and basolateral compartments of the Transwell insert, respectively. To study time-dependent lipid release, 0.5 mL micellar solution was added to Caco-2 monolayers grown on the Transwell insert. Incubation times at 37°C varied from 30 min to 6 h. Dose-dependent lipid release was monitored by incubating the cells with 0.25 to 5 mM total lipids at 37°C, for 4 h. Lipid release was stopped by aspiring the basolateral compartment separately. Basolateral media were immediately freeze-dried. The monolayers were washed twice with PBS. Cells were detached from each filter by adding 0.5 mL isoctane to the apical compartment and 1.5 mL to the basolateral compartment. Cells were incubated in the dark, under slight stirring conditions, overnight. Then, cells were transferred into plastic tubes and dried under nitrogen. The cell protein content of each well filter was measured as described by Bradford<sup>(32)</sup> in order to express the fatty acid content as pmole fatty acid/mg protein. All experiments were performed in duplicate. TEER measurements were performed on the monolayer, before and after the experiments. Cell viability was also checked using the tetrazolium salt-test as reported in Mosmann<sup>(33)</sup>.

### **Fatty acid analysis**

The lipids in the basolateral medium were transmethylated as described by Lepage and Roy<sup>(34)</sup>. Trimyristolein was added as an internal standard for total fatty acid quantification. The resulting fatty acid methyl esters were analyzed by GC on a BPX 70 capillary column (60-m long, 0.25-µm film, 0.25-mm i.d. from SGE (Victoria, Australia)), using H<sub>2</sub> as carrier gas, with a split ratio of 1:80. The GC system consisted of a gas chromatograph (HP 4890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a flame ionization detector maintained at 280°C. Injector temperature was 250°C. Column temperature was increased from 150°C to 200°C (1.3°C/min), maintained at 200°C for 20 min, then increased from 200°C to 225°C

(10°C/min), and held at 225°C for 20 min. Data were collected and integrated by a Chromjet SP 4400 integration system (Spectra-Physics, Irvine, CA, USA). Fatty acids from Sigma France (Saint Quentin Fallavier, France) and natural extracts of known composition were used as standards for column calibration. The variation in peak area between two injections was less than 2%. Results were expressed in nmoles FA per milligram cell protein.

### **Statistical analysis**

Data were expressed as the mean ± SD of 3 wells per experiment. For the release of total and individual fatty acids, in the basolateral medium, statistical significance of differences was determined between the three independent groups (mixed micelles from flaxseed oil and containing 17:0-lyso-PC or soya lyso-PL or no PL) within a same hourly fraction, using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Fisher's LSD post-hoc test. Inter-group differences were considered significant at P<0.05. Statgraphics Plus version 5.0 statistical package (Rockville, Maryland, USA) was used throughout.

### **Results**

In this study, the fatty acid release by Caco-2 cells was investigated using mixed micelles of different compositions. All the mixed micelles contained the same mixture of bile salts purified from porcine bile. However, one type of micelles was prepared using flaxseed oil, and contained free fatty acids and 2-MAG from pancreatic lipase digestion of the oil. Two other types of micelle were based on lipid hydrolysis products of emulsified flaxseed oil, containing lyso-PL from the PLA<sub>2</sub> digestion of either soya lecithin or 17:0-PC. We evaluated the fatty acid release in the basolateral medium using Caco-2 cells grown on permeable Transwell polycarbonate filters.

### **Effect of mixed micelle lipid composition and concentration on cell viability**

Before studying time-dependent lipid release by Caco-2 cells, the non-toxic lipid concentration range was determined for micelles without lyso-PL and those containing soya lyso-PL, following incubation at 37°C for 4-h. In the absence of lyso-PL, cell viability was above 80% irrespective of the lipid concentration, up to 5 mM. In contrast, when cells were incubated with mixed micelles containing soya lyso-PL, their viability decreased drastically, and only 10% of the cells were still alive at 1 mM lipids. It is worth noting that no cytotoxic effect on Caco-2 cells was observed when the culture medium contained only bile salts (5 or 20 mM). Consequently, all the following experiments were carried out at lipid concentrations of 0.25 mM to eliminate cytotoxicity with flaxseed oil digestion products and reduce mortality (below 25%) with emulsion digestion products.

### **Fatty acid release by Caco-2 cells**

Lipid release by Caco-2 cells was estimated by the amount of fatty acids secreted into the basolateral medium (Fig 1A). Lipid release was measured after 30 minutes to 6 hours incubation of Caco-2 cells with the various mixed micelle compositions. Total fatty acid release was dependent on the initial lipid composition of the mixed micelles. For example, after 30 minutes, release was 3-5 times higher with mixed micelles containing lyso-PL (either from soya lecithin or 17:0-PC) than those derived from flaxseed oil (Table 3). Thereafter, the recovery of total fatty acids remained significantly different for the three systems ( $P<0.05$ ), with the highest release in cultures containing lyso-17:0-PC and the lowest in those without lyso-PL (Fig 1A, Table 3). Palmitic (16:0), oleic (18:1) and linoleic (18:2) acids were the three main fatty acids present in the basolateral medium, representing altogether more than 60% of total fatty acids, irrespective of mixed micelle composition or time elapsed (Table 3).

ALA release measured with mixed micelles containing lyso-17:0-PC or lyso-PL was significantly higher ( $P<0.05$ ) than with mixed micelles without lyso-PL (Fig 1B, Table 3). However, for the longer incubation time (6 hours), this difference was no more significant. It is worth noting that, starting 30 minutes after treating the cells with the mixed micelles cells, DHA contents increased noticeably when mixed micelles containing lyso-17:0-PC or lyso-PL were used compared with mixed micelles without lyso-PL (Table 3).

In the case of mixed micelles without lyso-PL, it was possible to investigate lipid concentrations above 0.25 mM. Figure 2 presents total fatty acid and ALA releases in the basolateral medium at 4 h as a function of the initial micelle lipid concentration provided to the cells: the lower the initial lipid concentration, the higher the fatty acid release. ALA release followed the same pattern.

## Discussion

In order to simulate physiological conditions, three different mixed micelles were formulated based on lipolysis products of flaxseed oil with or without PL. Consequently, fatty acids were provided to the cells as free fatty acids and MAG simultaneously. It is worth noting that the natural bile-salt mixture in the mixed micelles was not depleted of PL so that this lipid species represented about 2 wt.% in the bile-salt extract. To our knowledge, no previous study on Caco-2 cells used mixed micelles prepared from edible oil digestion products. Indeed, lipid uptake experiments are generally performed using fatty acids bound to bovine serum albumin<sup>(35)</sup> or mixed micelles of bile salts containing free fatty acids alone or in mixtures<sup>(19)</sup> as well as, in few cases, complex mixtures of two or more lipids: MAG, PL, lyso-PL and cholesterol<sup>(24,25,36)</sup> or synthetic TAG digestion products<sup>(26)</sup>. Thus, the cytotoxic effect of the mixed micelles used in this work was first investigated. No cytotoxicity was observed with

mixed micelles containing no lyso-PL up to 5 mM of lipids, i.e. containing only free fatty acids and MAG from *in vitro* flaxseed oil digestion, and 20 mM bile salts. This was in agreement with other studies showing that 5 mM free fatty acids had little or no effect on cell viability, although this depended on the type of fatty acid (chain length, unsaturation degree)<sup>(19,21)</sup>. Indeed, for long chain polyunsaturated fatty acids such as DHA, cell integrity was negatively affected at concentrations below 5 mM<sup>(21,37)</sup>. It is worth noting that, in most studies, mixed micelles were based on sodium taurocholate<sup>(19,20)</sup>, so no data are available concerning the cytotoxic effect of natural bile-salt mixtures. No deleterious effect of the mixture used was observed up to 20 mM. Cytotoxic effects of lyso-PL were observed on cell viability at concentrations exceeding 0.02 mM in mixed micelles prepared from emulsions. It is worth noting that some studies reported the use of lyso-PC up to 0.2 mM with less than 1% viability loss in Caco-2 cells following short (2 h)<sup>(25)</sup> or longer (24 h)<sup>(24)</sup> incubation times.

In the duodenum, the lipolytic products of lipid digestion, *i.e.* fatty acids, 2-MAG, and lyso-PL, are incorporated into bile salt micelles. They are then transported through the unstirred water layer to the apical side of the enterocytes. Micellar solubilisation enhances fatty acid uptake by increasing the gradient of soluble fatty acids in the unstirred water layer<sup>(4)</sup>. Passive diffusion and/or protein-mediated uptake have been advocated as possible mechanisms for lipolytic compound uptake at the luminal cell surface<sup>(23,38)</sup>. Fatty acid uptake *via* a carrier-mediated mechanism has been demonstrated to occur via saturable kinetics in Caco-2 cells<sup>(23,38)</sup> particularly for ALA<sup>(20)</sup>. Moreover, long chain fatty acid uptake was competitively inhibited by short or other long-chain fatty acids<sup>(20,38)</sup>. However, intestinal cells are not only capable of absorbing monomers. Recently, possible endocytosis of small lipid micelles at the apical membrane of Caco-2 cells was reported based on electron micrographs of the microvillus region<sup>(19)</sup>. In the presence of mixed micelles without lyso-PL, fatty acid release

decreased with the initial lipid concentration (Fig. 2), in relation with a concomitant depletion of the total fatty acids in the apical medium (Results not shown). This research only focused on fatty acid release in the basolateral medium, without analyzing the type of lipids and lipoproteins in which they were incorporated. Indeed, the influence of the fatty acids present in the mixed micelles on the amount of lipoproteins secreted as well as their TAG composition made interpretation difficult. However, monounsaturated fatty acid mixtures (rich in oleic acid) have been reported to stimulate the secretion of TAG-rich lipoproteins with larger particle size compared to polyunsaturated fatty acid mixtures<sup>(19)</sup>. The recovery of total fatty acids in the basolateral medium was significantly higher ( $P<0.05$ ) with mixed micelles containing lyso-PL than those without it (4.0- and 2.7-fold for lyso-17:0-PC and soya lyso-PL, respectively) (Fig. 1A, Table 3). These results may indicate that lyso-PL play a regulatory role in fatty acid incorporation, and lipid synthesis and/or secretion. Indeed, lyso-PL have been shown to be involved in the high efficiency of intestinal lipid absorption<sup>(24)</sup>. In particular, oleic acid incorporation in Caco-2 cells was four times higher in the presence of lyso-PL than when oleic acid-bovine serum albumin complex was used<sup>(24)</sup>. Moreover, it has been suggested that lyso-PC activates the metabolic routes leading to TAG and PL synthesis in the cells<sup>(24,25)</sup>. The presence of lyso-PC was also associated with an increased secretion of apoB-containing TAG-rich lipoprotein particles in Caco-2 cells<sup>(24)</sup>. In rats, it has been postulated that lyso-PL occur at the secretory pathway stage, mobilizing intracellular stores of both newly-synthesized and preformed TAG<sup>(15)</sup>.

Incubating Caco-2 cells with lipid mixtures enriched with one type of fatty acid (saturated, monounsaturated, or polyunsaturated) significantly modified the fatty acid profile of both cellular and secreted lipids<sup>(19,39)</sup>. Moreover, Caco-2 cells presented  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$  desaturase as well as elongase activity<sup>(26,39,40)</sup>. This was shown through the conversion of linoleic to arachidonic acid using labeled fatty acids<sup>(39,40)</sup> or structured TAG lipolysis products<sup>(26)</sup>. The

conversion of ALA to EPA but not to DHA was also demonstrated<sup>(40)</sup>. However, incorporation of fatty acids from the medium into Caco-2 cells, as well as desaturase and elongase activities were highly dependent on fatty acid concentration<sup>(40)</sup>, cell maturation<sup>(39)</sup>, and cell dietary status<sup>(26)</sup>. In our study, ALA release was significantly higher ( $P<0.05$ ) with mixed micelles containing lyso-PL than those that did not although the type of lyso-PL did not affect ALA release (almost 2-fold for lyso-17:0-PC or lyso-PL from soya compared with no lyso-PL) (Fig. 1B, Table 3). Moreover, a significant increase DHA but not in EPA was observed in the basolateral medium of cells incubated with the lipolysis products resulting from emulsion digestion (Table 3). This suggested that, irrespectively of the mixed micelle lipid composition, ALA was provided in sufficient amount to act as a substrate for desaturase and elongase enzymes. The desaturase activity was probably enhanced by increased absorption of ALA.

On the whole, our results using a Caco-2 cell model indicated that the digestion products of PL commonly present in dietary food enhanced the fatty acid release. This emphasised the fact that the formation of mixed micelles in the intestinal lumen plays an essential role in ensuring efficient lipid uptake as well as intestinal metabolism. The approach using Caco-2 cells identified some key parameters of the metabolic fate of fatty acids in the intestine. In particular, focusing on ALA as a major fatty acid present in flaxseed oil, the results supported those of our *in vivo* study in rats<sup>(12)</sup> i.e. marked differences in the absorption of fatty acids from emulsified flaxseed oil compared with flaxseed oil in bulk phase. Thus, both *in vitro* and *in vivo* studies indicated increased fatty acid bioaccessibility in the presence of PL. This strongly suggested that, besides the physicochemical parameters already presented to support the use of emulsions instead of oil in bulk phase (i.e., faster lipid hydrolysis of TAG and a improved solubilisation of hydrolysis products in mixed micelles), the enterocyte metabolism

is also involved in increasing fatty acid recovery (i.e., promoting lipid synthesis and/or secretion). However, the exact mechanisms involved in the digestion process of edible oils, lipid uptake/assimilation processes in intestinal epithelial cells, and the intestinal metabolism are still not fully elucidated. In particular, further research is required to clarify the role of lyso-PL in fatty acid transport and/or chylomicron synthesis.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge the National Association of Technical Research and the Aquitaine Regional Council for their financial support through a Ph. D. research grant for L.C.. Also the authors appreciate grant received from the Association of Technical Coordination for the Food Industry, following a “call for projects from young scientists”. The authors would like to express their personal appreciation for the valuable assistance of Xavier and Caroline Vitrac and Patrick Cottin at the CBMN laboratory. The authors gratefully acknowledge “Aquitaine Traduction” for its assistance in English.

The authors state that there are no conflicts of interest.

Contribution made by each author to the research.

L.C: Ph. D student in charge of the *in vitro* experiments

C.B.V: Industrial Ph. D supervisor, specialist in lipid metabolism

L.F.: Technical assistance for lipid analysis

E.M.: Technical assistance for lipid analysis

S.D.: Technical assistance for lipid analysis

N.C.: Expert in lipid metabolism

M.C.: Institutional Ph. D supervisor, expert in the formulation of colloidal systems for nutritional applications and lipid bioavailability

## References

1. Fernández-García E, Carvajal-Lérida I & Pérez-Gálvez A (2009) In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr Res* **29**, 751-760.
2. Hur SJ, Lim BO, Decker EA *et al* (2011) *In vitro* human digestion models for food applications. *Food Chem* **125**, 1-11.
3. Embleton JK & Pouton CW (1997) Structure and function of gastro-intestinal lipases. *Adv Drug Delivery Rev* **25**, 15-32.
4. Petit V, Niot I, Poirier H *et al.* (2007) Fatty acids intestinal absorption: facts and uncertainties. *Nutr Clin Metabol* **21**, 38-45.
5. Bonnaire L, Sandra S, Helgason T *et al.* (2008) Influence of lipid physical state on the in vitro digestibility of emulsified lipids. *J Agric Food Chem* **56**, 3791-3797.
6. Gervais R, Gagnon F, Kheadr EE *et al.* (2009) Bioaccessibility of fatty acids from conjugated linoleic acid-enriched milk and milk emulsions studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Int Dairy J* **19**, 574-581.
7. Hur SJ, Decker EA & McClements DJ (2009) Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chem* **114**, 253-262.
8. Golding M & Wooster TJ (2010) The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **15**, 90-101.
9. McClements DJ & Li Y (2010) Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv Colloid Interface Sci* **159**, 213-228.
10. Garaiova I, Guschina IA, Plummer SF *et al.* (2007) A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification. *Nutr J* **6**, 1-9.

11. Keogh JB, Wooster TJ, Golding M *et al.* (2011) Slowly and rapidly digested fat emulsions are equally satiating but their triglycerides are differentially absorbed and metabolized in Humans. *J Nutr* **141**, 809-815.
12. Couedelo L, Boue-Vaysse C, Fonseca L, *et al.* (2011) Lymphatic absorption of  $\alpha$ -linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion. *Br J Nutr* **105**, 1026-1035.
13. Michasliki MC, Briard V, Desage M *et al.* (2005) The dispersion state of milk fat influences triglyceride metabolism in the rat. A  $^{13}\text{CO}_2$  breath test study. *Eur J Nutr* **44**, 436-444.
14. Nishimukai M, Hara H & Aoyama Y. (2003) Enteral administration of soyabean lecithin enhanced lymphatic absorption of triacylglycerol in rats. *Br J Nutr* **90**, 565-571.
15. Nishimukai M & Hara H (2007) Soybean phosphatidylcholine-induced enhancement of lymphatic absorption of triglyceride depends on chylomicron formation in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 1192–1197.
16. Jiang Y, Noh SK & Koo SI (2001) Egg phosphatidylcholine decreases the lymphatic absorption of cholesterol in rats. *J Nutr* **131**, 2358-2363.
17. Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD *et al.* (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* **47**, 323-330.
18. van Greevenbroek MMJ, van Meer G, Erkelens DW *et al.* (1996) Effects of saturated, mono-, and polyunsaturated fatty acids on the secretion of apo B containing lipoproteins by Caco-2 cells. *Atherosclerosis* **121**, 139-150.
19. Jackson KG, Bateman PA, Yaqoob P *et al.* (2009) Impact of saturated, polyunsaturated and monounsaturated fatty acid-rich micelles on lipoprotein synthesis and secretion in Caco-2 cells. *Lipids* **44**, 1081-1089.

20. Tranchant T, Besson P, Hoinard C *et al.* (1997) Mechanisms and kinetics of alpha-linolenic acid uptake in Caco-2 clone TC7. *Biochim Biophys Acta* **1345**, 151-161.
21. Aspenström-Fagerlund B, Ring L, Aspenström P *et al.* (2007) Oleic acid and docosahexaenoic acid cause an increase in the paracellular absorption of hydrophilic compounds in an experimental model of human absorptive enterocytes. *Toxicology* **237**, 12-23.
22. Bateman PA, Jackson KG, Maitin V *et al.* (2007) Differences in cell morphology, lipid and apo B secretory capacity in Caco-2 cells following long term treatment with saturated and monounsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 475-485.
23. Murota K & Storch J (2005) Uptake of micellar long-chain fatty acid and sn-2-monoacylglycerol into human intestinal Caco-2 cells exhibits characteristics of protein-mediated transport. *J Nutr* **135**, 1626-1630.
24. Chateau D, Pauquai T, Delers F *et al* (2005) Lipid micelles stimulate the secretion of triglyceride-enriched apolipoprotein B48-containing lipoproteins by Caco-2 cells. *J Cell Physiol* **202**, 767-776.
25. Tsuzuki W (2007) Absorption properties of micellar lipid metabolites into Caco-2 cells. *Lipids* **42**, 613-619.
26. Spalinger JH, Seidman EG, Lepage G *et al.* (1998) Uptake and metabolism of structured triglyceride by Caco-2 cells: reversal of essential fatty acid deficiency. *Am J Physiol* **275**, 652-659.
27. Mathur SN, Born E, Murthy S *et al.* (1996) Phosphatidylcholine increases the secretion of triacylglycerol-rich lipoproteins by CaCo-2 cells. *Biochem J* **314**, 569-575.
28. Hovgaard L, Brøndsted H & Nielsen HM (1995) Drug delivery studies in Caco-2 monolayers. II. Absorption enhancer effects of lysophosphatidylcholines. *Int J Pharm* **114**, 141-149.

29. Nacka F, Cansell M & Entressangles B (2001) In vitro behavior of marine lipid-based liposomes. Influence of pH, temperature, bile salts and phospholipase A<sub>2</sub>. *Lipids* **36**, 35-42.
30. Lichtenberg D, Zilberman Y, Greenzaid P *et al.* (1979) Structural and kinetic studies on the solubilization of lecithin by sodium deoxycholate. *Biochemistry* **18**, 3517-3525.
31. Artursson P (1990) Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci* **79**, 476-482.
32. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
33. Mosmann T (1983) Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
34. Lepage G & Roy CC (1984) Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J Lipid Res* **25**, 1391-1396.
35. Levy E, Yotov W, Seidman EG *et al.* (1999) Caco-2 cells and human fetal colon: a comparative analysis of their lipid transport. *Biochim Biophys Acta* **1439**, 353-362.
36. Salvini S, Charbonnier M, Defoort C *et al.* (2002) Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing. *Br J Nutr* **87**, 211-217.
37. Usami M, Komurasaki T, Hanada A *et al.* (2003) Effect of  $\gamma$ -linolenic acid or docosahexaenoic acid on tight junction permeability in intestinal monolayer cells and their mechanism by protein kinase C activation and/or eicosanoid formation. *Nutrition* **19**, 150-156.

38. Trotter PJ, Ho SY & Storch J (1996) Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *J. Lipid Res.* **37**, 336-346.
39. Dias VC & Parsons HG (1995) Modulation in  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$ , and  $\Delta 5$  fatty acid desaturase activity in the human intestinal CaCo-2 cell line. *J Lipid Res* **36**, 552-563.
- 40 Chen Q & Nilsson Å (1993) Desaturation and chain elongation of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in the human CaCo-2 cell line. *Biochim Biophys Acta* **1166**, 193-201.

**Table 1.** Formulation of the mixed micelles supplied to Caco-2 cells consisting of lipid hydrolysis products from flaxseed oil in bulk phase, or flaxseed oil emulsified with soya lecithin or 17:0-PC.

Mixed micelles consisting of digestion products from:							
	Flaxseed oil <sup>1</sup>				Flaxseed oil/soya lecithin emulsion <sup>2</sup>		Flaxseed oil/17:0-PC emulsion <sup>2</sup>
Total lipid concentration	0.25	0.5	1	1.5	2	5	0.25
(mM) <sup>3</sup>							
Lyso-PL	-	-	-	-	-	-	0.02
2-MAG	0.08	0.16	0.32	0.48	0.64	1.60	0.07
Free FA	0.17	0.34	0.68	1.02	1.36	3.40	0.18

Lyso-PL: Lysophospholipids; 2-MAG: 2-monoacylglycerides; FA: fatty acids

<sup>1</sup> Mixed micelles consisting of bile salts purified from porcine bile extract and TAG digestion products. Lipid digestion was performed using pancreatic lipase (0.5 mg/mL) before bile salt addition.

<sup>2</sup> Mixed micelles consisting of bile salts purified from porcine bile extract, together with TAG and PL digestion products. Emulsions were based on flaxseed oil, stabilized by sodium deoxycholate (0.5%) and either soya lecithin or phosphatidylcholine (17:0-PC) (10%). Lipid digestion was performed using pancreatic lipase (0.5 mg/mL) and PLA<sub>2</sub> (1 mg/mL) before adding bile salt.

<sup>3</sup> Lipid concentration corresponded either to flaxseed oil TAG concentration (MW = 870 g/mol) or flaxseed oil TAG and PL concentrations (either soya lecithin (MW = 788 g/mol) or phosphatidylcholine (17:0-PC) (MW = 762 g/mole)). All mixed micelles contained bile salts purified from porcine bile extract at a final concentration of 20 mM (assuming an average molecular weight of 414 g/mole).

**Table 2.** Main fatty acid profile of the mixed micelles supplied to Caco-2 cells consisting of the lipid hydrolysis products from flaxseed oil in bulk phase, or flaxseed oil emulsified with soya lecithin or 17:0-PC, before bile salt solubilisation.

Fatty acid (wt%) <sup>1</sup>	Mixed micelles consisting of digestion products from:		
	Flaxseed oil <sup>2</sup>	Flaxseed oil/soya lecithin emulsion <sup>3</sup>	Flaxseed oil/17:0-PC emulsion <sup>3</sup>
16:0	5.08	5.44	4.87
17:0	0.06	0.02	15.06
18:0	4.05	4.03	3.53
18:1 (n-9)	18.53	19.01	16.72
18:2 (n-6)	15.52	15.61	13.50
18:3 (n-6)	0.35	0.08	0.18
18:3 (n-3)	46.03	47.23	40.09
20:4 (n-6)	0.04	0.00	0.05
20:5 (n-3)	0.00	0.00	0.00
22:6 (n-3)	0.00	0.00	0.00

<sup>1</sup> Fatty acid composition represents the mean of 3 measurements.

<sup>2</sup> Flaxseed oil TAG digestion was performed by using pancreatic lipase (0.5 mg/ml) before bile salt addition.

<sup>3</sup> Emulsions were based on flaxseed oil and stabilized by sodium deoxycholate (0.5%) and either soya lecithin or phosphatidylcholine (17:0-PC) (10%). Lipid digestion was performed using pancreatic lipase (0.5 mg/mL) and PLA<sub>2</sub> (1 mg/mL) before adding bile salt.

**Table 3.** Effect of mixed micelle composition on fatty acid release by Caco-2 cells.

Fatty acids (nmol/mg prot) <sup>1</sup>	Incubation time							
	0		30 min		2 h		6 h	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Mixed micelles with no lyso-PL <sup>2</sup>								
16:0	0.16	0.03	0.43 <sup>a</sup>	0.09	0.66 <sup>a</sup>	0.00	0.87 <sup>a</sup>	0.21
17:0	0.00	0.00	0.01 <sup>a</sup>	0.00	0.05 <sup>a</sup>	0.00	0.07	0.00
18:0	0.12	0.03	0.18 <sup>a</sup>	0.04	0.30 <sup>a</sup>	0.01	0.54 <sup>a</sup>	0.03
18:1n-9	0.05	0.01	0.26 <sup>a</sup>	0.06	0.54 <sup>a</sup>	0.12	1.63 <sup>a</sup>	0.49
18:2n-6	0.02	0.00	0.20 <sup>a</sup>	0.04	0.45 <sup>a</sup>	0.12	1.48 <sup>a</sup>	0.53
18:3n-3	0.00	0.00	0.04 <sup>a</sup>	0.01	0.09 <sup>a</sup>	0.02	0.21	0.01
20:4n-6	0.00	0.00	0.09 <sup>a</sup>	0.02	0.19 <sup>a</sup>	0.05	0.67 <sup>a</sup>	0.19
20:5n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01 <sup>a</sup>	0.00	0.02	0.01
22:6n-3	0.00	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.01 <sup>a</sup>	0.00	0.04 <sup>a</sup>	0.01
Total FA	0.48	0.10	1.34 <sup>a</sup>	0.29	2.71 <sup>a</sup>	0.44	6.83 <sup>a</sup>	1.79
Mixed micelles with soya lyso-PL <sup>3</sup>								
16:0	0.14	0.03	0.88 <sup>b</sup>	0.19	1.36 <sup>b</sup>	0.24	1.73 <sup>b</sup>	0.25
17:0	0.00	0.00	0.04 <sup>b</sup>	0.01	0.07 <sup>b</sup>	0.07	0.08	0.04
18:0	0.11	0.02	0.55 <sup>b</sup>	0.08	0.88 <sup>b</sup>	0.14	1.05 <sup>b</sup>	0.19
18:1n-9	0.05	0.01	0.74 <sup>b</sup>	0.07	1.36 <sup>b</sup>	0.57	1.98 <sup>b</sup>	0.41
18:2n-6	0.01	0.00	0.60 <sup>b</sup>	0.12	1.15 <sup>b</sup>	0.66	1.72 <sup>b</sup>	0.35
18:3n-3	0.00	0.00	0.10 <sup>b</sup>	0.00	0.20 <sup>b</sup>	0.03	0.25	0.03
20:4n-6	0.00	0.00	0.32 <sup>b</sup>	0.05	0.58 <sup>b</sup>	0.29	0.87 <sup>b</sup>	0.22
20:5n-3	0.00	0.00	0.01	0.00	0.02 <sup>b</sup>	0.01	0.04 <sup>b</sup>	0.01
22:6n-3	0.00	0.00	0.05 <sup>b</sup>	0.03	0.07 <sup>b</sup>	0.03	0.09 <sup>b</sup>	0.01
Total FA	0.44	0.08	3.68 <sup>b</sup>	0.01	6.58 <sup>b</sup>	1.32	9.06 <sup>b</sup>	1.50
Mixed micelles with lyso-17:0-PC <sup>3</sup>								
16:0	0.17	0.02	1.43 <sup>c</sup>	0.14	1.77 <sup>b</sup>	0.17	2.21 <sup>b</sup>	0.88
17:0	0.00	0.00	0.06 <sup>b</sup>	0.01	0.08 <sup>b</sup>	0.01	0.10	0.03
18:0	0.13	0.01	0.84 <sup>c</sup>	0.08	1.04 <sup>b</sup>	0.10	1.25 <sup>b</sup>	0.55
18:1n-9	0.06	0.00	1.03 <sup>b</sup>	0.10	1.29 <sup>b</sup>	0.13	2.29 <sup>b</sup>	1.11
18:2n-6	0.02	0.00	0.84 <sup>b</sup>	0.08	1.03 <sup>b</sup>	0.10	1.95 <sup>ab</sup>	1.02
18:3n-3	0.00	0.00	0.13 <sup>b</sup>	0.01	0.16 <sup>b</sup>	0.02	0.29	0.02
20:4n-6	0.00	0.00	0.42 <sup>b</sup>	0.04	0.51 <sup>b</sup>	0.05	1.00 <sup>b</sup>	0.47
20:5n-3	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02 <sup>b</sup>	0.00	0.04 <sup>b</sup>	0.02
22:6n-3	0.00	0.00	0.05 <sup>b</sup>	0.00	0.08 <sup>b</sup>	0.01	0.12 <sup>b</sup>	0.04
Total FA	0.56	0.03	5.38 <sup>c</sup>	0.52	8.09 <sup>b</sup>	0.66	10.69 <sup>b</sup>	1.91

<sup>1</sup> Values are means ± SD of 2 wells from 2 separate experiments.

<sup>2</sup> Mixed micelles consisting of bile salts purified from porcine bile extract and TAG digestion products. Lipid digestion was performed using pancreatic lipase (0.5 mg/mL) before bile salt addition.

<sup>3</sup> Mixed micelles consisting of bile salts purified from porcine bile extract, together with TAG and PL digestion products. Emulsions were based on flaxseed oil, stabilized by sodium deoxycholate (0.5%) and either soya lecithin or phosphatidylcholine (17:0-PC) (10%). Lipid digestion was performed using pancreatic lipase (0.5 mg/mL) and PLA<sub>2</sub> (1 mg/mL) before adding bile salt.

Fatty acid values with different superscript letters (a, b, c) at the same time are significantly different (P<0.05).

### **Legend captions**

**Fig. 1:** Time course of (A) total fatty acids (B)  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) release (nmol/mg prot) from Caco-2 cell line into the basolateral medium. Mixed micelles based on bile salts and the digestion products of flaxseed oil ( $\diamond$ ), flaxseed oil emulsion based on 17:0-PC ( $\bullet$ ), and flaxseed oil emulsion based on soya lecithin (\*) were introduced at the apical surface of Caco-2 cells grown on Transwell filters. The upper chamber was filled with 0.5 mL of incubation medium containing 0.25 mM solubilised lipids. Data represent the means  $\pm$  SD of 2 wells at a given time point.

**Fig.2:** Influence of lipid concentraion of mixed micelles on Caco-2 cell basolateral release of total fatty acids (□) and  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) (■). Equal volumes (0.5 mL) but different concentrations of mixed micelles based on sodium deoxycholate and flaxseed oil digestion products were added to the apical compartments and removed after 4 h incubation. Data represent the means  $\pm$  SD of 2 wells at each concentration point.

