HAL
open science

Etude de la digestion et du confort en bouche de produits fromagers développés pour répondre aux besoins sensoriels et nutritionnels de la population senior.

Lucie Lorieau

To cite this version:

Lucie Lorieau. Etude de la digestion et du confort en bouche de produits fromagers développés pour répondre aux besoins sensoriels et nutritionnels de la population senior.. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2018. Français. NNT : 2018NSARB310 . tel-01976704

HAL Id: tel-01976704

https://theses.hal.science/tel-01976704v1

Submitted on 10 Jan 2019

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

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

UNIVERSITE
BRETAGNE
LOIRE

AGRO
CAMPUS
OUEST

Lucie LORIEAU • 17 mai 2018

Thèse AGROCAMPUS OUEST
sous le label de l'Université Bretagne Loire
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'AGROCAMPUS OUEST
Spécialité Science de l'aliment

ÉCOLE DOCTORALE • Écologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation (EGAAL)

LABORATOIRE D'ACCUEIL • UMR INRA - AO
Science et technologie du lait et de l'œuf (STLO)

Étude de la digestion et du confort en bouche de produits fromagers développés pour répondre aux besoins sensoriels et nutritionnels de la population senior

Yves BOIRIE
Professeur, docteur en médecine, CHU Clermont-Ferrand / *président*

François BLACHIER
Directeur de recherche, PNCA, AgroParisTech / *rapporteur*

Martine HENNEQUIN
Professeure, UFR odontologie, Clermont-Ferrand / *rapporteure*

Beatriz MIRALLES-BURAGLIA
Chargée de recherche, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, Madrid /*examinatrice*

Françoise NAU
Professeure, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA–AO STLO / *examinatrice*

Juliane FLOURY
Maître de conférences, AGROCAMPUS OUEST, UMR INRA–AO STLO / *directrice de thèse*

Didier DUPONT
Directeur de recherche, UMR INRA–AO STLO / *co-directeur de thèse*

Étienne HAZART
Responsable R&D, Lactalis Saint Florent / *membre invité*

N° ordre : 2018-5

N° Série : B-310

THESE / AGROCAMPUS OUEST

Sous le label de l'Université Européenne de Bretagne

pour obtenir le diplôme de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE

Spécialité : Science de l'aliment

Ecole Doctorale : Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation (EGAAL)

présentée par :

Lucie LORIEAU

ETUDE DE LA DIGESTION ET DU CONFORT EN BOUCHE DE PRODUITS FROMAGERS DEVELOPPES POUR REPONDRE AUX BESOINS SENSORIELS ET NUTRITIONNELS DE LA POPULATION SENIOR

soutenue le 17/05/2018 devant la commission d'Examen

Composition du jury :

Yves Boirie *(Professeur, Docteur en médecine, Laboratoire de nutrition humaine, CHU, Clermont-Ferrand, France)*	Président du jury
François Blachier *(Directeur de recherche, PNCA, AgroParisTech, Paris, France)*	Rapporteur
Martine Hennequin *(Professeure, CROC, UFR d'Odontologie, Clermont-Ferrand, France)*	Rapporteur
Beatriz Miralles-Buraglia *(Chargée de recherche, CIAL, CSIC-UAM, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación , Madrid, Espagne)*	Examinateur
Françoise Nau *(Professeure, STLO- Agrocampus Ouest, Rennes, France)*	Référent établissement
Etienne Hazart *(Responsable R&D, Lactalis, Saint Florent, France)*	Membre invité
Juliane Floury *(Maître de conférences, STLO- Agrocampus, Rennes, France)*	Directrice de thèse
Didier Dupont *(Directeur de recherche, STLO- Agrocampus, Rennes, France)*	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Cette thèse est le fruit de trois années de recherche avec des équipes et des personnes formidables. On ne le dit jamais assez, l'équipe avec laquelle on travaille est essentielle pour avancer efficacement et en toute confiance. Donc avant tout, merci à vous tous pour votre contribution à ce travail !

Je pourrais écrire des pages et des pages de remerciements, mais je vais tenter d'être synthétique !

Je tiens tout d'abord à remercier **Gilles Feron**, coordinateur du projet AlimaSSenS. Merci pour la coordination du superbe projet AlimaSSenS ! C'était un réel plaisir de travailler sur ces thématiques de « Food Science » à destination des séniors, d'autant plus que ce projet est un vrai travail de collaboration entre tous les partenaires, qui amènent une richesse difficile à expliquer et quantifier. Je tenais aussi à te remercier pour ton aide lorsque je suis venue travailler au CSGA de Dijon. Ton optimisme et ton expertise étaient toujours les bienvenus.

Je tiens aussi à adresser mes remerciements à **Didier Dupont** co-directeur de ma thèse, directeur adjoint du STLO et responsable de l'équipe Bioactivité et Nutrition. Merci pour tes disponibilités, ton expertise, ta bienveillance, la clarté dans tes explications et idées. Ton aide et ton écoute étaient un vrai support pour avancer. Ton bureau était toujours grand ouvert en cas de problèmes, d'incertitudes et de questions. Ta confiance dans mon travail était un vrai plaisir tout au long de ces trois années ! Merci pour tout !

Un immense merci à **Juliane Floury**, ma directrice de thèse ! Merci à elle pour son encadrement, son écoute et ses conseils au quotidien ! Tu as toujours détecté à temps lorsque j'avais des blocages, des coups de speeds et besoin d'un regard extérieur pour avancer. Un petit mot à côté, tu ne le sais sûrement pas, mais tu m'as certainement permis de me (re)mettre au sport (ça et toute la lecture sur le « bien vieillir »).

Je remercie aussi **Etienne Hazart,** responsable R&D à Lactalis. Grâce à sa présence par téléphone et aux nombreuses réunions, il a su être présent et suivre l'avancée du projet tout au long de ces 3 années. Je ne saurais que te remercier pour tes conseils, ton optimisme et tes retours toujours très pertinents qui nous ont parfois posés beaucoup de questions. Merci de m'avoir permis de visiter plusieurs sites de Lactalis, c'était toujours un vrai plaisir à découvrir !

Un grand merci à **Amandine Ligneul,** ingénieure recherche et diététicienne à Lactalis. Elle a aussi toujours été présente dans le suivi du projet et nous a permis d'apporter un regard «nutrition » qui était parfois un peu délaissé. J'ai aussi pu compter sur toi pour avoir un point de vue extérieur sur nos résultats et prendre plus facilement du recul pour finalement extraire les messages principaux. Merci pour ta disponibilité, ta ponctualité et la rapidité de tes retours toujours très pertinents !

Je voudrais remercier les trois étudiantes-ingénieures qui m'ont aidée dans ce travail. **Linda Le Roux** qui m'a formidablement intégrée à mon arrivée au laboratoire et grâce à qui j'ai pu travailler sur des « petits boudins » durant les trois années suivantes. Après son stage de fin d'études et son CDD sur le projet AlimaSSenS, j'ai eu la chance d'avoir une collègue toujours aussi souriante dans le bureau ! Je remercie

Amira Halabi qui a fait un formidable travail lors de son stage de fin d'études. Souriante, impliquée, à l'écoute, c'était un plaisir de t'encadrer ! Je remercie aussi **Ting Ting Mao**, qui m'a beaucoup aidée pour le travail de paillasse lors de mes derniers mois de thèse. Ton investissement, ta rigueur et ta bonne volonté étaient les bienvenues !

Merci aussi à **Frédéric Gaucheron** qui a été d'une aide indispensable pour son expertise sur la partie calcium. Merci pour ton optimisme, ton entrain, ta bienveillance et ton sourire même quand c'était difficile !

Merci à **Marie-Hélène Famelart** qui a été particulièrement présente et pleine de bons conseils durant les premières années du projet, et qui a su rester disponible durant ces trois années. Ta spontanéité, tes conseils et ton écoute vont me manquer.

Je voudrais remercier **l'équipe de Dijon** avec qui j'ai travaillé pendant 5 mois! Merci tout d'abord à **Hélène Labouré** qui m'a énormément aidée dans la mise en place du protocole, l'explication des méthodes rhéologiques, l'exploitation des résultats et la rédaction des articles, tout ça avec le sourire et de la patience ! Merci aussi à **Chantal Septier** et **Aurélie Laguerre** qui ont été d'un soutien exceptionnel lors des séances d'analyses sensorielles. Sans elles, je n'aurais pas pu faire 1/3 de mon travail à Dijon. Merci aussi à **Mathilde, Carole, Martine, Melissa, Eric, Etienne** qui ont rendu ces quelques mois très agréables.

Je tenais aussi à remercier tous les **participants du projet AlimaSSenS** ! Ils sont restés motivés et présents tout au long du projet, alors que nous les sollicitions facilement plus d'une fois par mois !

Je remercie aussi **les équipes de Lactalis** qui ont suivi le projet lors de réunions annuelles et lors des journées recherche. Je remercie en particulier **Pascale Le Ruyet** et **Christophe Latron** qui ont toujours fait des remarques très pertinentes et qui m'ont aidée à prendre plus de recul sur mes résultats et les messages que l'on pouvait en tirer.

Un immense merci à **l'ensemble du STLO**. Ce laboratoire est à la hauteur de sa réputation. Merci pour le sourire de toutes les personnes du labo, de leur aide au quotidien, les gâteaux à toutes les pauses et à toutes occasions ! Merci pour cette ambiance d'équipe au sein du laboratoire !

J'ai une petite pensée particulière pour **Olivia Menard** merci pour ton dynamisme et ton aide en digestion *in vitro* ; **Amélie Deglaire** pour tes conseils en digestion et sur l'analyse des résultats ; **Gwenaëlle Henry** pour ton aide en digestion statique , les dosages d'acides aminés (qui ne se terminent jamais) et tes explications et retours qui m'ont permis de mieux analyser mes données ; **Yann Le Gouar** pour ton optimiste, ton organisation et ta participation indispensable à l'expérimentation animale ; **Jordane Ossemond** pour les gâteaux, les chocolats, les ricola (mes 4kg supplémentaires depuis que tu as changé de bureau) ; **Rachel Boutrou** pour les Doc STLO et ton aide pour ne pas se sentir dépassé même quand on est en rédaction et que l'on compte en semaine ; **Samira de Oliveira** pour tes conseils et ton sourire et **Jonathan Thévenot** pour ton aide précieuse en statistique ; **Arlette Leduc** pour ton aide pour le dosage du calcium dans mes très nombreux échantillons ; **Manon Hiolle** pour ton sourire, ta spontanéité et ta dernière relecture de ce mémoire.

Je pars aussi avec de très bons souvenirs de tous les repas, toutes les pauses « Paulette », toutes les soirées avec les **Doctorants du STLO** ! On le sait, on a de la chance !

Merci aux **membres du projet AlimaSSenS**. J'ai vraiment apprécié participer à ce beau projet ! Je venais toujours avec plaisir aux réunions plénières.

Merci à **Sophie Blat** et **Isabelle Luron** qui m'ont fait découvrir le travail de recherche et surtout la thèse, et qui m'ont soutenue pour de me lancer dans cette belle aventure.

Merci aux membres de mon comité de thèse **Isabelle Maître**, **Isabelle Souchon** et **Gaelle Boudry**, et de mon jury de thèse, **Martine Hennequin**, **François Blachier**, **Beatriz Miralles-Buraglia**, **Yves Boirie** et **Françoise Nau** qui ont accepté de prendre du temps pour évaluer ce travail et faire leur retour avec un regard extérieur, essentiel en science.

Un merci aussi à **ma famille**, qui m'a toujours soutenue dans mes choix même quand ils n'étaient pas évidents. Grâce à leur confiance, aujourd'hui je peux dire que j'ai pu réussir à faire ce que j'avais envie. Ce n'est pas toujours facile mais en se donnant les moyens, on finit toujours par y arriver !

Merci à **Pierre** qui m'a soutenue dans mon choix de partir de la maison pour 3 ans encore ! Merci d'être resté patient et d'avoir supporté ma mauvaise humeur (systématique ?) lorsque je faisais ma valise le dimanche soir !

Une belle aventure se termine, et bien d'autres qui s'ouvrent à moi ! Il n'y a plus qu'à choisir et se lancer !

MERCI A TOUS, sans vous tout ça n'aurait pas été possible !

« Il n'est rien dont ne puissent triompher la persévérance, l'attention et les soins soutenus »

Sénèque

PREFACE : ALIMASSENS

Le projet AlimaSSenS (vers une **Alim**entation **A**daptée et **S**aine à destination des **Sen**ior**S**) a pour objectif de fournir une offre alimentaire spécialement adaptée aux personnes âgées (+ 65 ans) vivant à domicile, en tenant compte de leur santé buccodentaire. Ce projet est financé par l'Agence Nationale de Recherche pour une durée de 5 ans (2014-2018). Ses objectifs principaux sont de :

- comprendre l'impact des changements de l'état buccodentaire, survenant avec l'âge, sur les processus de formation du bol alimentaire et leurs conséquences sur le plaisir à manger
- développer des produits alimentaires adaptés en termes de plaisir et de facilité à manger, et optimisés en termes de composition et de biodisponibilité des nutriments
- examiner l'intérêt des séniors autonomes pour ce type d'aliment en fonction de leur environnement socio-culturel et de la stratégie marketing utilisée lors de la mise en vente

Dans le cadre de ce projet, trois gammes de produits sont étudiées. Chacune de ces gammes a des objectifs plus spécifiques :

- Le développement des produits carnés est axé sur la facilité à fragmenter le produit lors de la formation du bol alimentaire. De plus, afin d'améliorer le plaisir sensoriel à la dégustation, l'ajout d'arômes dans ces produits est étudié.
- Les produits céréaliers sont formulés pour optimiser leur valeur nutritionnelle et être plus facilement humidifiés et fragmentés lors de la formation du bol alimentaire.
- Les produits laitiers sont élaborés de façon à maximiser les propriétés nutritionnelles tout en maintenant une texture facile à manger.

Très multidisciplinaire, AlimaSSenS associe l'expertise de 15 partenaires publics et privés, dans les domaines de l'odontologie, la physiologie, l'évaluation sensorielle, le comportement du consommateur, la nutrition, l'épidémiologie, la fouille de données, les procédés alimentaires, la sociologie et l'économie.

INTRODUCTION GENERALE

Dans la plupart des pays développés, la proportion de personnes âgées dans la population augmente rapidement. La population mondiale âgée de plus de 60 ans a doublé depuis 1980 et atteindra probablement deux milliards d'ici 2050. En Europe, alors qu'actuellement 17 % de la population a plus de 65 ans et 4,7 % plus de 80 ans, les estimations indiquent qu'en 2060, les plus de 65 ans représenteront près de 30 % de la population et les plus de 80 ans de l'ordre de 12 % (Mak & Caldeira, 2014).

Cependant, malgré l'augmentation de l'espérance de vie globale, l'espérance de vie en bonne santé a tendance à stagner aux environs de 62 ans. L'objectif actuel n'est donc pas d'augmenter l'espérance de vie mais plutôt l'espérance de vie en bonne santé (Mak & Caldeira, 2014). De façon générale, on considère que le « bien vieillir » passe par le maintien de l'autonomie. Chez les personnes âgées, l'autonomie peut être préservée par le maintien d'une activité physique et sociale, et par une adaptation de l'alimentation aux nouveaux besoins de l'organisme. Cette hygiène de vie pourra ainsi permettre le retardement et la prévention du déclin de nombreuses fonctions physiologiques liées au vieillissement (Raynaud et al., 2007).

Deux problèmes de santé peuvent particulièrement affecter l'autonomie des personnes âgées : la sarcopénie et l'ostéoporose. Ces fragilités musculaires et osseuses peuvent rapidement avoir des conséquences dramatiques sur la qualité de vie des personnes âgées. En effet, elles sont particulièrement liées à l'augmentation de la prévalence des chutes où les fractures sont fréquentes. Ces chutes et fractures sont souvent le point de départ de la perte d'autonomie chez les personnes âgées (Ferry, 2010). L'apparition des altérations de santé liées à ces pathologies peut être, en partie, limitée par l'adaptation du régime alimentaire (Ferry, 2008).

Cependant, un régime alimentaire adapté ne doit pas seulement répondre aux besoins nutritionnels, il doit aussi permettre le maintien du «plaisir à manger » (Grunert & Wills, 2007) afin de maintenir une prise alimentaire adaptée (Maitre et al., 2014). De plus, avec l'âge, des altérations de la santé buccodentaire (baisse du flux salivaire, édentement, baisse de la force musculaire) peuvent être liées à des difficultés et des douleurs lors de la prise alimentaire (Peyron, Woda, Bourdiol, & Hennequin, 2017). Ainsi, il est essentiel de développer des aliments pour les personnes âgées, qui répondent à la fois à leurs besoins nutritionnels mais aussi à leurs préférences sensorielles.

Les produits laitiers sont une véritable solution pour améliorer l'état nutritionnel des personnes âgées et lutter contre la sarcopénie et les fragilités osseuses. En effet, les produits laitiers sont riches en protéines et en calcium, nutriments essentiels pour la synthèse musculaire et la prévention de l'ostéoporose. De plus, il a été démontré que les protéines sériques stimulent plus efficacement la synthèse musculaire que les caséines (études chez le rat (Katsanos, 2006) et chez l'Homme (Katsanos et al., 2008; Pennings et al., 2011)). Cependant, pour l'instant, ces études n'ont été réalisées que sur ces protéines en solution (boissons), alors qu'il a été montré que la biodisponibilité des acides aminés en période postprandiale dépend aussi de la structure de la matrice alimentaire (Barbé et al., 2013; 2014). Les produits laitiers ont aussi l'avantage d'être riches en calcium et de pouvoir en fournir de manière importante à l'organisme.

Enfin, ils ont l'avantage de pouvoir être consommés sous des formes variées (liquide, semi-liquide, sous forme de fromages plus ou moins fermes et gras) et tout au long de la journée.

L'objectif de ce travail était de développer une gamme de produits laitiers répondant aux besoins nutritionnels mais aussi sensoriels des personnes âgées autonomes. L'intérêt était de se situer au stade de prévention de la perte d'autonomie par une alimentation adaptée, et non de proposer de nouveaux produits à destination de personnes âgées déjà fragilisées et dépendantes. Cette thèse fait partie du projet AlimaSSenS présenté dans la préface.

Avant d'exposer la stratégie adoptée dans ce travail de thèse, un état de l'art bibliographique a été dressé dans la première partie de ce manuscrit, rappelant les phénomènes d'altérations de la physiologie digestive survenant avec l'âge, ainsi que le rôle nutritionnel des protéines sériques et du calcium pour les personnes âgées.

Le travail expérimental est ensuite exposé sous forme d'articles ou de projets d'articles en anglais, pour publication dans des revues à comité de lecture. Le premier chapitre s'attachera à présenter les résultats traitant de l'impact de la texture des produits laitiers sur la formation du bol alimentaire et du confort en bouche pour une population de séniors autonomes ayant une santé buccodentaire variable. Le second chapitre traitera de la bioaccessibilité et biodisponibilité des acides aminés en fonction de la source protéique et de la structure des produits. Puis un 3ème et dernier chapitre portera sur l'étude des aspects de bioaccessibilité et biodisponibilité du calcium en fonction de la source calcique et de la structure des produits.

Enfin, une dernière partie de discussion générale et perspectives permettra d'identifier les résultats marquants et les axes de recherche intéressants à poursuivre pour compléter ce travail de recherche.

SOMMAIRE

Remerciements 1
Préface : AlimaSSenS 6
Introduction générale 7
Sommaire 9
I Etude Bibliographique 11
La bioaccessibilité et la biodisponibilité 11
I.1 Physiologie digestive du sénior 11
I.1.1 Digestion orale : la formation du bol 12
I.1.2 Digestion gastrique : l'hydrolyse et la vidange gastrique 14
I.1.3 Digestion intestinale : l'hydrolyse et l'absorption des nutriments par la barrière intestinale 16
I.1.4 Conséquence du vieillissement sur la biodisponibilité des nutriments 17
I.2 Les différents modèles de digestion 19
I.2.1 Les modèles de digestion *in vivo* : études chez l'Homme 19
I.2.2 Les modèles de digestion *in vivo* : modèles animaux 19
I.2.3 Les modèles de digestions *in vitro* et *in silico* 20
I.3 L'intérêt d'un apport en protéines pour la population sénior 21
I.3.1 Intérêts nutritionnels des protéines pour la population sénior 22
I.3.2 Caractéristiques physico-chimiques des protéines laitières majoritaires 24
I.3.3 Formation de gels de protéines sériques 26
I.3.4 Digestion et absorption des protéines laitières 27
I.4 Les supplémentations en calcium 31
I.4.1 Intérêts nutritionnels pour les séniors 31
I.4.2 Régulation du calcium 32
I.4.3 Les enrichissements en calcium 35
II Objectif et stratégie 38
III Résultats 41
III.1 Confort en bouche et formation du bol alimentaire 41
III.1.1 Effet de la texture des produits laitiers sur le confort en bouche 42
III.1.2 Effet de la santé buccodentaire des personnes âgées sur le confort en bouche 58
III.1.3 A retenir 79

III.2 Digestion des protéines sériques et des caséines 81

III.2.1 Impact du type de protéines et des structures de produits laitiers sur l'hydrolyse des protéines au cours d'une digestion *in vitro* 82

III.2.2 Impact du type de protéines (sériques ou caséines) incluses dans des produits laitiers solides sur la biodisponibilité de la leucine 104

III.2.3 A retenir 118

III.3 Digestion du calcium 120

III.3.1 Bioaccessibilité de sources de calcium incluses dans produits laitiers modèles 121

III.3.2 Digestion *in vivo* du calcium : étude de la concentration en calcium dans le plasma de porc suite à l'ingestion de trois produits laitiers ayant des sources calciques différentes 137

III.3.3 A retenir 140

IV Discussion générale et perspectives 142

IV.1 Santé buccodentaire, formation du bol et digestion 144

IV.2 Comparaison des études de digestion *in vitro* statique et *in vivo* 147

IV.3 Compréhension des mécanismes et conséquences physiologiques 152

V Applications : Conception d'aliments spécifiquement adaptés aux séniors 156

VI Références 158

VII Annexes : Liste des communications 184

VII.1 Publications 184

VII.2 Communications orales et posters 185

VIII Résumé 199

I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

LA BIOACCESSIBILITE ET LA BIODISPONIBILITE

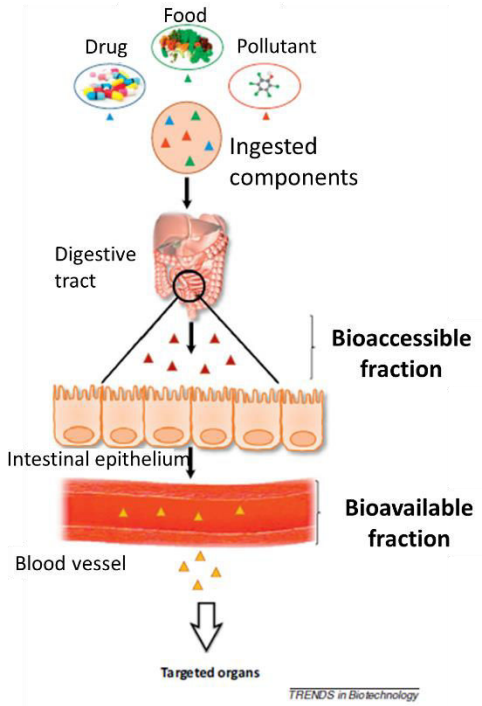


Figure 1 Représentation schématique des fractions de nutriments bioaccessibles et biodisponibles (Guerra et al., 2012)

Avant toute chose, lorsque l'on étudie la digestion il est important de bien définir deux termes essentiels : la bioaccessibilité et la biodisponibilité.

La bioaccessibilité est la fraction du nutriment ingéré libérée par la matrice alimentaire et disponible pour l'absorption intestinale. Généralement la bioaccessibilité est étudiée et mesurée lors de digestion *in vitro*, mais on peut aussi l'étudier à partir de digesta prélevés, chez l'Homme ou sur des animaux, à l'aide de sonde ou de canules au niveau de l'intestin grêle. Cette fraction est représentée par les triangles rouges sur la figure 1 (Guerra et al., 2012).

La biodisponibilité est la fraction du composant ingéré disponible pour une utilisation dans des fonctions physiologiques normales (déterminée par des dosages *in vivo* dans des prélèvements sanguins). Cette fraction est représentée par les triangles jaunes sur la figure 1. Le principal problème consiste à déterminer quelle fraction des nutriments ingérés peut être réellement utilisée par l'organisme pour exercer un effet sur la santé (Guerra et al., 2012).

I.1 PHYSIOLOGIE DIGESTIVE DU SENIOR

La fonction de digestion est essentielle à la vie. Elle a pour objectif de transformer les aliments en nutriments assimilables par l'organisme. Avec l'âge, un ensemble de petits changements affecte cette fonction et freine la digestion des aliments, les amenant à être moins efficacement digérés et augmentant ainsi le risque de malnutrition lors du vieillissement (Rémond et al., 2015).

Dans le cadre d'un vieillissement physiologique et en l'absence de pathologies associées, ces modifications sont lentes et peu pénalisantes. Seulement, l'âge n'est pas le seul facteur. Les pathologies associées au vieillissement, les facteurs sociaux, environnementaux ou encore génétiques jouent un rôle prépondérant dans l'installation et le développement de ces modifications tout au long de la digestion (Rémond et al., 2015).

I.1.1 Digestion orale : la formation du bol

Souvent négligée et pourtant primordiale, la première étape de la digestion intervient dès la mise en bouche de l'aliment. Cette première phase de la digestion a pour objectif de former un bol alimentaire.

L'aliment est alors déstructuré par l'action conjuguée de la mastication et de la salivation. La mastication permet de réduire la taille des aliments en particules, puis la salive permet d'humidifier le bol et de le rendre cohésif. Lorsque le bol alimentaire est suffisamment déstructuré et cohésif, il est alors dégluti (Peyron et al., 2017).

La salive a aussi pour rôle l'initiation de la digestion des polysaccharides grâce à l'action d'enzymes salivaires, en majorité des α-amylases (Rémond et al., 2015).

En outre, au plan sensoriel, la formation du bol est une étape très importante pour le consommateur, car c'est lors de cette étape que la texture, les arômes et le goût des aliments sont perçus (Peyron et al., 2017).

I.1.1.1 La mastication

Le vieillissement physiologique est toujours accompagné par une baisse de la force musculaire (allant de 20 à 40 % pour les personnes de 70 à 80 ans) expliquée par une diminution de la masse musculaire (Doherty, 2003). Ainsi, les muscles intervenant dans la formation du bol sont aussi impactés ; la force de morsure, de contraction des joues ou encore la force exercée par la langue sur le palais diminuent (Ikebe, Nokubi, Morii, Kashiwagi, & Furuya, 2005; Mioche, Bourdiol, & Peyron, 2004; Peyron et al., 2017). Cette baisse de force musculaire se répercute sur l'efficacité masticatoire (Hatch, Shinkai, Sakai, Rugh, & Paunovich, 2001). Cependant, ces modifications n'altèrent pas la qualité du bol alimentaire, car des adaptations comme l'augmentation de 50 % du nombre de cycles de mastication (Woda, Mishellany, & Peyron, 2006) (aussi représentée sur la figure 2 d'après l'étude de Mishellany-Dutour et al. (2008), compensent cette baisse de la force musculaire (Mioche et al., 2004; Woda, Mishellany, et al., 2006).

En outre, une part importante de la population sénior souffre également de problèmes buccodentaires, caractérisés par une forte prévalence de l'édentement partiel ou total. Il existe des différences considérables de prévalence de l'édentement en fonction des pays, des régions, ou encore des populations. Une revue bibliographique, basée sur les résultats de 55 études menées de 1960 à 2001 dans 14 pays, a montré une variation de la prévalence de l'édentement de 3 % à 80 % chez les personnes âgées de plus de 60 ans (Müller, Naharro, & Carlsson, 2007). En France, on estime que la prévalence de l'édentement total est d'en moyenne 30 % pour les plus de 70 ans (Woda, Mishellany, et al., 2006).

Cette part importante de la population est caractérisée par des troubles de la mastication et de la déglutition. Le port de prothèses dentaires est essentiel pour améliorer la santé buccodentaire, mais ne remplace que partiellement une dentition saine. En effet, les personnes équipées de prothèses dentaires ont certes moins de douleur et de difficulté lors de la prise alimentaire (Allen & McMillan, 2002), mais malgré ce traitement, on remarque une multitude d'altérations de la fonction masticatoire. La première altération, la plus marquée, est la chute de qualité des bols alimentaires avec un nombre plus important de grosses particules (comme représenté dans la figure 2) (Mishellany-Dutour, Renaud, Peyron, Rimek, & Woda, 2008; Woda, Mishellany, et al., 2006; Yven, Bonnet, Cormier, Monier, & Mioche, 2006). Cette

altération est liée à une baisse de 50-85 % de l'efficacité masticatoire (Woda, Mishellany, et al., 2006). De plus, les porteurs de prothèses dentaires ne parviennent pas entièrement à s'adapter aux changements de texture des aliments tels que la dureté (Woda, Foster, Mishellany, & Peyron, 2006; Yven et al., 2006). Ainsi, ils ont tendance à augmenter le nombre de cycles et la durée de la séquence de mastication (figure 2) (Mishellany-Dutour et al., 2008; Woda, Foster, et al., 2006). Du fait de ces difficultés, les personnes ayant une santé buccodentaire altérée adoptent spontanément des comportements alimentaires restrictifs, en privilégiant notamment la consommation de produits plus mous et en évitant les aliments riches en fibres (Schwartz, Vandenberghe-Descamps, Sulmont-Rossé, Tournier, & Feron, 2017; Toniazzo, Amorim, Muniz, & Weidlich, 2017).

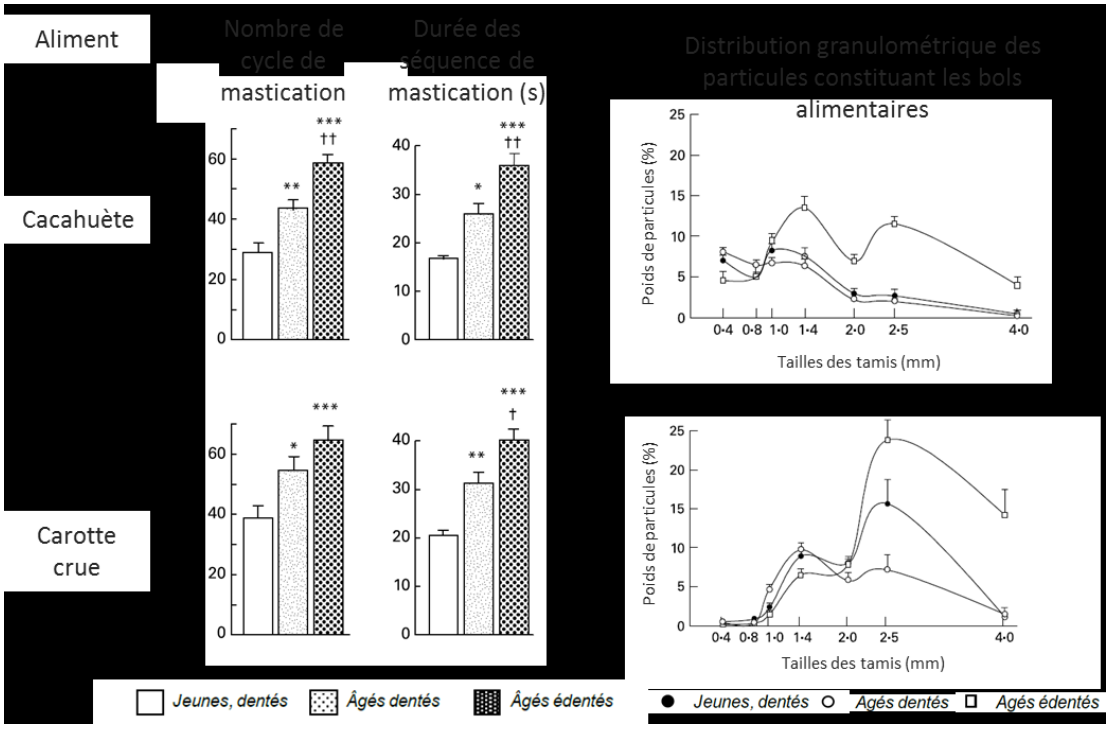


*Figure 2: Valeurs moyennes du nombre de cycles de mastication, de la durée de la séquence de mastication et distributions granulométriques des particules constituant des bols alimentaires de cacahuètes et de carottes crue chez les jeunes dentés, les séniors dentés et les séniors édentés. Les différences de moyenne avec les jeunes sujets dentés sont indiquées par: *p<0,05,**p<0,01, ***p<0,001.*

[т ↕ о ₵ ь ь ф ↑ т ⅡД т ↕ о т ⅠⅨ⇌т ⅡⅡт Ц ↑↓т д ⅓ т ↕ ↕ ↺ TEL т ↑ ЩЄ ф т ↕ Mishellany-Dutour et al.,2007).

I.1.1.2 La Salivation

La deuxième conséquence du vieillissement sur la formation du bol alimentaire est la baisse des sécrétions salivaires.

La salive est produite par trois glandes salivaires majeures (parotide, sous-maxillaire et sublinguale), ainsi que de nombreuses glandes salivaires mineures. La salive peut être classée en deux catégories : la salive stimulée, qui est principalement sécrétée par les glandes parotides, et la salive au repos (aussi appelée

non stimulée), qui est principalement sécrétée par les glandes sous-maxillaire et sublinguale (Chen, 2009; Mosca & Chen, 2017). Malgré une variabilité interindividuelle très élevée, on estime que le flux salivaire au repos est généralement compris entre 0,1 et 0,5 $mL.min^{-1}$ alors que le flux salivaire stimulé est compris entre 1,1 et 3,0 $mL.min^{-1}$ (Mosca & Chen, 2017).

Il est reconnu que ces deux types de flux salivaires diminuent avec l'âge. Par exemple, Moritsuka et al. (2006) ont montré une baisse du flux salivaire pour le groupe d'âge « 30-59 ans » en comparaison avec le groupe d'âge « 20-29 ans ». De la même façon, Vandenberghe-Descamps et al. (2016) ont montré une baisse du flux salivaire stimulé et au repos de 38 % entre un groupe de personnes âgées encore autonomes et un groupe de jeunes adultes.

D'autres études s'intéressant aux différentes glandes salivaires ont montré, qu'à l'exception du flux salivaire des glandes parotidiennes, les flux de toutes les autres glandes salivaires diminuaient avec l'âge (Dodds, Johnson, & Yeh, 2005; Percival, Challacombe, & Marsh, 1994). L'hypothèse est que la baisse du flux salivaire avec l'âge est liée à la baisse de l'activité masticatoire. En effet, l'activité masticatoire active la sécrétion salivaire. Les personnes âgées ayant une activité masticatoire plus faible, elles stimuleraient donc moins les glandes salivaires. Pour soutenir cette hypothèse, des études chez l'Homme ont montré que lorsque des personnes passaient à un régime alimentaire liquide, leurs flux salivaires stimulés et au repos diminuaient (Dodds et al., 2005).

Enfin, il est connu que la population sénior suit généralement un grand nombre de traitements médicamenteux pouvant, pour certains, inhiber les sécrétions salivaires (Dodds et al., 2005).

I.1.1.3 Perception sensorielle

Comme dit précédemment, la formation du bol est une étape essentielle pour le plaisir du consommateur. C'est lors de cette étape que l'on perçoit l'ensemble des caractéristiques sensorielles des aliments.

De nombreuses études ont montré que le vieillissement s'accompagne d'un déclin des capacités chimio-sensorielles, c'est-à-dire de la capacité à percevoir les odeurs ou les saveurs des aliments (Kremer, 2006; Schwartz et al., 2017). Toutefois, cette diminution moyenne cache une grande variabilité interindividuelle. Une étude de Sulmont-Rossé et al. (2015) sur des personnes âgées en bonne santé cognitive a révélé que, malgré un déclin moyen des capacités chimio-sensorielles, 43 % des séniors participants à cette étude avaient conservé des capacités chimio-sensorielles similaires aux jeunes adultes.

I.1.2 Digestion gastrique

cellules principales secrétant le pepsinogène et la lipase gastrique, et enfin les cellules sécrétrices de mucus qui permettent la lubrification et la protection des muqueuses (Bornhorst & Singh, 2014).

L'acide chlorhydrique permet également l'activation du pepsinogène (précurseur inactif) en pepsine, principale enzyme protéolytique des sécrétions gastriques. La pepsine est par ailleurs responsable de moins de 20 % de la digestion des protéines (Mat, Cattenoz, Souchon, Michon, & Le Feunteun, 2018). Son pH optimum est situé entre 2 et 4 (Minekus et al., 2014).

I.1.2.1.1 Le pH gastrique

A jeun, le pH intragastrique se situe entre 1,3 et 2,5. L'ingestion d'un repas conduit à une augmentation du pH dans une gamme allant de 4,5 à 6 mais pouvant aller jusqu'à 7,0 en fonction des repas et des individus. Les études montrent qu'une heure après l'ingestion du repas, le pH est généralement redescendu en dessous de 3 (Dressman et al., 1993; Kong & Singh, 2008b; Savarino et al., 1988; Simonian, Vo, Doma, Fisher, & Parkman, 2005).

Le pH intra gastrique est soumis à de grandes variabilités. Celles-ci s'expliquent d'abord par des variabilités interindividuelles. L'étude de Dressman et al. (1993) a par exemple mis en évidence que le pH à jeun était compris entre 1,1 et 2,0 en fonction des sujets, et que le pic du pH intra gastrique après un repas se situait entre 5,8 et 7,0. Cette étude décrit aussi les différences interindividuelles élevées des cinétiques de retour au pH basal en période postprandiale. De plus, la composition, la quantité, le pH initial, ainsi que le pouvoir tampon du repas sont des facteurs de variation importants sur les cinétiques de pH gastrique en période postprandiale. L'étude de Simonian et al. (2005) a, par exemple, mis en évidence ces différences en comparant le pH intra gastrique au cours de la journée après des repas classiques, gras ou épicés. Cette étude montre que le repas riche en graisse a un fort effet tampon sur le pH gastrique comparé au repas épicé et au repas classique.

I.1.2.1.2 La vidange gastrique

Le volume de l'estomac est très flexible, celui-ci peut s'étendre jusqu'à un volume d'environ 4 L après un repas (Kong & Singh, 2008b). Généralement, la libération du contenu gastrique commence quelques minutes après l'ingestion, mais le pic de libération du contenu stomacal se situe à environ 1h30- 2h après l'ingestion du repas (Kong and Singh, 2008b).

Durant son séjour dans l'estomac, le bol alimentaire n'est pas seulement stocké et hydrolysé par des enzymes et l'acidité, il subit également un malaxage et des phénomènes d'érosion grâce aux contractions musculaires. La vitesse de vidange gastrique, contrôlée par le sphincter pylorique, est principalement affectée par le volume du repas, sa pression osmotique, son contenu calorique, sa désintégration dans l'estomac et la viscosité du chyme (Barbé et al., 2014; Bornhorst & Singh, 2014; Rémond et al., 2015). Le sphincter pylorique joue le rôle de tamis en ne libérant que les particules de moins de 1 à 2 mm (Boland, 2016).

Dans la plupart des études, la cinétique de vidange gastrique est caractérisée grâce à deux paramètres (Bornhorst, Ferrua, & Singh, 2015):

- le temps de latence, qui correspond au temps nécessaire avant le démarrage de la vidange gastrique
- le temps de demi-vidange (t50), qui correspond au temps nécessaire pour que 50 % du volume du contenu gastrique ait quitté l'estomac. Le temps de demi-vidange des repas liquides est compris entre 10 et 60 minutes, tandis qu'il est beaucoup plus long pour des repas solides (par exemple de l'ordre de 50 min pour du pain et des pâtes, et 115 min pour du foie de bœuf) (Rémond et al., 2015).

La vidange gastrique joue un rôle clé dans la cinétique d'absorption des nutriments, et donc leur utilisation par l'organisme.

I.1.2.2 Effet du vieillissement sur la digestion gastrique

Les données disponibles dans la littérature concernant l'effet du vieillissement sur le temps de vidange gastrique sont contradictoires. Certaines études n'ont rapporté aucun effet significatif (Gainsborough et al., 1993; Hellmig et al., 2006) alors que d'autres ont relevé une vidange gastrique prolongée chez les personnes âgées (Clarkston et al., 1997; Di Francesco et al., 2006; O'Donovan et al., 2005). En divisant la population en trois groupes (jeunes adultes, séniors non fragiles et séniors fragiles), une étude a pu mettre en évidence que le temps de vidange gastrique était considérablement augmenté chez les personnes âgées fragiles, alors qu'il était inchangé chez les personnes âgées non fragiles (Serra-Prat, Mans, Palomera, & Clavé, 2013). De plus, une étude a montré que des temps de mastication plus importants, ainsi que la réduction de la taille des particules du bol alimentaire, permettaient une vidange plus rapide (Pera et al., 2002). Tous ces résultats semblent indiquer que le temps de vidange gastrique est augmenté seulement pour les sujets âgés fragiles (Rémond et al., 2015).

Concernant l'acidité de l'estomac, les études montrent que la production d'acide est réduite d'environ 30 % chez les personnes âgées. Cependant, ce déclin de la sécrétion d'acide est principalement lié à une prévalence plus élevée de l'infection à *Helicobacter pylori* et de la gastrite atrophique (inflammation de la paroi interne de l'estomac associée à une perte des glandes présentes au niveau de l'épithélium) (Dressman et al., 1993; Feldman, Cryer, McArthur, Huet, & Lee, 1996; Katelaris et al., 1993). De plus, l'utilisation de médicaments tels que les inhibiteurs de la pompe à protons, inhibent eux-aussi la sécrétion d'acide dans l'estomac (Rémond et al., 2015).

En ce qui concerne la pepsine, les sécrétions diminuent de 40 % après 70 ans (Feldman et al., 1996; Rémond et al., 2015).

I.1.3 Digestion intestinale : l

permet de neutraliser l'acide gastrique et d'ainsi remonter le pH du milieu jusqu'à une valeur appropriée pour la poursuite de la digestion enzymatique. Cet intestin reçoit aussi une quantité importante de sécrétions par le foie et le pancréas. Les enzymes pancréatiques permettent la majeure partie de l'hydrolyse des protéines, lipides et polysaccharidiques. Les principales enzymes sont l'amylase, la lipase, la trypsine, la chymotrypsine et la carboxypeptidase. De plus, la bile sécrétée par le foie est déversée au niveau du duodénum par l'intermédiaire de la vésicule biliaire. Elle permet l'émulsification des lipides, ce qui facilite l'accès des lipases à leurs sites d'activité (Guerra et al., 2012). L'iléon et le jéjunum ont pour fonction d'absorber les nutriments bioaccessibles. A cet endroit, la paroi intestinale est constituée de nombreuses villosités, elles-mêmes découpées en microvillosités, qui forment la bordure en brosse et permettent d'augmenter la surface d'absorption des nutriments (Guerra et al., 2012).

Les contractions de type péristaltique subies par le digesta intestinal dans l'intestin grêle permettent à la fois son mélange et son transport jusqu'au gros intestin. Chez le jeune adulte, le temps de transit dans l'intestin grêle varie de 2 à 6 h (Madsen & Graff, 2004). L'effet du vieillissement sur la motilité de l'intestin grêle n'est pas bien connu. Il semble que la motilité chez les personnes âgées soit plus lente, sans pour autant que la vitesse de transit ne soit modifiée lors du vieillissement (Anuras & Sutherland, 1984; Husebye & Engedal, 1992; Madsen & Graff, 2004; Rémond et al., 2015).

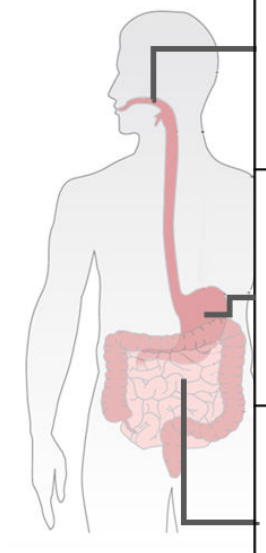
Le vieillissement a cependant un effet très marqué sur les sécrétions pancréatiques. En effet, de nombreuses études sur des modèles animaux et chez l'Homme ont montré une diminution de ces sécrétions avec l'âge (Chantarojanasiri et al., 2015; Jiang et al., 2013; Laugier, Bernard, Berthezene, & Dupuy, 1991; Torigoe et al., 2014).
Les nutriments non absorbés sont transportés jusqu'au gros intestin. Ses fonctions principales sont :

- l'absorption de l'eau et des électrolytes,
- la fermentation des polysaccharides et des protéines par le microbiote,
- la réabsorption des sels biliaires,
- et la formation et l'élimination des fèces.

Quelques études ont mis en évidence une augmentation significative du temps de transit colique chez les sujets plus âgés (Madsen & Graff, 2004). Cependant, ce ralentissement de la vitesse de transit semble principalement dû à des facteurs environnementaux tels qu'une consommation insuffisante de fibres, une inactivité physique, la prise de médicaments ou encore une déficience masticatoire. Tous ces syndromes sont liés à des symptômes de fragilité chez la personne âgée (Rémond et al., 2015).

I.1.4 Conséquence du vieillissement sur la biodisponibilité des nutriments

La figure 3, ci dessous, résume l'objectif de chacune des phase de la digestion et les altérations pouvant survenir lors du vieillisement.



Organe	Processus mécanique	Processus chimique	Altération lors du vieillissement
Cavité orale (bouche)	Mastication et lubrification du bol	Hydrolyse enzymatique : Principalement l'α-amylase (polysaccharides)	↘ de 38 % du flux salivaire ↘ de la force masticatoire ↘ de l'efficacité masticatoire ↗ % de la population édentée
Estomac	Mélange du bol, de l'acide chloridrique et des enzymes Vidange gastrique des particules <2mm	Hydrolyse enzymatique : pepsine (protéines) et lipase (acides gras)	↘ de 40 % des sécrétions enzymatiques ↗ pH intragastrique ↗ du temps de vidange
Intestin	Transport des digestas Absorption des nutriments	Hydrolyse enzymatique par les enzymes pancréatiques et intestinales (polysaccharides, protéines et acides gras) Fermentation par le microbiote	↘ de la motilité gastrique ↘ des secrétions enzymatiques pancréatiques ↗ du temps de transit

C ℄ ℮ ↺↑ т ⇄ { д ℞ ф I Ц ↑ ф д Ц ix℄ ↑ ↺⅓ Ц ↑ ℄ ь о т ⅓ ⌂ IXг ᵀᴱᴸт д ↑ ℄ ь о т д
pouvant survenir lors du vieillissement.(1) Vandenberghe-Descamps et al. (2016), (2) Woda et al. (2006b), (3) Müller et al. (2007), (4) Feldman et al. (1996), (5) Rémond et al. (2015), (6) Chantarojanasiri et al. (2015)

Comme présenté précédemment et résumé dans la figure 3, le vieillissement est accompagné d'un ensemble de modifications tout au long du tractus digestif. Les principales modifications sont la baisse des sécrétions enzymatiques et le ralentissement de la fonction digestive. Ce ralentissement a surtout été observé dans des conditions de vieillissement pathologique, loin d'être négligeable dans cette population agée.

Du fait de ces altérations, la digestion des aliments est ralentie et moins efficace. En effet, comme les sécretions enzymatiques diminuent dans tous les compartiments digestif, l'hydrolyse des nutriments est plus faible que lors de la digestion de l'adulte sain (Pennings et al., 2013; Rémond et al., 2007). Ainsi, pour un repas équivalent, les acides gras, les acides aminés et les glucides assisimilables sont présents en plus petite quantité pour le sénior que pour l'adulte sain. De plus, la vidange gastrique ainsi que la motilité intestinale sont ralenties, induissant un ralentissement de l'absortpion des nutriments. Ces modifications apportent des déséquilibres d'absorption intestinale des nutriments. C'est pourquoi il est essentiel d'adapter le régime ailmentaire des personnes agées aux nouveaux besoins et capacité de leur organisme. (Rémond et al., 2015)

I.2 LES DIFFERENTS MODELES DE DIGESTION

En fonction des phases de la digestion et des objectifs, une multitude de modèle d'études sont envisageables. Alors qu'une majorité des études sur la mastication sont directement menées chez l'Homme, ce modèle se révèle plus difficile à utiliser lorsqu'il s'agit d'étudier la digestion gastro-intestinale. Il convient alors de recourir à des méthodes alternatives. Dans cet objectif, différents modèles ont été développés ; des modèles animaux, *in vitro* et plus récemment des modèles de digestion *in sillico* (modélisation mathématique et simulations).

I.2.1 Les modèles de digestion *in vivo* : é

Tout d'abord, l'estomac du rat comporte deux parties, l'une pour la digestion bactérienne et l'autre pour les sécrétions acides et enzymatiques. De plus, le cæcum du rat est particulièrement développé alors qu'il est quasi inexistant chez l'Homme. Pour terminer, malgré un régime omnivore, le rat fractionne ses repas tout au long de la journée (Deglaire & Moughan, 2012; Guilloteau et al., 2010), à l'inverse des trois prises alimentaires quotidiennes classiquement prises par les Hommes.

Pour l'instant, l'animal de prédilection pour les études nutritionnelles est le porc (Deglaire & Moughan, 2012; Guilloteau et al., 2010; Litten-Brown, Corson, & Clarke, 2010; Patterson et al., 2008; Rowan, Moughan, Wilson, Maher, & Tasman-Jones, 1994). En plus d'avoir une physiologie digestive proche de l'humain (Guilloteau et al., 2010), le porc est un animal omnivore qui peut prendre ses repas en une ou plusieurs prises alimentaires. De plus, il est possible de poser des canules à différents niveaux du tube digestif pour avoir accès aux effluents gastriques ou intestinaux, permettant l'étude de la dégradation de l'aliment au cours du transit (Barbé et al., 2014).

Cependant, comme pour toutes les études animales, il est nécessaire d'inclure un grand nombre d'animaux afin de limiter les effets de la variabilité interindividuelle sur la compréhension des résultats. Afin de proposer une alternative aux études *in vivo* dans le domaine de la digestion, des modèles de digestion *in vitro* ont été développés.

I.2.3 Les modèles de digestions *in vitro* et *in silico*

Les études sur des modèles de digestions *in vitro* sont de plus en plus utilisées comme alternative aux modèles *in vivo*. Il existe une gamme très large de modèles de digestion. Certains imitent un seul des compartiments du tractus digestif ; comme des « masticateurs » ou « bouches artificielles » (Peyron & Woda, 2016; Poinot, Arvisenet, Grua-Priol, Fillonneau, & Prost, 2009), des estomacs (Bornhorst & Singh, 2014; Dupont, 2016; Wang et al., 2015) ou encore des parties de l'intestin (Jaime-Fonseca, Gouseti, Fryer, Wickham, & Bakalis, 2016), alors que d'autres modèles simulent plusieurs compartiments digestifs, comme les digesteurs gastro-intestinaux (Barroso, Cueva, Peláez, Martínez-Cuesta, & Requena, 2015; Ménard, Picque, & Dupont, 2015; Minekus, 2015; Wiele, Abbeele, Ossieur, Possemiers, & Marzorati, 2015). Ces modèles de digestion peuvent être statiques ou dynamiques, mais ils résultent toujours d'un compromis entre la complexité technologique et la signification biologique.

Au niveau des modèles de digestion statique, un consensus international a récemment été trouvé au sein de l'Action COST Infogest donnant lieu à la publication d'un protocole harmonisé et internationalement utilisé (Minekus et al., 2014). Ce modèle à l'avantage de pouvoir cribler un grand nombre d'aliments de façon assez rapide, économique, sans équipement spécifique, avec une bonne répétabilité et reproductibilité. Cependant, ce modèle est souvent critiqué car il est très simplifié et ne prend pas en compte les aspects dynamiques du processus digestif. Ce modèle se révèle particulièrement utile et pertinent lorsque l'on s'intéresse à des aliments simples ou des composants purifiés. Il peut aussi être utilisé afin de présélectionner des aliments pour, dans un second temps, les étudier dans des conditions de digestion dynamique ou *in vivo* (Bohn et al., 2017; Guerra et al., 2012; Minekus et al., 2014).

Afin de mieux prendre en compte les phénomènes dynamiques de la digestion, il est possible d'utiliser des modèles de digestion *in vitro* dynamiques. Ces modèles sont plus complexes et nécessitent des équipements spécifiques. A l'aide d'un paramétrage précis, fixé en fonction de l'aliment étudié et de la population d'intérêt (enfant, adulte, sénior ou animal), il se révèle particulièrement adapté pour mimer des phénomènes de digestions.

Cependant, afin d'être bien paramétrés, ces modèles dynamiques nécessitent de disposer de données de la littérature obtenues chez l'animal, l'Homme ou de réaliser des études préliminaires *in vivo* afin de connaitre les paramètres à renseigner (vitesses de vidange gastrique et intestinale, variations de pH, de température ou encore de sécrétions enzymatiques). Comme tout modèle, ces digestions dynamiques ont des limites. Pour l'instant, la plupart de ces modèles ne permettent pas de mimer l'absorption des nutriments par la barrière intestinale, de prendre en compte les effets du microbiote et n'intègrent pas les effets régulateurs des hormones de la digestion (Bohn et al., 2017).

Grâce à l'accumulation de données, de nouveaux modèles de digestion sont développés à l'aide de modélisations mathématiques. Ces modèles mathématiques, aussi appelés modèles *in silico*, permettent de prédire des phénomènes de dégradation du bol alimentaire durant la mastication, de reconstituer les mouvements du chyme dans l'estomac ou encore d'estimer les volumes stomacaux, les sécrétions enzymatiques, les temps de demi-vidange gastrique, ou encore les cinétiques d'hydrolyse des protéines. Ces modèles *in silico* sont très prometteurs, mais nécessitent des jeux de données complets et adaptés aux questions de recherches posées (Cleary, Sinnott, Hari, Bakalis, & Harrison, 2015; Feunteun et al., 2014).

I.3

I.3.1 Intérêts nutritionnels des protéines pour la population sénior

La masse musculaire squelettique résulte d'un équilibre dynamique entre la synthèse et la dégradation des protéines musculaires. Cet équilibre est perturbé dès l'âge de 50 ans, avec une dégradation des protéines musculaires supérieure à la synthèse. Ainsi, on estime que la masse musculaire squelettique diminue naturellement à un rythme de 0,7 % et 1 % par an, entre 50 et 75 ans. Puis, cette baisse de la masse musculaire s'intensifie à mesure que la sarcopénie s'installe (Mitchell et al., 2016).

Du fait de cette baisse de la masse musculaire, la force musculaire diminue elle aussi. On estime que la force musculaire est diminuée de 20 à 40 % entre les jeunes adultes et les adultes de 70 à 80 ans. Cette diminution s'intensifie avec l'âge et est de plus de 50 % pour les personnes de plus de 90 ans (Doherty, 2003).

Ce déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la masse musculaire peut-être expliqué par différents facteurs. Le tout premier, est la baisse de l'apport calorique et protéique avec l'âge (ANSES, 2017; Mitchell et al., 2016). De plus, pour un apport équivalent en protéines, les cinétiques de biodisponibilité des acides aminés ne sont pas les mêmes pour les jeunes adultes et les personnes âgées (Bauer et al., 2013; Boirie et al., 1997). Plusieurs phénomènes expliquent ces différences de biodisponibilités. Tout d'abord, du fait de l'apparition d'une séquestration splanchnique des acides aminés avec l'âge, ceux-ci sont moins nombreux à atteindre les organes cibles de façon rapide et simultanée chez les personnes âgées. De plus, des études ont montré que pour un même apport protéique, la synthèse musculaire était diminuée chez les sujets âgés par rapport aux jeunes adultes (Arnal et al., 2000; Dardevet et al., 2012; Katsanos, 2006). Ce phénomène est appelé « résistance anabolique au repas » (Aragon & Schoenfeld, 2013; Dardevet et al., 2012). Cette résistance est expliquée par un défaut de réponse de la voie de signalisation mTOR. Pour terminer, l'ensemble de ces phénomènes limitant la synthèse musculaire sont accentués par le fait que les personnes âgées ont une plus faible activité physique, alors que celle-ci permet de sensibiliser le muscle aux apports en acides aminées, afin de stimuler la synthèse musculaire (Bauer et al., 2013; Mitchell et al., 2016). La figure 4, adaptée de la revue de Mitchell et al, (2016), résume l'ensemble des phénomènes pouvant être liés au développent de la sarcopénie avec l'âge.

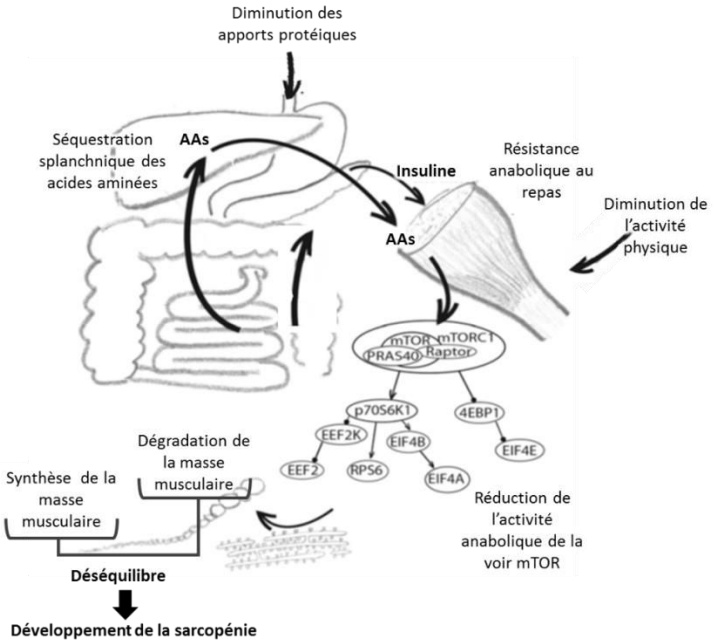


Figure 4 Facteurs pouvant affecter le métabolisme protéique du muscle squelettique et le développement de la sarcopénie chez les personnes âgées. ! ! ↕ ♂ Ц д ₵ о т ↕ Ц I ₵ II ф ↕ ♔ 5 ♘ Ц ix↑ y ↕

De nombreuses études ont mis en évidence l'intérêt d'une activité physique régulière et d'un apport en protéines adapté afin de limiter le développement de la sarcopénie.

L'activité physique est bénéfique pour toutes les personnes âgées. En effet, elle permet de gagner en force musculaire, même lorsque les personnes sont en état de fragilité, et de limiter les phénomènes de résistance anabolique au repas (Breen & Phillips, 2011; Csapo & Alegre, 2016; Watanabe et al., 2015). Les études ont rapporté que les personnes âgées avaient une perception positive de l'exercice physique, même lorsque ces personnes étaient hospitalisées (So & Pierluissi, 2012).

En parallèle de cette première stratégie, il est possible d'améliorer les apports protéiques afin de limiter les phénomènes de sarcopénie. Tout d'abord les apports nutritionnels conseillés en protéines sont de 1 à 1,2 g/kg corporel/jour pour les personnes de plus de 65 ans, alors qu'ils ne sont que de 0,8 g/kg/j pour les jeunes adultes sains (ANSES, 2016; Bauer et al., 2013). Cette augmentation de l'apport nutritionnel conseillé avec l'âge est justifiée par le rôle important des acides aminés essentiels sur la synthèse musculaire, en particulier la leucine. En effet, la leucine est à la fois un substrat et un stimulateur des facteurs et kinases intracellulaires impliqués dans les voies de signalisation contrôlant la traduction des protéines. Plus précisément, la leucine induit, par une cascade réactionnelle, la synthèse de la protéine kinase mTOR (Anthony, Anthony, Kimball, & Jefferson, 2001; Ham, Caldow, Lynch, & Koopman, 2014). Cependant, comme cet acide aminé n'est pas synthétisé par l'Homme, il doit être apporté par le biais de l'alimentation.

La leucine étant présente en forte concentration dans les protéines sériques, de nombreuses études ont été menées pour connaitre l'effet de ces protéines sur la synthèse musculaire. Ainsi, d'après les études menées chez la personnes âgée, un apport en protéines sériques stimulerait de manière plus efficace la synthèse musculaire qu'un apport similaire en protéines de type caséines (Burd et al., 2012; Devries &

Phillips, 2015; Dideriksen et al., 2011; Katsanos et al., 2008; Martin et al., 2013; Pennings et al., 2011, 2012; Tipton et al., 2006). Cependant, l'effet bénéfique des protéines sériques ne semble pas simplement dû à leur richesse en leucine. En effet, les études montrent que l'ingestion de la leucine seule est moins efficace pour stimuler la synthèse musculaire que l'ingestion de la même quantité en leucine mais apportée par des protéines sériques (Ham et al., 2014). D'autres études comparant les protéines sériques avec des protéines de soja, ont permis de mettre en évidence une synthèse musculaire plus élevée après un apport en protéines sériques (Butteiger et al., 2013; Tang, Moore, Kujbida, Tarnopolsky, & Phillips, 2009). Cependant ces études ont été réalisées sur des apports en protéines sous forme de solutions de poudre solubilisée et non intégrées dans des aliments, comme dans des produits laitiers.

Pour terminer, il existe un effet synergique des protéines et de l'activité physique. En effet, lorsque qu'un apport protéique est distribué dans les trois heures après l'exercice physique, on remarque une augmentation, quasi-systématique et importante, de la synthèse musculaire. Alors que, lorsque ces stratégies sont étudiées indépendamment (juste un effet de l'exercice physique ou d'un apport en protéines), les effets observés sont beaucoup moins marqués (Buhl et al., 2015; Burd et al., 2012; Dideriksen et al., 2011; Guimarães-Ferreira et al., 2014; So & Pierluissi, 2012; Thomas, Quinn, Saunders, & Greig, 2016; Tieland et al., 2012; Tipton et al., 2006; Watanabe et al., 2015).

Ainsi, on remarque que les protéines sériques sont de bonnes candidates pour limiter les phénomènes de sarcopénie. Leur intérêt nutritionnel est lié à leurs caractéristiques physicochimiques mais aussi à leur capacité d'être hydrolysées puis absorbées par l'organisme.

I.3.2 Caractéristiques physico-chimiques des protéines laitières majoritaires

Le lait de vache contient en majorité 2 types de protéines : les caséines pour 80 % et des protéines sériques pour 20 %. Les protéines caséiniques sont non solubles et forment des micelles en suspension. A l'inverse les protéines sériques sont solubles et de petite taille (3 à 6 nm). Le tableau 1 permet de comparer les caractéristiques physico-chimiques des caséines et des protéines sériques.

Tableau 1 Caractéristiques physico-chimiques des principales protéines du lait bovin (Boland et al., 2014)

	Caséines				**Protéines sériques**	
Proportion dans le lait bovin	80 %				20 %	
Température de dénaturation	>100 °C				>70 °C	
Taille	150 à 200 nm (micelles de caséines)				3 à 6 nm	
Composant majoritaire	**cas α_{s1}**	**cas α_{s2}**	**cas β**	**cas κ**	**β-lacto**	**α-lac**
Proportion	40 %	10 %	35 %	15 %	60 %	20 %
Masse moléculaire (kDa)	23	25	24	19	18,3	14,2
Résidus en acides aminés	199	207	209	169	162	123
Point isoélectrique	4,2	4,2	4,6	4,1	5,35	4,8

I.3.2.1 Caséines

La caséine est le principal composant protéique du lait bovin, correspondant environ à 80 % des protéines totales du lait. Il existe quatre principaux types de molécules de caséines, les caséines α_{s1}, α_{s2}, β et κ représentant respectivement 40 %, 10 %, 35 % et 15 % des caséines totales (Dalgleish & Corredig, 2012).

Dans le lait, les caséines sont principalement organisées sous forme de micelles, c'est-à-dire sous forme d'une structure sphérique d'environ 150 à 200 nm de diamètre formée par l'association des différentes caséines et de minéraux tels que le calcium et le phosphate (Dalgleish & Corredig, 2012). Au cours des années, plusieurs modèles de structure des micelles de caséines ont été proposés (de Kruif, Huppertz, Urban, & Petukhov, 2012). Les principaux modèles proposés sont (i) un modèle submicellaire où les micelles correspondent à des assemblages de submicelle (de Kruif et al., 2012), (ii) un modèle avec un ouvert (Holt & Horne, 1996) et (iii) un modèle ouvert de type éponge (Bouchoux, Gésan-Guiziou, Pérez, & Cabane, 2010). Au sein du cœur hydrophobe de la micelle sont retrouvées les caséines α et β, tandis que la périphérie hydrophile est composée des caséines α et κ. Ce sont les ponts de phosphate de calcium colloïdaux qui permettent la cohésion de l'ensemble de la micelle. Les caséines ont la particularité de précipiter à pH acide (pH 4,6) et d'être résistantes au traitement thermique car leur température de dénaturation est supérieure à 100 °C (Dalgleish & Corredig, 2012). Les caractéristiques principales des caséines sont exposées dans le tableau 1.

I.3.2.2 Protéines sériques

Aussi appelées protéines solubles ou protéines du lactosérum, les protéines sériques représentent environ 20 % des protéines totales du lait bovin. Ces protéines sont un mélange de protéines globulaires de petites tailles (entre 3 et 6 nm) qui ont d'excellentes propriétés nutritionnelles, en particulier grâce à leur richesse en acides aminés essentiels. Contrairement aux caséines, leur structure est compacte et elles sont thermosensibles.

Dans le lait bovin, la β-lactoglobuline est la protéine sérique la plus abondante (environ 60 % des protéines sériques). Son poids moléculaire est de 18 kDa et son point iso-électrique est de 5,1 (Madureira, Pereira, Gomes, Pintado, & Malcata, 2007). Elle existe sous différents états oligomériques (du dimère à octamère), selon le pH, la température et la force ionique du milieu (Croguennec, Mollé, Mehra, & Bouhallab, 2004). La forme dimérique reste cependant majoritaire dans le lait bovin (Boland, Singh, & Thompson, 2014).

L'α-lactalbumine est la seconde protéine majoritaire des protéines sériques, elle représente environ 20 % des protéines sériques du lait bovin (Madureira et al., 2007). C'est une métalloprotéine globulaire de poids moléculaire de 14,2 kDa, dont le point isoélectrique est de 4,2 (Lucy, MacDonald, & Gulcev, 2008). La présence d'ions calcium au cœur de la protéine lui confère une certaine rigidité, ainsi qu'une résistance aux traitements thermiques (Permyakov & Berliner, 2000).

Les caractéristiques principales des protéines sériques sont exposées dans le tableau 1.

I.3.3 Formation de gels de protéines sériques

Comme dit précédemment les protéines sériques ont une structure native globulaire très sensible aux variations de pH et aux traitements thermiques.

La dénaturation thermique, par des traitements à des température > 70 °C, de la β-lactoglobuline et de l'α-lactalbumine entraîne une modification de leur structure tridimensionnelle native compacte et l'exposition de leurs groupements hydrophobes et/ou thiols (Guyomarc'h et al., 2015; Qi, Brownlow, Holt, & Sellers, 1995). Les protéines sériques peuvent alors s'agréger entre elles, par des échanges thiol/disulfides et par des liaisons non covalentes de type interactions hydrophobes, ioniques ou de Van der Waals dans des proportions très variables selon les conditions expérimentales (Guyomarc'h et al., 2015; Oldfield, Singh, Taylor, & Pearce, 2000; Verheul, Roefs, & de Kruif, 1998). Ces nouvelles interactions intermoléculaires aboutissent à une agrégation des protéines et à la formation d'un réseau protéique tridimensionnel, permettant ainsi la formation d'un gel dont la structure varie en fonction de conditions spécifiques (concentration protéique, barème du traitement thermique, force ionique ou encore pH).

L'acidification du milieu contenant les protéines sériques entraine aussi des modifications physico-chimiques de la structure de ces protéines. En effet, selon le pH du milieu, la β-lactoglobuline existe sous six états conformationnels. La protéine est sous forme de dimère non-covalente à pH neutre (5,5-7,5), alors qu'à pH acide (inférieur à son point isoélectrique de 5,2), la protéine est sous forme d'octamère. Enfin, à pH inférieur à 3,5 et supérieur à 7,5, elle existe sous forme de monomère (Guyomarc'h et al., 2015). Or, l'état conformationnel influence la formation de liaisons intra- et inter-moléculaires et, *in fine*, le réseau protéique. De même, la structure tridimensionnelle de la protéine α-lactalbumine varie en fonction du pH. A pH inférieur à 5,0, l'affinité du calcium pour la protéine diminue. Or, la fixation du calcium permet la stabilisation de la structure tridimensionnelle de la protéine au cours de la dénaturation thermique (Forge et al., 1999). Il s'ensuit le passage de la conformation globulaire de la protéine à sa forme « molten globule » modifiant les interactions entre la protéine et son environnement, et donc la microstructure de la matrice dans laquelle les protéines sont présentes (Wu & Kim, 1998).

Les gels de protéines sériques formés par coagulation acide ont une élasticité et plasticité pratiquement nulles, de par le manque de structuration du réseau protéique. Les liaisons impliquées sont de type hydrophobe, de faible énergie, et donc sensibles aux traitements mécaniques (Guyomarc'h et al., 2015).

Ainsi, en traitant thermiquement les protéines sériques dans des milieux plus ou moins acides, et complexes, il est possible de modifier la structure des protéines et donc le type de liaisons intervenant dans le réseau protéique. Ceci permet l'obtention de matrices alimentaires gélifiées de même composition mais de structures et textures variables en fonction des traitements réalisés.

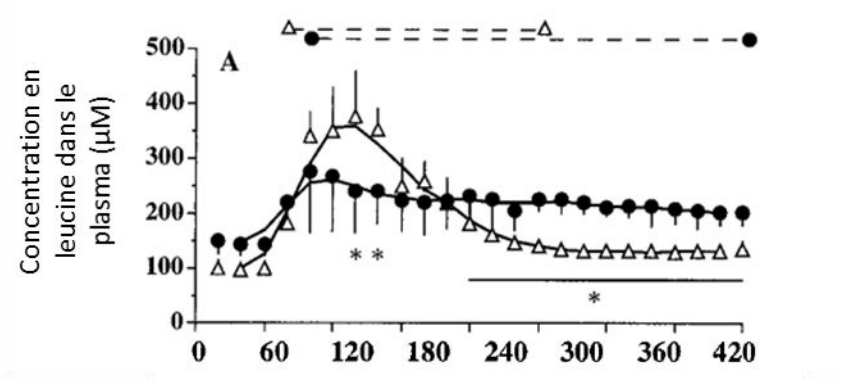
Du fait des changements de conformation des protéines suite aux traitements physico-chimiques réalisés pour former un réseau gélifié, il est fortement probable que l'accessibilité des enzymes à leurs sites de clivage sur les protéines soit également modifiée. Par conséquent, ces traitements vont donc aussi influencer le devenir de ces protéines au cours de leur digestion.

I.3.4 Digestion et absorption des protéines laitières

La digestibilité du lait mesurée dans l'iléon est d'en moyenne 95 %. Cette digestibilité varie en fonction des sources protéiques, elle est de 94 % lors de la digestion des caséines chez l'Homme et est plus élevée pour les protéines sériques (environ 97-98 % en fonction des modèles animaux) (Boland et al., 2014). Toutefois, la digestibilité finale n'est pas le critère unique pour caractériser la qualité nutritionnelle d'une protéine, la composition et la cinétique de biodisponibilité des acides aminés essentiels sont également pertinentes. Ces cinétiques de biodisponibilité peuvent être influencées par de nombreux facteurs dont les plus impactants sont la vidange gastrique, la structure du produit, les traitements thermiques et le mode d'administration de ces protéines (Boland et al., 2014; Sah, McAinch, & Vasiljevic, 2016).

I.3.4.1 Vidange gastrique : Concept des protéines lentes et rapides

Chez l'Homme, suite à l'ingestion de caséines ou de protéines sériques, la vidange gastrique des caséines est plus lente que celle des protéines sériques. Ce ralentissement de la vidange gastrique est dû à la précipitation des caséines dans l'estomac sous l'effet de l'acidité gastrique. Au contraire, les protéines sériques restent solubles dans l'estomac et sont évacuées rapidement (Boland et al., 2014; Lacroix et al., 2006; Lambers, van den Bosch, & de Jong, 2013; Mahé et al., 1996). Ces différences de vitesse de vidange gastrique ont pour conséquence une modulation de l'absorption des acides aminés et de la rétention protéique postprandiale chez l'Homme (Barbé et al., 2013; Boland et al., 2014; Sah et al., 2016). Ainsi, Boirie et al. (1997) ont montré que les cinétiques d'afflux des acides aminés, conditionnées par la digestion protéique, ont des répercussions importantes sur le métabolisme protéique postprandial (Figure 5). De part ces vidanges gastriques variables, et donc des cinétiques de biodisponibilité des acides aminés différentes, les caséines sont nommées protéines « lentes » alors que les protéines sériques sont appelées protéines « rapides » (Boirie et al., 1997).



C [illegible] pic rapide et transitoire de la concentration plasmatique en acides aminés (ici, la leucine), tandis que les caséines [illegible] gastrique retardée par rapport aux protéines solubles (Boirie et al., 1997).

Pour compléter, d'autres études montrent que les protéines sériques sont plus satiétogènes que les caséines (Hall, Millward, Long, & Morgan, 2003; Veldhorst et al., 2009). Cependant, cette différence ne

semble pas liée aux cinétiques de biodisponibilité des acides aminées (Marsset-Baglieri et al., 2014) mais serait plutôt liée à leur stimulation hormonale en période postprandiale (Hall et al., 2003).

Le comportement de ces protéines (sériques et caséines) a été largement étudié à la fois grâce à des systèmes modèles simplifiés de digestion *in vitro* (Dupont & Mackie, 2015; Hall et al., 2003; Rinaldi, Gauthier, Britten, & Turgeon, 2014) et des études *in vivo* chez l'humain (Boirie et al., 1997; Hall et al., 2003; Pennings et al., 2012; Tang et al., 2009). Cependant, la majorité de ces études ont été réalisées sur des aliments liquides. Ainsi, seules quelques études de la digestion de ces protéines via un apport alimentaire sous forme semi-solide ou solide, où les protéines sont alors sous forme agrégées et/ou gélifiées, et plus ou moins dénaturées, ont été menées grâce à des modèles de digestion *in vitro* (Borreani, Llorca, Quiles, & Hernando, 2017; Fang, Rioux, Labrie, & Turgeon, 2016; Kopf-Bolanz et al., 2014; Macierzanka, et al., 2012; Morell, Fiszman, Llorca, & Hernando, 2017), et ce type d'étude reste pour l'instant quasi-inexistant sur des modèles de digestion *in vivo* (Barbé et al., 2013; Feunteun et al., 2014).

Les études menées sur des aliments semi-solides ou solides ont permis de mettre en évidence que la vitesse de vidange gastrique dépend également de la cinétique de désintégration de la matrice alimentaire. De plus, cette vitesse de vidange gastrique contrôle la rapidité d'absorption des nutriments (Kong & Singh, 2008b). Le phénomène de désintégration des aliments dépend principalement des conditions de digestion, de la composition en matière grasse et de structure de la matrice alimentaire (Bornhorst & Singh, 2014). La cinétique de désintégration des aliments solides dans l'estomac est un facteur important influençant la vidange de l'estomac. En effet, le sphincter pylorique agit comme un tamis et retient les particules de taille supérieure de 1 à 2 mm (Kong & Singh, 2008b). La taille de ces particules est d'une part affectée par la structure et la quantité d'eau de l'aliment, mais varie aussi en fonction du niveau de dégradation des aliments lors de la formation du bol alimentaire pendant la digestion orale. Ainsi, les études ont montré que pour le même aliment, lorsque les particules sont plus petites à la déglutition, alors la vidange gastrique est plus rapide (Bornhorst & Singh, 2014; Guo et al., 2015; Urbain et al., 1989). De plus, il semble qu'une augmentation de viscosité du chyme dans l'estomac limite la désintégration des aliments au cours de la digestion gastrique et donc ralentit la vidange gastrique (Hellmig et al., 2006; Marciani et al., 2001). Cette viscosité du repas dans l'estomac est fortement liée à la structure et la composition de l'aliment ingéré. D'autres effets liés à la structure du repas peuvent amener des différences de biodisponibilité des nutriments. Ces phénomènes sont exposés dans le paragraphe suivant.

I.3.4.2 Structure de la matrice

Le fromage est une matrice complexe constituée d'un réseau de caséines avec des espaces ouverts contenant la matière grasse et la phase aqueuse. En fonction de la technologie fromagère utilisée lors de la transformation du lait, il est possible d'obtenir une très large gamme de textures, allant des fromages de type pâtes fraîches, molles et dures. Par exemple, le pressage d'un fromage augmente sa dureté en diminuant sa teneur en eau et en resserrant le réseau protéique. A l'inverse, les phénomènes de protéolyse et lipolyse au cours de l'affinage des fromages entrainent une diminution de leur dureté en modifiant le réseau lipo-protéique (Gunasekaran & Ak, 2002).

Une étude de digestion *in vitro* menée par Fang et al. (2016) a montré qu'à la fin de la digestion gastrique, les fromages à pâte élastique étaient moins désintégrés que les fromages à pâte molle et riches en matière grasse. De plus, ils ont observé que les fromages les plus désintégrés étaient ceux dans lesquels les protéines étaient les plus hydrolysées en fin de phase gastrique. Une autre étude *in vitro* de Thévenot et al. (2017) a montré que l'augmentation de la concentration en caséine dans des gels présure, amène une structure de matrice plus compacte avec des pores de petite taille, limitant la diffusion de la pepsine au sein du gel.

Pour compléter, d'autres études menées sur mini-porcs (Barbé et al., 2013; Feunteun et al., 2014) ont montré que la digestion des protéines était retardée lors d'un repas à base de gels laitiers obtenus par coagulation présure en comparaison avec la digestion d'un gel de même composition mais issu d'une coagulation acide. En effet après 12 h de digestion, la digestibilité des protéines était de seulement 24,7 % pour les protéines du gel présure, alors que cette valeur était de 90 % après un repas à base de lait liquide et du gel acide (Barbé et al., 2013; Feunteun et al., 2014). Cette différence a été expliquée en partie par un temps de vidange gastrique très long pour le gel de présure (352 min) par rapport au lait (114 min) et au gel acide (159 min). La deuxième explication de ces différences de digestibilité, pourrait être liée à une moindre accessibilité des enzymes à leur site de clivage lors de la digestion des gels présures, du fait de la formation d'un caillé très compact dans l'environnement acide de l'estomac (Barbé et al., 2013; Feunteun et al., 2014).

De façon générale, les procédés technologiques mis en œuvre lors de la fabrication des aliments, et en particulier des produits laitiers, affectent fortement les caractéristiques physico-chimiques et les interactions entre les macronutriments constituant la matrice alimentaire (Fang et al., 2016; Thévenot, Cauty, Legland, Dupont, & Floury, 2017). Ces différences peuvent notamment influer sur l'accessibilité des enzymes digestives, notamment en terme de diffusion au sein de la matrice (Barbé et al., 2013; Thévenot et al., 2017), mais aussi en terme d'accessibilité à leur site de clivage sur les protéines (Barbé et al., 2013; Sah et al., 2016). Par conséquent, les cinétiques de digestion des protéines en sont affectées (Barbé et al., 2013; Boland et al., 2014; Sah et al., 2016).

I.3.4.3 Traitement thermique

Les produits laitiers sont des produits généralement traités thermiquement (majoritairement lors d'étapes pasteurisation, stérilisation ou séchage par atomisation). Ces traitements thermiques ont, eux aussi, un impact sur la structure des protéines, en particulier sur les protéines sériques, pouvant impacter l'accessibilité des enzymes aux sites de clivages.

De par leur structure flexible, les caséines sont sensibles à l'hydrolyse enzymatique. Au cours de la digestion, la protéolyse des caséines débute donc dès la phase gastrique par action de la pepsine. Toutes les études *in vitro* ont clairement montré que l'hydrolyse des caséines débutaient moins de 5 min après addition de pepsine (Dupont & Mackie, 2015; Rinaldi et al., 2014; Sah et al., 2016). De la même façon une étude *in vivo* (Barbé et al., 2013) a montré l'hydrolyse par la pepsine était initiée pour la quasi-totalité des caséines en moins de 20 min après l'ingestion du repas.

A l'inverse les protéines sériques, du fait de leurs structures globulaires, sont beaucoup plus résistantes à l'hydrolyse enzymatique. La β-lactoglobuline est particulièrement résistante à l'hydrolyse par la pepsine, par conséquent elle n'est pas hydrolysée dans l'estomac (Boland et al., 2014; Sah et al., 2016).

Le traitement thermique des protéines sériques conduit à la modification de leurs structures tertiaires. Les protéines, alors dénaturées, exposent des liaisons peptidiques les sensibilisant à l'hydrolyse enzymatique, en particulier par la trypsine et la chymotrypsine (Lisak, Toro-Sierra, Kulozik, Božanić, & Cheison, 2013), entraînant une augmentation du degré de protéolyse (Mills, Sancho, Rigby, Jenkins, & Mackie, 2009; O'Loughlin, Murray, Kelly, FitzGerald, & Brodkorb, 2012). En fonction de la sévérité du traitement thermique, les protéines sériques sont plus ou moins dénaturées et agrégées (Rinaldi et al., 2014). Les agrégats plus grands offrent moins de sites de clivage pour les enzymes digestives par rapport aux plus petits agrégats en raison de la diminution de la surface spécifique totale. En outre, les agrégats liés de manière non covalente (par exemple, liés via des liaisons hydrogène) sont plus facilement hydrolysés que les agrégats liés par des ponts disulfures (Zhang & Vardhanabhuti, 2014)

L'effet du traitement thermique a aussi été observé sur les produits laitiers classiques contenant des caséines et des protéines sériques. Par exemple, une étude chez l'Homme a montré une utilisation anabolique plus élevée de l'azote alimentaire après l'ingestion d'un lait stérilisé à ultra-haute température (UHT) qu'après celle d'un lait pasteurisé, suggérant des différences de cinétique d'hydrolyse en fonction du traitement thermique (Lacroix et al., 2008). De la même façon les études portant sur les protéines très structurées (comme les protéines sériques et les protéines de la viande) ont démontré que des traitements thermiques modérés améliorent la digestibilité de ces protéines. Cet effet s'expliquerait par le dépliage des protéines par traitement thermique, exposant les liaisons peptidiques et augmentant ainsi l'accessibilité des enzymes digestives à leurs sites de clivage (Bax et al., 2012; Kopf-Bolanz et al., 2014; O'Loughlin et al., 2012). D'autres études s'intéressant aux mêmes effets pour les protéines végétales, ont mis en évidence des résultats similaires. Cependant dans le cas des protéines végétales, le traitement thermique favorisait l'hydrolyse des protéines par l'inhibition des facteurs antinutritionnels (Rahaman, Vasiljevic, & Ramchandran, 2016).

I.3.4.4 Mode administration

Enfin, il est possible de modifier le métabolisme protéique en changeant le mode d'administration des protéines. En effet, plusieurs études scientifiques ont montré l'intérêt de consommer des protéines dans les trois heures qui suivent un exercice physique, car celui-ci améliore la synthèse des protéines musculaires en sensibilisant les muscles aux actions anaboliques. (Josse, Tang, Tarnopolsky, & Phillips, 2010; Tipton et al., 2001; Tipton & Wolfe, 2004)

De plus, il semble intéressant de consommer simultanément des protéines et des glucides afin de favoriser la synthèse du glycogène et des protéines après un effort physique (Sah et al., 2016).

Pour terminer, il a été montré que chez les personnes âgées, un régime pulsé, consistant à apporter 80 % de l'apport protéines sur un seul repas dans la journée, permet une stimulation de la synthèse musculaire supérieure aux mêmes apports protéiques mais répartis tout au long de la journée. Cependant, l'effet positif du régime pulsé n'est retrouvé que pour des populations âgées. Il semblerait donc qu'apporter les protéines de façon importante et rapide permettrait de pallier aux effets de la

résistance anabolique aux repas qui s'installe avec l'âge (Arnal et al., 1999, 2002; Doherty, 2003; Rondanelli et al., 2015).

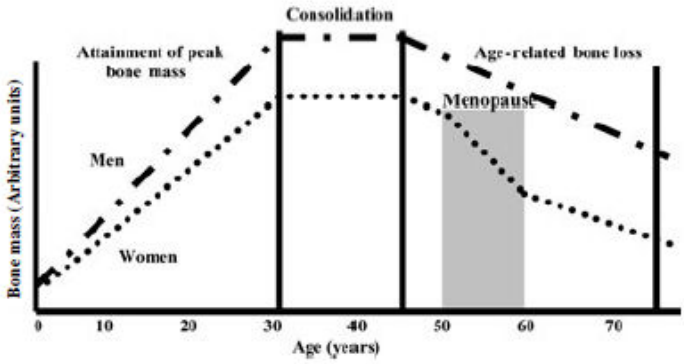
I.4 LES SUPPLEMENTATIONS EN CALCIUM

Comme exposé dans la partie I.1.2, les personnes âgées sont plus souvent sujettes à une neutralisation du pH gastrique et il semble que cette réduction de l'acidité gastrique puisse nuire à l'absorption du calcium à travers l'intestin. De plus, une partie de la population sénior souffre de douleurs vertébrales et de fractures à répétitions. Ces problèmes de santé sont généralement liés à une déminéralisation osseuse aussi appelée ostéoporose, pouvant être liée à une carence en calcium (Theobald, 2005).

Les recommandations actuelles suggèrent aux adultes sains de consommer 1000 mg/j de calcium, et cette recommandation est de 1200 mg/jour pour les personnes âgées de plus de 65 ans. Un apport suffisant en calcium et en vitamine D permettrait de limiter les phénomènes de fractures liés à l'ostéoporose. Comme exposé dans la partie I.3, ces fractures peuvent avoir de graves répercussions sur le maintien de l'autonomie des personnes âgées, il est donc essentiel de limiter ces phénomènes (Ferry, 2010).

I.4.1 Intérêts nutritionnels pour les séniors

La déminéralisation osseuse correspond à une diminution du dépôt de calcium et de phosphore dans les os, ce qui les rend plus fragiles et suffit parfois à déclencher des douleurs dues à de minuscules déformations entraînant notamment des problèmes de tassement-fracture chez le sujet âgé (Theobald, 2005). La masse osseuse se développe jusqu'à 25 ans, puis après s'être maintenue une vingtaine d'années, elle décroit de 0,2 à 0,3 % par an à partir de 45 ans. La perte de masse osseuse est accentuée chez les femmes après la ménopause, elle atteint alors un déclin de 2 à 4 % pendant les cinq premières années suivant la ménopause (Pointillart & Guéguen, 2003). Ces effets sont dus à la réduction des concentrations circulantes d'œstrogène, qui entraine une augmentation de la résorption osseuse en libérant des ions calcium dans le plasma (Theobald, 2005). La figure 6 illustre ces variations de la masse osseuse en fonction de l'âge et du sexe.



C ↺ ↑ т ⇄ 9 ↑ IX ↺ ↑ IX II о т ⅓ Ц I Ц ↕ ↕ т IX ↕ ↕ т ↺ ↑ chez la femme ь IX Д ↑ I (trait pointillé) (Theobald, 2005)

De manière générale, le risque à vie pour toute fracture de fragilité, malgré des mesures de prévention, est d'environ 40 % pour les femmes et 13 % pour les hommes (Cashman, 2002). Les carences en calcium, en particulier avant 25 ans, peuvent induire de l'ostéoporose. Lorsque les apports en calcium sont insuffisants et que la calcémie (concentration en calcium plasmatique) ne peut pas être maintenue, le calcium est alors mobilisé par résorption osseuse (Cashman, 2002; Theobald, 2005).

Cependant, mises à part ces situations de carence calcique, la relation entre l'apport nutritionnel en calcium et l'état osseux a été difficile à démontrer de manière convaincante. En effet, le calcium étant principalement apporté par les produits laitiers (de 40 à 70 % des apports en fonction des pays (U.S. Department of Agriculture/Economic Research Service, 2015; Vavrusova & Skibsted, 2014)), il est difficile de connaitre l'effet du calcium seul sur la minéralisation osseuse car les produits laitiers sont aussi riches en protéines. Ces protéines ne sont pas simplement essentielles pour la synthèse de la masse musculaire, elles jouent aussi un rôle primordial dans le développement de la masse osseuse (Girgis, Baldock, & Downes, 2015; Langsetmo et al., 2017; Tagliaferri, Wittrant, Davicco, Walrand, & Coxam, 2015). De nombreuses études ont ainsi démontré un effet positif d'un apport supplémentaire en calcium par les produits laitiers pour limiter les risques de fractures et chutes liés à l'ostéoporose (Feskanich, Meyer, Fung, Bischoff-Ferrari, & Willett, 2017; Gui et al., 2012; Sahni et al., 2014). Cependant, des études de supplémentation en calcium seul ont permis d'étudier cette question. Dans le cas de supplémentation en calcium par des compléments alimentaires, deux périodes semblent clé pour limiter la déminéralisation osseuse : l'adolescence et la période post-ménopause chez la femme (Cashman, 2002; Theobald, 2005). A ces périodes, des apports importants en calcium semblent être pertinents pour limiter la perte osseuse. Dawson-Hughes et al. (1990) ont par exemple rapporté un effet bénéfique de la supplémentation en calcium sur une période de 2 ans pour limiter la perte osseuse chez les femmes post-ménopausées. Cependant, cette étude a en partie été menée sur une population de femmes ménopausées consommant moins de 400 mg/j de calcium, alors que les apports recommandés sont de 1200 mg/j (Dawson-Hughes et al., 1990).

Alors que l'effet d'une supplémentation en calcium sur la déminéralisation osseuse est parfois contesté, l'effet de la vitamine D est cependant prouvé depuis maintenant plusieurs années. Ainsi , la supplémentation en vitamine D lors d'une période avec une moindre exposition au soleil, au moment du vieillissement (en particulier pour la femme en post-ménopause), permet une inhibition de la perte osseuse (Aloia et al., 2014; Chapuy et al., 1992; Girgis et al., 2015; Masuyama et al., 2003).

Les études montrent que la perte osseuse liée à l'âge, particulièrement présente chez les femmes (Figure 6) (Theobald, 2005), est en partie expliquée par les changements hormonaux survenant au cours de la ménopause, mais aussi par des phénomènes d'altérations de l'absorption du calcium liée au vieillissement. Après avoir exposé les mécanismes généraux de l'absorption du calcium, les différents phénomènes pouvant affecter cette absorption, en particulier chez les personnes âgées, seront présentés.

I.4.2 Régulation du calcium

Des phénomènes physiologiques importants sont mis en œuvre par l'organisme pour maintenir à un niveau stable les concentrations de calcium intracellulaires et extracellulaires. En effets, des

perturbations relativement faibles de l'homéostasie calcique peuvent conduire des symptômes sévères, tels que des arythmies cardiaques ou des dysfonctionnements cognitifs. L'homéostasie est contrôlée par trois hormones : l'hormone parathyroïdienne (PTH), le calcitriol (forme active de la vitamine D) et la calcitonine. Ces hormones agissent en réponse à des changements de la calcémie. Ainsi, l'absorption du calcium provenant du tractus gastro-intestinal peut être modifiée, ainsi que l'excrétion urinaire et la résorption du calcium par l'os (Kopic & Geibel, 2013; Pérez et al., 2008; Theobald, 2005). Suite au vieillissement, la diminution de la masse osseuse est principalement due à des altérations de la fonction d'absorption du calcium dans l'intestin (Kopic & Geibel, 2013; Pérez et al., 2008; Theobald, 2005).

I.4.2.1

La figure 7 schématise les différentes voies d'absorption du calcium.

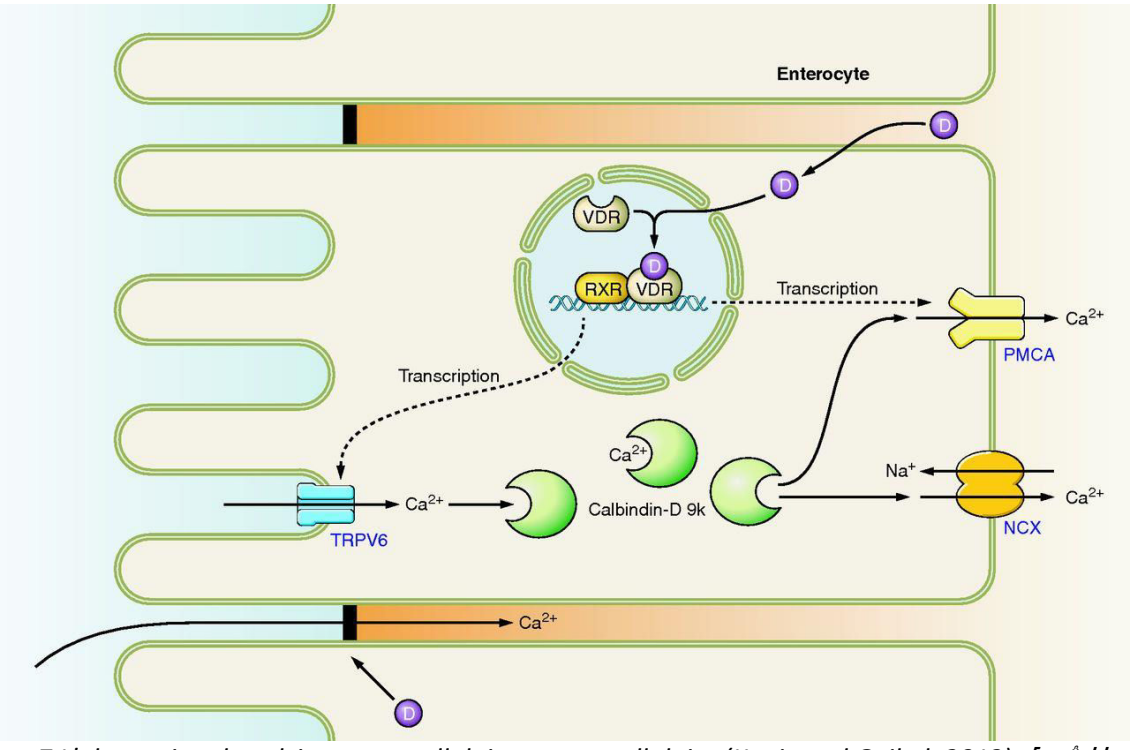


Figure 7 L'absorption du calcium transcellulaire et paracellulaire (Kopic and Geibel, 2013). [♤Ц г ↕ IX↑ ix↑ ₵ IXⅡ transcellulaire du calcium repose sur l'entrée du calcium à travers le canal TRPV6, puis son transport par le calbindin-5 ˝Å☞ т ↑ т Ⅱь ₵ Ⅱ ↕ Ц ↕ IX↑ ↑ ₵ т о т ⅓ Ц д т ⅓ ⅓ ↺⅓ port ↑↓₵ Ц ⅓ ♤ PMCA. Le calcitriol (forme active de la vitamine D) régule la plupart de ces protéines et la perméabilité des jonctions serrées.

I.4.2.2 Facteurs influençant la biodisponibilité du calcium pour les personnes âgées

Plusieurs facteurs sont liés à une diminution de l'absorption du calcium lors du vieillissement, mais ils touchent en majorité l'absorption active du calcium.

La toute première cause de la diminution de l'absorption du calcium avec l'âge est la diminution de la concentration en vitamine D dans l'organisme, dû à une moindre exposition cutanée à la lumière du soleil. Cette moindre exposition est souvent liée à une diminution globale de l'activité physique. De plus, lors du vieillissement, la peau est moins capable de synthétiser de la vitamine D suite à une exposition au soleil (Bonjour et al., 2009; Christakos, 2012). Par conséquent, de par la moindre concentration en vitamine D dans l'organisme, l'absorption active du calcium est diminuée. De plus, lors du vieillissement, on observe une résistance de la barrière intestinale au calcitriol, qui entraîne une diminution de l'expression de l'ensemble des molécules de transport essentielles à l'absorption du calcium par la voie active (Pérez et al., 2008; Scopacasa, Wishart, Horowitz, Morris, & Need, 2004).

La deuxième cause limitant l'absorption du calcium est l'augmentation du pH gastrique chez certaines personnes âgées. Un pH plus proche de la neutralité serait moins favorable à l'absorption calcique, car le calcium ne pourrait pas être solubilisé dans l'estomac, en amont de l'absorption intestinale. Ainsi, les

études cliniques montrent un lien entre la réduction de la sécrétion d'acide gastrique, la moindre absorption du calcium et/ou et le risque accru de fractures osseuses (Recker, 1985; Theobald, 2005).

Depuis de nombreuses années, certains aliments sont enrichis en calcium afin d'augmenter la quantité de calcium absorbé par l'organisme. Ces enrichissements sont très multiples et l'absorption du calcium semble pouvoir être modulé en fonction de la source de calcium ajoutée dans l'aliment.

I.4.3 Les enrichissements en calcium

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2006), l'enrichissement est défini comme la pratique consistant à augmenter délibérément la teneur en micronutriments essentiels afin d'améliorer la qualité nutritionnelle des aliments. En Europe, l'enrichissement des aliments est régi et décrit dans le règlement (CE) n°1925/2006 relatif à l'adjonction de vitamines, de substances minérales et de certaines autres substances aux denrées alimentaires. Cette réglementation autorise une dizaine de sources de calcium à des fins d'enrichissement.

Le calcium est un élément uniquement disponible pour la consommation associée à divers autres éléments. Chaque source de calcium a des propriétés physiques, structurelles et chimiques uniques. Ainsi le poids moléculaire, la densité, le goût ou encore la solubilité des différentes sources peuvent être très variables (tableau 2) (Preedy, 2015; Reinwald, Weaver, & Kester, 2008). En fonction des priorités des industriels et des caractéristiques des aliments, la source de calcium utilisée pour enrichir le produit pourra varier. Le carbonate de calcium est la source de calcium la plus utilisée car elle est économique et riche en calcium (40 %) (Preedy, 2015). Cependant, le carbonate de calcium à un goût légèrement savonneux qui peut nuire à la qualité sensorielle de certains produits. En outre, sa solubilité est très faible, entrainant la formation de dépôts dans les produits liquides (Preedy, 2015).

Différentes études ont été menées sur l'impact de la source de calcium sur l'efficacité de l'absorption du calcium, ainsi que sur les facteurs impactant sur ces différences de biodisponibilité (revue de Reinwald et al. (2008)). La biodisponibilité du calcium est d'en moyenne 30 % quelle que soit la source. Cependant, une étude a montré que le bisglycinate de calcium était plus absorbé (44 %) que le carbonate de calcium (29 %), le tricalcium de phosphate (25 %), et le calcium citrate (24 %) (Heaney, Recker, & Weaver, 1990). D'autres études semblent montrer une absorption plus élevée pour le calcium citrate malate que pour le carbonate de calcium (revue de Reinwald et al. (2008)). Ces études présentent l'intérêt d'avoir été réalisées sur l'Homme, cependant la validité des conclusions reste conditionnée à des variations interindividuelles très élevées. Ainsi, la valeur de la fraction absorbée varie entre 10 et 40 % quelles que soient les études et les sources de calcium. Le tableau 2 présente les caractéristiques de différentes sources de calcium.

¤ Ц г ⅓ т Ц ↺ ъ / Ц ↑ Ц д ↑ ф ↑ ₵ ↕ ↑ ₵ ← ↺ т ↕ о т ↕ ↕ IX ↺ ↑ д т ↕ о т д Ц ⅓ д ₵ ↺ ⅓ ⌂ Ц ⅓ ₵ I (Reinwald et al., 2008) et (Heaney et al.,1990). ND : données non disponibles

Source de calcium	Formule chimique	Poids moléculaire ($g \cdot mol^{-1}$)	% de calcium dans la formule	Caractéristique sensorielle	% de solubilité dans l'eau (Température en °C)	Fraction absorbée (Heaney et al., 1990)
Carbonate de calcium	$CaCO_3$	100,09	40,04	Gout de "savon"	0,005 (25)	29
Tri calcium de phosphate	$Ca_3(PO_4)_2$	310,18	39,00	Granuleux dans les liquides	0,002 (25)	25
Citrate de calcium	$Ca_3(C_6H_5O_7)$	498,44	24,12	Amer	0,1 (25)	24
Calcium citrate malate	$Ca_6(C_6H_5O_7)_2(C_4H_4O_5)_3$	1014,90	23,70	Neutre	1,1 (25)	36
Bisglycinate de calcium	$Ca(C_2H_4NO_2)_2$	188,20	21,30			44
Lactate de calcium	$Ca(C_3H_5O_3)_2$	218,22	18,37	Neutre	9 (20)	32
Calcium lactate gluconate	$Ca_2(C_{18}H_{32}O_{20})$	648,60	12,36	Neutre	40 (20)	32
Chlorure de calcium	$CaCl_2$	110,98	36,11	*ND*	74 (20)	*ND*
Oxalate de calcium	CaC_2O_4	128,10	31,29	*ND*	0 ,00067 (20)	*ND*
Dicalcium de phosphate	$CaHPO_4$	136,06	29,46	*ND*	0,02 (25)	*ND*
Fumarate de calcium	$CaC_4H_2O_4$	154,14	26,00	*ND*	1,22 (20)	*ND*
Calcium malate	$Ca(C_4H_4O_5)$	172,15	23,28	*ND*	0,4 (25)	*ND*
Gluconate de calcium	$Ca(C_6H_{11}O_7)_2$	430,38	9,31	*ND*	3 (20)	*ND*

Malgré les limites de ces études cliniques, il semble que la biodisponibilité du calcium issue des différentes sources disponibles soit majoritairement liée à leur variation de solubilité dans l'estomac et l'intestin. Ainsi, il est admis que les sources de calcium se solubilisant complètement dans l'estomac, puis restant solubles dans le duodénum lorsque le pH remonte, seraient absorbées en plus grande quantité par l'organisme.

Ainsi, Goss et al. (2007) ont déterminé la solubilité de cinq sources de calcium dans une gamme de pH de 2 à 9. Ils ont ainsi mis en évidence que la solubilité de chaque calcium était augmentée lorsque le pH diminue De plus, ces résultats montrent que le calcium de glycerophosphate et le calcium citrate sont moins sensibles aux variations de pH que les trois autres sources de calcium testées (Figure 8). Dans l'eau distillée, chaque sel produit un pH différent, affectant sa solubilité. Ainsi, alors que le citrate de calcium est plus soluble que le $CaCO_3$ dans l'eau, la différence de solubilité est atténuée lorsque le pH de la solution est contrôlé à 7,5. On peut ajouter que chaque source de calcium à son propre un pouvoir tampon sur le pH.

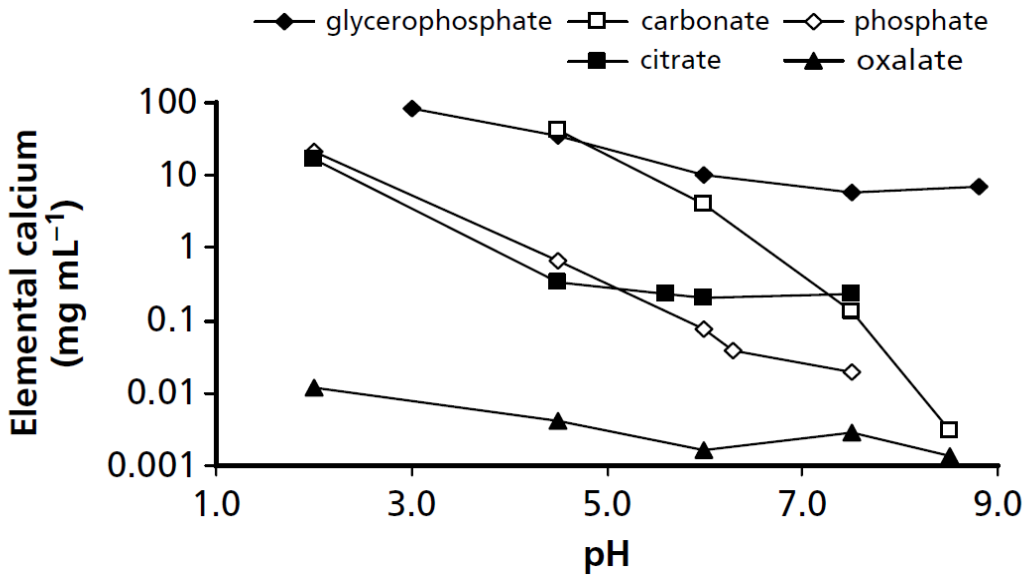


Figure 8 Solubilité des sources de calcium dans des solutions aqueuses (Goss et al., 2007)

Pour conclure, on estime que 65 % de la population sénior consomme moins de 1200 mg de calcium par jour (ANSES, 2017). Pour cette partie de la population, un apport supplémentaire en calcium est efficace pour limiter les phénomènes de déminéralisation osseuse. De nombreuses sources d'enrichissement en calcium sont disponibles. Chacune a ses caractéristiques, leur permettant, ou non, d'être intégrée dans l'alimentation. Cependant, les études cliniques sur les différentes sources de calcium sont victimes de grande variabilité interindividuelle, limitant les conclusions sur les différences de biodisponibilité entre les sources de calcium. De plus, les études *in vitro* n'ont pas été réalisées sur des modèles de digestion complets. Seul un facteur était modulé, il est donc difficile d'être certain que seul le pH influence la biodisponibilité du calcium. Ainsi, alors que l'intérêt d'un apport nutritionnel en calcium est depuis longtemps diffusé à la population générale, de nombreuses questions liées aux mécanismes d'absorption et d'utilisation du calcium restent sans réponses.

II OBJECTIF ET STRATEGIE

L'analyse de la littérature a permis de mettre en évidence l'intérêt d'un apport en protéines et en calcium suffisant pour les personnes âgées. Ces apports pourraient limiter le développement de pathologies comme l'ostéoporose et la sarcopénie responsables de la perte d'autonomie avec l'âge. De plus, cette revue de la bibliographie a aussi montré que les altérations de santé buccodentaire sont très fréquentes au sein de la population sénior et que celles-ci entrainent souvent des changements d'habitudes alimentaires, généralement en défaveur d'un apport nutritionnel adéquat.
Cependant plusieurs points de la littérature méritent d'être approfondis. Tout d'abord, alors que les différences de formation de bols et de perception en bouche sont assez bien décrites entre les jeunes adultes et les séniors, peu d'études prennent en compte le statut de la santé buccodentaire sur ces phénomènes. Ensuite, alors que la structure des aliments est reconnue pour influencer la biodisponibilité des nutriments, aucune étude, à notre connaissance, ne s'est intéressée à l'impact de la structure de la matrice alimentaire sur la bioaccessibilité et biodisponibilité du calcium. Enfin, alors que l'effet de la vitesse de digestion des caséines et des protéines sériques sur la synthèse musculaire a été amplement étudié, ces études se sont cependant focalisées quasi exclusivement sur des produits de forme liquide. Pourtant, il est connu que la structure de la matrice à un impact majeur sur les vitesses de vidange gastrique et donc sur la vitesse de digestion des aliments.

Suite à cet état de l'art 3 grandes questions se sont posées

1. Comment la texture des produits laitiers et la santé buccodentaire du consommateur de plus de 65 ans influencent la formation du bol alimentaire, les perceptions sensorielles et le confort en bouche ?
2. Comment la source protéique (caséines et protéines sériques natives ou dénaturées) ainsi que la structure des produits (liquide ou gélifiée) influence la bioaccessibilité et la biodisponibilité des acides aminés ?
3. Comment la source de calcium et la structure des produits influencent la bioaccessibilité et biodisponibilité du calcium ?

Suite à ces questions et dans l'objectif de développer des produits laitiers de texture fromagère répondant aux besoins nutritionnels et sensoriels des séniors, ce travail de thèse a été décomposé en 4 étapes principales (figure 9).

La première étape de ce projet a été de formuler une gamme de produits laitiers de même composition mais de textures différentes (partie 1 figure 9). A l'inverse des produits laitiers classiques dont l'apport protéique provient majoritairement des caséines, l'objectif était de formuler de nouveaux produits dont les protéines majoritaires sont des protéines sériques. Ces produits devaient aussi pouvoir être enrichis par différentes sources de calcium. Pour cette étape, la contrainte majeure était de réussir à obtenir une gamme de textures de produits laitiers variées, se rapprochant de textures fromagères, tout en conservant une composition identique pour tous les produits.

Suite au développement de ces produits, la 2ème étape a consisté à étudier l'acceptabilité des différentes textures de produits laitiers chez les personnes âgées autonomes, en fonction de leur santé buccodentaire (partie 2 figure 9). Cette étape du projet s'est déroulée à l'INRA de Dijon car ce centre, spécialisé en analyse sensorielle, avait recruté et caractérisé un panel de 200 personnes âgées dans le cadre du projet AlimaSSenS. Les résultats de cette partie sont présentés dans la partie III.1 (première partie des résultats).

La dernière partie de ce travail consistait à étudier la bioaccessibilité (parties 3A et 4A figure 9) et la biodisponibilité (parties 3B et 4B de la figure 9) du calcium et des acides aminés des différents produits. Des études de digestion *in vitro* ont d'abord été menées pour s'intéresser à l'impact des sources calciques et protéiques, et déterminer l'effet de la structure de la matrice alimentaire sur la bioaccessibilité de ces nutriments (Parties 3A et 4A figure 9). Puis, une étude de digestion *in vivo* sur modèle porc a été réalisée pour étudier la biodisponibilité de ces nutriments en fonction des sources calciques et protéiques (parties 3B et 4B de la figure 9) après l'ingestion de produits solides. La deuxième partie des résultats (III.2) présente les études relatives à la bioaccessibilité et la biodisponibilité des acides aminés (parties 3A et 3B de la figure 9). La troisième partie (III.3) présente les résultats des études portant sur la bioaccessibilité et la biodisponibilité du calcium (parties 4A et 4B de la figure 9).

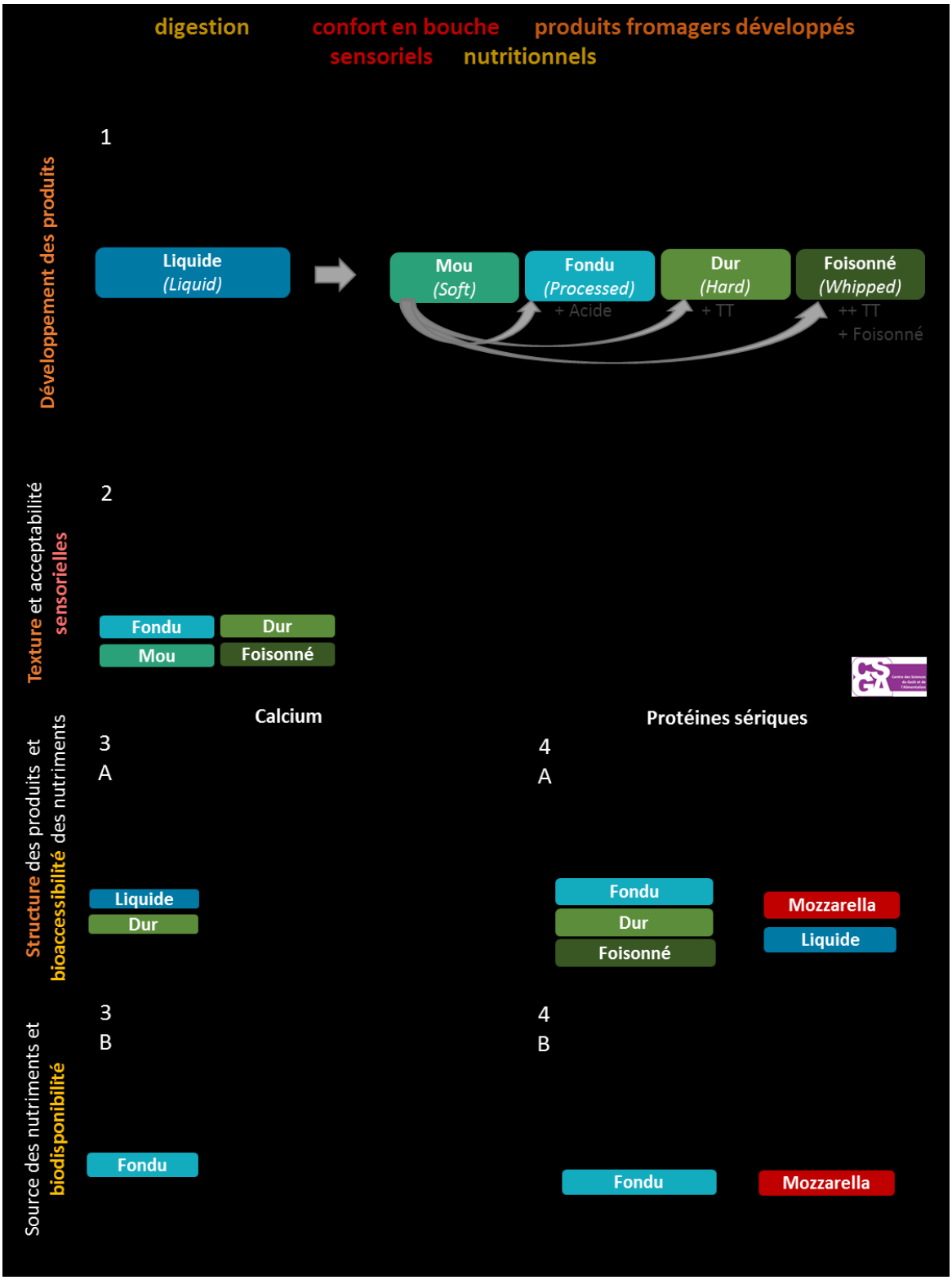


Figure 9 Stratégie et objectif de chacune des parties du projet de thèse

III RESULTATS

III.1 CONFORT EN BOUCHE ET FORMATION DU BOL ALIMENTAIRE

Lors de la prise alimentaire, les récepteurs gustatifs, olfactifs, les mécanorécepteurs ou encore les muscles de la bouche, des joues et de la langue sont activés afin de former un bol alimentaire et de ressentir la texture, l'odeur et le goût de aliment (Chen, 2009; Woda, Mishellany, et al., 2006).

Tous ces signaux et contractions musculaires peuvent être altérés par le vieillissement et l'apparition de pathologies (Peyron et al., 2017). De plus, ils diffèrent en fonction du type d'aliment dégusté (Chen, 2009). A notre connaissance, la majorité des études a pour l'instant été menée sur des adultes sains, et plus rarement sur des enfants et des personnes âgées. En outre, les quelques études menées sur les personnes âgées ont très rarement abordé les perceptions en bouche et les bols alimentaires formés en fonction de la santé buccodentaire des populations étudiées. Par ailleurs, la majorité de ces études ont soit été menées sur la base d'aliments vraiment très différents, soit sur des aliments modèles à base de gélatine, exacerbant ainsi les différences entre les produits et les population étudiées, ou limitant les conclusions par la difficulté à transposer les résultats à des aliments communs.

L'objectif de ce chapitre est de comprendre comment la texture de produits laitiers fromagers et la santé buccodentaire du consommateur de plus de 65 ans influencent la formation du bol alimentaire, les perceptions sensorielles et le confort en bouche.

Afin de répondre à cet objectif, ce chapitre a été divisé en deux parties :

- La première partie permet d'étudier l'effet de la texture de produits fromagers sur la formation du bol alimentaire et les perceptions en bouche de personnes âgées ayant une bonne santé buccodentaire. Les fromages modèles avaient une composition identique mais quatre textures distinctes développées dans le but de se rapprocher de texture de fromage commerciaux (un fromage modèle Dur, un Mou, un Fondu et un Foisonné) ;
- La seconde partie se concentre sur l'effet de la santé buccodentaire des personnes âgées sur la formation du bol et les perceptions en bouche suite à l'ingestion de ces différents produits fromagers.

Les résultats de ces études sont présentés sous forme d'un article soumis et d'un projet d'article.

III.1.1 Effet de la texture des produits laitiers sur le confort en bouche

Cette partie est basée sur la publication soumise suivante :

Bolus quality and food comfortability of model cheeses for the elderly as influenced by their texture

L. Lorieau[1], C. Septier[2], A. Laguerre[2], L. Le Roux[1], E. Hazart[3], A. Ligneul[3], M-H Famelart[1], D. Dupont[1], J. Floury[1], G. Feron[2], H. Labouré[4]*

[1] INRA – UMR STLO Science & Technology of Milk & Eggs, INRA Agrocampus, France
[2] INRA - UMR CSGA Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, France
[3] Lactalis Recherche et Développement, France
[4] Agrosup Dijon, France

*Corresponding author: helene.laboure@inra.fr

Submitted to Food Research International on 02/03/2018

HIGHLIGHTS

- Bolus of hard and dry model cheeses were difficult to form
- Melting and fatty model cheeses bolus were easy to form
- The bolus characteristics and the perception of bolus formation were correlated
- Elderly judged model cheeses more comfortable when the bolus was easily formed

KEYWORDS

Dairy product, cheese, food comfortability, elderly, sensory perception, bolus, texture, milk protein

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the influence of the texture of dairy products on bolus properties and food comfortability as perceived by elderly persons.