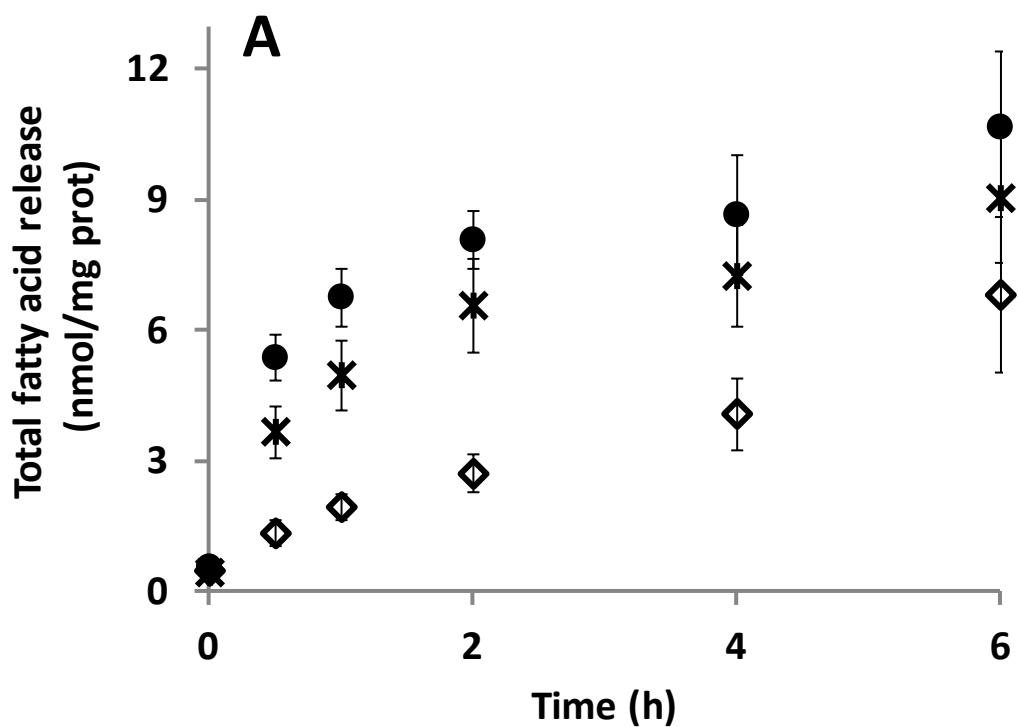


Figure 1A

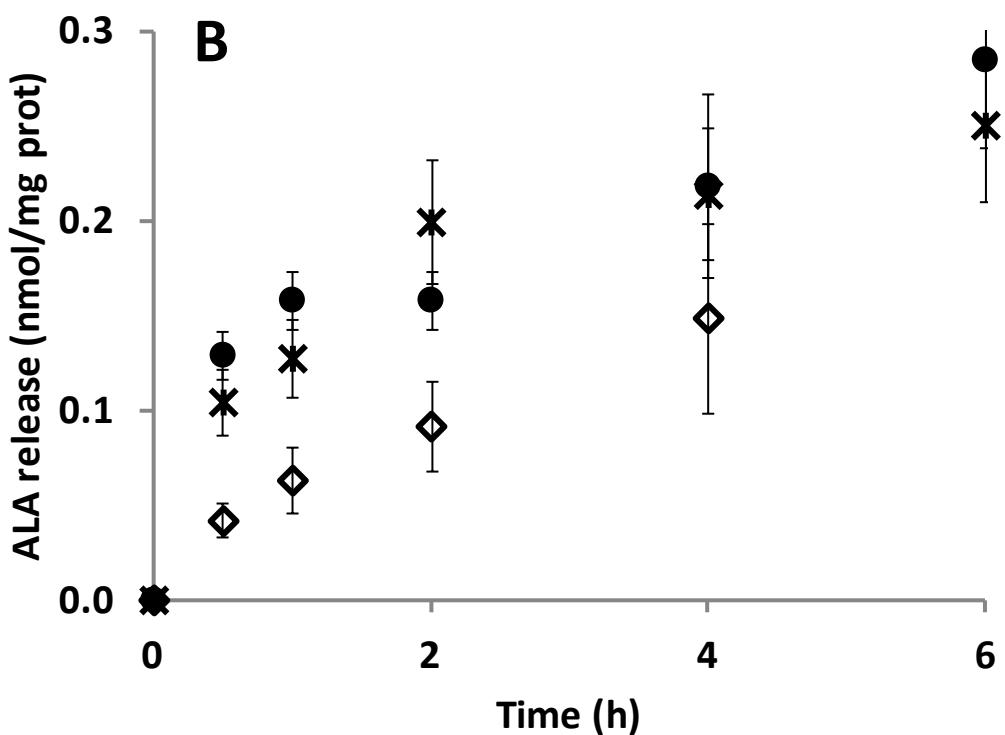


Figure 1B

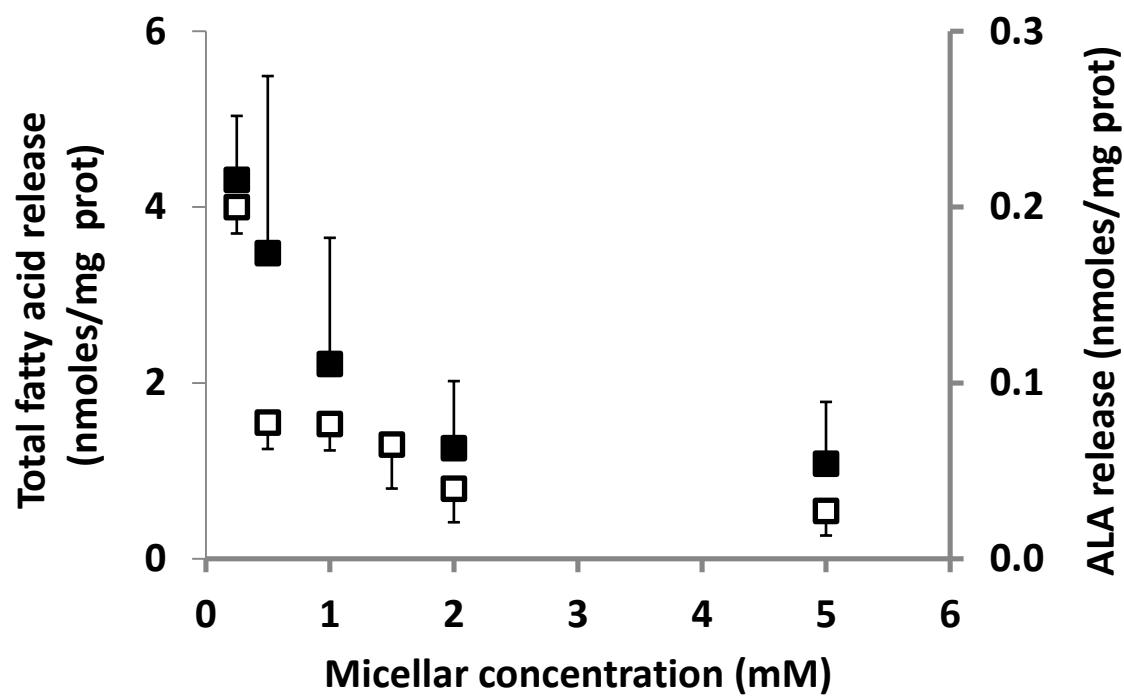


Figure 2

## **2.3. Principaux résultats et développement**

### **2.3.1. Cytotoxicité des micelles mixtes**

Les micelles mixtes lipides/sels biliaires sont préparées à partir des produits d'hydrolyse de l'huile de lin en phase continue ou émulsionnée, soit avec une lécithine de soja (lécithine 1) soit avec un phospholipide (17:0-PC). La caractérisation de ces systèmes lipidiques en termes de taille montre que la présence de Lyso-PL permet de réduire sensiblement le diamètre moyen des micelles mixtes. Les tailles élevées des micelles et leur distribution relativement large par rapport à celle des micelles de sels biliaires purs peuvent s'expliquer par le fait que, dans cette étude, les micelles sont préparées directement dans le milieu de culture DMEM qui contient des sels et des protéines.

La cytotoxicité des micelles mixtes est étudiée pour un temps d'incubation de 4 heures et pour des concentrations lipidiques des micelles variant de 0 à 5 mM. On met en évidence qu'en absence de Lyso-PL, des concentrations en lipides allant jusqu'à 5 mM n'altèrent pas la viabilité cellulaire et ne modifient pas l'intégrité de la membrane intestinale (évaluée par la perméabilité membranaire au mannitol marqué et le maintien des jonctions serrées de la monocouche cellulaire). L'utilisation de Lyso-PL issus de la lécithine de soja ou de 17:0-PC induit un effet毒ique sur les cellules Caco-2 et ce, dès 0,5 mM. Pour cette concentration, seules 45% des cellules sont viables et la mortalité cellulaire est quasi totale pour des concentrations en lipides supérieures. Une concentration de 0,25 mM est retenue pour la suite des expérimentations car elle correspond à une absence de toxicité et une faible mortalité cellulaire (moins de 25%).

### **2.3.2. Influence de la présence de Lyso-PL sur la sécrétion des acides gras par les cellules Caco-2**

La sécrétion basolatérale des acides gras par les Caco-2 est estimée sur une période de 24 heures et pour une concentration en lipides fixée à 0,25 mM. Cette sécrétion est améliorée en présence de Lyso-PL avec une tendance plus marquée avec Lyso-17 :0-PC. Ainsi, après 30 minutes d'incubation, la sécrétion en acides gras totaux est 3 à 5 fois plus importante en

présence de Lyso-PL (lécithine de soja et PC 17:0, respectivement). On observe une sécrétion de l'ALA dans le compartiment basolatéral dès 30 minutes d'incubation. La présence de Lyso-PL dans les micelles est associée à une sécrétion de l'ALA significativement plus élevée. Par exemple, après 30 minutes, la quantité d'ALA mesurée dans le milieu basolatéral est environ 2,5 fois plus importante lorsque les micelles contiennent des Lyso-PL (0,10 et 0,13 nmoles/mg protéines) par rapport à celles qui n'en contiennent pas (0,04 nmoles/mg protéines). Il n'y a pas d'influence significative de la nature des Lyso-PL (issus de 17:0-PC ou de la lécithine de soja) sur la sécrétion d'ALA et, ce tout au long de la cinétique. Pour les micelles contenant des Lyso-PL, la sécrétion plus importante d'ALA suggère une absorption plus efficace de cet acide gras. Les cellules Caco-2 présentant des activités Δ5 et Δ6 désaturases et élongase, l'ALA peut être converti en EPA et DHA, qui peuvent être excrétés, à leur tour, dans le milieu basolatéral. C'est effectivement ce que l'on observe avec les micelles mixtes contenant des Lyso-PL.

#### **2.4. Conclusion**

Les études réalisées sur le modèle cellulaire Caco-2 nous permettent de montrer que la présence de Lyso-PL dans les micelles mixtes lipides/sels biliaires modulent la sécrétion basale des acides gras et notamment de l'ALA et ce, dès les premières heures suivant le dépôt des lipides. Le type de Lyso-PL influence dans une moindre mesure la sécrétion des acides gras alors que les proportions de PC sont nettement différentes (10% pour la lécithine de soja et 100% pour 17:PC). Dans le cas des AG à longue chaîne, l'absorption pourrait faire intervenir un transporteur membranaire. Nos résultats suggèrent que l'affinité de ce transporteur serait modulée par la présence de Lyso-PL. Par ailleurs, la présence de Lyso-PL dans la composition micellaire pourrait favoriser, directement ou indirectement, la synthèse des chylomicrons qui peut se manifester soit par une augmentation de leur teneur en TAG soit par une augmentation de leur nombre en favorisant leur compaction au sein de la cellule.

La Figure 16 rassemble les résultats obtenus pour la sécrétion de l'ALA par les cellules Caco-2, observés dans nos conditions expérimentales.

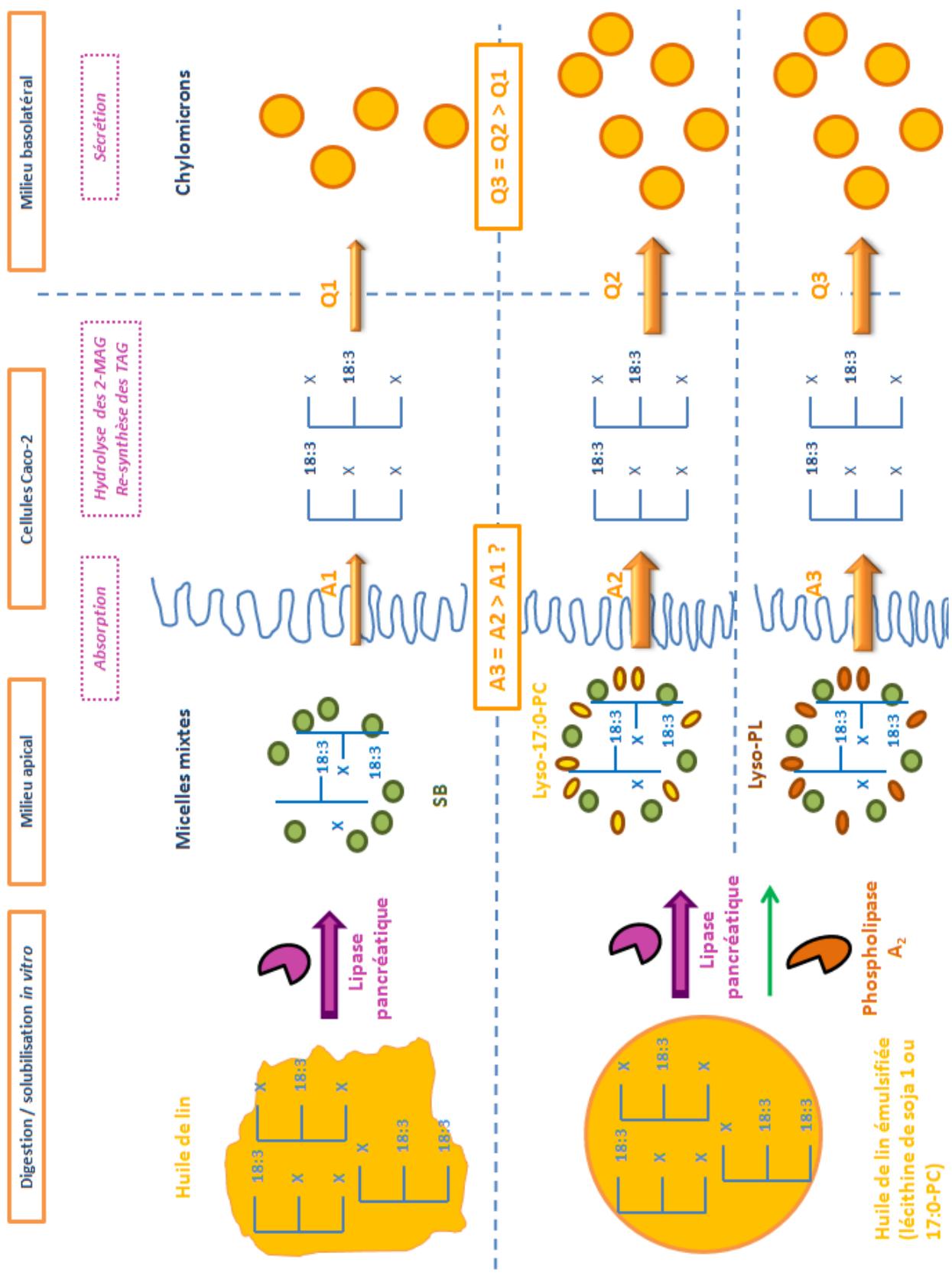


Figure 16 : Représentation schématique de la synthèse (S) et de la sécrétion (Q) de lipides synthétisés dans les cellules Caco-2 suite à l'absorption (A) des produits issus de la lipolyse *in vitro* de l'huile de lin émulsionnée ou non par la lécithine de soja ou de 17:0-PC

### 3. Effet de l'émulsification de l'huile de lin sur la bio accessibilité de l'acide $\alpha$ -linolénique *in vivo* chez le rat

#### 3.1. Introduction

Plusieurs études montrent que la biodisponibilité des acides gras n-3 est améliorée par la présentation des triglycérides sous forme émulsionnée que ce soit pour l'ALA (Garaiova et al. 2007, Nishimukai et al. 2003) ou pour des acides gras à chaînes plus longues et plus insaturées comme l'EPA ou le DHA (Garaiova et al. 2007 ; Raatz et al. 2009), chez l'animal ou chez l'Homme (Garaiova et al. 2007 ; Raatz et al. 2009). Dans le cas des systèmes émulsionnés, les hypothèses classiquement avancées pour expliquer l'amélioration du passage de la barrière entérocytaire (Nishimukai et al. 2003) ou de la teneur en AGPI n-3 au niveau plasmatique (Garaiova et al. 2007 ; Raatz et al. 2009) reposent sur : i) l'existence de gouttelettes lipidiques préformées améliorant l'efficacité de la vidange gastrique chez l'animal (Armand 1998) mais aussi chez l'Homme (Armand et al. 1994) ; ii) l'existence d'une interface lipide/eau préformée favorisant l'ancre de la lipase pancréatique et *in fine* l'hydrolyse des TAG ; iii) l'importance de la présence de PL qui modulerait l'absorption des acides gras et favoriserait le compactage des TAG dans l'entérocyte et le relargage des TAG néo synthétisés dans la lymphe des rats (Nishimukai et al. 2003 ; Nishimukai & Hara 2007).

Dans ce contexte, nous avons étudié l'impact d'un apport de l'huile de lin sous forme émulsionnée sur la **biodisponibilité intestinale de l'ALA**. L'huile de lin est choisie, d'une part, à cause de sa forte proportion en ALA (plus de 45% des AG totaux). En effet il convient, en France, d'améliorer les apports alimentaires en ALA et l'huile de lin, de par cette richesse représente un intérêt nutritionnel avéré. D'autre part, on ne dispose pas de données relatives à la biodisponibilité de l'ALA que contient cette huile alors qu'elle a obtenu récemment l'autorisation de mise sur le marché. De plus, une seule étude met en avant l'intérêt de l'émulsification de l'huile de lin sur son devenir métabolique chez l'Homme (Garaiova et al. 2007). Néanmoins, il convient, dans cette étude, de noter que l'huile de lin est utilisée en mélange avec de l'huile de bourrache et de l'huile de poisson qui pourraient interagir sur la bio accessibilité de l'ALA issu de l'huile de lin.

Dans notre étude, les émulsions sont stabilisées par une lécithine de soja. Le choix de cet émulsifiant est basé sur l'hypothèse selon laquelle la présence de PL améliorerait le passage

intestinal des lipides et, notamment, celui des acides gras n-3 (Nishimukai et al. 2003 ; Nishimukai et al. 2007). Néanmoins, l'absorption intestinale des lipides dépend fortement de la composition en PL de la lécithine (Amate et al. 2001). C'est pourquoi, deux types de lécithine dont la composition en PL individuels est différente (§ II-1.1.3) sont utilisés. L'étude de la bio accessibilité de l'ALA est réalisée chez le rat. En effet, ce modèle animal est pertinent pour l'étude de l'absorption des lipides pour une extrapolation chez l'Homme. Les analyses réalisées portent sur la composition en acides gras des lipides totaux et des TAG de la lymphé. La structure glycéridique des TAG est aussi déterminée. Afin de relier les résultats obtenus *in vivo* à l'impact de l'émulsification, le comportement *in vitro* des émulsions dans des conditions mimant celles du milieu gastro-intestinal est analysé. Ainsi les émulsions sont caractérisées en milieu acide représentant celui de l'estomac et ce, pendant trois heures, puis à pH basique mimant le milieu intestinal.

Les objectifs de cette étude visent à :

- i) Analyser le comportement physique et chimique des émulsions à base d'huile de lin ;
- ii) Mettre en évidence *in vitro* les différences de digestibilité (hydrolyse des TAG par la lipase pancréatique et solubilisation des produits d'hydrolyse par les sels biliaires) entre l'huile de lin émulsionnée et l'huile de lin en phase continue ;
- iii) Evaluer l'effet de l'émulsification sur l'amélioration du statut en ALA dans le compartiment lymphatique ( $C_{max}$ ) et sa vitesse de passage de l'ALA ( $T_{max}$ ) ;
- iv) Mesurer l'influence de la nature de la lécithine utilisée pour stabiliser l'émulsion sur le statut lymphatique en ALA ;
- v) Appliquer à nos conditions expérimentales le modèle d'absorption des TAG développé grâce à l'utilisation des TAG structurés à une huile naturelle.

- 3.2. Lymphatic absorption of  $\alpha$ -linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion (2010). L. Couëdelo, C. Boué-Vaysse, L. Fonseca, E. Montesinos, S. Djoukitch, N. Combe, M. Cansell. British Journal of Nutrition, 17, 1026-1035.**

## Lymphatic absorption of $\alpha$ -linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion

Leslie Couëdelo<sup>1,2</sup>, Carole Boué-Vaysse<sup>2</sup>, Laurence Fonseca<sup>2</sup>, Emeline Montesinos<sup>2</sup>, Sandrine Djoukitch<sup>2</sup>, Nicole Combe<sup>2</sup> and Maud Cansell<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Université Bordeaux 1, Laboratoire CBMN UMR 5248, F-33405 Talence Cedex, France

<sup>2</sup>ITERG, Unité de Nutrition & Santé, F-33405 Talence Cedex, France

(Received 8 June 2010 – Revised 22 September 2010 – Accepted 8 October 2010)

### Abstract

The bioavailability of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) from flaxseed oil in an emulsified form *v.* a non-emulsified form was investigated by using two complementary approaches: the first one dealt with the characterisation of the flaxseed oil emulsion in *in vitro* gastrointestinal-like conditions; the second one compared the intestinal absorption of ALA in rats fed the two forms of the oil. The *in vitro* study on emulsified flaxseed oil showed that decreasing the pH from 7·3 to 1·5 at the physiological temperature (37°C) induced instantaneous oil globule coalescence. Some phase separation was observed under acidic conditions that vanished after further neutralisation. The lecithin used to stabilise the emulsions inhibited TAG hydrolysis by pancreatic lipase. In contrast, lipid solubilisation by bile salts (after lipase and phospholipase hydrolysis) was favoured by preliminary oil emulsification. The *in vivo* absorption of ALA in thoracic lymph duct-cannulated rats fed flaxseed oil, emulsified or non-emulsified, was quantified. Oil emulsification significantly favoured the rate and extent of ALA recovery as measured by the maximum ALA concentration in the lymph ( $C_{\max} = 14 \text{ mg/ml}$  at 3 h in the emulsion group *v.* 9 mg/ml at 5 h in the oil group;  $P < 0\cdot05$ ). Likewise, the area under the curve of the kinetics was significantly higher in the emulsion group (48 mg  $\times$  h/ml for rats fed emulsion *v.* 26 mg  $\times$  h/ml for rats fed oil;  $P < 0\cdot05$ ). On the whole, ALA bioavailability was improved with flaxseed oil ingested in an emulsified state. Data obtained from the *in vitro* studies helped to partly interpret the physiological results.

**Key words:** Emulsion; Intestinal lipid absorption; Lymphatic lipids; Flaxseed oil;  $\alpha$ -Linolenic acid bioavailability

The bioavailability of a lipid nutrient present in food depends on complex physico-chemical and enzymatic processes including digestion, intestinal absorption and delivery to all organs for cell lipid requirements<sup>(1–3)</sup>. Several parameters affect the lipid digestion and absorption steps. The influence of the lipid nature<sup>(4–8)</sup> results, at least partly, from the pancreatic lipase activity due to the TAG structure<sup>(7)</sup>, the inherent resistance of very long PUFA to hydrolysis<sup>(4)</sup> and the more efficient hydrolysis of short- and medium-chain TAG<sup>(8,9)</sup>. Fat digestion also depends on the supramolecular lipid structures ingested<sup>(10)</sup>, i.e. liposomes<sup>(11)</sup> and emulsified oils<sup>(12–16)</sup>. In this latter case, the impact of interfacial composition of the emulsion<sup>(13,17,18)</sup>, as well as the influence of the droplet size of the emulsified lipid phase<sup>(12–15)</sup>, should be taken into account. More recently, it has been demonstrated that the physical state of the TAG also influences the rate and extent of lipid digestion<sup>(10,19)</sup>.

In this context, the aim of the present study was to measure the intestinal absorption of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) in rats after the administration of flaxseed oil in both emulsified and non-emulsified states. Flaxseed oil was chosen because of its high ALA content. The current French dietary guidelines recommend a daily intake of at least 1 g of *n*-3 ALA for adults, while keeping the linoleic acid:ALA ratio lower than 5<sup>(20)</sup>. By comparison, the WHO advises an *n*-3 PUFA intake between 0·8 and 1·1 g of ALA/d, and the US Dietary Guidelines recommend 1·1 g for women and 1·6 g for men. Linoleic acid and ALA are usually consumed in a ratio ranging from 10 to 15 in France, thus making ALA supplementation necessary<sup>(21,22)</sup>. Among various vegetable sources, flaxseed oil nowadays provides the highest amount of ALA (40–45 wt % of total fatty acids). Several studies have shown the potential to increase the ALA plasma level through flaxseed oil ingestion<sup>(23–26)</sup>. As a result, in July 2006, the French agency

**Abbreviations:** ALA,  $\alpha$ -linolenic acid; BS, bile salt; MAG, monoacylglycerol; OD, optical density; O/W, oil-in-water; PL, phospholipid.

\*Corresponding author: Professor M. Cansell, fax +33 5 40 00 68 08, email mcansell@enscbp.fr

for food, environmental and occupational health safety authorised the introduction of flaxseed oil in foods<sup>(27)</sup>. Recently, flaxseed oil has been marketed as virgin oil<sup>(28)</sup>. With the aim of probing how lipid bioavailability depends on its dispersion state, rats were fed flaxseed oil either in a bulk phase or an oil-in-water (O/W) emulsion. Soya lecithin was used to stabilise the oil interface. The present study was carried out to determine whether the emulsified state of the lipids influenced ALA lymphatic absorption and, more generally, its bioavailability. In addition, the emulsion stability was characterised under conditions that mimicked those of the gastrointestinal tract in terms of pH variation, enzyme lipolysis and bile salt (BS) solubilisation.

## Experimental methods

### Materials

Flaxseed oil was supplied by ITERG (Pessac, France). Soya lecithin (Lecimulthin) was kindly provided by Cargill (Baupre, France). The lecithin composition was determined after the separation of different phospholipid (PL) species by two-dimensional TLC using the following solvents: in the first direction, chloroform–acetone–methanol–acetic acid–water (50:20:10:10:5, by vol.), and in the second direction, butanol–acetic acid–water (60:20:20, by vol.)<sup>(29)</sup>. Various diacyl PL and lysophospholipid classes were visualised by exposing the plates to iodine vapour. Different spots were scraped and analysed for total P determination according to the method used by Ames<sup>(30)</sup>. PL composition of the lecithin is reported in Table 1. Phospholipase A<sub>2</sub> from *Naja mossambica mossambica*, lipase from porcine pancreas, sodium deoxycholate and porcine bile extract were obtained from Sigma (Sigma, St Louis MO, USA). Porcine bile extract was purified from coloured pigments on activated charcoal, as described previously<sup>(31)</sup>. The solvents were of analytical grade.

### Emulsion preparation and characterisation

O/W emulsions were prepared at room temperature. The oil phase contained 1 g of sodium deoxycholate and 20 g of lecithin per 100 g of oil. This oil phase was manually dispersed into the aqueous phase to an oil fraction of 45 g/100 g. The coarse O/W emulsions obtained were then sheared using an Ultraturax apparatus (IKA, Staufen, Germany), equipped with a generator axis (10 mm S25-N-10G; IKA, Staufen, Germany) under a nitrogen flux to

**Table 1.** Main phospholipid species of the lecithin

Phospholipids (% w/w)	Soya lecithin
Phosphatidylcholine	13.2
Phosphatidylethanolamine	29.6
Phosphatidylinositol	24.6
Lysophospholipids	23.0
Unidentified	9.6

prevent lipid oxidation. Direct visualisation of the oil droplets just after preparation and under acid stress was carried out using a phase-contrast microscope (Axiovert 135 with a water immersion, 100× objective; Zeiss, Germany). Mean particle diameter (as evaluated by the volume-weighted average diameter  $d_{4,3}$ ) and particle size distribution were determined by static light scattering using a Coulter LS 230 apparatus (Brea, CA, USA).

O/W emulsions were exposed to acidic conditions (pH 1.5) using 10 M-HCl. The emulsions were incubated at acid pH, from 0 to 3 h, at 37°C and analysed regularly. Neutralisation was carried out by the addition of small volumes of 10 M-NaOH solution in emulsions previously stored 2 h under acidic conditions at 37°C. All experiments were performed under stirring.

### Lipid hydrolysis by pancreatic lipase

The time course of lipase-catalysed hydrolysis of both flaxseed oil and O/W emulsions was monitored using a pH-stat (Titroline alpha plus TA10 plus; SCHOTT Instrument, Mainz, Germany) on the basis of protocols described in Hope & Theimer<sup>(32)</sup>. Experiments were performed in a thermostated bath at 37°C, and at a pH of 8, using a 0.5 M-NaOH solution for automatic titration. In the case of flaxseed oil, an emulsion was prepared by mixing 40 ml of methocel (3.5%), 0.6 M-NaCl solution and 25 ml of oil, under stirring. The hydrolysis reaction was initiated by mixing 10 ml of the previous emulsion with 10 mg of pancreatic lipase in the presence of 2 M-CaCl<sub>2</sub>. In the case of O/W emulsions, the lipase solution was directly added. In another set of experiments, a colipase solution (1 mg/ml) was also added to the reaction medium. Lipase activity was calculated from the initial slope of the titration curve and expressed as milliequivalents of fatty acids released per min and per g of enzyme extract (mEq/min per g of enzyme extract). The amount of enzyme and the oil and emulsion concentrations used were chosen to ensure substrate-saturating conditions. In both cases, assays were performed in triplicate.

### Lipid solubilisation by bile salts

Lipid micellisation was performed by BS addition to the hydrolysis products obtained from flaxseed oil in both emulsified and non-emulsified (bulk) states. In the case of bulk flaxseed oil, NEFA and monoacylglycerols (MAG) resulting from pancreatic lipase hydrolysis were mixed with BS. In the case of emulsified flaxseed oil, the PL used to stabilise the emulsion were first subjected to phospholipase A<sub>2</sub> hydrolysis (19 units/ml of emulsion) before pancreatic lipase addition. In this instance, NEFA and MAG from lipase hydrolysis, and NEFA and lysophospholipids from phospholipase A<sub>2</sub> hydrolysis were solubilised.

The lipid–BS mixtures were prepared by adding 10 ml of a concentrated BS solution (concentrations ranging

from 5 to 70 mm, considering an average molecular weight for BS of 480 g/mol) to the hydrolysed lipids (ranging from 3 to 50 mg, i.e. concentrations ranging from 0.5 to 5 mM, considering an average molecular weight for both TAG and PL of 775 g/mol). Micellisation by BS was followed by measuring the turbidity at 400 nm. Turbidity measurements (optical density (OD) at 400 nm) were performed in a thermostated cell support using a Perkin Elmer lambda Bio 20 spectrophotometer (Waltham, MA, USA). After stirring, the mixtures were allowed to equilibrate until stable turbidity values were obtained. For each lipid concentration ([lip]tot), a solubilisation curve was obtained by plotting the evolution of OD as a function of total BS concentration ([BS]tot). The solubilisation point, corresponding to the BS amount required to completely solubilise the lipids into mixed micelles, was determined as the point at which further addition of BS only slightly affected the suspension turbidity. In practice, this point corresponded to an OD approximately equal to zero, as in Lichtenberg<sup>(33)</sup>. At this solubilisation point, the concentration of BS molecules not associated with the lipids ([BS]bulk) and the molecular ratio of BS to lipid in the mixed micelles ([BS:lip]mic) were determined by the following equation<sup>(34)</sup>:

$$[BS]_{tot} = [BS]_{bulk} + [BS:lip]_{mic} \times [lip]_{tot}$$

Using linear regression analysis, [BS]bulk was deduced from the intercept of the extrapolated curve with the ordinate axis, and [BS:lip]mic was deduced from the slope. Solubilisation was performed at 25 and 37°C on hydrolysis products derived from flaxseed oil in the bulk and emulsified states.

#### *Animals, surgical procedures and lymph analysis*

Male Wistar rats (8 weeks old, body weight 300–350 g) were obtained from Elevage Janvier (St-Berthevin, France) and were randomly assigned to one of the dietary groups. The study was conducted in accordance with European Community Council Directives (86/1609/EEC). All experiments conformed to the Guidelines for the Handling and Training of Laboratory Animals. Rats were housed for at least 3 d before the experiment in a controlled environment, with constant temperature and humidity, and with free water and food access. Two lipid formulas based on flaxseed oil were used for the experiments (Table 2). Rats were fed a fat-free diet (Epinay, France) and had free access to water 24 h before the surgery. For collecting the lymph, a polyethylene catheter (inner diameter 0.86 mm, outer diameter 1.27 mm; Biotrol, Paris, France) was inserted into the main mesenteric lymph duct of each rat placed under ketamine/xylazine anaesthesia (100 and 10 µg/g of body weight), as described in Bollman *et al.*<sup>(35)</sup> and Combe *et al.*<sup>(36)</sup>. After the surgery, rats were placed in individual restraining cages, in a warm environment, with tap water freely available. A few hours later,

**Table 2.** Main fatty acid profile of the dietary lipids and their intramolecular distribution in TAG

Fatty acids*	Flaxseed oil		Flaxseed oil emulsion†	
	TAG (wt %)	sn-2 MAG‡ (mol %)	Soya lecithin (wt %)	Total lipids (wt %)
16:0	5.1	7.4	22.5	5.4
18:0	4.0	3.8	3.4	4.0
18:1n-9	18.5	51.8	11.7	19.0
18:2n-6	15.5	49.2	55.3	19.6
18:3n-3	46.0	28.4	4.2	47.2
18:3n-6	0.3	13.4	0.1	0.1
Trans-18:3n-3	6.3	31.6	0.0	6.7
Others§	2.6		1.2	1.9
Σ SFA	10.0		26.8	9.9
Σ MUFA	20.8		13.4	20.1
Σ n-3 PUFA	46.0		4.3	47.2
Σ n-6 PUFA	16.0		55.5	19.7
Σ TFA	6.9		0.1	6.9
n-6:n-3	0.35		12.91	0.41

sn-2 MAG, sn-2 monoacylglycerol; TFA, trans-fatty acid.

\* Fatty acid composition represents the mean of two measurements.

† Flaxseed oil was emulsified using 8% soya lecithin.

‡ The fatty acid composition of sn-2 MAG of flaxseed oil TAG was determined after pancreatic lipase hydrolysis followed by isolation and analysis of monoacylglycerols. Results are expressed in mol% corresponding to the distribution of each fatty acid in the internal position of TAG.

§ Others represent the sum of the fatty acids that each contributes to <1 g/100 g.