Four cheese models identical in term of their nutritional composition but different by the type of texture (Soft, Hard, Processed and Whipped) were developed to resemble market cheese. Study was performed with a panel of 38 elderly persons without dental impairment but with variable rate of saliva flow. The time of chewing required to form the bolus was measured. The rheological properties of the bolus obtained were studied as well as the quantity of saliva incorporated. Food comfortability was assessed by means of a questionnaire asking about in-mouth comfort, bolus formation, pain, and perceived texture and flavor.

Results showed that food comfortability was positively correlated to the ease of forming the bolus which depended on the food texture. Thus, the bolus formed with the Whipped product which required more saliva, was harder than the other three products and so judged the least comfortable. This product was characterized by a dry and sticky texture. On the other hand, the Soft and Processed products led to a softer food bolus that was more easily formed, and thus were judged as more comfortable. Their textures were perceived as soft, fatty and melting.

This work highlights the importance of considering food bolus formation and related properties when looking for the link between food product characteristics and the enjoyment of eating in the case of the elderly population.

GRAPHICAL ABSTRACT

III.1.1.1 Introduction

In 2015, 12.3 % of the world population were over 60 years old, and this percentage is expected to double by the year 2050. Indeed, it is estimated that this proportion of the population will reach 21.5 % in 2050 (Aguilera & Park, 2016). Nevertheless, the challenge is not ageing, but healthy ageing.

It is commonly assumed that sensory impairments and difficulties in masticating and swallowing occurred with age, and that they negatively affect the diet of older people, both in terms of quality and quantity (Schwartz et al., 2017). Older people perceive a lower flavor intensity than younger adults and they are less sensitive to flavor changes and taste intensity levels (Doets & Kremer, 2016). However, such changes in food perception do not reduce the food liking amongst the elderly (Kremer, Bult, Mojet, & Kroeze, 2007). However, when it comes to oral capacity, aging induces changes in the oral physiology with a decrease of the muscular and bite forces, an increase of the tooth loss (Mioche et al., 2004) and a decrease of 38 % of the salivary flow (Vandenberghe-Descamps et al., 2016). These impairments lead to an increase of mastication time (Mioche et al., 2004) which in turn affects food choices and dietary intakes (Walls & Steele, 2004).

In this context, food formulation is expected to reduce eating difficulties and produce pleasant food for the elderly. Texture is an important sensory attribute in determining quality and consumer acceptability of food. Furthermore, Devezeaux de Lavergne, van de Velde, van Boekel, & Stieger (2015) confirmed that oral processing is key to dynamic texture perception. Some research has shown that a food is judged difficult to eat when the bolus is difficult to form, which is especially the case with hard products (Laguna & Sarkar, 2016). In general, hard foods require more chewing cycles and greater masticatory forces to be swallowing (Chen, 2009). Moreover, to develop foods for elderly persons that are easy to eat and swallow, it is important to not only consider product characteristics, but also the corresponding food bolus texture properties. For instance, it has been shown that bolus rheology of various fluid foods was the most important factor determining the ease of subsequent swallowing (Chen & Lolivret, 2011).
However the nutritional composition of food is also very important. Indeed, older people start to lose weight from around age 65, mainly due to a progressive loss of skeletal muscle mass, a process which is known as sarcopenia. Thus, older adults require an increased daily protein intake (around 1.0 to 1.3 g/kg body weight) relative to younger people (0.8 g/kg body weight) (Bauer et al., 2013). Nutritional studies on older people have demonstrated that whey proteins stimulated postprandial muscle protein accretion more effectively than caseins (Pennings et al., 2011). Furthermore, whey proteins also appear to have some anabolic benefits beyond their contents of essential amino acids (Bauer et al., 2013). Therefore, it seems reasonable to develop food products for elderly people that will provide nutritionally balanced proteins.

Physiological dysfunctions and specific nutritional needs occurring with aging require a specific food development that enhances nutritional intakes whilst maintaining the enjoyment of eating. In this context, the main objective of the current study was to evaluate the sensory characteristics of four cheese models adapted to the nutritional needs of elderly but that were also comfortable to eat. Four cheese models identical in terms of their nutritional composition but different by the type of texture (Soft, Hard, Processed and Whipped) were developed. The sensory characteristics of these products were evaluated by a panel of elderly people. The relationships between mastication, food bolus

properties and comfortability of mouthfeel were subsequently explored and discussed. The long-term goal is to develop new dairy products adapted to the specific needs of the elderly.

III.1.1.2 Materials and methods

III.1.1.2.1 Cheese models

III.1.1.2.1.1 Composition

The cheese models prepared were based on an emulsion of whey proteins with cream which was heated to induce a gel. This emulsion contained 24 % (w/w) of whey proteins (95 % whey proteins, Pronativ®, Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France), 20 % (w/w) of fat provided by cream (Crème Fleurette 30 % Casino, Saint Etienne, France) and 0.6 % (w/w) of NaCl (European Salt Company, Hannover, Germany). The pH of the cheese models was adjusted with gluconodeltalactone (GDL) (Roquette, Lestrem, France) depending on the formulation of the subsequent product (Figure 1).

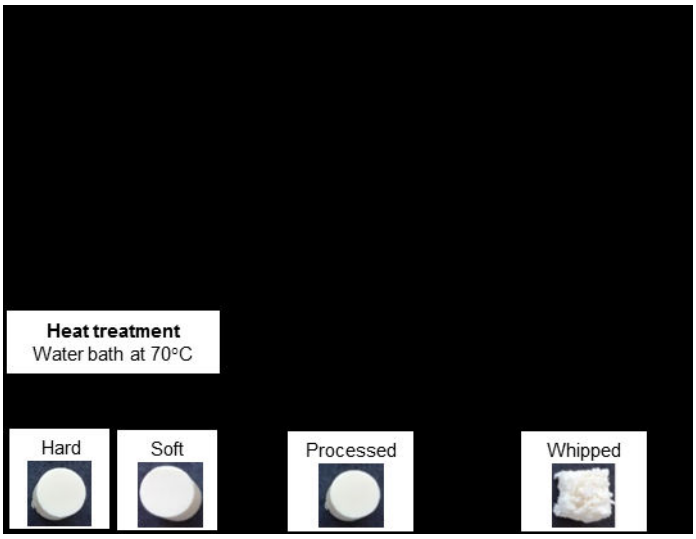


Figure 1: Manufacturing process of the four cheese models

III.1.1.2.1.2 Preparation of the cheese models

A range of processing conditions were used in order to obtain the four defined cheese textures from the same source material (Figure 1). These products are subsequently referred to as “Soft”, “Hard”, “Processed” and “Whipped”. To avoid the effect of product taste on the food comfortability, the products were not flavored and had the same taste.

In all cases, the source dairy ingredients were first mixed one hour at 37 °C using a blender (Thermomix TM5, Vorwerk, France). For the Hard, Processed and Soft products, the emulsion was transferred directly to 26 mm diameter synthetic cases (Darmini Darmex Casing caliber 28, MCM Casing, Lucenay, France). Heat treatments were then: 35 min at 70 °C (Hard), 18 min at 70°C (Soft) and 17 min at 75 °C (Processed). For the Whipped product, the emulsion was foamed 20 min (Thermomix TM5, Vorwerk, France), and then transferred to plastic cups (Pot 125mL, RPC BEBO, Denmark) which were heated at 75

°C for 80 min. The matrices were then stored for a maximum of one month at 4 °C. During this period their characteristics (taste, smell, and texture) were stable.

III.1.1.2.1.3 Rheological properties

The same first compression test was applied on the Hard, Soft and Processed products. Cylindrical samples of the Soft and Processed products were analyzed by double compression using a Lloyd TA 1 texture analyzer fitted with a 100 N sensor, whilst cylindrical samples of the hard product were too stiff and thus measured using an Instron texture analyzer fitted with a 1000 N sensor. It was not possible to conduct the same compression test on the Whipped product because of its completely different foam structure. All texture analyzes were carried out at 20 °C and within 1 min after removing from the fridge at 4 °C and immediate cutting. The parameters used for the different rheological tests are set out in Table 1.

Table 1 Parameters of the compression tests

	Soft	Processed	Hard	Whipped
Type of test	Double-compression test with no time between the two compressions	Double-compression test with no time between the two compressions	Simple compression	Double-compression test with no time between the two compressions
% of compression	70 %	70 %	70 %	85 %
Crosshead speed	30 $mm.s^{-1}$	30 $mm.s^{-1}$	30 $mm.s^{-1}$	100 $mm.s^{-1}$
Shape of the test piece	Cylinder : 20 mm height 26 mm diameter	Cylinder : 20 mm height 26 mm diameter	Cylinder : 20 mm height 26 mm diameter	Cube : 20 x 30 x 30 mm
Probe	Cylindrical plate of 30 mm diameter	Cylindrical plate of 30 mm diameter	Cylindrical plate of 30 mm diameter	Cylindrical plate of 20 mm diameter
Texture Analyser	Lloyd TA 1 (Lloyd Instruments, Elancourt, France)	Lloyd TA 1 (Lloyd Instruments, Elancourt, France)	Instron 4501 (Elancourt, France)	Lloyd TA 1 (Lloyd Instruments, Elancourt, France)
Load cell	100 N	100 N	1 kN	100 N
Repetition X Batches	3 x 8	3 x 8	3 x 8	3 x 8

Parameters describing the physical properties of the four types of cheese models are defined as follows (Bourne & Comstock, 1981; Pons & Fiszman, 1996): the hardness force (N) is the maximum force reached during the first compression; the fracture force (N) is the force required to cause the first fracture; the adhesive force (N) is the minimum force reached during the first compression; the springiness is the extent to which the sample returns to its initial height, ranging between 0 and 1; and the cohesiveness is

the area under the force-distance curve during the second compression divided by that of the first compression : the value is thus between 0 and 1. Collected data is given in the table 2.

*Table 2 pH and rheological properties of the four cheese models. Data are presented as means ± standard deviations. Different letters indicate significant differences between means (p<0.05). *** <0.0001, **<0.001 and *<0.05.*

Variables	p-value	Hard				Soft				Processed				Whipped			
pH	***	6.35	±	*0.08*	*a*	6.36	±	*0.07*	*a*	5.57	±	*0.05*	*b*	5.20	±	*0.10*	*c*
Hardness force (N)	***	104.37	±	*18.63*	*a*	31.59	±	*12.78*	*b*	31.42	±	*10.13*	*b*	6.12	±	*1.35*	
Fracture force (N)	***	108.25	±	*19.5*	*a*	15.65	±	*7.96*	*b*	8.88	±	*3.99*	*b*	5.93	±	*1.34*	
Adhesive force (N)	***					-1.90	±	*0.85*	*b*	-8.19	±	*4.13*	*a*	-0.08	±	*0.02*	
Springiness	*					0.28	±	*0.15*	*b*	0.20	±	*0.11*	*a*	0.71	±	*0.05*	
Cohesiveness	ns					0.13	±	*0.04*		0.11	±	*0.06*		0.53	±	*0.03*	

The Hard product is characterized by a fracture force 7 to 12 times higher than that of the Processed and Soft products. This difference is a consequence of a longer time of heating treatment. The Processed and Soft products yielded to a similar fracture force, but the Processed product displayed more adhesion and less springiness, certainly due to the modulation of its pH. The springiness and cohesiveness of the Whipped product were high (0.71 and 0.53) implying a product that preserved much of its original shape after the first compression. This product especially described an elastic behavior.

III.1.1.2.2 Participants

III.1.1.2.2.1 Recruitment

Thirty-eight volunteers aged between 66 and 86 years were selected for this study. Inclusion was based on criteria as followed: living at home, no acute pathological episodes neither at the time of the study nor in the recent past, a score of at least 24 on the mini mental state evaluation (MMSE) (Folstein, Folstein, & McHugh, 1975), and a number of functional units equal to seven or more. A functional unit was defined as a pair of posterior antagonist teeth that had at least one contact area during chewing.

III.1.1.2.2.2 Saliva flow measurements

The resting and stimulated salivary flows were measured at each session following procedures described by Vandenberghe-Descamps et al. (2016). The saliva at rest was measured by instructing the participant to allow their saliva to flow into a pre-weighed screw-cap cup every time they felt like swallowing over a period of 10 minutes. The stimulated saliva was collected by asking the subjects to chew a piece of parafilm of 0.5 g for 5 min and then to spit out their saliva into a pre-weighed cup for 5 min. The saliva flow was calculated from the weight of saliva, assuming 1 g being equal to 1 mL.

The present part design was approved by the "comité de protection des personnes" CPP Est-1 [N° RCB: 2016-A01250-51].

Table 3 sets out the characteristics of the subjects making up the panel.

Table 3 Composition and characteristics of the panel.
Data are presented as the mean ± the standard deviation

	Women (n=21)			Men (n=17)		
Age	71.1	±	4.9	73.5	±	5.5
Number of functional units	8.3	±	1.1	8.2	±	1.0
Resting salivary flow ($mL.min^{-1}$)	0.27	±	0.16	0.38	±	0.2
Stimulated salivary flow ($mL.min^{-1}$)	1.45	±	0.57	1.93	±	1.0

III.1.1.2.3 Bolus studies

III.1.1.2.3.1 Chewing parameters

Chewing behavior was determined by video recording as described previously (Assad-Bustillos, Tournier, Septier, Della Valle, & Feron, 2017). The procedure was explained prior to starting: participants had to chew and swallow normally the food products whilst they were being filmed. The videos were then analyzed to record the number of chew cycles and swallowing time. One chew cycle was considered as the mandible movement upward and downward, the final number of chews was the sum of chew cycles from when the participant placed the food inside the mouth up until the action of the first swallowing.

III.1.1.2.3.2 Rheological parameters

In order to study the rheological properties of the bolus, participants were invited to eat the food product and then to spit it out in a receptacle at the point when they are ready to swallow. The collection vessel was a transparent plexiglas block which was used in the subsequent rheology tests. The collection vessel had the following dimensions: 3.5 x 3.5 cm with a hollow cylinder of 2.3 cm diameter and 3.0 cm height (Figure 2).

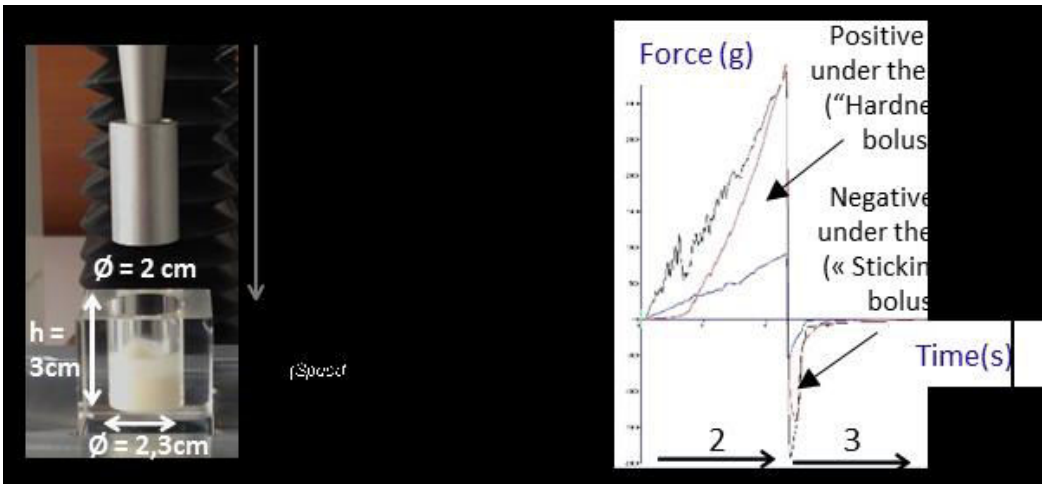


Figure 2: Device used for bolus compression test, and typical data obtained

The rheological properties of the food bolus were then studied by a compression test performed with a TAX-T2 texture analyzer (Texture Technologies Corp, Hamilton, USA). A cylinder-piston of 2.0 cm diameter descended until the detection of the bolus at which point it first compressed the bolus by 90 % (at a speed of 50 % bolus.s^{-1}) and then went up with a speed of 5 mm.s^{-1}. The area under the positive part of the curve (Figure 2) is used to define the "Hardness of bolus". It displays the energy required for the piston to travel down to its final position. The area under the negative part of the curve (Figure 2) is used to define "Stickiness of bolus". It represents the energy needed to raise of the piston back to its initial position.

III.1.1.2.3.3 Insalivation

The quantity of saliva incorporated in the bolus is calculated following the procedure described by Drago et al. (2011). The dry matter content and the weight of food taken to the mouth were already known. By measuring the weight of bolus spat out and its dry matter content (after drying in an oven at 130 °C over 24 h), the percentage of saliva incorporated per g of food was calculated as followed:

$$\text{g saliva / g of food} = ((\text{bolus}_{WC}/\text{bolus}_{DM}) \times \text{food}_{DM}) - \text{food}_{WC}$$

Where WC means water content and DM means dry matter.

The amount of food coating in the mouth was also calculated by the formula below:

$$\text{Food in mouth (g)} = ((\text{food}_{M} \times \text{food}_{DM}) - (\text{bolus}_{WC} \times \text{bolus}_{DM})) / \text{food}_{DM}$$

Where DM means dry matter and M means mass (g)

III.1.1.2.4 Food comfortability

Food comfortability was evaluated through the use of a questionnaire following a procedure described previously by Vandenberghe-Descamps, Sulmont-Rossé, Septier, Feron, & Labouré (2017). Briefly, the questionnaire comprised five parts. The first section was general questions on food comfort. The second section which was on bolus formation included six items: the ability to bite the food with incisors (and the same with premolars), the ability to masticate and moisten the food, the time needed to form the food bolus and the ability to swallow. The third section focused on pain perception defined under five terms: a burning or spicy sensation, and muscular, articular, dental, and gum pain. The fourth section was on texture perception which was evaluated by scoring the intensity of eight descriptive parameters: sticky, stringy, greasy, dry, doughy, melting, firmness, and hardness. The fifth section was on flavor perception described by five parameters: taste intensity and the qualities, salty, sugary, acidic, and bitter.

During the sessions, the volunteers were invited to eat a portion of three grams of the cheese model prior to each of the 5 parts of the questionnaire. They were free to drink as much as they needed during the session. The sessions were conducted in a sensory room set out with individual booths following the AFNOR standard (AFNOR, 1987) and illuminated with white light. The room temperature was 20.5 ± 0.5 °C.

III.1.1.2.5 Experimental procedure

The study took place in two distinct sessions. The first related to answering the questionnaire and the second to collect samples for characterizing the bolus. For each session the four cheese models were presented in a different order predetermined by a William Latin square design. The four food products were coded with a three-digit number, and portions of 3 g were freshly prepared for the session and kept at 4 °C. Each participant performed each of the two types of session in duplicate, making 4 sessions in total. During the first session, after the collection of the saliva at rest and when stimulated, the participants completed the food comfortability questionnaire. The second session was performed approximately one month later. On this occasion, the flowrate of saliva at rest and when stimulated were once again measured. Then the participants were filmed whilst eating each of the 4 food products, and finally the bolus formed was collected for the compression test (performed immediately after collection) and to measure the quantity of saliva incorporated into the bolus.

III.1.1.2.6 Statistical analysis

Statistical analysis were performed using R-studio software version 3.3.1 with the “lmerTest” package for linear mixed models (Kuznetsova, Brockhoff, Haubo, & Christensen, 2015) and the “multcomp” package for post hoc analyses (Hothorn et al., 2016).

One-way analyses of variance (ANOVA) were performed to test if a significant difference existed between the food products for each variable. Subjects were treated as a random effect. Post-hoc comparisons were performed using the Holm–Bonferroni test. The threshold for significance was set at 5 %. Means were associated with their standard errors. Finally, a multiple factor analysis (MFA) was performed with the package “FactoMineR” (Husson, Josse, Le, Mazet, & Husson, 2017).

III.1.1.3 Results & Discussion

III.1.1.3.1 Products characteristics affected chewing parameters and bolus properties

III.1.1.3.1.1 Chewing was significantly affected by the type of cheese models

Comparing the four cheese models showed that chew duration of the Processed and Soft products was significantly lower than that for the Whipped and Hard products (Table 4). The chew number of the four cheese models were also significantly different with the following order: Processed (21 cycles) < Soft (24 cycles) < Whipped (32 cycles) < Hard (35 cycles). The chewing frequency also varied with the cheese model. The Whipped and Processed products needed a faster chewing frequency than in the case of the Hard and Soft products (Table 4).

Finally, as shown in previous studies, the hardness of the cheese models was positively correlated with the necessary chewing time (Chen, 2009; Peyron, Lassauzay, & Woda, 2002; Woda et al., 2006). The Whipped product was a special case because it required more chewing time with a higher cycle number. However, the frequency was lower. It is likely that the product characteristics led to a self-adapting masticatory frequency in order to form a cohesive bolus. Indeed, it has been shown for a group of 50 individuals consuming cheese that different chewing strategies are applied depending on the hardness and the fat content of the food product (Yven et al., 2012). Other studies showed an impact of some

texture attributes such as elasticity and adhesiveness, on the chewing frequency (Guo, Ye, Lad, Dalgleish, & Singh, 2013; Jalabert-Malbos, Mishellany-Dutour, Woda, & Peyron, 2007). Indeed, it was demonstrated that an increase in the elasticity of the products was linked to an increase in the masticatory frequency, and that an increase in adhesiveness resulted in a slowing down of the chewing frequency (Çakir et al., 2012; Foster, Woda, & Peyron, 2006).

*Table 4: Effects of food texture on mastication and bolus parameters. Data are presented as means ± the standard deviation. Different letters indicate significant differences between means *** <0.0001, **<0.001 and *<0.05.*

Parameter	p-value	Hard				Soft				Processed				Whipped			
Time of chewing (s)	***	27	±	*8*	*a*	19	±	*6*	*b*	18	±	*6*	*b*	28	±	*7*	*a*
Number of cycles	***	35	±	*11*	*a*	24	±	*8*	*c*	21	±	*8*	*d*	32	±	*9*	*b*
Chewing frequency ($chew.s^{-1}$)	***	1.31	±	*0.25*	*b*	1.28	±	*0.26*	*b*	1.19	±	*0.26*	*a*	1.16	±	*0.20*	*a*
Bolus Hardness ($g.s^{-1}$)	***	3520	±	*2440*	*b*	1641	±	*1173*	*c*	1606	±	*1263*	*c*	4146	±	*2161*	*a*
Bolus Stickiness ($g.s^{-1}$)	***	-432	±	*260*	*b*	-316	±	*160*	*a*	-336	±	*210*	*a*	-596	±	*353*	*c*
Bolus Humidity (g of saliva / g of product)	***	0.60	±	*0.27*	*b*	0.45	±	*0.23*	*c*	0.46	±	*0.27*	*c*	0.82	±	*0.34*	*a*
Food in mouth (g)	***	0.40	±	*0.12*	*b*	0.42	±	*0.16*	*b*	0.48	±	*0.14*	*a*	0.42	±	*0.14*	*b*

III.1.1.3.1.2 Bolus rheological parameters are significantly affected by the cheese model consumed

The bolus formed from the Whipped product was the hardest, the stickiest and the most humid, whilst that of the Soft and Processed products were the softest, the least sticky and the driest (Table 4) and that of the Hard product displayed an intermediate behavior. The bolus from Soft and Processed products were similar with the major difference being the quantity of residual food in mouth (greater in the case of the Processed product) (Table 4). The Whipped and Hard products were chewed longer which may explained the higher quantity of saliva incorporated. The boluses of the Processed and Soft products were formed fairly quickly. They were softer and drier than the boluses formed from the Hard and Whipped foods (Table 4). As already reported, as the time for chewing lengthens, more saliva becomes incorporated into the bolus (Devezeaux de Lavergne et al., 2015). However, the amount of saliva incorporated in the bolus can be also strongly impacted by the production rate of saliva (Drago et al., 2011; Engelen, Fontijn-Tekamp, & Bilt, 2005). In this study, the correlation (r^2) between the chewing time and the bolus humidity were 0.35, 0.22, 0.22 and 0.24 for the Soft, Process, Hard and Whipped products respectively (with a significant correlation only in the case of the Soft product). However, the correlation is much more important when the production rate of saliva is taken into account. Thus, the correlation between the mastication time multiplied by the stimulated salivary flow and bolus humidity were 0.41, 0.33, 0.34, 0.38 for Soft, Process, Hard and Whipped product respectively (with a significant p-value in all four cases ($p<0.001$).

It is interesting to note that a larger quantity of saliva incorporated into the bolus does not necessarily lead to a “softer” bolus. Indeed, whilst the Hard and Whipped bolus were the most humid, they were also the hardest and stickiest (Table 3). Conversely, Drago, *et al* (2011) reported that a higher bolus water content led to less adhesiveness of the bolus.

Numerous studies on food have demonstrated the direct link between the increase of the food hardness on the mastication time and the number of chewing cycles (Guo et al., 2013; Laguna & Sarkar, 2016; Laguna, Hetherington, Chen, Artigas, & Sarkar, 2016; Park, Kim, Lee, & Park, 2017). However, the fat content had also a major impact on the extent of mastication (Yven et al., 2012). Indeed, Yven *et al* (2012), demonstrated that hard and low-fat cheeses required a longer chewing time than soft and high-fat cheeses. Furthermore, Foster et al. (2006) demonstrated that whether hard and elastic or hard and plastic in texture, such food types both needed more chewing cycles. The natural chewing process is to allow a sufficient food breakdown to take place with enough saliva to be incorporated so to form a coherent bolus safe for swallowing.

III.1.1.3.2 The effect of cheese model on its comfortability

The scores for comfort in-mouth are overall positive because they are exceeded 48 on a scale 0-100. Processed and Soft products were considered as the most comfortable, the Hard product as moderately comfortable, and the Whipped product was ranked as between uncomfortable and moderately comfortable (Table 5).

All the variables characterizing the perception of the bolus formation had a score higher than 60/100 indicating that the bolus was relatively easy to form. Furthermore, the ease of forming the bolus was significantly different between the four cheese models. The Whipped and Hard products seemed more difficult to chew and took more time before swallowing (Table 5). The Whipped product was considered more difficult to humidify (Table 5). Nevertheless, the panel did not report any pain when eating any of these four dairy products (score <2/100 for all the related items in the questionnaire).

Questions on the food texture enabled a better understanding of the perception of the product texture by the elderly people. The Hard product was characterized by a drier, firmer and harder texture. The Whipped product was described as having a stickier and dry texture. During the session, the panel members also mentioned a granular quality to the texture, but this item was not included in the questionnaire. The Soft and Processed products were judged to be more similar. They were characterized by a melting, not dry and not hard texture. The Processed product only differed from this sticky and greasy texture.

The last part of the questionnaire, which focused on the flavor perception, revealed few differences between the four products. This was expected since all the cheese model had the same composition. However, a higher intensity of flavor was still distinguished for the Processed product. This might be explained by the influence of texture on flavor as this product was perceived more sticky and greasy, suggesting a higher coating in the mouth and cheeks, and thus an enhancement of the stimulation of the flavor receptors (Tournier, Sulmont-Rossé, Guichard, & Benkeblia, 2007).

Table 5: Results from the questionnaire on the perception of food comfortability

¤ ₯ т ↕ д IX↑ т ↑ Ц II ⁊ т ↕ ь ↑ IX I ℏ ↑ IX ℨℏℏ ℭ II Ц ⅓ ⅓ д Ц ↕ т ↕ ♔ С IX↑

0 indicates impossible and 100 indicates very easy. For the section ♔ ix Ц ℭ II ♔ ☞ ♔ ix↑ IXo ↺д ↑ ↑ т ⇋ ↑ ↺

*0 indicates not at all and 100 indicates extremely. Data are presented as mean values ± the standard deviation. Different letters indicate significant differences between means *** <0.0001, **<0.001, *<0.05 and ns means no significant.*

Section heading	Parameter	p-value	Hard				Soft				Processed				Whipped			
General comfort																		
	comfort	***	54	±	*22*	b	76	±	*15*	a	76	±	*14*	a	48	±	*18*	c
	easy	***	73	±	*17*	b	88	±	*11*	a	87	±	*14*	a	64	±	*17*	c
Bolus formation																		
	incisor	***	88	±	*13*	b	96	±	*8*	a	94	±	*11*	a	88	±	*19*	b
	molar	***	89	±	*10*	b	96	±	*7*	a	96	±	*8*	a	89	±	*16*	b
	masticate	***	84	±	*14*	b	94	±	*8*	a	92	±	*14*	a	82	±	*19*	b
	humidify	***	63	±	*17*	b	80	±	*13*	a	80	±	*13*	a	59	±	*18*	c
	swallow	***	73	±	*15*	b	87	±	*11*	a	87	±	*12*	a	67	±	*18*	c
	time	**	62	±	*16*	b	78	±	*12*	a	77	±	*15*	a	60	±	*18*	b
	burn	ns	4	±	*11*		3	±	*10*		4	±	*13*		5	±	*14*	
Pain																		
	muscle	ns	0	±	*3*		0	±	*0*		0	±	*3*		1	±	*5*	
	articular	ns	2	±	*6*		0	±	*3*		0	±	*0*		0	±	*3*	
	dental		0	±	*0*		0	±	*0*		0	±	*0*		0	±	*0*	
	gum	ns	1	±	*5*		0	±	*0*		1	±	*4*		0	±	*0*	
Product texture																		
	sticky	**	27	±	*21*	b	28	±	*13*	b	39	±	*16*	a	38	±	*23*	a
	stringy	***	11	±	*16*	b	4	±	*8*	c	3	±	*7*	c	20	±	*19*	a
	greasy	***	15	±	*17*	c	28	±	*18*	b	38	±	*18*	a	13	±	*16*	c
	dry	***	40	±	*23*	a	6	±	*11*	b	4	±	*8*	b	47	±	*28*	a
	dough	ns	36	±	*20*		35	±	*14*		39	±	*16*		36	±	*22*	
	firm	***	36	±	*17*	a	13	±	*14*	b	13	±	*16*	b	11	±	*16*	b
	melting	***	7	±	*12*	b	38	±	*16*	a	40	±	*19*	a	7	±	*15*	b
	hard	***	11	±	*13*	a	1	±	*5*	b	1	±	*4*	b	3	±	*8*	b
Flavor																		
	intense	***	12	±	*13*	a	16	±	*15*	a	20	±	*17*	b	10	±	*14*	a
	salty	ns	21	±	*16*		23	±	*16*		25	±	*16*		20	±	*14*	
	sugary	ns	1	±	*6*		3	±	*8*		4	±	*10*		2	±	*6*	
	acidic	ns	5	±	*10*		5	±	*11*		5	±	*12*		8	±	*15*	
	bitter	ns	5	±	*12*		2	±	*8*		5	±	*12*		9	±	*18*	

Finally, the food comfortability is positively correlated with the ease of forming a bolus (r^2 of 0.54, 0.70, 0.69, 0.70 for “comfort” relating to the parameters “masticate”, “humidify“, “swallow” and “time” respectively all, p-values<0.001). The dry texture attribute is negatively correlated to the easiness to form a bolus and the food comfortability (r^2 of -0.6, -0.4, -0.6, -0.7, -0.6 for “dry” relating to the parameters “comfort”, “masticate”, “humidify”, “swallow” and “time” respectively, all p-values<0.001). The melting texture was positively correlated to the easiness to form a bolus and the food comfortability (r^2 0.5, 0.3, 0.6, 0.6, 0.6 for ”melting” relating to the parameters “comfort”, “masticate”, “humidify”, “swallow” and “time” respectively, all p-values<0.001).

To summarize, a food product is described as "comfortable" when the bolus is easy to form. Furthermore, some food textures influence positively or negatively the formation of this bolus. Thus, for those products that were perceived as dry and/or hard, the bolus was formed with more difficulty and thus perceived as less comfortable. In contrast, for the soft and melting products, the bolus was easier to form and therefore the food judged comfortable. (Hayakawa et al., 2014) likewise showed that eating difficulty could be positively correlated (r^2 = 0.84) to an elastic texture and negatively correlated (r^2 = -0.95) to the ease that food melted in the mouth.

III.1.1.3.3 Relationship between sensory perceptions (questionnaire) and bolus formation characteristics

Measurements performed on the food bolus enabled the identification of correlations between the perception qualities (evaluated in the questionnaire) and the observed parameters of the bolus and chewing properties. A multifactorial analysis (MFA) (illustrated in Figure 3) highlights the relationships between the sensory perception parameters and measurements on the bolus formation.

The first dimension of the MFA explains 75 %. Parameters relating to food comfortability (green), bolus formation (blue) and bolus characteristics (red) are all depicted on this dimension (Dim1) (Figure 3), indicating a positive relation between this group. Some opposing attributes to the food comfortability are the number of chewing cycles and the chewing time (before swallowing), the bolus humidity and hardness.

For example, when a product required more chewing time to form a bolus, the participants indicated this on the questionnaire and thus, they considered the product less comfortable. Therefore, the perception of the bolus formation by elderly people is consistent with the physical measurements performed on the bolus and chewing observed during the bolus formation. Only some of the texture parameters (pink in figure 3) are represented on the first dimension of the MFA. For the four cheese models tested, those that had a melting and greasy texture perception were considered to be easier in forming a bolus and thus more comfortable. The boluses formed from the cheese models that were described as dry, stringy and difficult to form, were thus finally considered as less comfortable food products. The hard and firm texture are represented only at 48 % and 19 %, respectively, on the first dimension of the MFA, indicating a low relation between these textures and the in-mouth comfort.

The second dimension of the MFA explains 20 % of the inertia and separates the samples as a function of texture perception and chewing frequency. In the positive direction (the top of the figure), are the cheese models with sticky texture or with a slower chewing frequency and in the negative direction, the firmer cheese models with a quicker chewing frequency.

Figure 3 : Multifactoriel Analysis (MFA) plots.

(A) represents the variable plot. The variables are colored by group of variables.

(B) represents the plot of individuals with the partial representation of each product in function of group of variables. By considering independently the representation of each product according to a single variable group (a single color), it illustrates the differences in the four cheese models in term of bolus formation measurements (red), mastication parameters (yellow), confort (green), bolus formation perception (blue) and texture perception (pink).

Only groups of variables that enable discrimination of the 4 cheese models are used for the MFA.

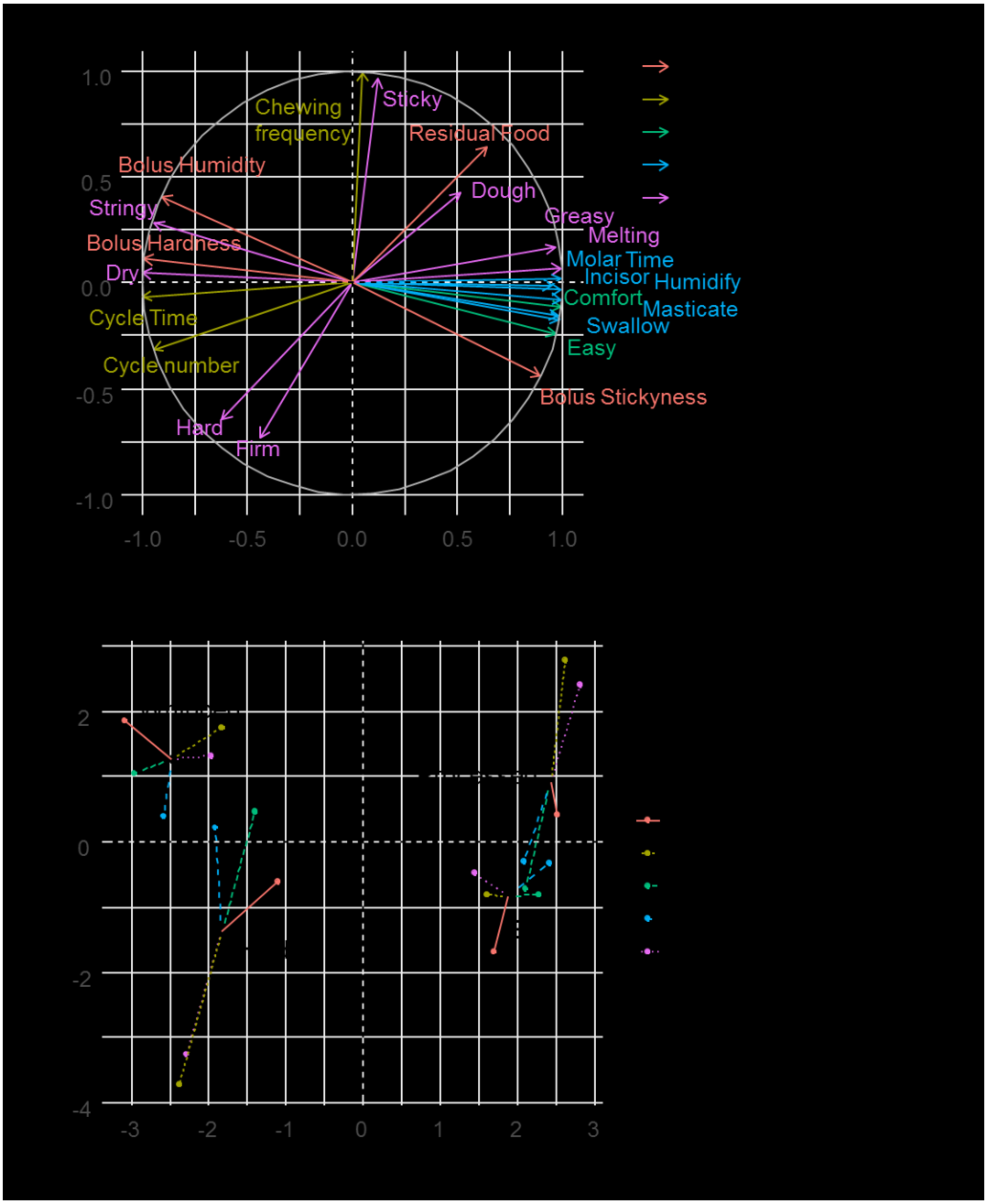


Figure 3 B illustrates the differences in the four cheese models in term of texture perception, mastication parameters and bolus formation measurements. When considering food comfortability and bolus formation perception, only two groups can be distinguished; (i) those products that are judged comfortable and which form a bolus easily (the Soft and Processed products), and (ii) those products where the bolus is not easily formed and which are judged less comfortable (Whipped and Hard products).

Other workers have reported that harder foods stayed longer in mouth (Lassauzay, Peyron, Albuisson, Dransfield, & Woda, 2000), and were more difficult to eat (Çakır et al., 2012; Laguna & Sarkar, 2016; Laguna et al., 2016). This longer oral residence time in the mouth is linked to an additional effort to form the food bolus, which can explain why the food is considered less comfortable to eat. In the case of liquid food, it has been shown that oral residence time had a linear relationship with the sensed difficulty of swallowing. Chen & Lolivret (2011) suggested that a type of food that feels difficult to swallow is retained longer in the mouth, leading to difficulty in swallowing.

The elastic, dry and granular texture of the Whipped product was more difficult to manipulate in the mouth during the bolus formation. It is likely that more effort is needed to form a bolus from a food with a dry texture than food with a hard texture (Laguna & Sarkar, 2016; Laguna et al., 2016; Lassauzay et al., 2000). This additional effort to achieve a cohesive bolus leads to eating difficulties thus reducing the perceived comfortability of the food.

In this study, food comfortability is strongly correlated with the perceived ease of eating. Laguna *et al.* (Laguna & Sarkar, 2016; Laguna et al., 2016) worked on the perceived difficulty of eating and their results were comparable to ours. Indeed, there are links between the time of mastication, the ease in breaking down ingested food to form a cohesive bolus and the related eating difficulty. In a same way, Tarrega, Quiles, Morell, Fiszman, & Hernando (2017) showed that in general, liking increased for samples considered “easy to chew”. It seems that the effort to create a bolus directly impact the food comfortability in the case of young adults, as well as for the elderly, as reported by several workers (Hayakawa et al., 2014; Laguna & Sarkar, 2016; Laguna et al., 2016).

III.1.1.4 Conclusions

Results of this study showed that bolus formation, its properties and the perceived food comfortability were all affected by the texture of the four studied cheese models.

Soft and Processed cheese models exhibited the lowest fracture force and their textures were judged soft, melting and greasy. The boluses formed from these products were softer and perceived easy to form. Consequently, this type of food product was judged comfortable.

As expected, the Hard product required the highest fracture force and was perceived as the hardest of the four test foods by the elderly making up the evaluation panel. In this case the bolus was moderately easy to form (based both on measured parameters and the perception of the bolus formation) but the cheese model was less comfortable than the others.

The Whipped product was soft but elastic, and its texture perceived as dry, sticky and granular. The bolus of this cheese model was difficult to form (evident from both the measured parameters and the perception of the bolus formation). Thus, the elderly considered this product as the least comfortable.

This work focused principally on product effects rather than subject effects. However, considering that oral capacities are altered with age, it would be interesting to know if during the consumption of such food products whether the oral health of the elderly can influence the bolus formation and the perceived food conformability.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge with thanks the financial support from the French National Research Agency received as part of the AlimaSSenS [ANR-14-CE20-0003-01] fund. Lactalis also provided financial inputs to the project.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The authors include two members of staff of Lactalis.

III.1.2 Effet de la santé buccodentaire des personnes âgées sur le confort en bouche

Cette partie est basée sur le projet d'article suivant :

The influence of oral health of the elderly on the bolus formation and food comfortability of model cheeses

L. Lorieau [1], J. Floury[1], C. Septier [2], A. Laguerre [2], L. Le Roux [1], E. Hazart [3], A. Ligneul [3], D. Dupont[1], E. Vigneau[3], M. Hanafi[3], G. Feron [2], H. Labouré [5*]

[1] 1 INRA – UMR STLO Science & Technology of Milk & Eggs, INRA Agrocampus, France
[2] INRA - UMR CSGA Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, France
[3] Lactalis Recherche et Développement, France
[4] ONIRIS, France
[5] Agrosup Dijon, France

*Corresponding author: helene.laboure@inra.fr

Target journal: Food and Function

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the impact of oral impairments of elderly people on food comfortability and bolus properties during the consumption of cheese models.

A panel of 72 elderly persons (ages 66 to 88) classified in two groups according to their dental status (poor vs. satisfactory) was recruited. The panel was also presenting a range of salivary flow rates. Four cheese models with an identical composition but different textures (Soft, Hard, Processed and Whipped) were tested. The food comfortability was assessed by means of a questionnaire based on general oral comfort, bolus formation, pain, texture and flavor perception. The time and number of chewing cycles required to form the bolus were measured. The rheological properties of the bolus were studied, as well as the incorporated saliva.

While the oral comfort and the different items evaluated in the food comfortability questionnaire were poorly associated with oral health of the subjects, the bolus characteristics were in contrast significantly different. In fact, people with a poor dentition made harder and less sticky bolus than people with a satisfactory dentition. Moreover, for the subjects with a poor dentition, the quantity of saliva incorporated into the bolus was correlated with the stimulated salivary flow rate, which was not the case for subjects with a satisfactory dentition.

To complete this work, it will be interesting to study the signals of the chewing ending and the swallowing triggering because they seem to be impacted by the oral health and to influence sensory perceptions.

GRAPHICAL ABSTRACT

III.1.2.1 Introduction

In the majority of developed countries, the proportion of elderly people in the population is growing rapidly. In Europe, while currently 17 % of the population is over 65 years old and 5 % is over 80 years old, estimations indicate that by 2060, those over 65 will represent almost 30 % of the population and those over 80 will account for 12 % (Mak & Caldeira, 2014).

Aging is usually associated with health alterations. First, aging usually involved a muscle fatigue accompanied by a bite force diminution and a tongue motor decline (Mioche et al., 2004; Peyron et al., 2017). These phenomena lead to a drop in masticatory performance (Woda et al., 2006). In addition, between 2004 and 2006, 27 to 35 % of seniors (aged 75-85) living in European countries are victims of edentulism (Müller et al., 2007). Edentulism is also responsible of a decrease in masticatory efficacy (Woda et al., 2006). Moreover, it is known that during aging, salivary flow decreases. Vandenberghe-Descamps et al. (2016) observed a decrease of 38 % for the stimulated and resting salivary flow between autonomous elderly and young adult. Saliva is essential to form a cohesive and easy-to-swallow bolus, this may be related to bolus formation difficulties or swallowing. Finally, with age, sensory performances globally declined. Older people perceive less taste intensity than young adults. In fact, they are less sensitive to changes in aromatic profile and somatosensory sensation (Aguilera & Park, 2016; Doets & Kremer, 2016). In general, there is a global decline of all functions that facilitate eating (that take into account difficulties in handling, opening and transport of the package, in addition to the alteration of oral and sensing capabilities) (Laguna, Sarkar, Artigas, & Chen, 2015). Recently, the eating capability score has been set up to evaluate the impact of these alterations appearing during aging on difficulties and pain during eating (Laguna et al., 2016).

To compensate these oral disorders, research has shown that elderly people increase their chewing time and/or the number of chewing cycles, and swallow large food particles (Mishellany-Dutour et al., 2008; Peyron et al., 2017; Woda et al., 2006). At any age, the act of eating must remain a pleasant sensory experience and a source of pleasure (Grunert & Wills, 2007). However, to our knowledge, few studies are interested in the pleasure of eating and the oral comfort, especially among the elderly. Recently, Vandenberghe-Descamps et al. (2017) studied the impact of the dental status and the salivary flow on the perception of the food comfortability on a large array of food using a questionnaire (Vandenberghe-Descamps, Labouré, Septier, Feron, & Sulmont-Rossé, 2017). Results showed that oral comfort is a multi-dimensional concept including the bolus formation perception, sensory and pain sensations. They also showed that, for both groups of food products tested (cereal or meat products), the oral health did not influence the oral comfort and the bolus formation perception, but some sensory sensations were significantly affected by the oral health. Thus, it is essential to develop foods for the elderly, which meet both their nutritional needs but also their sensory preferences. These foods must maintain the "enjoyment to eat" (Grunert & Wills, 2007) in order to maintain an appropriate food intake (Maitre et al., 2014).

For this purpose, dairy products are a relevant solution to improve the nutritional status of the elderly and to prevent sarcopenia and bone fragility. Indeed, dairy products are rich in protein, which is an essential nutrient to stimulate the muscle synthesis (Miller, 2007). In addition, whey proteins have been shown to stimulate muscle synthesis more effectively than caseins (Katsanos et al., 2006; 2008). Dairy products also have the advantage of being rich in calcium which would prevent bone demineralization (Theobald, 2005). Finally, dairy products exist in a large diversity in terms of taste, texture and food use.

In this context, relationships between oral health, chewing, food bolus properties and food comfortability regarding dairy products will be explored and discussed. On this purpose, four cheese models identical in term of nutritional composition, but different by the type of texture (Soft, Hard, Processed and Whipped) were designed to look like some market cheeses. These products were consumed by a panel of 72 autonomous elderly people with/without oral impairment (dental and salivary flow), and their sensory characteristics were evaluated.

III.1.2.2 Materials and methods

III.1.2.2.1 Cheese models

III.1.2.2.1.1 Preparation

The cheese models were based on an emulsion of whey proteins with cream heated in order to induce a gel. A range of processing conditions were used to obtain the four defined cheese textures from the same source material. These products are subsequently referred as “Soft”, “Hard”, “Processed” and “Whipped”. To avoid the effect of product taste on the food comfortability, the products were not flavored and had the same taste.

The cheese models were formulated from 24 % (w/w) of whey protein (95 % whey protein, Pronativ®, Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France), 20 % (w/w) of fat provided by dairy cream (Crème Fleurette 30 % Casino, Saint Etienne, France), 0.6 % (w/w) of NaCl (European Salt Company, Hannover, Germany), 0.5 % (w/w) of $CaCO_3$ (Quimdis, Levallois-Perret, France). The pH of the Processed and Whipped products was lowered from 6.4 (pH of the Hard and Soft products) to 5.6 and 5.2 (± 0.10) respectively, by adding 1% and 1.8 % of Gluconodeltalactone (GDL) (Roquette, Lestrem, France). A certain amount of water was finally added to the mix in order to reach the different concentration targeted. The dry matter of the products was of 50 ± 1 %. All components were mixed for one hour at 37 °C and 300 rpm into a blender (Thermomix TM5, Vorwerk, France). To prepare the Hard and Processed products, the emulsion was first transferred in sealed plastic cylindrical containers (inner diameter 26 mm, Darmini Darmex Casing caliber 28, MCM Casing, Lucenay, France) and then the cylinders were heated by immersion in a water bath at 70 °C for 35 min for the Hard product, and at 75 °C for 17 min for the Processed product. For the Whipped product, the emulsion was first foamed using the blender at 500 rpm during 20 min (Thermomix TM5, Vorwerk, France), and 75 g of the mix was transferred into plastic cups (Pot 125 mL, RPC BEBO, Denmark). The cups were sealed and immersed in a water bath at 75 °C for 80 min. The products were finally stored for a maximum of one month at 4 °C.

III.1.2.2.1.2 Rheological properties

For the Hard, Soft and Processed cheese models, a compression test was performed. Samples of 20 mm height and 26 mm diameter were compressed to 70 % with a 30 mm diameter flat-ended cylindrical probe. The force-time curves were recorded at a constant crosshead speed of 30 $mm.s^{-1}$. The Hard product was analyzed by a texture analyzer Instron (Elancourt, France) with a 1 kN load cell. The Soft and Processed products were analyzed with a double-bite compression test, by the texture analyzer Lloyd TA 1 (AMETEK, Lloyd Instruments, Elancourt, France), with a more precise load cell at 100 N. The test was set to have the same first compression as the one used for the Hard product. A double-compression

cycle test was used to obtain 70 % compression of the original sample height. The cross-head speed was 30 mm.s^{-1}. No time was allowed to elapse between the two compression cycles. Because of the foaming, the Whipped product has a completely different structure, it was therefore not possible to conduct the same compression test than for the three other cheese models. For this Whipped product, a double-bite compression was performed with a 20 mm diameter flat-ended cylindrical probe using the texture analyzer Lloyd TA 1 with a 100 N load cell. 20 x 30 x 30 mm cube of samples were compressed twice at 85 % of the original sample height with a constant crosshead speed of 100 mm.s^{-1}. No time was allowed to elapse between the two compression cycles. .

Each test was performed three times per batch for each product (3 repetitions x 8 batches = 24), placing the sample on a flat platform at a room temperature. Values of the fracture force (N) (defined as the force required to cause the first fracture), the adhesive force (N) (defined as the minimum force reached) and the springiness (rate at which the sample returns to its initial height size between 0 and 1) (Bourne & Comstock, 1981; Pons & Fiszman, 1996) are reported in Table 1.

*Table 1: Rheological properties of the four cheese models. Data are presented as means ± the standard error. Different letters indicate significant differences between means (p<0.05). *** means <0.0001, **<0.001 and *<0.05. The test parameters for the Whipped product was different, so the results cannot be compared.*

Variables	p-value	Hard	Soft	Processed	Whipped
Fracture force (N)	***	108.25 ± *19.5* *a*	15.65 ± *7.96* *b*	8.88 ± *3.99* *b*	5.93 ± *1.34*
Adhesive force (N)	***		-1.90 ± *0.85* *b*	-8.19 ± *4.13* *a*	-0.08 ± *0.02*
Springiness	*		0.28 ± *0.15* *b*	0.20 ± *0.11* *a*	0.71 ± *0.05*

The Hard product was characterized by a fracture force 7 to 12 times higher than that of the Processed and Soft products. The Processed and Soft products had a similar fracture force, but the Processed one was more adhesive and less spring. The springiness of the Whipped product was high, which means that this product had almost preserved its original height after the first compression.

III.1.2.2.2 Participants

III.1.2.2.2.1 Recruitment

Seventy-two volunteers (39 women, 33 men) aged from 66 to 88 years participated in the study. The selected participants had to be over 65 years old, living at home, had no recent pathologies or during the experiment, had a score of at least 24 on the mini mental state evaluation (MMSE) (Folstein et al., 1975), and had a number of functional units less than 4 or superior to 7. A functional unit was defined as a pair of posterior opposing teeth (premolars and molars) that had at least one contact area during chewing. Depending on the number of functional units, participants were classified within two different groups. A satisfactory dental status was considered to be of at least 7 functional units. Conversely, a poor dental status was considered to be inferior or equal to 4 functional units (Vandenberghe-Descamps et al., 2016). The characteristic of each group is reported in table 2. The number of functional units was

evaluated visually by a dentist at bare eye, and also by asking participants to chew a 200 µm thick articulating paper according to the procedure described by Vandenberghe-Descamps et al. (2016).

III.1.2.2.2.2 Saliva flow measurements

The resting and stimulated salivary flow was measured during each session as described by Vandenberghe-Descamps et al. (2016). The saliva at rest was quantified by instructing the participant to allow their saliva to flow into a pre-weighed screw-cap cup every time they felt like swallowing over a period of 10 min. The stimulated saliva was collected by asking the subjects to chew a 0.5 g piece of parafilm for 5 min and then to collect their saliva into a pre-weighed cup for 5 min. The saliva flow was estimated from the weight of saliva, assuming 1 g being equal to 1 mL.

The present part design was approved by the "comité de protection des personnes" CPP Est-1 [N° RCB : 2016-A01250-51].

Table 2 gives the characteristics of the panels

*Table 2: Characteristics of the panel. ns: no significant, ***: p-value<0.001*

	Dentals status	p-value	Satisfactory	Poor
Number			36	36
Age *(± standard error [range])*		ns	72.1 ± 5.2 [86-66]	74.1 ± 6.2[88-66]
Gender (% female)			55 %	53 %
Functional Unit *(± standard error)* Selection criteria		***	8.3 ± 1 ≥7	2.6 ± 1.5 ≤4
Saliva *(± standard error [range])*	Stimulated Flow ($mL.min^{-1}$)	ns	1.7 ± 0.8 [3.6-0.4]	1.5 ± 0.8 [3.8-0.2]
	Resting Flow ($mL.min^{-1}$)	ns	0.3 ± 0.2 [0.8-0.1]	0.4 ± 0.2 [0.8-0.1]

The panel was balanced in number and gender in each of the dental status groups. Moreover, no effect of the dentition on the salivary flow was observed as previously showed by Vandenberghe-Descamps et al. (2016).

III.1.2.2.3 Food comfortability

Food comfortability was assessed using a questionnaire developed recently by Vandenberghe-Descamps et al. (2017). This questionnaire is composed of 5 sections grouping from 2 to 8 elements evaluated by structured scales. Each section of the questionnaire refers to the food comfortability. The first section was general questions about oral comfort. The second section focused on bolus formation. It included six elements: the ability to cut food with incisors and the same with premolars, the ability to chew and humidify food, the ability to swallow and the time needed to form the food bolus. The third section

focused on the perception of pain and included five elements: burning sensation or spice, and muscle, articular, dental and gum pain. The fourth section focused on the perception of texture and included eight items evaluated on their intensity: sticky, stringy, greasy, dry, doughty, pasty, melting, firm and hard. The fifth section dealt with the perception of flavor. It consisted of five elements: the intensity of taste and the salty, sweet, acidic and bitter perceptions.

During the sessions, the volunteers were invited to eat a portion of three grams of dairy product for each part of the questionnaire. They were free to drink as much as needed during the session. The sessions were conducted in a sensory room equipped with individual booths according to the AFNOR standard (AFNOR, 1987) and under white light. The room temperature was 20.5 ± 0.5 °C.

III.1.2.2.4 Bolus studies

III.1.2.2.4.1 Chewing parameters

Chewing parameters were determined by video recording as described previously by Assad-Bustillos et al. (2017). Participants were instructed to chew and swallow normally the product while they were filmed. The videos were analyzed to count the number of chewing cycles and measure the time to swallow. A chewing cycle was considered to be the upward and downward movement of the mandible. The final number of cycles was the sum of the cycle number from the moment where the participant placed the food in the mouth until the action of the first swallowing.

III.1.2.2.4.2 Rheological parameters

Bolus rheological parameters were determined by a compression test as described previously by Lorieau et al. (submitted). The participants collected their bolus by spitting it when they wanted to swallow it. They collected it directly in the rheology module, which was a 3.5 x 3.5 cm plexiglass block hollowed with a cylinder of 2.3 cm diameter and 3.0 cm height. The rheological test was performed immediately after collection of the bolus.

The rheological properties of the food bolus were studied by a compression test performed with a TAX-T2 (Texture Technologies Corp, Hamilton, USA). A cylinder-piston of 2.0 cm diameter went down until the detection of the bolus. When the device detected the bolus, it compressed the bolus by 90 % (with a speed of 50 % bolus.s^{-1}) and then went up with a speed of 5 mm.s^{-1}.

The positive area under the curve is named “Hardness of bolus”. It represents the energy required for the piston to go down to the related height. The negative area under the curve is named “Stickiness of bolus”. It represents the energy needed to raise of the piston into its initial position.

III.1.2.2.4.3 Insalivation

The quantity of saliva incorporated in the bolus is calculated as described by Drago et al. (2011). The dry matter content of the product and the weight of food introduced in the mouth were known. By measuring the weight of spit bolus and the dry matter content of the spit bolus after dehydration in an oven at 130 °C during 24 h, the percentage of saliva incorporated by gram of product were calculated as followed:

$$\text{g saliva / g of food} = ((\text{bolus}_{WC}/\text{bolus}_{DM}) \times \text{food}_{DM}) - \text{food}_{WC}$$

Where WC means water content (g) and DM means dry matter (g).

The amount of food remaining in the mouth was also calculated as:

$$\text{Food in mouth (g)} = ((\text{food}_{M} \times \text{food}_{DM}) - (\text{bolus}_{WC} \times \text{bolus}_{DM})) / \text{food}_{DM}$$

Where DM means dry matter and M means mass (g)

III.1.2.2.5 Experimental procedure

The study was conducted in two sessions. The first session concerned the food comfortability questionnaire and the second the chewing and bolus characteristics. Each session was conducted twice for each participant in total: 4 sessions per participant. During the first session, after the collection of the resting and stimulated saliva, the participants had to answer the questionnaire of food comfortability. The second session was performed about one month later. For this second session, after collecting the resting and stimulated saliva, the participants were filmed during the eating of each product, and finally the bolus was collected for the compression test and the measurement of the amount of saliva incorporated into the bolus. For each session, the products were presented to the participants in a different order determined by a William Latin square. Three grams portions of products were freshly prepared for the session, coded with a three-digit number and stored at 4 °C.

III.1.2.2.6 Statistical analysis

III.1.2.2.6.1 Analysis of variance and covariance

To investigate the impact of oral health status on food comfortability, chewing parameters and bolus parameters, a two-way Analysis of Covariance (ANCOVA) model with interaction (dental status + stimulated salivary flow + dental status

salivary flow and the variable were calculated for each group of dentition with the function “rcoor.adjust”.

III.1.2.2.6.2 Multi Factorial Analysis on an average product

In order to consider all the measured variables simultaneously and their organization in several blocks, i.e. the block of the food comfortability items, the block of the chewing characteristics and the block of the instrumental bolus parameters, the multiblock method called Multiple Factor Analysis (MFA) were performed (“MFA” function (Kostov, Bécue-Bertaut, & Husson, 2013) on the package FactoMineR (Husson, Josse, Le, & Mazet, 2017; Husson et al., 2017)). More precisely, two MFA were conducted: a first MFA for the "Satisfactory Dentition" group and a second for the "Poor Dentition" group. The objective was to study in a global way, for each of these two groups, the links between the four blocks of variables.

Moreover, let us remark, that each block of data is available for each of the four type of products, and at the other hand, that the aim with MFA is to study the relationships between the different blocks of collected data. Before performing MFA, each data set by product was centered (to discard the product effect) and standardized (to discard the heterogeneity of variances between variables (arrow number 1 on the figure 1). Thereafter, the four transformed product’s matrices were averaged in order to consider an “averaged matrix” (arrows number 2 on the figure 1).

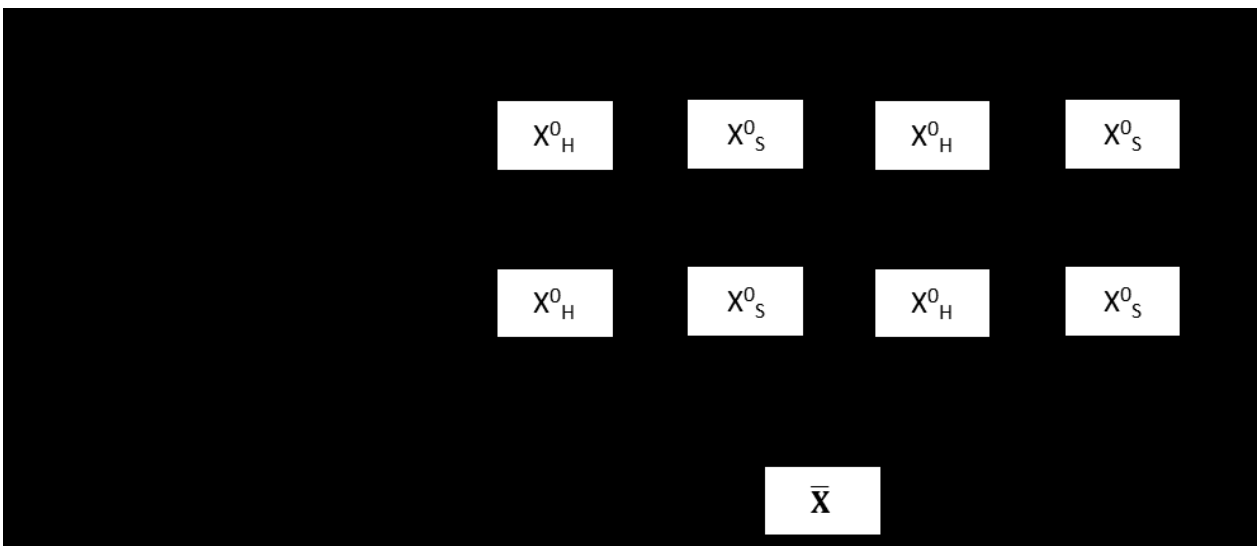


Figure 1: Strategy of data transformation to obtain a new data table representing an average product

III.1.2.3 Results and discussion

III.1.2.3.1 Effect of the dental status and the stimulated salivary flow on the food comfortability perception

*Table 3 ANCOVA model coefficients for items of the food comfortability questionnaire by products. Only the items significantly affected by the oral health (stimulated salivary flow and/or dental status) were reported. Significant coefficients (p-value<0.05) were in bold. F: Fisher ratio; p: p-value; *:p-value<0.05 **: p-value<0.001; µ: fixed effect; SFS: Stimulated Salivary Flow; Dent: Dental status (with satisfactory dentition as reference); Dent x SFS: interaction effect of the dental status and the stimulated salivary flow.*

Variables / Product		Hard			Soft			Processed			Whipped		
General comfort		SFS	Dent	Dent x SFS	SFS	Dent	Dent x SFS	SFS	Dent	Dent x SFS	SFS	Dent	Dent x SFS
Comfort	F p	0.00	**4.78***	0.16	2.41	0.13	0.73	2.54	1.20	3.15	0.62	1.05	1.53
	µ	-0.61	**-13.97**	2.36	-1.62	5.34	-4.21	0.67	9.03	-8.05	6.54	7.28	-7.63
Easy	F p	0.39	2.80	2.60	0.07	2.55	0.34	0.05	1.75	0.12	2.31	**4.17***	0.17
	µ	-1.75	-17.36	7.14	-0.22	-7.00	1.86	-0.78	-5.89	1.26	3.40	**-11.71**	2.13
Bolus formation													
Incisor	F p	0.99	1.25	**4.32***	0.98	1.28	0.58	1.06	0.68	2.15	3.15	0.15	0.25
	µ	-1.66	-14.90	**7.32**	0.11	-0.66	1.52	-0.42	-7.52	3.66	6.38	2.71	-2.75
Molar	F p	0.77	0.67	**4.26***	1.37	0.31	0.19	0.90	0.04	1.96	1.35	0.36	0.39
	µ	-1.60	-11.74	**6.11**	0.70	-0.54	0.90	-0.54	-4.92	3.28	4.19	2.43	-2.85
Masticate	F p	1.51	3.01	1.15	1.12	0.21	0.09	1.51	3.01	1.15	**3.80***	0.95	0.08
	µ	0.66	-11.73	4.06	1.99	2.59	-0.91	0.66	-11.73	4.06	**4.54**	-6.38	1.49
Humidify	F p	0.31	**5.73***	0.35	1.73	1.13	1.26	0.00	2.13	0.20	0.44	**7.35****	1.22
	µ	3.33	**-4.43**	-2.81	5.42	4.13	-4.80	1.20	-1.80	-1.85	5.67	**-2.05**	-6.10
Product texture attributes													
Sticky	F p	0.54	1.17	0.27	0.06	3.00	1.15	1.51	0.19	0.04	0.72	**4.54***	0.17
	µ	3.14	9.45	-2.90	2.05	11.45	-3.96	3.53	3.42	-1.02	3.24	**14.98**	-2.62
Greasy	F p	0.00	0.06	0.61	0.07	1.57	0.02	0.00	**5.47***	2.81	0.59	0.05	2.45
	µ	1.64	6.98	-3.74	-0.63	5.98	-0.73	3.30	**21.91**	-8.07	1.75	12.32	-7.17
Dry	F p	0.02	1.41	2.18	0.02	0.80	1.12	0.04	0.43	0.60	0.04	**6.37***	0.05
	µ	3.85	21.79	-9.70	-1.62	-3.23	3.44	-0.85	-1.89	2.02	0.55	**18.56**	-1.72
Dough	F p	0.35	1.63	0.75	2.16	1.92	0.02	0.16	0.10	0.96	0.01	**4.16***	0.32
	µ	0.38	14.14	-5.10	3.07	5.68	-0.66	3.29	9.02	-4.84	-2.07	**4.23**	3.45
Firm	F p	0.61	1.50	1.06	1.51	1.30	**4.60***	0.18	1.84	2.18	1.57	0.36	2.03
	µ	0.27	13.67	-5.36	1.61	18.00	**-8.87**	1.61	12.49	-5.35	-7.03	-9.39	7.36
Melting	F p	0.02	1.70	0.18	0.30	0.03	1.67	0.02	0.30	1.04	2.66	**7.21****	2.81
	µ	-0.27	-7.13	1.77	-1.84	-11.51	6.70	2.45	6.28	-5.32	8.47	**2.71**	-7.94
Flavor attributes													
Salty	F p	0.01	0.58	0.21	0.81	1.26	0.12	**5.35***	0.28	0.08	0.22	0.37	0.03
	µ	1.11	6.15	-2.10	-1.58	6.67	-1.58	**-5.85**	-0.22	1.28	-1.53	0.84	0.75
Sweet	F p	12.88	0.00	0.79	1.52	3.41	1.06	0.20	**4.79***	0.04	7.45	2.27	6.60
	µ	1.91	-2.03	1.27	0.00	0.00	0.00	0.00	**0.00**	0.00	0.00	0.00	0.00

III.1.2.3.1.1 Food comfortability and oral health

In Table 3, the two first lines (General Comfort) present the ANCOVA results for the first section of the food comfortability questionnaire. The two "comfort" and "ease" of eating items were strongly correlated (r^2 between 0.5 and 0.7 regarding the product, p-value: <0.001). People with a poor dentition considered the Hard product more comfortable than people with a satisfactory dentition (63/100 and 53/100 for the poor and the satisfactory dentitions, respectively. The score ranges was from 0 to 100, 0 indicated impossible and 100 indicated very easy). Similarly, people with a poor dentition assessed that the Whipped Product was easier to eat than people with a satisfactory dentition (73/100 and 65/100 for poor and satisfactory dentitions, respectively). Globally, according to whole panel, these two products were the least comfortable (50/100, 59/100, 77/100, 78/100 for the Whipped, Hard, Soft and Processed products, respectively). Thus, while it was possible to think that the difficulty of eating these products would be exacerbated by a poor dentition, our results showed the opposite. It should nevertheless be noted that while the Hard and Whipped products were considered less comfortable than the Soft and Processed products, they were not considered as uncomfortable, but only as "moderately comfortable".

Using the same questionnaire on a wider product range, Vandenberghe-Descamps, et al. (2017) did not show any significant effect of the oral health on oral comfort for meat and cereal products. In the same way, Assad-Bustillos *et al.* (2017), who studied cereal products, did not detect any difference on oral comfort in function of the dental status, but showed that the stimulated salivary flow rate was positively correlated to the oral comfort during eating of a sponge cake. To complete, Laguna et al. (2016) observed that the majority of the elderly population did not consider chewing and swallowing as a difficulty when they eat in general way. In addition, Laguna et al. (2016) also noted that older people with missing teeth had more difficulty with the first bite when they ate, but this difficulty was almost absent during subsequent chewing of the food. To summarize, in accordance with our results, previous publications seem to show that the oral comfort and the difficulty of eating were poorly affected by the oral health. However, in case of specific product (such as cereal product (Assad-Bustillos et al., 2017) or product whose the bolus is very difficult to form (Laguna et al., 2016) or a very altered oral health, the oral comfort can be slightly affected.

III.1.2.3.1.2 Bolus formation perception and oral health

The second part of Table 3 shows the results of the ANCOVA on bolus formation perception evaluated by the food comfortability questionnaire (Table 3, section Bolus formation). Significant effects were observed only for the Hard and the Whipped products. These products were similarly described as those whose bolus were the least easy to form.

Moreover, people with a poor dentition considered the Whipped and Hard products easier to humidify than people with a satisfactory dentition (Whipped product: 70/100 and 59/100, Hard Product: 71/100 and 63/100 for the poor and satisfactory dentitions, respectively). Our previous study has demonstrated that the oral comfort is highly correlated with the perceptions of the bolus formation (Vandenberghe-Descamps, Sulmont-Rossé, et al., 2017; Lorieau, et al., submitted). Thus, it is quite logical to observe a similarity of the dentition effects between the results of the oral comfort and the bolus formation perception. These effects could be explained by the bolus characteristics made by each of these groups

of people, as further discussed in section III.1.2.3.2.1 “Dental status, chewing parameters and bolus characteristics”.

For the Whipped product, there was a positive effect of the stimulated salivary flow on the notation of "masticate" item, meaning that this product was perceived to be easier to chew when a subject had a high-stimulated salivary flow. It is noteworthy that for the "masticate" item, the observed effect was an effect of the stimulated salivary flow and for the "humidify" item, an effect of the dental status was observed.

Finally, some interaction effects were observed between the oral health and the bolus formation perception for the Hard product. Thus, while the stimulated salivary flow was positively correlated ($r^2 = 0.34$; p value = 0.04) to the easiness to chew with the "incisor" for people with a satisfactory dentition, there was no correlation for the people with a poor dentition ($r^2 = -0.12$; p-value = 0.48). An interaction effect was also observed for the "molar" item, with a positive correlation between the ability to chew with molar and the stimulated salivary flow with the group of satisfactory dentition ($r^2 = 0.36$, p-value = 0.03), whereas there was no correlation for the group with a poor dentition. This interaction effect between the dental status and the stimulated salivary flow could be explained by the bolus characteristics made by each of these groups of people, as further discussed in section III.1.2.3.2.4 “Partial conclusion: Effect of the dental status and the stimulated salivary flow on chewing and bolus parameters “, and could also be related to the perceptions of bolus formation as explained in section III.1.2.3.3 “Global overview with a multiblock multivariate analysis”.

As previously mentioned, studies show that oral comfort or difficulty of eating were very strongly correlated with perceptions of the bolus formation (Laguna et al., 2015; Vandenberghe-Descamps, Labouré, et al., 2017 ;Lorieau et al., submitted). Another study showed that in general, the food product liking increased for samples which can be considered as “easy to chew” (Tarrega et al., 2017). Thus for the elderly, but also for the young adults, when a bolus is perceived as difficult to form (mainly related to chewing difficulties and to the time of residence in the mouth), the food will be generally considered as difficult to eat and uncomfortable (Laguna, Barrowclough, Chen, & Sarkar, 2016; Laguna et al., 2016; Vandenberghe-Descamps et al., 2017; Lorieau et al., submitted). Another study showed that the attributes of foods identified as troublesome were the same for both young adults and elderly persons (Roininen, Fillion, Kilcast, & Lähteenmäki, 2004). Thus, these studies showed that the perception of the bolus formation is an essential element to improve the oral comfort of a food, but our results (Table 3) and previous studies (Laguna et al., 2016; Roininen et al., 2004; Vandenberghe-Descamps et al., 2017) showed that these perceptions are only slightly impacted by the oral health.

III.1.2.3.1.3 Pain and oral health

No significant effect of the oral health was found on the pain perception when elderly persons have eaten these four cheese models. The notations were always very low (average less than 3/100 for all items).

III.1.2.3.1.4 Texture perception and oral health

The third part of the table 3 presents the results of food texture perceptions. These perceptions were mainly impacted by the dental status, especially for the Whipped and Processed products.

First of all, it is noteworthy that the difference of texture perception in function of the dental status were the texture elements that were evoked by the panel to characterize the products. For example, the Processed product was usually characterized by a “greasy” texture, and the Whipped product was mainly characterized by a “dry and sticky” texture (as reported in Lorieau et al. (submitted) and in the supplementary data 1). For all the texture parameters significantly impacted by dental status (excluding the “melting” texture), the subjects with a satisfactory dentition attributed higher scores than the subjects with a poor dentition (for the people with a poor and a satisfactory dentition respectively, the notations of the Whipped product were of 28/100 and 38/100 for the “dough” texture, 31/100 and 47/100 for the “dry” texture, 27/100 and 38/100 for the “sticky” texture, and for the “greasy” texture of the Processed product, the notation were of 29/100 and 38/100. The score ranges was from 0 to 100, 0 indicated “not at all” and 100 indicated “extremely”). However, it is possible that the “melting” texture of the Whipped product was particularly perceived when people were wearing a dental prosthesis (16/100 and 7/100 for the people with a poor and a satisfactory dentition, respectively), because the food adheres to the teeth and thus the prosthesis increased the troublesome sensory stimuli (Roininen et al., 2004).

It seems that elderly with a poor dentition were less sensitive to the "sticky", "dough" and "dry" textures of the Whipped product than people with a satisfactory dentition. This observation could explain the better perception of the ease of eating when this product was consumed by people with a poor dentition in comparison to people with a satisfactory dentition (Table 3).

Moreover, by comparing the texture notation of the four cheese models between the two groups of dentition, it seems that the people with a satisfactory dentition better discriminated the perceived texture attributes than the people with a poor dentition. For example, the notation of the “dry” texture given by people with a satisfactory dentition were between 47/100 and 4/100 for the 4 cheese models (with F=122 according to the ANOVA realized to understand the effect of the product type on the “dry” texture) whereas the notation attributed by people with a poor dentition were between 36/100 and 4/100 (with F=87). In the same way, this tendency was observed for the “greasy” texture (with F=47 and F=25 for the groups of satisfactory and poor dentitions, respectively) and for the “melting” texture (with F=108 and F=67 for the groups of satisfactory and the poor dentition respectively). Conversely, it seems that the “sticky” texture perception was better discriminated for the people with a poor dentition than people with a satisfactory dentition (F=7 and F=15 for the groups of satisfactory and poor dentitions, respectively).

Table 3 also shows an interaction between the dental status and the stimulated salivary flow for the perception of the “firm” texture of the Soft product. For this interaction, a significant and negative correlation (r^2 = -0.39; $p<0.001$) between the stimulated salivary flow and the notation of the "firm” texture was observed for subjects with a satisfactory dentition, whereas no correlation was observed for

subjects with a poor dentition. This means that for the group of people with a satisfactory dentition, the Soft product was perceived firmer for the subjects having a low salivary flow.

Few studies have been done on the texture perception as a function of age and dental status. Mioche et al. (2004) observed no aged-related effects in terms of “tenderness” and “juiciness” perceptions of meat when comparing young subjects and old adults with good dental health. However, Veyrune and Mioche (2000) noticed that subjects with complete dentures were more sensitive to changes in “juiciness” of meat compared to dentate subjects, but the “toughness” perception of meat was similar between the two groups. Another study by Forde and Delahunty (2002) showed that older people seem less able than younger people to discriminate several yogurts according to their “thickness” (thanks to the addition of xanthan to the products). Our results are therefore consistent with these previous published studies. Thus, the alteration of the oral health due to aging seemed to be linked to a decrease of the perception of certain textural attributes. However, these effects were sometimes slight and variable, and largely dependent on the type of food product studied.

III.1.2.3.1.5 Flavor and oral health

The last part of table 3 presents the results concerning the flavor of the products. Very little difference perceptions of flavors in function of the oral health were identified. Indeed, the products had the same composition and did not have any particular flavor. Therefore, in general, the products were perceived as poor in flavor (intensity: 15/100), with sweetness, acidity and bitterness attributes presenting an average less than 3/100. However, the products were described as slightly salty (with an average of 21/100).

For the Processed product, the dental status and the stimulated salivary flow had some significant effects on the salty and sweet flavor perceptions. In particular, the “salty” sensation decreased when the stimulated salivary flow increased. This relationship can be explained by a dilution effect of this product by the saliva which led to the decrease the “salty” sensation (Heinzerling, Stieger, Bult, & Smit, 2011).

III.1.2.3.1.6 Partial conclusion: Effect of the dental status and the stimulated salivary flow on the oral perception

Subjects with a poor dentition attribute a higher notation for the oral comfort and easiness to form the bolus compared to subjects with a satisfactory dentition (these results were significant for the Whipped and the Hard product). Moreover, the texture perception of the different products was different according to the dental status of the elderly. Two hypothesis can explain these effects of the dentition on the oral comfort and texture perception. First, the group with a poor dentition seems less able to discriminate the different textures of the products than the group with a satisfactory dentition. Secondly, it is possible that the group with a poor dentition is used to experiencing difficulties during eating and then accommodates to “harder” bolus that the group with a satisfactory dentition. As the four cheese models tested were all perceived as quite "easy to eat", the people with a poor dentition better evaluated the oral comfort than the people with a satisfactory dentition. The stimulated salivary flow had lesser effect on the perceptions of product texture and formation of the bolus. As previously explained, these sensory perception differences may be due to differences of chewing and bolus

characteristics in function of the oral health, which will be further explored in the following section of this article.

III.1.2.3.2 Effect of the dental status and the stimulated salivary flow on the chewing and the instrumental bolus parameters

Table 4 presents the results of the ANCOVA on all parameters measured on the chewing and the bolus characteristics. The effects of the oral health on the mastication parameters and on the formed bolus are described and discussed in three sections: the first section describes the effects of the dental status, the second section focusses on the effect of the stimulated salivary flow, and the last section concerns the interaction effect between the dental status and the stimulated salivary flow.

Table 4: ANCOVA model coefficients for the chewing parameters and the bolus characteristics. Significant coefficients (p-value<0.05) were in bold. F: Fisher ratio; p: p-*value; *: p-value<0.05 **: p-value<0.001; p-value<0.001; µ: fixed effect. SFS: Stimulated Salivary Flow, Dent: Dental status (with satisfactory dentition as reference), Dent x SFS: interaction effect of the dental status and the stimulated salivary flow.*

Variables		Hard			Soft			Processed			Whipped		
		SFS	Dent	Dent x Sal	SFS	Dent	Dent x Sal	SFS	Dent	Dent x Sal	SFS	Dent	Dent x Sal
Time of chew (s)	F^p	2.35	0.53	0.68	0.61	1.10	1.11	2.72	**3.93***	0.59	**3.75***	0.04	1.36
	µ	-3.34	-5.63	2.44	-1.71	-5.09	2.12	-3.10	**-7.97**	2.18	**-4.26**	-5.65	3.24
Number of cycle	F^p	0.17	0.43	0.04	0.02	0.01	0.10	0.62	**3.75***	0.01	1.31	0.56	0.33
	µ	-0.95	-2.99	0.70	-0.53	-1.50	0.79	-1.05	**-5.30**	0.37	-2.71	-1.00	1.74
Chewing Frequency (chew.s^{-1})	F^p	2.64	0.02	0.55	1.78	3.24	1.69	1.92	0.25	1.85	0.56	2.09	0.15
	µ	-0.06	-0.05	0.04	-0.06	-0.19	0.07	-0.07	-0.09	0.07	-0.04	-0.13	0.03
Bolus Hardness (g.s^{-1})	F^p	0.48	**24.67 *****	2.51	5.38	**15.40 *****	**4.64 ***	**4.02 ***	**6.79 ****	1.54	**4.10 ***	**6.69 ****	**3.77 ***
	µ	-1020	**-7768**	1897	-921	**-3026**	**991**	**-843**	**-2336**	714	**-1333**	**-3781**	**1419**
Bolus Stickiness (g.s^{-1})	F^p	1.55	**18.80 *****	3.72	**7.12 ****	**10.82 *****	2.98	**5.22 ***	**6.31 ****	1.09	1.60	3.52	1.41
	µ	225	**1108**	-327	**140**	**378**	-121	**132**	**321**	-91	126	385	-134
Bolus humidity (g of saliva / g of product)	F^p	**7.78 ****	1.87	1.44	**9.12 *****	1.48	1.89	**6.73 ****	0.36	0.71	**11.55 *****	0.30	1.94
	µ	**0.15**	0.23	-0.09	**0.15**	0.22	-0.09	**0.13**	0.15	-0.07	**0.26**	0.20	-0.15
Food in mouth	F^p	0.55	0.70	0.45	0.56	1.58	0.43	1.59	0.06	0.00	0.13	0.27	0.59
	µ	0.02	0.06	-0.02	-0.03	0.00	0.03	-0.03	0.01	0.00	0.02	0.06	-0.03

III.1.2.3.2.1 Dental status, chewing parameters and bolus characteristics

As shown in Table 4, the dental status had a significant impact on the hardness of the bolus. Indeed, people with a poor dentition made harder bolus than people with a satisfactory dentition (Figure 2). Table 4 and figure 2 also showed that the group with a poor dentition produced more sticky food bolus

than the group with a satisfactory dentition. This result was expected because the hardness and the stickiness of the bolus were negatively correlated (r^2: -0.93, p-value< 0.001).

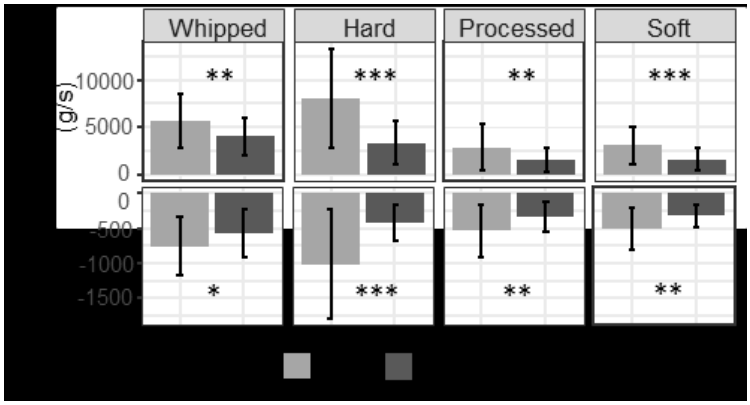


*Figure 2: Hardness and stickiness of the bolus in function of the dental status (poor vs satisfactory). The means, the standard error, and the difference of means (by a Tuckey test) are represented (p-value <0.01: ** and <0.001: ***).*

Results of the ANCOVA also showed both a higher time and number of mastication cycles for the people with a poor dentition than thus with a satisfactory dentition (Table 4). However, this was significant only for the Processed cheese. Indeed, the average number of chewing cycle was equal to 21 for the satisfactory dentition group while it was equal to 26 for the poor dentition group. Consistently, the average chewing time was of 22 seconds for people with a poor dentition and 17 seconds for people with a satisfactory dentition.

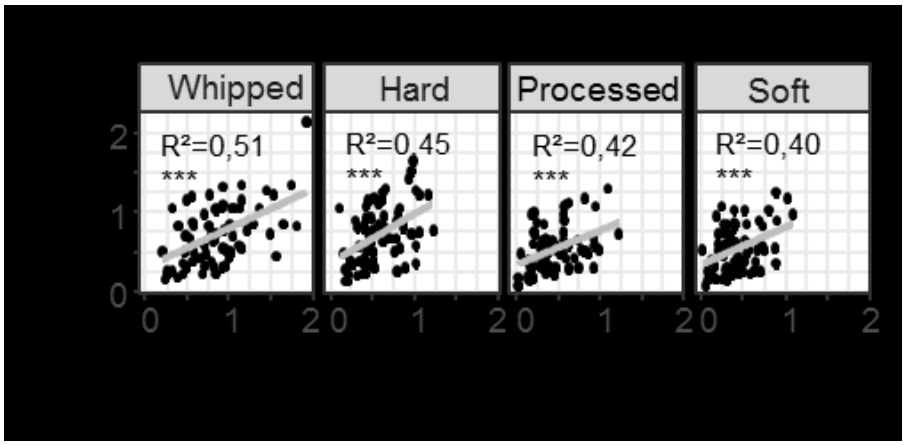
Numerous studies have already shown that the number of cycles, as well as the chewing time, were increasing during aging, and that these increases were even more pronounced for the prosthesis wearers. It seems that this increase of the chewing time is instinctively set up in order to compensate the lower masticatory efficiency related to the decline in muscular strength and the alteration of oral health (Mishellany-Dutour et al., 2008; Peyron et al., 2017; Yven et al., 2006).

Moreover, published studies have also reported that elderly people wearing dentures were forming less disintegrated bolus and bolus containing larger particles (Mishellany-Dutour et al., 2008; Yven et al., 2006). In agreement with these previous studies, our results indicate that elderly people with a poor dentition achieved harder bolus than older people with a satisfactory dentition, whatever the cheese model. This higher bolus hardness may be due to less bolus degradation and the presence of larger particles in the group of elderly with a poor dentition. In addition, Kohyama, et al. (2002) observed a larger variability of chewing parameters in the elderly population than in the young adult population. The authors hypothesized that these results were explained by the heterogeneity of the bolus samples produced by elderly people and because people with an altered oral health were maybe less able to adapt their mastication according to the product.

III.1.2.3.2.2 Stimulated salivary flow, chewing time and bolus hardness

The second major result was the significant effect of the stimulated salivary flow on the bolus humidity (Table 4). It has already been reported that the bolus humidity increases with the chewing time for a given product (Assad-Bustillos et al., 2017, 2017; Drago et al., 2011; Engelen et al., 2005). Although this effect is significant, the correlation coefficients between these two parameters were only around 30 %. Figure 3 shows the correlation coefficients calculated between the stimulated salivary flow corrected by chewing time, as a function of the bolus humidity for each product, which were comprised between 40 and 51 % depending on the cheese model. This relatively good correlation between these two parameters seems to mean that, in order to obtain a bolus with a comparable humidity level, a person presenting a high stimulated salivary flow has to keep the product in the mouth for a shorter time than a person presenting a low stimulated salivary flow.

*Figure 3: Correlation between the stimulated flow saliva x chewing time and the bolus humidity for the four cheese models. R^2 indicates the correlation coefficient. *** means p-value<0.0001*



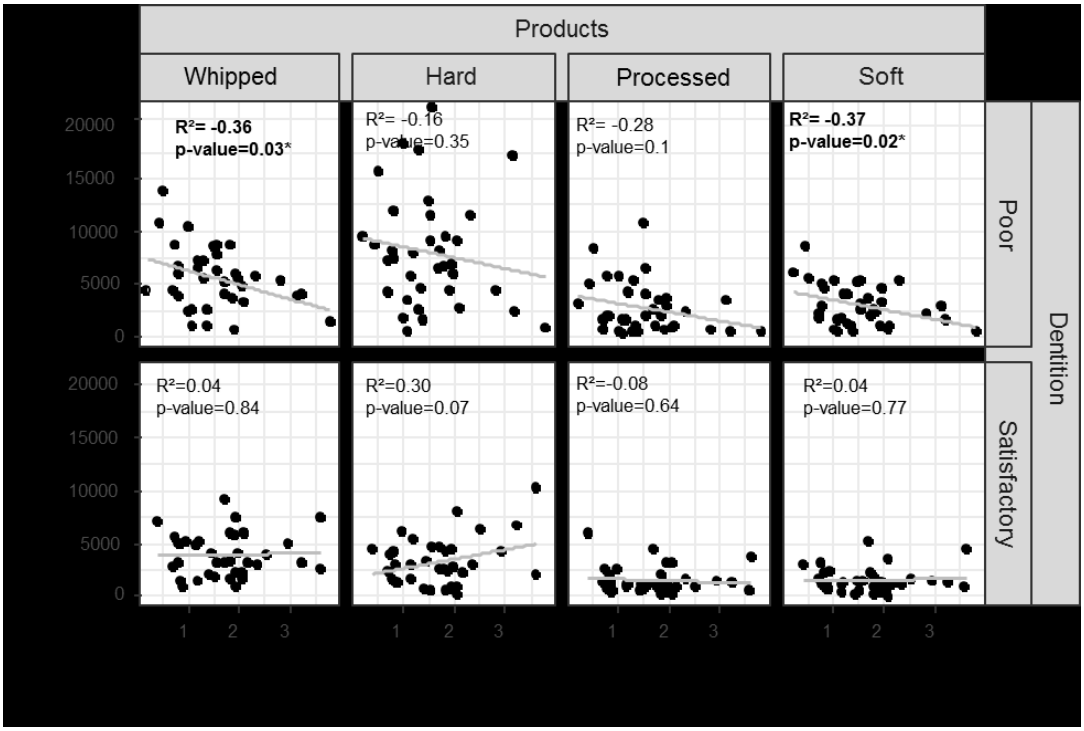
III.1.2.3.2.3 Interaction between the stimulated salivary flow and the dental status on the bolus hardness

Table 4 also showed some significant interactions between the stimulated salivary flow and the dental status. Figure 4 illustrates this interaction effect on the hardness of the bolus for the different cheese models.

While the stimulated salivary flow had no effect on the bolus hardness of subjects with a satisfactory dentition, the stimulated salivary flow was negatively correlated with the bolus hardness of subjects with a poor dentition for the four cheese models (significantly for the Whipped and Soft products) (Figure 4).

The hypothesis is that subjects with a satisfactory dentition adapt their chewing in order to always form food bolus having similar hardness characteristics whatever their salivary flow, while subjects with a poor dentition fail to achieve this adaptation. This lack of adaptation can certainly be explained by the decline in the oral receptors numbers due to the loss of teeth and/or the wearing of dental prostheses (Peyron et al., 2017). Thus, as this group of subjects fail to adapt their chewing, the stimulated salivary flow becomes a factor that influences in a major way the bolus hardness, leading to the high variability of the values measured for this parameter.

Figure 4: Correlations between the bolus hardness and the stimulated salivary flow for both groups of poor and satisfactory dentitions and the four cheese models.



III.1.2.3.2.4 Partial conclusion: Effect of the dental status and the stimulated salivary flow on chewing and bolus parameters

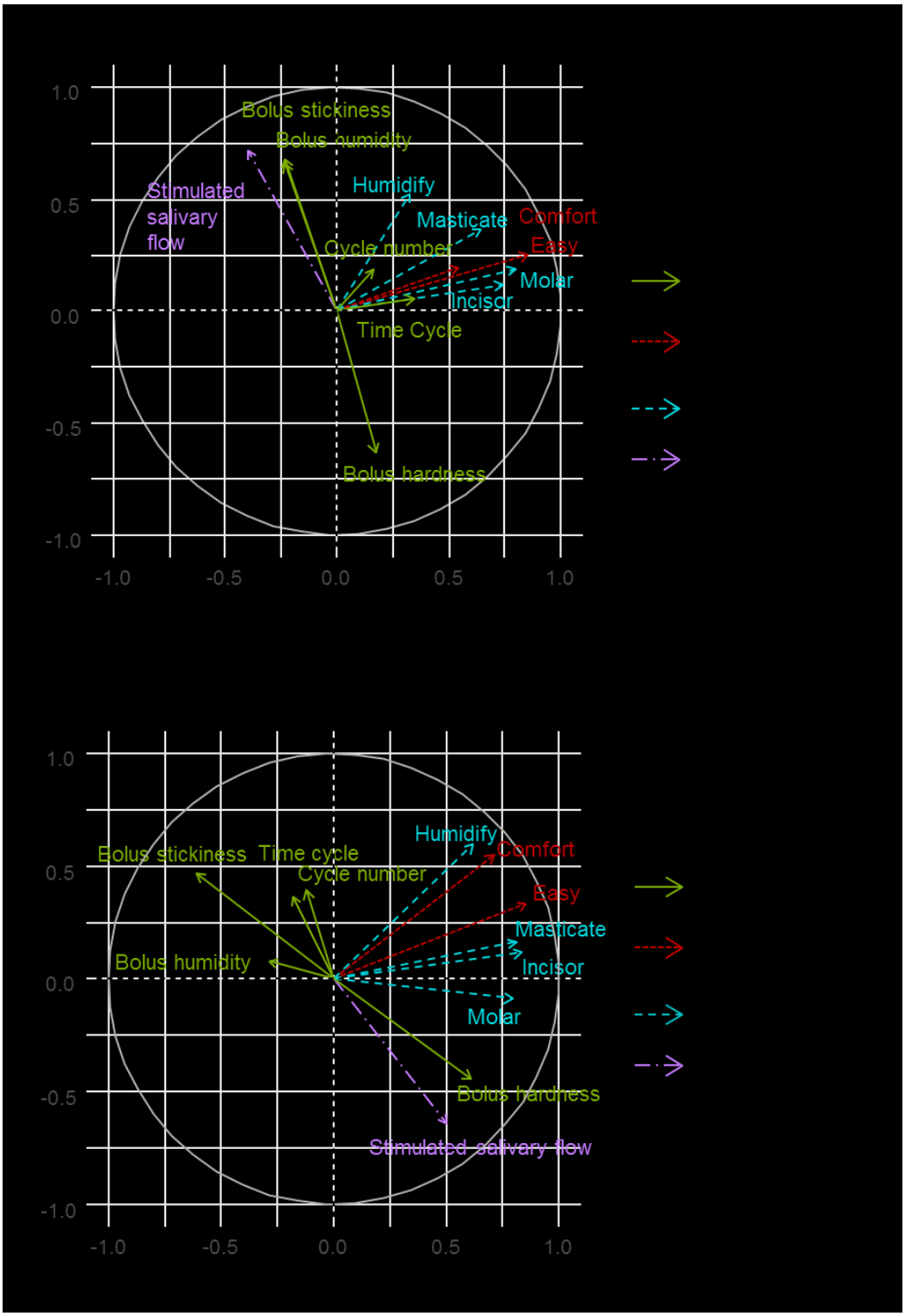
Elderly people with a poor dentition made harder and less sticky bolus than the subjects with a satisfactory dentition when eating cheese models presenting different textural properties. Whatever the cheese product, the stimulated salivary flow was correlated with the amount of saliva incorporated into the bolus. For people with a poor dentition, the stimulated salivary flow was also negatively correlated with the hardness of the bolus. To summarize, the characteristics of the bolus obtained after chewing of cheese models were affected by the oral health. In the last section of this article, the possible relationships between the sensory perception of the different cheese models and the bolus modification depending on the oral health are explored.

III.1.2.3.3 Global overview with a multiblock multivariate analysis

Two multivariate analysis of the data, by considering an average product as described in section III.1.2.2.6.2 “Multi Factorial Analysis on an average product”, allowed establishing some correlations between the notations of the product perception (obtained with the questionnaire), the instrumental parameters of the bolus and the chewing properties, for the two different groups of dental status of the panel.

For the two MFA, the food comfortability perceptions (Figure 5: in red) and the perception of the easiness to form the bolus (Figure 5: in blue) were pointed on the same dimension, indicating a positive relation

Figure 5: Variable plot of the same Multifactorial Analysis (MFA) performed on the two groups of dental status (A for the poor dentition, B for the satisfactory dentition). Sensory perception parameters are shown in green and blue, instrumental bolus parameters in red, and the stimulated salivary flow in purple.



between them. To support these results, the correlation coefficients between oral comfort and perceptions of the bolus formation were positive and significant for both groups of satisfactory and poor dentitions (for the average product, the correlations between comfort and incisor, molar, masticate and humidify were superior to 0.33, and p-value were always superior than 0.001). These correlations had already been demonstrated in two previous studies using the same food comfortability questionnaire (Vandenberghe-Descamps et al., 2017; Lorieau et al., submitted).

The harness and stickiness of the bolus (Figure 5: in green) and the perception of the easiness to form the bolus (Figure 5: in blue) were pointed in orthogonal direction, indicating no relation between them. In addition, for both groups of dental status, no significant correlation was obtained between the perception of bolus formation and the rheological properties of the bolus. For example for both dentition groups, the amount of saliva incorporated into the bolus was not correlated with the perception of bolus humidity (r^2=-0.32, p-value=0.26 for the group of poor dentition and r^2=-0.05 p-value=0.76 for the group of satisfactory dentition). In the same way, the measured parameter of chewing (time of cycle) not correlated with the perception by the subjects of this chewing process ("Masticate" item) (r^2=0.04 for the group with a poor dentition and r^2=0.01 for the group with a satisfactory dentition). This is interesting because it means that each subject makes its own bolus and perceives the bolus formation differently compared to his own standard. Thus, the parameters of hardness or humidity of the bolus do not seem to be the right parameters to explain the thresholds of the end of chewing and of the swallowing. Additional studies are required to understand if the swallowing thresholds could be related to other sensory sensations or multifactorial bolus characteristics that can be measured.

Figure 5 also shows that the stimulated salivary flow of each group of dental status is represented in a totally opposite direction on each of the two MFA. Indeed, as previously shown (Figure 4), there was no correlation between the stimulated salivary flow and the bolus hardness for the group with a satisfactory dentition. Conversely, the stimulated salivary flow was negatively correlated to the bolus hardness for the elderly people with a poor dentition. Indeed, it was previously demonstrated that elderly people with a poor dentition produced harder bolus than those with a satisfactory dentition (Figure 2). Thus, the elderly with a poor dentition made harder bolus for which the humidity was dependent on the stimulated salivary flow, while the elderly with a satisfactory dentition made bolus presenting comparable hardness and humidity properties whatever their salivary flow. Conversely, for the elderly people with a satisfactory dentition, a positive correlation between ability to chew with the "molar" and "incisor" with the stimulated salivary flow was observed. As previously mentioned, our hypothesis is that people with a poor dentition generally formed hard bolus. In fact, they have fewer difficulties to form and swallow harder bolus

The last major result of these MFA was the highest variability between the individuals was retrieved by the two first MFA dimensions in the poor dentition group. Indeed, the dimensions 1 and 2 of MFA in the poor dentition group represents only 49 % of the variability within this group of people, whereas this same MFA for the satisfactory dentition group represents 59 % of the variability within this group. Thus, the group of subjects presenting a poor dentition was quite heterogeneous, and it would therefore be

interesting to characterize more finely the population of this group by the type of dental prosthesis, the time since the elderly person wears its prosthesis, or their muscular strength.

III.1.2.4 Conclusion

Sensory perceptions during the consumption of the different cheese models were slightly affected by the dental status of the elderly. Indeed, the subjects with a poor dentition attributed higher notes for oral comfort and considered the bolus easier to form, than the subjects with a satisfactory dentition (and this was particularly significant for the products considered to be the less comfortable). However, the dental status slightly affected the perception of the different textural properties of the products. Yet, the effect of the oral health was very important on the instrumental characteristics of the bolus. Elderly people with a poor dentition produced harder and less sticky bolus than the group of subjects with a satisfactory dentition. This result suggests that the group of poor dentition can swallow harder bolus and was therefore less troubled than the group of satisfactory dentition, resulting in a higher oral comfort evaluation. Moreover, for the subjects with a poor dentition, the quantity of saliva incorporated into the bolus was correlated with the stimulated salivary flow rate, which was not the case for subjects with a satisfactory dentition. This could be explain by a lack of mastication adaptation for the elderly people with a poor dentition, while elderly people with a satisfactory dentition achieved to adapt their mastication.

To complete this work, it will be interesting to study the signals of the chewing ending and the swallowing triggering because they seem to be impacted by oral health and to influence sensory perceptions.

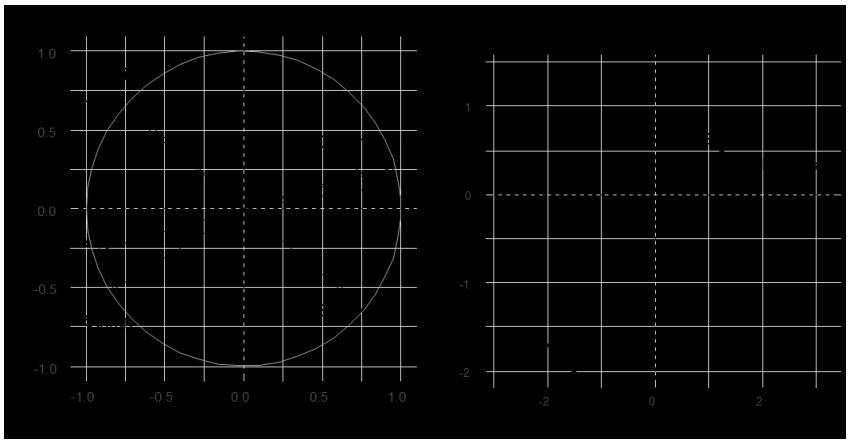
ACKNOWLEDGEMENT

This study is part of AlimaSSenS [ANR-14-CE20-0003-01] funded by the French National Research Agency.

CONFLICT OF INTEREST

Lucie Lorieau declared received supports from Lactalis. Etienne Hazard and Amandine Ligneul work for Lactalis.

SUPPLEMENTARY DATA 1: *Principal Component Analysis presenting the sensory texture attributes of the four different cheese models perceived by the panel of elderly.*



III.1.3 A retenir

Ces deux études ont permis d'identifier les facteurs pouvant influencer le confort en bouche des personnes âgée lorsqu'elles mangent un produit fromager. Pour cela 4 produits fromagers de composition identique mais de textures différentes (Dur, Fondu, Mou, Fouetté) ont été dégustés par des personnes âgées autonomes de plus de 65 ans ayant un statut dentaire et un flux salivaire variable. Lors d'une première séance, les perceptions sensorielles de confort en bouche, de formation du bol alimentaire, de douleur, de texture et de flaveur des aliments ont été étudiées à l'aide d'un questionnaire. Lors d'une deuxième séance, la formation du bol alimentaire était étudiée en mesurant le temps de mastication, la dureté et l'adhésivité du bol (par test de compression), ainsi que la quantité de salive incorporée au bol.

Le facteur majeur influençant le confort en bouche est la facilité à réaliser le bol alimentaire. Ainsi, manger un produit fromager est considéré comme confortable lorsque le bol alimentaire se forme facilement. Cependant, la texture perçue des produits est souvent liée à des caractéristiques particulières du bol alimentaire. Ainsi, les produits ayant une texture ressentie plutôt «sèche» sont souvent liés à des difficultés d'humidification du bol, et donc à un inconfort en bouche. De façon similaire, le produit ressenti comme «dur» nécessite souvent des temps de mastication assez long, cependant le confort en bouche n'est pas amplement affecté. Toutefois, les deux produits ressentis comme «mou», «fondant» et «gras» sont des produits dont les bols sont beaucoup plus faciles à former, car ils se déstructurent facilement en bouche ce qui aide à la cohésion du bol alimentaire. Ces deux produits sont considérés comme confortables.

Le deuxième facteur pouvant influencer le confort en bouche est la santé buccodentaire des personnes âgées. Tout d'abord, les caractéristiques physico-chimiques et rhéologiques des bols alimentaires réalisés sont très fortement influencées par la santé buccodentaire (statut dentaire et flux salivaire). D'un côté, le flux salivaire stimulé est positivement corrélé avec la quantité de salive incorporée dans le bol. De l'autre, les personnes ayant une dentition altérée réalisent des bols alimentaires d'une dureté (évaluée par test de compression) bien supérieure aux personnes âgées ayant une dentition saine. Cependant ces modifications de formation du bol alimentaire en fonction de la santé buccodentaire n'influent pas négativement les perceptions sensorielles lors de la dégustation des produits laitiers. En effet pour les produits laitiers les moins confortables, les personnes âgées ayant une dentition altérée attribuent des notes plus élevées de confort en bouche et considèrent les bols plus faciles à former que les personnes âgées ayant une dentition saine.

Ces études démontrent que les produits fromagers sont des produits globalement confortables en bouche et faciles à manger pour les personnes âgées, et ce quelle que soit leur santé buccodentaire. Alors que les textures perçues «sèches» et «collantes» se révèlent souvent liées à des difficultés à réaliser un bol cohésif et sont donc souvent liées à un inconfort en bouche, la dureté des produits a révélé être beaucoup moins liée à une baisse du confort en bouche, car les efforts supplémentaires pour former le bol alimentaire de ces produits ne sont pas très importants. D'un autre côté, même si les

textures perçues comme molles, grasses et fondantes sont très confortables en bouche, il ne semble pas idéal de proposer uniquement des produits dans cette gamme de textures, car cela apporterait de la monotonie dans le régime alimentaire.

III.2 DIGESTION DES PROTEINES SERIQUES ET DES CASEINES

Les personnes âgées ont des besoins nutritionnels accrus en protéines (ANSES, 2016). En cas d'apport insuffisant, le phénomène de sarcopénie est souvent amplifié et s'installe plus rapidement, limitant la qualité de vie de personnes âgées (Ferry, 2008). Les protéines sériques permettent un afflux précoce et massif d'acides aminés plasmatiques, particulièrement intéressants pour stimuler la synthèse musculaire des personnes âgées (Pennings et al., 2011). Cet afflux précoce et massif d'acides aminés dans le plasma s'explique à la fois par une concentration importante en acides aminés essentiels des protéines sériques, et par une vitesse de vidange gastrique rapide au cours de la digestion. En effet, ces protéines sont appelées protéines « rapides » car elles sont rapidement vidangées de l'estomac. De ce fait, elles sont hydrolysées rapidement dans l'intestin, ce qui permet cet afflux précoce et massif d'acide aminés dans le plasma. A l'inverse, les caséines sont considérées comme étant des protéines « lentes », car elles coagulent dans l'estomac sous l'effet de l'acidité, augmentant de fait leur temps de séjour dans l'estomac. Ce ralentissement de la vidange gastrique ralentit ensuite la cinétique d'hydrolyse des protéines au niveau de la phase intestinale, et explique l'afflux d'acides aminés en faible quantité mais sur une longue période après l'ingestion de caséines (Boirie et al., 1997). Actuellement, les études de digestion de ces deux types de protéines ont été réalisées quasi exclusivement sur des produits liquides. Toutefois, il est connu que la structure de la matrice alimentaire à un impact majeur sur les vitesses de vidange gastrique et donc sur la vitesse de digestion des aliments (Barbé et al., 2013). En effet, les études menées sur les aliments semi-solides ou solides mettent en évidence que la vidange gastrique dépend de la désintégration de la matrice alimentaire dans l'estomac et de la viscosité du chyme (Bornhorst & Singh, 2014; Fang et al., 2016).

L'objectif de ce travail était de comparer la digestion des caséines et des protéines sériques, ainsi que l'impact de la structure alimentaire et de la dénaturation des protéines sur leur hydrolyse durant leur digestion.

Afin de répondre à ces objectifs, le chapitre est scindé en deux parties, correspondant à deux articles scientifiques.

- La première partie porte sur l'étude de l'hydrolyse des protéines sériques et des caséines, en fonction de la structure de la matrice alimentaire dans laquelle elles sont intégrées. Pour cette étude, 5 produits laitiers (les fromages modèles Fondu, Mou, Dur et Foisonné, et leur version liquide) de composition identique mais présentant des propriétés structurales différentes ont été digérés en suivant un protocole de digestion *in vitro* statique.
- La deuxième partie porte sur l'étude de la biodisponibilité des acides aminés, en particulier la leucine, après ingestion par des porcs d'un produit laitier gélifié à base de protéines sériques (fromage modèle type Fondu) et d'un fromage traditionnel à base de caséines (la Mozzarella).

III.2.1 Impact du type de protéines et des structures de produits laitiers sur l'hydrolyse des protéines au cours d

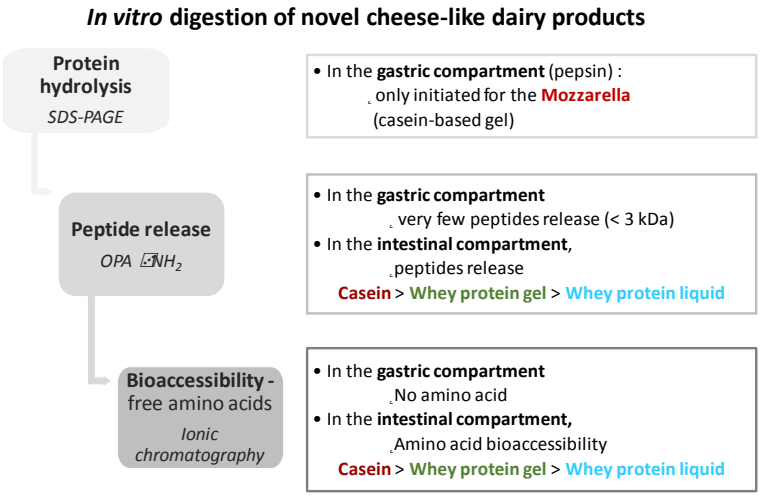
ABSTRACT

Elderly people exhibit specific nutritional needs, in particular they require higher protein intake. The objective of this study was to compare, using an *in vitro* digestion protocol, the nutritional performance of novel dairy products, based on whey proteins and which mimicked different commercial cheese textures. Whey proteins have replaced caseins in these different gels for their known ability to promote muscle synthesis in the elderly thanks to their high amount of leucine.

The hydrolysis of proteins and the bioaccessibility of amino acids have been evaluated from the simulated gastro-intestinal digestion of four whey-based products of identical composition but different structural properties. Heat-induced gelation of a whey-based dairy emulsion was performed by applying different combination of pH, stirring and heat treatment, in order to obtain a range of different gel structures, from liquid to more or less firm and or whipped gels. A commercial Mozzarella cheese has been tested as the casein-based control.

Results showed that both the kinetics of protein hydrolysis and the amino acid release were significantly higher in the casein-based gel than in whey protein matrices. The extent of protein hydrolysis was higher in the whey protein gels compared to the liquid control sample, due to a facilitated hydrolysis of the heat-denatured proteins compared to native proteins. Peptide release and amino acid bioaccessibility were however not significantly influenced by the matrix structure. Further studies, using an *in vivo* digestion model will allow assessing the amino acids bioavailability of these matrices.

GRAPHICAL ABSTRACT



III.2.1.1 Introduction

Aging is accompanied by a progressive decline in skeletal muscle mass, termed sarcopenia (Koopman & van Loon, 2009). The skeletal muscle protein synthetic response to food intake was shown to be impaired in older adults (Cuthbertson, 2004; Guillet, 2004). This impaired is called "anabolic resistance of aging" and is considered as a key factor in the development of sarcopenia.

The amino acid composition is the most important factor in defining food protein quality, followed by the digestibility of the protein and the bioavailability of its amino acids. The process of digestion includes mechanical, chemical and enzymatic steps to release nutrients and facilitate their absorption. Bioaccessibility refers to nutrients release from the food matrix in the intestinal lumen, while the term bioavailability corresponds to the protein fraction that has been absorbed (Rinaldi, Rioux, Britten, & Turgeon, 2015). Because of their amino acid composition, the main bovine milk proteins, caseins and whey proteins, can be regarded as a complete source of amino acids. Caseins, representing about 80 % of the protein content in bovine milk, are flexible and heat stable proteins. Whey proteins, representing approximately 20 % of the total milk proteins, are globular proteins that are soluble over a broad pH range and are heat-sensitive. From the nutritional point of view, milk whey proteins are considered superior to casein in various aspects. Pennings et al. (2011) showed that whey protein was more effective than either casein or casein hydrolysate protein in stimulating postprandial muscle protein accretion in older men. The greater anabolic properties of whey than of casein were mainly attributed to the faster digestion and absorption kinetics of whey, which resulted in a greater increase in postprandial plasma amino acid availability and thereby further stimulated muscle protein synthesis (Boirie, et al., 1997; Dangin et al., 2001). These findings were supported by the “fast” and “slow” protein concept (Boirie, et al., 1997; Dangin et al., 2001; Koopman & van Loon, 2009). Indeed, casein, unlike whey, coagulates in the acidic environment in the stomach, which delays its gastric emptying and induces a slow postprandial increase in plasma amino acids (Bendtsen, Lorenzen, Bendsen, Rasmussen, & Astrup, 2013). In contrast, whey proteins remain soluble and pass rapidly through the stomach, mostly intact, leading to faster delivery of amino acids to the bloodstream (Mahé et al., 1996). Moreover, besides differences in protein digestion and absorption kinetics, whey and casein also markedly differ in their amino acid composition (Boirie et al., 1997; Dangin et al., 2001; Tang, Moore, Kujbida, Tarnopolsky, & Phillips, 2009). Whereas both proteins contain all the amino acids required to effectively stimulate muscle protein synthesis (Volpi, Kobayashi, Sheffield-Moore, Mittendorfer, & Wolfe, 2003), whey has a considerably higher leucine content (Boirie, et al., 1997; Dangin et al., 2001; Tang et al., 2009). The latter may also contribute to the proposed greater anabolic properties of whey than of casein, because leucine has been identified as the main nutritional signal responsible for stimulating postprandial muscle protein accretion (Buse & Reid, 1975; Katsanos, Kobayashi, Sheffield-Moore, Aarsland, & Wolfe, 2006; Rieu et al., 2006).

The majority of studies with “fast” and “slow” proteins use noncomplex beverages mostly consisting of water, standard whey, or casein preparations and in particular cases in combination with carbohydrates or alternative sweeteners. The effect of protein modification strategies and ingredient interaction within complex formulations on the overall gastrointestinal behaviour of whey and casein is, however, still less known (Lambers, Bosch, & Jong, 2013). Food processing steps, such as fermentation, homogenization or heat treatment, are applied to produce most of dairy products available on the market, such as cheese and yogurt. These treatments influence the matrix structure and can modify the digestion and

absorption kinetics of the nutrients (Kopf-Bolanz et al., 2014; Korhonen, Pihlanto-Leppälä, Rantamäki, & Tupasela, 1998). The disintegration of the matrix is a key factor influencing nutrient release during digestion (Singh, Ye, & Ferrua, 2015). In the gastric environment, the structural characteristics and the properties of the matrix determine how easily digestive enzymes and fluids can diffuse into the food particles (Thévenot, Cauty, Legland, Dupont, & Floury, 2017). In particular, structure effects can strongly modulate the digestion of proteins. Macrostructure has a strong influence *in vivo* where liquid milk proteins are more rapidly metabolized and procure less satiety compared to rennet gels of the same composition (Barbé et al., 2013). With gelled whey proteins, different microstructures can be obtained by variating pH and temperature and duration of the heat treatment and can lead to digestion differences *in vitro* and *in vivo* (Kitabatake & Kinekawa, 1998; Macierzanka, et al., 2012; Peram, Loveday, Ye, & Singh, 2013; Takagi, Teshima, Okunuki, & Sawada, 2003). Native β-lactoglobulin is very resistant to pepsin and chymotrypsin digestion, while disruption of native structure and unfolding of the protein by thermal treatment exposes susceptible peptide bonds and drastically decreases the resistance to proteolytic digestion by pepsin and trypsin (Guo, Fox, Flynn, & Kindstedt, 1995; Kopf-Bolanz, et al., 2014; O'Loughlin, Murray, Kelly, FitzGerald, & Brodkorb, 2012; Singh, Øiseth, Lundin, & Day, 2014). Except for unfolding of protein, it has been recently found that the aggregate size and porosity might also play a role in promoting susceptibility to enzymatic hydrolysis (O'Loughlin et al., 2012).

In the field of food sciences, *in vitro* digestion experiments constitute a powerful means to investigate the effects of food composition and structure on digestion, which is triggered by the growing interest of designing foods with particular nutritive properties (Bohn, et al., 2017). *In vitro* models allow the screening of various foods, before conducting *in vivo* animal or human trials on a limited number of food matrices. They present the great advantage of being a relatively fast and inexpensive way to study food digestion (Bohn, et al., 2017; Shani-Levi et al., 2017). An international consensus has recently been found for mimicking digestion at the adult stage with a standardized static protocol based on physiologically relevant conditions gathered from humans (Minekus et al., 2014).