0.3 g of flaxseed oil, either as bulk oil or O/W emulsion, were administered through a gastric feeding tube, followed by 0.5 ml of water. The amounts of total fatty acids and ALA per rat were, for the bulk-phase group, 230 and 103 mg, respectively, and, for the emulsion group, 260 and 104 mg, respectively. Lymph was collected for 24 h with fractionation in tared tubes maintained in an ice bath. During the collection period, the lymph flow averaged 0.30 (SEM 0.03) ml/h. The total lipid contents of chylomicrons were immediately analysed. At least eight cannulated rats were used for each studied lipid ingestion condition.

Lipids from lymph samples were trimethylated according to the method of Lepage & Roy<sup>(37)</sup>. Trimyristolein was added as an internal standard for TAG fatty acid quantification. Fatty acid methyl esters were analysed by GC on a BPX 70 capillary column (60 m long, 0.25 µm film, 0.25 mm inner diameter (SGE, Victoria, Australia), H<sub>2</sub> as a carrier gas and split ratio of 1:80). The GC system consisted of a gas chromatograph (HP 4890; Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a flame ionisation detector maintained at 280°C. The injector temperature was 250°C. The column temperature was increased from 150 to 200°C (1.3°C/min), maintained at 200°C for 20 min, increased from 200 to 235°C (10°C/min) and held at 235°C for 20 min. Data were collected and integrated by a Chromjet SP 4400 integration system (Spectra-Physics, Irvine, CA, USA). Fatty acids from Sigma France (St Quentin Fallavier, France) and natural extracts of known composition were used as standards for column calibration. The variation in peak area between injections was less than 2%.

The intramolecular fatty acid distribution in TAG of dietary flaxseed oil and lymph chylomicrons was determined through lipase hydrolysis according to Desnuelle<sup>(38)</sup> and Entressangles *et al.*<sup>(39)</sup>. The resulting 2-MAG and 1,3-diacylglycerols were separated by TLC using hexane–diethyl ether–formic acid (70:30:1, by vol.) as a developing solvent<sup>(39)</sup>. Respective fractions were transmethylated, and fatty acid methyl esters were analysed by GC, as described previously. The proportion of ALA in the *sn*-2 position of TAG was obtained by the following equation:

$$\% \text{ALA} (\textit{sn}-2) = \frac{\% \text{ALA} (2-\text{MAG}) \times 100}{\% \text{ALA} (\text{TAG}) \times 3}.$$

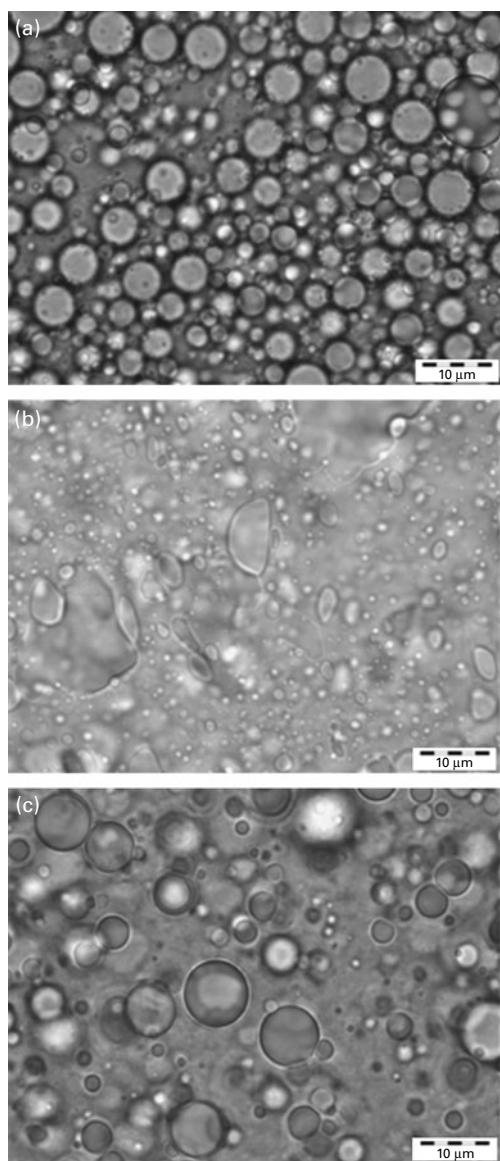
### Statistical analysis

Data are expressed as means with their standard errors. When only two independent groups of data were compared (solubilisation data and kinetic study), the parametric Student's *t* test was used. The area under the curve was calculated according to the trapezoidal method, and the data were compared with the Mann–Whitney test. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ . The statistical significance of differences in the fatty acid compositions of chylomicron TAG between the three dietary conditions (fasted, bulk flaxseed oil and emulsion) was analysed by one-way ANOVA.  $V_{\max}$  values obtained with different hydrolysis conditions were analysed by two-way ANOVA. These analyses included Dunnett's multiple comparison procedure and Tukey's honestly significant difference procedure. Only when two of the above tests showed significance at the  $P < 0.05$  level were the differences judged to be significant.

## Results

### Emulsion behaviour under acid conditions

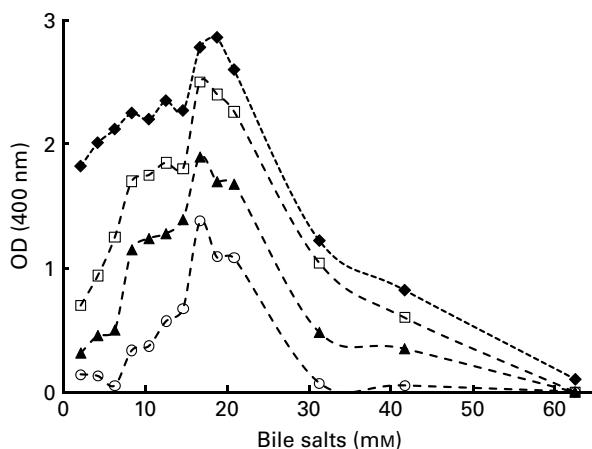
The O/W emulsions were characterised in terms of droplet size distribution. The mean diameter of the droplets was found to be 4.9 µm, with a distribution ranging from 0.8 to 15 µm as confirmed by optical microscopy (Fig. 1(a)). When the medium was acidified (pH 1.5) in order to mimic gastrointestinal tract conditions, the mean diameter increased up to 12.2 µm because of droplet coalescence (Fig. 1(b)). Some phase separation was observed under this acidic condition during a 3 h storage period. In the physiological digestion process, emulsions stayed for approximately 2–3 h under acidic conditions (comparable to the human stomach) before returning to a neutral environment (comparable to the human intestine). To mimic this shift in pH, an emulsion sample previously stored at pH 1.5 for 2 h at 37°C was further neutralised (pH 7.3). This resulted in a slight increase in the mean diameter, although no phase separation was observed in the sample (Fig. 1(c)). The size distribution did not vary for at least 24 h (results not shown).



**Fig. 1.** Microscopy observation (100×) of flaxseed emulsions stabilised by soya lecithin: (a) just after preparation; (b) in acid conditions (pH 1.5, 10 min, 37°C); (c) in neutral conditions (pH 7.3) after an incubation of 2 h at pH 1.5 (37°C).

### Lipid solubilisation by bile salts

To mimic lipid transfer from the stomach to the intestine, bulk oil and emulsions were exposed to pancreatic lipase with or without phospholipase A<sub>2</sub> before BS addition. The solubilisation process was followed by variations in turbidity measured as a function of BS addition. Almost zero turbidity levels corresponding to mixed micelles at equilibrium were obtained after 36 h (results not shown), indicating that equilibrium was slowly reached when BS were added to the digestion products of either bulk oil or emulsions. Fig. 2 presents typical solubilisation curves obtained for various lipid concentrations in emulsions. Lipid micellisation was achieved when a drastic decrease in OD was observed. The complex evolutions of the OD suggested that the lipid–surfactant structures underwent



**Fig. 2.** Dependence of turbidity on the bile salt concentration in equilibrated NEFA-lysophospholipid-monoacylglycerol-bile salt-mixed dispersions containing constant lipid levels and varying levels of bile salts. The samples were made by a series of dilutions of the lipid aggregates after phospholipase A<sub>2</sub> followed by pancreatic lipase hydrolysis with various bile salt solutions ( $[lip]_{tot} = 4.2$  (●), 2.1 (□), 1.0 (▲) and 0.5 (○) mm).  $[lip]_{tot}$ , lipid concentration. OD, optical density.

size and/or shape variations, as already reported for the solubilisation of other colloidal structures such as liposomes<sup>(34,40,41)</sup>. Varying the lipid concentration made it possible to calculate two parameters that fully describe the solubilisation process, i.e.  $[BS]_{bulk}$  and  $[BS:lip]_{mic}$ . The results for mixed micelles at equilibrium are reported in Table 3. Irrespective of the initial lipid system and/or of the temperature,  $[BS]_{bulk}$  values were well above the critical micellar concentration of the main bile acids present in bile (11 mm for cholic acid and 3 mm for deoxycholic acid)<sup>(42)</sup>, suggesting that, at the micellisation point and thereafter, mixed lipid-BS micelles and pure BS micelles coexisted. The composition of mixed micelles consisting of fatty acids, MAG and BS was hardly influenced by an increase in temperature up to 37°C. This may be related to the fact that, at 25°C, acyl chains were already

**Table 3.** Bile salt:lipid molecular ratio in mixed micelles ( $[BS:lip]_{mic}$ ) at equilibrium and the corresponding bile salt concentration in the continuum medium ( $[BS]_{bulk}$ ) as a function of temperature and the initial lipid system (oil and emulsion)

(Mean values with their standard errors)\*

Lipid system	Temperature (°C)	$[BS:lip]_{mic}$		$[BS]_{bulk}$ (mm)	
		Mean	SEM	Mean	SEM
Oil†	25	6.0‡	2.1	36.8	7.0
Oil	37	5.5	2.0	35.0	7.1
Emulsion§	25	2.5	1.3	31.8	5.1
Emulsion	37	4.6	2.1	22.8	7.1

\* Values represent the mean of at least five independent experiments for each lipid system (oil and emulsion) and temperature (25 and 37°C).

† Oil was subjected to pancreatic lipase before bile salt addition.

‡ Mean values were significantly different from those of the emulsion system ( $P < 0.05$ ).

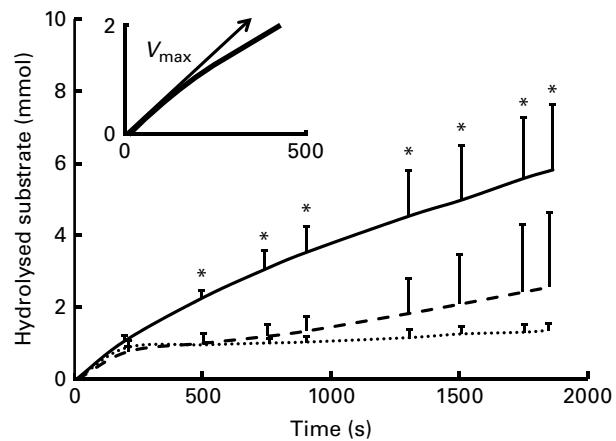
§ Emulsion was subjected to phospholipase A<sub>2</sub> and pancreatic lipase before bile salt addition.

|| Mean values were significantly different from the experiment performed at 37°C ( $P < 0.05$ ).

in the liquid state. In the present study, increasing the temperature from 25 to 37°C may only modify the solubility of BS in the aqueous phase and/or the partition of the surfactant between the aqueous phase and the micelles. In the case of flaxseed emulsions, the resulting mixed micelles contained lysophospholipids in addition to fatty acids, MAG and BS. At 25°C, lysophospholipids significantly decreased the  $[BS:lip]_{mic}$  value due to their surface-active properties (Table 3). Increasing the temperature from 25 to 37°C led to a significant increase in the  $[BS:lip]_{mic}$  value (Table 3). This suggested a lower solubility of BS monomers at the physiological temperature. No phase transition of lysophospholipids occurred because they were already in a liquid-crystalline phase at 25°C. Increasing the temperature may lead to the coexistence of different types of micelles. Indeed, with regard to lecithin/BS-mixed micelles, simple BS micelles may coexist in varying proportions with mixed micelles, depending on the type of BS, the [lecithin]:[BS] ratio and the temperature<sup>(43)</sup>.

### Oil and emulsion hydrolysis by pancreatic lipase

Pancreatic lipase catalyses the hydrolysis of *sn*-1 and *sn*-3 fatty acyl ester bonds of TAG to produce 2-MAG and fatty acids. The catalytic behaviour was studied on bulk oil and emulsions stabilised by lecithin. All experiments were performed with a lipid:enzyme ratio greater than  $10^5$  that ensured a saturating concentration of substrate (results not shown). Under these conditions, the initial rate per g of enzyme extract corresponding to the maximal activity of the enzyme ( $V_{max}$ ) was calculated from curves (Fig. 3, inset). The  $V_{max}$  value obtained with bulk oil (2.2 (sem 0.7) mEq/min per g of enzyme extract) was significantly higher than that measured in the emulsion (0.7 (sem 0.2) mEq/min per g of enzyme extract;  $P < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Time course for a typical hydrolysis of oil by pancreatic lipase (—), of oil-in-water emulsion stabilised by lecithin by pancreatic lipase (---) and by pancreatic lipase and colipase (.....). Inset: the total velocity ( $V_{max}$ ) was determined as extrapolation of the linear line to zero abscissa. All experiments were performed at least five times. \*Mean values were significantly different at a time point ( $P < 0.05$ ).

The addition of colipase to this emulsified system did not increase lipase activity, suggesting that, *in vitro*, colipase could not prevent pancreatic lipase inhibition by PL (Fig. 3).

#### Lymphatic recovery of $\alpha$ -linolenic acid

Because lymph flow did not show any significant difference between rats throughout the kinetic study, the two treated groups were compared with regard to fatty acid concentration in the lymph. At 24 h after feeding, the total fatty acid concentration in the lymph was twice as high in the emulsion group as in the oil group (32.5 v. 14.5 mg/ml of lymph;  $P<0.001$ ). This tendency was also observed for ALA (8.0 mg/ml of lymph in the emulsion group, compared with 3.5 mg/ml of lymph in the oil group;  $P<0.05$ ). The rate and total extent of ALA absorption at the intestinal site are illustrated in Fig. 4 for up to 6 h after feeding. The rate of ALA absorption was similar for both groups in the first 2 h. After 3 h, ALA recovery in the lymph of the emulsion group was significantly higher than that of the bulk-phase group (14.0 v. 6.5 mg/ml, respectively). Moreover, the maximum ALA concentration ( $C_{max}$ ) was obtained sooner, and to a significantly greater extent in the emulsion group compared with the bulk-phase group (Table 4). Likewise, the area under the curve that estimates the intestinal bioavailability of ALA was significantly higher for rats fed emulsified flaxseed oil (Fig. 4, inset; Table 4).

Fatty acid composition of flaxseed oil and the intramolecular fatty acid distribution in TAG are shown in Table 2. In bulk flaxseed oil, ALA, the major fatty acid, was evenly distributed between the three positions of the TAG molecules. The two other main fatty acids, oleic acid (18:1) and linoleic acid (18:2), were mainly esterified in the internal position. The fatty acid composition of

**Table 4.** Maximum  $\alpha$ -linolenic acid concentration ( $C_{max}$ ), time required to reach  $C_{max}$  ( $T_{max}$ ) and area under the curve (AUC) in the lymph of rats fed flaxseed oil in the bulk phase or in the oil-in-water emulsion (Mean values with their standard errors,  $n$  8)

		$C_{max}$ (mg/ml)*	$T_{max}$ (h)	AUC (mg $\times$ h/ml)	
				Mean	SEM
Oil		9	5	26	7
Emulsion		14†	3	48†	12

\* Lipid ingestion by rats corresponded to 0.3 g in the form of flaxseed oil in the bulk phase or emulsified. Chylomicrons were collected for 24 h from eight animals, and the lipid fractions were extracted. Following separation by TLC, TAG was analysed for fatty acid composition by GC.

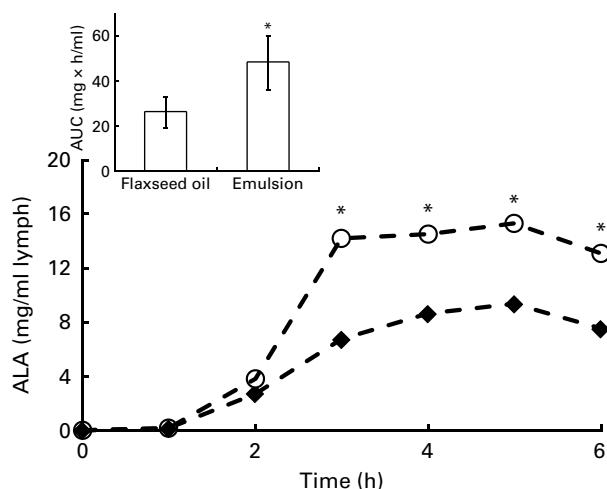
† Mean values were significantly different ( $P<0.05$ ).

lymphatic chylomicron TAG and their intramolecular fatty acid distribution following administration of flaxseed oil as a bulk phase or as an emulsion were examined (Table 5). The fatty acid composition of chylomicron TAG of both rat groups mainly reflected the fatty acid profile of the dietary lipid source. As expected, feeding rats with bulk flaxseed oil or with an emulsion increased the proportion of ALA in the lymph compared with fasted rats. A significant decrease in the proportion of endogenous fatty acids, palmitic acid (16:0) and arachidonic acid (20:4), was observed in the lymph, mainly due to a dilution of these fatty acids in TAG as a consequence of their low proportions of dietary lipids. The proportion of ALA in the *sn*-2 position of chylomicron TAG was similar in the three dietary groups (Table 5).

#### Discussion

Among various vegetable oils, flaxseed oil is one of the richest sources of ALA. Several studies in human subjects have already demonstrated that flaxseed oil intake leads to an increase in ALA levels in the plasma<sup>(23,25)</sup> and an enrichment in ALA of erythrocyte total PL<sup>(23,44)</sup>. Moreover, flaxseed oil consumption has been associated with significant health benefits thanks to an improvement of biomarkers of cardiovascular risk<sup>(23,26,45)</sup> and of inflammation<sup>(24,26)</sup>. On the one hand, basic information about ALA bioavailability from flaxseed oil is still unavailable in order to understand its biological efficiency. On the other hand, improving the bioaccessibility of ALA from the food matrix is a potential strategy for providing additional *n*-3 PUFA.

In the present study, we compared the metabolic fate of flaxseed oil delivered either as a bulk phase or as an emulsion on lymphatic absorption. We clearly demonstrated that TAG were more efficiently absorbed when provided as an emulsion rather than as a bulk phase. As a result, fatty acid and ALA enrichment in chylomicrons was greater ( $C_{max}$ ) and faster ( $T_{max}$ ) in rats fed emulsified oil than in rats fed bulk oil. These results are in agreement with others studies performed either on animal models<sup>(13,46)</sup> or on human subjects<sup>(16)</sup>. These studies have suggested



**Fig. 4.** Time-course concentration of  $\alpha$ -linolenic acid (ALA) in chylomicrons for the oil (◆) and emulsion (○) rat groups. Values are means of at least eight rats for each lipid system, at each time point. \*Mean values were significantly different at a time point ( $P<0.05$ ). Inset represents the area under the curve (AUC) for the two rat groups.

**Table 5.** Main fatty acid composition and distribution of chylomicron TAG in the rat lymph resulting from oil in the bulk phase or oil-in-water (O/W) emulsion ingestion 24 h after feeding

(Mean values with their standard errors, n 8)

Fatty acids	Chylomicrons*									
	Fasted rats				Oil				O/W emulsion	
	TAG† (wt %)		sn-2 MAG‡ (mol %)		TAG (wt %)		sn-2 MAG (mol %)		TAG (wt %)	
	Mean	SEM	Mean		Mean	SEM	Mean		Mean	SEM
16:0	24.1 <sup>a</sup>	2.7	47.6		12.1 <sup>b</sup>	0.7	47.4		12.2 <sup>b</sup>	0.8
18:0	9.4 <sup>a</sup>	1.0	10.6		5.7 <sup>b</sup>	0.5	24.3		4.8 <sup>b</sup>	0.5
16:1n-7	3.2 <sup>a</sup>	0.5	23.6		1.5 <sup>b</sup>	0.8	24.3		1.5 <sup>b</sup>	0.8
18:1n-9	14.4 <sup>a</sup>	1.0	33.8		17.8 <sup>b</sup>	0.3	46.9		18.7 <sup>b</sup>	0.7
18:1n-7	5.5 <sup>a</sup>	0.2	16.5		2.2 <sup>b</sup>	0.4	23.1		2.2 <sup>b</sup>	0.4
18:2n-6	19.1	2.5	40.3		17.1	4.1	41.8		18.8	2.1
18:3n-3	0.6 <sup>a</sup>	0.0	15.8		32.1 <sup>b</sup>	1.3	17.7		30.5 <sup>b</sup>	4.1
20:4n-6	11.9 <sup>a</sup>	0.3	37.4		2.3 <sup>b</sup>	0.2	50.2		1.9 <sup>b</sup>	0.5
22:5n-3	0.7 <sup>a</sup>	0.4	0.3		0.2 <sup>b</sup>	0.0	9.0		0.2 <sup>b</sup>	0.1
22:6n-3	2.4 <sup>a</sup>	0.4	13.3		0.9 <sup>b</sup>	0.1	15.5		0.5 <sup>b</sup>	0.2
Σ SFA	36.6 <sup>a</sup>	1.1			19.2 <sup>b</sup>	3.2			18.7 <sup>b</sup>	4.1
Σ MUFA	26.6 <sup>a</sup>	2.1			22.7 <sup>b</sup>	1.4			23.6 <sup>b</sup>	1.6
Σ n-3 PUFA	4.0 <sup>a</sup>	0.8			33.4 <sup>b</sup>	1.2			31.3 <sup>b</sup>	2.8
Σ n-6 PUFA	32.2 <sup>a</sup>	2.0			20.1 <sup>b</sup>	3.1			21.3 <sup>b</sup>	3.1
Σ TFA	0.3 <sup>a</sup>	0.2			4.6 <sup>b</sup>	0.3			4.8 <sup>b</sup>	0.3
n-6:n-3	8.05 <sup>a</sup>	1.08			0.60 <sup>b</sup>	0.04			0.68 <sup>b</sup>	0.10

sn-2 MAG, sn-2 monoacylglycerol; TFA, trans-fatty acid.

a,b Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different for lymphatic fatty acid wt% ( $P < 0.05$ ).

\* Lipid ingestion by rats corresponded to 0.3 g in the form of flaxseed oil in the bulk phase or emulsified. Chylomicrons were collected for 24 h from eight animals, and the lipid fractions were extracted. Following separation by TLC, TAG was analysed for fatty acid composition by GC.

† The data represent the average of three different determinations.

‡ The fatty acid composition of sn-2 MAG of flaxseed oil and chylomicron TAG was determined after pancreatic lipase hydrolysis followed by isolation and analysis of MAG. The sn-2 MAG analysis was performed on pooled samples of the lymph of eight rats. Results are expressed in mol% corresponding to the distribution of each fatty acid in the internal position of TAG.

that PL from egg phosphatidylcholine<sup>(13,47)</sup> or soya phosphatidylcholine<sup>(13)</sup> could enhance lipid intestinal absorption in rats. Nishimukai *et al.*<sup>(13)</sup> have also shown that the enhancement of lipid output in the lymph was highly related to the TAG:PL ratio used in the dietary formulation.

The digestion process implies a hydrolysis step by lipolytic enzymes including pancreatic lipase that operates at the oil–water interface. Both the nature of the lipids present at this interface and the curvature of the interface could modulate enzyme activity. Indeed, studies based on *in vitro* digestion of emulsified lipids coated with various emulsifiers have shown that PL facilitated access to emulsified fats compared with other non-ionic surfactants<sup>(2,17)</sup>. Above and beyond the interfacial composition, the average oil droplet size also influences lipase activity. Studies have demonstrated that fine emulsions (<1 µm) were hydrolysed by pancreatic lipase faster than coarse emulsions (>20 µm) *in vitro*<sup>(48)</sup> in both animals<sup>(49)</sup> and human subjects<sup>(12,50,51)</sup>. In the present *in vitro* study, we first observed the behaviour of the emulsion provided to rats in gastrointestinal-like conditions. Results showed that the emulsified state was maintained even with large variations in pH (Fig. 1), suggesting that *in vivo*, the lipid–water interface may be preserved up to the intestine level. Thus, TAG of the emulsified oil may be hydrolysed faster by pancreatic lipase, resulting in an increased absorption of hydrolysed products. In contrast, in the

case of flaxseed oil in the bulk phase, the interface must be created by the mechanical mixing in the stomach and intestine. Nevertheless, the *in vitro* hydrolysis of emulsified oil by pancreatic lipase showed that lipase activity was lower than that in the oil as a bulk phase (Fig. 3). This is in agreement with previous *in vitro* studies showing that long-chain TAG emulsified with PL were not hydrolysed by pancreatic lipase, even in the presence of BS and colipase<sup>(52–55)</sup>. However, it has been reported that this inhibition by PL disappeared due to the presence of NEFA generated by TAG hydrolysis<sup>(54,55)</sup> that modified the interface properties. The efficiency of intestinal absorption is also determined by the solubilisation of hydrolysis products into BS-mixed micelles. *In vitro* micellisation experiments involving flaxseed oil (both emulsified and non-emulsified) demonstrated that a lower amount of surfactants was required to produce mixed micelles with the emulsion system (Table 3). In the case of rats that were fed emulsion, the additional amount of lysophospholipids indirectly provided by the dietary lipid formulation may facilitate the transport of hydrolysis products through the unstirred water layer of enterocytes. The present *in vivo* results suggested that the emulsification of flaxseed oil enhances its digestibility, due to the faster hydrolysis of TAG because of the pre-existing oil–water interface and a better solubilisation of hydrolysis products in mixed micelles. Consequently, emulsions may be less prone to

oxidative degradation and may reside less long in the intestinal lumen, leading to a reduction of the extent to which they are conveyed to faeces. Besides parameters influencing lipid bioavailability in the intestinal lumen, it is worth noting that lipid recovery in the lymph may also be affected by the processes occurring in the enterocytes, i.e. uptake into the mucosal cells, as well as the packaging and secretion of chylomicrons. The supply of dietary phosphatidylcholine may favour the formation of chylomicrons<sup>(56)</sup> and/or be involved in the regulation of jejuna apo A-I synthesis in animals<sup>(57)</sup>. Indeed, Nishimukai & Hara<sup>(56)</sup> have demonstrated that the amount of TAG in the rat lymph increased twofold in the presence of soya lecithin.

Several studies have pointed out that the fatty acid composition of chylomicrons and fatty acid distribution in TAG reflected that of the dietary oil<sup>(58–60)</sup>. It is well established that fatty acids esterified at the *sn*-2 position of dietary TAG are mainly retained during the absorption process<sup>(61)</sup> due to the positional specificity of pancreatic lipase. After incorporation of these hydrolysis products into the mucosal pool, most of the 2-MAG are reacylated to TAG that are incorporated into chylomicrons secreted into the lymph. To our knowledge, no similar studies have been performed with flaxseed oil. ALA enrichment in chylomicrons was observed irrespective of the dietary form of flaxseed oil (Table 5). However, the percentage of ALA esterified at the *sn*-2 position of chylomicron TAG was slightly lower (18 and 23% for oil and emulsion, respectively) compared with that in dietary flaxseed oil (28%). This may be attributed to a degradation of some 2-monolinolenate glycerols<sup>(62)</sup>. Indeed, chylomicron TAG contained a high percentage of endogenous fatty acids, which were supplied by bile lipids, especially 16:0, 18:1 and 18:2 fatty acids<sup>(63,64)</sup>.

On the whole, the present results showed that the extent of fatty acid absorption, and especially of ALA, was significantly higher in the rat group ingesting emulsified oil compared with the group given oil in the non-emulsified state. Moreover, the results of the *in vitro* studies dealing with emulsion stability, lipid hydrolysis and solubilisation were used to interpret, at least partly, the increased lymphatic concentration in ALA in the newly synthesised TAG. Nevertheless, basic information on ALA bioavailability from flaxseed oil is still necessary to understand its biological efficiency. In particular, because the intramolecular fatty acid distribution in chylomicron TAG did not exactly reflect that of the dietary oil, the metabolic pathway of ALA during the digestion process remains to be further explored.

### Acknowledgements

The authors acknowledge the National Association of Technical Research and the Aquitaine Regional Council for their financial support through a PhD research grant for L. C. The authors state that there are no conflicts of

interest. Contribution made by each author to the research is as follows: L. C. is a PhD student who contributed to the design of the *in vitro* and *in vivo* experiments. C. B.-V. is the industrial PhD supervisor, specialist in lipid metabolism. L. F., E. M. and S. D. provided technical assistance for the lipid analysis. N. C. is an expert in lipid metabolism who helped to interpret the *in vivo* results. M. C. is the institutional PhD supervisor and is an expert in the formulation of colloidal systems for nutritional applications and in lipid bioavailability.

### References

- Embleton JK & Pouton CW (1997) Structure and function of gastro-intestinal lipases. *Adv Drug Deliv Rev* **25**, 15–32.
- Singh H, Ye A & Horne D (2009) Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Prog Lipid Res* **48**, 92–100.
- Kubow S (1996) The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Nutr Biochem* **7**, 7530–7541.
- Ikeda I, Sasaki E, Yasunami H, *et al.* (1995) Digestion and lymphatic transport of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids given in the form of triacylglycerol, free acid and ethyl ester in rats. *Biochim Biophys Acta* **1259**, 297–304.
- Ramírez M, Amate L & Gil A (2001) Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum Dev* **65**, S95–S101.
- Mekki N, Charbonnier M, Borel P, *et al.* (2002) Butter differs from olive oil and sunflower oil in its effect on postprandial lipemia and triacylglycerol-rich lipoproteins after single mixed meals in healthy young men. *J Nutr* **132**, 3642–3649.
- Mu H & Porsgaard T (2005) The metabolism of structured triacylglycerols. *Prog Lipid Res* **44**, 430–448.
- Bach AC & Babayan VK (1982) Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr* **36**, 950–962.
- Marten B, Pfeuffer M & Schrezenmeir J (2006) Medium-chain triglycerides. *Int Dairy J* **16**, 1374–1382.
- McClements JD & Li Y (2010) Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv Colloid Interface Sci* **159**, 213–228.
- Cansell M, Nacka F & Combe N (2003) Marine lipid-based liposomes increase *in vivo* fatty acid bioavailability. *Lipids* **38**, 551–559.
- Armand M, Pasquier B, André M, *et al.* (1999) Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am J Clin Nutr* **70**, 1096–1106.
- Nishimukai M, Hara H & Aoyama Y (2003) Enteral administration of soyabean lecithin enhanced lymphatic absorption of triacylglycerol in rats. *Br J Nutr* **90**, 565–571.
- Michalski MC, Briard V, Desage M, *et al.* (2005) The dispersion state of milk fat influences triglyceride metabolism in the rat. A <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> breath test study. *Eur J Nutr* **44**, 436–444.
- Michalski MC, Soares V, Lopez M, *et al.* (2006) The supramolecular structure of milk fat influences plasma triacylglycerols and fatty acid profile in the rat. *Eur J Nutr* **45**, 215–224.
- Garaiova I, Guschina IA, Plummer SF, *et al.* (2007) A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification. *Nutr J* **6**, 1–9.
- Mun S, Decker EA & McClements DJ (2007) Influence of emulsifier type on *in vitro* digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Res Int* **40**, 770–781.