The aim of the present work is to investigate the proteolysis patterns of whey-based dairy products with identical composition but different textures, and relate these patterns to their structure, using a static *in vitro* digestion approach. The results may help when designing protein-fortified dairy products for elderly.

III.2.1.2 Materials and methods

III.2.1.2.1 Materials

Pasteurized dairy cream with 30 % (w/w) fat (Crème Fleurette 30 % Casino, Saint Etienne, France) was purchased from a local supermarket. Native whey protein isolate (Pronativ®) with a protein content of ≥ 90 % and a moisture content of 5.3 % was purchased from Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France. NaCl was from European Salt Company, Hannover, Germany, Gluconodeltalactone (GDL) from Roquette, Lestrem, France and $CaCO_3$ (39.9 % calcium) was supplied by Quimdis, Levallois-Perret, France. Pepsin (P7012; 2722 $IU.mg^{-1}$), pancreatin (P7545; 6.79 $IU.mg^{-1}$) and bile extract (B8631; 3.1 $mM.g^{-1}$) were all of porcine origin and obtained from Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France. The enzyme activities and

bile salt concentrations in the bile extracts were measured according to the assays detailed in Minekus et al. (2014). Enzyme inhibitors Pepstatin A (P5318) and Pefabloc (76307) were also obtained from Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France. All other materials were standard analytical grade. Water was distilled water.

III.2.1.2.2 Preparation of dairy products

The dairy products were based on an emulsion of native whey protein and cream, with different stirring and/or heating process to induce gels presenting different textural properties, respectively denoted as "Hard", "Processed" and "Whipped" products. The base emulsion was formulated from 24 % (w/w) of whey protein isolate, 20 % (w/w) fat provided by dairy cream, 0.6 % (w/w) of NaCl, 0.5 % (w/w) of $CaCO_3$. The pH of the Hard product was identical to that of the emulsion base, ie 6.4. For both the Processed and Whipped products, a slow acidification down to 5.9 and 5.4 (± 0.10) was obtained by adding 1 % and 1.8 % of GDL to the base emulsion, respectively. A certain amount of water was finally added to the mix in order to reach these different target concentrations. All components were mixed for 58 min at 37 °C and 300 rpm into a blender (Thermomix TM5, Vorwerk, France). To prepare the Hard and Processed gels, the emulsion was first transferred in sealed plastic cylindrical containers (inner diameter 26 mm, Darmini Darmex Casing caliber 28, MCM Casing, Lucenay, France) and then the cylinders were heated by immersion in a water bath at 70 °C for 36.5 min for the Hard gel, and at 75 °C for 19 min for the Processed gel. For the Whipped product, the emulsion was first foamed using the blender at 500 rpm during 20 min (Thermomix TM5, Vorwerk, France), and 75 g of the mix was transferred into plastic cups (Pot 125 mL, diameter 68 mm, RPC BEBO, Denmark). The cups were sealed and immersed in a water bath at 75 °C for 80 min. After heating, the gels were cooled in ice water bath and stored at 4 °C for 1-30 days prior to use.

The base emulsion of whey protein and cream was also studied as the liquid and non-denatured whey protein control (denoted as "Liquid"; pH 6.4), and a commercial Mozzarella cheese kindly provided by Lactalis (Société Laitière de Pontivy, Pontivy, France) was studied as the casein gel control. This cheese was chosen for its similar protein and fat contents compared to the whey-based products (24.5 % protein, 19.1 % fat).

All these different products were prepared in triplicate for further characterization and *in vitro* digestion experiments.

III.2.1.2.3 Characterization of products

III.2.1.2.3.1 Compression Test

Uniaxial compression tests were performed on the gels (Mozzarella, Hard and Processed products) with a 30 mm diameter flat-ended cylindrical probe at room temperature. Samples of 20 mm height and 26 mm diameter were compressed by 70 % at a constant crosshead speed of 30 $mm.s^{-1}$, using either a 1 kN load cell for the Hard and Mozzarella gels (Instron, Elancourt, France) or a 100 N load cell (Lloyd TA1, AMETEK, Lloyd Instruments, Elancourt, France) for the Processed gel. The fracture force has been chosen as the mechanical primary characteristic of the gels. Its value corresponds to the force required to cause the first fracture (N). Each test was performed in triplicate on each batch for each product (9 measures in total).

III.2.1.2.3.2 Confocal microscopy

Thin slices, measuring approximately 5 x 5 x 2 mm thick, were cut from the heart of the products using a scalpel. The protein network and fat components were stained using fluorescent dyes (Sigma–Aldrich, St Louis, USA): 10 µL of a 10 % Fast Green aqueous solution and 40 µL of a 0.1 % Nile Red 1,2-propanediol solution were mixed and deposited on the surface of the slice. The sample was held at 20 °C for 30 min to permit the diffusion of the fluorescent dyes into the product. The sample was then set between glass slides for observation by an 60x objective lens (oil immersion) of an inverted Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) using 543 and 632 nm excitation wavelengths in sequential beam fluorescent mode for fat and protein detection, respectively. Micrographs had a resolution of 512 x 512 pixels and were recorded in the samples at a constant depth of 15 µm from the glass slide, and analyzed for size measurement by Fiji software (Image J 1.51n, National Institute of Health, USA). Images shown in this paper correspond to superimpositions of images of the same area observed separately with the two markers, with proteins coded in green and fat in red. Aqueous phase and any gas bubbles in the slices may appear as black holes in the micrographs. There were at least two samples of each product, and for each sample at least 10 micrographs were taken. The micrographs presented in Table 1 were considered by the authors to be representative of the different product samples.

III.2.1.2.3.3 Transmission electron microscopy

Small cubes of around 2-3 mm side were first cut with a scalpel. Samples were fixed in 2 % (w/w) glutaraldehyde in a 0.1 M sodium cacodylate buffer for 16 h at 4 °C (pH 7.4). After fixation, specimens were rinsed at least 4 times in 0.15 M Na cacodylate buffer, before post-fixation with 1.5 % osmium tetroxide for 2 h at 4 °C. After further rinsing, the samples were then dehydrated in a graded series of increasing concentrations of ethyl alcohol from 70 % to 100 %, and placed in hydroxypropyl methacrylate (HPMA) for 20 min. Samples were then progressively infiltrated in several mixtures of HPMA -Epon resin (2v: 1v , 1v: 1v then 1v:2v) (Epon kit 14120, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) for 1h30 min each and then in pure Epon resin for 16 h. Infiltration was continued the next day with epoxy resin with 1.5 % DMP30 (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol) (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) for 3 h. Samples were finally embedded in a new mix of epoxy-DMP30 resin and polymerized at 60 °C for 48 h in blocks. From these blocks, ultra-thin sections (80 nm) were cut with a UC7 LEICA ultra-microtome (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) placed on grids, and post-stained with 40 $g.L^{-1}$ uranyl acetate for 30 min and with lead citrate for 20 min.

TEM viewing were done with a JEM-1400 Transmission Electron Microscope (JEOL CO. Ltd, Tokyo, Japan) operated at 120 kV accelerating voltage. Digital images were acquired using the Gatan SC1000 Orius® CCD camera (4008 x 2672), set up with the imaging software Gatan Digital MicrographTM (Gatan, Pleasanton, USA). Ten TEM micrograph images were taken at a magnification of x20,000 on different parts of each samples tested and saved as 32-bit grayscale DM3 images of 4008 x 2670 pixels (1 pixel = 2.5 nm) and a daily gain reference image was acquired before each observation for further image analysis. Image processing and analysis were performed using Fiji software. Two main microstructural parameters of the different products, i.e. the porosity and tortuosity of the protein network, were characterized from binary TEM micrographs according to the image analysis procedure described in

(Thévenot et al., 2017) . The ‘‘porosity” can be defined as the fraction of the image area occupied by the aqueous phase, and the ‘‘tortuosity” is defined as the ratio of the shortest paths through the aqueous phase (i.e. avoiding the protein phase) between two opposite borders of the image, to the Euclidean distance between the same borders. The micrographs presented in Table 1 were considered by the authors to be representative of the different product samples.

III.2.1.2.3.4 Protein surface hydrophobicity

A simplified method avoiding the solubilization step of the gelled proteins developed by Chelh, Gatellier, & Santé-Lhoutellier (2006) was used to determine the protein hydrophobicity. This method is based on the binding of bromophenol blue (BPB) sodium salt on non-solubilized proteins and the quantification of bound BPB. The volume concentration of total protein ($mg.mL^{-1}$) was first determined in each dairy product by the Biuret method (Gornall, Bardawill, & David, 1949). Two mL of solution was prepared by mixing the right amount of dairy product to a volume of 20 mM phosphate buffer at pH 6 to obtain a final protein concentration adjusted to 2 $mg.mL^{-1}$. To 1 mL of this solution, 80 µL of 1 $mg.mL^{-1}$ BPB sodium salt for electrophoresis (from Sigma) (in distilled water) was added and mixed well. A control, without proteins, consisted in the addition of 200 µL of 1 $mg.mL^{-1}$ BPB (in distilled water) to 1 mL of 20 mM phosphate buffer at pH 6. Samples and control were kept under stirring, at room temperature, during 10 min and were then centrifuged for 15 min at 2000g. The absorbance of the supernatant (diluted 1/10) was measured at 595 nm against a blank of phosphate buffer. The amount of bound BPB is given by:

$$\text{Bound BPB } (\mu g) = 80\ \mu g \times (A_{control} - A_{sample}) / A_{control}$$

with A = absorbance at 595 nm

III.2.1.2.4 In vitro digestion protocol

In vitro digestion experiments were based on the harmonized COST INFOGEST protocol, in which the composition of the simulated oral, gastric and intestinal fluids are described (Minekus et al., 2014). This protocol was developed by a consensus of international experts in the field of food digestion, from physiological data obtained in human.

III.2.1.2.4.1 Oral phase

To simulate oral digestion, a gel bolus was first obtained by mixing 100 g of gelled samples with 51 mL of simulated saliva fluid (SSF) and 500 µL of 0.3 M $CaCl_2$ in a blender (MIXWEL+ Awel Microbiology, Wien, Austria) for 30 s at speed 1 then 60 s at speed 2. The simulated gel bolus was then kept at 37 °C under stirring at 80 rpm in a water bath at 37 °C (Grant, OLS 200, Cambridgeshire, England). In this study, the salivary α-amylase was not added to the SSF since the matrices did not contain starch. In order to obtain a bolus' humidity similar to that formed on the same products by elderly people in good dental health (Lorieau et al., submitted), the final ratio of food to SSF was set at 66:34 (w/w), instead of 50:50 (w/v) as recommended in Minekus et al. (2014). The liquid control sample was not subjected to simulated mastication.

III.2.1.2.4.2 Gastric phase

30 g of the simulated oral bolus was mixed with 24 mL of simulated gastric fluid (SGF). After adjusting the pH to 3.0 with 4 M or 12 M HCl, depending on the product, a volume of 15 µL 0.3 M $CaCl_2$ was added. Three mL of porcine pepsin stock solution (40,000 $U.mL^{-1}$) was then added to achieve 2,000 $U.mL^{-1}$ in the final mixture and the simulated digesta prepared was immediately incubated for 2 h in the water bath at 37 °C whilst mixing at 80 rpm. This mixture is henceforth referred to as the simulated gastric chyme being produced from a simulation of gastric digestion.

III.2.1.2.4.3 Intestinal phase

60 mL of the simulated gastric chyme was mixed with 33 mL of simulated intestinal fluid (SIF) and pH adjusted to 7.0 with 2 or 4 M NaOH, depending on the product. The mixture was completed with 120 µL of 0.3 M $CaCl_2$ and 7.5 mL of bile (160 mM in water). Pancreatin contains enzymatic components including trypsin, amylase and lipase, ribonuclease, and protease. A volume of pancreatin solution (800 $U.mL^{-1}$) was dissolved in SIF in order to reach 100 $U.mL^{-1}$ of trypsin activity. The final mixture volume was finally adjusted to 120 mL with water. The simulated digesta was incubated for 2 h in the water bath at 37°C whilst mixing at 80 rpm. This mixture is referred to as the simulated intestinal digesta.

III.2.1.2.4.4 Sample collection

During each digestion trial, 2 mL of sample was taken at the end of the oral phase, and then at times 0, 1, 2, 5, 10, 30, 60, 120 min during both the gastric and subsequent intestinal simulations. A volume of 20 µL 0.5 M Pepstatin A or 100 µL 0.1 M Pefabloc were added to stop the enzyme reaction at the end of the gastric or intestinal phase respectively. Each sample (except those from the liquid control) was homogenized at 2,500 rpm for 1 min with an T 25 digital ULTRA-TURRAX® equipped with an inox S25N-8G Dispersing element (IKA® Works, Inc., Wilmington, NC, USA), before subsequent freezing and storage at 20 °C ahead of biochemical analysis. Each of these experiments was performed in triplicate on each of the 5 products from different daily productions (n = 3) for a total of 15 independent digestions.

III.2.1.2.5 Biochemical analysis of digesta

III.2.1.2.5.1 Protein hydrolysis

The protein compositions of the digesta were determined by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). SDS–PAGE analysis was performed on the thawed digesta samples, without centrifugation, using 4–12 % polyacrylamide NuPAGE Novex® Bis–Tris 15-well precast gels (Novex® Life Technologies, California, USA) mounted in a Hoefer™ miniVE vertical electrophoresis system (Pharmacia Biotech, Sweden) following the manufacturer's instructions. Samples were first homogenized by pipetting. Gastric and intestinal samples were diluted 8-fold and 4-fold, respectively, with the denaturing NuPAGE® LDS (4X) buffer (106 mM TRIS HCl ; 141 mM TRIS Base ; LDS 2 % ; Glycerol 10 % ; 0.51 mM EDTA ; 0.22 mM SERVA® Blue G250 ; 0.175 mM Phenol Red ; pH 8.5) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) under reducing conditions (with 0.5 M DTT solution and 10 min at 70 °C). Samples were then loaded, at a protein concentration of 10 µg of total protein/well, into the sample slots and a marker kit (Mark 12™ Unstained Standard, novex® Life Technologies, California, USA) was used for molecular weight (MW) calibration. Electrophoresis was performed at 200 V and 50 mA during 125 min. Gels were fixed in 30 % (v/v) ethanol and 10 % (v/v) acetic acid solution for 30 min and stained with Coomassie Brillant Blue

G250 for 24 h. The gels were scanned with an Image Scanner III LabScan 6.0 (GE Healthcare Europe GbmH, Velizy-Villacoublay, France).

III.2.1.2.5.2 Release of α-amino groups

The kinetics of α-amino groups release during *in vitro* digestion experiments was measured using the OPA (o-phthaldialdehyde) method. α-Amino groups released by hydrolysis of the proteins react with o-phthaldialdehyde and β-mercaptoethanol to form an adduct that strongly absorbs at 340 nm. Due to the interference of the protein compounds from the digestive fluids, a filtration step was necessary for all samples of digestion experiments. Therefore, a volume of 900 µL of each thawed digesta sample was centrifuged for 10 min at 8,000 g and at 4°C. The supernatant was ultra-filtered through a 3 kDa Vivaspin® Polyethersulfone centrifugal filter (Vivaspin® 500, 3000K MWCO, PES, Sartorius AG, Goettingen, Germany) for 30 min at 10,000 g and at 4°C. Molecules larger than 3 kDa were removed consequently, and the measurement shows the release of peptides < 3 kDa from protein hydrolysis during *in vitro* digestion. The release of peptide at each digestion time of the gastric and intestinal phases was calculated as the percentage of α-amino groups released by hydrolysis of the proteins in the 3 kDa ultra-filtered solution on the total number of α-amino groups present in the sample at the final time (120 min) of the gastric and intestinal phases, respectively.

The OPA reagent was prepared as described by Church, Swaisgood, Porter, & Catignani, 1983 : 1.25 mL of SDS (200 $mg.mL^{-1}$), 350 mL dithiothreitol (DTT) (1 M), 1.25 mL OPA reagent in ethanol (10 $mg.mL^{-1}$) and 47.15 mL sodium tetraborate (Borax) (20 mM – pH 9.5) were mixed. The solution was kept in the dark. A Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) was set at 340 nm blanked with 100 µL OPA reagent + 50 µL deionized water. To make a calibration curve, 50 µL of 0.2; 0.4; 0.6; 0.8; 1 and 2 mM methionine standard solutions were added to 100 µL OPA reagent in a flat-bottom 96-well microtiter plate (Greiner Bio-One, Courtaboeuf, France). The same procedure was applied to samples from digestion experiments. The total number of α-amino groups were determined by the OPA method after total acid hydrolysis of the 120 min digesta samples from both the gastric and intestinal phases (2 mg of total protein) with 1.5 mL of 6 N hydrochloric acid (HCl) solution at 110 ° C for 24 h. After cooling, the hydrolysate was dried at 60 °C under vacuum in a rotary evaporator. After drying, the sample powder was re-dispersed in 2 mL of deionized water and filtered using a 0.45 µm Syringe Filter (Restek, Bellefonte, PA, USA). The absorbance at 340 nm of all samples in the microplate were automatically measured by the spectrophotometer after standing for exactly 10 min in each wells. Each assay was done in triplicate on all samples.

III.2.1.2.5.3 Amino acid concentration

The proportion of free amino acids released from the products and solubilized into the digestive fluids (bioaccessibility) were determined by ion chromatography. It was calculated as the percentage of the free amino acid concentration released at the final digestion time on the total amino acid concentration in the same final digesta sample.

Proteins contained in the thawed samples were first removed by precipitation of 500 µL of sample with 25 mg of dried sulfosalicylic acid at 4 °C for 1 h. The solution was centrifugated at 5,000 g for 15 min at 4 °C to remove the precipitated proteins. The supernatant was filtered on a 0.45 µm VWR® centrifugal nylon membrane filter (VWR International, Radnor, PA USA) and diluted 2.5-fold with the lithium citrate

injection buffer (0.2 M - pH 2.2) (Biochrom Ltd., Cambridge, UK). The total amino acid concentration was determined after total acid hydrolysis of the same samples (2 mg of total protein) with 1.5 mL of a 6 N HCl solution at 110 °C for 24 h. After cooling, the hydrolysate was dried at 60 °C under vacuum in a rotary evaporator. After drying, the sample powder was re-dispersed in 2 mL of deionized water and filtered using a 0.45 µm Syringe Filter (Restek, Bellefonte, PA, USA). These solutions were then injected in the cation exchange column of the Biochrom 30+ Automatic Amino Acid Analyzer (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) using lithium citrate buffer as eluent, according to Moore, Spackman, & Stein (1958), with post-column derivatisation with ninhydrine as the revealing reagent (Ultra Ninhydrin Reagent Kit, Biochrom). Finally, a photometric detection at 570 nm (440 nm for proline) led to the determination of the mass concentration of amino acids. The amino acids were quantified by comparing them with amino acid profiles from external amino acid standard (A9906, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). This chromatographic assay was not replicated on each sample, but as digestion experiments were realized in triplicate, three independent values of amino acid concentrations were available for each product.

III.2.1.2.6 Statistical analysis

A repeated measures analysis of variance (rANOVA) was performed on the data using RStudio v3 software (RStudio™, Boston, MA, USA) with the function “lmer” of the package “lmerTest” (Kuznetsova, Brockhoff, & Christensen, 2014). The differences in mean values ($p < 0.05$) were assessed by using a Tukey’s test (“TuckeyHSD” function).

III.2.1.3 Results

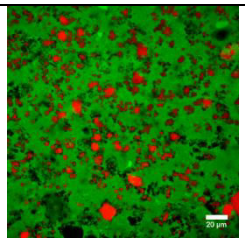
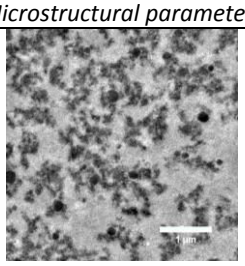
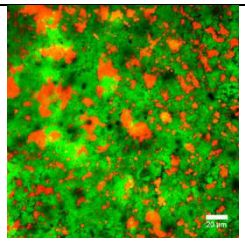
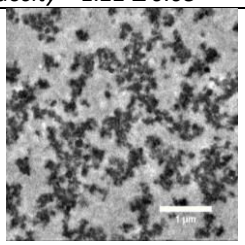
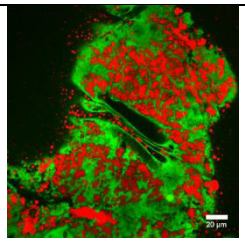
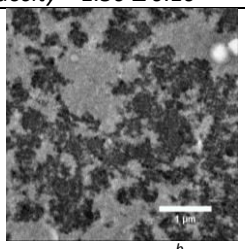
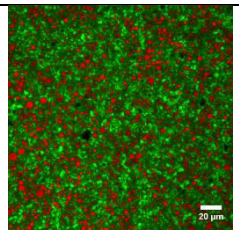
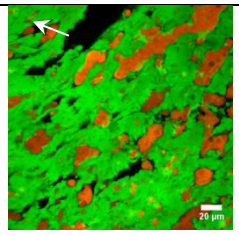
III.2.1.3.1 Multi-scale characterization of the products

Heat-induced gelation of a whey-based dairy emulsion was performed by applying different combination of pH, stirring and heat treatment, in order to obtain a range of different gel structures. The untreated emulsion and a commercial mozzarella cheese were also studied as controls. Table 1 shows photographs of the different products for illustrative purposes.

At the macrostructural level, texture analysis was performed by measuring the fracture force (N) of the gels. The two Hard and Processed products show a very significant difference in their values ($p <0.001$), with the Hard gel having a fracture force (131 N) more than ten times higher than that of the Processed gel (10 N). Despite the fracture force of the Mozzarella (100 N) was significantly lower than the Hard gel’s one ($p<0.05$), this commercial cheese meets the objective of finding a casein-based control gel very close both in terms of composition and texture to the Hard whey-based gel.

The network structures of these gels were visualised at the micrometer length scale using confocal laser scanning (CSLM) and transmission electronic (TEM) microscopy and shown in Table 1. CSLM was used to examine the overall lipoproteic network organization and to obtain information about the fat droplet morphology and distribution. Despite the identical fat and protein composition of the liquid, Hard, Processed and Whipped products, confocal microscopy showed that the lipoproteic network differed at the microscopic level. In the liquid emulsion, small fat globules of about 15 µm in diameter were quite homogeneously dispersed in the whey protein suspension. The presence of protein aggregates was also highlighted on the CSLM micrograph, in which the green spots correspond to clusters of non-fully

Table 1. Summary of the treatment conditions, macrostructure and microstructure of the different dairy products. In the CSLM images, the scale bars correspond to 20 µm. The fat is coloured in red, the protein network in green, and black zones correspond to air bubbles. In the TEM images, the scale bars correspond to 1 µm. Different superscript letters in the same column denote values with statistically significant differences (p < 0.05) [illegible]

Product name Treatment conditions *Surface hydrophobicity*	**Macrostructure** *Textural property*	**Microstructure (CSLM)**	**Microstructure (TEM)** *Microstructural parameters*
Hard gel pH = 6.4 70°C / 36.5 min *BPB bound (µg)* *= 23.6 ± 0.2* [a]	 *Fracture force (N)* *= 130.81 ± 15.46* [a]		 *Porosity = 0.62 ± 0.01* [a] *Tortuosity = 1.22 ± 0.08* [a]
Processed gel pH = 5.9 75°C / 19 min *BPB bound (µg)* *= 22.5 ± 0.3* [b]	 *Fracture force (N)* *= 10.33 ± 3.43* [b]		 *Porosity = 0.60 ± 0.02* [a] *Tortuosity = 1.30 ± 0.10* [a]
Whipped gel pH = 5.4 75°C / 80 min *BPB bound (µg)* *= 45.6 ± 1.2* [c]			 *Porosity = 0.50 ± 0.04* [b] *Tortuosity = 1.57 ± 0.1* [b]
Liquid control pH = 6.4 No heat treatment → **native whey proteins** *BPB bound (µg) = 0* [d]			
Mozzarella Traditional cheese-making process → **casein proteins**	 *Fracture force (N)* *= 100.09 ± 8.51* [c]		

dissolved proteins (white arrow as an example), with variable sizes of 10 µm of order of magnitude. In the whey based gelled products, the continuous phase made of proteins showed more irregularities than in the commercial cheese, which showed a continuous homogeneous network. This suggests a non-homogenous gelation process during the heat treatment. In the gelled products as well as in the Mozzarella, large fat globules are observed, owing to emulsion destabilization processes involving coalescence. Coalescence occurs when two or more droplets merge to form a bigger droplet. In the Processed and Whipped products, as well as in the Mozzarella, the lipid phase did not form spherical droplets but more large "pockets" of fat of several hundred microns, probably due to extensive coalescence phenomena during cheese-making and heat treatment. Micrographs of the gelled products presented black holes which corresponded to air bubbles of variable sizes. As expected, larger air bubbles were visible in the Whipped product because of the foaming process applied to the whey-based emulsion before heat treatment.

Image analysis was performed on TEM micrographs to quantify two main microstructural parameters, i.e. the porosity and the tortuosity of the protein network (Table 1). On the micrographs, the dark phase corresponds to the protein matrix (particle aggregates) and the lighter phase corresponds to the aqueous phase, mainly formed by water, lactose and minerals. TEM micrographs of the Hard and Processed products micrographs were visually quite similar. The microstructure of the gels was dominated by spherical protein aggregates (100-200 nm wide) dispersed in the serum phase. Image analysis of the micrographs confirmed that their microstructural properties were similar, with porosity and tortuosity parameters non-significantly different ($p > 0.05$) (around 0.6 for the porosity and around 1.2-1.3 for the tortuosity). In the Whipped product, the TEM micrographs allowed to observe much larger protein agglomerates (500 – 1000 nm) despite an identical protein concentration compared to the Hard and Whipped gels. These protein aggregates were closely packed forming a network with mean porosity and tortuosity equal to 0.50 ± 0.04 and 1.57 ± 0.15 for the Whipped gel, which were significantly ($p < 0.05$) smaller and larger, respectively, than the values obtained for the two other whey-based gels. At the molecular level, Table 1 shows the amount of bound BPB in the different whey-based dairy products. In the liquid control, the value was found negligible because the whey proteins are in their native globular state and therefore their surface hydrophobicity is low. The amount of bound BPB drastically increased in the gelled products obtained by heat treatments. Indeed, extended exposure to temperatures > 60 °C can irreversibly affect the solubility of whey proteins and change the relative hydrophobicity at the protein surface leading to exposure of nonpolar hydrophobic residues thereby increasing hydrophobic attraction (Kim, Cornec, & Narsimhan, 2005; O'Loughlin et al., 2012). The values were close in both Hard and Processed products, because of the quite similar energy supply applied to these two products during heat treatments, i.e. 70 °C during 36.5 min and 75 °C during 19 min, respectively. However, in the Whipped gel, the heat treatment was much more drastic, with a temperature of 75 °C during 80 min, leading to the doubling of the amounts of bound BPB.

III.2.1.3.2 Extent of digestion

III.2.1.3.2.1 Protein hydrolysis

The *in vitro* gastro-intestinal protein digestion patterns of the two control samples and the three whey-based gels, were examined using the SDS-PAGE technique under reducing conditions. Figure 1 shows the protein profiles before (0 min) and after different simulated *in vitro* gastric and intestinal digestion times. As expected, the control Mozzarella sample before digestion (0 min) has a typical milk-like protein profile, the most abundant proteins being α-, β-, κ-casein, β-lactoglobulin and α-lactalbumin, as confirmed by the standard proteins run in parallel on the same gel. Although the three caseins, β-lactoglobulin and α-lactalbumin bands progressively disappeared during digestion, they surprisingly reappeared after 60 min of gastric digestion. This was probably due to a problem of sampling caused by the heterogeneity of the samples during digestion with the presence of milk protein particles of different sizes that cannot always be pipetted. In the liquid control, the characteristic bands corresponding to β-lactoglobulin remained practically unchanged throughout the gastric phase, meaning that this protein was resistant to pepsin hydrolysis. In contrast, the intensity of the α-lactalbumin band decreased very progressively. After 5 min of intestinal digestion, the intensities of these two main whey protein bands decreased but they were still visible at 120 min, meaning that the hydrolysis of this protein was still incomplete at the end of the simulated digestion process. Two sets of peptide bands appeared both below the α-lactalbumin band (14.4 kDa) and below 3 kDa, due to the degradation of high molecular weight proteins into proteinaceous molecules with a low molecular weight and smaller peptides.

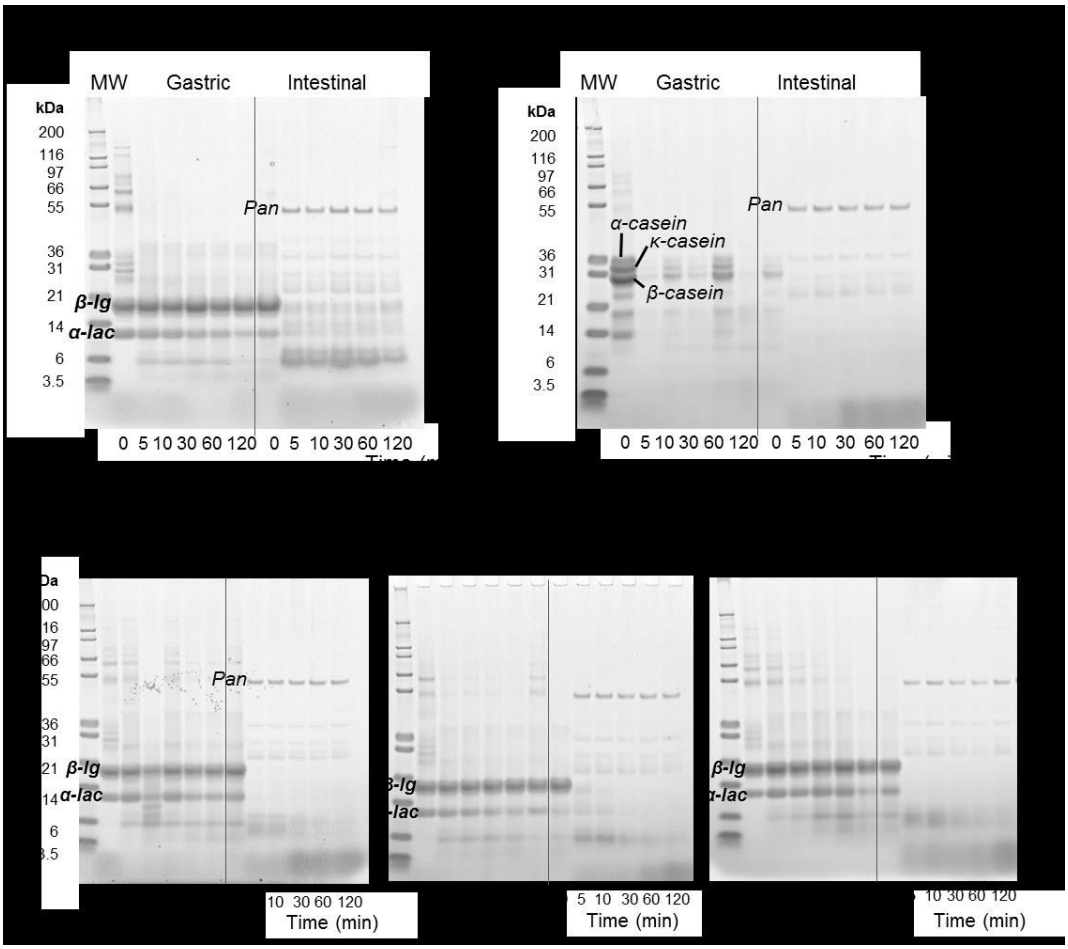


Figure 1. SDS-PAGE protein profile during in vitro gastro-intestinal digestion (0, 5, 10, 30, 60 and 120 min) of A) Liquid control, B) Mozzarella, C) Hard, D) Processed and E) Whipped whey-based dairy gels. MW: Molecular weight of standards markers.

The electrophoresis profiles obtained during the simulated digestion of the three whey-based gels are globally similar to each other. The intensity of the α-lactalbumin and β-lactoglobulin bands is almost constant during the whole duration of gastric phase. For the Hard and Whipped gels, the bands almost fully disappeared after 5 min of intestinal digestion, whereas the intensity of the bands decreased a bit more slowly in the Processed cheese. Therefore, the two main whey proteins were resistant to pepsin hydrolysis. The proteolysis only began with the addition of the pancreatin enzymes at the beginning of the intestinal phase. In parallel, this observation could be related to the appearance of several bands of smaller proteins below the α-lactalbumin band and peptides around 3 kDa.

III.2.1.3.2.2 3.2.2. Kinetics of proteolysis

The kinetics of proteolysis was determined from the OPA quantification of the <3 kDa soluble protein fraction, which consists of small peptides and amino acid residues. Figure 2 shows the percentage of α-amino groups release as function of digestion time for the gastric (Fig. 2A) and intestinal (Fig. 2B) phases for the different dairy products. During the gastric simulated digestion phase (Fig 2A), the hydrolysis of

proteins by pepsin was very limited and no significant difference in proteolysis ($p>0.05$) was observed between the different dairy matrices. After 120 min of pepsin digestion, the α-amino group release ratio reached only around 0.5 % for the Mozzarella, Liquid and Hard products and around 0.75 % for the Processed and Whipped gels. However, the addition of duodenal and bile juices induced a major increase in proteolysis for all matrices. After the addition of proteolytic enzymes trypsin and chymotrypsin, both present in duodenal fluid, the kinetics of α-amino groups release were similar in shape for all products, with a fast rate at the beginning of the intestinal phase followed by a progressive slowing down after 10 min of intestinal digestion (Fig 2B). The final α-amino groups release ratio reached at the end of the intestinal phase (120 min) for the Mozzarella was significantly ($p<0.05$) higher (around 37 %) than the values obtained through the digestion of the whey-based products. The kinetics of proteolysis of the three different whey-based gels (Hard, Whipped and Processed) were not significantly different ($p>0.05$), but the final α-amino groups ratio obtained with the Hard gel was slightly lower (around 18 %) than for the Processed and Whipped gels (around 25 %). The α-amino groups release evolution during intestinal digestion of the liquid (and native whey protein) control was even significantly ($p>0.05$) lower than in the Processed and Whipped products, with a final ratio around 15 %.

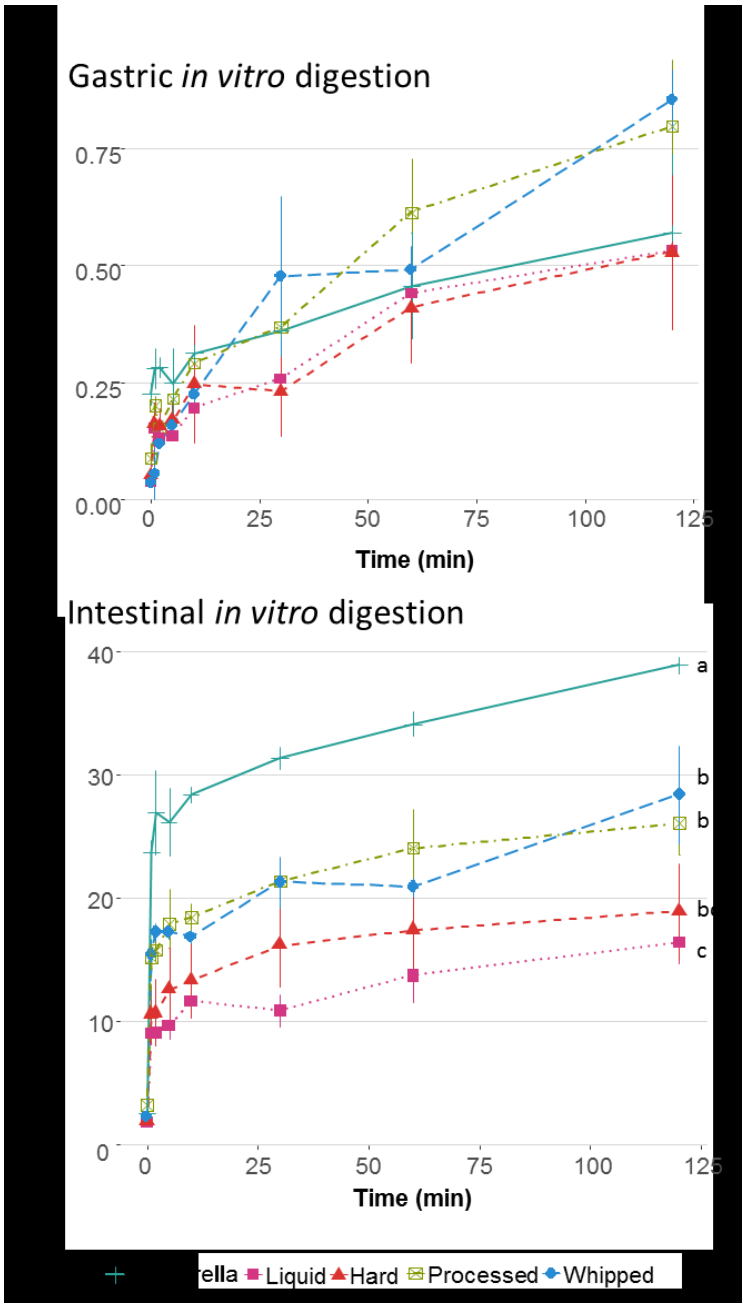


Figure 2. α-amino groups release during gastric (A) and intestinal (B) simulated digestion of the five dairy products: Mozzarella, Liquid control, Hard, Processed and Whipped whey-based gels. Values with a different superscript letter within a curve are significantly different (p ≤ 0.05).

III.2.1.3.2.3 In vitro bioaccessibility of the main amino acids

The bioaccessibility of the main amino acids was compared between the three different whey-based gels and the two control products using an *in vitro* gastro-intestinal model. Amino acid profiles of the whey-based products and of the Mozzarella are shown in Table 2. Some important protein characteristics of the whey-based products were the much higher concentrations of asparagine, alanine, methionine,

isoleucine, leucine, lysine and arginine compared to the casein Mozzarella control, and the lower content of the amino acids threonine, tyrosine and histidine. A focus on the concentration of the two branched-chain amino acids leucine and isoleucine, which are of particular interest in this study as precursor for muscle protein synthesis, showed values respectively more than 2-fold and 3.4-fold higher in the whey-based products than in the Mozzarella cheese. Both profiles showed a close content of the amino acids serine, glutamine, glycine and valine.

Table 3. Amino acid pattern (mg.g^{-1} protein) of the whey-based products and Mozzarella.

	Whey-based products	Mozzarella
Threonine	2613 ± *344*	3254 ± 24
Serine	2145 ± *175*	2331 ± 27
Asparagine	4865 ± *444*	2348 ± 26
Glutamic acid	7195 ± *699*	8112 ± 160
Glycine	1290 ± *95*	1204 ± 14
Alanine	2028 ± *172*	1341 ± 11
Valine	2368 ± *192*	2488 ± 17
Methionine	703 ± *209*	399 ± 24
Isoleucine	2338 ± *173*	670 ± 65
Leucine	4685 ± *356*	2021 ± 47
Tyrosine	1788 ± *121*	3618 ± 4
Lysine	4183 ± *346*	2310 ± 27
Histidine	963 ± *93*	2064 ± 15
Arginine	1465 ± *154*	767 ± 5

Figure 3 shows the ratio of the concentration of some amino acids released in the soluble phase of the digesta at the end of the simulated digestion process on the respective total concentration of the same amino acids in the product, for the five dairy matrices. These values can be considered as a measure of the *in vitro* bioaccessibility of the different essential amino acids. The determination of tryptophan was not possible using ionic chromatography, due to its degradation following acid hydrolysis. The overall trend shows a significantly higher ratio ($p<0.05$) of the arginine, tyrosine, phenylalanine, lysine and leucine amino acids released at the end of digestion for the Mozzarella compared to the whey-based products. The values obtained for these 5 amino acids were non-significantly different ($p>0.05$) between the three whey-based gels, and significantly lower ($p<0.05$) in the liquid control containing non heated whey proteins. The arginine amino acid showed the highest value of *in vitro* bioaccessibility, with values around 83 % for the Mozzarella, 55 % for the three whey-based gels and 42 % for the liquid control. Bioaccessibility values were lower for the tyrosine, phenylalanine and lysine amino acids, around 50 % from the Mozzarella, <40 % for the whey-based gels and between 20 and 30 % from the liquid control. For the Leucine amino acids, values were even inferior with 30 % of free amino acids from the Mozzarella, around 16 % from the whey-based gels and <10 % from the liquid control. Therefore, despite a total concentration of arginine, leucine and lysine twice higher in the whey-based products compared

to Mozzarella cheese control, the bioaccessibility of these amino acids obtained in an *in vitro* digestion model was almost twice as low in the whey-based gels and even lower in the liquid control. Particularly low values of the free amino acid ratio (around 5 %) were obtained in the different dairy products for the threonine, valine and isoleucine.

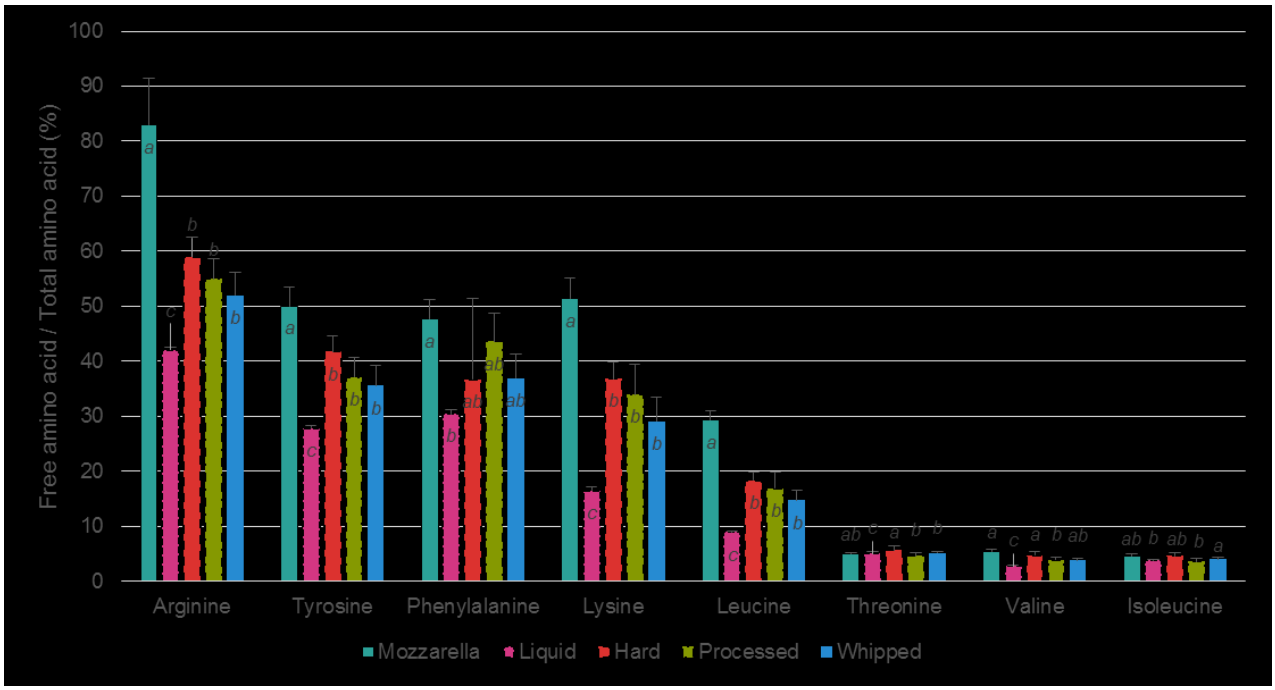


Figure 3. Ratio of the concentration of the main amino acids released in the soluble phase of the digesta at the end of the simulated digestion process on the respective total concentration of the same amino acid in the product, for the five dairy products: Mozzarella, Liquid control, Hard, Processed and Whipped whey-based gels.

III.2.1.4 Discussion

The objective of this study was to compare the digestion of novel whey-protein based dairy products using an *in vitro* digestion protocol. Whey proteins were chosen for their known ability to promote muscle synthesis in the elderly. Products were formulated using identical composition but different processes, leading to a range of structural properties from liquid to more or less firm gels. A commercial Mozzarella cheese was tested as the casein-based control. Nutritional performance was assessed by measuring the hydrolysis of proteins and the bioaccessibility of amino acids.

III.2.1.4.1 Under simulated gastric digestion conditions, the initiation of proteolysis by pepsin is mainly observed for casein-based products. Whey proteins are pepsin-resistant, particularly when they are still native.

It has already been widely shown in the literature that the digestibility of proteins depends on the degree of denaturation (Jin et al., 2016). Indeed, proteolysis of a protein substrate can occur only if the protease active site can bind and adapt to the specific stereochemistry of the polypeptide chain

(Fontana, Polverino de Laureto, De Filippis, Scaramella, & Zambonin, 1997). This is difficult to achieve with native rigid protein structures, whereas unfolded proteins are degraded much faster. Caseins have very flexible and open structures which make them extremely sensitive to proteolysis (Morell, Fiszman, Llorca, & Hernando, 2017). Conversely, undenatured whey proteins have a globular structure (e.g. β-lactoglobulin and α-lactalbumin) which inhibits the enzymes' access to potential cleavage sites. As a result, these proteins are considerably more resistant to pepsin hydrolysis (Lundin, Golding, & Wooster, 2008; Nguyen, Bhandari, Cichero, & Prakash, 2015). Figure 1 showed that whereas proteolysis by pepsin had started for caseins during the gastric phase, whey proteins were quite resistant to its enzymatic action for the different dairy products. The whey-based gels were heat-treated, which denature the whey proteins and should result in increased susceptibility to pepsin proteolysis (Lundin et al., 2008) compared to the Liquid control in which whey proteins were under their native state. Our results showed that heated whey proteins were still more resistant to pepsin attack than the casein proteins in the Mozzarella control during gastric digestion. These results are in accordance with Borreani, Llorca, Quiles, & Hernando (2017) who investigated the *in vitro* gastric digestion behavior of whey and casein proteins in a heat-treated semi-solid real food. However, Kopf-Bolanz et al. (2014) and Tunick et al. (2016) found that the degradation of casein bands was very rapid during gastric digestion of milk. Even if β-lactoglobulin and α-lactalbumin bands remained intense throughout the digestion period, Kopf-Bolanz et al. (2014) observed the β-lactoglobulin in decreasing amounts depending on the heat treatment of the milk.

In fact, pepsin is an endoprotease known to initiate only the hydrolysis of proteins of the digestion process in the stomach, leading to the release of smaller protein fragments, and eventually large peptides in the chyme. For instance, Fontana et al. (1997) showed that the molecular weight of the smallest protein fragments released from the proteolysis of native α-lactalbumin by pepsin at pH 2 was 11 kDa. β-lactoglobulin has also been reported to be rather resistant to pepsinolysis thanks to its native conformation, particularly stable at low pH (Guo et al., 1995). By assuming a similar behavior for the whey-based gels, this hypothesis could explain the very low amount of α-amino groups (< 0.8 %) released in the gastric digesta (Figure 2A). Indeed, the OPA assay chosen in this study for determining the degree of hydrolysis was carried out on the 3 kDa ultrafiltrates of digesta, which therefore quantified the number of cleaved peptide bonds by pepsin on the released peptides smaller than 3 kDa only. Those results are in line with low values of degree of hydrolysis by pepsin found in the literature for whey proteins: 1.7 % after 4 h for native proteins (Asselin, Hébert, & Amiot, 1989), about 3 to 10 % after 2 h for heated proteins (Kim et al., 2007), 7.9 % for whey protein gels after 3h and between 3.4 and 6.0 % after 2h (Luo, Boom, & Janssen, 2015).

Moreover, the molecular state and structural properties of the different dairy products had no significant effect on the degree of proteolysis by pepsin (Figure 2A). This result is not in accordance with Mat, Le Feunteun, Michon, & Souchon (2016), who observed during simulated gastric digestion, that the rate of proteolysis was slower for a solid whey based-based emulsion than for the corresponding liquid one. Moreover, they noticed that gel pieces were still present at the end of the gastric phase, implying limited pepsin hydrolysis and the persistence of solid-state effects on digestion. To go further on the matrix structure effect, Borreani et al. (2017) observed using *in vitro* gastric digestion that the casein broke down more slowly than the whey proteins in semi-solid dairy matrices. For them, this difference was due

to the strong clotting of the caseins at low gastric pH. Fang, Rioux, Labrie, & Turgeon (2016) observed that the disintegration of Mozzarella cheese was slow and incomplete during simulated *in vitro* gastric digestion, due to the compact and elastic textural properties of this matrix. They also measured low proteolysis level and peptide release and hypothesized a limited access of the pepsin enzyme to the protein substrate in this casein-based gel. In the same way, Luo et al. (2015) showed that the steric hindrance of the network in whey-based gels influenced negatively the hydrolysis efficiency of pepsin. Floury et al. (2018) and Luo, Borst, Westphal, Boom, & Janssen (2017) showed that the principal mode of pepsin action during static *in vitro* digestion experiments is the hydrolysis of the proteins located at the surface of the gel particles. Such behaviour was explained by the strong reduction of the pepsin diffusivity inside the protein network compared to diffusion in solution, and therefore the lower enzyme accessibility to the protein substrates within the compact microstructure of these matrices (Luo, Borst, Westphal, Boom, & Janssen, 2017; Thévenot et al., 2017). These observations are thus finally in agreement with the low hydrolysis measured at the end of the gastric phase in the case of our gelled products, either casein or whey based, which all showed dense protein networks (Table 1).

III.2.1.4.2 Under simulated intestinal digestion conditions

III.2.1.4.2.1 Proteolysis is less intense in the whey-based products than in the casein-based Mozzarella control.

Based on data from the literature on whey protein digestion and their nutritional performance in human (Pennings et al., 2011), a faster digestion of the whey-based protein products and a much higher leucine concentration released at the end of digestion compared to the casein-based Mozzarella control were expected. On the contrary, our results showed a faster and significant higher release of peptides measured during the simulated intestinal digestion of Mozzarella, compared to all other whey-based products. This discrepancy between the present data and most published studies comparing the nutritional properties of caseins and whey proteins are probably the result of differences in digestion protocols. Indeed, using *in vivo* digestion models, caseins have been shown to be more slowly digested than whey proteins. Because of their micellar structure and their physicochemical properties, the coagulation of milk casein in the stomach slows down their emptying and metabolism, contrary to soluble whey proteins, known to be rapidly emptied from the stomach and resulting in a rapid increase in amino acid concentration in the plasma (Barbé et al., 2013; 2014; Boirie et al., 1997). Nevertheless, most of the published studies were limited to liquid matrices (Tang et al., 2009). From these *in vivo* studies, it is clear that there is a strong impact of milk gelation on the retention of food in the stomach, which leads to a slowing of gastric emptying (Barbé et al., 2014; Le Feunteun et al., 2014). Both the gastric emptying and the continuous secretion of digestive enzymes and hydrochloric acid are not simulated in static conditions. Thus, the faster proteolysis of the caseins in the Mozzarella control, and the greater degree of hydrolysis reached at the end of digestion, in comparison with those of the whey-based products, can be explained by the experimental conditions. These ultimately led to a greater amount of free leucine released by the casein matrix at the end of the digestion process, while its total initial concentration is lower.

III.2.1.4.2.2 The denaturation of whey proteins promotes their hydrolysis during digestion

The digestion of the whey-based gels, with denatured proteins, led to a higher protein hydrolysis than the digestion of the liquid matrix with native proteins. In accordance with the electrophoresis (Figure 1), the degree of α-amino groups release was the lowest for the liquid control, in which the whey proteins were in their globular native states, compared to the whey-based gels (Figure 2B). This results in a significantly lower concentration of leucine at the end of digestion for the liquid control with respect to the whey-based gels (Figure 3). Singh et al. (2014) also observed that whey proteins in structured gels were hydrolysed faster than native proteins in solution under simulated gastric conditions. Indeed, heat treatments aimed at promoting the aggregation of the whey proteins, and therefore the gelled state have resulted in more or less denaturation of the proteins, leading to different surface hydrophobicity depending on the unfolding of the macromolecules (Table 1). As shown previously, β-lactoglobulin, the major constituent of whey proteins, is, in its native form, rather resistant to pepsin hydrolysis. However, its susceptibility to pepsinolysis increased when the protein is denatured by heat above 70 °C (Reddy, Kella, & Kinsella, 1988), which is related to an irreversible change in the conformation and the resulting exposure of previously buried hydrophobic areas. Peram et al. (2013) showed that stable high molecular weight aggregates (e.g. pentamers, tetramers, and trimers) generated during heat-induced aggregation of β-lactoglobulin were digested relatively rapidly compared with native and non-native dimers. Our results are therefore in agreement with previous published studies showing that the denaturation of whey proteins promotes their hydrolysis during intestinal digestion thanks to the unfolding of the globular molecules during heat treatment.

III.2.1.4.2.3 There was no clear effect of the microstructure of the whey-based gels

Several recent studies have highlighted the importance of food microstructure on the digestion of milk proteins (Barbé et al., 2013; Rinaldi, Gauthier, Britten, & Turgeon, 2014). Factors such as heating profiles, pH and application of shear during the foaming process, all play a role in determining final microstructure of whey protein gels. It generates opportunity to design network structures with varying morphology (Singh et al., 2014). Heat-induced gelation of whey proteins involves the formation of molecular linkages through disulphide and hydrogen bonds, Van der Waals, hydrophobic and electrostatic interactions, whose extent also depends on the physico-chemical conditions such as pH and shear (Singh et al., 2014). When the surface charge and electrostatic repulsion are reduced, the protein molecules form primary aggregates (50-300 nm) that can associate further into larger polydisperse agglomerates which, if the protein concentration is high enough, can then be connected to form a network (Nicolai, Britten, & Schmitt, 2011). The three Hard, Processed and Whipped whey-based protein gels differ statistically by their macro- and micro-structural properties (Table 1). Moreover, the protein particles in the Whipped gel appeared to be more closely packed than those in the non-sheared gels, due to a more extensive heat denaturation of the whey protein conformation (Table 1). The differences in the gel microstructures are manifestation of changes of whey proteins at the molecular level. Indeed, the molecular assembly of whey proteins into aggregates and networks is dependent on the conditions during gel formation (Singh et al., 2014). In the present study, no difference between the three differently structured heat-induced gels could be observed, neither on proteolysis of the main proteins by electrophoresis (Figure 1) and on the kinetics of α-amino groups release during the simulated intestinal digestion (Figure 2B), nor on the bioaccessibility of the amino acids at the end of the intestinal

phase (Figure 3). However, despite a non-statistically significant difference, the degree of α-amino groups release obtained for the Hard gel was lower throughout the intestinal phase compared with the two Processed and Whipped products (Figure 2B). The slightly slower kinetic of digestion could be attributed to differences in the gel structures (Table 1). Especially, the fracture force of the Hard gel was significantly higher than the Processed gel. These results are in agreement with Singh et al (2014) who measured that the rate of peptides released during *in vitro* digestion differed depending on the structure of the gels and extent of heat and shear induced protein aggregation. Proteins in the sheared gels were digested more slowly than the non-shear gels. This was attributed to the denser agglomerates for the sheared gels, which might have slowed down the enzyme diffusion into the gel particles due to steric hindrance. Luo et al. (2015) also mentioned the hypothesis of different enzyme activity between whey protein solutions and gels using simulated gastric conditions. They showed that the barrier of the protein gel structure did not simply slow down the reaction rates (compared to soluble protein digestion), but it also altered the mechanisms of enzymatic hydrolysis. They postulated that the difference in activity observed stemmed from the steric hindrance of gel structure to the diffusion of pepsin and its hydrolysates.

III.2.1.5 Conclusion

This work highlighted the influence of whey protein structure (native vs. denatured/gelled) on enzymatic digestion using a simulated gastro-intestinal model. As expected, the heating of whey protein during the formation of gelled structures, significantly reduced the resistance of whey proteins to enzymatic digestion compared to the native state. However, different structure of gels and/or extent of protein denaturation did not influence significantly the proteolysis and bioaccessibility of free amino acids. More surprisingly, both the kinetic of protein hydrolysis and the amino acid liberation were significantly higher in the casein-based gel than in whey protein matrices. It resulted that the bioaccessibility of amino acids from whey-based products, yet having a higher initial content for most of the main amino acids, was much less than from a casein-based traditional cheese like Mozzarella. However, this study did not take into account the dynamics of gastric emptying, acid and enzyme secretions. These important physiological parameters will have to be studied in future *in vivo* digestion studies in humans or animals.

ACKNOWLEDGEMENT

This study is part of AlimaSSenS [ANR-14-CE20-0003-01] funded by the French National Research Agency. The project is also supported by the Lactalis Group. We wish to thank G. Henry for her expertise in ionic chromatography, A. Burel from the Microscopy Rennes Imaging Center of SFR BIOSIT (France) for her expertise in TEM experiments, L. Aubry and V. Santé-Lhoutellier from UR INRA QuaPA, site de Theix (France) for analysis of protein surface hydrophobicity.

CONFLICT OF INTEREST

Etienne Hazart and Amandine Ligneul are staff of the Lactalis Group. The authors have declared no conflict of interest.

III.2.2 Impact du type de protéines (sériques ou caséines) incluses dans des produits laitiers solides sur la biodisponibilité de la leucine

Cette partie est basée sur le projet d'article suivant :

Whey-based cheese provide more postprandial plasma leucine than casein-based cheese: a pig study

L. Lorieau[1], Y. Le Gouar[1], G. Henry[1], T.T. Mao[1], A. Ligneul[2], E. Hazart[2], D. Dupont[1], J. Floury[1]*

[1] INRA – UMR STLO Science & Technology of Milk & Eggs, INRA Agrocampus, France
[2] Lactalis Recherche et Développement, France,

*Corresponding author: Juliane Floury

Target Journal: Food Chemistry

ABSTRACT

In order to develop dairy products suitable to the nutritional needs of elderly people, the amino acids bioavailability have been studied, after ingestion of either a whey-based cheese or Mozzarella, a casein-based cheese. Pigs were used as a model. Both cheeses contained 24 % protein and 20 % lipids. Following ingestion, samples of duodenal effluents and blood were collected over a 7 hour-period.

Whilst whey-based cheese contained 25 % more leucine than Mozzarella, digestion resulted in a concentration of postprandial plasma leucine between 2h and 5h30 after ingestion twice than that produced by the Mozzarella. Noting that the dry matter of the duodenal effluents were similar after each of the two cheese meals, differences in gastric emptying would not explain the difference in leucine bioavailability.

These results suggest the possibility of stimulating more efficiently the muscle synthesis in elderly people with cheese based on whey proteins rather than those based on caseins.

III.2.2.1 Introduction

The aging process is accompanied by a progressive decline in skeletal muscle mass, termed sarcopenia (Doherty, 2003). The decline of the muscle mass is related to an imbalance of the muscle proteins with a degradation rate superior to its synthesis. This phenomenon is mainly explained by the development of the "anabolic resistance", an effect which increases with age (Mitchell et al., 2016).

In order to limit this muscular decline, older people should maintain a regular physical activity and ensure a sufficient protein intake. Indeed, especially after age 65, their daily protein requirements increase from 0.8 g/kg body weight/day to 1-1.2 g/kg/d (Bauer et al., 2013). Certain essential amino acids, in particular leucine (provided by some proteins, such as the caseins and whey proteins from milk), are known to stimulate muscle synthesis by stimulating insulin secretion and thus the mTOR signaling pathway (Anthony et al., 2001; Ham et al., 2014). Studies on the elderly people have shown that an intake of whey protein stimulated muscle synthesis more efficiently than by the ingestion of the same amount of protein provided by caseins (Burd et al., 2012; Devries & Phillips, 2015; Katsanos et al., 2008; Martin et al., 2013; Pennings et al., 2011, 2012). Also, ingestion of leucine alone was less effective for stimulating the muscle synthesis than by the ingestion of the same amount of this essential amino acid provided by whey proteins (Ham et al., 2014). Moreover, it is known that gastric emptying of caseins is slower than that for whey proteins. This slowing of gastric emptying is due to the precipitation of caseins in the stomach under the effect of the gastric acidity (Bendtsen, Lorenzen, Bendsen, Rasmussen, & Astrup, 2013). On the other hand, whey proteins remain soluble in the stomach and are thus evacuated quickly (Boland et al., 2014; Lacroix et al., 2006; Lambers et al., 2013; Mahé et al., 1996). These changes to the gastric emptying behavior, affect the absorption of amino acids and the postprandial protein retention in humans and animals (Barbé et al., 2013; Boland et al., 2014; Sah et al., 2016). Boirie et al., (1997) have shown that the bioavailability of plasma amino acids, determined by protein digestion, has an important repercussion on postprandial protein metabolism. So caseins are named "slow" proteins whilst whey proteins are named "fast" proteins (Boirie et al., 1997). The digestion behavior of these two proteins has been widely studied in the case of liquid intakes or drinks, using a simplified model of digestion (Dupont & Mackie, 2015; Hall et al., 2003; Rinaldi et al., 2014) and using *in vivo* studies, like in rodent, pig or human (Boirie et al., 1997; Hall et al., 2003; Pennings et al., 2012; Tang et al., 2009). There have been fewer studies on simulated digestion models using semi-solid or solid foods with the work arising from (Borreani et al., 2017; Fang et al., 2016; Kopf-Bolanz et al., 2014; Macierzanka, et al., 2012; Morell et al., 2017, Lorieau et al. (in revision)). There are even fewer studies based on *in vivo* studies (Barbé et al., 2013; Feunteun et al., 2014). However, the effect of the food matrix itself on the kinetics of gastric emptying and protein hydrolysis is known to be predominant. In fact, the studies carried out on semi-solid or solid foods have highlighted that the gastric emptying also depends on the disintegration of the food ingested, which depends on its structure. As the pyloric sphincter acts as a sieve and retains particles larger to 1-2 mm, hard food and that difficult to disintegrated in the stomach result in a much longer emptying time (Barbé et al., 2013; Feunteun et al., 2014; Kong & Singh, 2008b). In addition, it appears that an increase of the viscosity of the chyme in the stomach further limits the kinetics of disintegration of food during the digestion phase and therefore slows down gastric emptying (Marciani et al., 2001). Therefore, it there remains a need to perform additional studies comparing the digestion

kinetics of whey and casein proteins, in order to establish if the digestive behavior of these two proteins differ when they are included in solid food.

The purpose of the present work is to study the bioavailability of amino acids, in particular the leucine, after the ingestion of a whey-based cheese and a casein-based cheese by using pig as an *in vivo* digestion model.

III.2.2.2 Materials et methods

III.2.2.2.1 Cheese models

Two cheeses of similar composition (24 % protein, 20 % fat) but based on casein and whey proteins were studied. Mozzarella cheese (pH 5.4) was chosen as a cheese formed from caseins (Lactalis, Société Laitière de Pontivy, Pontivy, France). The whey-based cheese model was formulated from 20 % (w/w) of fat (provided by dairy cream represented by crème fraiche, 30 % fat, Casino, Saint Etienne, France), 24 % (w/w) of whey protein (Pronativ® 95, Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France), 0.6 % (w/w) salt (NaCl), 0.7 % (w/w) calcium ($CaCO_3$, Quimdis, Levallois-Perret, France) and 1.5 % (w/w) of Glucono-delta-lactone (GDL) (Roquette, Lestrem, France). After mixing (300rpm) all the components over 1 hour at 37 °C (Thermomix TM5, Vorwerk, France), the mix was transferred to 26 mm diameter synthetic cases (Darmini Darmex Casing Caliber 28, MCM Casing, Lucenay, France). These synthetic cases were then immersed in a water bath at 75 °C for 20 min to form a gel. The final pH of the prepared cheese model was 5.9. In this paper, these two cheese products will be referred to as Mozzarella and whey-based cheese.

III.2.2.2.2 Animal experimentation

III.2.2.2.2.1 Animals

All procedures were in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals (L358-86 / 609 / EEC). The study received prior approval by the local animal ethic committee.

The animals used were 16 young Large White × Land Race × Pietrain sows of about 3 months old and 30-35kg live weight.

Two weeks before starting the trials, pigs were surgically fitted with a T-shaped cannula (silicone rubber) in the duodenum (10 cm downstream from the pylorus) and a catheter (polyvinyl chloride; 1.1 mm internal diameter, 1.9 mm outer diameter) in the jugular vein (around 10 cm inside the blood vessel). Pre-anesthesia of the animals was by an intramuscular injection of ketamine at 15 $mg.kg^{-1}$ (Imalgene 1000®). Animals were anesthetized by intubation with an oxygen/isoflurane gas mixture and maintained in this state throughout the surgical procedure. During the operation, analgesia of the animals was by the intravenous infusion at ear level of Fentanyl Renaudin® (10 mL at 50 $\mu g.mL^{-1}$). Animals received an intramuscular dose of amoxicillin the day of the operation and after 48 and 96 hours (Duphamox Long Acting®, 150 $mg.mL^{-1}$; at a dose of 1 mL/10 kg body weight). In the case of post-surgical discomfort (pain within 2 days after the operation and du to it), analgesia continued during 2 days by a subcutaneous injection of morphine hydrochloride every 2 hours (0.1 to 0.5 mL). In case of pain after surgery, pigs were

given paracetamol (Pracetam in 10 % premix, 30 mg/kg weight, Sogeval) and Spasfon for abdominal pain (1 ampoule of 4 mL twice a daily).

Following the operation, the pigs were housed in individual slatted pens (1 m²) within a ventilated room with controlled temperature (21 °C). During the two weeks of convalescence following the surgical procedure and also between the sampling days, pigs were fed with 800 g/d of a pig feed concentrate (Cooperl Arc Atlantique®, Pelstan, France) containing 16 % of protein, 1 % of fat, 4 % of cellulose and 5 % of mineral matter. Animals had free access to water. Seven hours after the test meal, a supplement of 400 g of feed concentrate was provided. One kg of the feed concentrate provided 2264 kcal and 160 g of protein. One week after the surgical operation, the cheese meals were offered to the animals, in order to accustom them to these new foods.

III.2.2.2.2.2 Test Meal

The test meals were provided two weeks after the operation of the animals, following a Latin square. All pigs were fasted the night before receiving the test meal. Furthermore, they had no access to water over a period starting from 1 h before to 7 h after meal delivery. Each meal portion was composed of 545 g of one cheese (either Mozzarella or whey-based cheese), providing an energy intake of 1526 kcal and 131 g of protein. The meal had to be fully eaten in less than 20 min. If at the end of this period, less than half of the portion was ingested, the pig was excluded from the study. Each food was presented twice to each animal over a period of two weeks, with a 48-hour break minimum between each test meal session.

Duodenal effluents samples only were collected during the first week of the trial, and blood samples only were taken during the second week. Samples of duodenal effluents were collected in tubes of 50 mL, first when the animal was still fasting (30 min before the meal ingestion), then at the presentation of meal (0 min), and then during the digestion of the meal (10 min, 20 min, 50 min, 105 min, 165 min, 225 min, 315 min and 405 min after the beginning of meal ingestion). The sample collection was stopped when 15mL was collected. The duodenal effluent samples were then quickly mixed, and after pH measurement. Samples were stored in ice for two hours maximum and then frozen at -20 °C.

Blood samples were taken 30 min before the meal and then 7 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min, 330 min, 420 min after the meal ingestion. For each sampling, 3 mL of blood were collected in tubes containing heparin (Hep-Li, SARSTEDT, Germany) as anticoagulant. Then, after centrifugation at 3000 g for 10 min at 4 °C, the blood plasmas (about 2 mL) were stored at -20 °C.

III.2.2.2.3 Chemical and physical analysis

III.2.2.2.3.1 Dry matter of the duodenal effluents

Dry matter of the duodenal effluents was determined after lyophilization of the sample (S.G.D.-SERAIL type CS 10-0.8, Argenteuil France) and calculated as follow:

III.2.2.2.3.2 Amino acid concentration

The concentration of amino acids in the plasma were determined by ion chromatography. 50 µL of a 10 % DTT solution was added to 500 µL of plasma sample. The solution was then mixed (Vortex, Heidolph ™ Reax 2000 TOP-MIX) and after 2 min of reaction, the sample protein was removed by adding 10 % by volume of a 0.5 $g.mL^{-1}$ sulfosalicylic acid solution (SAA) (i.e. 55 µL SAA at 0.5 $g.^{-1}$ mL for a sample of 500 µL + 50 µL of 10 % DDT) (Mondino, Bongiovanni, Fumero, & Rossi, 1972). After further mixing, the sample was kept for 1 h on ice. The precipitated proteins were then removed by centrifugation (4000 g for 20 min at 4 °C). The supernatant was diluted 1:1 with a [0.2 M] lithium citrate buffer (lithium loading buffer, Biochrom) at pH 2.2 and then filtered on a 0.45 µm filter (Rotilabo® Mini Tip Syringe filter, Ø15mm, CA).

These prepared solutions were then injected in the cation exchange column of the Biochrom 30+ Automatic Amino Acid Analyzer (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) using lithium citrate buffer as eluent, following the procedure set out by Moore, Spackman, & Stein (1958), with post-column derivatization using ninhydrine as the revealing reagent (Ultra Ninhydrin Reagent Kit, Biochrom). Finally, a photometric detection at 570 nm (440 nm for proline) led to the determination of the mass concentration of amino acids present. Quantification was by comparing the detected levels with amino acid profiles from external amino acid standard (A9906, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France).

The areas under the curve (AUC) of each amino acid were calculated by the trapezoidal rule.

III.2.2.2.3.3 Plasma insulin concentration

Insulinemia was measured by an enzyme immunoassay on an automated analyzer (kit: AIA-PACK IRI, Tosoh Bioscience AIA ™ -1800 Systems, Tokyo, Japan) with a sensitivity threshold of 0.5 $\mu U.mL^{-1}$.

III.2.2.2.4 Statistical analysis

In the trial only 11 pigs were used because 5 animals had to be excluded. Two of them were eating less than 50 % of the meals, 2 had complications following the surgical operation, and one animal had a flat postprandial amino acid profile after the ingestion of the whey-based cheese.

Data are presented as means ± one standard deviation. The effect of time of sampling, cheese type and the interaction of these two parameters (time x cheese type), on changes in amino acid concentration, pH, dry matter content, and insulinemia, were statistically investigated by applying two-way ANOVA with the animal in random effect. The statistical tests were carried out using the lmer function of the lme4 package (Kuznetsova et al., 2015) on the R 3.3.2 software. In the case of interaction between time of sampling and cheese type, the effect was tested with the glht function of the multcomp package (Hothorn et al., 2016). The confidence interval was 95 %. The areas under the curve and the amino acid concentrations were compared with a Student's t-test with the function including in R, “t.test”.

III.2.2.3 Results

III.2.2.3.1 Amino acid composition of the cheese products

Table 1 shows the concentration of the main amino acids in the whey-based cheese and in the Mozzarella cheese. The whey-based cheese has a significantly higher concentration of asparagine, leucine and lysine. On the other hand, the Mozzarella is characterized by a significantly higher concentration of proline, tyrosine and histidine.

Table 1. Amino acid composition (g amino acid / kg product) for the whey-based cheese and Mozzarella. Significant differences in amino acid composition were determined with a t-test. The essential amino acids are indicated in bold.

Amino acid ($g.kg^{-1}$)	Mozzarella	Whey-based cheese	p-value
Glutamic acid	8.112 ± *0.226*	7.195 ± *0.807*	ns
Asparagine	2.348 ± *0.036*	4.865 ± *0.513*	**
Leucine	**3.618 ± *0.006***	**4.685 ± *0.412***	*
Lysine	**3.263 ± *0.052***	**4.183 ± *0.4***	*
Proline	3.923 ± *0.064*	2.268 ± *0.202*	***
Threonine	**3.254 ± *0.034***	**2.613 ± *0.397***	**ns**
Valine	**2.488 ± *0.023***	**2.368 ± *0.222***	**ns**
Tyrosine	2.31 ± *0.037*	1.788 ± *0.139*	**
Serine	2.331 ± *0.038*	2.145 ± *0.202*	ns
Isoleucine	**2.021 ± *0.066***	**2.338 ± *0.199***	**ns**
Arginine	1.709 ± *0.045*	1.465 ± *0.178*	ns
Glycine	1.204 ± *0.02*	1.29 ± *0.11*	ns
Histidine	1.145 ± *0.023*	0.943 ± *0.102*	*

III.2.2.3.2 pH and dry matter of duodedual effluents

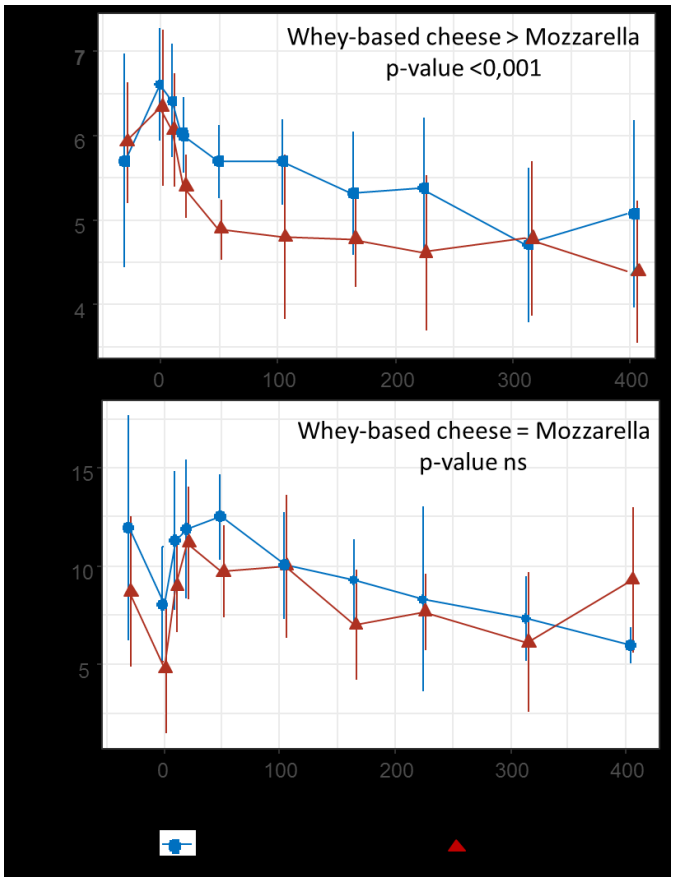


Figure 1: Changes in pH (A) and dry matter (B) of the duodenal effluents. Significant differences were identified by ANOVA. The interaction effect is not significant. In the case of the pH of the duodenal effluents, cheese type and time effect are both significant. In the case of duodenal dry matter elapsed time is the only one significant factor. ns: not significant

III.2.2.3.2.1 Time evolution of pH

The average values of the pH measured in the duodenal effluents during the fasting phase ahead of feeding (t = - 30 min) were similar (pH = 5.8 ± 1). However, the individual value varied greatly depending on the pig, ranging between 3.4 and 7.3. The ingestion of the meals produced an instantaneous increase in the pH measured in the duodenal effluents, up to 6.4 ± 0.7 at time 0 min (Figure 1A). Then pH of the duodenal effluents gradually decreased until 225 min following the meal ingestion, down to an average value of 5.4 ± 1.0 for the whey-based cheese and 4.6 ± 0.9 for the Mozzarella. After 400 min of digestion, the pH of the duodenal effluents were 5.1 ± 1.1 and 4.4 ± 1.1 after the ingestion of the whey-based cheese and the Mozzarella, respectively. Throughout the digestion period, the pH of the duodenal effluents after the ingestion of the whey-based cheese were significantly higher (around +0.5 pH unit) than following the ingestion of the Mozzarella (p-value <0.001). This difference might reflect the initial pH difference of the two cheeses: 5.9 for the whey-based cheese, 5.4 for the Mozzarella. Moreover, the presence of carbon dioxide (provided by the calcium carbonate) in the whey-based cheese is known to buffer the pH (Thomas, 1976).

III.2.2.3.2.2 Evolution of the dry matter of duodenal effluents during digestion

The quantification of the dry matter of duodenal effluents over the digestion period enabled a qualitative estimation of the dilution of meals by digestive fluids. As shown on Figure 1B, the dry matter changes throughout digestion did not significantly differ between the two test meals ($p > 0.05$). The mean dry matter of the duodenal effluents before ingestion of the meals was equal to 10 ± 5 %. It immediately decreased after ingestion of the meals, down to an average value of 6 ± 4 %, before recovering over the first 20 min of digestion, reaching 12 ± 3 %. After 20 min of digestion, the dry matter of the duodenal effluents gradually decreased until the end of the 7 h period of digestion, settling at a final value of 8 ± 4 %.

III.2.2.3.3 Levels of amino acids found in the plasma after feeding

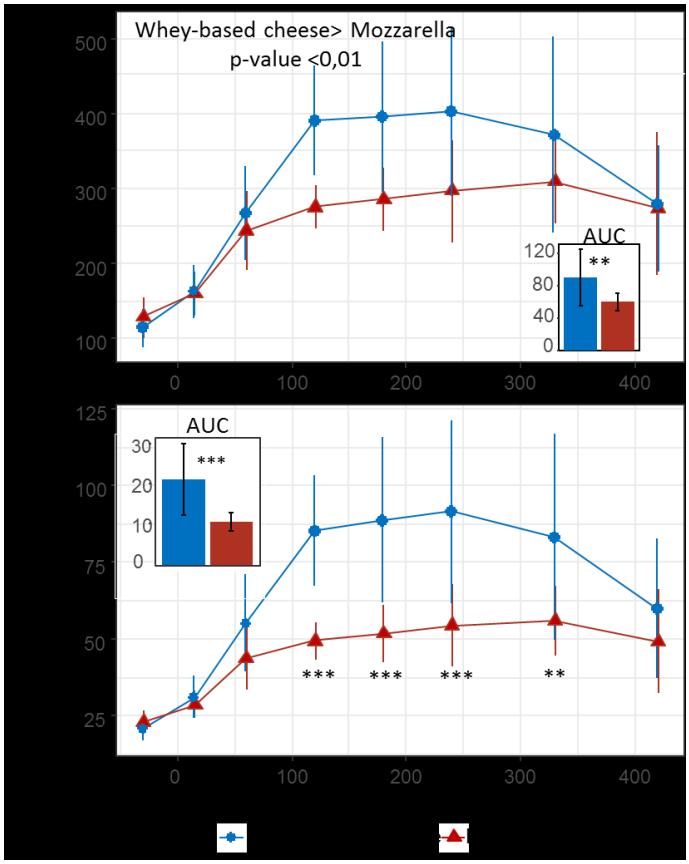


*Figure 2: Concentration of essential amino acids (A) and leucine (B) in the plasma taken over a 405 min digestion period following ingestion of whey-based cheese and Mozzarella. The bar graph insert depicts the areas under the curve (AUC) in g.min.mL^{-1}. p-value <0.01: **, <0.001: ***. With respect to the essential amino acids, the ANOVA statistical analysis showed that the digestion of the whey-based cheese induced a significantly higher concentration of amino acids in the plasma than that of the Mozzarella cheese. This result is supported by the comparison of the AUC. Concerning leucine, the whey-based cheese demonstrated a superior bioavailability of the amino acid, especially between 120 and 330 min after the meal ingestion. The areas under the curve were significantly different.*

III.2.2.3.3.1 Amino acid bioavailability

*Table 2: Areas under the curve (AUC) of the postprandial concentration of the main amino acids after the ingestion of the two types of cheese. Mean differences were evaluated with a t-test. p-value >0.5: ns: non-significant ; <0.5: *; <0.01: ** and <0.001: ***. Essential amino acids are marked in bold.*

Amino acid (AUC in mg.min.mL^{-1})	Mozzarella			Whey-based cheese			p-value
Glutamic acid	6630	±	*1542*	5074	±	*2444*	ns
Asparagine	-19	±	*367,8*	752	±	*695,2*	***
Leucine	**11085**	**±**	***2221***	**21713**	**±**	***8902***	***
Lysine	**11834**	**±**	***2036***	**19972**	**±**	***6801***	***
Proline	17877	±	*4797*	7394	±	*3588*	***
Threonine	**4500**	**±**	***1184***	**11694**	**±**	***4234***	***
Valine	**11765**	**±**	***2821***	**13246**	**±**	***6405***	**ns**
Tyrosine	2401	±	*630,2*	2180	±	*1055*	ns
Serine	4349	±	*1157*	4498	±	*2479*	ns
Isoleucine	**6009**	**±**	***1285***	**10728**	**±**	***4696***	***
Arginine	1895	±	*629,5*	2437	±	*1169*	ns
Glycine	2310	±	*598,1*	2429	±	*1306*	ns
Histidine	3891	±	*1021*	3472	±	*1717*	ns

Figure 2A shows the changes in concentration of total essential amino acids in the plasma over time following the ingestion by the pig of the two different cheese models. A similar small increase of the total essential amino acid concentration in the plasma for both food products was observed between time -30 min to time 7 min after the meal (115 ± 24 and 125 ± 28 mg.mL^{-1} rising to 164 ± 34 and 156 ± 30 mg.mL^{-1} for the whey-based cheese and the Mozzarella respectively). The rising concentration of essential amino acid released into the blood followed a similar trend irrespective of food type up to 60 min of digestion, with a large increase of the plasma amino acid concentration to around 260 ± 65 and 256 ± 64 mg.mL^{-1} for the whey-based cheese and the Mozzarella, respectively. Then, the essential amino acid concentrations in the case of the whey-based cheese meals rose faster to significantly higher values in the period of 120 to 240 min (396 ± 94 mg.mL^{-1}) compared to that from the Mozzarella meal (285 ± 48 mg.mL^{-1}). Finally, the essential amino acid concentrations then fell back to converge on a similar final values of 275 ± 92 and 270 ± 81 mg.mL^{-1} for the whey-based cheese and the Mozzarella, respectively. The areas under the curve were 36 % higher (p-value <0.01) after the ingestion of the whey-based cheese (96 ± 30 g.min.mL^{-1}) than for the Mozzarella (61 ± 10 g.min.mL^{-1}).

Figure 2B shows the leucine concentrations over a 405 min period of digestion after the ingestion of the two types of cheese. The concentration curves follow similar trends to those observed for the essential amino acids, but with a greater difference between the two curves being apparent. Between 120 and 330 min after the ingestion of the whey-based cheese, the concentrations of leucine in the plasma were

significantly higher (87 ± 53 mg.mL^{-1}) than that after ingestion of Mozzarella (53 ± 10 mg.mL^{-1}). After 405 min of digestion, the leucine concentrations converged with final similar values of 59 ± 22 and 49 ± 16 mg.mL^{-1} relating to the whey-based cheese and the Mozzarella, respectively. Moreover, the difference between the two curves is more visible when integrating the areas under the curve, which equates to the total amount of postprandial amino acid released to the plasma. The area under the curve was doubled in the case of plasma leucine obtained from digestion of the meal of the whey-based cheese (23 ± 8 g.min.mL^{-1}) compared to that the meal of Mozzarella (11 ± 2 g.min.mL^{-1}) (p-value <0.001).

The area under the curve of each of the amino acid present in sufficient amount in the plasma to be quantified by ionic chromatography are listed in Table 2. The area under the curve for most of the amino acids after ingestion of the whey-based cheese was higher than that obtained following the ingestion of Mozzarella, especially for asparagine, leucine, lysine, threonine and isoleucine. Four of these five amino acids are essential. Furthermore, only in one case did the digestion of the Mozzarella result in a higher release of an amino acid than for the whey-based cheese: proline. The postprandial asparagine concentration was stable after the Mozzarella ingestion (expressed by an area under the curve close to 0), whereas it increased after the whey-based cheese ingestion. This last result may be partly explained by the low amount of asparagine present in the Mozzarella in comparison to the level in the whey-based cheese (Table 1).

III.2.2.3.3.2 Insulin plasma concentration

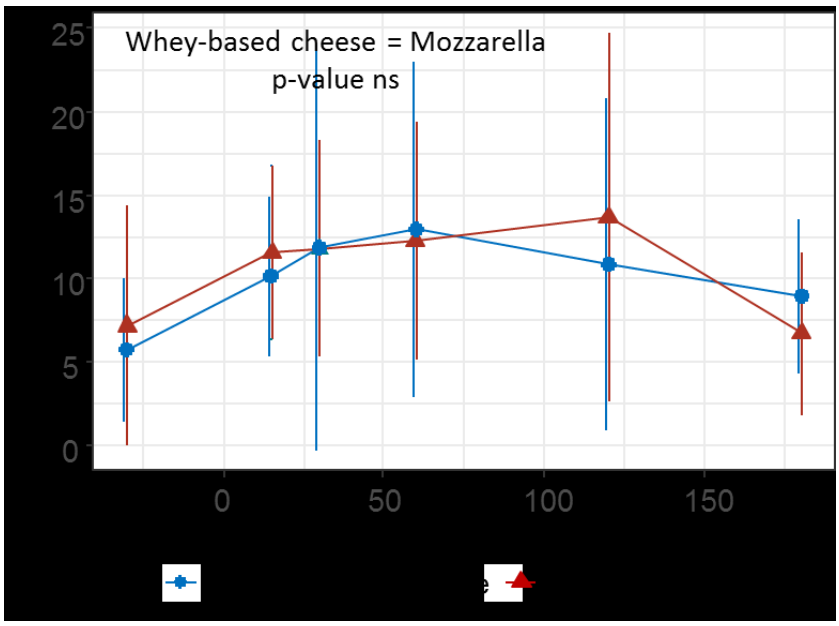


Figure 3: Insulinemia after the ingestion of whey-based cheese or Mozzarella

Insulin concentrations did not greatly vary, neither between the two types of cheese models, nor over time following ingestion, with values between around 7 ± 5 and 14 ± 11 µU.mL^{-1}. According another study measuring pig insulinemia after a test meal (Blat, Nogret, Chauvin, Flageul, & Malbert, 2006), the measured insulinemia was considered as stable during the whole duration of the postprandial period for both types of tested meals (Figure 3).

III.2.2.4 Discussion

III.2.2.4.1 Whey-based cheese provides a higher amino acid bioavailability than a casein-based cheese

The proteins in whey and casein markedly differ in their amino acid composition. Whereas both contain a high concentration of amino acids, whey proteins have a considerably higher content of the essential amino acid than caseins (Boirie et al., 1997; Dangin et al., 2001; Tang et al., 2009). This difference in amino acid composition between the two different cheese models is clearly visible in Table 1. For the same total amount of protein in the two tested products (24 %), the whey-based cheese contained 16.2 g of essential amino acids/kg, whilst Mozzarella contained 14.7 g/kg. This difference was even more marked in the case of leucine content, with 25 % more leucine in the whey-based cheese than in the Mozzarella. In previous studies comparing the bioavailability of amino acids after ingestion of these two different protein sources through beverages, a peak of plasma amino acids was reported to appear about 1 h after the ingestion of whey (Boirie et al., 1997; Dideriksen et al., 2011; Luiking, Abrahamse, Ludwig, Boirie, & Verlaan, 2016; Pennings et al., 2011). When casein-based meals were ingested, the maximum concentration of essential amino acids in the plasma was between 1.5 and 2.5 times lower than that observed after ingestion of whey proteins. In this case, a plateau of essential amino acids concentration occurred from 30 to 60 min after ingestion, and not a peak as observed after ingestion of whey proteins (Boirie et al., 1997; Dideriksen et al., 2011; Luiking et al., 2016; Pennings et al., 2011). In the current study, the maximum amount of leucine in the plasma after the ingestion of the whey-based cheese was doubled that observed following ingestion of Mozzarella, but in both cases, a concentration plateau (rather than peak) was observed. Moreover, this plateau was reached at a later point, i.e. 2 h after meal ingestion (Figure 2). Furthermore, between 0 and 7 hours of digestion, the areas under the curves for leucine, lysine, asparagine and isoleucine was much higher in the case of the whey-based cheese than for the Mozzarella cheese (Table 2). Furthermore, even though the Mozzarella contained more proline, tyrosine and histidine than Mozzarella (Table 1), only in the case of proline was there a significantly greater amount released to the plasma after its ingestion (Table 2). Finally, while both cheese products contained an equivalent amount of threonine (Table 1), the total release of threonine was higher after ingestion of whey-based cheese than Mozzarella (Table 2). Similar data have already been observed in other *in vivo* digestion studies based on the consumption of liquid formulations (Boirie et al., 1997; Nilsson, Holst, & Björck, 2007). In these two specific studies, the meals were specifically formulated to provide the same amount of both total protein and leucine. Nevertheless, the subsequent leucine bioavailability was much higher after the ingestion of the whey protein-based drink than the equivalent one formulated with casein. Therefore, the amino-acid composition of the ingested protein does not fully correspond to the subsequent differences in the bioavailability of the same acids. Thus, other factors such as gastric emptying and protein sensitivity to the digestive enzymes must be considered as more significant during the digestion of protein-based food.

III.2.2.4.2 The similar dry matter profile of the duodenal effluent suggests a similar gastric emptying profile

In previous studies comparing the bioavailability of amino acids following the ingestion of whey or casein proteins, the main differences observed were related to the differences of gastric emptying, due to the precipitation of caseins in the acidic environment of the stomach which didn't occur with the whey proteins (Boland et al., 2014; Lacroix et al., 2006; Lambers et al., 2013; Mahé et al., 1996). However,

these proteins were all given in drinks. Casein precipitation under acidic conditions is the basis of the traditional cheese manufacturing process (Farkye, 2004). In the present study, the casein of the Mozzarella cheese was already present in the aggregated form before reaching the acidic conditions of the stomach. It is unclear how this structural change influences the subsequent kinetics of protein hydrolysis initiation and gastric emptying. It has been reported that existing knowledge of postprandial pH and dry matter profiles in the duodenal effluents over the digestion period may enable a qualitative idea of the amount of digestive juice integrated into the chyme (Schulze, 2006). Therefore, different release profiles of amino acids between the whey-based cheese and Mozzarella could be the result of differences in terms of kinetics of gastric emptying and acidification/neutralization of the duodenal effluents. However, the results of this study show that the kinetics of dry matter of the duodenal effluents resulting from the two foods were the same (Figure 1). In addition, the pH of duodenal effluents after ingestion of the whey-based cheese was higher than that measured following the ingestion of the Mozzarella (Figure 1). This difference may be explained by both a different initial pH of the two cheese models (pH of 5.4 and 5.9 for the Mozzarella and whey-based cheese, respectively) and the presence of calcium carbonate in the whey-based cheese, which is known to buffer the pH (Thomas, 1976). Thus, the gastric emptying and acidification/neutralization behavior during digestion of the two food products were quite similar. To the authors' knowledge, there is no published work on *in vivo* studies that compares the gastric emptying and hydrolysis of these two types of proteins presented as solid foods. Yet, it is now largely recognized that the food structure impacts on the its disintegration during digestion, which is a key factor influencing nutrient release during the process (Singh et al., 2015). For example, a study using miniature pigs fed with either milk, acid or rennet gels, has demonstrated a delayed digestion of proteins in the case of the rennet gel ingestion when compared to the ingestion of milk and acid gel (Feunteun et al., 2014). This result was explained by a half gastric emptying time which was three times longer for the rennet gel than for the two other meals (Le Feunteun et al., 2014). Another study carried out using an *in vitro* digestion model, has shown that cheese disintegration during the digestion process was affected by both its texture and composition (Fang et al., 2016). It was observed that at the end of gastric digestion, an elastic cheese (such as Mozzarella), was less disintegrated than ripened and soft cheeses with higher fat content such as a mature cheddar or a Camembert, therefore limiting proteolysis. Furthermore, the viscosity of the chyme is also an important factor on gastric emptying rates. Thus, in the case of a more viscous chime, less digestive fluids are incorporated slowing down the gastric emptying process (Guerin et al., 2001; Kong & Singh, 2008b; Marciani et al., 2001).

The results of this study do not explain the differences observed on the amino acids bioavailability following the ingestion of Mozzarella and whey-based cheese. Indeed, the changes in the dry matter in the duodenal effluents were similar following ingestion of both cheese models (Figure 1), which suggests that there are no main differences in the gastric emptying process between these two cheeses. A more focused study on gastric emptying behavior (such as a scintigraphy study) along with the characterization of both the kinetics of protein hydrolysis and the peptide release in the digestive effluents (using, for example, the OPA method, mass spectrometry or ionic chromatography) may be necessary to fully explain the observed differences in the bioavailability of amino acids (Figure 2).

III.2.2.4.3 Whey proteins are known to stimulate the muscular synthesis of the elderly by increasing the insulin secretion. However a simultaneous carbohydrate intake seems essential to initiate insulin secretion that activates the muscular synthesis

Pennings et al. (2011) demonstrated that whey proteins were more effective than casein in stimulating postprandial muscle protein accretion in older men. The greater anabolic properties of whey proteins compared to caseins has been mainly attributed to the larger increase in the postprandial plasma amino acid availability, and thereby to the higher stimulation of muscle protein synthesis (Boirie et al., 1997; Dangin et al., 2001). Amino acids are potent modulators of protein turnover, and the skeletal muscle cells are highly sensitive to changes in amino acid availability. Indeed, if amino acids are present in abundance in the plasma, the activity of mTORC1 is increased, promoting muscular protein synthesis (Ham et al., 2014). The stimulation of mTOR activity is due to the increase of insulin secretion (Mitchell et al., 2016). Moreover, it has been reported that insulin secretion was largely favoured by the ingestion of whey proteins relative to other proteins whether from animal (such as caseins from cheese) or vegetable origin (Koopman et al., 2005; Nilsson, Stenberg, Frid, Holst, & Björck, 2004). This phenomenon has been related by Nilsson et al., (2007) to the higher content of branched-chain amino acids in the whey proteins. Indeed, the essential amino acids such as leucine, isoleucine, valine, lysine, and threonine are amino acids which act as insulin secretagogues, whereas arginine is less effective (Nilsson et al., 2007). However, the presence of amino acids by themselves in the plasma is not sufficient to stimulate insulin secretion. Carbohydrates are also required in the food intake to ensure insulin secretion (Schweiger, Warnhoff, Pahl, & Pirke, 1986; Yokogoshi & Wurtman, 1986). The concentration of plasma insulin measured over the 7-h digestion period in these trials was both stable irrespective of the nature of the ingested cheese (Figure 3). This absence of insulin secretion following ingestion of the prepared feed can be explained by the fact that the meals ingested by the pigs were only composed of the cheeses products, which mainly contained fat and proteins, but which were largely free of carbohydrates (it was estimated that the lactose content of both cheeses was less than 1 %).

Thus, it may be that whey proteins can sustain insulin secretions, but that a carbohydrate intake is needed to initiate insulin secretion. However, this hypothesis remains to be verified. In future studies, it will be necessary to include a carbohydrate component in the meal in addition to whey proteins. The objective would be to study the effect of whey proteins in solid foods on insulin secretion (and consequently muscle synthesis) in elderly people.

III.2.2.5 Conclusions

Consuming whey proteins as a solid food intake induced a postprandial plasma leucine concentration double that observed after the similar ingestion of casein given as a traditional cheese. These results are consistent with those observed in studies carried out these same proteins integrated in beverage. The maximum concentration of postprandial plasma leucine appeared approximately 2 h after ingestion in both cases, whereas published studies with beverage observed a faster response with an increase of the leucine concentration in the plasma around one hour after ingestion. The peak concentration was once again double for the whey protein that produced by the casein. The slower amino acid release in the plasma observed for both solid cheeses studied (whey- and casein-based cheeses), compared to the literature, were attributed to the solid structure of the food that may have delayed the gastric emptying

but equally for both products. However, it remains unclear why there were different release behaviors of each amino acids observed depending on the source protein type. In order to understand these results, further study is necessary to compare the gastric half-emptying times and the kinetics of protein hydrolysis of these two cheeses models. Furthermore, to develop new products adapted to the nutritional needs of the elderly, the impact of these cheese models on muscle synthesis should be tested.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge with thanks the financial support received from the French National Research Agency received as part of the AlimaSSenS fund [ANR-14-CE20-0003-01]. The Lactalis Group also provided financial inputs to the project.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest. The authorship includes two members of staff of Lactalis

III.2.3 A retenir

Ce travail a tout d'abord permis de mettre en évidence, en conditions de digestion *in vitro* statique, l'influence de la source protéique, la structure des matrices laitières et le niveau de dénaturation des protéines sériques sur les cinétiques d'hydrolyse des protéines et la bioaccessibilité des acides aminés. Pour cela, trois produits fromagers à base de protéines sériques, de composition identique mais de structures variables, ont été obtenus en modulant le barème de traitement thermique appliqué pour gélifier les matrices. Ils étaient comparés à deux témoins : un fromage du commerce à base de caséines (Mozzarella) et une version liquide du produit à base de protéines sériques.

Les résultats ont montré que le fromage témoin à base de caséines présentait le degré d'hydrolyse le plus élevé en phase intestinale en comparaison aux autres produits. Les degrés d'hydrolyse en phase intestinale des gels se sont révélés significativement supérieurs (mais non significativement différents entre les gels) au même produit liquide non traité thermiquement. De plus, bien que les produits à base de protéines sériques aient une teneur en leucine 25 % supérieure à celle du fromage témoin à base de caséines, la concentration en leucine libérée en fin de digestion par ce fromage était significativement plus élevée que pour les produits à base de protéines sériques.

Nous en avons conclu que, malgré une structuration des produits gélifiées sous la forme d'un réseau tridimensionnel plus ou moins dense et compact, la dénaturation des protéines sériques due au traitement thermique, permet de faciliter l'hydrolyse de ces protéines par les enzymes pancréatiques et d'améliorer la bioaccessibilité des acides aminés, par rapport à la matrice liquide où les protéines sont natives. Cependant, les différences de microstructure entres les matrices gélifiées n'étaient probablement pas suffisantes pour entrainer des différences de comportement significatives au cours des digestions *in vitro*. De manière plus étonnante, la bioaccessibilité des acides aminés issus du fromage à base de caséines était supérieure à celle des produits composés de protéines sériques.

Nous pouvons expliquer ces résultats plutôt contradictoires avec ceux obtenus sur des études cliniques chez l'Homme, par le fait qu'ils ont été obtenus à l'aide d'un modèle de digestion *in vitro* statique ne permettant pas de prendre en compte des paramètres dynamiques de la digestion comme la vitesse de vidange gastrique et les débits de sécrétions d'acides et d'enzymes. Pourtant, ces paramètres physiologiques sont essentiels pour expliquer les différences entre les protéines « rapides » et « lentes » qui caractérisent la vitesse de digestion des protéines sériques et des caséines après l'ingestion d'aliment liquide.

La deuxième étude sur le modèle porcin, a permis considérer tous les effets dynamiques de la physiologie digestive sur la biodisponibilité des acides aminés. Nous avons mis en évidence que l'ingestion de protéines sériques dans des aliments solides induit une concentration en leucine plasmatique postprandiale deux fois plus élevée que celle observée après l'ingestion de caséines dans un fromage traditionnel. De plus, la concentration maximale de leucine plasmatique est apparue environ 2 heures après l'ingestion de la mozzarella et du fromage modèle à base de protéines sériques.

Ainsi, alors que la première étude a mis en évidence une sensibilité à l'hydrolyse enzymatique supérieure des caséines par rapport aux protéines sériques dans les produit laitiers solides, la deuxième étude,

réalisée dans des conditions de digestion physiologique, a montré que la biodisponibilité des acides aminés essentiels était supérieure après l'ingestion des protéines sériques par rapport à l'ingestion de caséines dans des produits laitiers solides. Ceci confirme bien le fait que les phénomènes physiologiques dynamiques de la digestion (vidange gastrique, sécrétion acide et enzymatique, mouvement péristaltique, hormones, etc.) sont des facteurs primordiaux lors de la digestion protéique.

Ces résultats suggèrent la possibilité de stimuler davantage la synthèse musculaire des personnes âgées avec de nouveaux produits laitiers à base de protéines sériques plutôt qu'avec du fromage à base de caséines. Cependant afin de mieux comprendre les facteurs clés permettant de maximiser la biodisponibilité des acides aminés, il est essentiel de réaliser de nouvelles études sur les temps de demi-vidange gastrique et l'hydrolyse protéique de ces deux produits laitiers solides. En outre, des études cliniques s'intéressant à l'impact des protéines sériques incluses dans des produits solides sur la synthèse musculaire devront être menées pour évaluer les performances nutritionnelles réelles de ce type de nouveaux produits.

III.3 DIGESTION DU CALCIUM

D'après la récente étude individuelle nationale des consommations alimentaires (INCA 3) publiée par l'ANSES, il apparait que 65 % de la population sénior consomme moins de 1200 mg de calcium par jour (ANSES, 2017). Pourtant, pour cette partie de la population, il a été montré qu'un apport supplémentaire en calcium serait bénéfique pour limiter les phénomènes de déminéralisation osseuse (Feskanich et al., 2017; Gui et al., 2012; Sahni et al., 2014). De nombreuses sources d'enrichissement en calcium sont disponibles. Chacune de ces sources a des caractéristiques physico-chimiques propres (pH, solubilité, concentration en calcium). Cependant, les études cliniques portant sur l'efficacité d'un enrichissement en calcium sur la prévention de l'ostéoporose sont victimes de grandes variabilités interindividuelles (Heaney et al., 1990; Reinwald et al., 2008). Ces difficultés limitent les conclusions possibles pour caractériser et différencier la biodisponibilité et l'efficacité sur la prévention de l'ostéoporose de chacune des sources de calcium. De plus, les études *in vitro* actuellement publiées n'ont pas été réalisées sur des modèles de digestion gastro-intestinaux complets. D'autre part, alors que la structure alimentaire est connue pour influencer la biodisponibilité des nutriments, aucune étude à notre connaissance ne s'est intéressée à l'impact de la structure de la matrice alimentaire sur la bioaccessibilité et la biodisponibilité du calcium.

Ainsi l'objectif de ce chapitre est d'étudier :

- l'impact de la structure de produits laitiers à base de protéines sériques (liquide vs gel) sur la bioaccessibilité du calcium
- l'impact de la forme chimique de l'apport en calcium sur :
    - sa bioaccessibilité en condition de digestion *in vitro* statique ;
    - sa biodisponibilité en condition de digestion *in vivo* sur modèle porcin.

Ce chapitre est découpé en deux parties :

- La première partie présente les résultats de l'étude de la bioaccessibilité de quatre sources de calcium intégrés dans des produits laitiers à base de protéines sériques liquide ou gélifié (fromage modèle type dur);
- La deuxième partie présente les premiers résultats obtenus suite à une étude *in vivo* sur des porcs, comparant leur calcémie suite à l'ingestion de produit laitiers ayant des sources d'enrichissement en calcium variable.

III.3.1 Bioaccessibilité de sources de calcium incluses dans produits laitiers modèles

Cette partie est basée sur l'article scientifique suivant :

Bioaccessibility of four calcium sources in different whey-based dairy matrices assessed by *in vitro* digestion

L. Lorieau[1], L. Le Roux[1], F. Gaucheron[1], A. Ligneul[2], E. Hazart[2], D. Dupont[1], J. Floury[1*]

[1]UMR STLO, Agrocampus Ouest, INRA, 35000 Rennes, France
[2]Lactalis Recherche et Développement, 35240 Retiers, France

*Corresponding author: juliane.floury@agrocampus-ouest.fr

Publié dans Food Chemistry (Volume 245, 15, Pages 454-462) en Avril 2018 et disponible en ligne depuis le 21 octobre 2017

HIGHLIGHTS

- Four calcium sources were added to liquid or gelled whey-based dairy matrices.
- Changes in the bioaccessibility of calcium were mainly due to pH variation.
- Calcium phosphate is the form of calcium for which the bioaccessibility was the most affected by pH.
- Calcium bioaccessibility was not affected by the structure of the matrix.

KEYWORDS : calcium, dairy product, digestion *in vitro*, solubility, pH, bioaccessibility, whey protein gel

ABSTRACT

Numerous calcium sources are available to enrich food, but their behavior during digestion is still unknown. This study focused on the influence of the gastro-intestinal pH, the food structure and the calcium source on the bioaccessibility of the nutrient.

Four calcium sources were studied: calcium carbonate, calcium citrate malate, calcium phosphate and calcium bisglycinate. These were added to dairy matrices, containing cream and whey proteins, of different forms (liquid or gel). The kinetics of solubility and ionic calcium concentration during *in vitro* digestion were studied, as function of gastro-intestinal pH.

All calcium sources were almost fully soluble in the gastric compartment, and then became insoluble in the intestinal phase. The level of calcium insolubilisation in the intestinal phase was not significantly influenced by the matrix structure (liquid or gel), but was more dependent on the calcium source, this effect leading to different final calcium bioaccessibility from 36 % to 20 %

III.3.1.1 Introduction

The calcium ion is implicated in various physiological processes (Buchowski, 2015) and its importance for the organism is well established. It is absorbed mainly in the duodenum and jejunum. Calcium is absorbed by passive diffusion or by active transport across the intestinal mucosa. Passive diffusion is considered as a process which does not reach saturation, whilst active transport is a mechanism limited by saturation (Kopic & Geibel, 2013). Numerous epidemiological studies have shown a positive relationship between bone mass and calcium intake, for the child (Lloyd et al., 1996), the adult (Matković et al., 1979) and the elderly (Chapuy et al., 1992). Nonetheless, only 32 % of U.S. adults consume a diet that meets the adequate intake of calcium (Nicklas, O'Neil, & Fulgoni, 2009), and 59 % of French elderly consume less than the recommended 1200 mg

tend to precipitate thereby limiting their potential absorption by the organism. The characteristics of these four authorized calcium sources for supplementing foods are summarized in Table 1.

	Calcium Carbonate $CaCO_3$	Calcium Citrate Malate CaCM	Calcium Bisglycinate CaBG	Dairy calcium phosphate CaPhos
Formula	$CaCO_3$	$Ca_6(C_6H_4O_7)_2(C_4H_4O_5)_3$	$Ca(COOCH_2NH_2)_2$	Mineral milk powder : Mineral content : 80.0 % of which Calcium: 28.5 % Phosphor: 16 %
Molecular weight ($g.mol^{-1}$)	100.09	1012.9	188.2	
Calcium content (%) in dry sample	39.9	23.2	13	28.5
Solubility constant product (K_{sp}) in water at 25°C ($mg.mL^{-1}$)	0.014 *	29.1*	282.3*	$2x10^{-29}$ ϕ
Fraction absorbed †	23.5±12 %	24.2±5 %	44.0±10 %	25.5±13 % (tricalcium phosphate)
Advantage	The most used and well-understood source (pKa, Kd etc.) Inexpensive	Neutral taste Neutral pH Better bioavailability than $CaCO_3$ *	High fraction absorbed Authorized since 2008 α	Neutral taste Neutral pH Milk source
Disadvantage	Soapy taste Low solubility	Relatively expensive	Alkaline pH Expensive Not well-know	Low solubility Presence of phosphorus

Table 1. Physical characteristics of the calcium sources used in this study.

ϕHandbook of Chemistry & Physics (2003) ; *Reinwald et al. (2008) ; †Heaney et al. (1990) ; α European Food Safety Authority (2008)

To our knowledge, the comparison of the bioavailability of different calcium sources has been rarely addressed in the literature. Heaney et al. (1990) showed that the absorbed fraction of calcium was 44 % for CaBG, 25 % for tricalcium phosphate (a calcium form which is close to the CaPhos used in this study) and 23 % for $CaCO_3$ (Table 1). Other studies have determined that the absorbed fraction of calcium is 35–39 % and 25–30 % for CaCM and $CaCO_3$, respectively (Reinwald et al., 2008). Moreover, the absorption of calcium sources can vary with changes in physiological conditions, i.e. gastric pH, intestinal membrane permeability, etc. A better understanding of the differences of bioavailability between calcium sources

might help to recommend well adapted calcium enrichments for specific consumers (i.e. children and elderly people)

During digestion, the pH of the gastrointestinal tract varies with time and place from very acidic in the stomach to nearly neutral in the small intestine (Kopic & Geibel, 2013). The high solubility of calcium substrate in an acidic environment is considered as an important factor determining its bioavailability (Preedy, 2015). Achlorydric subjects (people who do not produce chlorydric acid in their stomach) absorb significantly less calcium than healthy people, demonstrating that calcium solubilisation at the gastric stage is an essential step in its subsequent absorption in the small intestine (Recker, 1985). Moreover, Goss, Lemons, Kerstetter, and Bogner (2007) showed that with reducing acidity of aqueous solution, calcium solubility decreases as expected but that the extent of this decrease varies between the calcium sources. Other factors can also affect the bioaccessibility and bioavailability of calcium, especially the presence of proteins. It has been already established that high protein diets promote calcium absorption (Preedy, 2015). Indeed, the acidic environment is prolonged by the presence of amino acids when the digested food moves into the intestinal tract. Consequently, the calcium remains in a soluble form over a longer period, enabling a higher absorption in the intestinal tract (Goss, Prushko, & Bogner, 2010). Furthermore, both micro- and macro-structures of food have a significant influence on the different steps of protein digestion. For example, dairy products have been shown to induce delayed and lower levels of amino acid absorption than liquid milk of an identical composition (Barbé et al., 2013)

Many supplements are available to enrich food products with calcium, but only the bioavailabilities of $CaCO_3$ and CaCM have been studied in depth using *in vivo* experiments (Reinwald et al., 2008). Factors influencing the solubility of $CaCO_3$ are well understood, but publications concerning the other forms of calcium are still rare. Moreover, there is no available data in the literature reporting the impact of the structure of the food matrix on calcium bioaccessibility. The use of an *in vitro* model of digestion would enable the study of such factors to advance in the understanding of the mechanisms influencing bioaccessibility of calcium during food digestion.

This study investigates the role of pH variation, and of the structure of the dairy product, on the bioaccessibility of different calcium sources, during *in vitro* digestion. The different dairy matrices have been formulated to fulfill the nutritional needs of the elderly. With that purpose in mind, whey was chosen as the main protein component to maximize muscle synthesis (Devries & Phillips, 2015) and calcium enrichment to prevent osteoporosis. Thus in this study, the food supplements used were mainly composed of whey proteins and not caseins as in traditional dairy products. Calcium supplementation was performed by testing four different sources ($CaCO_3$, CaCM, CaPhos and CaBG) which were added to two lipo-proteinic matrices with a similar composition (in terms of whey proteins, fat, salt, calcium and water content) but with different structures. The first was a solution with whey protein in their native state, and the second, a heat-induced gel with denaturized proteins. In a separate study that served as the control, the bioaccessibility of these same calcium sources was determined when formulated in pure water. Bioaccessibility was evaluated by measuring the concentration of (i) soluble calcium in the solution obtained after ultrafiltration of the digesta through a 3 kDa membrane, and (ii) the concentration of ionic calcium (Ca^{2+}) in the digesta. Ionic calcium is considered as only a part of the soluble calcium. In addition, calcium bound to a carrier molecule, can also cross the gut wall and thus be

available to the organism. The concentrations in the gastro-intestinal tract of both of these calcium forms were compared in relation to their physico-chemical properties, the nature of associated anions and their solubility at different pH values.

III.3.1.2 Materials and methods

III.3.1.2.1 Calcium sources

Four calcium supplements were investigated: $CaCO_3$ (39.9 % calcium, supplied by Quimdis, Levallois-Perret, France), CaCM (23.2 % calcium, supplied by Dr. Paul Lohmann, Emmerthal, Germany), CaBG (13 % calcium, supplied by Albion, Clearfield, USA) and dairy CaPhos (28.5 % calcium supplied by Lactalis, Retiers, France). These were added to each matrix in order to reach a final concentration of 0.5 % (w/w) of calcium.

III.3.1.2.2 Preparation of matrices

The four calcium supplements were each added to three mixtures: two dairy matrices and water. The dairy products were based on a solution of native whey protein and cream, either as the liquid form ("Liq") or with heating to induce a gel ("Gel"). The same calcium sources were directly suspended in milliQ water adjusted at pH 6.3 with HCl ("Water") to serve as the controls. The naming protocol of the prepared matrices was: Gel-X, Liq-X and Water-X, where X was the calcium source added, either $CaCO_3$, CaCM, CaBG or CaPhos. Table 2 gives the composition of each prepared matrix.

Table 2. Composition of digested matrices based on four calcium sources: calcium bisglycinate (CaBG), calcium carbonate ($CaCO_3$), dairy calcium phosphate (CaPhos), calcium citrate malate (CaCM) Three formulations for each calcium supplement: liquid dairy matrix (Liq), heat induced dairy gel (Gel) and water (Water).

		$CaCO_3$	**CaCM**	**CaBG**	**CaPhos**
Common parameters	Elemental calcium in calcium source (%)	39.9	23.2	13	28.5
	Calcium in matrix (%)	0.50			
	pH of matrix	6.3			
Water Control (Water)	Water to dilute calcium (%)	98.75	97.84	96.15	98.25
Dairy matrices (Gel + Liq)	Fat (%)	20			
	Protein (%) *Of which whey protein (%)*	24 *23*			
	NaCl (%)	0.6			
	GDL (%)	0.26	0	1.5	0

The base dairy products were formulated from 24 % (w/w) of whey protein (95 % whey protein, Prolacta 95®, supplied by Lactalis Ingredients, Bourgbarré, France), 20 % (w/w) fat provided by dairy cream

(Crème Fleurette 30 % Casino, Saint Etienne, France) and 0.6 % (w/w) of NaCl (European Salt Company, Hannover, Germany). The pH of each matrix was adjusted to 6.3 by adding 0.3 % and 1.5 % of Gluconodeltalactone (GDL) (Roquette, Lestrem, France) to the matrices containing $CaCO_3$ and CaBG, respectively. The amounts of GDL required varied because of the difference in the buffering capacities of the calcium sources.

After preheating to 37 °C, cream and the water were blended (Thermomix TM5, Vorwerk, France) during 5 min before adding all other components (including whey proteins, GDL, the calcium supplement) and then mixing further for one hour at 37 °C. Each of the four preparations (distinguished by the type of calcium supplement) was divided into two parts: half was kept as the liquid matrix. The other half was used to prepare the gel matrix: the mixture was poured into synthetic casings to 26 mm diameter (Darmini Darmex Casing caliber 28, MCM Casing, Lucenay, France) which were placed into a water bath at 75 °C. The time of heat treatment was varied such that each of the four preparations would have a similar gel hardness: Gel-CaPhos and Gel-CCM were heated for 35 min, whereas 37 min was needed for Gel- $CaCO_3$ and 120 min for Gel-CaBG. All the matrices were finally stored overnight at 4 °C before further analysis.

To check for the similarity of texture of each gel, a uniaxial compression test was performed. The hardness of the gel matrices was determined at room temperature using an Instron device (Elancourt, France) equipped with a 5 cm diameter flat-ended cylindrical probe. 20 mm height samples were compressed by 70 % at a constant crosshead velocity of 30 $mm.s^{-1}$. The hardness of the gel was defined as the applied force divided by distance ($N.mm^{-1}$) attained during sample compression. The hardness in $N.mm^{-1}$ were 2.6 ± 0.4 for Gel- $CaCO_3$, 3.1 ± 0.2 for Gel-CCM, 2.9 ± 0.4 for Gel-CaPhos and 3.6 ± 1.1 for Gel-CaBG.

III.3.1.2.3 *In vitro* static digestion

The *in vitro* digestion was based on the standardized COST INFOGEST protocol, in which the composition of the simulated oral, gastric and intestinal fluids are described (Minekus et al., 2014). This protocol was developed by a consensus of international experts in the field of food digestion, from physiological data obtained in human. *In vitro* digestions of 8 combinations (4 calcium sources × 2 dairy matrices, either liquid or gel) were carried out in duplicate. Four aqueous solutions containing the different calcium sources were also studied in duplicate as a control. The duplicates are derived from two independent experiments *of in vitro* digestion, performed on two batches of matrices prepared independently.

In the case of the heat-induced gel, a preliminary step of mincing was carried out with a Moulinex® fresh express mixer (Moulinex, Ecully, France) to simulate mastication. Gel particles of approximately 1 mm were produced. Liquid matrices and water solution were not subjected to simulated mastication due to their liquid structure.

After mincing, the protocol was the same for all matrices. Briefly, 10 g of matrix were first mixed with 8 mL of simulated saliva fluid. Next, 50 µl of 0.3 M $CaCl_2$ and 1.95 mL of water were added. The simulated digesta was incubated for 2 min at 37 °C whilst being agitated at 80 rpm in an orbital shaker (Grant, OLS 200, Cambridgeshire, England). In this study, salivary α-amylase was not added since the matrices did not contain starch. This mixture is henceforth referred to as the simulated oral bolus.