18. Sandra S, Decker EA & McClements DJ (2008) Effect of interfacial protein cross-linking on the *in vitro* digestibility of emulsified corn oil by pancreatic lipase. *J Agric Food Chem* **56**, 7488–7494.
19. Bonnaire L, Sandra S, Helgason T, et al. (2008) Influence of lipid physical state on the *in vitro* digestibility of emulsified lipids. *J Agric Food Chem* **56**, 3791–3797.
20. Legrand P, Astorg PO, Bougnoux P, et al. (2010) Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatifs à l'actualisation des apport nutritionnels conseillés pour les acides gras (Opinion of the French agency for food, environmental and occupational health safety). AFSSA – Saisine no. 2006-SA-0359.
21. Astorg P, Arnault N, Czernichow S, et al. (2004) Dietary intakes and food sources of *n*-6 and *n*-3 PUFA in French adult men and women. *Lipids* **39**, 527–535.
22. Combe N & Boué C (2001) Apports alimentaires en acides linoléique et alpha linolénique d'une population d'Aquitaine (Dietary intakes of linoleic acid and alpha-linolenic acid in a population of Aquitaine). *Oléag Corps Gras Lipides* **8**, 118–121.
23. Cunnane SC, Ganguli S, Menard C, et al. (1993) High α-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br J Nutr* **69**, 443–453.
24. Wallace FA, Miles EA & Calder PC (2003) Comparison of the effects of flaxseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *Br J Nutr* **89**, 679–689.
25. Austria JA, Richard MN, Chahine MN, et al. (2008) Bioavailability of alpha-linolenic acid in subjects after ingestion of three different forms of flaxseed. *J Am Coll Nutr* **27**, 214–221.
26. Bloedon LT, Balikai S, Chittams J, et al. (2008) Flaxseed and cardiovascular risk factors: results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. *J Am Coll Nutr* **27**, 65–74.
27. AFSSA (2006) Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation de l'emploi de l'huile de lin, nature ou en mélange, dans l'alimentation courante ainsi que de son intérêt nutritionnel en matière d'apport d'acide alpha-linolénique (Opinion of the French agency for food, environmental and occupational health safety on the use of flaxseed oil, pure or mixed with other oils, in current foods and on its nutritional impact relative to alpha linolenic acid supply). AFSSA – Saisine no. 2004-SA-0409.
28. AFSSA (2009) Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à une demande d'évaluation des risques liés à la consommation courante d'huile de lin vierge (Opinion of the French agency for food, environmental and occupational health safety on the potential risks linked to the current consumption of virgin flaxseed oil). AFSSA – Saisine no. 2008-SA-0392.
29. Wolff RL, Combe N & Entressangles B (1984) Incorporation et élimination de l'acide élaïdique dans les différents phospholipides des mitochondries ou leurs membranes chez le rat (Incorporation and elimination of elaidic acid in various phospholipids of mitochondria and their membranes in rats). *Rev Fse Corps Gras* **31**, 161–170.
30. Ames BN (1966) Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase. *Meth Enzymol* **18**, 115–118.
31. Nacka F, Cansell M & Entressangles B (2001) *In vitro* behavior of marine lipid-based liposomes. Influence of pH, temperature, bile salts and phospholipase A<sub>2</sub>. *Lipids* **36**, 35–42.
32. Hope A & Theimer R (1996) Titrimetric test for lipase activity using stabilized triolein emulsions. *Phytochemistry* **42**, 973–978.
33. Lichtenberg D (1985) Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim Biophys Acta* **821**, 470–478.
34. Paternostre MT, Roux M & Rigaud JL (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. I. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside and sodium cholate. *Biochemistry* **27**, 2668–2677.
35. Bollman JL, Cain JC & Grindlay JH (1948) Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine, or thoracic duct of rat. *J Lab Clin Med* **33**, 1349–1352.
36. Combe N, Constantin MJ & Entressangles B (1981) Lymphatic absorption of nonvolatile oxidation products of heated oils in the rat. *Lipids* **16**, 8–14.
37. Lepage G & Roy CC (1984) Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *J Lipid Res* **25**, 1391–1396.
38. Desnuelle P (1961) Pancreatic lipase. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **23**, 129–161.
39. Entressangles B, Sari H & Desnuelle P (1966) On the positional specificity of pancreatic lipase. *Biochem Biophys Acta* **125**, 597–600.
40. Lichtenberg D, Zilberman Y, Greenzaid P, et al. (1979) Structural and kinetic studies on the solubilization of lecithin by sodium deoxycholate. *Biochemistry* **18**, 3517–3525.
41. Walter A, Vinson PK, Kaplun A, et al. (1991) Intermediate structures in the cholate-phosphatidylcholine vesicle-micelle transition. *Biochem J* **60**, 1315–1325.
42. Hofmann AF & Mysels KJ (1992) Bile acid solubility and precipitation *in vitro* and *in vivo*: the role of conjugation, pH, and Ca<sup>2+</sup> ions. *J Lipid Res* **33**, 617–626.
43. Mazer NA, Benedek GB & Carey MC (1980) Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. *Biochemistry* **19**, 601–615.
44. Barcelo-Coblijn G, Murphy EJ, Othman R, et al. (2008) Flaxseed oil and fish-oil capsule consumption alters human red blood cell *n*-3 fatty acid composition: a multiple-dosing trial comparing 2 sources of *n*-3 fatty acid. *Am J Clin Nutr* **88**, 801–809.
45. Harper CR, Edward MC & Jacobson TA (2006) Flaxseed oil supplementation does not affect plasma lipoprotein concentration on particle size in human subjects. *J Nutr* **136**, 2844–2848.
46. Laugeronne F, Vors C, Géloën A, et al. (2010) Emulsified lipids increase endotoxemia: possible role in early postprandial low-grade inflammation. *J Nutr Biochem* (Epublication ahead of print version 19 March 2010).
47. Jiang Y, Noh SK & Koo SI (2001) Egg phosphatidylcholine decreases the lymphatic absorption of cholesterol in rats. *J Nutr* **131**, 2358–2363.
48. Borel P, Armand M, Ythier P, et al. (1994) Hydrolysis of emulsions with different triglycerides and droplet sizes by gastric lipase *in vitro*. Effect on pancreatic lipase activity. *J Nutr Biochem* **5**, 124–133.
49. Borel P, Armand M, Ythier P, et al. (1994) Digestion and absorption of tube-feeding emulsions with different droplet sizes and compositions in the rat. *J Parenter Enteral Nutr* **18**, 534–543.
50. Armand M (2007) Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **10**, 156–164.
51. Carrière F, Renou C, Lopez V, et al. (2000) The specific activities of human digestive lipases measured from the *in vivo* and *in vitro* lipolysis of test meals. *Gastroenterology* **119**, 949–960.
52. Borgström B (1980) Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A<sub>2</sub>, and fatty acid for the digestion of dietary fat: *in vitro* experiments with porcine enzymes. *Gastroenterology* **78**, 954–962.

53. Reis P, Holmberg K, Watzke H, *et al.* (2009) Lipases at interfaces: a review. *Adv Colloid Interface Sci* **147–148**, 237–250.
54. Patton JS & Carey MC (1981) Inhibition of human pancreatic lipase–colipase activity by mixed bile salt–phospholipid micelles. *Am J Physiol* **241**, 328–336.
55. Larsson A & Erlanson-Albertsson C (1986) Effect of phosphatidylcholine and free fatty acids on the activity of pancreatic lipase–colipase. *Biochem Biophys Acta* **876**, 543–550.
56. Nishimukai M & Hara H (2007) Soybean phosphatidylcholine-induced enhancement of lymphatic absorption of triglyceride depends on chylomicron formation in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 1192–1197.
57. Wang H, Du J, Lu S, *et al.* (2001) Regulation of intestinal apolipoprotein A-I synthesis by dietary phosphatidylcholine in newborn swine. *Lipids* **36**, 683–687.
58. Lambert MS, Botham KM & Mayes PA (1996) Modification of the fatty acid composition of dietary oils and fats on incorporation into chylomicrons and chylomicron remnants. *Br J Nutr* **76**, 435–445.
59. Ikeda I, Yoshida H & Imaizumi K (1997) Effects of triolein or oleic acid on lymphatic recovery of docosahexaenoic acid given as ethyl ester and their intramolecular distribution in lymph triglyceride of rats. *Lipids* **32**, 949–952.
60. Yoshida H, Mawatari M, Ikeda I, *et al.* (1999) Effect of dietary seal and fish oils on triacylglycerol metabolism in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* **45**, 411–521.
61. Hunter JE (2001) Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides. *Lipids* **36**, 655–668.
62. Christensen M & Hoy CE (1996) Effect of dietary triacylglycerol structure on triacylglycerols of resultnatnt chylomicrons from fish oil- and seal oil-fed rats. *Lipids* **31**, 341–344.
63. Shrivastava BK, Redgrave TG & Simmonds WJ (1967) The source of endogenous lipid in the thoracic duct lymph of fasting rats. *Q J Exp Physiol* **52**, 305–312.
64. Baxter JH (1966) Origin and characteristics of endogenous lipid in thoracic duct lymph in rats. *J Lipid Res* **7**, 158–166.

### 3.3. Résultats et développements

#### 3.3.1. Oxydabilité de l'huile de lin en phase continue et en émulsion

##### 3.3.1.1. Rappels sur les phénomènes d'oxydation des lipides

Le rancissement oxydatif des acides gras est un phénomène chimique, spontané, évolutif, irréversible et altératif (Figure 17). Il s'agit de l'attaque des acides gras insaturés par l'oxygène atmosphérique. Cette réaction implique :

- **Un substrat** : des acides gras insaturés présentant un hydrogène en position bisallylique (entre deux insaturations) dans leur chaîne hydrocarbonée. Ces AG se trouvent généralement estérifiés au sein des triglycérides et des phospholipides ;
- **Un réactif** : l'oxygène de l'air ;
- **Des catalyseurs** : rayons UV, température, traces métalliques prooxydantes ;
- **Des initiateurs** : radicaux libres déjà présents dans la matrice.

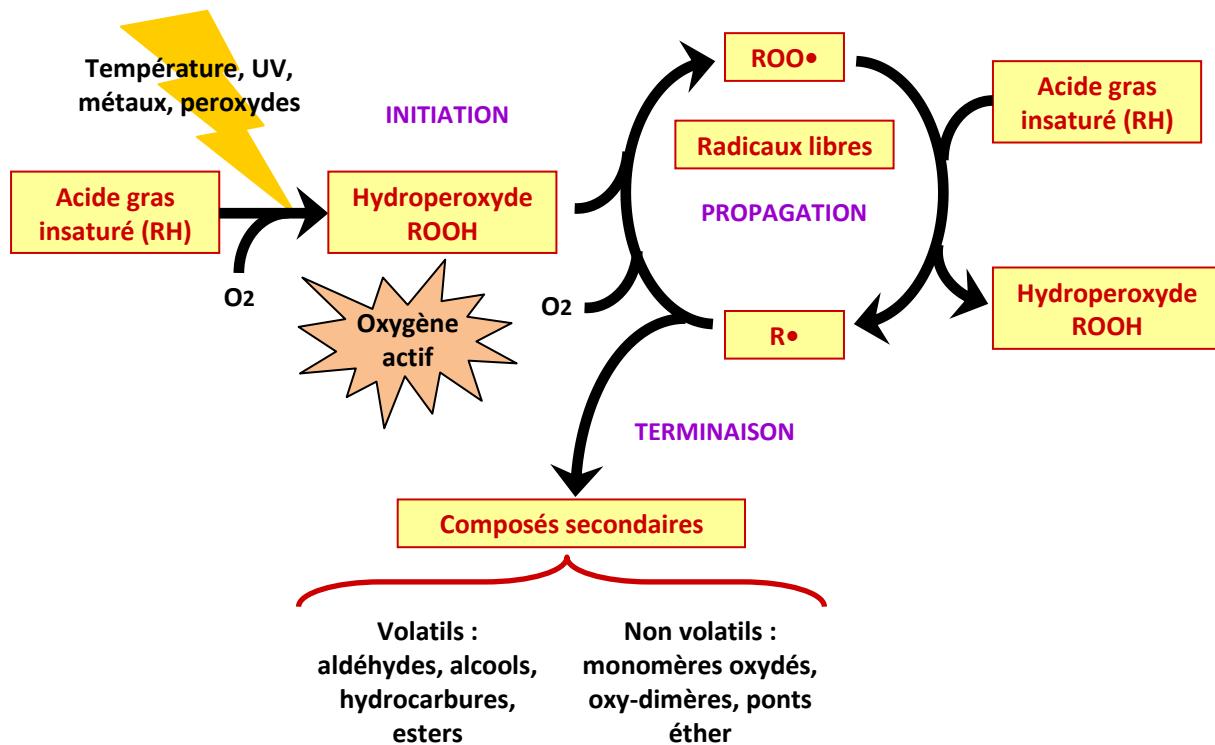
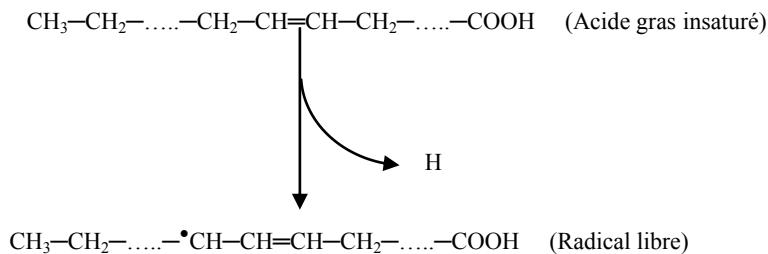


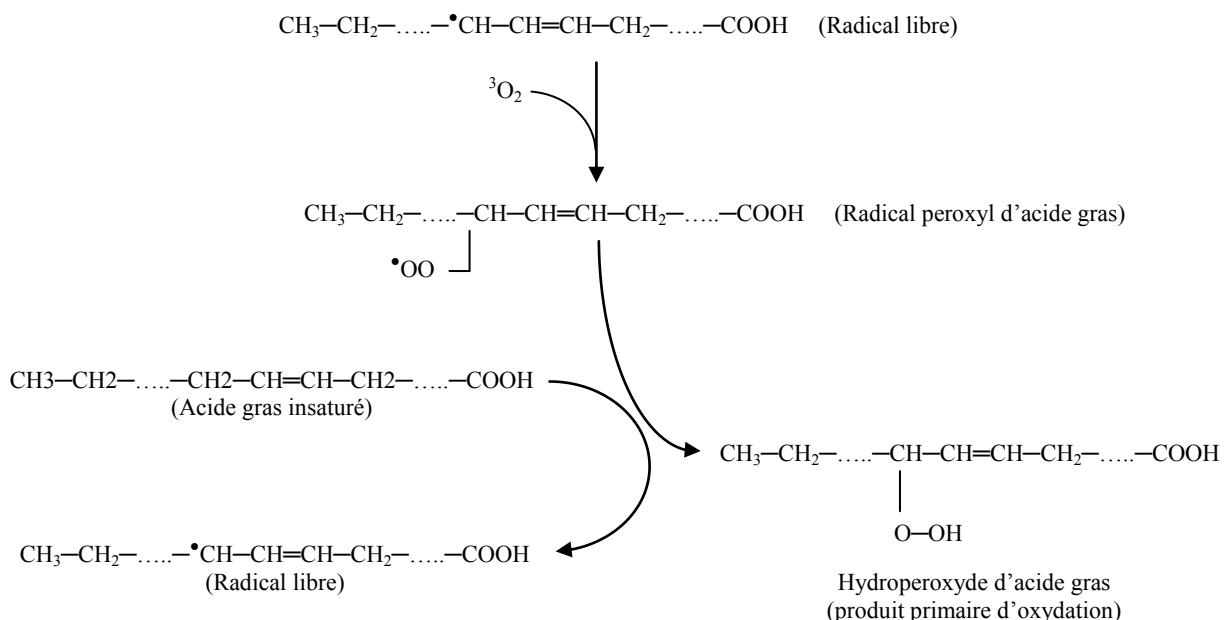
Figure 17 : Schéma général de l'oxydation lipidique (ITERG, 2005)

L'oxydation des lipides est un phénomène complexe qui met en cause plusieurs réactions radicalaires en chaîne (Frankel 2005) que l'on peut décrire par trois étapes principales :

- **L'initiation**: formation de radicaux libres par rupture homolytique d'un atome d'hydrogène adjacent à une double liaison allylique :

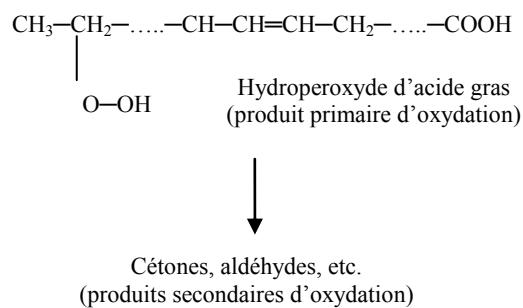


- **La propagation** : réaction entre les radicaux alkyl des lipides insaturés et l'oxygène moléculaire triplet pour former des radicaux peroxyl qui, par une réaction de transfert d'oxygène avec les chaînes grasses, conduisent aux hydroperoxydes. Ces derniers vont alors propager la réaction radicalaire :



Il se forme ainsi des hydroperoxydes isomères, dont des diènes et des triènes conjugués. On parle de peroxydation.

- **La terminaison** : arrêt des réactions en chaîne par combinaison des radicaux libres.



Plusieurs paramètres sont impliqués dans le fait que l'oxydabilité des lipides en émulsion est différente de celle des lipides en phase continue :

- **La fragmentation de l'huile** : de manière générale, la fragmentation de la phase huileuse en gouttelettes favoriserait les réactions oxydatives, probablement du fait de l'augmentation de la zone interfaciale, au niveau de laquelle se produiraient davantage d'interactions avec les composés prooxydants de la phase aqueuse. Cela a été montré pour des huiles riches en acide linoléique (Cercaci et al. 2007) ou des huiles riches en EPA et DHA (Frankel et al. 2002) ;
- **La concentration de l'huile** : l'oxydation des lipides diminue avec les concentrations d'huile élevées (Osborn & Akoh 2004 ; Sun & Gunasekaran 2007). En augmentant la quantité d'huile, on diminue proportionnellement la quantité de phase aqueuse et donc la quantité de molécules hydrophiles prooxydantes telles que les traces métalliques. De plus, pour des fractions d'huile plus importantes, les AGPI pourraient migrer vers l'intérieur des gouttelettes, devenant ainsi moins accessibles aux composés prooxydants au niveau de la zone interfaciale (McClements & Li 2000) ;
- **La taille des globules gras** : plusieurs études ont tenté de mettre en évidence un effet de la taille des gouttelettes sur la stabilité oxydative d'huiles riches en AGPI. Les résultats obtenus sont contradictoires. Dans certaines études, aucun effet significatif de la taille des gouttes sur l'oxydation n'a pu être démontré (Osborn & Akoh 2004 ;

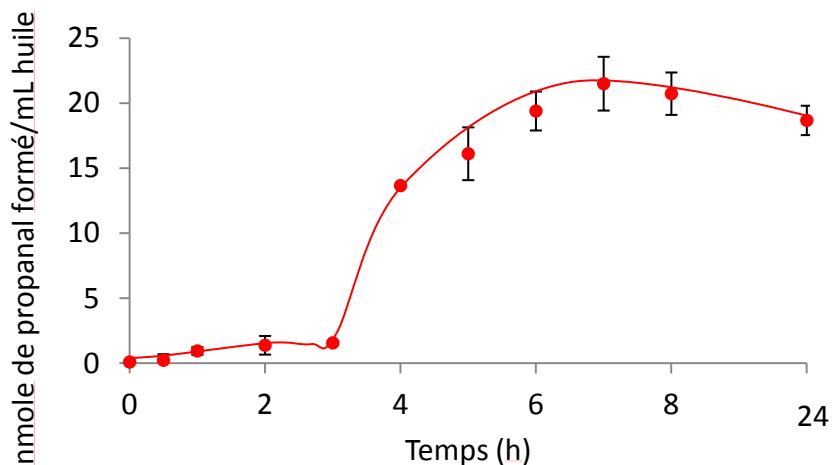
Lethuaut et al. 2002). Pour d'autres, la diminution de la taille de gouttelettes est corrélée à une diminution des phénomènes oxydatifs (Let et al. 2007) ou alors à une augmentation de l'oxydation (Jacobsen et al. 2000 ; Gohtani et al. 1999) ;

- La **concentration en tensioactifs** utilisés pour stabiliser l'émulsion : des concentrations élevées en émulsifiant peuvent augmenter la stabilité oxydative des lipides émulsionnés. En effet, les tensioactifs sont alors plus compactés à l'interface huile-eau, et la zone interfaciale constitue alors une barrière physique plus efficace contre les initiateurs d'oxydation (Coupland & Mc Clements et al. 1996) ;
- La **nature de l'émulsifiant** : les protéines peuvent soit retarder, soit favoriser l'oxydation des lipides dans les émulsions huile dans eau. En augmentant la viscosité de la zone interfaciale entourant les gouttelettes, les protéines peuvent restreindre la pénétration et la diffusion des initiateurs de radicaux dans la phase grasse. Les protéines contenant des groupements thiols réducteurs sont particulièrement efficaces en tant qu'antioxydants dans le lait, la viande et le poisson. Cependant, en présence de métaux, certaines protéines laitières peuvent favoriser les phénomènes d'oxydation lipidique (Frankel 1998). Les phospholipides présentent différents effets vis-à-vis de l'oxydation des lipides : chélation de métaux par leur groupement phosphate et constitution d'un film barrière à l'air. De plus, les phospholipides tels que la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine possèdent une fonction aminée réductrice  $\text{NH}_3^+$  au niveau de leur tête polaire, qui leur confère des propriétés antioxydantes (Karleskind 1992) ;
- La **charge électrique de l'émulsifiant** : les attractions et répulsions électrostatiques influencent significativement l'efficacité des antioxydants et des prooxydants. Le taux d'oxydation est beaucoup plus élevé dans les émulsions préparées avec des émulsifiants ioniques (sodium dodécyl sulfate (SDS), palmitate de potassium) que dans les émulsions préparées avec des émulsifiants non ioniques (Tween 20) (Mancuso et al. 1999). Dans le cas des émulsions stabilisées par des émulsifiants anioniques, les attractions électrostatiques s'exercent entre l'interface huile-eau chargée négativement et les ions métalliques chargés positivement. Les métaux dans la phase aqueuse s'hydratent et deviennent plus réactifs avec les hydroperoxydes polaires et les radicaux hydrosolubles à l'interface huile-eau ;

- La présence de **solutés dans la phase aqueuse** : des solutions aqueuses de certains sucres ou de certains acides aminés (méthionine, lysine, thréonine) sont capables d'inhiber l'oxydation des lipides en émulsion en piégeant les radicaux libres en solution dans la phase aqueuse. D'autres acides aminés, comme l'histidine, peuvent la favoriser. Cependant, ces effets sont très dépendants du type d'émulsifiant utilisé, du pH et de la présence de métaux dans l'émulsion. Les protéines en phase aqueuse peuvent soit piéger les radicaux libres, soit être préférentiellement oxydées et retarder, ainsi, l'oxydation des lipides (Frankel 2005). L'effet prooxydant du chlorure de sodium résulterait d'une augmentation de l'activité des ions métalliques et des enzymes prooxydantes, ainsi que de l'apport d'impuretés (traces métalliques) (Graille 2003) ;
- L'influence du **pH** : un pH acide favorise, en principe, les réactions d'oxydation, particulièrement quand celles-ci sont initiées par des métaux tels que le fer et le cuivre. L'effet catalytique du fer serait favorisé à pH acide en raison de la plus grande stabilité et solubilité des ions ferreux dans ces conditions (Graille 2003). Dans le cas des émulsions stabilisées par des protéines, la production d'hydroperoxydes est plus importante à pH 7 qu'à pH 3 (Faraji et al. 2004 ; Hu et al. 2003). En effet, au dessous de leur point isoélectrique, les protéines sont chargées positivement et repoussent les ions métalliques, également chargés positivement.

### 3.3.1.2. Oxydation de l'huile de lin

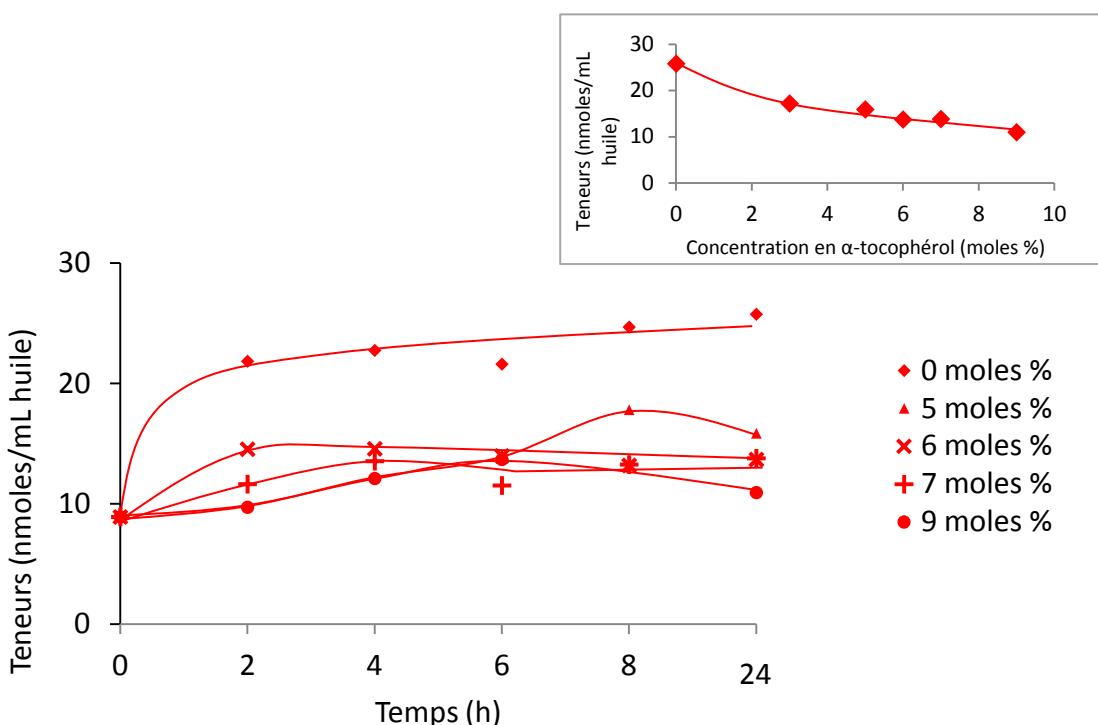
L'oxydabilité de l'huile de lin en phase continue est suivie grâce au dosage du propanal par CPG couplée à l'espace de tête. La présence de propanal rend compte de l'oxydation de l'ALA, acide gras majoritaire de l'huile de lin (45% des acides gras totaux). Cette mesure est réalisée sur 24 heures à 37°C (Figure 18).



**Figure 18 : Evolution de la concentration en propanal de l'huile de lin (nmoles de propanal/mL d'huile) stockée à 37°C en fonction du temps**

L'oxydation de l'huile de lin en phase continue présente une phase de latence d'environ 3 heures suivie par une augmentation rapide de la formation de propanal à 6 heures (Figure 19) pour atteindre la valeur de 18 nmoles de propanal/mL d'huile, à 24 heures. Ainsi, la concentration de propanal de l'huile de lin augmente de l'ordre d'un facteur 6 pendant le temps de stockage étudié. Si on place la même quantité d'huile en présence de fer et d'acide ascorbique (conditions prooxydantes), la quantité maximale de propanal qui peut apparaître dans l'échantillon est de 650 nmoles/mL d'huile. Cela indique qu'à 24 heures, 3% de la quantité d'acides gras oxydables est effectivement dégradée.

L'huile de lin contient naturellement de la vitamine E sous la forme de  $\gamma$ -tocophérol (Tableau 12). Une des solutions pour améliorer la stabilité oxydative de l'huile de lin est de la supplémenter en antioxydant. Nous avons choisi l' $\alpha$ -tocophérol classiquement utilisé en alimentaire. Afin de déterminer la quantité optimale d' $\alpha$ -tocophérol à incorporer dans l'huile de lin, l'influence de l'ajout d' $\alpha$ -tocophérol (jusqu'à 9 moles %) sur la concentration en propanal produite est étudiée (Figure 19). L'addition d' $\alpha$ -tocophérol permet d'améliorer la stabilité oxydative de l'huile de lin sur 24 heures et ce, dès le début de la cinétique et quelle que soit la concentration en  $\alpha$ -tocophérol utilisée. Un ajout de 9 moles % d' $\alpha$ -tocophérol permet de réduire de 57% l'oxydation de l'ALA à 24 heures.



**Figure 19 : Evolution de la concentration en propanal de l'huile de lin (nmoles de propanal/mL d'huile) des mélanges huile de lin/α-tocophérol (0-5-6-7et 9 moles %) stockés à 37°C, en fonction du temps. Insert : Concentration en propanal libéré en fonction de l'ajout de différentes concentrations d'α-tocophérol dans l'huile de lin à 24 heures**

La Figure 20 compare l'évolution de la concentration en propanal pour l'huile de lin en émulsion et en phase continue au cours d'une incubation à 37°C pendant 24 heures. Il est important de noter que la comparaison des résultats n'est pertinente qu'à partir du moment où les éléments suivants sont pris en compte : rapport phase huileuse/air et coefficient de partage des aldéhydes volatiles entre air/phase huileuse et air/émulsion.

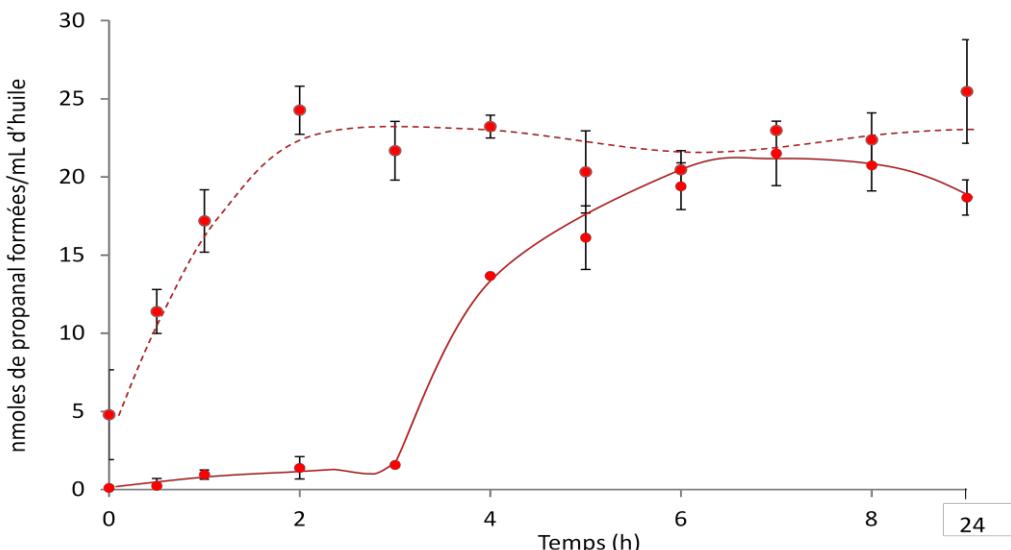
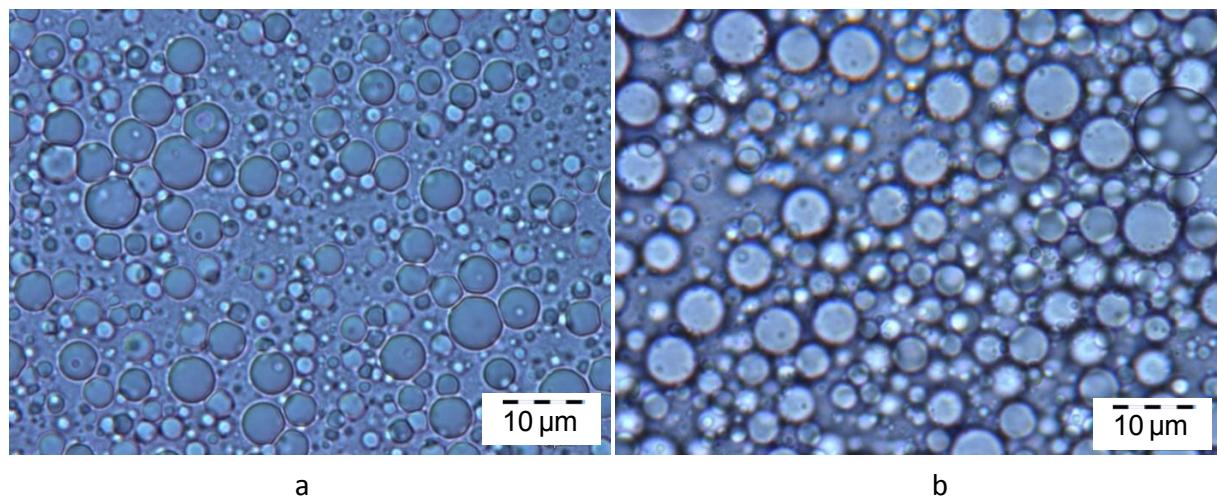


Figure 20 : Evolution de la concentration en propanal (nmoles de propanal/mL d'huile) de l'huile de lin en phase continue (—) ou en émulsion (- - -) stabilisée avec la lécithine de soja 1, stockée à 37°C en fonction du temps

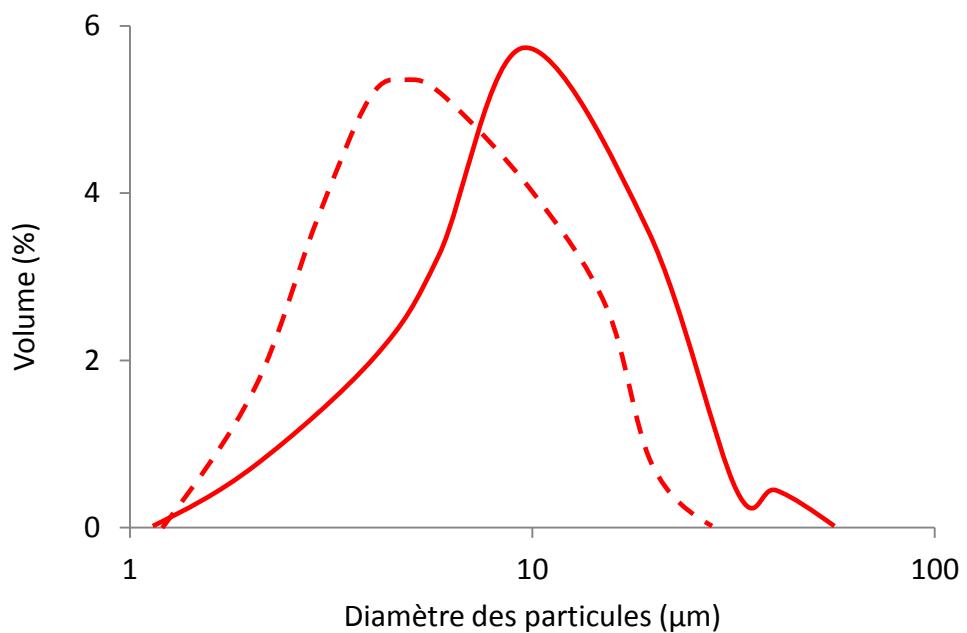
Malgré les précautions prises lors de l'étape d'émulsification de l'huile de lin (effectuée sous flux d'azote), il apparaît que l'huile de lin en émulsion présente d'emblée un niveau d'oxydation supérieur à l'huile non émulsionnée (3,5 nmoles de propanal/mL d'huile émulsionnée vs 0,1 n mole de propanal/mL d'huile en phase continue). Par ailleurs, l'émulsification fait disparaître la phase de latence. Néanmoins, après 6 heures d'incubation, les systèmes émulsionnés et non émulsionnées présentent le même degré d'oxydation de l'ALA mesuré par la concentration de propanal. Ce résultat suggère que le fractionnement de l'huile dans des gouttelettes n'accélère pas la phase de propagation par rapport à l'huile non émulsionnée.

### 3.3.2. Etude des émulsions à base d'huile de lin dans les conditions mimant celles du milieu gastro-intestinal

Deux formulations d'émulsions d'huile de lin sont étudiées différant par la nature de la lécithine utilisée. La lécithine de soja 1 est plus riche en PE (45% vs 30%) et en Lyso-PE (43% vs 23%) que la lécithine de soja 2, respectivement (Tableau 14). Les émulsions préparées avec la lécithine 1 présentent des gouttelettes d'huile de taille moyenne de 10 µm (Figure 21a) avec une répartition entre 1 et 80 µm (Figure 22). Les émulsions préparées avec la lécithine 2 présentent une distribution en taille plus homogène (Figure 21b) avec un diamètre moyen des globules de 4,5 µm (Figure 22).



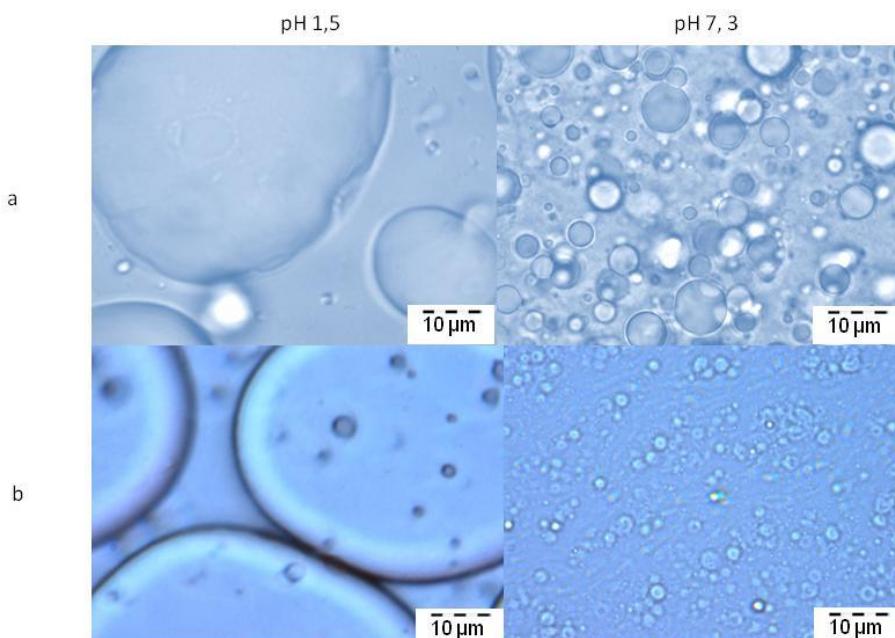
**Figure 21 : Clichés obtenus en microscopie optique en contraste de phase (X 100) des émulsions d'huile de lin à base de lécithine 1 (a) et de lécithine 2 (b)**



**Figure 22 : Distribution en volume des diamètres des gouttelettes d'huile dans l'eau des émulsions d'huile de lin à base de lécithine 1 (—) et de lécithine 2 (---)**

Les variations de pH appliquées aux émulsions représentent celles observées chez l'Homme au cours d'un repas au niveau gastroduodénal. Un pH acide ( $\text{pH}=1,5$ ) est appliqué pendant 3 heures (temps de digestion gastrique), suivi d'une neutralisation légèrement basique du milieu ( $\text{pH}=7,3$ ) relatif au milieu intestinal. L'acidification du milieu aqueux des émulsions

huile/eau induit une déstructuration des émulsions caractérisée par une coalescence des gouttelettes lipidiques (Figure 23). La taille moyenne des globules gras passe alors de  $4,6 \pm 0,6$  à  $12 \pm 2,5 \mu\text{m}$  pour l'émulsion à base de la lécithine 1 et de  $5,0 \pm 0,4$  à  $17,6 \pm 3,0 \mu\text{m}$  pour l'émulsion à base de la lécithine 2. Néanmoins, aucun déphasage d'huile n'est observé et ce pour les deux formulations d'émulsion. Ce résultat s'explique par le fait que les systèmes restent sous agitation pendant les 3 heures. La neutralisation du milieu permet une dispersion de l'huile sous la forme de fines gouttelettes (Figure 23). Cependant la taille des particules n'est pas complètement restaurée ( $9-13 \mu\text{m}$ ) et reste nettement supérieure à celle de l'émulsion d'origine ( $4,6-5 \mu\text{m}$ ). On remarque que la distribution plus fine de l'émulsion observée avec la lécithine 2 est conservée.



**Figure 23 : Clichés obtenus en microscopie optique en contraste de phase (X 100) des émulsions d'huile de lin à base de lécithine 1 (a) et de lécithine 2 (b) à pH 1,5 (3 h) et à pH 7,3 (après une incubation 3 heures à pH 1,5)**

Compte tenu de l'influence des sels biliaires et des PL, rapportée dans la littérature, nous avons procédé à une analyse fine de ces facteurs sur l'hydrolyse des TAG par la lipase pancréatique sur l'émulsion d'huile de lin à base de lécithine 1. Il ressort de cette étude que l'activité de la lipase en condition *in vitro* est inhibée par la présence de PL, dans nos conditions expérimentales. L'ajout de différentes concentrations de colipase (5, 6, 7 et 9 moles %) ne restaure pas l'activité de l'enzyme. Par contre, l'ajout de 0,3 M d'AGL (17:0)

permet de lever l'inhibition générée par les PL et ainsi de restaurer l'activité de la lipase pancréatique pour l'hydrolyse des TAG (Figure 24).

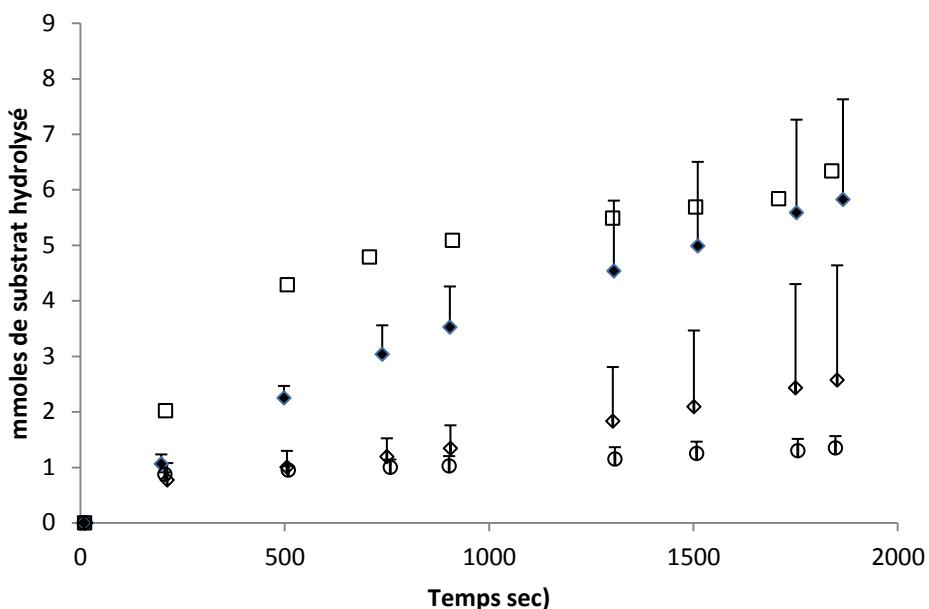


Figure 24 : Cinétique d'hydrolyse de l'huile de lin en phase continue(♦) par la lipase pancréatique, en émulsion avec la lécithine de soja 1 sans colipase (○), en présence de colipase (◇), et en présence de colipase et d'AGL C-17:0 (□) (mmoles de substrat hydrolysé)

### 3.3.3. Absorption lymphatique de l'acide $\alpha$ -linolénique

#### 3.3.3.1. Influence de l'émulsification de l'huile de lin sur l'absorption lymphatique de l'acide $\alpha$ -linolénique

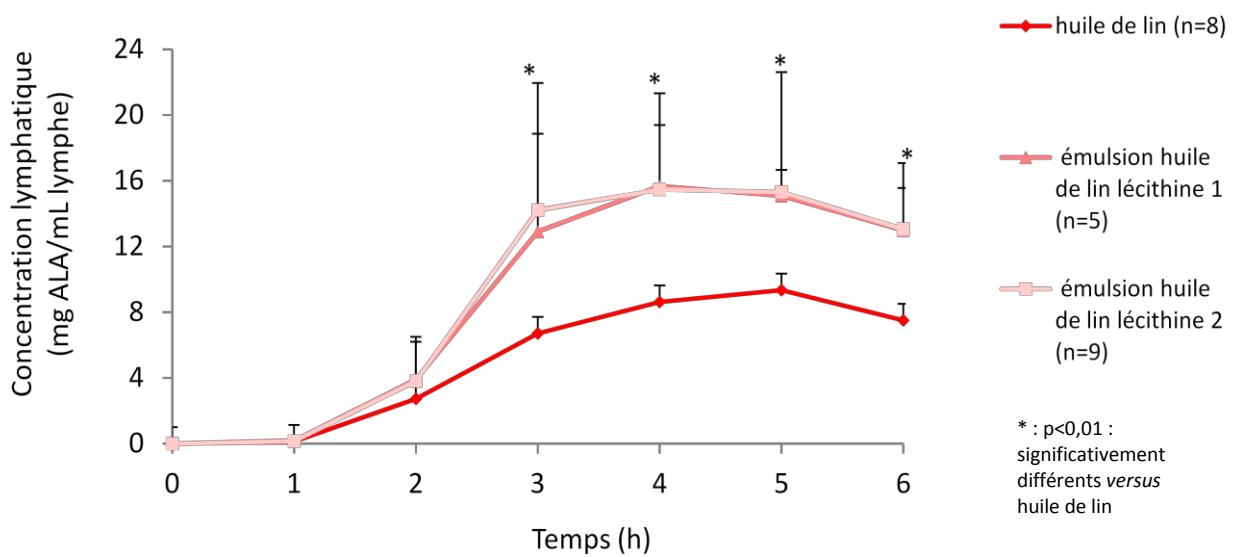
Une étude systématique de l'absorption lymphatique de l'ALA *in vivo* chez le rat est réalisée pour l'émulsion d'huile de lin à base de lécithine 1 et comparée avec l'huile de lin non émulsionnée. Il ressort de cette étude que le taux de passage de l'ALA à travers la barrière intestinale est élevé ( $95,2 \pm 3,4\%$ , n=8). D'autre part, l'absorption de l'ALA sur 24 heures est significativement améliorée ( $p<0,001$ ) lorsque l'huile de lin est administrée sous forme émulsionnée comparativement à l'huile en phase continue ( $AUC = 48,0$  vs  $26,1$  mg/mL.h, respectivement). La cinétique de passage lymphatique de l'ALA issu de l'huile de lin en phase continue étudiée entre 0 et 6 heures montre que, chez le rat, l'absorption est maximale entre 4 et 5 heures ( $T_{max}$ ) et significativement plus tardive que celle de l'huile de lin émulsionnée ( $T_{max} = 3$  h ;  $p<0,05$ ). Au pic d'absorption, la concentration d'ALA dans les lipides totaux de la lymphe est significativement inférieure pour l'huile de lin en phase

continue ( $C_{max} = 8 \text{ mg/mL}$ ) par rapport à la forme émulsionnée ( $C_{max} = 14 \text{ mg/mL}$ ;  $p<0,05$ ).

Les structures des TAG lymphatiques sont déterminées sur les fractions de lymphé rassemblées sur 24 heures. Aucune différence significative de la répartition de l'ALA entre les deux groupes de rats n'est observée (18 et 23% de l'ALA en position *sn*-2 dans les TAG plasmatiques).

### 3.3.3.2. Influence de la formulation des émulsions sur l'absorption lymphatique de l'α-linolénique

La Figure 25 présente la cinétique d'apparition de l'ALA dans les lipides totaux de la lymphé pour des émulsions d'huile de lin stabilisées par deux lécithines de soja différentes. Dans les deux cas, les cinétiques d'absorption de l'ALA sont superposables. Ces données montrent que l'absorption lymphatique de l'ALA n'est pas influencée par le type de lécithine utilisé. Notamment, on en conclut que la Lyso-PE et la Lyso-PI ont les mêmes effets sur l'absorption de l'ALA.



**Figure 25 : Concentrations en ALA dans les lipides totaux de la lymphé (mg ALA/mL lymphé) chez le rat pour deux émulsions à base d'huile de lin et stabilisées par deux types de lécithine de soja et pour l'huile de lin en phase continue**

### 3.4. CONCLUSION

Les études *in vitro* relatives à la caractérisation des émulsions d'huile de lin dans les conditions mimant celles du milieu gastro-intestinal suggèrent que l'interface huile/eau de l'émulsion serait conservée jusqu'au site de digestion des lipides et nécessiterait également une quantité plus faible de sels biliaires pour la micellisation totale des produits d'hydrolyse comparativement à celle requise pour l'huile de lin en phase continue. Le maintien d'une interface préformée huile/eau favoriserait l'adsorption de la lipase pancréatique alors que, dans le cas de l'administration de l'huile de lin en phase continue, cette interface doit être générée. L'hydrolyse plus rapide des lipides émulsionnés et leur prise en charge dans des micelles mixtes nécessitant moins de sels biliaires amélioreraient le processus d'absorption des hydrolysats au niveau de la couche d'eau non agitée des entérocytes. Ces résultats *in vitro* supportent l'hypothèse selon laquelle l'émulsification des lipides serait susceptible de moduler positivement la biodisponibilité intestinale de l'ALA issu de l'huile de lin. En effet, l'enrichissement de l'ALA dans les chylomicrons lymphatiques des rats est plus important ( $C_{max}$ ) et plus rapide ( $T_{max}$ ) après administration de la forme émulsionnée. L'intérêt de formuler les émulsions en utilisant de la lécithine est multiple. D'une part, la présence de Lyso-PL issus de l'hydrolyse de la lécithine pourrait favoriser la solubilisation des lipides qui nécessiterait moins de sels biliaires que dans le cas de l'huile de lin en phase continue. Les PL pourraient contribuer à améliorer le transport entérocytaire des lipides en favorisant le compactage des TAG et/ou la sécrétion des chylomicrons dans la lymphe. En effet, les résultats obtenus *in vitro* sur modèle cellulaire Caco-2 suggèrent que la présence de Lyso-PL, issus de lécithine, favorise la synthèse des TAG et leur compactage au sein des chylomicrons. En ce qui concerne la distribution de l'ALA dans les TAG lymphatiques, le modèle développé avec les TAG structurés peut s'appliquer. Néanmoins, la répartition équimolaire de l'ALA dans les TAG de l'huile de lin et la présence de TAG comportant deux ALA sur la même molécule ne permettent pas de mettre en évidence les différentes voies de synthèse des TAG dans l'entérocyte.

La Figure 26 représente un schéma récapitulatif de l'ensemble des hypothèses formulées pour expliquer les différences de bio accessibilité de l'ALA selon la forme d'apport de l'huile de lin (émulsionnée ou non).

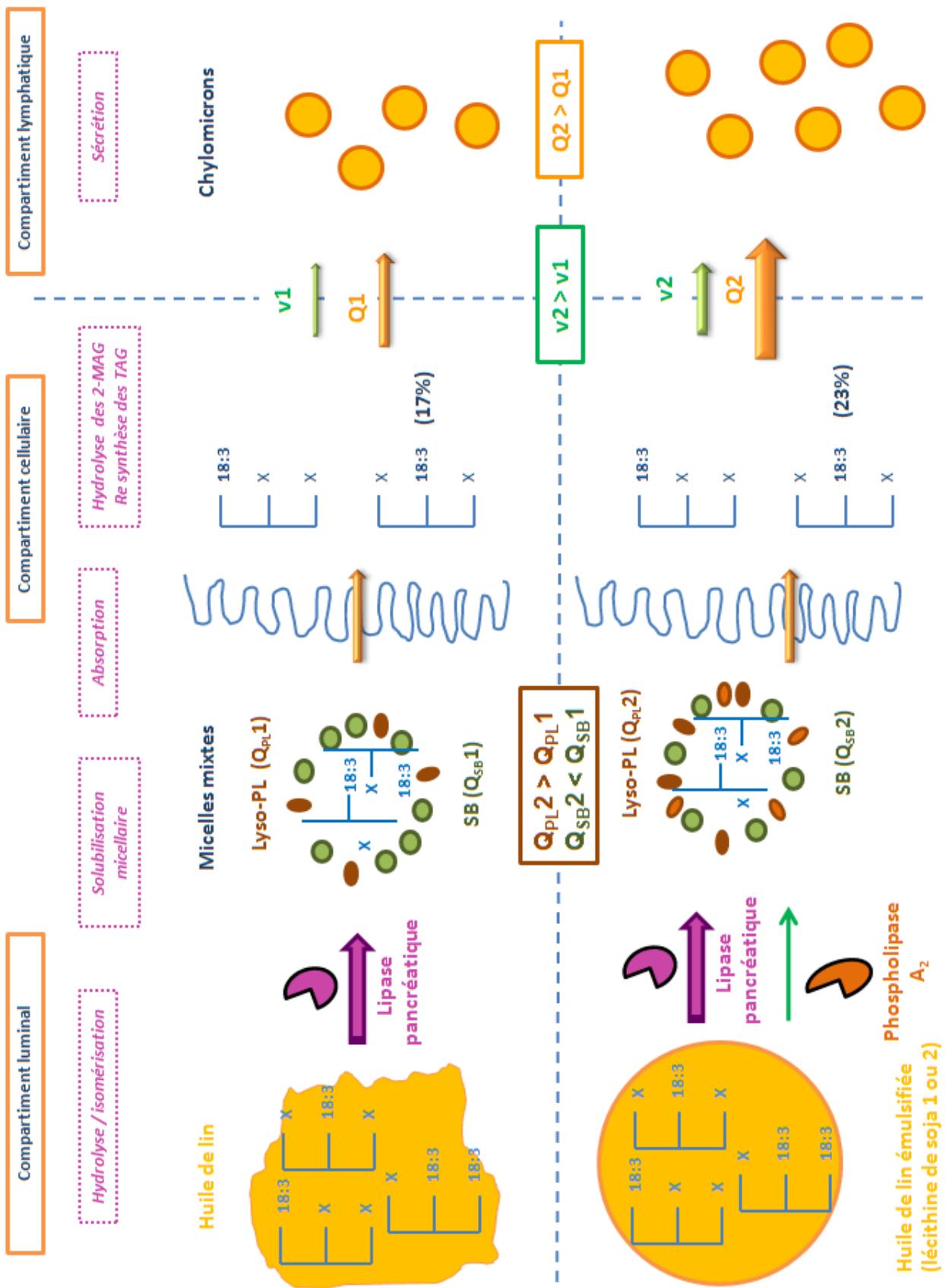


Figure 26 : Schéma récapitulatif du devenir métabolique de l'ALA issu de l'huile de lin selon la forme administrée (émulsifiée ou non) après hydrolyse et micellisation dans la lumière intestinale, la vitesse d'absorption ( $v$ ), la resynthèse dans l'entérocyte et la sécrétion ( $Q$ ) des chylomicrons dans le compartiment lymphatique chez le rat

Les apports nutritionnels conseillés révisés récemment (ANC 2010) soulignent la nécessité d'accroître la consommation française en acides gras polyinsaturés de la famille n-3 et, notamment, celle de l'ALA. Parmi les huiles végétales sources d'AGPI n-3, l'huile de lin apparaît comme une source particulièrement riche en ALA (généralement présent à plus de 50% des acides gras totaux). Bien qu'encore peu consommée par la population française, les avis favorables rendus par l'Anses pour son intégration dans l'alimentation (Saisines n°2004-SA-0213, n°2004-SA-0409, n° 2006-SA-0359) devraient permettre d'élargir son utilisation soit en tant qu'huile d'assaisonnement soit en tant qu'ingrédient dans des produits alimentaires. Néanmoins, malgré l'apport nutritionnel important en ALA lié à la consommation de l'huile de lin, la biodisponibilité de cet acide gras en fonction des formes d'utilisation alimentaire de cette huile reste une question qui mérite d'être abordée. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la bio accessibilité de l'ALA dans la mesure où les étapes de digestion et d'absorption sont des étapes clés dans le métabolisme des lipides qui conditionnent le devenir de l'ALA dans l'organisme. Notre démarche expérimentale est basée sur deux approches complémentaires :

- **l'apport maîtrisé d'ALA** soit à partir de l'huile de lin (en faisant varier l'organisation supramoléculaire des lipides, *i.e.*, huile en phase continue, dans des émulsions et dans des micelles mixtes de diverses formulations), soit au sein de triglycérides structurés (ALA strictement estérifié en position interne ou en positions externes du TAG) ;
- l'utilisation de deux **modèles pour étudier la digestion des lipides**, un modèle cellulaire (les cellules Caco-2) et un modèle animal (le rat).

Dans un premier temps, l'administration de TAG structurés chez le rat nous a permis, à travers l'analyse des lipides lymphatiques et plasmatiques, de suivre précisément le devenir de l'ALA en termes quantitatifs (concentrations en ALA) et qualitatifs (structure des TAG néoformés). Ainsi, le taux de résorption lymphatique de l'ALA est similaire quelle que soit la position de ce dernier sur le squelette glycérol des TAG ingérés. En accord avec d'autres études de la littérature, ce résultat montre que l'efficacité de digestion des deux types de

TAG étudiés est similaire en termes d'une part, d'hydrolyse par la lipase pancréatique, d'autre part, de solubilisation micellaire des produits d'hydrolyse. De manière plus originale, nous avons démontré, grâce à la pureté des TAG structurés modèles, que la structure initiale des TAG alimentaires n'est que partiellement conservée dans les TAG sécrétés par l'entérocyte (à hauteur de 46% lorsque l'ALA est en position interne des TAG ingérés à 4 heures). Ce résultat modère donc les affirmations sur le maintien systématique des structures des TAG ingérés. Les hypothèses pouvant expliquer ces résultats sont les suivantes : i) l'isomérisation de l'acide gras de la position interne vers la position externe et ii) la stimulation de la monoglycéride lipase après le pic d'absorption des acides gras. Ainsi, la voie des 2-monoacylglycérols, normalement prépondérante pendant la digestion pour la synthèse des TAG par l'entérocyte, serait partiellement substituée par la voie du glycérophosphate. Par ailleurs, la répartition de l'ALA dans les TAG lymphatiques est conservée dans les TAG plasmatiques. Ce résultat suggère que l'activité de la LPL est similaire vis à vis des deux groupes de TAG d'origine lymphatique. L'ensemble de cette étude nous a permis de proposer un schéma d'absorption de l'ALA selon sa position sur les TAG alimentaires.

Les données de la littérature indiquent que les PL sont susceptibles d'améliorer l'absorption des acides gras. Dans un deuxième temps, en faisant varier la composition de micelles mixtes, nous avons montré l'influence des Lyso-PL sur la sécrétion des acides gras et notamment de l'ALA par le modèle cellulaire Caco-2. Les Lyso-PL améliorent la sécrétion de l'ALA dans les lipoprotéines. En ce qui concerne le phénomène d'absorption, plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer ce résultat : i) une vitesse de dissociation des micelles mixtes différente ; ii) une amélioration de l'affinité des récepteurs impliqués dans le transport de l'ALA au niveau de la membrane apicale de l'entérocyte en présence de Lyso-PL ; iii) une modification de la perméabilité membranaire des cellules en présence de Lyso-PL (pour ce qui concerne la partie des acides gras et 2-MAG absorbée par diffusion passive). Les Lyso-PL pourraient intervenir en mobilisant de manière plus active les TAG pré et néoformés. L'ensemble de cette étude a permis de proposer un schéma d'absorption et de sécrétion de l'ALA selon la présence et le type de Lyso-PL dans les micelles mixtes initialement mises en contact avec le milieu apical des cellules.

Dans un troisième temps, nous avons voulu étendre l'étude au modèle animal par l'utilisation d'huile de lin sous forme émulsionnée ou non. Cette étude a permis, à travers l'analyse des lipides lymphatiques chez le rat, de déterminer l'influence de la forme physique ainsi que celle de la composition de l'interface huile/eau sur l'enrichissement des chylomicrons en ALA. L'émulsification des lipides permet non seulement d'accroître les concentrations lymphatiques en ALA mais encore d'accélérer la cinétique d'enrichissement. Ces résultats pourraient résulter, d'une part, de la présence d'une interface préformée au niveau intestinal favorisant une adsorption plus rapide de la lipase pancréatique à l'interface huile/eau et, d'autre part, d'une solubilisation des produits de la lipolyse nécessitant une quantité moindre de sels biliaires lorsque de la lécithine est utilisée pour stabiliser l'émulsion alimentaire. De plus, les résultats obtenus avec les cellules Caco-2 indiquent que la présence de Lyso-PL pourrait aussi favoriser les processus d'absorption et de sécrétion des lipides. L'ensemble de cette étude nous a permis de compléter le schéma proposé avec les deux autres approches et de vérifier l'impact des PL sur l'absorption de l'ALA.

De manière plus générale, l'un des objectifs de ce travail de thèse était de déterminer quelles informations pertinentes relatives à la digestion/absorption de l'ALA pouvaient être obtenues à partir de chaque modèle *in vivo* (rat) et *in vitro* (cellules Caco-2). Il s'avère que les deux approches sont complémentaires et ne peuvent se substituer l'une à l'autre. L'une des limites à l'utilisation des cellules Caco-2 se situe au niveau des concentrations des lipides utilisées. Si la composition des micelles mixtes peut être très proche de celle présente au niveau intestinal, les concentrations utilisées sont très inférieures à celles administrées au rat. Nous avons notamment montré les effets délétères des Lyso-PL sur la viabilité des cellules Caco-2. Malgré cette contrainte, chaque modèle a permis de mettre en exergue le rôle des PL dans les mécanismes de digestion/absorption de l'ALA.

Un autre objectif de ce travail de thèse était de déterminer dans quelle mesure il était possible d'extrapoler à une huile naturelle les mécanismes de digestion/absorption/métabolisme entérocytaire de l'ALA obtenus grâce aux TAG synthétiques. Le modèle d'absorption de l'ALA proposé avec les TAG structurés s'applique de manière cohérente à l'huile de lin.

Quant à l'objectif de préconiser une ou des formes d'apports de l'ALA qui optimisent sa bioaccessibilité, nous avons montré que c'est le cas avec l'émulsification de l'huile de lin.

Les différents résultats issus des études *in vivo* et *in vitro* soulèvent de nombreuses questions quant aux mécanismes précis impliqués dans la digestion/absorption de l'huile de lin. Ainsi, **différentes perspectives** se dégagent de ce travail de thèse.

Les études sur les émulsions dans les conditions mimant celles du milieu gastro-intestinal conduisent à des informations pertinentes pour interpréter les résultats *in vivo* chez le rat. Afin d'affiner les résultats obtenus et mieux distinguer entre la part liée à la solubilisation micellaire et celle liée à la lipolyse, la mesure des taux de lipolyse gastrique et intestinale serait à étudier en fonction des changements de composition interfaciale des particules lipidiques.

Les travaux initiés avec les TAG structurés modèles ont montré l'intérêt d'utiliser des molécules de synthèse parfaitement caractérisées. Le maintien partiel de la structure des TAG alimentaires au niveau des TAG lymphatiques suggère l'intervention de l'enzyme responsable de l'hydrolyse des 2-MAG dans l'entérocyte. Il serait intéressant de confirmer l'activité de cette enzyme dans nos conditions expérimentales. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la monoglycéride lipase (non commercialisé à ce jour), ou encore l'utilisation de souris génétiquement modifiées, invalidées pour le gène de la monoglycéride lipase pourraient être envisagées.

L'étude des TAG structurés suggère que la part d'ALA est plus importante sous forme de 2-MAG s'il est fourni en position interne des TAG alimentaire. C'est cette forme qui serait véhiculée puis métabolisée par le foie. Ainsi, l'ALA serait préférentiellement bio-converti en dérivés supérieurs plutôt que  $\beta$ -oxydé. Il serait donc intéressant de vérifier cette hypothèse et notamment en ce qui concerne l'elongation de l'ALA en EPA et DHA. L'utilisation de TAG structurés marqués permettrait de répondre à cette problématique. Deux types de marquage peuvent être envisagés : un marquage de l'ALA au carbone 13 ou le greffage du fluorophore sur l'acide gras d'intérêt. Le marquage au  $^{13}\text{C}$  permettrait de suivre le devenir de l'ALA selon sa position sur le TAG sans encombrement stérique de la configuration spatiale du TAG alimentaire. Cette approche permettrait, notamment, de mieux étudier la clearance des chylomicrons en relation avec l'activité de la LPL et de mieux connaître le devenir de l'ALA sous forme de 2-MAG ( $\beta$ -oxydation ou métabolisation en dérivés supérieurs dans le

foie et utilisation par les tissus périphériques). Le greffage d'une sonde fluorescente (déjà considéré dans le cadre de la thèse d'E. Vaique), pourrait être envisagé pour suivre en temps réel par IRM, le devenir de l'ALA dans l'organisme. L'utilisation de cette sonde devra être validée au préalable par une étude d'absorption/sécrétion par les cellules Caco-2 ou le modèle animal.

Les résultats obtenus avec le modèle cellulaire Caco-2 soulèvent de nombreuses questions quant aux mécanismes impliqués dans les processus d'absorption/sécrétion notamment au niveau du/des récepteur(s) impliqué(s) dans le transport des acides gras et notamment de l'ALA ainsi que son affinité en présence de Lyso-PL. L'utilisation de techniques de biologie moléculaire permettrait de « screener » rapidement les récepteurs déjà identifiés et suspectés dans la reconnaissance entérocytaire des lipides. Par ailleurs, une analyse fine de la composition des lipoprotéines sécrétées doit être réalisée.

Abdalla A, Klein S, Mäder K (2008). A new self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for poorly soluble drugs: characterization, dissolution, in vitro digestion and incorporation into solid pellets. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 35: 457-64.

Abrams CK, Hamosh M, Dutta SK, Hubbard VS, Hamosh P (1987). Role of non pancreatic lipolytic activity in exocrine pancreatic insufficiency. *Gastroenterology* 92: 125-129.

AFSSA. «Acides gras de la famille oméga 3 et système cardiovasculaire : intérêt nutritionnel et allégations.» 2003.

AFSSA Saisine n°2004-SA-0213. *Avis de l'AFSSA relatif à l'évaluation de l'emploi d'huile de lin dans un complément alimentaire à teneur garantie en acide alpha-linolénique*. Maison-Alfort, 25 juillet 2006.

AFSSA Saisine n°2004-SA-0409-saisines liées 2003-SA-0213. *Avis de l'AFSSA relatif à l'évaluation de l'emploi de l'huile de lin, nature ou en mélange, dans l'alimentation courante ainsi que de son intérêt nutritionnel en matière d'apport en acide alpha-linolénique*. Maison-Alfort, 25 juillet 2006.

AFSSA Saisine n°2006-SA-0359. *Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras*. Maison-Alfort, 01 mars 2010.

Akesson B, Gronowitz S, Hersløf B, Ohlson R (1978). Absorption of synthetic, stereochemically defined acylglycerols in the rat. *Lipids* 13: 338-343.

Amate L, Gil A, Ramírez M (2001). Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids from different sources affect fat and fatty acid excretions in rats. *Journal of Nutrition* 131: 3216-3221.

Ames B (1966). Assay of inorganic phosphate and phosphatase. *Methods Enzymology* 18: 115-118.

Anant S, Davidson NO (2001). Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing. *Current Opinion in Lipidology* 12: 159-165.

Armand M, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Lafont H, Lairon D (1994). Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach. *American Journal of Physiology* 266: 372-381.

Armand M, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Andre M, Peyrot J, Salducci J, Lairon D (1996). Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *American Journal of Physiology* 271: 172-183.

Armand M (1998). Physicochemical properties of lipid emulsions : effect on fat digestion and absorption. *Cahiers de Nutrition et Diététique* 33: 305-311.

Armand M, Pasquier B, André M, Borel P, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Portugal H, Jaussan V, Lairon D (1999). Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *American Journal of Clinical Nutrition* 70: 1096-1106.

Arterburn LM, Hall EB, Oken H (2006). Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 83: 1467S-1476S.

Aspenström-Fagerlund B, Ring L, Aspenström P, Tallkvist J, Ilbäck NG, Glynn AW (2007). Oleic acid and docosahexaenoic acid cause an increase in the paracellular absorption of hydrophilic compounds in an experimental model of human absorptive enterocytes. *Toxicology* 237: 12-23.

Benolken RM, Anderson RE, Wheeler TG (1973). Membrane fatty acids associated with the electrical response in visual excitation. *Science* 182: 1253-1254.

Besnard P, Niot I, Bernard A, Carlier H (1996). Cellular and molecular aspects of fat metabolism in the small intestine. *Proceedings of the Nutrition Society* 55: 19-37.

Besnard P, Niot I, Poirier H, Clément L, Bernard A (2002). New insights into the fatty acid-binding protein (FABP) family in the small intestine. *Molecular and Cellular Biochemistry* 239: 139-147.