The simulated oral bolus was then mixed with 16 mL of simulated gastric fluid and 10 µl of 0.3 M $CaCl_2$. The pH was adjusted to 3.0 with 6 M HCl. One mL of porcine pepsin stock solution (Sigma P7012, St. Quentin Fallavier, France) was added to achieve 2000 U mL^{-1} in the final mixture and the volume adjusted to 20 mL with water. The simulated digesta prepared was incubated for 2 h at 37 °C whilst mixing at 80 rpm. This mixture is henceforth referred to as the simulated gastric chyme being produced from a simulation of gastric digestion.

The simulated gastric chyme prepared was then mixed with 22 mL of simulated intestinal fluid (SIF) and pH adjusted to 7.0 with 10 M NaOH. 80 µL of 0.3 M $CaCl_2$ and 5 mL of bile (160 mM in water, Sigma B831, St. Quentin Fallavier, France) were added to the mixture. Pancreatin contains enzymatic components including trypsin, amylase and lipase, ribonuclease, and protease. Enough pancreatin (Sigma, P7545, St. Quentin Fallavier, France) was dissolved in SIF in order to reach 100 U mL^{-1} of trypsin activity in the final mixture. The final mixture volume was adjusted with water to 80 mL. The simulated digesta was incubated for 2 h at 37 °C whilst mixing at 80 rpm. This mixture is referred to as the simulated intestinal digesta.

During each digestion trial, 1 mL of sample was taken at the end of the oral phase, and then at times 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120 min during both the gastric and subsequent intestinal simulations. 20 µL of 0.5 M Pepstatin A (Sigma P5318, St. Quentin Fallavier, France) were added to the 1 mL gastric samples to stop the enzyme reaction. 50 µl of 0.1 M Pefabloc (Sigma 76307, St. Quentin Fallavier, France) were added to the 1 mL intestinal samples to stop the enzyme reaction from this phase. All samples were then centrifuged at 8000g for 2 min at 4 °C. Supernatants were then ultrafiltered (Centrifugal filter with molecular weight cut off of 3 kDa, VWR, Radnor, USA) at 8000g for 20 min at 4 °C. Ultrafiltrates were stored at 4 °C prior to further chemical analysis.

III.3.1.2.4 Physico-chemical analyses

III.3.1.2.4.1 Total and soluble calcium

Total calcium concentration was measured in the case of liquid and water matrices, and soluble calcium was measured in the ultrafiltered (3 kDa) samples prepared from the digesta. Calcium concentration in all cases was determined by atomic absorption spectrometry (Varian 220FS spectrometer, Les Ulis, France) (International Dairy Federation & International Standards Organisation, 2007). *In vitro* soluble calcium was calculated from the following formula:

$CaCl_2$ (0.5-1-2-5-10-20-50-100-200 mM) with 110 mM KCl as the background electrolyte at pH 3.0 (for gastric compartment) or at pH 7.0 (for intestinal compartment). As the $CaCl_2$ salt was not totally dissociated in solution, Milksalt® software was used to predict the free Ca^{2+} concentration (Mekmene, Le Graët, & Gaucheron, 2010). The electric potential measurements (mV) for the standard curves were plotted as function of the logarithm of predicted Ca^{2+} concentrations. Measured electrical potentials of digesta samples were converted into Ca^{2+} concentrations using this calibration curve. To be able to compare the concentrations of soluble and ionic calcium during the simulated digestion in the intestinal tract, the calcium concentration at each digestion time of the intestinal phase was normalized with respect to the final concentration of the gastric phase and expressed as a percentage.

III.3.1.2.5 Statistical analysis

For all experiments, differences between the four calcium sources, the two prepared dairy test products and control, and the time of sampling during digestion were tested for statistical significance using a nonparametric analysis of repeated measurement with the package “nparLD” in R 3.2.4 (Noguchi, Gel, Brunner, & Konietschke, 2012). In each case of a significant effect of calcium sources, matrices or time, the function “npar.t.test” of the statistical package “nparcomp” (Konietschke, Placzek, Schaarschmidt, & Hothorn, 2015) was used. In the case of a significant interaction effect, a linear mixed model with a random intercept on experiments was performed to take into account the repeated measures and followed by the use of the function “difflsmeans” of the package “lmerTest” (Kuznetsova et al., 2015)

III.3.1.3 Results

III.3.1.3.1 pH changes during *in vitro* digestion trials

Fig. 1a shows the pH variation as a function of time during the simulated digestion of the different matrices (Water, Liq and Gel). In all cases, the pH of the digesta changed in a similar way during the different steps of the *in vitro* digestion process ($p > 0.1$). During the simulated oral step of the digestion process, the pH was 6.48 ± 0.38 for all matrices, a value which is close to the initial pH of the matrices (pH 6.3). The pH falls to a relatively constant value of 3.19 ± 0.20 during the gastric phase. During the intestinal phase, the pH responded differently depending on matrices ($p < 0.0001$ between Water, Gel and Liq). At the beginning of this last phase, the average pH was similar for all samples with a value of 7.26 ± 0.15. Then, it increased to 7.85 ± 0.13 in the case of the control (Water) whereas it fell to pH 5.93 ± 0.20 and 5.73 ± 0.12 for Gel and Liq digesta, respectively.

The small difference of pH change between the Gel and Liq digesta may be simply explained by the relative difficulty in measuring pH in the Gel digesta, because of the presence of solid particles.

III.3.1.3.2 Changes in the soluble calcium concentration during *in vitro* digestion

Fig. 1b shows the changes of the soluble calcium concentration in the ultrafiltered digesta samples taken during the *in vitro* digestion of the different matrices. During the oral step, none of the calcium supplements were totally solubilized. Their solubility (expressed as a % of the total content present), were less than 43 % in all cases. Only in the gastric digestion phase, where the pH was around 3, the calcium became much more soluble. The solubilization of calcium was rapid and occurred at the beginning of the gastric phase (in less than a minute) with the percentage of soluble calcium quickly

exceeding 92 % for the matrices with CaBG, $CaCO_3$ and CaPhos. It was a bit lower (82 %) for the matrices with CaCM.

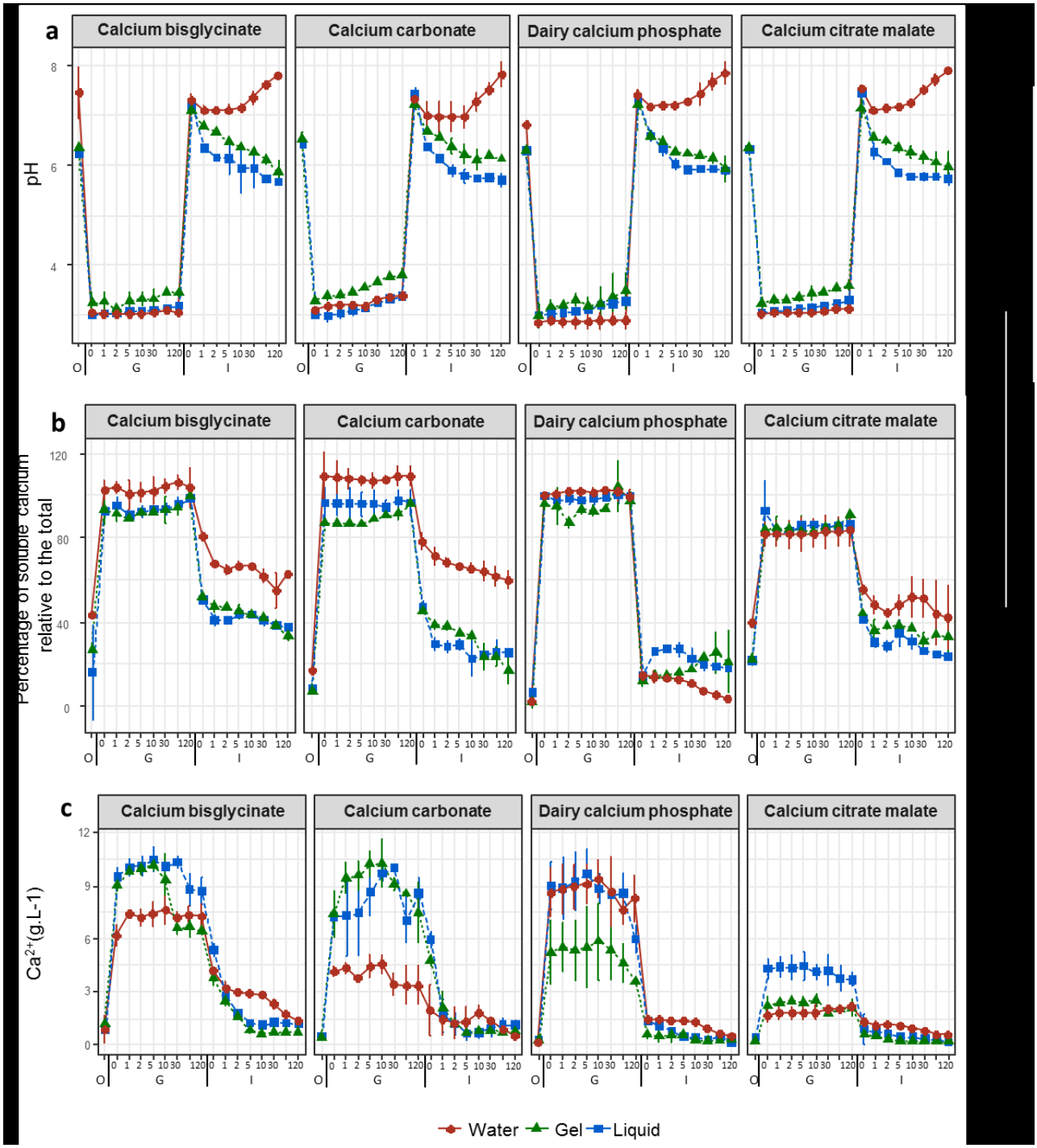


Fig. 1. Changes in (a) pH, (b) percentage of soluble calcium (relative to the total of calcium) in the food matrix, (c) concentration of ionic calcium, for each of the four calcium supplements included in water, liquid and gel of dairy matrix, during in vitro digestion.

At the beginning of the subsequent intestinal phase, the percent of soluble calcium in the ultrafiltered digesta rapidly decreased from 80 % to 12 % (Fig. 1b). This might have been expected as the result of the precipitation of calcium due to the rise of the pH of the digesta from acidity to the neutrality (Fig. 1a). This precipitation process led to the formation of molecules of molecular mass higher than 3 kDa, large enough so not to pass through the ultrafiltration membrane. These large molecules led to a decrease in the calcium content of the soluble phase of the digesta. Fig. 1b shows that the concentration of soluble calcium at the beginning of digestion in the intestinal compartment was significantly different for CaPhos (at just 13.8 ± 1.9 %), and more than 46.0 % for the three other calcium sources ($p < 0.001$). However, this level of solubility was not constant over the duration of the 120 min of the intestinal phase and differed as a function of matrices. In the case of supplementing with CaPhos, the percent of soluble calcium decreased by 11.4 ± 0.12 % during the 2 h of intestinal phase for the water control, whereas it increased by 3.6 ± 0.5 % and 2.2 ± 8.8 %, for the two dairy matrices, Liq-CaPhos and Gel-CaPhos, respectively (Fig. 1b). For CaPhos, the final % of soluble calcium was different for Gel and Liq ($p < 0.001$).

At the beginning of the intestinal phase, CaBG had a calcium solubility of 80.8 ± 1.6 % in the water control and 51.1 ± 1.9 % in both the Gel-CaBG and Liq-CaBG (Fig. 1b). Then, the percent of soluble calcium fell during the 10 first minutes and then changed little for a final value to 63.0 ± 1.7 % in water-CaBG and 35.6 ± 2.7 % in Gel-CaBG and Liq-CaBG (Fig. 1b). The change over the 120 min was statistically significant ($p = .0018$). The behavior of $CaCO_3$ was followed a similar pattern with a percent of soluble calcium of 78.1 ± 4.2 % in water- $CaCO_3$, and 47.8 ± 2.3 % in Gel- $CaCO_3$ and Liq- $CaCO_3$ at the beginning (Fig. 1b), values that all decreased during the first 10 min and then stabilized at 60.1 ± 4.5 % in water-CaCO3 and 22.0 ± 6.4 % in Gel- $CaCO_3$ and Liq-$CaCO_3$ (Fig. 1b). This difference between initial and final times was also statistically significant ($p < 0.001$). The percent of soluble calcium of CaCM in the three digestas at the beginning of the intestinal phase were quite similar, with 55.5 ± 2.7 % in water-CaCM, 40.7 ± 1.9 % in Liq-CaCM and Gel-CaCM. These levels then fell during digestion to 42.1 ± 15.2 % for water-CaCM and 26.9 ± 6.5 for Liq-CaCM and Gel-CaCM (Fig. 1b). However, this decrease was less pronounced than for the other calcium sources, and the concentration of soluble calcium reached a stable value after only 1 min. More generally, the changes in soluble calcium in the Gel and Liq matrices were similar for CaBG, $CaCO_3$ and CaCM, but consistently higher in the digesta from water control than for those based on Gel and Liq.

III.3.1.3.3 Changes in the ionic calcium concentration during *in vitro* digestion

Fig. 1c shows the ionic calcium concentration (Ca^{2+}) measured in the digesta throughout the whole digestion process. Fig. 2 shows the kinetics of the falling solubility for each of the different calcium sources in the intestinal compartment, by normalizing data to the last calcium concentration determined in the gastric compartment (t = 120 min) being set at 100 %. Fig. 2a shows the normalized % of soluble calcium and 2b the normalized % of ionic calcium. The rates of the falling solubility were different and depended on the calcium supplement used. Overall, the changes in Ca^{2+} concentration agreed with results obtained on soluble calcium (Fig. 1b and 1c). Similar trends were observed, although the ionic concentration was certainly overestimated in the case of $CaCO_3$, CaBG and CaPhos. Indeed, for these three calcium sources, the average of the soluble calcium concentration in gastric phase was

7.4 ± 0.5 g

Figs. 1c and 2b enable the comparison of Ca^{2+} and soluble calcium in the intestinal compartment. In the gastric compartment, the ionic calcium concentration was higher than 5 g

(Butler, 1991). At a neutral pH, the Ksp (solubility constant) of calcium phosphate and $CaCO_3$ are very low at 2×10^{-29} and 5×10^{-9}, respectively (Haynes, 2014). Such low values of Ksp for calcium phosphate explain the low calcium solubility during intestinal digestion when compared to other calcium sources (Figs. 1 and 2). Phosphate and carbonate are present in large quantities in the salivary, gastric and intestinal fluids used in the protocol of *in vitro* digestion (Minekus et al., 2014), and their presence can also explain the calcium fall of solubility observed for all prepared samples. The dissolved calcium ions are readily re-associated with phosphate or carbonate to precipitate in the intestine where the pH is nearly neutral (Kopic & Geibel, 2013).

The solubility is not the same for the four calcium sources and the following increasing order was observed starting with the least soluble: CaPhos < $CaCO_3$ < CaBG and CaCM. Since amounts of phosphate and carbonate are significant in the case of CaPhos and $CaCO_3$, the largest fall in solubility was observed with these anions rather than with those in CaBG or CaCM. In the presence of bisglycinate or citromalate, reassociation with calcium is possible to form relatively soluble salts with Ksp of 29.1 and 282.3 for CaCM and CaBG, respectively (Reinwald et al., 2008).

The solubility of the CaCM in the intestinal compartment seems less sensitive to pH than that of $CaCO_3$ and CaBG (Fig. 2b). These results were in agreement with other studies showing that calcium citrate solubility remains largely unaffected until the pH drops below 4 (Goss et al., 2007). Calcium citrate and the CaCM are comparable calcium salts because their structures are similar.

All these observations show the importance of acid pH on the solubility of the different calcium sources. They also suggest that a reduction of gastric acidity may even hinder effective calcium uptake throughout the entire intestine: the same things have been reported by Recker (1985). The gastric pH of some elderly people is less well-controlled than for healthy adults, and there are even some cases of achlorydric subjects which do not secrete any acid in the stomach. In such cases, the pH of the stomach content is not acid, calcium is thus not in its ionic form and cannot be further absorbed in the small intestine (Recker, 1985). In this context, as bioaccessibility of CaCM seems to be less affected by pH than for other calcium sources by the variations of pH, it may be a more appropriate supplement food for elderly.

III.3.1.4.2 Calcium fall of solubility in intestinal compartment is not greatly influenced by the presence of food components

As the majority of the calcium was not soluble within 10 min of the intestinal phase, it can be concluded that re-association of Ca^{2+} and the different anions was similarly fast. During the intestinal phase, the concentration of soluble calcium had fallen by the completion of digestion: especially in the case of $CaCO_3$ and CaBG (Fig. 2a). The decrease of the concentration of soluble calcium between the beginning and the end of the intestinal phase was similar irrespective of the calcium source or digested formulation. Consequently, the fall of bioaccessibility during the intestinal phase is the same whether water or dairy matrices. In each case, calcium reassociates to reform the same compound irrespective of the matrices, the anion either coming from the initial source of calcium, or from other sources contained in the digestive fluids. However, the calcium from CaBG, $CaCO_3$ and CaCM was more soluble in water at pH 7 than in either of the digested dairy matrices where the pH is yet lower. In the case of the fourth

calcium substrate, CaPhos, there was a specific behavior. As mentioned previously, its solubility was lower than that of the three other calcium sources. Furthermore, its behavior was specific to the digested matrix: when CaPhos was dissolved in water, its solubility fell from the beginning to the end of the intestinal phase, whereas when CaPhos is introduced in dairy matrices, its solubility actually increased. This increase can be explained by the following explanation. At the beginning of the intestinal phase, the pH is around 7, causing the calcium and phosphate precipitation into phosphate calcium. And then, during the intestinal digestion of the dairy matrices, the pH decreases down to 6 (Fig. 1). This acidification of the digesta was due to the release of amino acids and fatty acids from protein and lipid (Hsu, Vavak, Satterlee, & Miller, 1977). However, the phosphate is known to be very sensitive to variations in pH. It is therefore assumed that the pH fall changes its ionization state (HPO_4^{2-} in $H_2PO_4^-$) during acidification. Therefore, each ion of the calcium phosphate becomes free and is released in its soluble form in the digesta (Fig. 2a). This increase of soluble calcium, during the intestinal phase, was not observed with the other sources of calcium enrichment (Fig. 2). This difference in behavior between the sources of calcium is certainly due to the different calcium precipitates which form at the beginning of the intestinal phase. Indeed, calcium phosphate is one of the calcium precipitates most sensitive to pH variations, in comparison with CaBG, CaCM and CaBG (respective Ksp of 2×10^{-29}, 5×10^{-9}, 29.1 and 282 for CaPhos, $CaCO_3$, CaCM and CaBG).

Moreover, the dairy matrices contained not only proteins but also a large amount of fat, and it is known that fat can reduce calcium absorption due to formation of insoluble non absorbable calcium soap (Preedy, 2015) in particular for dairy matrices with CaBG, $CaCO_3$ and CaCM compared to the same calcium sources in water. The formation of soap could therefore explain the difference in calcium bioaccessibility observed between the two dairy matrices and the water control.

III.3.1.4.3 The gelation of whey proteins had no impact on calcium bioaccessibility

Comparing the *in vitro* digestion of (i) the dairy matrices to a water control, and (ii) the liquid and gelled matrices, enabled the evaluation of the impact of the presence of proteins and of the structure, respectively, on the calcium bioaccessibility. The kinetics of calcium solubility during the gastric and intestinal phases were not significantly different for both liquid and gel matrices, whatever the source of calcium, proving that there was no major impact of the matrix structure. Concerning the impact of the proteins, the literature seems to indicate that proteins enhance the calcium absorption. Indeed, protein intake is known to stimulate acid release in the stomach and thus to acidify the gastro contents, which in turn, enhances calcium absorption (Bonjour et al., 2009). There is also the buffering effect of amino acids, fatty acid and bile components, all which help to maintain calcium in solution in the intestinal compartment (Goss et al., 2010). The results from this study show the impact of the hydrolysis of proteins and lipids on the pH (Fig. 1a). During the digestion of matrices containing whey proteins and lipids, any proteins are hydrolyzed into peptides and amino acids and any lipids into fatty acids (Hsu et al., 1977). Therefore, the release of these acids can result in a significant acidification of the food digesta when compared to a water control, but this acidification did not lead to a better bioaccessibility of the calcium present.

During static *in vitro* digestion and according to the protocol used in this study, the same pH conditions were applied to the different digestion stages, whatever the product or its quantity. However, in the real

physiological situation, each organism has to adapt the regulation of pH over time and to the ingested meal all along the gastrointestinal tract, which means that the pH is not constant in one compartment along the time (Minekus et al., 2014). The arising differences of pH caused by regulation during digestion may explain that during *in vitro* digestion calcium has a better bioaccessibility in a water medium than in dairy matrices. On the other hand, published studies dealing with nutritional recommendations on calcium supplementation, suggest that the absorption efficiency is increased when the calcium intake is associated with a real meal rather than with water alone (Buchowski, 2015; Heaney, Smith, Recker, & Hinders, 1989).

III.3.1.4.4 The bioaccessibility measured in this study is similar to the bioavailability measured *in vivo* (Heaney et al., 1990)

Calcium can be absorbed either by passive or active route. The passive route is not limited by saturation nor controlled by other molecules. The active route can become saturated and is mainly controlled by the vitamin D (Kopic & Geibel, 2013). For an efficient absorption in the gastrointestinal tract, calcium must be present in an ionic form (Preedy, 2015). Therefore, *in vitro* digestion models only allow to determine if the calcium is in the right form to be absorbed, but they do not assess the proportion of absorbed calcium or the relative importance of the 2 mechanisms of absorption. Furthermore, *in vitro* digestion assays can be completed by absorption through Caco-2 cells. These cellular models allow the simulation of the absorption process and can be considered as a better indicator of calcium bioavailability than the direct measurement of calcium solubility. Perales, Barberá, Lagarda, and Farré (2005) showed that the calcium measured in the supernatant after centrifugation is proportional to the calcium content of the food, but that the calcium quantified after sample dialysis (cut-off 12 kDa) and the calcium uptake by Caco-2 cells are both inversely affected by the calcium content of food. A linear relationship was even observed between calcium uptake by Caco-2 cells and dialyzed calcium. A possible explanation for these results could be that solubilized calcium is not only composed of free calcium ions, but also of partially soluble calcium salts. If this salt molecule has a molecular weight higher than the cut-off value of the filter membrane, it cannot pass through the ultrafiltration membrane, but with a lower cut-off value (3 kDa), close to value applicable to the absorption by cell monolayers, concentration of dialyzed calcium and uptake calcium by Caco-2 cells become similar (Goss et al., 2008; Rossi, 2015). In the present study, 3 kDa filters were used, enabling absorption properties that closely resemble those found with cell monolayers.

Table 3 shows the calcium bioaccessibility of the dairy matrices and calcium sources investigated in this study and the fraction of similar calcium absorbed by women subjects during fasting. Determination was by using the double-isotope method (difference between calcium absorbed and excreted) with (for CaCM) or without (for CaPhos, $CaCO_3$ and CaBG) co-ingested food (Heaney et al., 1990). The values for the bioaccessibility and the observed bioavailability are very similar for the four calcium sources considered. It is noteworthy that *in vitro* studies are much cheaper and easier to perform than *in vivo* studies which are expensive, also time-consuming and require considerable ethical consideration. Moreover, *in vitro* studies enable the variation of digestion parameters independently or not, in order to better understand the relative importance of each factor. Although *in vitro* digestion does not reflect the entire complexity of the digestion process, the results reported in Table 3 suggest that the *in vitro*

protocol developed in this work was well adapted to study calcium bioaccessibility and to use it to indicate calcium bioavailability. However, this is unfortunately not always the case. For instance, Magnano et al. (2011) showed a poor correlation between calcium absorbability determined on rats and *in vitro* calcium solubility for different food matrices. Nonetheless, *in vitro* digestion models are still useful to compare the bioaccessibility of different calcium sources when added to different foods, keeping in mind that *in vivo* trials (if possible on humans), should be necessary to establish more specifically how calcium bioavailability is really affected.

Table 3. Comparison of bioaccessibility and bioavailability of calcium. Calcium bisglycinate (CaBG), calcium carbonate ($CaCO_3$), dairy calcium phosphate (CaPhos), and calcium citrate malate (CaCM). Bioaccessibility is defined as the calcium that is available (mainly as the ionic form) for absorption by the small intestine. Data concerns only the soluble calcium at the end of the intestinal phase during in vitro digestion of whey protein matrices. Different letters indicate significant differences between means ix噤リ噤♔れゑ、♔ . ₵ IXЦ ↑↓Ц ₵ ⅓ Ц г ₵ ⅓ ₵ ↑ ⇌ ₵ ↕ о т ь ₵ IIт о Ц ↕ ↑ ₯ т д Ц ⅓ al.(1990) obtained in a Human study).

	CaCM	$CaCO_3$	CaBG	CaPhos
Bioaccessibility (%calcium present in the soluble form)	27.2 ± 7.5 (a)	22.0 ± 6.4 (ab)	35.6 ± 2.7 (a)	19.55 ±8 .7 (b)
Bioavailability (Fractional absorption)*	36 ± 7	30 ± 12	44 ± 10	Tricalcium-phosphate : 25 ± 13

*Heaney *et al.*, in 1990

III.3.1.5 Conclusions

The calcium sources studied (CaCM, $CaCO_3$, CaBG and CaPhos) were almost fully soluble in the gastric compartment and the calcium present was mainly as the ionic form (Ca^{2+}) because of the acidic pH.

In the intestinal compartment, the calcium solubility substantially falls due to the pH rising to 7. However, the fall of solubility depends on the calcium source. The solubility of a particular form of calcium depended mainly on the environmental pH, caused by molecular interactions with other compounds present in the intestinal digesta. Dairy calcium phosphate had a distinct behavior with an important fall of solubility in the beginning of the intestinal compartment, due to strong ionic interactions between calcium and phosphate.

In addition, the organization of whey proteins in the food matrix (whether as a liquid or gel) had little or no effect on solubilisation increase/decrease of calcium, and therefore on its bioaccessibility.

Finally, the *in vitro* experiment did not reflect the entire complexity observed with the *in vivo* digestion, but results obtained in this study with the INFOGEST model of digestion were in agreement with previously reported calcium bioavailability data.

III.3.2 Digestion *in vivo* du calcium : étude de la concentration en calcium dans le plasma de porc

calcium est retrouvé dans les tissus mous et les fluides biologiques (Theobald, 2005). L'homéostasie calcique est maintenue grâce à l'absorption du calcium au niveau intestinal, son excrétion urinaire et la résorption du calcium par l'os. Du fait de la présence en faible quantité du calcium dans le plasma, il semble assez aisé pour l'organisme de réguler la calcémie grâce à la résorption osseuse et l'excrétion urinaire.

Dans la littérature, les termes « biodisponibilité » et « absorption » du calcium sont parfois employés pour décrire le même phénomène physiologique « d'absorption », ce qui prête à confusion. Il existe cependant une différence importante entre ces deux termes. En effet, l'absorption du calcium décrit le processus par lequel le calcium traverse la barrière intestinale (décrite dans la partie I.4.2.1) (Kopic & Geibel, 2013), alors que la biodisponibilité du calcium est définie comme la quantité de calcium absorbée et utilisée par le corps pour des fonctions métaboliques normales (Cashman, 2002).

D'après la littérature, il est établi que le coefficient d'absorption effectif du calcium suite à la consommation de lait varie entre 25 et 35 % chez les adultes (Bonjour et al., 2009; Fardet, Dupont, Rioux, & Turgeon, 2018). Il est également connu qu'une supplémentation en vitamine D, en particulier dans les populations carencées en vitamine D et calcium, est bénéfique pour réduire le risques de fractures (Chapuy et al., 1992). En effet, la vitamine D (sous sa forme active), permet de stimuler l'absorption intestinale du calcium (Christakos, 2012; Schwartz, Kane, & Bikle, 2016). De plus, l'excrétion urinaire du calcium est positivement corrélée à la quantité d'apports en calcium (Heaney et al., 1977; 1989), indiquant qu'un apport nutritionnel supplémentaire calcique ne permet pas toujours une absorption plus importante du calcium. Cependant d'autres points restent encore controversés. Alors que certaines études, principalement chez le rat, montrent que l'augmentation du ratio calcium sur phosphore (Ca/P) inhibe la perte osseuse et augmente l'absorption intestinale du calcium (Koshihara, Masuyama, Uehara, & Suzuki, 2004; Lamberg-Allardt & Kemi, 2017; Masuyama et al., 2003), d'autres études n'ont à l'inverse pas mis en évidence d'effet du phosphate et du ratio Ca/P sur l'absorption du calcium (Fenton, Lyon, Eliasziw, Tough, & Hanley, 2009; Heaney, 2000; Lee & Cho, 2015). De la même façon, certaines études montrent que les phosphopeptides de caséines (couramment abrégé CPP) sont susceptibles d'augmenter l'absorption *in vivo* du calcium (Bennett et al., 2000; Hansen, Sandström, Jensen, & Sørensen, 1997; Lee, Noguchi, & Naito, 1983). Les phosphopeptides de caséines contiennent des groupes de résidus de phosphosérine qui peuvent lier efficacement le calcium et inhiber la formation de phosphates de calcium insolubles (Etcheverry, Grusak, & Fleige, 2012). Cependant, d'autres études chez l'Homme n'ont pas mis en évidence d'effet stimulant des phosphopeptides de caséines sur l'absorption du calcium (Hansen, Sandström, Jensen, & Sørensen, 1997; Narva, Kärkkäinen, Poussa, Lamberg-Allardt, & Korpela, 2003; Teucher et al., 2006). Les résultats sont donc contradictoires et de nouvelles études sont nécessaires pour clarifier le rôle du ratio Ca/P et des phosphopeptides de caséines sur la biodisponibilité du calcium.

Plusieurs méthodes, nécessitant des études sur long terme, sont envisageables pour étudier l'absorption et la biodisponibilité du calcium. Ces études peuvent être menées chez l'Homme ou l'animal, mais il est intéressant de noter que les études publiées sur l'Homme sont assez anciennes. En effet, ce type d'étude a peu à peu été abandonné ou substitué pour trois raisons majeures (Fardet et al., 2018). Premièrement, de nouveaux modèles d'études *in vitro*, moins coûteux et plus rapides, ont été développés.

Deuxièmement, les isotopes stables du calcium utilisés pour étudier le métabolisme du calcium ont un coût assez élevé, et de surcroît, il est désormais interdit d'utiliser des radio-isotopes lors d'études sur l'Homme. Pour terminer, ces études demandent un investissement important en terme de temps (Fardet et al., 2018). Cependant, les études *in vivo* sur des modèles animaux, en particulier chez le rat, sont toujours réalisées. Pour toutes ces études, il existe trois méthodes principales permettant d'estimer la biodisponibilité ou l'absorption du calcium. La première est la mesure de la densité osseuse. Cette méthode est considérée comme le meilleur moyen, pour évaluer les effets à long terme, des facteurs influençant la biodisponibilité du calcium. Les mesures de densité osseuse sont réalisées par ostéodensitométrie (aussi appelée absorptiométrie biphotonique à rayons X, densitométrie osseuse ou DEXA, pour Dual Energy X-Ray Absorptiometry). En réalisant un suivi dans le temps (sur plusieurs semaines voire plusieurs années), il est possible d'observer les effets du régime d'intervention sur la densité osseuse (Cashman, 2002). Ces études sont donc des études sur long terme, afin que le régime ou traitement d'intervention ait le temps d'avoir un effet mesurable sur la masse osseuse. La deuxième méthode est l'utilisation de bilans matières oraux-fécaux sur le calcium. Cette méthode assez simple consiste à évaluer l'absorption intestinale du calcium en mesurant la différence entre les apports en calcium et l'excrétion calcique (fécale et urinaire). Cette méthode présente l'inconvénient d'être assez peu précise, du fait des erreurs d'estimation de l'apport, mais surtout de la difficulté à collecter la totalité des matières fécales et urinaires. De plus, cette méthode ne mesure pas réellement l'absorption du calcium, mais plutôt le calcium excrété. Or du calcium endogène peut aussi être excrété par le rein, ce qui explique les grandes différences entre la perte endogène et l'absorption apparente du calcium. Cependant, cette méthode étant assez facile à mettre en place, elle reste très utilisée. La dernière méthode, principalement utilisée lors d'études chez l'Homme ou l'animal, est la mesure de l'absorption réelle du calcium basée sur l'utilisation de traceurs. Cette méthode consiste à marquer les aliments par des isotopes stables du calcium (^{42}Ca, ^{44}Ca, ^{46}Ca et ^{48}Ca), ou anciennement par des traceurs radioactifs (^{45}Ca et ^{47}Ca), puis de mesurer la quantité de calcium tracé dans les os, les fèces ou les urines (Cashman, 2002; Fardet et al., 2018). (Buchowski, Sowizral, Lengemann, Van Campen, & Miller, 1989) a ainsi démontré que le pourcentage de dose radioactive dans l'os semblait être un indicateur valable de biodisponibilité du calcium de l'aliment. Ces études sont, elles aussi, des études sur « long terme », car il faut que le calcium ait le temps d'être absorbé et/ou excrété. Il est donc nécessaire de compter au minimum 48h pour chaque essai.

Dans le but de répondre au mieux aux besoins nutritionnels des populations carencées en calcium, il serait intéressant de continuer les études sur l'absorption du calcium. Une étude sur plus long terme utilisant une des méthodes précédemment citées est notamment envisageable dans le cadre de la poursuite de ce travail de thèse sur modèle porcin. Il serait ainsi possible de nourrir les animaux exclusivement avec leur alimentation de croissance classique, mais enrichie par des sources variables en calcium. Ces résultats pourraient être pertinents par rapport aux données de la littérature car nous avons vu que certains mécanismes, comme l'effet du phosphate ou encore des protéines sur l'absorption du calcium, sont encore mal compris. En améliorant les connaissances sur l'absorption et l'utilisation du calcium par l'organisme, il pourrait être possible de proposer des solutions alimentaires efficaces et faciles à mettre en place, pour limiter le développement de l'ostéoporose et le risque de chutes et fractures liés à cette pathologie.

III.3.3 A retenir

A l'aide d'un modèle de digestion *in vitro* statique complet, nous avons pu mettre en évidence que les variations de la bioaccessibilité du calcium au cours de la digestion sont principalement dues aux changements de pH dans le tractus gastro-intestinal. Cependant elles sont finalement peu impactées par la forme chimique initiale de la source d'enrichissement des produits en calcium. Ainsi, durant la phase de digestion gastrique, la majorité des sources de calcium était entièrement solubilisée et sous forme ionique, indiquant une bioaccessibilité très élevée du calcium à pH acide. Cependant, dès le passage dans le compartiment intestinal, où le pH était de 7, le calcium retournait très rapidement sous une forme insoluble, limitant de fait sa bioaccessibilité. Lors de l'étude portant sur la digestion du calcium sur modèle porcin, nous avons recueilli les effluents duodénaux sur une période de 7h suivant l'ingestion des produits laitiers enrichis en calcium provenant de différentes sources. Des mesures de concentrations en calcium totaux et solubles dans ces effluents duodénaux nous permettront d'évaluer l'impact du pH sur la solubilité du calcium en condition *in vivo*. Ces résultats nous permettront de comparer la solubilité du calcium dans des effluents duodénaux en fonction de la source d'enrichissement en calcium, du pH des effluents duodénaux et de la matrice alimentaire.

Les résultats de la digestion *in vitro* statique n'ont pas mis en évidence d'effet de la gélification des produits laitiers à base de protéines sériques sur la bioaccessibilité du calcium. Cependant la composition des produits semble être un facteur important car la bioaccessibilité du calcium était généralement plus élevée lorsque le calcium était solubilisé dans de l'eau plutôt qu'intégré dans les produits laitiers contenant des protéines et de la matière grasse. L'étude de la solubilité du calcium dans les effluents duodénaux, suite à l'ingestion de produits laitiers à base de caséines et de protéines sériques, permettra d'étudier ces phénomènes dans les conditions de digestion physiologiques, et sur différents types de matrices alimentaires.

Le dernier résultat majeur suite aux digestions *in vitro* statiques est la plus forte sensibilité aux variations de pH du phosphate de calcium par rapport au carbonate de calcium, au calcium citrate malate et au bisglycinate de calcium. En effet, la chute de bioaccessibilité du calcium était bien plus marquée lors du passage dans le compartiment intestinal pour les matrices contenant du phosphate de calcium en comparaison avec les trois autres sources d'enrichissement. L'hypothèse est que le phosphate est encore plus sensible aux variations de pH que le calcium. Ainsi, lorsque le pH du milieu remonte lors du passage de l'estomac à l'intestin, le phosphate se réassocie rapidement avec les ions calcium, diminuant leur bioaccessibilité.

Les résultats de l'étude de digestion *in vitro* pourraient être complétés par une étude clinique permettant de donner des valeurs d'absorption du calcium (par des bilans oro-fécaux ou le marquage des aliments par des isotopes du calcium) ou encore d'efficacité sur la prévention de l'ostéoporose (nombre de chute ou de fracture, mesure de minéralisation osseuse). Cependant les résultats obtenus sont cohérents avec les précédentes études réalisées. En effet, notre étude a mis en évidence que la bioaccessibilité du calcium était d'environ 30 %, et cette valeur est équivalente aux données d'absorption du calcium classiquement retrouvée dans la majorité des études cliniques (Bonjour et al., 2009; Heaney et al., 1990; Theobald, 2005).

L'étude de la calcémie sur le modèle de digestion porcin a mis en évidence que la calcémie est très stable tout au long de la période postprandiale. Ce paramètre ne semble donc pas être un bon indicateur de la biodisponibilité et de l'absorption du calcium. Toutefois d'autres méthodes sont actuellement disponibles pour étudier l'efficacité d'un apport calcique sur son absorption et son effet sur la masse osseuse. Pour étudier ces phénomènes, il est par exemple possible de mesurer la densité osseuse ou de réaliser des bilans oro-fécaux.

IV DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse visait à étudier l'impact de la texture de produits fromagers, à base de protéines sériques et enrichis en calcium, sur le confort en bouche, la bioaccessibilité et la biodisponibilité des acides aminés et du calcium.

L'originalité de cette thèse résidait dans l'aspect multidisciplinaire des études et des approches scientifiques utilisées. Les nombreux résultats obtenus mettent en évidence que la combinaison des aspects de formulation, d'analyse sensorielle et d'étude de la digestion (sur des modèles de digestion simulée ou porcin) confirment la réussite d'un tel projet, de par la richesse des connaissances générées. Dans ce travail, toutes les approches et techniques mises en œuvre avaient le même objectif : l'amélioration des connaissances pour permettre le développement de nouveaux produits laitiers adaptés nutritionnellement et sensoriellement aux besoins spécifiques des personnes âgées.

L'intérêt des protéines sériques pour stimuler la synthèse musculaire des personnes âgées ayant été démontré dans la littérature (Pennings et al., 2011), le premier objectif de cette thèse a donc été le développement de fromages modèles dont les protéines étaient exclusivement des protéines sériques. La composition nutritionnelle de ces produits a été définie en se basant sur des compositions standards de fromages commercialisés (24% de protéines, 20% de lipides). Avec une même préparation initiale, foisonnée ou non, et traitée thermiquement selon différents barèmes, quatre fromages modèles ayant des textures à la fois variées et proches de celles de fromages commerciaux (Mou, Fondu, Dur et Foisonné) ont été développés. Dans un objectif nutritionnel, ces fromages modèles ont aussi été enrichis par différentes sources de calcium.

Suite au développement de ces produits, l'acceptabilité des différentes textures fromagères a été étudiée sur un panel de personnes âgées (+65 ans) autonomes. Ces études ont mis en évidence que le facteur majeur influençant le confort en bouche est la facilité à réaliser le bol alimentaire. Ainsi, les bols alimentaires des fromages modèles Dur et Foisonné ont été perçus plus difficiles à réaliser que les bols des fromages modèles Mou et Fondu. Alors que le confort en bouche et la perception des textures étaient faiblement associés à la santé buccodentaire des sujets, les caractéristiques du bol alimentaire étaient en revanche significativement différentes en fonction de la santé dentaire et du flux salivaire des personnes âgées. Ainsi, la santé buccodentaire des personnes âgées ne semble pas être le facteur majeur à prendre en compte pour le développement de produits laitiers sensoriellement adaptés aux personnes âgées. Cependant, il est important de s'intéresser aux caractéristiques des bols alimentaires que les séniors peuvent réaliser lorsqu'ils dégustent de tels produits, afin de maximiser le confort en bouche.

Les études de digestion *in vitro* ont permis de comparer l'impact de la structure des fromages modèles, de la source d'enrichissement en calcium et en protéines sur la bioaccessibilité des acides aminés et du calcium. Ce modèle de digestion a permis de tester un grand nombre de matrices. En effet, cette étape de sélection était impossible à réaliser *in vivo* pour des raisons éthiques et budgétaires. Ainsi, nous avons pu comparer jusqu'à 12 matrices différentes dans le cas de l'étude de la bioaccessibilité du calcium (4 sources de calcium incluses dans de l'eau, ou dans un fromage modèle gélifié ou sous sa forme liquide),

et 5 matrices dans le cas de l'étude de la bioaccessibilité des acides aminés (3 fromages modèles, leur version liquide non traitée thermiquement et un fromage commercial à base de caséines). Ces études ont mis en évidence que la bioaccessibilité du calcium est majoritairement liée aux pH intra-gastrique et intra-intestinal, plutôt qu'à la forme chimique initiale de la source d'enrichissement en calcium. De plus, la bioaccessibilité du calcium n'a pas été impactée par la structure des produits fromagers (liquide ou gélifiée). De façon similaire, la bioaccessibilité des acides aminés n'a pas été significativement influencée par la structure des fromages modèles étudiés (Fondu, Dur et Foisonné). De manière plus surprenante par rapport aux études publiées sur ce sujet, la bioaccessibilité des acides aminés était plus élevée lors de la digestion du fromage commercial à base de caséines que lors de la digestion des fromages modèles à base de protéines sériques. Toutefois, en accord avec les résultats de la littérature, nous avons pu mettre en évidence que la dénaturation des protéines sériques par traitement thermique a permis d'augmenter la bioaccessibilité des acides aminés. Comme les caractéristiques texturales et structurales des fromages modèles n'ont impacté ni la bioaccessibilité du calcium, ni celle des acides aminés, toutes les textures de ces fromages modèles sont envisageables pour le développement de nouveaux produits laitiers nutritionnellement adaptés aux besoins de personnes âgées.

Pour finir, l'étude de digestion *in vivo* sur modèle porc a permis de prendre en compte tous les aspects dynamiques et physiologiques de la digestion, qui sont négligés par le modèle de digestion *in vitro* statique. Cette étude a mis en évidence que la digestion du fromage modèle à base de protéines sériques permet d'obtenir en période postprandiale, une concentration en leucine plasmatique deux fois supérieure à celle obtenue suite à la digestion du fromage commercial à base de caséines. Grâce à cette biodisponibilité supérieure de la leucine, la synthèse musculaire des personnes âgées pourrait être davantage stimulée, ce qui pourrait limiter les phénomènes de sarcopénie. Cependant, des études cliniques doivent être menées afin de valider cette hypothèse.

Suite à ce travail de thèse, certains points restent à éclaircir. Ainsi, de nouvelles études pourront être menées afin de répondre à ces interrogations.

IV.1 SANTE BUCCODENTAIRE, FORMATION DU BOL ET DIGESTION

La première partie de ce travail a très clairement mis en évidence que les caractéristiques du bol alimentaire (caractéristiques rhéologiques et quantité de salive incorporée) étaient affectées par la santé buccodentaire des personnes âgées (Partie III.1.2). Ainsi, les personnes âgées ayant une santé buccodentaire altérée réalisent des bols de moins bonne qualité que les personnes ayant une bonne santé buccodentaire (bols plus durs, plus adhésifs et contenant moins de salive). La formation du bol alimentaire est la première étape de la digestion. Elle a pour objectif de déstructurer l'aliment et de rendre le bol alimentaire cohésif par l'action conjuguée de la mastication et de la salive (Peyron et al., 2017). L'effet de la santé buccodentaire sur les caractéristiques des bols alimentaires était déjà connu. En effet, d'autres études avaient notamment mis en évidence que les personnes portant des appareils dentaires réalisaient des bols peu dégradés et comportant de grosses particules alimentaires (Mishellany-Dutour et al., 2008; Woda, Mishellany, et al., 2006; Yven et al., 2006).

Les caractéristiques du bol alimentaire vont ensuite impacter le processus de digestion de l'aliment (Alam, Pentikainen, Narvainen, Holopainen-Mantila, Poutanen, & Sozer, 2017; Grundy, et al., 2015). Dans l'estomac, il est connu que la viscosité et la désintégration du chyme jouent un rôle important sur les cinétiques d'hydrolyse des nutriments. Ainsi, une étude réalisée à l'aide d'un modèle de digestion *in vitro* a mis en évidence qu'à la fin de la digestion gastrique, des fromages élastiques (comme la Mozzarella) étaient moins désintégrés que des fromages plus affinés, plus tendres et plus riches en matière grasse (comme le Camembert et le Cheddar vieilli), limitant ainsi la protéolyse de ces aliments (Fang et al., 2016). De plus, une augmentation de la viscosité du chyme est liée à un moindre mélange des fluides digestifs à celui-ci et au ralentissement de la vidange gastrique (Guerin et al., 2001; Kong & Singh, 2008a; Marciani et al., 2001). Ainsi, les caractéristiques du chyme ont un rôle majeur sur la vitesse de vidange gastrique et d'hydrolyse des aliments. De ce fait, il est très probable que les cinétiques de bioaccessibilité et biodisponibilité des nutriments soient aussi fortement impactées.

De nos jours, très peu d'études ont été menées pour connaître l'effet potentiel d'une moindre dégradation du bol alimentaire du fait d'une altération de la santé buccodentaire sur la digestion gastro-intestinale des aliments. Pour l'instant, à notre connaissance, seules deux études se sont intéressées à cette question (Rémond et al., 2007; Sayd, Peyron, Viet, & Sante-Lhoutellier, 2016). La première étude réalisée par Sayd et al. (2016), s'est intéressée à la protéolyse et la lipolyse de saucisses de Francfort à l'aide d'un modèle de digestion *in vitro* dynamique. Elle a comparé l'effet combiné d'une mastication déficiente et d'une digestion simulée avec des paramétrages relatifs aux séniors (principalement liés à une réduction des quantités d'enzymes digestives), à un modèle de digestion simulée classique, basé sur les paramètres d'un adulte sain. Cette étude a mis en évidence un effet modéré de la mastication et un effet majeur des conditions digestives de personnes séniors sur la digestion gastro-intestinale des protéines et des lipides (Sayd et al., 2016). La deuxième étude, menée par Rémond et al. (2007), a étudié le taux d'absorption de protéines et le métabolisme protéique de sujets âgés en fonction de leur efficacité masticatoire, après l'ingestion d'une portion de viande. Deux groupes de sujets âgés ont été étudiés : un groupe de sujets avec une bonne dentition naturelle et un autre groupe équipé de prothèses dentaires complètes, connu pour avoir une mauvaise efficacité masticatoire. Cette étude a montré que la synthèse des protéines par l'organisme en période postprandiale était plus faible chez les porteurs de

prothèses dentaires que chez les sujets bien dentés (30 % et 48 % de l'apport en leucine, respectivement, était utilisé pour la synthèse musculaire $p<0,05$). Ainsi, l'utilisation des protéines de la viande pour la synthèse protéique par l'organisme peut être altérée par une diminution de l'efficacité masticatoire des séniors (Rémond et al., 2007). De façon un peu similaire, Pennings et al. (2013) ont comparé la rétention postprandiale des protéines après l'ingestion de bœuf haché ou non haché, chez des sujets âgés porteurs de prothèses dentaires. Cette étude a mis en évidence que l'ingestion de bœuf haché entraînait une augmentation de la biodisponibilité des acides aminés (Pennings et al., 2013). Ainsi, le hachage du bœuf semble permettre une digestion plus rapide des aliments, certainement du fait d'un bol alimentaire plus dégradé.

Ces études montrent un effet négatif d'une moindre efficacité masticatoire sur l'hydrolyse des nutriments et leur utilisation ultérieure par l'organisme. Les effets de la mastication sur la digestion ont été observés dans d'autres études qui tentent de comprendre les mécanismes expliquant l'impact de cette première étape de la digestion, sur la digestion gastro-intestinale et l'utilisation finale des nutriments par l'organisme.

Ainsi, la mastication est connue pour stimuler la salivation (Dodds et al., 2005). La salive contient des enzymes (en particulier de l'α-amylase) qui permettent d'initier la dégradation enzymatique des aliments dès la phase de digestion orale (Rémond et al., 2015). Une moindre mastication entraine une moindre dégradation du bol, mais aussi une moindre quantité de salive incorporée dans le bol, limitant ensuite certainement l'hydrolyse des aliments pendant la digestion gastro-intestinale.

De plus, comme indiqué précédemment, la vidange gastrique est un processus principalement régulé par la taille des particules et la viscosité du chyme (Guerin et al., 2001; Kong & Singh, 2008a; Marciani et al., 2001). Par conséquent, il est probable qu'une mastication plus complète permette de réduire le travail mécanique mis en œuvre par l'estomac pour dégrader les aliments afin de permettre leur vidange dans l'intestin. Une étude a ainsi mis en évidence que le taux de vidange gastrique est significativement influencé par l'efficacité masticatoire (Pera et al., 2002) : pour des jeunes adultes, le temps de demi-vidange était significativement plus court lorsque les aliments étaient mâchés sur 50 cycles plutôt que sur 25 cycles. Une autre étude a mis en évidence que la mastication peut également jouer un rôle dans le maintien d'une bonne motilité dans le tube digestif en augmentant les mouvements gastriques (Kimura et al., 2006). Une mastication suffisante semble donc non seulement accélérer la vidange gastrique, mais aussi aider à la digestion en stimulant la motilité du tractus digestif.

Ainsi, tous ces résultats montrent des effets importants de la mastication sur l'efficacité de la digestion gastro-intestinale des aliments. Il semble possible que la moindre dégradation des bols alimentaires par les personnes ayant une efficacité masticatoire déficiente, implique un ralentissement de la vidange gastrique. Ce ralentissement pourrait en partie expliquer le retard dans l'absorption des protéines de la viande, observé dans l'étude de Rémond et al. (2007). Cependant, d'autres raisons pourraient expliquer ces différences. Par exemple, les personnes âgées ayant une efficacité masticatoire déficiente sont souvent des sujets âgés faibles, ayant un état de santé plus altéré avec une inflammation chronique de bas grade plus marquée (Jourdan, Deutz, Cynober, & Aussel, 2011; Rémond et al., 2007). Ainsi, la séquestration splanchnique des acides aminés peut être supérieure chez cette population de personnes

âgées affaiblies (Jourdan et al., 2011), expliquant également les différences de métabolisme protéique observées dans l'étude de Rémond et al. (2007).

De plus, l'étude sur la vitesse de vidange gastrique en fonction de la mastication a été conduite sur un seul type de population, en bonne santé, à qui on a imposé un nombre de cycles de mastication (Pera et al., 2002). Cette étude ne comparant pas deux populations ayant des états de santé buccodentaires différentes, les objectifs ne sont pas tout à fait les mêmes. En effet, lorsqu'on fixe le temps de mastication pour une même population, on s'intéresse à l'effet de l'efficacité masticatoire sur la vidange gastrique, alors que dans l'autre cas, on s'intéresse à l'effet de la santé buccodentaire. Il est donc possible que les stratégies adoptées par une population sénior présentant un haut niveau d'édentement (i.e. augmentation du nombre de cycles de mastication et choix alimentaire) suffisent en fait à maintenir des vitesses de vidange gastrique équivalentes à celles observées chez les personnes âgées ayant une bonne santé buccodentaire.

Perspective 1 : Mieux prendre en compte la première phase de la digestion dans les protocoles de digestion *in vitro*

Pour la suite de ce travail de thèse, il serait intéressant de mieux prendre en compte la phase orale de la digestion dans le protocole de digestion *in vitro* harmonisé (Minekus et al., 2014). Lors de ce travail de thèse, nous avons essayé de mieux simuler cette étape de la digestion lors de l'étude de la bioaccessibilité des acides aminés (partie III.3.1) en adaptant la quantité de fluide salivaire à incorporer en fonction des résultats issus des mesures de quantité de salive incorporée dans les bols de fromages modèles réalisés par le panel de personnes âgées (parties III.1.1). Ainsi, au lieu d'inclure 1 g de fluide salivaire pour 1 g de produit comme préconisé dans le protocole Infogest (Minekus et al., 2014), les bols alimentaires contenaient 66 % de fromage modèle et 34 % de fluide salivaire (partie III.2.1). Actuellement, le groupe d'experts Infogest travaille sur une mise à jour du protocole de digestion *in vitro* statique, avec une partie d'optimisation de la phase orale. Par la suite, il pourrait être recommandé de ne pas simplement mélanger le fluide salivaire et l'amylase avec l'aliment broyé (opération actuellement réalisée à l'aide d'une râpe de cuisine), mais plutôt d'essayer de former un bol en mélangeant le fluide salivaire et l'aliment par des opérations de broyage et de malaxage plus proches de l'action de mastication. Cependant, il reste important de souligner que ce modèle de digestion *in vitro* statique a pour objectif de mimer de façon simple le processus de digestion dans des conditions statiques (paramètres fixes pour chacune des étapes de la digestion). Ainsi, toutes les modifications du protocole doivent prendre en compte cette contrainte afin qu'il conserve sa fonction de test simple, peu onéreux et mis en œuvre facilement par tout type de laboratoire.

Pour poursuivre dans cet objectif d'optimisation du protocole de digestion *in vitro,* il serait intéressant d'étudier l'impact de la modification des conditions de déstructuration du bol alimentaire (taille des particules du bol, viscosité du bol et quantité fluide salivaire variables) sur l'hydrolyse des protéines et des lipides en phase gastrique et intestinale. Ces études pourraient aussi être réalisées en condition de digestion *in vitro* dynamique comme dans l'étude de Sayd et al. (2016) précédemment présentée. A l'aide de ce modèle, les aspects de vidange gastrique liés à la taille des particules générées dans l'estomac et à la viscosité du chyme, pourraient être davantage pris en compte.

Perspective 2 : Comprendre l'impact de la santé buccodentaire sur la digestion des aliments et l'utilisation des nutriments par l'organisme

Nous avons vu que l'impact de la santé buccodentaire sur l'hydrolyse des protéines et leur utilisation par l'organisme n'a été que rarement abordé (étude de Rémond et al. (2007)). Il serait donc intéressant de mieux comprendre les phénomènes influençant les cinétiques d'hydrolyse des protéines et leur utilisation par l'organisme, afin de développer de nouveaux aliments répondant réellement aux besoins nutritionnels des seniors. Pour cela, il pourrait être intéressant de mieux caractériser la population âgée étudiée et les bols alimentaires réalisés selon leur état de santé. En général, des populations de sujets âgés dentés et totalement édentés sont comparées. Cependant, certains sujets âgés ne portent que des appareils partiels, avec parfois un faux-palais. De plus, la population sénior est très hétérogène. En effet, l'état de santé global, la santé cognitive, l'autonomie ou encore l'âge sont très variables d'un sénior à l'autre. Il est possible que d'autres facteurs que la santé buccodentaire puissent influencer l'hydrolyse des nutriments et leur utilisation par l'organisme. Il apparait donc nécessaire de caractériser de manière plus complète les populations sénior étudiées pour mieux intégrer ces différents facteurs.

Pour terminer, bien que la plupart des études précédemment citées évoquent l'importance de la santé buccodentaire des sujets, la majorité d'entre elles ne se sont en réalité intéressées qu'au seul effet de la dentition. Pourtant, le flux salivaire a un impact majeur sur la facilité à réaliser un bol cohésif facile à avaler. De plus, la salive contient des enzymes qui initient la digestion. Ainsi, il semble essentiel de mieux comprendre l'impact de la salivation sur la digestion gastro-intestinale des aliments. En effet, la population sénior étant connue pour avoir un flux salivaire plus faible que celle des jeunes adultes (avec une réduction du flux salivaire estimée à 38 % d'après Vandenberghe-Descamps et al. (2016), la prise en compte de ce paramètre supplémentaire serait particulièrement pertinente dans l'objectif de développer des aliments à destination de cette population spécifique.

IV.2 COMPARAISON DES ETUDES DE DIGESTION *IN VITRO* STATIQUE ET *IN VIVO*

Ce travail a mis en évidence que la méthodologie choisie pour étudier la digestion de protéines conditionne fortement les résultats obtenus et les conclusions qui peuvent en découler (partie III.2). Ainsi, l'approche par une méthode de digestion *in vitro* statique a très clairement démontré qu'à la fin de la digestion simulée, les caséines du fromage commercial étaient plus hydrolysées que les protéines sériques des fromages modèles. De ce fait, nous en avons déduit que la bioaccessibilité des acides aminés issus des caséines était supérieure à celle des protéines sériques. Pourtant, l'étude de digestion *in vivo* sur modèle porcin, comparant la digestion des caséines et des protéines sériques apportées par des aliments solides, a mis en évidence une biodisponibilité plus élevée de la majorité des acides aminés essentiels après l'ingestion de protéines sériques plutôt que de caséines. A première vue, ces résultats semblent plutôt contradictoires.

Ce travail de thèse a aussi montré que les résultats des études portant sur la digestion du calcium sur des modèles *in vitro* et *in vivo* étaient contrastés. Ainsi, les données de bioaccessibilité du calcium évaluées dans l'étude de digestion *in vitro* (partie III.3.1) étaient cohérentes avec les données d'absorption du calcium disponibles dans la littérature (Heaney et al., 1990). En revanche, les mesures de calcémie du

porc en période postprandiale ne semblent pas être un bon indicateur de l'absorption et de l'utilisation du calcium par l'organisme. En effet, de façon générale, la biodisponibilité d'un nutriment correspond à sa concentration dans le sang en période postprandiale. Or, au regard de notre étude sur le calcium (partie III.3.2) on remarque que pour certains nutriments, cette mesure n'est peut-être pas la plus pertinente.