Beysseriat M, Decker EA, McClements DJ (2006). Influence of Dietary Fiber on Properties of Oil-in-Water Emulsions Passed Through an In Vitro Human Digestion Model. *Food Hydrocolloids* 20: 800-809.

Bollman JR, Cain JC, Grindlay JH (1948). Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine or thoracic duct of the rat. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 33: 1349-1352.

Borel P, Armand M, Pasquier B, Senft M, Dutot G, Melin C, Lafont H, Lairon D (1994a). Digestion and absorption of tube-feeding emulsions with different droplet sizes and compositions in the rat. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 18: 534-543.

Borel P, Armand M, Ythier P, Dutot G, Melin C, Senft M, Lafont H, Lairon D (1994b). Hydrolysis of emulsions with different triglycerides and droplet sizes by gastric lipase in vitro. Effect on pancreatic lipase activity. *Journal of Nutritional Biochemistry* 5: 124-133.

Borgstrom B (1975). On the interactions between pancreatic lipase and colipase and the substrate, and the importance of bile salts. *Journal of Lipid Research* 16: 411-417.

Borgström B (1980). Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A2, and fatty acid for the digestion of dietary fat: in vitro experiments with the porcine enzymes. *Gastroenterology* 78: 954-962.

- Borgström B, Erlanson C (1973). Pancreatic lipase and co-lipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents. *European Journal of Biochemistry* 37: 60-68.
- Boulos P, Combe N (2000). Biodisponibilité de l'acide  $\alpha$ -linolénique : intérêt d'une huile combinée. *Oleagineux Corps Gras Lipides* 7: 101-104.
- Bourre JM (2003). Alimentation animale et valeur nutritionnelle induite sur les produits dérivés consommés par l'homme : Les lipides sont-ils principalement concernés ? *Oléagineux Corps Gras Lipides* 10: 405-424.
- Bourre JM (2004). *La vérité sur les oméga 3*. Paris: Odile Jacob, p. 288.
- Bourre JM (2005). Dietary omega-3 Fatty acids and psychiatry: mood, behaviour, stress, depression, dementia and aging. *Journal of Nutrition Health Aging* 9: 31-38.
- Boyd M, Risovic V, Jull P, Choo E, Wasan KM (2004). A stepwise surgical procedure to investigate the lymphatic transport of lipid-based oral drug formulations: Cannulation of the mesenteric and thoracic lymph ducts within the rat. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 49: 115-120.
- Bracco U (1994). Effect of triglyceride structure on fat absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* 60: 1002-1009.
- Bradford MM (1972). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 248-254.
- Brenna JT, Salem N, Sinclair AJ, Cunnane SC (2009). Alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids* 80: 85-91.
- Breslow JL (2006). n-3 fatty acids and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 83: 1477-1482.
- Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 214: 248-257.
- Brokerhoff H, Yurkowski M (1999). Stereospecific analyses of several vegetable fats. *Journal of Lipid Research* 7: 62-64.
- Burdge GC, Wootton SA (2002). Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *British Journal of Nutrition* 88: 411-420.
- Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM, Wootton SA (2003). Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [13C] $\alpha$ -

linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards  $\beta$ -oxidation in older men. *British Journal of Nutrition* 90: 311-321.

Burr GO, Burr MM (1929). A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Journal of Biological Chemistry* 82: 345-367.

Cansell M, Nacka F, Combe N (2003). Marine lipid-based liposomes increase in vivo FA bioavailability. *Lipids* 38: 551-559.

Carey MC, Small DM, Bliss CM (1983). Lipid digestion and absorption. *Annual Review of Physiology* 45: 651-677.

Carnielli VP, Verlato G, Pederzini F, Luijendijk I, Boerlage A, Pedrotti D, Sauer PJ (1998). Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula. *American Journal of Clinical Nutrition* 67: 97-103.

Carrière F, Moreau H, Raphel V, Laugier R, Benicourt C, Junien JL, Verger R (1991). Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase. *European Journal of Biochemistry* 202: 75-83.

Carrière F, Barrowman JA, Verger R, Laugier R (1993). Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* 105: 876-888.

Carrière F, Renou C, Lopez V, De Caro J, Ferrato F, Lengsfeld H, De Caro A, Laugier R, Verger R (2000). The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals. *Gastroenterology* 119: 949-960

Carrière F (2008). Soixante ans de recherche sur la lipolyse enzymatique des corps gras à Marseille. *Oleagineux Corps Gras Lipides* 15: 196-207.

Cartwright IJ, Plonné D, Higgins JA (2000). Intracellular events in the assembly of chylomicrons in rabbit enterocytes. *Journal of Lipid Research* 41: 1728-1739.

Cercaci I, Rodriguez-Estrada MT, Lercker G., Decker EA (2007). Phytosterol oxidation in oil-in-water emulsions and bulk oil. *Food Chemistry* 102: 161-167.

Chahinian H, Snabe T, Attias C, Fojan P, Petersen SB, Carrière F (2006). How gastric lipase, an interfacial enzyme with a ser-his-asp catalytic triad, acts optimally at acidic pH. *Biochemistry* 45: 993-1001.

Chen Q, Nilsson A (1993). Desaturation and chain elongation of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in the human CaCo-2 cell line. *Biochimica et Biophysica Acta* 1166: 193-201.

Chernenko GA, Barrowman JA., Kean KT, Herzberg GR, Keough KMW (1989). Intestinal absorption and lymphatic transport of fish oil (MaxEPA) in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta* 1004: 95-102.

- Chiliard Y, Ferlay A, Doreau M (2001). Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières : acides gras trans polyinsaturés, acide linoléique conjugué. *INRA- Productions Animales* 14: 232-335.
- Chow SL, Hollander D (1979). Linoleic acid absorption in the unanesthetized rat: mechanism of transport and influence of luminal factors on absorption. *Lipids* 14: 378-385.
- Christensen MS, Høy CE, Redgrave TG (1994). Lymphatic absorption of n-3 polyunsaturated fatty acids from marine oils with different intramolecular fatty acid distributions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1215: 198-204.
- Christensen MS, Høy CE, Becker CC, Redgrave TG (1995). Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexanoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure. *American Journal of Clinical Nutrition* 61: 56-61.
- Christensen MS, Høy CE (1996). Effects of dietary triacylglycerol structure on triacylglycerols of resultant chylomicrons from fish oil- and seal oil-fed rats. *Lipids* 31: 341-344.
- Ciubotariu E, Ménard D, Bendayan M, Garofalo C, Delvin E, Levy E (2003). La lignée cellulaire Caco-2 et un de ses clones, le Caco-2/15 : une analyse comparative pour l'état de différenciation cellulaire, du métabolisme et du transport des lipides. *71ième Congrès de l'ACFAS*.
- Clarke SD & Jump DB (1994). Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annual Review of Nutrition* 14: 83-98.
- Combe N, Constantin MJ, Entressangles B (1981). Lymphatic absorption of nonvolatile oxidation products of heated oils in the rat. *Lipids* 16: 8-14.
- Combe N, Boué C (2001). Apports alimentaires en acides linoléique et alpha linolénique d'une population. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 8: 118-121.
- Combe N, Fenart E (2004). Les oméga 3 : de l'alimentation animale à la nutrition humaine : Acides gras oméga 3 : aspects métaboliques / Omega 3 fatty acids: from animal feeding to human nutrition : Omega 3 fatty acids: metabolic aspects. *Oléagineux Corps Gras Lipides* 11: 46-49.
- Coupland JN, Mc Clements DJ (1996). Lipid oxidation in food emulsions. *Trends in Food Science and Technology* 7: 83-91.
- De Fouw NJ, Kivits GA, Quinlan PT, van Nielen WG (1994). Absorption of isomeric, palmitic acid-containing triacylglycerols resembling human milk fat in the adult rat. *Lipids* 29: 765-770.

- De Lorgeril M, Renaud S, Mamelle N, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Guidollet J, Touboul P, Delaye J (1994). Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet* 343: 1454-1459.
- De Lorgeril M, Salen P (2008). The Mediterranean diet: rationale and evidence for its benefit. *Current Atherosclerosis Reports* 10: 518-522.
- Decker EA (1996). The role of stereospecific saturated fatty acid positions on lipid nutrition. *Nutrition Reviews* 54: 108-110.
- Degrace P, Caselli C, Rayo JM, Bernard A (1996). Intestinal lymph absorption of butter, corn oil, cod liver oil, menhaden oil, and eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid ethyl esters in rats. *Lipids* 3: 405-414.
- De Nigris SJ, Hamosh M, Kasbekar DK, Lee TC, Hamosh P (1988). Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochimica Biophysica Acta* 959: 38-45.
- Desnuelle P (1961). Pancreatic Lipase. *Advanced Enzymology Relation Subject Biochemistry* 23: 129-161.
- Desnuelle P & Benzonana G (1965). Kinetic study of the action of pancreatic lipase on emulsified triglycerides. Enzymology assay in heterogeneous medium. *Biochimica et Biophysica Acta* 105: 121-136.
- Dickinson E (1996). *Les colloïdes alimentaires*. Éd. Masson. Courthaudau J.-L., Le Meste M. *Série Sciences de l'Ingénieur*, p 216.
- Embleton JK, Pouton CW (1997). Structure and function of gastro-intestinal lipases. *Advanced Drug Delivery Reviews* 25: 15-32.
- Emken EA, Adlof RO, Duval SM, Nelson GJ (1999). Effect of dietary docosahexaenoic acid on desaturation and uptake in vivo of isotope labeled oleic, linoleic and linolenic acids by male subjects. *Lipids* 34: 785-798.
- Faraji H, Mc Clements DJ, Decker EA (2004). Role of continuous phase protein on the oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4558-4564.
- Fatouros DG, Mullertz A (2008). In vitro lipid digestion models in design of drug delivery systems for enhancing oral bioavailability. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 4: 65-76.
- Fernandez-Garcia E, Carvajal-Lerida I, Perez-Galvez A (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research* 29: 751-760.

Fickers P, Destain J, Thonart P (2008). Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 12: 119-130.

Field FJ, Albright E, Mathur SN (1998). Regulation of triglyceride-rich lipoprotein secretion by fatty acids in CaCo-2 cells. *Journal of Lipid Research* 29: 1427-1437.

Filer LJ, Mattson FH, Fomon SJ (1969). Triglycerides configuration and fat absorption by the human infant. *Journal of Nutrition* 99: 293-298.

Folch J, LEES M, Sloanes-Stanley GH (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biology and Chemistry* 226: 497-509.

Fotouhi N, Jenkins TC (1992). Resistance of fatty acyl amides to degradation and hydrogenation by ruminal microorganisms. *Journal of Dairy Science* 75: 1527-1532.

Frankel EN (1998). Lipid Oxidation, Second Edition. *The Oily Press* 15-96.

Frankel EN, Satuea-Gracia T, Meyer AS, German JB (2002). Oxidative stability of fish and algae oils containing long-chain polyunsaturated fatty acids in bulk and in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2094-2099.

Frankel EN (2005). Lipid Oxidation, Second Edition. The Oily Press 21-142.

Fraser R, Cliff WJ, Courtice FC (1968). The effect of dietary fat load on the size and composition of chylomicrons in thoracic duct lymph. *Quarterly journal of experimental physiology and cognate medical sciences* 53: 390-8.

Garaiova I, Guschina IA, Plummer SF, Tang J, Wang D, Plummer NT (2007). A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification. *Nutrition Journal* 6: 4.

Gargouri Y, Pieroni G, Riviere C, Sauniere JF, Lowe PA, Sarda L, Verger R (1986). Kinetic assay of human gastric lipase on short- and long-chain triacylglycerol emulsions. *Gastroenterology* 91: 919-925.

Glahn R, Lee O, Yeung A, Goldman M, Miller D (1998). Caco-2 Cell Ferritin Formation Predicts Nonradiolabeled Food Iron Availability in an In Vitro Digestion/Caco-2 Cell Culture Model. *Journal of Nutrition* 128: 1555-1561.

Goetze O, Steingoetter A, Menne D, van der Voort IR, Kwiatek MA, Boesiger P, Weishaupt D, Thumshirn M, Fried M, Schwizer W (2007). The effect of macronutrients on gastric volume responses and gastric emptying in humans: A magnetic resonance imaging study. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver and Physiology* 292: 11-17.

- Gohtani S, Sirendi M, Yamamoto N, Kajikawa K, Yamano Y (1999). Effect of droplet size on oxidation of docosahexaenoic acid in emulsion system. *Journal of Dispersion Science & Technology* 20: 1319-1325.
- Golding M & Wooste T.J (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15: 90-101
- Glick MR & Ryder KW. Analytical systems ranked by freedom from interferences. *Clinical Chemistry* 33: 1453-1458.
- Graille J (2003). Lipides et corps gras alimentaires. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires. Tec et Doc. Lavoisier Paris, p 165-191.
- Halling PJ (1981). Protein-stabilized foam and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 15: 155-203.
- Hamosh M, Bitman J, Wood L, Hamosh P, Mehta NR (1985). Lipids in milk and the first steps in their digestion. *Pediatrics* 75: 146-150.
- Hamosh M (1990). Lingual and gastric lipases. *Nutrition* 6: 421-428.
- Hanahan DJ (1997). *A Guide to Phospholipid Chemistry*. New York.: Oxford University Press, p 214.
- Harnack K, Andersen G, Somoza V (2009). Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. *Nutrition & Metabolism* 6: 1-11.
- Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT (1989). Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 93: 736-749.
- Ho SY, Storch J (2001). Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells. *American Journal of Physiology and Cellular Physiology* 281: 1106-1117.
- Hofman AF (1976). Fat digestion : the interaction of lipid digestion products with micellar bile acid solution. *Lipid absorption : Biochemical and Clinical Aspects*, Ed. Rommel & Goebell. Lancaster, p 3-18.
- Holman RT, Johnson SB, Hatch TF (1982). A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 35: 617-623.
- Hoyle RJ, Brockerhoff H (1963). On the structure of the depot fats of marine fish and mammals. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 102: 452-455.

Hsu KT, Storch J (1996). Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 13317-13323.

Hu M, Mc Clements DJ, Decker EA (2003). Impact of whey protein emulsifiers on the oxidative stability of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 1435-1439.

Huang YS, Liu JW, Koba K, Anderson SN (1995). N-3 and n-6 fatty acid metabolism in undifferentiated and differentiated human intestine cell line (Caco-2). *Molecular and Cellular Biochemistry* 151: 121-130.

Hulshof K, van Erp-Baart MA, Anttolainen M, Becker W, Church SM, Couet C, Hermann-Kunz E, Kesteloot H, Leth T, Martins I, Moreiras O, Moschandreas J, Pizzoferrato L, Rimestad AH, Thorgeirsdottir H, van Amelsvoort JMM, Aro A, Kafatos AG (1999). Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on trans fatty acids: the TRANSFAIR study. *European Journal of Clinical Nutrition* 53: 143-157.

Hur SJ, Lim BO, Park GB, Joo ST (2009). Effects of various fiber additions on lipid digestion during in vitro digestion of beef patties. *Journal of Food Science* 74: 653-657.

Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food chemistry* 125: 1-12.

Hussain MM, Kancha RK, Zhou Z, Luchoomun J, Zu H, Bakillah A (1996). Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1300: 151-170.

Hussain MM (2000). A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*. 148: 1-15.

Hussain MM, Fatma S, Pan X, Iqbal J (2005). Intestinal lipoprotein assembly. *Current Opinion in Lipidology* 16: 281-285.

Hwang D (2000). Fatty acids and immune responses-a new perspective in searching for clues to mechanism. *Annual Review of Nutrition* 20: 431-456.

Ichihara KI, Suda SY (2003). Lipid biosynthesis in developing perilla seeds. *Phytochemistry* 63: 139-143.

Ikeda I, Tomari Y, Sugano M, Watanabe S, Nagata J (1991). Lymphatic absorption of structured glycerolipids containing medium-chain fatty acids and linoleic acid, and their effect on cholesterol absorption in rats. *Lipids* 26: 369-373.

Ikeda I, Sasaki E, Yasunami H, Nomiya S, Nakayama M, Sugano M, Imaizumi K, Yazawa K (1995). Digestion and lymphatic transport of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids

given in the form of triacylglycerol, free acid and ethyl ester in rats. *Biochim Biophys Acta* 1259 :297-304.

Innis SM, Dyer R, Nelson CM (1994). Evidence that palmitic acid is absorbed as sn-2 monoacylglycerol from human milk by breast-fed infants. *Lipids* 29: 541-545.

Jackson KG, Bateman PA, Yaqoob P, Williams CM (2009). Impact of saturated, polyunsaturated and monounsaturated fatty acid-rich micelles on lipoprotein synthesis and secretion in Caco-2 cells. *Lipids* 44: 1081-1089.

Jacobsen C, Hartvigsen K, Lund P, Thomsen MK, Skibsted LH, Adler-Nissen J, Holmer G, Meyer AS (2000). Oxidation in fish oil-enriched mayonnaise 3. Assessment of the influence of the emulsion structure on oxidation by discriminant partial least squares regression analysis. *European Food Research & Technology* 211: 86-98.

Jacobson TA (2008). Role of n-3 fatty acids in the treatment of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 87: 1981S-1990S.

Jensen RG (1989). Lipids in human milk-composition and fatsoluble vitamins. 2<sup>nd</sup> Ed. Éd. Lebenthal E. New York: *Textbook of gastroenterology and nutrition in infancy*, p. 157-208.

Johnston JM, Rao GA (1967). Intestinal absorption of fat. *Protoplasma* 63: 40-44.

Kararlit T (1995). Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans on commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 16: 351-380.

Karleskind A (1992). Manuel des Corps Gras. Tec et Doc. Lavoisier Paris, p 53-70.

Kedinger M, Haffen K, Simon-Assmann P (1987). Intestinal tissue and cell cultures. *Differentiation* 36: 71-85.

Khoo SM, Edwards GA, Porter CJH, Charman WN (2001). A conscious dog model for assessing the absorption, enterocyte-based metabolism, and intestinal lymphatic transport of halofantrine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 90: 1599-1607.

Kindel T, Lee DM, Tso P (2010). The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. *Atherosclerosis Supplement* 11: 11-16.

Lagrost L, Masson D, Chapman J (2003). « L'athérosclérose Physiologie, diagnostics, thérapeutiques ». Société Française d'Athérosclérose, © Masson, Paris vol1 ch5.

Lairon D (2008). Macronutrient intake and modulation on chylomicron production and clearance. *Atherosclerosis* 9: 45-48.

Larsson A, Erlanson-Albertsson C (1986). Effect of phosphatidylcholine and free fatty acids on the activity of pancreatic lipase-colipase. *Biochim Biophys Acta* 876: 543-550.

Lauritzen L, Hansen HS, Jørgensen MH, Michaelsen KF (2001). The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Progress in Lipid Research* 40: 1-94.

Lengsfeld, H., Beaumier-Gallon, G., Chahinian, H., De Caro, A., Verger, R., Laugier, R. and Carrière, F. (2005) Physiology of Gastrointestinal Lipolysis and Therapeutical Use of Lipases and Digestive Lipase Inhibitors. *Lipases and Phospholipases in Drug Development: From Biochemistry to Molecular Pharmacology*, Weinheim, G. Müller and S. Petry, 10: 195-229

Lepage G, Roy CC (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research* 27:114-120.

Let MB, Jacobsen C, Sorensen AM, Meyer A (2007). Homogenization conditions affect the oxidative stability of fish oil enriched milk emulsions: lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 1773-1780.

Lethuaut L, Metro F, Genot C (2002). Effect of droplet size on lipid oxidation rates of oil-in-water emulsions stabilized by protein. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79: 425-430.

Levin MS, Talkad VD, Godon JI, Stenson WF (1992). Trafficking of exogenous fatty acids within Caco-2 cells. *Journal of Lipid Research* 33: 9-19.

Levy E, Mehran M, Seidman E (1995) Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9: 626-635.

Levy E, Yotov W, Seidman EG, Garofalo C, Delvin E, Ménard D (1999). Caco-2 cells and human fetal colon: a comparative analysis of their lipid transport. *Biochimica et Biophysica Acta* 1439: 353-362.

Lichtenberg D, Zilberman Y, Greenzaid P, Zamir S. (1979) Structural and kinetic studies on the solubilization of lecithin by sodium deoxycholate. *Biochemistry* 18: 3517-3525.

Lien EL (1994). The role of fatty acid composition and positional distribution in fat absorption in infants. *Journal of Pediatry* 125: 62-68.

Lien EL, Boyle FG, Yuhas R, Tomarelli RM, Quinlan P (1997). The effect of triglyceride positional distribution on fatty acid absorption in rats. *Journal Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 25: 167-174.

Lu S, Gough AW, Bobrowski WF, Stewart BH (1996). Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85: 270-273

Luchoomun M, Hussain MM (1999). Assembly and secretion of chylomicrons by differentiated Caco-2 cells. Nascent triglycerides and preformed phospholipids are preferentially used for lipoprotein assembly. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 19565-19572.

Lukiw WJ, Bazan NG (2008). Docosahexaenoic acid and the aging brain. *Journal of Nutrition* 138: 2510-2514.

Lutz O, Meraihi Z, Mura JL, Frey A, Riess GH, Bach AC (1989). Fat emulsion particle size: influence on the clearance rate and the tissue lipolytic activity. *The American Journal of Clinical Nutrition* 50: 1370-1381.

Mancuso JR, Mc Clements DJ, Decker EA (1999). The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 4112-4116.

Marciani L, Wickham M, Singh G, Bush D, Pick B, Cox E, Fillery-Travis A, Faulks R, Marsden C, Gowland P.A, Spiller R.C (2007). Enhancement of intragastric acid stability of a fat emulsion meal delays gastric emptying and increases cholecystokinin release and gallbladder contraction. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 292: 1607-1613.

Martin A. Apports nutritionnels conseillés pour la population française, 3rd ed. Édité par Tec & Doc. Lavoisier, 2001.

Mattson FH, Volpenhein RA (1964). The digestion and absorption of triglycerides. *Journal of Biological Chemistry* 239: 2772-2777.

Mattson FH, Nolen GA, Webb MR (1979). The absorbability by rats of various triglycerides of stearic and oleic acid and the effect of dietary calcium and magnesium. *Journal of Nutrition* 109: 1682-1687.

Mazza M, Pomponi M, Janiri L, Bria P, Mazza S (2007). Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: an overview. *Progress in Neuropsychopharmacology and Psychiatry* 30: 12-26.

McClements DJ, Li Y (2010). Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science* 159: 213-228.

Michalski MC, Soares AF, Lopez C, Leconte N, Briard V, Geloen A (2006). The supramolecular structure of milk fat influences plasma triacylglycerols and fatty acid profile in the rat. *European Journal of Nutrition* 45: 215-224.

Moreau H., Laugier R., Gargouri Y., Ferrato F., Verger R. (1988a) Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin. *Gastroenterology* 95 :1221-1226.

- Moreau H, Gargouri Y, Lecat D, Junien JL, Verger R (1988b). Purification, characterization and kinetic properties of the rabbit gastric lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 960: 286-293.
- Morrison WR, Smith LM (1964). Preparation of fatty methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal Lipid Research* 5: 600-608.
- Mosmann T (1983). Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Mu H, Høy CE (2001). Intestinal absorption of specific structured triacylglycerols. *Journal of Lipid Research* 42: 792-798.
- Mun S, Decker EA, McClements DJ (2005). Influence of droplet characteristics on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant-chitosan layers. *Langmuir* 21: 6228-6234.
- Murakami K, Sasaki S, Takahashi Y, Uenishi K, Yamasaki M, Hayabuchi H, Goda T, Oka J, Baba K, Ohki K, Muramatsu K, Sugiyama Y (2008). Total n-3 polyunsaturated fatty acid intake is inversely associated with serum C-reactive protein in young Japanese women. *Nutrition Research*. 28: 309-314.
- Murota J, Storch K (2005). Uptake of micellar long-chain fatty acid and sn-2-monoacylglycerol into human intestinal Caco-2 cells exhibits characteristics of protein-mediated transport. *Journal of Nutrition* 135: 1626-1630.
- Nair SS, Leitch JW, Falconer J, Garg ML (1997). Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *Journal of Nutrition* 127: 383-393.
- Nakamura MT, Nara TY (2004). Structure, function, and dietary regulation of δ6, δ5, and δ9 desaturases. *Annual Review of Nutrition* 24: 345-376.
- Nelson TL, Stevens JR, Hickey MS (2007). Inflammatory markers are not altered by an eight week dietary alpha-linolenic acid intervention in healthy abdominally obese adult males and females. *Cytokine* 38: 101-106.
- Nishimukai M, Hara H, Aoyama Y (2003). Enteral administration of soybean lecithin enhanced lymphatic absorption of triacylglycerol in rats. *British Journal of Nutrition* 90: 565-51.
- Nishimukai M, Hara H (2007). Soybean Phosphatidylcholine-Induced Enhancement of Lymphatic Absorption of Triglyceride Depends on Chylomicron Formation in Rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 71: 1192–1197.
- Norum KR, Helgerud P, Petersen LB, Groot PH, De Jonge HR (1983). Influence of diets on acyl-CoA:cholesterol acyltransferase and on acyl-CoA:retinol acyltransferase in villous and

crypt cells from rat small intestinal mucosa and in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 751: 153-161.

O'Driscoll CM (2002). Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15: 405-415.

Oomen AG, Rompelberg CJ, Bruil MA, Dobbe CJ, Pereboom DP, Sips AJ (2003). Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 281-287.

Osborn HT, Akoh CC (2002). Structured Lipids—Novel Fats with Medical, Nutraceutical, and Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and in Food Safety* 1: 93-103.

Osborn HT, Akoh CC (2004). Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions. *Food Chemistry* 84: 451–456.

Peretti N, Roy CC, Sassolas A, Deslandres C, Drouin E, Rasquin A, Seidman E, Brochu P, Vohl MC, Labarge S, Bouvier R, Samson-Bouma ME, Charcosset M, Lachaux A, Levy E (2009). Chylomicron retention disease: a long term study of two cohorts. *Molecular Genetics and Metabolism* 97: 136-142.

Petit V, Niot I, Poirier H, Besnard P (2007). Fatty acids intestinal absorption : facts and uncertainties. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 21: 38-45.

Porsgaard T, Straarup EM ,Høy CE (1999). Lymphatic fatty acid absorption profile during 24 hours after administration of triglycerides to rats. *Lipids* 34: 103-107.

Porsgaard T, Xu X, Götsche J and Mu H (2005). Differences in the intramolecular structure of structured oils do not affect pancreatic lipase activity in vitro or the absorption by rats of (n-3) fatty acids. *Journal of Nutrition* 135: 1705-1711.

Porter CJ, Charman SA, Charman WN (1996). Lymphatic transport of halofantrine in the triple-cannulated anesthetized rat model: effect of lipid vehicle dispersion. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85: 351-356.

Raatz SK, Redmon JB, Wimmergren N, Donadio JV, Bibus DM (2009). Enhanced absorption of n-3 fatty acids from emulsified compared with encapsulated fish oil. *Journal of the American Dietetic Association* 109: 1076-1081.

Ramírez M, Amate L, Gil A (2001). Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early human development* 65: 95-1001.

Rao RH, Mansbach CM (1993). Alkaline lipase in rat intestinal mucosa: physiological parameters. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 304: 483-489.

Redgrave TG, Dunne KB (1975). Chylomicron formation and composition in unanaesthetised rabbits. *Atherosclerosis* 22: 389-400.

- Renner F, Samuelson A, Rogers M, Glickman RM. (1986). Effect of saturated and unsaturated lipid on the composition of mesenteric triglyceride-rich lipoproteins in the rat. *Journal of Lipid Research* 27: 72-81.
- Reymond JP, Sucker H (1988). In vitro model for ciclosporin intestinal absorption in lipid vehicles. *Pharmaceutical Research* 5: 673-676.
- Roche HM, Gibney MJ (2000). Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71: 232-237.
- Rodriguez A, Sarda P, Nessmann C, Boulot P, Leger CL, Descomps B (1998). Delta6- and delta5-desaturase activities in the human fetal liver: kinetic aspects. *Journal of Lipid Research* 39: 1825-1832.
- Rogalska E, Ransac S, Verger R (1990). Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 20271-20276.
- Salvini S, Charbonnier M, Defoort C, Alquier C, Lairon D (2002) Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing. *British Journal of Nutrition* 87: 211-217.
- Sandoval A, Fraisl P, Arias-Barrau E, Dirusso CC, Singer D, Sealls W, Black PN (2008). Fatty acid transport and activation and the expression patterns of genes involved in fatty acid trafficking. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 477: 363-371.
- Sandra S, Decker EA, McClements DJ (2008). Effect of interfacial protein cross-linking on the in vitro digestibility of emulsified corn oil by pancreatic lipase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:7488-94.
- Sarda L, Desnuelle P (1958). Actions of pancreatic lipase on esters in emulsions. *Biochimica et Biophysica Acta* 30: 513-521.
- Scanu A (1966). Serum high-density lipoprotein : effect of change in structure on activity of chicken adipose tissue lipase. *Science* 153: 640-641.
- Senior JR (1964). Intestinal absorption of fats. *Journal of Lipid Research* 5: 495-521.
- Selk L, Porter CJ, Charman WN (2001). Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their in vitro digestion products, by HPTLC coupled with in situ densitometric analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 25:651-61.
- Shi Y, Burn P (2004). Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nature Reviews Drug Discovery* 3: 695-710.

- Shiau YF, Fernandez P, Jackson MJ, McMonagle S (1985a). Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *American Journal of Physiology* 248: 608-617.
- Shiau YF, Popper DA, Reed M, Umstetter C, Capuzzi D, Levine GM (1985b). Intestinal triglycerides are derived from both endogenous and exogenous sources. *American Journal of Physiology* 248: 164-169.
- Simopoulos AP, Salem N (1989). n-3 Fatty acids in eggs from range-fed Greek chickens. *The New English Journal of Medicine* 321: 1412.
- Simopoulos AP (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition* 54: 438-463.
- Small DM (1991). The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annual Review of Nutrition* 11: 413-434.
- Spalinger JH, Seidman EG, Lepage G, Ménard D, Gavino V, Levy E (1998). Uptake and metabolism of structured triglyceride by Caco-2 cells: reversal of essential fatty acid deficiency. *American Journal of Physiology* 275: 652-659.
- Sprecher H (2002). The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins* 67: 79-83.
- Straarup EM, Høy CE (2001). Lymphatic transport of fat in rats with normal- and malabsorption following intake of fats made from fish oil and decanoic acid. Effects of triacylglycerol structure. *Nutrition Research* 21: 1001-1013.
- Sultan F, Lagrange D and Griglio S (1995). Métabolisme intravasculaire des chylomicrons et des remnants de chylomicrons. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 9: 43-51.
- Sun C, Gunasekaran S (2007). Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum. *Food Hydrocolloids* p.165-174.
- Tranchant T, Besson P, Hoinard C, Delarue J, Antoine JM, Couet C, Goré J (1997). Mechanisms and kinetics of alpha-linolenic acid uptake in Caco-2 clone TC7. *Biochimica et Biophysica Acta* 1345: 151-161.
- Tranchant T, Besson P, Hoinard C, Pinault M, Alessandri JM, Delarue J, Couet C, Goré J (1998). Long-term supplementation of culture medium with essential fatty acids alters alpha-linolenic acid uptake in Caco-2 clone TC7. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 76: 621-629.
- Trotter PJ, Storch J (1991). Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation. *The Journal of Lipid Research* 32: 293-304.

Trotter PJ, Storch J (1993). Nutritional control of fatty acid esterification in differentiating Caco-2 intestinal cells is mediated by cellular diacylglycerol concentrations. *Journal of Nutrition* 123: 728-736.

Trotter PJ, Ho SY, Storch J (1996). Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells. *Journal of Lipid Research* 37: 336-346.

Tsuzuki W (2007). Absorption properties of micellar lipid metabolites into Caco2 cells. *Lipids* 42: 613-619.

Uauy R, Valenzuela A (2000). Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutrition* 16: 680-684.

Usami M, Komurasaki T, Hanada A, Kinoshita K, Ohata A (2003) Effect of  $\alpha$ -linolenic acid or docosahexaenoic acid on tight junction permeability in intestinal monolayer cells and their mechanism by protein kinase C activation and/or eicosanoid formation. *Nutrition* 19: 150-156.

Vaïque E, Guy A, Couedelo L, Gosse I, Durand T, Cansell M, Pinet S (2010). Rapid access to structured triacylglycerols acylated with n-3 polyunsaturated fatty acids for nutritional applications. *Tetrahedron* 66: 8872-8879. NNT : 2009BOR13917 ; URL pérenne : <http://www.theses.fr/2009BOR13917>

Van Elswyk ME, Hatch SD, Stella GG, Mayo PK, Kubena KS (1998). Poultry-based alternatives for enhancing the omega 3 fatty acid content of American diets. *World Review of Nutrition and Dietetics* 83: 102-115.

Van Greevenbroek MMJ, van Meer G, Erkelens DW, de Bruin TWA (1996) Effects of saturated, mono-, and polyunsaturated fatty acids on the secretion of apo B containing lipoproteins by Caco-2 cells. *Atherosclerosis* 121: 139-150.

Van Greevenbroek MM & de Bruin TW (1998). Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 141: 9-16.

Vaubourdolle M (2007). Biochimie-Hématologie. Tome 2. Rueil-Mamaison: *Le Moniteur Internat*, p 1116.

Vermunt S, Mensink R, Simonis M, Hornstra G (2000). Effects of dietary  $\alpha$ -linolenic acid on the conversion and oxidation of  $^{13}\text{C}$ - $\alpha$ -linolenic acid. *Lipids* 35: 137-142.

Vignerol PY, Spitch P, Audegond M (1973). Huiles chauffées : étude des modifications chimiques au cours du chauffage. *Revue Française des Corps Gras* 20: 463-469.

Walter E & Kissel T (1994). Transepithelial transport and metabolism of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2): evidence for an active transport component?. *Pharmaceutical Research* 11: 1575-1580.

- Wang CS, Hartsuck J, Mc Conathy WJ (1992). Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1123: 1-17.
- Whyte M, Karmen A, Goodman DS (1963). Fatty acid esterification and chylomicron formation during fat absorption. 2. Phospholipids. *Journal of Lipid Research*: 4:322-9
- Wickham M, Garrood M, Leney J, Wilson PD, Fillery-Travis A (1998). Modification of a phospholipid stabilized emulsion interface by bile salt: effect on pancreatic lipase activity. *Journal of Lipid Research* 39: 623-632.
- Wilton DC (2008). *Phospholipases*, 5ème édition, Eds Vance DE and Vance J E, p 653.
- Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Barden A, Watts GF, Beilin LJ (2003). Effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients. *Atherosclerosis* 166: 85-93.
- Yang LY & Kuksis A (1991). Apparent convergence (at 2-monoacylglycerol level) of phosphatidic acid and 2-monoacylglycerol pathways of synthesis of chylomicron triacylglycerols. *Journal of Lipid Research* 32: 1173-1186.
- Yu H, Cook TJ, Sinko PJ (1997). Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharmaceutical Research* 14: 757-762.
- Zheng C, Khoo C, Furtado J, Ikewaki K, Sacks FM (2008). Dietary monounsaturated fat activates metabolic pathways for triglyceride-rich lipoproteins that involve apolipoproteins E and C-III. *The American Journal of Clinical Nutrition* 88: 272-281.

**Annexe 1 : Synthèse des TAG structurés : Vaique E, Guy A, Couedelo L, Gosse I, Durand T, Cansell M, Pinet S (2010). Rapid access to structured triacylglycerols acylated with n-3 polyunsaturated fatty acids for nutritional applications. *Tetrahedron* 66: 8872-8879**

# Accepted Manuscript

Title: Rapid access to structured triacylglycerols acylated with n-3 polyunsaturated fatty acids for nutritional applications

Authors: Emilie Vaique, Alexandre Guy, Leslie Couedelo, Isabelle Gosse, Thierry Durand, Maud Cansell, Sandra Pinet



PII: S0040-4020(10)01420-1

DOI: [10.1016/j.tet.2010.09.070](https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.09.070)

Reference: TET 21032

To appear in: *Tetrahedron*

Received Date: 10 June 2010

Revised Date: 16 September 2010

Accepted Date: 20 September 2010

Please cite this article as: Vaique E, Guy A, Couedelo L, Gosse I, Durand T, Cansell M, Pinet S. Rapid access to structured triacylglycerols acylated with n-3 polyunsaturated fatty acids for nutritional applications, *Tetrahedron* (2010), doi: [10.1016/j.tet.2010.09.070](https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.09.070)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Graphical Abstract**

To create your abstract, type over the instructions in the template box below.  
Fonts or abstract dimensions should not be changed or altered.

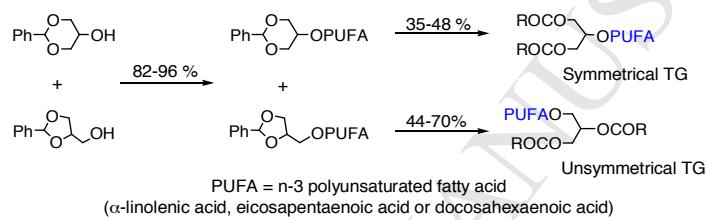
**Rapid access to structured triacylglycerols acylated with n-3 polyunsaturated fatty acids for nutritional applications**

Leave this area blank for abstract info.

Emilie Vaique,<sup>a</sup> Alexandre Guy,<sup>b</sup> Leslie Couedelo,<sup>c</sup> Isabelle Gosse,<sup>a</sup> Thierry Durand,<sup>b</sup> Maud Cansell,<sup>d</sup> Sandra Pinet<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université Bordeaux 1, CNRS, ISM UMR 5255, ENSCBP, 16 avenue Pey Berland, 33607 Pessac Cedex, France. <sup>b</sup> Institut des Biomolécules Max Mousseron, Universités Montpellier I et II, Faculté de Pharmacie, CNRS, IBMM UMR 5247, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 05, France.

<sup>c</sup> ITERG, Département Nutrition Santé; Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France. <sup>d</sup> Université Bordeaux 1, CNRS, TREFLE UMR 8508, ENSCBP, 16 avenue Pey Berland, 33607 Pessac Cedex, France.





## Rapid access to structured triacylglycerols acylated with n-3 polyunsaturated fatty acids for nutritional applications

Emilie Vaique<sup>a</sup>, Alexandre Guy<sup>b</sup>, Leslie Couedelo<sup>c</sup>, Isabelle Gosse<sup>a</sup>, Thierry Durand<sup>b</sup>, Maud Cansell<sup>d</sup>, Sandra Pinet<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université Bordeaux 1, CNRS, ISM UMR 5255, ENSCBP, 16 avenue Pey Berland, 33607 Pessac Cedex, France

<sup>b</sup> Institut des Biomolécules Max Mousseron, Universités Montpellier I et II, Faculté de Pharmacie, CNRS, IBMM UMR 5247, 15 avenue Charles Flahault, BP 14491, 34093 Montpellier Cedex 05, France

<sup>c</sup> ITERG, Département Nutrition Santé; Avenue des Facultés, 33405 Talence Cedex, France

<sup>d</sup> Université Bordeaux 1, CNRS, TREFLE UMR 8508, ENSCBP, 16 avenue Pey Berland, 33607 Pessac Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received

Received in revised form

Accepted

Available online

#### Keywords:

structured triacylglycerols  
n-3 polyunsaturated fatty acids  
esterification  
acyl-migration

### ABSTRACT

In order to better understand the metabolic fate of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), an efficient access to symmetrical and unsymmetrical triacylglycerols (TGs), esterified with PUFAs, with known high purity, is required. In this context, we optimized the esterification of a mixture of glycerols protected as dioxane and dioxolane with PUFAs. The kinetics of this reaction depends on various factors such as the fatty acid chain length and the stereochemistry of the dioxane. Then, one-pot acetal hydrolysis and esterification of hydroxyl groups led to the desired structured TGs without either double bond isomerization or acyl migration (except when symmetrical TGs are acylated with long-chain saturated fatty acids in external positions). PUFAs location on the glycerol backbone was assayed by NMR, HPLC and pancreatic lipase hydrolysis.

2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

For several years, there has been a growing body of evidence on the implication of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on cardiovascular,<sup>1</sup> inflammatory,<sup>2</sup> neurodegenerative diseases<sup>3</sup> and prevention of some cancers.<sup>4</sup> In particular, the beneficial effects on human health of  $\alpha$ -linolenic acid (18:3 n-3, ALA), eicosapentaenoic acid (20:5 n-3, EPA), and docosahexaenoic acid (22:6 n-3, DHA) have been pointed out. In the diet, these fatty acids are found esterified as triacylglycerols (TGs) that represent the most important source of lipids. *In vivo*, the assimilation of the fatty acids present in TGs depends on complex physicochemical and enzymatic processes.<sup>5</sup> In particular, the digestion process of lipid nutrients implies lipolytic enzymes, *i.e.* gastric and pancreatic lipases. The pancreatic lipase regioselectively hydrolyses the fatty esters of TGs present at the external positions of the glycerol backbone (also called, sn-1 and sn-3 positions). The hydrolysis products formed are two free fatty acids and a 2-monoacylglycerol.<sup>6</sup> Moreover, there is an inherent

resistance of very long-chain PUFAs to pancreatic lipase hydrolysis. In other words, the enzyme activity towards short and medium chain is favored. As a result, the lipase specificity both towards the fatty acid position and the chain length,<sup>7</sup> associated with a preferential intestinal absorption of the 2-monoacylglycerol compared with that of the free fatty acids<sup>8</sup> could account for a favored *in vivo* bioavailability of the fatty acids esterified at the position 2 of the glycerol skeleton. Besides these physiological data, the exact influence of the fatty acid position on the glycerol backbone on its metabolic fate is still under investigation. Some studies used structured TGs in nutritional studies.<sup>8a</sup> However, they always concerned mixtures of lipids that prevented understanding the precise metabolic fate of the fatty acids. In this context, it should be helpful to have highly pure structured TGs acylated with PUFAs either in position 1 (or 3) or in position 2, for nutritional investigations.

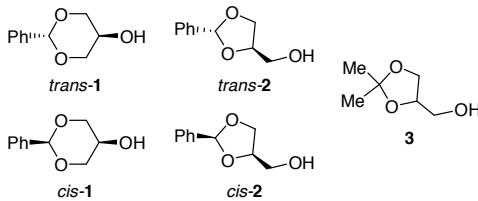
Two main approaches are commonly used to obtain structured TGs; enzymatic<sup>9</sup> and chemical methods.<sup>9a, 10, 11</sup> Most of the time,

\* Corresponding author. Tel.: +33-40-00-65-71; fax: +33-40-00-27-17; e-mail: pinet@enscbp.fr

symmetrical TGs are obtained with by-products resulting of acyl-migration which occurs as soon as the reaction implies mono- or diacylglycerol intermediates. The synthesis of unsymmetrical TGs is less documented and also suffers from acyl-migration.<sup>9b, 11a, 11c</sup> In general such TGs are obtained in low yields, making these procedures not suitable for large-scale syntheses. Moreover, as PUFAs exhibit pronounced susceptibility to autoxidation affecting integrity of the native olefinic system,<sup>12</sup> the number of available procedures for the preparation of TGs acylated with PUFAs is limited.<sup>9a-b, 13</sup> In fact, to the best of our knowledge only Fraser and Haraldsson groups have synthesized symmetrical and unsymmetrical TGs, esterified with EPA or DHA, on large-scale. Symmetrical and unsymmetrical TGs prepared by Fraser et al. were obtained respectively with 2 to 5 and 5 to 10 % acyl-migration by carbon NMR analysis.<sup>9a</sup> Haraldsson only indicated they have not seen acyl migration with unsymmetrical species after crystallization.<sup>9i</sup>

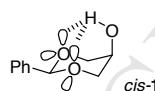
In order to prevent acyl-migration, a synthetic method using glycerol protected as dioxane **1** or dioxolane **3** (Figure 1) has been developed, and applied so far, only to saturated and monounsaturated fatty acids.<sup>10c-d</sup>

It is well-known that acetal **1** can easily be obtained by condensation of glycerol and benzaldehyde. But, whatever the reaction conditions, mixtures of 2-Phenyl-[1,3]dioxan-5-ol **1** and (2-Phenyl-[1,3]dioxolan-4-yl)-methanol **2** are formed after equilibration, in equivalent amounts.<sup>14</sup> Both **1** and **2** also coexist as *cis/trans* isomers (Figure 1).



**Figure 1.** Five- and six-membered rings obtained from condensation of glycerol with benzaldehyde or acetone.

Usually, *trans*-**1** easily isomerizes, in the presence of acid, into the isomer *cis*-**1**, stabilized thanks to hydrogen bonding between the oxygen atoms and the hydroxyl group in the 1,3-diaxial position.<sup>14g-h</sup> *Cis*-**1** can be obtained as the major product after crystallization (Figure 2).<sup>14f-h, 15</sup>

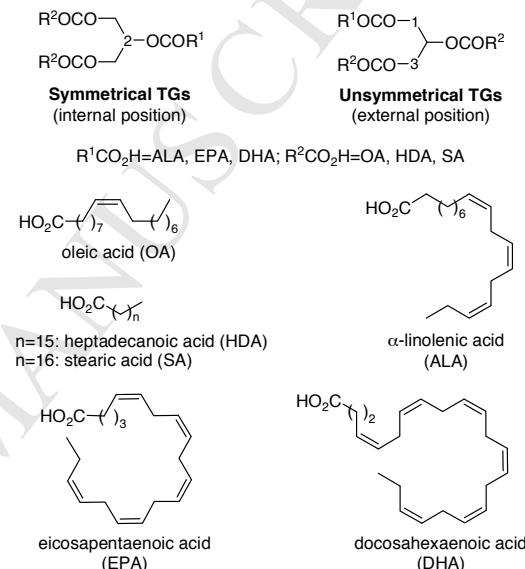


**Figure 2.** Stabilizing hydrogen bonding in *cis*-**1**.

If glycerol is condensed with acetone, only the five-membered ring **3** is formed. Thus, *cis*-**1** is used in classical syntheses of symmetrical TGs, while **3** is employed to get unsymmetrical species. The use of a mixture of **1** and **2** to synthesize, simultaneously the precursors of symmetrical and unsymmetrical structured TGs has never been investigated, although such a strategy would lead to both species, in a limited number of reaction steps compared with the number of steps needed in the case of two independent syntheses.

In this paper, we describe, from a mixture of **1** and **2**, a generic approach for the synthesis of new symmetrical and unsymmetrical TGs containing n-3 PUFAs (ALA, EPA or DHA). The other positions were esterified either with oleic acid (18:1, OA) as a common fatty acid found in natural oils or with

heptadecanoic acid (17:0, HDA), a fatty acid that is not present in endogenous lipids of the lymph and that can be used as an internal standard to quantify the intestinal passage of lipids. The different structured TGs chosen to be synthesized in order to use them for *in vivo* studies in rats are presented in Figure 3. First, we optimized, on gram-scale, the esterification of **1** with either stearic acid (SA, 16:0) or ALA, and compared the reactivity of the saturated fatty acid to that of the PUFA's. Then, we studied the kinetics of the acylation of the dioxane **1** as a function of its stereochemistry. The best conditions in hands, we prepared a **1:2** mixture and proceeded to its acylation with PUFAs. Then, esterified products were transformed into structured TGs in the presence of trifluoroacetic anhydride (TFAA) and OA or HDA.<sup>10d</sup> All products were fully characterized via 1D and/or 2D NMR measurements. TGs' purity was determined by carbon NMR, HPLC and pancreatic lipase hydrolysis.



**Figure 3.** Structured TGs with PUFAs in internal or external position of the glycerol skeleton.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Optimization of the acylation of protected glycerols

Acylation of **1** with fatty acids is usually described in the presence of coupling agent (DCC or EDCI) and DMAP. However, as amounts of catalyst and reagents vary from one reference to another, it was necessary to determine the appropriate conditions of this reaction in the presence of n-3 PUFAs. Thus, we first optimized the esterification of a (1:1) *cis/trans* commercial mixture of **1** with either a saturated fatty acid (stearic acid, SA) or a less stable PUFA ( $\alpha$ -linolenic acid, ALA). In order to compare the reactivity of both fatty acids, reactions were stopped after 48h. Acylated products *cis*-**4** and *trans*-**4** were isolated by silica gel chromatography. Some of the conditions used for the esterification and yields of each compound are given in Table 1. Although DMAP can be used in catalytic amounts with SA, it has to be introduced in slight excess to get higher yields especially with ALA (Table 1, entries 1, 2, 5 and 6). Higher amounts of DMAP permit to enhance the reaction kinetics and to obtain **4b** in better yields (Table 1, entry 6). These results indicate that ALA reacts more slowly than the saturated fatty acid.

**Table 1.** Esterification of an equimolar *cis/trans* mixture of **1**, with either stearic acid (SA) or  $\alpha$ -linolenic acid (ALA)

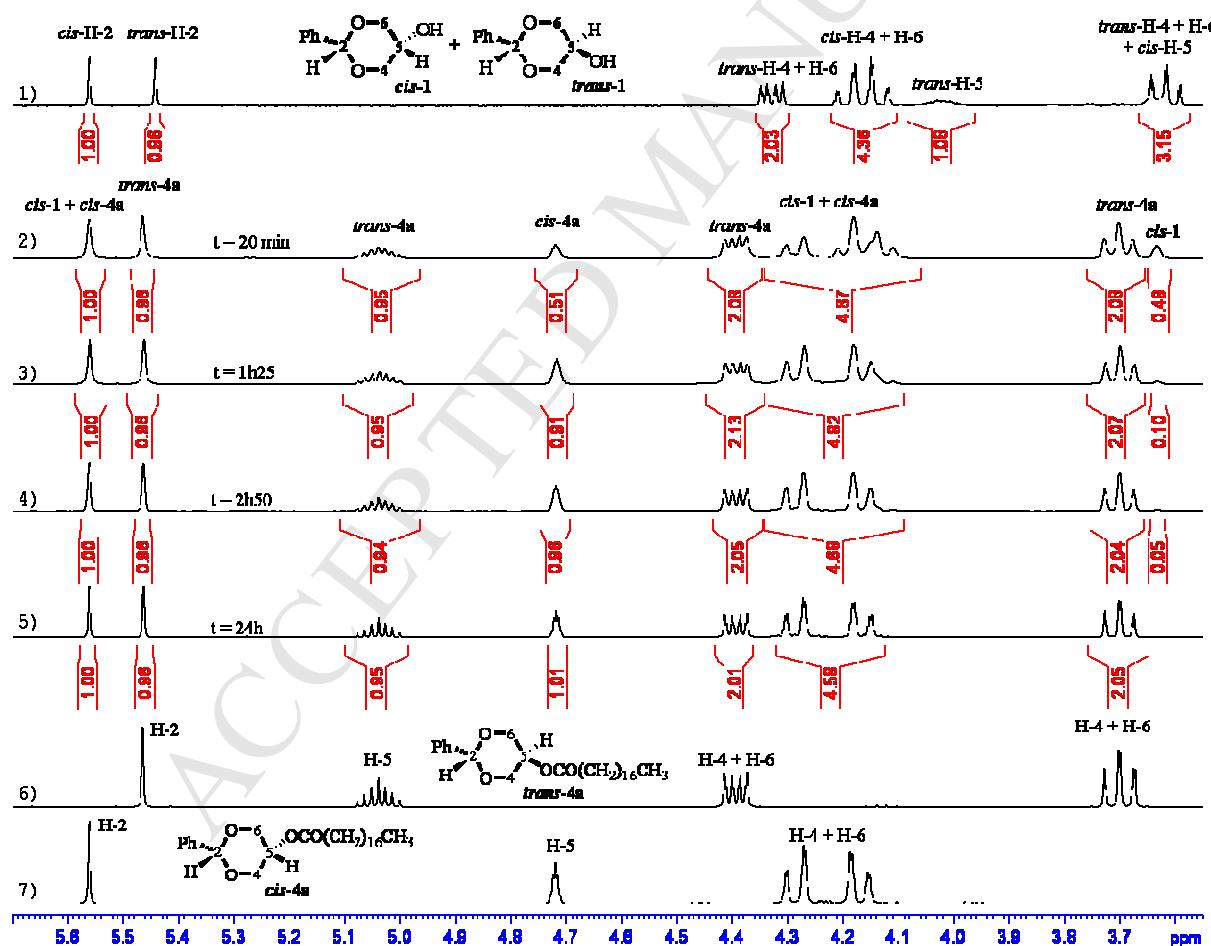
Entry	<b>1</b> (eq)	$R^1CO_2H$ (eq)	DMAP (eq)	cis- and trans-4		Total yield (%) <sup>d</sup>
				<i>cis</i> -4 (%) <sup>a</sup>	<i>trans</i> -4 (%) <sup>a</sup>	
				4a: $R^1=OCO(CH_2)_{16}CH_3$	4b: $R^1=OALA$	
1	1.0	SA (1.2)	0.2	39	23	62 <sup>b,d</sup>
2	1.0	SA (1.2)	1.3	39	46	85 <sup>b</sup>
3	1.2	SA (1)	1.3	23	53	76 <sup>b,d</sup>
4	1.0	SA (1.2)	1.3	37	46	83 <sup>c</sup>
5	1.0	ALA (1.2)	0.2	4	4	8 <sup>b</sup>
6	1.0	ALA (1.2)	1.3	37	41	78 <sup>b</sup>
7	1.0	ALA (1.2)	1.3	39	26	65 <sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> Yield of isolated chemically pure stereoisomer; <sup>b</sup>Coupling agent: DCC; <sup>c</sup>Coupling agent: EDCI; <sup>d</sup> Recovery of *cis*-**1**; SA: stearic acid; ALA:  $\alpha$ -linolenic acid.

Furthermore, a slight excess of fatty acid leads to better yields than an excess of alcohol and avoids the presence of unconsumed

*cis*-**1**, difficult to remove during the purification step (Table 1, entries 2 and 3).

To facilitate the purification, DCC was replaced by EDCI.<sup>9a</sup> With SA, the choice of the coupling agent has no influence on the reaction yield (Table 1, entries 2 and 4) whereas, in our hands, in the presence of ALA, DCC leads to better results (Table 1, entries 6 and 7). This study also shows that ratios of acylated products *cis*-**4** and *trans*-**4** depend on the experimental conditions. Indeed, although the esterification was carried out from a (1:1) mixture of *cis/trans*-**1**, stereoisomers of **4** are not obtained in equivalent amount. Most of the time, *trans*-**4** is obtained as the main product (Table 1, entries 2, 3, 4 and 6) except in the presence of catalytic amount of DMAP or when **1** is esterified with ALA in the presence of EDCI (Table 1, entries 1 and 7). These results suggest that *cis* and *trans* stereoisomers of **1** have not the same reactivity towards the carboxylic acid. To check this hypothesis we followed by <sup>1</sup>H NMR measurements, the acylation of a (1:0.96) *cis/trans* mixture of **1**, with SA and 0.5 equivalent of DMAP (Figure 4). In such conditions, the reaction of *trans*-**1** is complete in 20 min and, according to the integration values, no isomerization of *trans*-**1** into *cis*-**1** occurs. Regarding the *cis* stereoisomer, only half of *cis*-**1** has reacted within 20 min. The esterification of this species is almost complete in 2h50 (96 % conversion) and fully complete after 24h.



**Figure 4.** <sup>1</sup>H NMR spectra, in  $CDCl_3$  at 400 MHz, as a function of time of a *cis/trans* mixture of **1** in the absence and in the presence of stearic acid (1.3 eq), DCC (1.3 eq) and DMAP (0.5 eq) at 25°C. Mixture of *cis/trans*-**1** (1). Reaction after 20 min (2), 1h25 (3), 2h50 (4) and 24h (5). Pure products *trans*-**4a** (6) and *cis*-**4a** (7).

As mentioned previously, *cis*-**1** is stabilized thanks to hydrogen bonds between the hydroxyl group and the oxygen atoms of the ring. Moreover, as detailed below, *trans*-**4** adopts a chair conformation while the *cis* stereoisomer adopts a less stable twist one. Both the hydrogen bonds stabilization in *cis*-**1** and the formation of the less stable *cis*-**4** product may disfavor the formation of *cis*-**4**. Nevertheless, when only 0.2 equivalent of DMAP are used, we observe an inversion of the stereoisomer ratio, in favor of *cis*-**4a**. In such conditions, the esterification is slowed down and partial isomerization of *trans*-**1** into *cis*-**1** becomes possible before the esterification is achieved.<sup>14g-h</sup> As a result, at the end of the reaction, more *cis*-**4a** than *trans*-**4a** is recovered.

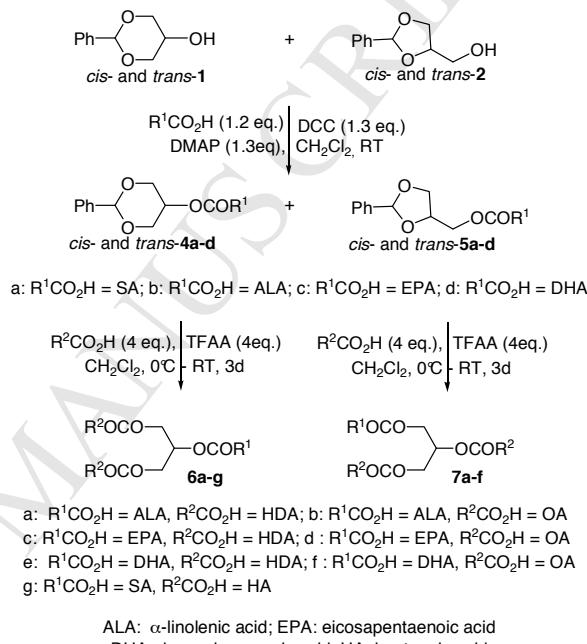
## 2.2. Efficient access to structured TGs esterified with various PUFAs

After having optimized the esterification of **1** with ALA, we prepared, in 80 % yield, a (42:58) **1:2** mixture from glycerol and benzaldehyde,<sup>14a</sup> (Scheme 1). To verify if a difference of reactivity existed between the stereoisomers of dioxolane **2**, the esterification of this **1:2** mixture was studied by <sup>1</sup>H NMR with SA. In contrast with the stereoisomers of **1**, the stereoisomers of **2** have the same reaction kinetics and are esterified as fast as *trans*-**1** (see Supplementary Material).

Then, in the optimized conditions determined previously (DCC (1.3 eq.), DMAP (1.3 eq.) and fatty acid (1.2 eq.)), the **1:2** mixture was successfully esterified with SA and PUFAs of the n-3 series forming **4** and **5**. As mentioned before, reactions were stopped after 48h, in order to compare the reactivity of each PUFA. At this stage, to check if each stereoisomers of **4** and **5** reacted differently or not at the time of the last reaction step, we decided to purify and isolate all these stereoisomers by chromatography on silica gel. Results are summarized in Table 2. Products **4** and **5** were isolated in excellent yields when the acylation was made with the saturated fatty acid or with ALA (Table 2, entries 1 and 2) but the yield decreases with the chain length and the unsaturation degree of the fatty acid (Table 2, entries 1, 2, 3 and 4), as already reported in the literature from 3.<sup>9b</sup> The lowest yield, obtained with DHA, might come from either its higher instability to oxidation or its structure. To answer this question, the reaction time of the acylation in the presence of DHA was increased. After 4 days, the yield reached 96 % (Table 2, entry 5). This result proves that PUFAs are stable enough under these experimental conditions and also indicates that the structure of the PUFA has an influence on the kinetic of the reaction. The more the PUFA is long and unsaturated, the more the reaction is slow, as if the coiled conformation of the PUFA, due to the *cis* configuration of the double bonds, was responsible for steric hindrance during the acylation.

Each stereoisomer of products **4** and **5** has been fully characterized by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. The assignment of *cis* and *trans* stereoisomers as well as the conformations of the six-member rings were deduced from both proton and 2D NOESY NMR experiments (see Supplementary Material). For instance in the case of the dioxane *trans*-**4b** we observed a correlation between the benzylic proton H-2 and the axial protons H-4 and H-6, whereas no correlation was observed between H-2 and the equatorial protons. The configuration of *cis*-**4b** is confirmed by the observed correlation between the proton H-2 and the proton H-5. Likewise for the dioxolane **5b**, a correlation is observed in the *cis* isomer spectrum between protons H-2 and H-4 but not in the *trans* isomer one. Moreover, according to proton NMR

experiment, the ring of *trans*-**4** adopts a chair conformation. This is supported by the coupling constants of hydrogen atoms at C-4 (or C-6) of the ring (*J*<sub>H-4ax,H-5</sub>=10 Hz; *J*<sub>H-4eq,H-5</sub>=5.2 Hz; *J*<sub>gem</sub>=11.2 Hz). In contrast, the chair conformation is excluded in the case of *cis*-**4b** by its proton NMR spectrum. Indeed, this spectrum shows a large gem coupling (*J*<sub>gem</sub>=12.9 Hz) and only small coupling constants (*J*=1.8 and 1.3 Hz) between H-5 and both H-4 (or H-6).<sup>16</sup> According to Karplus law,<sup>17</sup> these coupling constants indicate that the dihedral angles between H-5 and H-4 (or H-6) are around 60-70 degrees and they are in favour of a distorted conformation. As correlations between H-5 and both geminal protons H-4 (and H-6) are observed the NOESY spectrum, this is probably a twist conformation in which phenyl and ester groups adopt pseudo-equatorial positions.



**Scheme 1.** Acylation of the **1:2** mixture with stearic acid or polyunsaturated fatty acids and access to structured TGs

**Table 2.** Acylation, with fatty acids, of the mixture of alcohols **1** and **2**

Entry	R <sup>1</sup> CO <sub>2</sub> H	<i>cis</i> - <b>4</b> (%) <sup>a</sup>	<i>trans</i> - <b>4</b> (%) <sup>a</sup>	<i>cis</i> - <b>5</b> (%) <sup>a</sup>	<i>trans</i> - <b>5</b> (%) <sup>a</sup>	Reaction yield (%)
1	SA	25	14	33	27	99 <sup>b</sup>
2	ALA	30	14	25	27	96 <sup>b</sup>
3	EPA	8	17	35	22	82 <sup>b</sup>
4	DHA	10	6	23	17	56 <sup>b</sup>
5	DHA	21	15	32	28	96 <sup>c</sup>

SA: stearic acid; ALA: α-linolenic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; DHA: docosahexaenoic acid. <sup>a</sup>Yield of isolated chemically pure stereoisomer; <sup>b</sup>Reaction time: 48h; <sup>c</sup>Reaction time: 96h.

Then, we carried out the synthesis of the structured TGs shown in Scheme 1, following the procedure developed in the case of **4** acylated with saturated or monounsaturated fatty acids.<sup>10c-d</sup> In order to assess the influence of the stereochemistry of **4** and **5** on the recovery of symmetrical TGs **6** and unsymmetrical TGs **7**, the synthesis was performed with products **4** and **5** present as a mixture of *cis/trans* isomers or as pure stereoisomers (Scheme 1, Table 3). In the presence of TFAA and

OA (or HDA), TGs **6** and **7** were successfully obtained from **4** and **5**, acylated with PUFAs.

Symmetrical TGs **6** were obtained with moderate to good yields. With SA (Table 3, entry 9) the yield is in agreement with those reported in the literature for saturated species.<sup>10d</sup> With PUFAs, yields are lower probably due to possible fatty acid non linear conformation (Table 3, entries 1 to 8). For ALA, yields are similar whatever the stereochemistry of the starting compound **4b** (Table 3, entries 1 and 2, 3 and 4). Therefore, other symmetrical TGs, with longer fatty acid chains, were synthesized from a *cis/trans* mixture of **4c** or **4d**. Based on these results, it is evident that the isolated yields do not depend on the identity of the PUFA (Table 3, entries 1, 2, 5, 7 and 3, 4, 6, 8).

From **5**, unsymmetrical TGs acylated with PUFAs were synthesized for the first time with very good yields. As for **4**, the stereochemistry of the starting material does not affect the reaction (Table 3, entries 10 and 11).

**Table 3.** TGs recovery from **4** and **5** used as pure stereoisomers or as a mixture of *cis/trans* stereoisomers

Entry	Acetal	TG	R <sup>1</sup> CO <sub>2</sub> H	R <sup>2</sup> CO <sub>2</sub> H	Yields of TG (%)
1	<i>cis</i> - <b>4b</b>	<b>6a</b>	ALA	HDA	48
2	<i>trans</i> - <b>4b</b>	<b>6a</b>	ALA	HDA	46
3	<i>cis</i> - <b>4b</b>	<b>6b</b>	ALA	OA	35
4	<i>trans</i> - <b>4b</b>	<b>6b</b>	ALA	OA	38
5	<b>4c</b> <sup>a</sup>	<b>6c</b>	EPA	HDA	46
6	<b>4c</b> <sup>a</sup>	<b>6d</b>	EPA	OA	44
7	<b>4d</b> <sup>a</sup>	<b>6e</b>	DHA	HDA	46
8	<b>4d</b> <sup>a</sup>	<b>6f</b>	DHA	OA	47
9	<i>trans</i> - <b>4a</b>	<b>6g</b>	SA	HA	71
10	<i>trans</i> - <b>5b</b>	<b>7a</b>	ALA	HDA	63
11	<i>cis</i> - <b>5b</b>	<b>7a</b>	ALA	HDA	60
12	<b>5b</b> <sup>a</sup>	<b>7a</b>	ALA	HDA	68
13	<b>5b</b> <sup>a</sup>	<b>7b</b>	ALA	OA	70
14	<b>5c</b> <sup>a</sup>	<b>7c</b>	EPA	HDA	44
15	<b>5d</b> <sup>a</sup>	<b>7e</b>	DHA	HDA	63
16	<b>5d</b> <sup>a</sup>	<b>7f</b>	DHA	OA	60

<sup>a</sup> *cis/trans* mixture of stereoisomers; SA: stearic acid; ALA:  $\alpha$ -linolenic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; HA: Heptanoic acid; HDA: Heptadecanoic acid; DHA: docosahexaenoic acid; OA: oleic acid.

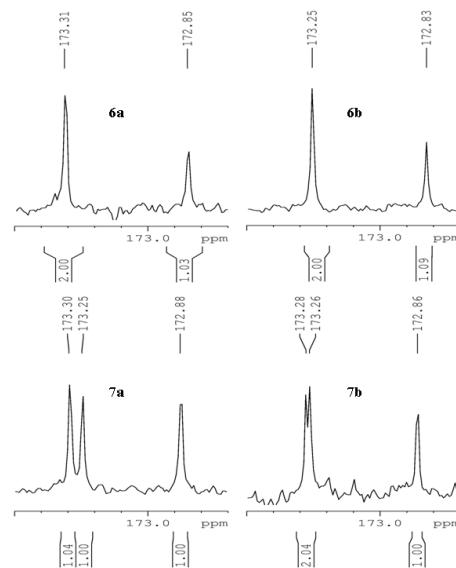
Knowing the reactivity of each stereoisomers of **4** and **5**, we attempted the simultaneous synthesis of symmetrical and unsymmetrical TGs **6** and **7** from a mixture of unpurified **4** and **5**. Although the reaction proceeds smoothly the obtained regioisomers **6** and **7** have too similar polarities to be separated, even on impregnated silver nitrate silica gel.<sup>11a,18</sup>

### 2.3. Acyl migration and enzymatic hydrolysis of structured triacylglycerols

As acyl migration (that depends on many factors including temperature, solvent and presence of traces of acid or base) can be a major problem during the synthesis and purification of TGs, the regiochemical identity of the synthesized species was carefully checked.

According to <sup>13</sup>C NMR measurements, no signal corresponding to acyl migration was detected except in the case

of the symmetrical product **6e** (see Supplementary Material). Indeed, each of the symmetrical TGs contains the expected carbonyl resonances in a ratio 2:1 while the unsymmetrical TGs contain the expected three resonances in a ratio 1:1:1. Carbon NMR spectra of the carbonyl region of structured TGs acylated with ALA, are given as an example in Figure 5.



**Figure 5.** Estimation of the purity of symmetrical and unsymmetrical TGs acylated with ALA (<sup>13</sup>C NMR experiments in CDCl<sub>3</sub>, at 25°C).

Then, symmetrical and unsymmetrical TGs containing ALA were submitted to pancreatic lipase action, a method classically used to quantify the presence of fatty acid esterified at the different positions of the glycerol skeleton.<sup>19</sup> Table 4 presents the ALA distribution determined by the pancreatic lipase method. From symmetrical TGs **6a** and **6b**, 93.6 and 91.8% of ALA was recovered respectively in internal position, *i.e.* as 2-monoglycerides after lipase hydrolysis (Table 4, entries 1 and 2). However, 6.4-8.2% of ALA was measured at the external position since 2-monoglycerides acylated either with OA or HDA were also recovered. From unsymmetrical TGs **7a** and **7b**, 2-monoglycerides were mainly acylated with OA or HDA and only less than 1% of ALA was measured at the internal position (Table 4, entries 3 and 4).

**Table 4.** Amount of fatty acids in internal position, after enzymatic hydrolysis of structured triacylglycerols acylated with ALA

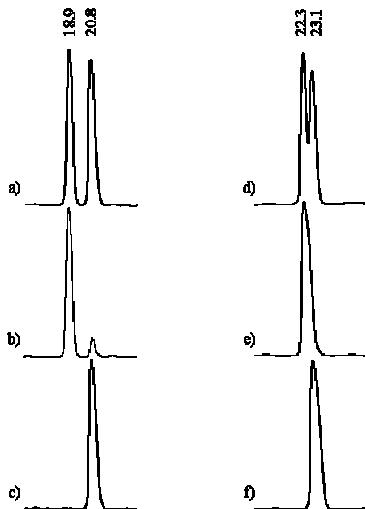
Entry	TG	ALA in internal	OA in internal position (%) <sup>a</sup>	HDA in internal position (%) <sup>a</sup>
1	<b>6a</b>	93.6	-	6.4
2	<b>6b</b>	91.8	8.2	-
3	<b>7a</b>	0.7	-	99.3
4	<b>7b</b>	0.9	99.1	-

<sup>a</sup> determined by gas chromatography

As the detection limit of the NMR experiment is about 5-10%, and as the enzymatic hydrolysis is known to lead to some acyl migration,<sup>20</sup> we also quantified the purity of TGs by Ag-HPLC. In the case of symmetrical TGs, acyl migration products are detected only when glycerol backbone is esterified with HDA. For instance, TG **6a** is obtained with 8.0% of the acyl migration product **7a** (Figure 6b) while **6b**, acylated with OA is obtained in a pure form (Figure 6e). Thus, the 8.2 % of OA in internal

position determined after lipase hydrolysis of **6b**, only comes from the pancreatic analysis method, but not from the synthesis. These results are in agreement with those previously reported by Xu *et al.*<sup>20</sup> In the case of enzymatic TGs synthesis, they showed that long-chain saturated fatty acids were more subject to acyl migration than unsaturated ones.

As shown in the Figures 6c and 6f, it is noteworthy that no acyl migration occurs during the synthesis of unsymmetrical TGs.



**Figure 6.** Ag-HPLC analysis of symmetrical and unsymmetrical TGs acylated with ALA. (a) HPLC Chromatogram of a mixture of **6a** and **7a**. (b) HPLC Chromatogram of **6a** (c) HPLC Chromatogram of **7a**. (d) HPLC Chromatogram of a mixture of **6b** and **7b**. (e) HPLC Chromatogram of **6b** (f) HPLC Chromatogram of **7b**. Column: Chromspher Lipids® Varian, 250x4.6 mm. Mobile phase: 99.25/0.75 Hexane/Acetonitrile. Flow rate: 1 ml/min. UV detection at 206 nm.

### 3. Conclusions

In summary, we have demonstrated that the esterification of a (1:2) mixture was possible with excellent yields, even with long-chain PUFAs. The resulting esters were transformed successfully into structured TGs with high purity according to NMR, HPLC and enzyme hydrolysis experiments. No sign of isomerization of unstable non-conjugated double bonds into conjugated ones has been observed. Besides, acyl migration in symmetrical TGs is observed only when long-chain saturated fatty acids are present at the external positions of the glycerol backbone. No acyl-migration was observed when OA is used or in the case of unsymmetrical TGs. Because of the high purity of these TGs, they are currently being used for *in vivo* studies in rats in order to get specific data concerning PUFAs metabolism.

### 4. Experimental Section

#### 4.1. General

All reactions were carried out under nitrogen atmosphere using dried glassware and syringe/septa techniques. All commercial reagents were purchased from Aldrich and used without further purification. Dichloromethane, ethyl acetate and hexane with spectrophotometric grade were purchased from Scharlau. Dichloromethane was freshly distilled from CaH<sub>2</sub> before use. The mixture of **1** and **2** was prepared according to a procedure described in literature.<sup>14a</sup> <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR

spectra were recorded on a Bruker Ultrashield Avance 400 MHz spectrometer. *J* values are given in Hz. Chemical shifts are reported relative internal tetramethylsilane ( $\delta$  0.00 ppm) or CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  7.26 ppm) for <sup>1</sup>H and CDCl<sub>3</sub> ( $\delta$  77.0 ppm) for <sup>13</sup>C. The following notation is used for the <sup>1</sup>H NMR spectral splitting patterns: singlet (s), doublet (d), triplet (t), multiplet (m), doublet of doublet (dd), triplet of triplet (tt). Infrared spectra were determined on a Nicolet iS10 FT-IR spectrometer. Melting points were measured using a Kofler Heizbank melting point bench (model 7841). High Resolution Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry was carried out on a Fisons Autospec Mass Spectrometer as an ABEQQ Configuration. Elemental analyses were performed at the CNRS Center of Chemical Analysis in Vernaison (France). The intramolecular fatty acid distribution in TGs was determined through lipase-catalysed hydrolysis experiments. The resulting sn-2 monoacylglycerols and free fatty acids were separated by TLC. Respective fractions were transmethylated in the presence of boron trifluoride-methanol. Fatty acid methyl esters of sn-2 monoacylglycerols and of free fatty acids were subjected to gas chromatography (GC) on a BPX 70 capillary column (60-m long, 0.25- $\mu$ m film, 0.25-mm *i.d.*, SGE, hydrogen as carrier gas, split ratio of 1:80). The GC system consisted in a gas chromatograph (Hewlett Packard, HP 4890) provided with a flame ionization detector temperature maintained at 250°C. The injector temperature was at 250°C. The column temperature was programmed from 150°C to 200°C (1.5°C/min) held for 50 min, from 200°C to 250°C (20°C/min), held for 20 min. Data was collected and integrated by a Chromjet SP 4400 integration system (Spectra-Physics). Fatty acids of known composition from Sigma were used as standards for column calibration. Variation in surface area determination between injections was less than 2%. Ag-HPLC analyses were carried out on Perkin Elmer series 200 apparatus with 250x4.6 mm ChromSpher Lipids ® column of Varian.

#### 4.2. General procedure for the synthesis of pure esters **4** and **5**

To a mixture of DCC (745 mg, 3.6 mmol), DMAP (440 mg, 3.6 mmol) and fatty acid (3.35 mmol) in freshly distilled CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) was added, under nitrogen atmosphere, the mixture of **1** and **2** (500 mg, 2.75 mmol). The resulting solution was stirred for 48h or 96h at room temperature. The solvent was evaporated *in vacuo* to give a crude mixture of four stereoisomers, which was purified by silica gel column chromatography (10% AcOEt/Hexane) to give pure *cis* and *trans* stereoisomers of **4** and **5**.

Compounds **4b** and **5b** are given as examples. Synthesis and characterization data of all esters **4** and **5** are described in the Supplementary Material

(*9Z,12Z,15Z*)-octadeca-9,12,15-trienoic acid 2-phenyl-[1,3]dioxan-5-yl ester **4b** and (*9Z,12Z,15Z*)- octadeca-9,12,15-trienoic acid 2-phenyl-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl ester **5b**  
Stereoisomers of **4b** and **5b** were prepared from  $\alpha$ -linolenic acid (932 mg) in 96% yield (1.163 g, 2.64 mmol)

**cis-4b** (363 mg, 30 %) as colourless oil; R<sub>f</sub> (10% AcOEt/Hexane) 0.18;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)/cm<sup>-1</sup> 3095, 3070, 3009, 2960, 2927, 2853, 1732, 1641, 1525, 1453, 1394, 1238, 1144 and 1084;  $\delta$ <sub>H</sub> (400 MHz; CDCl<sub>3</sub>; Me<sub>4</sub>Si) 7.52-7.49 (2H, m), 7.38-7.36 (3H, m), 5.56 (1H, s), 5.38-5.33 (6H, m), 4.72 (1H, tt, *J*=1.8 and 1.3), 4.29 (2H, dd, *J*=12.9 and 1.3), 4.17 (2H, dd, *J*=12.9 and 1.8), 2.82-2.79 (4H, m), 2.43 (2H, t, *J*=7.6), 2.09-2.03 (4H, m), 1.70-1.60 (2H, m), 1.34-1.32 (8H, m) and 0.97 (3H, t, *J*=7.6);  $\delta$ <sub>C</sub> (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>,

$\text{Me}_4\text{Si}$ ) 173.9, 137.9, 132.0, 130.3, 129.1, 128.3, 127.7, 127.2, 126.1, 101.3, 69.2, 65.8, 34.4, 29.6, 29.2, 29.13, 29.10, 27.2, 25.6, 25.5, 24.94, 20.7 and 14.3;  $m/z$  (ESI $^+$ ) 463.5 ([M+Na] $^+$ , 100%); HRMS (ESI $^+$ ) calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Na}$  463.2824 found 463.2803.

**trans-4b** (169 mg, 14%) as colourless oil;  $R_f$  (10% AcOEt/Hexane) 0.45;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)/cm $^{-1}$  3096, 3068, 3010, 2958, 2927, 2854, 1738, 1642, 1523, 1450, 1392, 1235, 1144 and 1083;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz; CDCl $_3$ ; Me $_4\text{Si}$ ) 7.49-7.47 (2H, m), 7.38-7.34 (3H, m), 5.46 (1H, s), 5.41-5.29 (6H, m), 5.03 (1H, tt,  $J$ =10.0 and 5.2), 4.38 (2H, dd,  $J$ =11.2 and 5.2), 3.69 (2H, dd,  $J$ =11.2 and 10.0), 2.82-2.79 (4H, m), 2.30 (2H, t,  $J$ =7.6), 2.09-2.03 (4H, m), 1.70-1.60 (2H, m), 1.34-1.32 (8H m) and 0.97 (3H, t,  $J$ =7.6);  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz, CDCl $_3$ , Me $_4\text{Si}$ ) 172.7, 137.3, 132.0, 130.2, 129.2, 128.4, 128.3, 128.2, 127.8, 127.1, 126.1, 104.4, 68.6, 62.6, 34.1, 29.6, 29.13, 29.08, 29.05, 27.2, 25.6, 25.5, 24.8, 20.6 and 14.3;  $m/z$  (ESI $^+$ ) 463.5 ([M+Na] $^+$ , 100%); HRMS (ESI $^+$ ) calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Na}$  463.2824 found 463.2805.

**cis-5b** (304 mg, 25%) as colourless oil;  $R_f$  (10% AcOEt/Hexane) 0.25;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)/cm $^{-1}$  3108, 3093, 3065, 3009, 2960, 2926, 2850, 1728, 1644, 1470, 1394, 1212, 1094 and 1065;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz; CDCl $_3$ ; Me $_4\text{Si}$ ) 7.64-7.61 (2H, m), 7.39-7.37 (3H, m), 5.82 (1H, s), 5.43-5.28 (6H, m), 4.47-4.43 (1H, m), 4.24-4.22 (2H, m), 4.12 (1H, dd,  $J$ =8.4 and 7.2), 3.95 (1H, dd,  $J$ =8.4 and 5.2), 2.82-2.79 (4H, m), 2.33 (2H, t,  $J$ =7.2), 2.09-2.03 (4H, m), 1.66-1.60 (2H, m), 1.40-1.27 (8H, m) and 0.97 (3H, t,  $J$ =7.6);  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz, CDCl $_3$ , Me $_4\text{Si}$ ) 173.6, 137.0, 132.0, 130.2, 129.5, 128.4, 128.3, 128.2, 127.7, 127.1, 126.7, 104.7, 74.2, 67.5, 64.3, 34.1, 29.6, 29.13, 29.07, 27.2, 25.6, 25.5, 24.9, 20.5 and 14.3;  $m/z$  (ESI $^+$ ) 463.5 ([M+Na] $^+$ , 100%); HRMS (ESI $^+$ ) calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Na}$  463.2824 found 463.2816.

**trans-5b** (327 mg, 27%) as colourless oil;  $R_f$  (10% AcOEt/Hexane) 0.37;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)/cm $^{-1}$  3112, 3091, 3066, 3010, 2958, 2925, 2853, 1735, 1641, 1470, 1393, 1212, 1096 and 1066;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz; CDCl $_3$ ; Me $_4\text{Si}$ ) 7.48-7.46 (2H, m), 7.39-7.36 (3H, m), 5.95 (1H, s), 5.43-5.28 (6H, m), 4.52-4.60 (1H, m), 4.29-4.20 (3H, m), 3.79 (1H, dd,  $J$ =8.4 and 6.6), 2.82-2.79 (4H, m), 2.33 (2H, t,  $J$ =7.2), 2.09-2.03 (4H, m), 1.66-1.60 (2H, m), 1.40-1.27 (8H, m) and 0.97 (3H, t,  $J$ =7.6);  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz, CDCl $_3$ , Me $_4\text{Si}$ ) 173.6, 137.5, 132.0, 130.2, 129.3, 128.4, 128.3, 128.2, 127.7, 127.1, 126.4, 103.9, 73.9, 67.3, 63.9, 34.1, 29.6, 29.2, 29.1, 27.2, 25.6, 25.5, 24.9, 20.5 and 14.3;  $m/z$  (ESI $^+$ ) 463.5 ([M+Na] $^+$ , 100%); HRMS (ESI $^+$ ) calcd for  $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_4\text{Na}$  463.2824 found 463.2820.

#### 4.3. General procedure to access to structured triacylglycerols

To a mixture of **4** or **5** (1 eq) and fatty acid (4 eq) in anhydrous CH $_2\text{Cl}_2$  (3 mL/mmol) at 0°C was added slowly TFAA (4 eq). At the end of the addition, the resulting brown solution was stirred at room temperature for 3 days. The solvent was evaporated *in vacuo* and the crude residue purified by silica gel chromatography (5% AcOEt/Hexane) to give pure triacylglycerol **6** or **7**.

All compounds **6** and **7** were prepared according to this procedure. **6a** and **7a** are given as examples. Details concerning the synthesis and the characterization data of other structured triacylglycerols are given in the Supplementary Material

#### 4.3.1. Octadeca-9,12,15-trienoic acid 2-heptadecanoyloxy-1-heptadecanoyloxymethyl-ethyl ester **6a**

**6a** was prepared from **4b** (306 mg, 0.695 mmol) and heptadecanoic acid (712 mg, 2.78 mmol) in 48% yield (285 mg, 0.33 mmol) as colourless oil; [Found: C, 76.77; H, 11.47. C $_{55}\text{H}_{100}\text{O}_6$  requires C, 77.05; H 11.76%];  $R_f$  (20% AcOEt/Hexane) 0.78;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)/cm $^{-1}$  2921, 2851, 1743, 1466, 1253, 1165, 1098 and 717;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz; CDCl $_3$ ; Me $_4\text{Si}$ ) 5.45-5.26 (7H, m), 4.29 (2H, dd,  $J$ =11.9 and 4.3), 4.14 (2H, dd,  $J$ =11.9 and 5.9), 2.82-2.79 (4H, m), 2.40-2.25 (6H, m), 2.12-2.01 (4H, m), 1.67-1.55 (6H, m), 1.45-1.15 (60H, m), 0.97 (3H, t,  $J$ =7.6) and 0.88 (6H, t,  $J$ =7.2);  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz, CDCl $_3$ , Me $_4\text{Si}$ ) 173.3, 172.8, 131.9, 130.2, 128.3, 128.2, 127.8, 127.1, 68.9, 62.1, 34.2, 34.0, 31.9, 29.71, 29.68, 29.64, 29.62, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 29.1, 29.0, 27.2, 25.6, 25.5, 24.9, 22.7, 20.6, 14.3 and 14.1.

#### 4.3.2. Octadeca-9,12,15-trienoic acid 2,3-bis-heptadecanoyloxy-propyl ester **7a**

**7a** was prepared from **5b** (205 mg, 0.465 mmol) and heptadecanoic acid (477 mg, 1.86 mmol) in 68% yield (272 mg, 0.32 mmol) as colourless oil;  $R_f$  (20% AcOEt/Hexane) 0.78;  $\nu_{\text{max}}$  (KBr)/cm $^{-1}$  2851, 1743, 1466, 1253, 1165, 1098 and 717;  $\delta_{\text{H}}$  (400 MHz; CDCl $_3$ ; Me $_4\text{Si}$ ) 5.44-5.23 (7H m), 4.29 (2H, dd,  $J$ =11.9 and 4.3), 4.14 (2H, dd,  $J$ =11.9 and 6.0), 2.85-2.75 (4H, m), 2.38-2.27 (6H, m), 2.13-2.02 (4H, m), 1.68-1.53 (6H, m), 1.45-1.2 (60H, m), 0.97 (3H, t,  $J$ =7.6) and 0.88 (6H, t,  $J$ =7.2);  $\delta_{\text{C}}$  (100 MHz, CDCl $_3$ , Me $_4\text{Si}$ ) 173.3, 173.2, 172.9, 132.0, 130.2, 128.3, 128.2, 127.8, 127.1, 68.9, 62.1, 34.2, 34.1, 34.0, 31.9, 29.72, 29.68, 29.64, 29.61, 29.52, 29.50, 29.4, 29.31, 29.29, 29.2, 29.14, 29.10, 27.2, 25.6, 25.5, 24.93, 24.89, 24.85, 22.7, 20.6, 14.3 and 14.2;  $m/z$  (ESI $^+$ ) 879: ([M+Na] $^+$ , 100%); HRMS (ESI $^+$ ) calcd for C $_{55}\text{H}_{100}\text{O}_6\text{Na}$  879.7412 found 879.7398.

#### 4.4. Determination of the fatty acid distribution in TGs using lipase hydrolysis

The intramolecular fatty acid distribution in TGs was determined according to a method described with slight modifications.<sup>19</sup> Briefly, lipase-catalyzed hydrolysis experiments were performed in a thermostated bath at 40°C and pH 8. The reaction mixture consisted of 15 mg of TGs, 1 g of porcine pancreatin suspended in 1 mL of tris HCl buffer (1.0 M adjusted to a pH of 8.0), 0.2 mL of aqueous solution of calcium chloride (22%; wt/vol) and 0.5 mL of aqueous solution of sodium deoxycholate (0.1%; wt/vol). The resulting 2-monoacylglycerols and free fatty acids were separated by thin layer chromatography (TLC). TLC was performed with Merck silica gel (60H) spread on 20x20 cm glass plates, 0.35 mm thick, activated at 110°C for 1 h Hexane/diethyl ether/formic acid (70/30/1, vol/vol/vol) was used as developing solvent. Respective fractions were transmethylated in the presence of boron trifluoride-methanol complex.<sup>21</sup> Fatty acid methyl ester (FAME) of 2-monoacylglycerols and free fatty acids were subjected to gas chromatography.

#### Acknowledgments

This work was supported by the French Ministry of Research, the Centre National de Recherche Scientifique and Région Aquitaine. We thank Mr N. Pinaud for his contribution in Noesy experiments.

## Supplementary Material

Optimization of the acylation, kinetics studies of the **1:2** mixture acylation, detailed experimental procedures, characterization of products **4a**, **4c-d**, **5a**, **5c-d**, **6b-f**, **7b-f**.and NMR spectra of all compounds are reported.

## References and notes

1. (a) Schmidt, E.B.; Arnesen, H.; de Caterina, R.; Rasmussen, L. H.; Kristensen, S. D. *Thromb. Res.* **2005**, *115*, 163-170; (b) Calder, P. C. *Nutr. Res.* **2004**, *24*, 761-722; (c) Von Schacky, C. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 224S-227S; (d) Connor, S. L.; Connor, W. E. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, *66*, 1020S-1031S.
2. (a) Belluzzi, A.; Boschi, S.; Brignola, C.; Munarini, A.; Cariani, G.; Miglio, F. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 339S-342S; (b) Ziboh, V. A.; Miller, C. C.; Cho, Y. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 361S-366S.
3. (a) Bourre, J. M. *O.C.L.* **2004**, *4-5*, 362-370; (b) Das, U. *Nutrition* **2003**, *19*, 988-993; (c) Chalon S., *O.C.L.* **2001**, *4*, 317-320.
4. (a) Stehr, S. N.; Heller, R. A. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *373*, 1-8; (b) Saasdatian, M.; Goudable, J.; Riboli, E. *O.C.L.* **2001**, *8*, 111-116; (c) Bougnoux, P. *Curr. Opin. Nutr. Metab. Care* **1999**, *2*, 121-126; (d) Rose, D. *Am. J. Clin. Nutr.* **1997**, *66*, 998S-1003S.
5. Petit, V.; Niot, I.; Poirier, H.; Besnard, P. *Nut. Clin. M&t.* **2007**, *21*, 38-45.
6. Carriere, F.; Rogalska, E.; Cudrey, C.; Ferrato, F.; Laugier, R.; Verger, R. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 429-435.
7. Entressangles, B.; Sari, H.; Desnuelle, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1966**, *125*, 597-600.
8. (a) Christensen, M. S.; Höy, C.-E.; Becker, C. C.; Redgrave, T. G. *Am. J. Clin. Nutr.* **1995**, *61*, 56-61; (b) Renaud, S. C.; Ruf, J. C.; Pettithory, D. J. *Nutr.* **1994**, *125*, 229-237; (c) Mattson, F. H.; Nolen, G. A.; Webb, M. R. *J. Nutr.* **1979**, *109*, 1682-1687.
9. (a) Andrews, P. C.; Fraser, B. H.; Junk, P. C.; Massi, M.; Perlmuter, P.; Thienthong, N.; Wijesundara, C. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 9197-9202; (b) Fraser, B. H.; Perlmuter, P.; Wijesundara, C. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2007**, *84*, 11-21; (c) Villeneuve, P.; Barouh, N.; Baréa, B.; Piombo, G.; Figueroa-Espinoza, M. C.; Turon, F.; Pina, M.; Lago, R. *Food Chem.* **2007**, *100*, 1443-1452; (d) González Moreno, P. A.; Robles Medina, A.; Camacho Rubio, F.; Camacho Páez, B.; Molina Grima, E. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 1044-1052; (e) Halldorsson, A.; Magnusson, C. D.; Haraldsson, G. G. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9101-9109; (f) Halldorsson, A.; Magnusson, C. D.; Haraldsson, G. G. *Tetrahedron. Lett.* **2001**, *42*, 7675-7677; (g) Sellappan, S.; Akoh, C. C. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2071-2076; (h) Kawashima, A.; Shimada, Y.; Yamamoto, M.; Sugihara, A.; Nagao, T.; Komemushi, S.; Tominaga, Y. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2001**, *78*, 611-616; (i) Haraldsson, G. G.; Halldorsson, A.; Kulás, E. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 1139-1145; (j) Haraldsson, G. G.; Höskuldsson, P. A.; Sigurdsson, S. T.; Thorsteinsson, F.; Guðbjarnason, S. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1671-1674.
10. (a) Stamatov, S. D.; Stawinski, J. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 3659-3669; (b) Obika, S.; Yu, W.; Shimoyama, A.; Uneda, T.; Miyashita, K.; Doi, T.; Imanishi, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 245-254; (c) Gras, J-L.; Bonfanti, J-F. *Synt. Commun.* **2000**, *30*, 4213-4219; (d) Gras, J-L.; Bonfanti, J-F. *Synlett* **1999**, *11*, 1835-1837; (e) Lie Ken Jie, M. S. F.; Lam, C. C. *Chem. Phys. Lipids* **1995**, *77*, 155-171; (f) Cockman, S.J.; Joll, C.A.; Mortimer, B-K.; Redgrave, T.G.; Stick, R.V. *Aust. J. Chem.* **1990**, *43*, 2093-2097; (g) Stimmel, B. F.; King, C. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, *56*, 1724-1725.
11. (a) Adlof, R. O.; List, G. R. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **2008**, *85*, 99-104; (b) Fauconnot, L.; Robert, F.; Villard R.; Dionisi, F. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *139*, 125-136; (c) Adlof, R. O.; List, G. R. *J. Agric. Food. Chem.* **2003**, *51*, 2096-2099; (d) Sonnet, P. E. *Chem. Phys. Lipids* **1991**, *58*, 35-39.
- 12 (a) Miyashita, K.; Frankel, E. N.; Neff, W. E.; Awl, R. A. *Lipids* **1990**, *25*, 48-53; (b) Cho, S.-Y.; Miyashita, K.; Miyazawa, T.; Fujimoto, K.; Kaneda, T. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1987**, *64*, 876-879.
13. Stamatov, S. D.; Stawinski, J. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1759-1761.
14. (a) Deutsch, J.; Martin, A.; Lieske, H. *Journal of Catalysis* **2007**, *245*, 428-435; (b) Bartolli, S.; De Nicola, G.; Roelens, S. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8149-8156; (c) Bódai, V.; Novák, L.; Poppe, L. *Synlett* **1999**, *6*, 759-761; (d) Forbes, D. C.; Ene, D. G.; Doyle, M. P. *Synthesis* **1998**, 879-882; (e) Juaristi, E.; Antúnez, S. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 5941-5950; (f) Jochims, J. C.; Kobayashi, Y. *Tetrahedron Lett.* **1974**, *7*, 575-578; (g) Showler, A.J.; Darley, P.A. *Chem. Rev.* **1967**, *67*, 427-440; (h) Baggett, N.; Brimacombe, J. S.; Foster, A. B.; Stacey, M.; Whiffen, D. H. *J. Chem. Soc.* **1960**, 2574-2581.
15. (a) Vázquez-Hernández, M.; Rosquete-Pina, G. A.; Juaristi, E. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 9063-9072.; (b) Aneja, R.; Davies, A. P. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1974**, 141-145.
16. Eliel, E. L.; Hutchins, R. O. *J. Amer. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 2703-2715;
17. Karplus, M. *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11-15.
18. (a) Adlof, R.; List, G. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1046*, 109-113; (b) Adlof, R. O. *J. High Resol. Chromatogr.* **1995**, *18*, 105-107.
19. Mattson, F.H.; Volpenhein, R.A.; *J. Lipid Res.* **1961**, *2*, 58-62.
20. Xu, X.; Skands, A. R. H.; Hoy, C.-E.; Mu, H.; Balchen, S.; Adler-Nissen, J. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **1998**, *75*, 1179-1186.
21. Morisson, W.R.; Smith, L.M. *J. Lipid Res.* **1964**, *5*, 600-608.

**Annexe 2 : Composition en acides gras (moles %) des TAG et structures glycéridiques (moles % par rapport aux trois positions sur le TAG) des triglycérides synthétisés**

Acides gras	TAG		2-MAG	
	18:1	18:3	18:1	18:1
12:0	0.00		0.00	0.00
14:0	0.00		0.00	0.00
14:1(n-5)	0.00		0.00	0.00
15:0	0.00		0.00	0.00
16:0	0.00		0.00	0.00
16:1 trans	0.00		0.00	0.00
16:1(n-9)	0.00		0.00	0.00
16:1(n-7)	0.00		0.00	0.00
17:0	0.00		0.00	0.00
17:1	0.00		0.00	0.00
18:0	0.00		0.00	0.00
18:1trans	0.00		0.00	0.00
18:1(n-9)	66.95		0.00	66.94
18:1(n-7)	0.00		0.00	0.00
18:2 trans	0.00		0.00	0.00
18:2(n-6)	0.00		0.00	0.00
18:3(n-6)	0.00		0.00	0.00
18:3trans	0.00		0.00	0.00
18:3(n-3)	33.05		100.00	33.06
20:0	0.00		0.00	0.00
20:1(n-9)	0.00		0.00	0.00
20:1(n-7)	0.00		0.00	0.00
20:2(n-9)	0.00		0.00	0.00
20:2(n-6)	0.00		0.00	0.00
20:3(n-9)	0.00		0.00	0.00
20:3(n-6)	0.00		0.00	0.00
20:4(n-6)	0.00		0.00	0.00
22:0	0.00		0.00	0.00
22:1(n-9)	0.00		0.00	0.00
20:5(n-3)	0.00		0.00	0.00
22:4(n-6)	0.00		0.00	0.00
24:0	0.00		0.00	0.00
22:5(n-6)	0.00		0.00	0.00
24:1(n-9)	0.00		0.00	0.00
22:5(n-3)	0.00		0.00	0.00
22:6(n-3)	0.00		0.00	0.00
<b>Σ AGS</b>	<b>0.00</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<b>Σ AGMI</b>	<b>66.95</b>		<b>0.00</b>	<b>66.94</b>
<b>Σ AGPI</b>	<b>33.05</b>		<b>100.00</b>	<b>33.06</b>
<b>Σ AGPI (n-6)</b>	<b>0.00</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<b>Σ AGPI (n-3)</b>	<b>33.05</b>		<b>100.00</b>	<b>33.06</b>
<b>Σ AGT</b>	<b>0.00</b>		<b>0.00</b>	<b>0.00</b>

AGS = acides gras saturés ; AGMI = acides gras monoinsaturés cis, AGPI = acides gras polyinsaturés cis ; AGT = acides gras insaturés trans.

**ELSEVIER  
TERMS AND CONDITIONS**  
Sep 29, 2011

**LICENSE**

This is a License Agreement between couedelo leslie ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

Supplier	Elsevier The Kidlington,Oxford,OX5 1GB,UK	Limited Lane
Registered Company Number	1982084	
Customer name	couedelo leslie	
Customer address	avenue des facultés Bat B2 talence, other 33405	
License number	2611820140982	
License date	Feb 18, 2011	
Licensed content publisher	Elsevier	
Licensed content publication	Tetrahedron	
Licensed content title	Rapid access to structured triacylglycerols acylated with n-3 polyunsaturated fatty acids for nutritional applications	
Licensed content author	Emilie Vaique, Alexandre Guy, Leslie Couedelo, Isabelle Gosse, Thierry Durand, Maud Cansell, Sandra Pinet	
Licensed content date	13 November 2010	
Licensed content volume number	66	
Licensed content issue number	46	
Number of pages	8	
Start Page	8872	
End Page	8879	
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation	
Portion	full article	
Format	both print and electronic	
Are you the author of this Elsevier article?	Yes	
Will you be translating?	No	
Order reference number		
Title of your thesis/dissertation	Biodisponibilité de systèmes colloïdaux riches en AGPI, études in vitro et in vivo	
Expected completion date	Feb 2011	
Estimated size (number of pages)	170	
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12	
Permissions price	0.00 EUR	
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP	
Total	0.00 EUR	
Terms and Conditions		

**CAMBRIDGE  
TERMS AND CONDITIONS**

**UNIVERSITY**

**PRESS**

**LICENSE**

Sep 29, 2011

This is a License Agreement between couedelo leslie ("You") and Cambridge University Press ("Cambridge University Press") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Cambridge University Press, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number

License date

Licensed content publisher 2611921265793

Licensed content publication Feb 18, 2011

Licensed content title Cambridge University Press

Licensed content author British Journal of Nutrition

Licensed content date Lymphatic absorption of α-linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion

Volume number

Issue number Jan 1, 0017

Start page 48

End page -1

Type of Use 1

Requestor type 10

Portion Dissertation/Thesis

Author of this Cambridge Author  
University Press article

Author / editor of the new work Full article

Order reference number Yes

Territory for reuse Yes

Title of your thesis /  
dissertation

Expected completion date World

Estimated size(pages) Biodisponibilité de systèmes colloidaux riches en AGPI, études in vitro et in vivo

Billing Type Feb 2011

Billing address 170

Invoice

avenue des facultés Bat B2

1 er étage aile ouest

Customer reference info talence, other 33405

Total France

Terms and Conditions

0.00 EUR