Ainsi deux interrogations se sont posées :

- Quels sont les atouts et les limites des modèles *in vitro* statiques pour étudier la digestion du calcium et des protéines dans des matrices alimentaires complexes ?
- Quel est le lien entre biodisponibilité et bioaccessibilité des nutriments ? (Corrélation entre les résultats des études de digestion *in vitro* et *in vivo*)

La première chose à bien identifier est l'objectif du modèle de digestion *in vitro* statique. En effet, cette approche permet, grâce à un protocole simple, peu coûteux et facile à mettre en place, d'étudier la digestion de molécules purifiées, d'évaluer l'allergénicité potentielle de protéines ou de comparer le comportement digestif de produits plus complexes pour permettre une présélection avant de passer sur un modèle de digestion plus pertinent d'un point de vue physiologique (Minekus et al., 2014). Ainsi, le groupe d'experts réunis dans le projet Infogest a proposé un protocole de digestion assez simple, avec des conditions expérimentales et des paramètres de digestion stables (i.e. pH constant dans les différents compartiments gastrique et intestinal, absence de flux de produits ou d'enzymes entre les différents compartiments, absence d'absorption des nutriments…), permettant tout de même d'avoir un modèle pertinent. Les paramétrages de ce test sont basés sur des valeurs de paramètres physiologiques réalistes (Bohn et al., 2017; Ménard & Dupont, 2014). Cependant, ce modèle ne permet pas de reproduire les aspects dynamiques de la digestion et la complexité biologique du tractus digestif. L'utilisation de modèles de digestion *in vitro* dynamiques, *in vivo*, animaux ou humains demeurent les meilleures approches pour étudier la digestion dans toute sa complexité.

Depuis l'harmonisation du protocole de digestion *in vitro* statique (Minekus et al., 2014), des études ont été menées pour tenter de mettre en évidence des corrélations entre les données obtenues par des modèles *in vitro* statiques et *in vivo*. Une revue récente (Bohn et al., 2017) a ainsi montré que dans le cas d'émulsions, de solutions protéiques simples ou d'aliments à base d'amidon, les modèles *in vitro* sont de bons prédicteurs du comportement des lipides, protéines et glucides lors de digestions *in vivo*. Cependant, dans le cas de macronutriments (comme les caroténoïdes) ou de composés intégrés dans des aliments plus complexes, le comportement de ces composés est plus difficile à prédire par ce modèle de digestion simulé statique. Cependant, dans la majorité des cas, il semble que les modèles de digestion *in vitro* statiques permettent malgré tout de classer correctement les aliments en fonction de la bioaccessibilité de certains nutriments (minéraux, caroténoïdes), même si les valeurs obtenues *in vitro* sont différentes de celles observées *in vivo* (Bohn et al., 2017).

A l'issu de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence que le processus de libération du calcium au cours de la digestion de produits laitiers par un modèle *in vitro* statique peut être corrélé aux données antérieures obtenues lors d'études chez l'Homme (Cashman, 2003; Heaney et al., 1990; Reinwald et al.,

2008; Theobald, 2005), à condition d'être bien conscient des limites de chacune de ces approches. En effet, il est connu que le calcium doit être sous forme soluble dans le tractus gastro-intestinal afin d'être absorbé par l'organisme. Ainsi, les études de digestion *in vitro* permettent d'évaluer la bioaccessibilité du calcium en mesurant la concentration de sa forme soluble dans le compartiment intestinal. Trois méthodes de dosage peuvent être utilisées : la centrifugation, la dialyse ou plus récemment l'ultrafiltration (Etcheverry et al., 2012; Lorieau et al., 2018; Perales et al., 2005). Les modèles de digestion *in vitro* peuvent être complétés par des modèles cellulaires Caco-2. Cependant, certaines méthodes permettent une meilleure estimation de la bioaccessibilité du calcium. Alors que les bioaccessibilités du calcium évaluées par transfert au travers de cellules Caco-2 et par dialyse sont positivement corrélées (0,70), la mesure du calcium soluble par simple centrifugation du digesta intestinal est négativement corrélée à ces deux méthodes d'évaluation (r^2 de -0.83 et -0.93 avec les mesures par dialyse et par transfert au travers de cellule Caco-2, respectivement) (Perales et al., 2005; Rossi, 2015). Une explication possible est que le calcium solubilisé dans les digestas est non seulement composé d'ions calcium, mais aussi de sels de calcium. Le calcium ainsi associé à d'autres molécules, présente alors un poids moléculaire trop important pour pouvoir être transporté au travers la barrière intestinale par diffusion passive ou par les transporteurs des entérocytes. Ainsi, le calcium non solubilisé ne peut pas être absorbé. Une digestion *in vitro* statique complétée par un transfert au travers des cellules Caco-2 ou par une ultrafiltration avec un seuil de coupure se rapprochant de celui des cellules de la barrière intestinale, semblent être particulièrement adaptée pour prédire l'absorption du calcium chez l'Homme (Cashman, 2003; Etcheverry et al., 2012). Dans notre étude (partie III.3.1), le dosage du calcium soluble à l'aide d'une ultrafiltration (seuil de coupure à 3kDa) a permis de reproduire de manière satisfaisante les conditions d'absorption obtenues plus classiquement grâce à des cellules monocouches Caco-2. La pertinence de la mesure de la calcémie pour étudier la biodisponibilité du calcium et les méthodes permettant de quantifier l'absorption du calcium ayant déjà été présentées et discutées dans la partie III.3.2, ces points ne seront pas abordés dans cette discussion.

Les études actuelles sur la digestion de protéines permettent une comparaison précise de données issues des modèles de digestion *in vitro* et *in vivo*. Deux études comparant les hydrolyses de protéines laitières et les libérations des peptides obtenus par modèle de digestion *in vitro* statique et *in vivo* (au niveau du jéjunum d'Homme par (Sanchón et al., 2018) et des compartiments gastro-intestinaux de porc par (Egger et al., 2017)) ont été publiées très récemment et rapportent des résultats prometteurs. En effet, Sanchón et al. (2018) ont démontré une corrélation de 0,74 ± 0,16 entre les profils peptidiques dérivés de l'α-lactalbumine retrouvés en phase intestinale de la digestion simulée et ceux des effluents provenant du jéjunum de 4 volontaires. De plus, l'étude d'Egger et al. (2017) a démontré que le profil peptidique des digestas gastriques était très similaire entre les deux modèles de digestions *in vitro* et *in vivo,* avec notamment un coefficient de corrélation de 0,71 pour les peptides dérivés de la caséine α_{s1}. Les coefficients de corrélation étaient en revanche plus faibles au niveau des digestas intestinaux (entre 0,58 et 0,48). Cette moins bonne corrélation entre les deux approches de digestion *in vitro* et *in vivo* au niveau intestinal, par rapport à la phase gastrique, s'expliquerait par le fait que le protocole de digestion simulé ne reproduit pas l'absorption des nutriments à travers la barrière intestinale ayant lieu dans l'intestin grêle (Egger et al., 2017). De plus, le modèle de digestion *in vitro* statique ne reproduit pas l'effet de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal sur l'hydrolyse de petits peptides (Tobey, Heizer,

Yeh, Huang, & Hoffner, 1985). En effet, cette bordure en brosse est constituée de nombreuses enzymes, dont des peptidases, impliquées dans la phase terminale de la digestion des protéines. Ces aspects, importants au niveau physiologique, permettent d'augmenter l'hydrolyse et l'absorption des peptides. Cependant, ils ne sont pas pris en compte dans les modèles de digestion *in vitro* statiques (Picariello et al., 2015).

Finalement, on remarque que dans ces deux publications (Egger et al., 2017; Sanchón et al., 2018), il s'agit de l'étude et de la comparaison de l'hydrolyse des peptides entre les deux modèles de digestion. Jamais ces études n'ont fait de lien entre la bioaccessibilité des acides aminés (évaluée *in vitro)* et leur biodisponibilité dans le plasma (mesurée *in vivo)*. De plus, ces deux études ont été menées sur des solutions simples et non sur des aliments plus complexes, comme dans notre présent projet. Malgré une tentation importante de comparer nos résultats de bioaccessibilité et de biodisponibilité des acides aminés, ceci reste pour l'instant impossible. En effet, bioaccessibilité et biodisponibilité sont deux concepts bien distincts (décrits dans la partie 1.1). Un nutriment bioaccessible ne sera pas systématiquement absorbé au niveau de l'intestin. De la même façon, un nutriment absorbé ne se retrouvera pas forcément dans la circulation sanguine et la fraction biodisponible d'un nutriment n'aura pas nécessairement d'effet sur la santé et sur le fonctionnement de l'organisme.

Perspective 1 : Estimer la bioaccessibilité des peptides et du calcium dans les effluents duodénaux collectés lors de l'étude *in vivo* sur modèle porc

Lors de notre étude de digestion *in vivo,* les plasmas ainsi que les effluents duodénaux des porcs ont été collectés et conservés. Ainsi, il nous serait possible d'évaluer les profils peptidiques dérivés de l'α-lactalbumine ou d'une des caséines, dans nos effluents duodénaux. Il pourrait alors être possible de réaliser une étude comparable à celle d'Egger et al. (2017) et Sanchón et al. (2018) afin de de mieux connaître l'influence de la structure de la matrice sur l'hydrolyse des protéines, et peut-être expliquer en partie la biodisponibilité supérieure des acides aminés essentiels mesurée après ingestion du fromage modèle à base de protéines sériques en comparaison avec le fromage commercial (Partie III.2.2). De la même façon, il nous serait possible de mesurer les concentrations en calcium soluble et total dans les effluents duodénaux. Ceci nous permettrait de calculer le ratio calcium soluble sur calcium total et de comparer la bioaccessibilité du calcium issu de la digestion du fromage commercial et des fromages modèles à base de protéines sériques enrichis en carbonate de calcium ou en calcium de phosphate. Ces mesures permettraient aussi de comparer les bioaccessibilités du calcium et des peptides selon le modèle de digestion utilisé (*in vitro* statique *versus in vivo* porcin*)*. Cependant, il est à noter que les effluents ont été collectés au niveau du duodénum, ce qui correspond à un stade intermédiaire entre la phase gastrique et la phase intestinale du modèle de digestion *in vitro* statique.

Perspective 2 : Déterminer les facteurs expliquant la biodisponibilité supérieure de la leucine après l'ingestion de protéines sériques en comparaison aux caséines incluses dans des matrices solides

Dans l'objectif de comprendre les différences de biodisponibilité des acides aminés suite à l'ingestion de caséines ou protéines sériques sous forme solide (partie III.2.2), il serait intéressant de coupler les aspects de suivi d'hydrolyse des protéines dans les digestas du duodénum à des études de vidange

gastrique. Dans un premier temps, il faudrait reproduire les mêmes conditions d'ingestion des aliments que dans l'article de la partie III.2.2, c'est-à-dire, l'ingestion de 545g fromage modèle à base de protéines sériques ou de fromage traditionnel, en moins de 20 min, par des porcs conventionnels d'environ 30-35 kg. Il sera ainsi possible d'estimer la vitesse de vidange gastrique (par exemple par scintigraphie) de ces deux fromages en fonction de la source protéique de l'aliment. Si cette étude valide notre hypothèse et que la vidange gastrique du fromage traditionnel est plus lente que celle du fromage modèle à base de protéines sérique, la biodisponibilité supérieure des acides aminés après l'ingestion du fromage à base de protéines sériques pourra être en partie expliquée par cette vidange gastrique plus rapide de l'aliment. Cependant, la plupart des études actuelles étudiant la vitesse de vidange gastrique des protéines sériques, des caséines ou des protéines de lait de façon générales, ont été réalisées sur des protéines apportées sous forme de boissons ou de produits laitiers peu structurés (dans lesquels les caséines précipitent dans l'estomac sous l'effet de l'acidité gastrique) (Barbé, Ménard, et al., 2014; Lambers, van den Bosch, et al., 2013; Mahé et al., 1996), et non sous forme d'aliments solides (dans lesquels les caséines sont déjà coagulées pour former des gels ou fromages). Pour compléter cette possible étude de vidange gastrique, il serait possible de marquer les protéines des aliments afin de réaliser des bilans matières pour mieux comprendre comment elles sont digérées, hydrolysées et utilisées (Boirie et al., 1997; Dangin, Boirie, Guillet, & Beaufrère, 2002)

Perspective 3 : Développer ou améliorer les modèles de digestion *in vitro* statiques et dynamiques pour l'étude sur des aliments plus complexes et des populations spécifiques

Nous avons montré que le modèle de digestion *in vitro* statique n'était pas très adapté aux aliments complexes, notamment, car il ne permet pas de prendre en compte les phénomènes dynamiques de la digestion (comme la vidange gastrique ou l'apport continu d'enzymes digestives). Pourtant, la prise en compte de l'aspect structure de la matrice alimentaire est maintenant reconnue comme primordiale, aussi bien par les scientifiques du domaine de la digestion que par les nutritionnistes. Il est donc essentiel de développer des modèles de digestion dynamiques ou semi-dynamiques permettant de mieux simuler la digestion d'aliments complexes, sans pour autant avoir systématiquement recours à des études sur l'Homme ou l'animal. Dans ces modèles, il serait également possible d'ajouter des compartiments ou des fonctions. Il serait par exemple possible d'ajouter des fermenteurs à la suite du compartiment intestinal afin d'étudier l'effet du microbiote sur la digestion ou à l'inverse l'effet de la digestion sur le microbiote comme déjà réalisé par (Booijink et al., 2010). Il serait également possible d'ajouter des membranes en sortie de phase intestinale afin de mimer une partie de l'absorption passive qui a lieu dans l'intestin (ce qui est déjà réalisé sur certains digesteurs dynamiques comme le « TIM » (Minekus, 2015)). Ces solutions sont actuellement en cours de développement ou déjà utilisées, mais de façon encore assez sporadique.

Dans le cadre d'études sur des aliments à destination de populations spécifiques, telle que celle des séniors, la prise en compte des paramètres physiologiques de la digestion de cette classe de la population, est désormais indispensable (Shani-Levi et al., 2017). Ainsi, des modèles de digestion *in vitro* statique et dynamique simulant la digestion du sénior, sont en cours de développement. Par rapport aux modèles de digestion adultes, ceux-ci mettent en œuvre des activités enzymatiques plus faibles tout au

long de la digestion, des cinétiques de descente en pH en phase gastrique et de remonté en pH en phase intestinale plus lentes, avec une amplitude de variation de pH plus basique tout au long de la digestion gastro-intestinale (pH allant de 1,2 à 4,5 pour le modèle adulte contre 2 à 6,5 pour le modèle sénior) (Levi & Lesmes, 2014). Le développement de tels modèles de digestion, permettra, à terme, d'étudier l'effet du vieillissement sur la digestion gastro-intestinale des aliments.

IV.3 COMPREHENSION DES MECANISMES ET CONSEQUENCES PHYSIOLOGIQUES

Ce travail a mis en évidence que les protéines sériques, incluses dans des produits laitiers solides, induisaient une biodisponibilité des acides aminés deux fois supérieure à celle observée après l'ingestion de caséines. Il a aussi démontré que la bioaccessibilité du calcium était principalement liée aux pH gastro-intestinaux. Il n'a cependant pas mis en évidence de variation de la calcémie en période postprandiale. Cependant, durant ce travail de thèse, les effets physiologiques de ces différences de bioaccessibilité et biodisponibilité n'ont pas eu l'occasion d'être étudiés. Une partie des objectifs de ce projet étaient d'améliorer les connaissances scientifiques sur la digestion du calcium et des protéines, afin de développer des produits laitiers nutritionnellement adaptés aux séniors. Ainsi, il est essentiel de poursuivre ce travail par des études chez l'Homme ou l'animal pour connaître l'impact des différences de bioaccessibilité du calcium et de biodisponibilité des acides aminés sur la physiologie du sénior.

Perspective 1 : Connaitre l'impact de la biodisponibilité supérieure des acides aminés branchés après l'ingestion de protéines sériques *versus* caséines, incluses dans des aliments solides, sur la synthèse musculaire des séniors.

Notre étude a mis en évidence que la consommation de fromages modèles à base de protéines sériques induisait une biodisponibilité des acides aminés deux fois supérieure à celle observée après l'ingestion des fromages commerciaux à base de caséines. De précédentes études avaient mis en évidence ce même effet, mais pour des protéines sériques et des caséines ingérées sous forme de boissons (Boirie et al., 1997; Pennings et al., 2011). De plus, ces études avaient aussi mis en évidence une stimulation plus efficace de la synthèse musculaire après l'ingestion de protéines sériques plutôt que de caséines, chez des sujets âgées (Burd et al., 2012; Pennings et al., 2011). Ainsi, la biodisponibilité supérieure des acides aminés que nous avons observée, pourrait permettre une stimulation intense de la synthèse musculaire des personnes âgées. Cependant, des études cliniques sont nécessaires pour démontrer cet effet. Des études sur court terme (sur une journée) permettraient d'étudier la stimulation de la synthèse musculaire (comme dans l'étude de Pennings, et al. (2011)), alors que des études sur plus long terme (de plus de 4 semaines) permettraient d'étudier l'effet bénéfique de tels produits pour lutter contre le phénomène de sarcopénie, en mesurant par exemple l'évolution de la masse et la force musculaire des personnes âgées. Il faudra donc envisager d'étudier ces effets physiologiques selon le mode d'administration des protéines sériques : soit sous forme de prise unique en proposant un repas test à base de fromage modèle uniquement, soit en proposant ces mêmes produits dans le cadre d'une alimentation globale.

Il est particulièrement important de réaliser ces études sur des populations sénior, car il est fait l'hypothèse que ces personnes sont probablement moins sensibles aux apports en acides aminés

branchés par le plasma, que les jeunes adultes. L'organisme aurait alors besoin d'un apport massif et rapide d'acides aminés branchés, afin de le détecter et de l'utiliser pour la synthèse musculaire (Dardevet et al., 2012; Katsanos, 2006). Il est possible que ces différences de sensibilité aux acides aminés, entre les jeunes adultes et les séniors, soient aussi en partie dues à une séquestration splanchnique des acides aminés plus marquée dans le cas de la population sénior, limitant leur biodisponibilité ultérieure dans l'organisme (Boirie, Gachon, & Beaufrère, 1997).

Pour terminer, il est très important de bien caractériser et choisir la population de sénior étudiée. En effet, les études cliniques portant sur l'effet des protéines sériques en comparaison aux caséines, chez les séniors, montrent parfois des résultats contradictoires. Une partie de ces études ont mis en évidence un effet bénéfique d'un apport en protéines sériques sur la synthèse, la masse et/ou la force musculaire (Bukhari et al., 2015; Katsanos et al., 2008; Luiking, Deutz, Memelink, Verlaan, & Wolfe, 2014; Pennings et al., 2011; Xu, Tan, Zhang, Gui, & Yang, 2015). A l'inverse, d'autres études ne mettent pas en évidence d'effet bénéfique des protéines sériques sur ces mêmes critères (Chale et al., 2013; Dideriksen et al., 2011; Zhu et al., 2015). Il semble qu'une partie de ces différences de résultats puissent être expliquée par l'état de santé des personnes âgées. En effet, afin de stimuler la synthèse musculaire, il est essentiel d'avoir un minimum d'activité physique (ou simplement une mobilisation musculaire). Ainsi, lorsque les personnes âgées sont très faibles, ce minimum de mobilisation musculaire est quasi-inexistant, donc la stimulation de la synthèse musculaire par les protéines sériques pourrait ne pas être visible. Deux études réalisées par Aleman-Mateo semblent mettre en évidence ce phénomène (Aleman-Mateo et al., 2012 ; 2014). Pour ces deux études, des personnes âgées ont reçu quotidiennement, pendant 3 mois, 210 g de ricotta (fromage à base de protéines sériques). La première étude a été réalisée sur une population de séniors sarcopéniques (des personnes âgées affaiblies) (Aleman-Mateo et al., 2012), la deuxième sur une population de séniors non sarcopéniques (Aleman-Mateo et al., 2014). Ainsi, les auteurs ont montré que la consommation quotidienne de 210 g de ricotta pendant 3 mois permettait d'atténuer la perte de la force musculaire pour les personnes âgées non sarcopéniques, ce qui n'était pas le cas pour la population de séniors sarcopéniques.

Ainsi, les études cliniques possibles sont nombreuses en fonction des questions posées. Pour ces études, il sera particulièrement essentiel de bien choisir la durée de l'étude (« repas-test » ou régime d'intervention) et le type de population étudiée (séniors autonomes ou affaiblies mais ayant toujours une mobilisation musculaire).

Perspective 2 : Connaître l'effet physiologique de la supplémentation en calcium du régime l'alimentaire

De nombreux produits alimentaires proposés par les industriels et disponibles sur le marché sont enrichis en calcium. Depuis quelques années, les industriels augmentent les quantités de calcium présentes dans ces produits. L'importance de consommer quotidiennement des produits laitiers pour avoir un apport suffisant en calcium afin d'avoir « des os solides » est largement communiquée au grand public. Cependant, les effets physiologiques d'une telle supplémentation en calcium dans le cadre de notre alimentation quotidienne sont en réalité peu connus fautes de données disponibles. Pourtant, de nombreuses questions se posent *: la quantité de calcium ingérée quotidiennement a-t-elle une influence*

[illegible] Une telle supplémentation est-elle bénéfique pour la minéralisation osseuse ? [illegible] en calcium ? Il est donc essentiel d'apporter des réponses à ces questions.

Notre travail a mis en évidence que la bioaccessibilité du calcium est majoritairement liée au pH gastro-intestinal. Cependant, peu de différences de bioaccessibilité et de biodisponibilité du calcium ont été observées en fonction des sources d'enrichissement utilisées avec les méthodes que nous avons utilisées au cours de cette thèse. Pour poursuivre ce travail, il serait tout d'abord intéressant de réaliser des études cliniques chez l'Homme afin de connaitre les effets physiologiques d'une supplémentation de l'alimentation en calcium. Grâce à des études sur long terme, il serait possible d'observer l'effet d'une telle supplémentation sur la minéralisation osseuse, l'absorption du calcium ou encore son excrétion. Là aussi, il est essentiel de bien choisir la population étudiée. En effet, une partie des méta-analyses réalisées pour étudier l'impact d'un régime riche en calcium sur la minéralisation osseuse ou sur le nombre de chutes et de fractures, n'ont pas mis en évidence de corrélations entre ces paramètres (Bischoff-Ferrari Heike et al., 2011; Tai, Leung, Grey, Reid, & Bolland, 2015; Winzenberg, Shaw, Fryer, & Jones, 2006; Zhao, Zeng, Wang, & Liu, 2017). Il semblerait qu'une supplémentation de l'alimentation en calcium soit particulièrement pertinente pour les populations ayant des besoins accrus en calcium, en particulier les femmes post-ménopausées et les personnes carencées (Cumming, 1990; Welten, Kemper, Post, & van Staveren, 1995).

De plus, nous avons montré lors de notre étude *in vitro* que les propriétés de solubilités des différentes formes chimiques du calcium selon le pH du milieu sont importantes au cours du processus digestif car elles conditionnent la bioaccessibilité du calcium. Or, il est connu que le pH gastrique des séniors est souvent plus élevé que celui de la population générale (Recker, 1985; Rémond et al., 2015). En outre, il semblerait que l'acidité du pH dans l'estomac et le pH dans l'intestin aient tous deux un impact majeur sur l'absorption du calcium (Goss et al., 2007; Kopic & Geibel, 2013; Recker, 1985). Selon Goss et al. (2007), la solubilité du calcium est souvent maximisée à des pH acides. Il sera donc intéressant de s'intéresser spécifiquement aux personnes âgées lors de ces études cliniques et d'étudier l'absorption du calcium et de la minéralisation osseuse de personnes âgées en fonction de la source d'enrichissement en calcium dans l'alimentation. Il semble particulièrement pertinent d'étudier le calcium citrate malate ou le calcium malate, car la solubilité de ces sels de calcium varie très peu en fonction du pH (Goss et al., 2007; Reinwald et al., 2008).

Il serait également possible de poursuivre ce travail de thèse avec des études *in vivo* sur modèle animal. L'avantage de ce type de modèle est que les études utilisant le marquage des aliments par des isotopes du calcium sont plus faciles à monter que lors d'étude chez l'Homme. Ce marquage des aliments permet de réaliser des bilans d'absorption et d'utilisation du calcium (Cashman, 2003). Ces études nous permettraient de mieux connaitre les facteurs affectant l'absorption et l'utilisation du calcium. Jusqu'à présent, la majorité des études montrant un effet du ratio calcium sur phosphore ou des phosphopeptides de caséines sur l'absorption du calcium, ont été réalisés sur modèle murin (Bennett et al., 2000; Koshihara et al., 2004; Lee et al., 1983; Masuyama et al., 2003; Tsuchita, Goto, Shimizu, Yonehara, & Kuwata, 1996). Cependant les études réalisées chez l'Homme ne mettent, en général, aucun effet en évidence (Heaney, 2000; Lee & Cho, 2015; Narva et al., 2003). Les études menées chez le rat ne

semblent donc pas entièrement transposables à l'Homme. Il serait donc particulièrement intéressant de réaliser ce type d'étude sur un modèle porc pour compléter les connaissances dans ce domaine.

Alors qu'actuellement la quantité de calcium ajoutée dans les aliments est régulièrement augmentée, il semblerait que cet apport supplémentaire ne soit en réalité pas absorbé par l'organisme. En effet, la quantité de calcium excrété est positivement corrélée à la quantité de calcium ingéré (Heaney, Recker, & Saville, 1977; Heaney, Recker, Stegman, & Moy, 1989). Cependant, les études montrant ce type de résultats sont assez anciennes et se basent sur des bilans oraux-fécaux. Il serait donc possible de s'intéresser plus en détail à cette question avec des méthodes de marquage des aliments qui permettraient de connaitre la quantité de calcium réelle absorbée. Cette étude pour être complétée en travaillant sur des populations d'animaux carencées en calcium, afin de mieux évaluer l'impact d'une carence calcique sur l'absorption du calcium.

Pour terminer, si ces études sont menées en apportant le calcium par le biais de nos fromages modèles, il sera possible d'observer l'effet synergique des protéines et du calcium sur l'absorption et l'utilisation de celui-ci. En effet, il semble qu'un apport en protéines suffisant soit bénéfique à la minéralisation osseuse (De Souza Genaro & Martini, 2010). Les muscles et les os sont deux tissus interagissant fortement (Tagliaferri et al., 2015). De la même façon, la vitamine D est très connue pour stimuler l'absorption du calcium, cependant c'est aussi une vitamine particulièrement intéressante pour le maintien de la masse musculaire (Bauer et al., 2015; Domingues-Faria, Vasson, Goncalves-Mendes, Boirie, & Walrand, 2016; Verreijen et al., 2015). A terme, il est probable que l'on découvre des liens entre le développement de la sarcopénie et celui de l'ostéoporose. Ainsi, la combinaison des apports en protéines sériques, en calcium et en vitamine D, pourra être étudiée plus en détail. De ce fait, il sera possible de proposer des stratégies alimentaires plus efficaces aux personnes âgées afin de limiter le risque de développement de pathologies tel que la sarcopénie et l'ostéoporose.

V APPLICATIONS : CONCEPTION D

alimentaires restent faciles à former, même pour des personnes ayant une santé buccodentaire altérée. Ainsi, il est assez aisé de développer une gamme de produits laitiers confortables en bouche pour l'ensemble des personnes âgées, quelles que soient leurs difficultés masticatoires.

De plus, il est très important de toujours proposer aux consommateurs une large gamme de produits, y compris pour les personnes âgées. En effet, la monotonie alimentaire est très délétère au maintien de l'appétit et à l'équilibre alimentaire (Schwartz et al., 2017). Les produits laitiers sont des produits existants sous une gamme de texture et de composition très large, alors pourquoi se cantonner à proposer seulement des crèmes desserts et des boissons lactés aux personnes âgées ?

VI REFERENCES

Aguilera, J. M., & Park, D. J. (2016). Texture-modified foods for the elderly: Status, technology and opportunities. *Trends in Food Science & Technology*, *57*, 156–164. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.001

Aleman-Mateo, H., Gallegos Aguilar, A. C., Ramirez Carreon, V., Macias, L., Astiazaran Garcia, H., & Ramos Enriquez, J. R. (2014). Nutrient-rich dairy proteins improve appendicular skeletal muscle mass and physical performance, and attenuate the loss of muscle strength in older men and women subjects: a single-blind randomized clinical trial. *Clinical Interventions in Aging*, 1517. https://doi.org/10.2147/CIA.S67449

Aleman-Mateo, H., Macias, L., Esparza-Romero, J., Astiazaran-Garcia, H., & Blancas, A. L. (2012). Physiological effects beyond the significant gain in muscle mass in sarcopenic elderly men: evidence from a randomized clinical trial using a protein-rich food. *Clinical Interventions in Aging*, 225. https://doi.org/10.2147/CIA.S32356

Allen, F., & McMillan, A. (2002). Food selection and perceptions of chewing ability following provision of implant and conventional prostheses in complete denture wearers. *Clinical Oral Implants Research*, *13*(3), 320–326. https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2002.130313.x

Aloia, J. F., Dhaliwal, R., Shieh, A., Mikhail, M., Fazzari, M., Ragolia, L., & Abrams, S. A. (2014). Vitamin D supplementation increases calcium absorption without a threshold effect. *American Journal of Clinical Nutrition*, *99*(3), 624–631. https://doi.org/10.3945/ajcn.113.067199

ANSES. (2016). Les protéines. Retrieved December 11, 2017, from https://www.anses.fr/fr/content/les-prot%C3%A9ines

ANSES. (2017). *Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3* (No. INCA 3) (p. 566). ANSES.

Anthony, J. C., Anthony, T. G., Kimball, S. R., & Jefferson, L. S. (2001). Signaling pathways involved in translational control of protein synthesis in skeletal muscle by leucine. *The Journal of Nutrition*, *131*(3), 856S–860S.

Anuras, S., & Sutherland, J. (1984). Small Intestinal Manometry in Healthy Elderly Subjects. *Journal of the American Geriatrics Society*, *32*(8), 581–583. https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1984.tb06136.x

Aragon, A. A., & Schoenfeld, B. J. (2013). Nutrient timing revisited: is there a post-exercise anabolic window. *J Int Soc Sports Nutr*, *10*(1), 5.

Arnal, M. A., Mosoni, L., Boirie, Y., Gachon, P., Genest, M., Bayle, G., … others. (2000). Protein turnover modifications induced by the protein feeding pattern still persist after the end of the diets. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *278*(5), E902–E909.

Arnal, M.-A., Mosoni, L., Boirie, Y., Houlier, M.-L., Morin, L., Verdier, E., … others. (1999). Protein pulse feeding improves protein retention in elderly women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *69*(6), 1202–1208.

Arnal, M.-A., Mosoni, L., Dardevet, D., Ribeyre, M.-C., Bayle, G., Prugnaud, J., & Mirand, P. P. (2002). Pulse Protein Feeding Pattern Restores Stimulation of Muscle Protein Synthesis during the Feeding Period in Old Rats. *The Journal of Nutrition*, *132*(5), 1002–1008.

Assad-Bustillos, M., Tournier, C., Septier, C., Della Valle, G., & Feron, G. (2017). Relationships of oral comfort perception and bolus properties in the elderly with salivary flow rate and oral health status for two soft cereal foods. *Food Research International*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.057

Asselin, J., Hébert, J., & Amiot, J. (1989). Effects of In Vitro Proteolysis on the Allergenicity of Major Whey Proteins. *Journal of Food Science*, *54*(4), 1037–1039. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb07938.x

Barbé, F., Le Feunteun, S., Rémond, D., Ménard, O., Jardin, J., Henry, G., … Dupont, D. (2014). Tracking the in vivo release of bioactive peptides in the gut during digestion: Mass spectrometry peptidomic characterization of effluents collected in the gut of dairy matrix fed mini-pigs. *Food Research International*, *63*, *Part B*, 147–156. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.015

Barbé, F., Ménard, O., Gouar, Y. L., Buffière, C., Famelart, M.-H., Laroche, B., … Dupont, D. (2014). Acid and rennet gels exhibit strong differences in the kinetics of milk protein digestion and amino acid bioavailability. *Food Chemistry*, *143*, 1–8.

Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M., Laroche, B., … Rémond, D. (2013). The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chemistry*, *136*(3–4), 1203–1212.

Barroso, E., Cueva, C., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M. C., & Requena, T. (2015). Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract SIMGI. *LWT - Food Science and Technology*, *61*(2), 283–289. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.014

Bauer, J., Biolo, G., Cederholm, T., Cesari, M., Cruz-Jentoft, A. J., Morley, J. E., … Boirie, Y. (2013). Evidence-Based Recommendations for Optimal Dietary Protein Intake in Older People: A Position Paper From the PROT-AGE Study Group. *Journal of the American Medical Directors Association*, *14*(8), 542–559. https://doi.org/10.1016/j.jamda.2013.05.021

Bauer, J. M., Verlaan, S., Bautmans, I., Brandt, K., Donini, L. M., Maggio, M., … Cederholm, T. (2015). Effects of a Vitamin D and Leucine-Enriched Whey Protein Nutritional Supplement on Measures of Sarcopenia in Older Adults, the PROVIDE Study: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal of the American Medical Directors Association*, *16*(9), 740–747. https://doi.org/10.1016/j.jamda.2015.05.021

Bax, M.-L., Aubry, L., Ferreira, C., Daudin, J.-D., Gatellier, P., Rémond, D., & Santé-Lhoutellier, V. (2012). Cooking Temperature Is a Key Determinant of in Vitro Meat Protein Digestion Rate: Investigation of Underlying Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(10), 2569–2576. https://doi.org/10.1021/jf205280y

Beaucher, E., Bourmault, P., Mekmene, O., & Gaucheron, F. (2011). Dosage du calcium ionique dans les produits laitiers liquides par une électrode spécifique. *Cahier Technique INRA*, (73), 61–73.

Bendtsen, L. Q., Lorenzen, J. K., Bendsen, N. T., Rasmussen, C., & Astrup, A. (2013). Effect of Dairy Proteins on Appetite, Energy Expenditure, Body Weight, and Composition: a Review of the Evidence from Controlled Clinical Trials. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, *4*, 418–438. https://doi.org/10.3945/an.113.003723

Bennett, T., Desmond, A., Harrington, M., McDonagh, D., FitzGerald, R., Flynn, A., & Cashman, K. D. (2000). The effect of high intakes of casein and casein phosphopeptide on calcium absorption in

the rat. *British Journal of Nutrition*, *83*(6), 673–680. https://doi.org/10.1017/S0007114500000854

Bischoff-Ferrari Heike A, Dawson-Hughes Bess, Baron John A, Kanis John A, Orav Endel J, Staehelin Hannes B, … Willett Walter C. (2011). Milk intake and risk of hip fracture in men and women: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of Bone and Mineral Research*, *26*(4), 833–839. https://doi.org/10.1002/jbmr.279

Blat, S., Nogret, I., Chauvin, A., Flageul, H., & Malbert, C.-H. (2006). Entero-pancreatic neurons are responsible for the intestinal phase of pre absorptive insulin secretion. *10. International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, *108*, np.

Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., … Dupont, D. (2017). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *0*(0), 1–23. https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1315362

Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M. P., Maubois, J. L., & Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(26), 14930–14935.

Boirie, Y., Gachon, P., & Beaufrère, B. (1997). Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *65*(2), 489–495.

Boland, M. (2016). Human digestion – a processing perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(7), 2275–2283. https://doi.org/10.1002/jsfa.7601

Boland, M., Singh, H., & Thompson, A. (2014). *Milk Proteins: From Expression to Food*. Academic Press.

Bonjour, J. P., Guéguen, L., Palacios, C., Shearer, M. J., & Weaver, C. M. (2009). Minerals and vitamins in bone health: the potential value of dietary enhancement. *British Journal of Nutrition*, *101*(11), 1581.

Booijink, C. C. G. M., El-Aidy, S., Rajilić-Stojanović, M., Heilig, H. G. H. J., Troost, F. J., Smidt, H., … Zoetendal, E. G. (2010). High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environmental Microbiology*, *12*(12), 3213–3227. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02294.x

Bornhorst, G. M., Ferrua, M. J., & Singh, R. P. (2015). A Proposed Food Breakdown Classification System to Predict Food Behavior during Gastric Digestion. *Journal of Food Science*, *80*(5), R924–R934. https://doi.org/10.1111/1750-3841.12846

Bornhorst, G. M., & Singh, R. P. (2014). Gastric Digestion In Vivo and In Vitro: How the Structural Aspects of Food Influence the Digestion Process. *Annual Review of Food Science and Technology*, *5*(1), 111–132. https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092346

Borreani, J., Llorca, E., Quiles, A., & Hernando, I. (2017). Designing dairy desserts for weight management: Structure, physical properties and in vitro gastric digestion. *Food Chemistry*, *220*(Supplement C), 137–144. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.202

Bouchoux, A., Gésan-Guiziou, G., Pérez, J., & Cabane, B. (2010). How to Squeeze a Sponge: Casein Micelles under Osmotic Stress, a SAXS Study. *Biophysical Journal*, *99*(11), 3754–3762. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.019

Bourne, M. C., & Comstock, S. H. (1981). Effect of Degree of Compression on Texture Profile Parameters. *Journal of Texture Studies*, *12*(2), 201–216. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1981.tb01232.x

Bovell-Benjamin, A., Viteri, F., & Allen, L. (2000). Iron absorption from ferrous bisglycinate and ferric trisglycinate in whole maize is regulated by iron status. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *71*(6), 1563–1569.

Bramaud, C., Aimar, P., & Daufin, G. (1995). Thermal isoelectric precipitation of α-lactalbumin from a whey protein concentrate: Influence of protein–calcium complexation. *Biotechnology and Bioengineering*, *47*(2), 121–130.

Breen, L., & Phillips, S. M. (2011). Skeletal muscle protein metabolism in the elderly: Interventions to counteract the'anabolic resistance'of ageing. *Nutrition & Metabolism*, *8*(1), 68.

Buchowski, M. (2015). Calcium in the context of dietary sources and metabolism. In V. R. Preedy (Ed.), *Calcium chemistry, analysis, function and effects* (pp. 3–20). Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Buchowski, M. S., Sowizral, K. C., Lengemann, F. W., Van Campen, D., & Miller, D. D. (1989). A Comparison of Intrinsic and Extrinsic Tracer Methods for Estimating Calcium Bioavailability to Rats from Dairy Foods. *The Journal of Nutrition*, *119*(2), 228–234. https://doi.org/10.1093/jn/119.2.228

Buhl, S. F., Andersen, A. L., Andersen, J. R., Andersen, O., Jensen, J.-E. B., Rasmussen, A. M. L., … Petersen, J. (2015). The effect of protein intake and resistance training on muscle mass in acutely ill old medical patients – A randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.02.015

Bukhari, S. S. I., Phillips, B. E., Wilkinson, D. J., Limb, M. C., Rankin, D., Mitchell, W. K., … Atherton, P. J. (2015). Intake of low-dose leucine-rich essential amino acids stimulates muscle anabolism equivalently to bolus whey protein in older women at rest and after exercise. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, *308*(12), E1056–E1065. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00481.2014

Burd, N. A., Yang, Y., Moore, D. R., Tang, J. E., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2012). Greater stimulation of myofibrillar protein synthesis with ingestion of whey protein isolate v. micellar casein at rest and after resistance exercise in elderly men. *British Journal of Nutrition*, *108*(06), 958–962. https://doi.org/10.1017/S0007114511006271

Buse, M. G., & Reid, S. S. (1975). Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *Journal of Clinical Investigation*, *56*(5), 1250–1261.

Butteiger, D. N., Cope, M., Liu, P., Mukherjea, R., Volpi, E., Rasmussen, B. B., & Krul, E. S. (2013). A soy, whey and caseinate blend extends postprandial skeletal muscle protein synthesis in rats. *Clinical Nutrition*, *32*(4), 585–591. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.10.001

Çakir, E., Koç, H., Vinyard, C. J., Essick, G., Daubert, C. R., Drake, M., & Foegeding, E. A. (2012). Evaluation of Texture Changes Due to Compositional Differences Using Oral Processing. *Journal of Texture Studies*, *43*(4), 257–267. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2011.00335.x

Çakır, E., Vinyard, C. J., Essick, G., Daubert, C. R., Drake, M., & Foegeding, E. A. (2012). Interrelations among physical characteristics, sensory perception and oral processing of protein-based soft-solid structures. *Food Hydrocolloids*, *29*(1), 234–245. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.006

Cashman, K. D. (2002). Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. *British Journal of Nutrition*, *87*(S2), S169. https://doi.org/10.1079/BJN/2002534

Cashman, K. D. (2003). Prebiotics and calcium bioavailability. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, *4*(1), 21–32.

Centre de Recherche pour l'Etude et l'Observation des Conditions de vie. (2010). *Consommation de* *д IX I ix⅓ ф I т II↑↕ Ц ⅓ ₵ I т II↑ Ц ₵ ↑ т ↕ т II С ↑ Ц IIд т* ☞(pp91–34)*⅓ IX₵ ↑ Ц ↑ ₵* CREDOC.

Chale, A., Cloutier, G. J., Hau, C., Phillips, E. M., Dallal, G. E., & Fielding, R. A. (2013). Efficacy of Whey Protein Supplementation on Resistance Exercise-Induced Changes in Lean Mass, Muscle Strength, and Physical Function in Mobility-Limited Older Adults. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, *68*(6), 682–690. https://doi.org/10.1093/gerona/gls221

Chantarojanasiri, T., Hirooka, Y., Ratanachu-ek, T., Kawashima, H., Ohno, E., & Goto, H. (2015). Evolution of pancreas in aging: degenerative variation or early changes of disease? *Journal of Medical Ultrasonics*, *42*(2), 177–183. https://doi.org/10.1007/s10396-014-0576-2

Chapuy, M. C., Arlot, M. E., Duboeuf, F., Brun, J., Crouzet, B., Arnaud, S., … Meunier, P. (1992). Vitamin D3 and calcium to prevent hip fratures in elderly women. *The New England Journal of Medecine*, *327*(23), 1637–1642.

Chen, J. (2009). Food oral processing—A review. *Food Hydrocolloids*, *23*(1), 1–25. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.11.013

Chen, J., & Lolivret, L. (2011). The determining role of bolus rheology in triggering a swallowing. *Food Hydrocolloids*, *25*(3), 325–332. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.06.010

Christakos, S. (2012). Recent advances in our understanding of 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of intestinal calcium absorption. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *523*(1), 73–76. https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.020

Clarkston, W. K., Pantano, M. M., Morley, J. E., Horowitz, M., Littlefield, J. M., & Burton, F. R. (1997). Evidence for the anorexia of aging: gastrointestinal transit and hunger in healthy elderly vs. young adults. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *272*(1), R243–R248.

Cleary, P. W., Sinnott, M. D., Hari, B., Bakalis, S., & Harrison, S. M. (2015). 10 - Modelling food digestion. In *Modeling Food Processing Operations* (pp. 255–305). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-284-6.00010-6

Croguennec, T., Mollé, D., Mehra, R., & Bouhallab, S. (2004). Spectroscopic characterization of heat-induced nonnative β-lactoglobulin monomers. *t ↑ IX↑ т ₵ II { д ₵ т IIд т 噤♂ ! t ↺г ⅓ ₵*, *Society*, *13*(5), 1340–1346. https://doi.org/10.1110/ps.03513204

Csapo, R., & Alegre, L. M. (2016). Effects of resistance training with moderate vs heavy loads on muscle mass and strength in the elderly: A meta-analysis: Strength training: high vs lighter loads. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *26*(9), 995–1006. https://doi.org/10.1111/sms.12536

Cumming, R. G. (1990). Calcium intake and bone mass: A quantitative review of the evidence. *Calcified Tissue International*, *47*(4), 194–201. https://doi.org/10.1007/BF02555919

Cuthbertson, D. (2004). Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *The FASEB Journal*. https://doi.org/10.1096/fj.04-2640fje

Dalgleish, D. G., & Corredig, M. (2012). The Structure of the Casein Micelle of Milk and Its Changes During Processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, *3*(1), 449–467. https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101214

Dangin, M., Boirie, Y., Garcia-Rodenas, C., Gachon, P., Fauquant, J., Callier, P., … Beaufrère, B. (2001). The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *280*(2), E340-348.

Dangin, M., Boirie, Y., Guillet, C., & Beaufrère, B. (2002). Influence of the protein digestion rate on protein turnover in young and elderly subjects. *The Journal of Nutrition*, *132*(10), 3228S–3233S.

Dardevet, D., Rémond, D., Peyron, M.-A., Papet, I., Savary-Auzeloux, I., & Mosoni, L. (2012). Muscle Wasting and Resistance of Muscle Anabolism: The "Anabolic Threshold Concept" for Adapted Nutritional Strategies during Sarcopenia. *The Scientific World Journal*, *2012*, 1–6. https://doi.org/10.1100/2012/269531

Dawson-Hughes, B., Dallal, G. E., Krall, E. A., Sadowski, L., Sahyoun, N., & Tannenbaum, S. (1990). A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine*, *323*(13), 878–883. https://doi.org/10.1056/NEJM199009273231305

de Kruif, C. G., Huppertz, T., Urban, V. S., & Petukhov, A. V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, *171–172*(Supplement C), 36–52. https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.01.002

De Souza Genaro, P., & Martini, L. A. (2010). Effect of protein intake on bone and muscle mass in the elderly: Nutrition Reviews©, Vol. 68, No. 10. *Nutrition Reviews*, *68*(10), 616–623. https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00321.x

Deglaire, A., & Moughan, P. J. (2012). Animal models for determining amino acid digestibility in humans – a review. *British Journal of Nutrition*, *108*(S2), S273–S281. https://doi.org/10.1017/S0007114512002346

Devezeaux de Lavergne, M., van de Velde, F., van Boekel, M. A. J. S., & Stieger, M. (2015). Dynamic texture perception and oral processing of semi-solid food gels: Part 2: Impact of breakdown behaviour on bolus properties and dynamic texture perception. *Food Hydrocolloids*, *49*, 61–72. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.037

Devries, M., & Phillips, S. M. (2015). Supplemental protein in support of muscle mass and health: advantage whey: whey, body composition, and muscle mass. *Journal of Food Science*, *80*(S1), A8–A15.

Di Francesco, V., Zamboni, M., Dioli, A., Zoico, E., Mazzali, G., Omizzolo, F., … Bosello, O. (2006). Delayed Postprandial Gastric Emptying and Impaired Gallbladder Contraction Together With Elevated Cholecystokinin and Peptide YY Serum Levels Sustain Satiety and Inhibit Hunger in Healthy Elderly Persons. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, *60*, 1581–1585. https://doi.org/10.1093/gerona/60.12.1581

Dideriksen, K. J., Reitelseder, S., Petersen, S. G., Hjort, M., Helmark, I. C., Kjaer, M., & Holm, L. (2011). Stimulation of muscle protein synthesis by whey and caseinate ingestion after resistance exercise in elderly individuals: Milk proteins and resistance exercise. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, *21*(6), e372–e383. https://doi.org/10.1111/j.1600-0838.2011.01318.x

Dodds, M. W. J., Johnson, D. A., & Yeh, C.-K. (2005). Health benefits of saliva: a review. *Journal of Dentistry*, *33*(3), 223–233. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.009

Doets, E. L., & Kremer, S. (2016). The silver sensory experience – A review of senior consumers' food perception, liking and intake. *Food Quality and Preference*, *48*, 316–332. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.08.010

Doherty, T. J. (2003). Invited Review: Aging and sarcopenia. *Journal of Applied Physiology*, *95*(4), 1717–1727. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00347.2003

Domingues-Faria, C., Vasson, M.-P., Goncalves-Mendes, N., Boirie, Y., & Walrand, S. (2016). Skeletal muscle regeneration and impact of aging and nutrition. *Ageing Research Reviews*, *26*, 22–36. https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.12.004

Drago, S. R., Panouillé, M., Saint-Eve, A., Neyraud, E., Feron, G., & Souchon, I. (2011). Relationships between saliva and food bolus properties from model dairy products. *Food Hydrocolloids*, *25*(4), 659–667. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.07.024

Dressman, J. B., Berardi, R. R., Dermentzoglou, L. C., Russell, T. L., Schmaltz, S. P., Barnett, J. L., & Jarvenpaa, K. M. (1993). Upper Gastrointestinal pH in Seventy-Nine Healthy, Elderly, North American Men and Women. *Pharmaceutical Research*, *10*(2), 187–196. https://doi.org/10.1023/A:1018970323716

Dupont, D. (2016). In Vitro Digestion Models. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21091-3

Dupont, D., & Mackie, A. R. (2015). Static and dynamic in vitro digestion models to study protein stability in the gastrointestinal tract. *Drug Discovery Today: Disease Models*, *17–18*(Supplement C), 23–27. https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2016.06.002

Egger, L., Ménard, O., Baumann, C., Duerr, D., Schlegel, P., Stoll, P., … Portmann, R. (2017). Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic in vitro digestion systems with in vivo data. *Food Research International*. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.049

Engelen, L., Fontijn-Tekamp, A., & Bilt, A. van der. (2005). The influence of product and oral characteristics on swallowing. *Archives of Oral Biology*, *50*(8), 739–746. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2005.01.004

Etcheverry, P., Grusak, M. A., & Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317

European Parliament. (2013). Regulation of the European Parliament and of the Council (EU) No 609/2013 of 12 June 2013. *Official Journal of the European Union*, *181*(35).

Fang, X., Rioux, L.-E., Labrie, S., & Turgeon, S. L. (2016). Commercial cheeses with different texture have different disintegration and protein/peptide release rates during simulated in vitro digestion. *International Dairy Journal*, *56*, 169–178. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.01.023

Fardet, A., Dupont, D., Rioux, L.-E., & Turgeon, S. L. (2018). Influence of food structure on dairy protein, lipid and calcium bioavailability: A narrative review of evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–24. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1435503

Farkye, N. Y. (2004). Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, *57*(2–3), 91–98. https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00146.x

Feldman, M., Cryer, B., McArthur, K. E., Huet, B. A., & Lee, E. (1996). Effects of aging and gastritis on gastric acid and pepsin secretion in humans: a prospective study. *Gastroenterology*, *110*(4), 1043–1052.

Fenton, T. R., Lyon, A. W., Eliasziw, M., Tough, S. C., & Hanley, D. A. (2009). Phosphate decreases urine calcium and increases calcium balance: A meta-analysis of the osteoporosis acid-ash diet hypothesis. *Nutrition Journal*, *8*, 41. https://doi.org/10.1186/1475-2891-8-41

Ferry, M. (2008). Bases nutritionnelles pour un vieillissement réussi. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, *43*(2), 90–96.

Ferry, M. (2010). Nutrition, vieillissement et santé. *Gérontologie et société*, *33 / 134*(3), 123–132. https://doi.org/10.3917/gs.134.0123

Feskanich, D., Meyer, H. E., Fung, T. T., Bischoff-Ferrari, H. A., & Willett, W. C. (2017). Milk and other dairy foods and risk of hip fracture in men and women. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. https://doi.org/10.1007/s00198-017-4285-8

Feunteun, S. L., Barbé, F., Rémond, D., Ménard, O., Gouar, Y. L., Dupont, D., & Laroche, B. (2014). Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig In Vivo Data. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(4), 1099–1113. https://doi.org/10.1007/s11947-013-1116-6

Folstein, M. F., Folstein, S. E., & McHugh, P. R. (1975). “Mini-mental state.” *Journal of Psychiatric Research*, *12*(3), 189–198. https://doi.org/10.1016/0022-3956(75)90026-6

Fontana, A., Polverino de Laureto, P., De Filippis, V., Scaramella, E., & Zambonin, M. (1997). Probing the partly folded states of proteins by limited proteolysis. *Folding and Design*, *2*(2), R17–R26. https://doi.org/10.1016/S1359-0278(97)00010-2

Forge, V., Wijesinha, R. T., Balbach, J., Brew, K., Robinson, C. V., Redfield, C., & Dobson, C. M. (1999). Rapid collapse and slow structural reorganisation during the refolding of bovine α-lactalbumin11Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology*, *288*(4), 673–688. https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2687

Foster, K. D., Woda, A., & Peyron, M. A. (2006). Effect of Texture of Plastic and Elastic Model Foods on the Parameters of Mastication. *Journal of Neurophysiology*, *95*(6), 3469–3479. https://doi.org/10.1152/jn.01003.2005

Fox, J., Muenchen, R., & Putler, D. (2018). RcmdrMisc: R Commander Miscellaneous Functions (Version 1.0-8). Retrieved from https://CRAN.R-project.org/package=RcmdrMisc

Gainsborough, N., Maskrey, V. L., Nelson, M. L., Keating, J., Sherwood, R. A., Jackson, S. H., & Swift, C. G. (1993). The association of age with gastric emptying. *Age and Ageing*, *22*(1), 37–40.

Gaudichon, C. (2013). Les modèles humains. In *Structure des aliments et effets nutritionnels* (Quae, pp. 299–306).

Girgis, C. M., Baldock, P. A., & Downes, M. (2015). Vitamin D, muscle and bone: Integrating effects in development, aging and injury. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *410*, 3–10. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.03.020

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction. *Journal of Biological Chemistry*, *177*(2), 751–766.

Goss, S., Lemons, K., Kerstetter, J., & Bogner, R. (2007). Determination of calcium salt solubility with changes in pH and P CO2 , simulating varying gastrointestinal environments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *59*(11), 1485–1492.

Goss, S., Prushko, J., & Bogner, R. (2010). Factors affecting calcium precipitation during neutralisation in a simulated intestinal environment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *99*(10), 4183–4191.

Goss, S., Rafferty, P., Prushko, J., Gorman, E., Taub, M., & Bogner, R. (2008). Exploration of intestinal calcium precipitation as a barrier to absorption at high calcium doses. *Pharmaceutical Research*, *25*(12), 2760–2768.

Grunert, K. G., & Wills, J. M. (2007). A review of European research on consumer response to nutrition information on food labels. *Journal of Public Health*, *15*(5), 385–399. https://doi.org/10.1007/s10389-007-0101-9

Guerin, S., Ramonet, Y., LeCloarec, J., Meunier-Salaün, M. C., Bourguet, P., & Malbert, C. H. (2001). Changes in intragastric meal distribution are better predictors of gastric emptying rate in conscious pigs than are meal viscosity or dietary fibre concentration. *British Journal of Nutrition*, *85*(3), 343–350. https://doi.org/10.1079/BJN2000271

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, *30*(11), 591–600. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001

Gui, J.-C., Brašić, J. R., Liu, X.-D., Gong, G.-Y., Zhang, G.-M., Liu, C.-J., & Gao, G.-Q. (2012). Bone mineral density in postmenopausal Chinese women treated with calcium fortification in soymilk and cow's milk. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, *23*(5), 1563–1570. https://doi.org/10.1007/s00198-012-1895-z

Guillet, C. (2004). Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans. *The FASEB Journal*. https://doi.org/10.1096/fj.03-1341fje

Guilloteau, P., Zabielski, R., Hammon, H. M., & Metges, C. C. (2010). Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? *Nutrition Research Reviews*, *23*(01), 4–22. https://doi.org/10.1017/S0954422410000077

Guimarães-Ferreira, L., Cholewa, J. M., Naimo, M. A., Zhi, X. I. A., Magagnin, D., Dal Ponte de Sá, R. B., … Zanchi, N. E. (2014). Synergistic effects of resistance training and protein intake: Practical aspects. *Nutrition*, *30*(10), 1097–1103. https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.12.017

Gunasekaran, S., & Ak, M. M. (2002). *Cheese Rheology and Texture*. CRC Press.

Guo, M. R., Fox, P. F., Flynn, A., & Kindstedt, P. S. (1995). Susceptibility of β-Lactoglobulin and Sodium Caseinate to Proteolysis by Pepsin and Trypsin. *Journal of Dairy Science*, *78*(11), 2336–2344. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76860-6

Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Dalgleish, D., & Singh, H. (2013). The breakdown properties of heat-set whey protein emulsion gels in the human mouth. *Food Hydrocolloids*, *33*(2), 215–224. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.008

Guo, Q., Ye, A., Lad, M., Ferrua, M., Dalgleish, D., & Singh, H. (2015). Disintegration kinetics of food gels during gastric digestion and its role on gastric emptying: an in vitro analysis. *Food & Function*, *6*(3), 756–764. https://doi.org/10.1039/C4FO00700J

Guyomarc'h, F., Famelart, M.-H., Henry, G., Gulzar, M., Leonil, J., Hamon, P., … Croguennec, T. (2015). Current ways to modify the structure of whey proteins for specific functionalities—a review. *Dairy Science & Technology*, *95*(6), 795–814. https://doi.org/10.1007/s13594-014-0190-5

Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J., & Morgan, L. M. (2003). Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition*, *89*(2), 239–248. https://doi.org/10.1079/BJN2002760

Ham, D. J., Caldow, M. K., Lynch, G. S., & Koopman, R. (2014). Leucine as a treatment for muscle wasting: A critical review. *Clinical Nutrition*, *33*(6), 937–945. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.09.016

Hansen, M., Sandström, B., Jensen, M., & Sørensen, S. S. (1997). Casein Phosphopeptides Improve Zinc and Calcium Absorption from Rice-Based but not from Whole-Grain Infant Cereal. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *24*(1), 56.

Hansen, M., Sandström, B., Jensen, M., & Sørensen, S. S. (1997). Effect of Casein Phosphopeptides on Zinc and Calcium Absorption from Bread Meals. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *11*(3), 143–149. https://doi.org/10.1016/S0946-672X(97)80041-7

Hatch, J. P., Shinkai, R. S. A., Sakai, S., Rugh, J. D., & Paunovich, E. D. (2001). Determinants of masticatory performance in dentate adults. *Archives of Oral Biology*, *46*(7), 641–648. https://doi.org/10.1016/S0003-9969(01)00023-1

Hayakawa, F., Kazami, Y., Ishihara, S., Nakao, S., Nakauma, M., Funami, T., … Kohyama, K. (2014). Characterization of eating difficulty by sensory evaluation of hydrocolloid gels. *Food Hydrocolloids*, *38*, 95–103. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.007

Haynes, W. M. (2014). *Handbook of Chemistry and Physics* (95th ed.). CRC Press. Retrieved from https://books.google.fr/books?id=bNDMBQAAQBAJ

Heaney, R. P. (2000). Dietary protein and phosphorus do not affect calcium absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *72*(3), 758–761. https://doi.org/10.1093/ajcn/72.3.758

Heaney, R. P., Recker, R. R., & Saville, P. D. (1977). Calcium balance and calcium requirements in middle-aged women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *30*(10), 1603–1611. https://doi.org/10.1093/ajcn/30.10.1603

Heaney, R. P., Recker, R. R., Stegman, M. R., & Moy, A. J. (1989). Calcium absorption in women: Relationships to Calcium intake, Estrogen status, and age. *Journal of Bone and Mineral Research*, *4*(4), 469–475. https://doi.org/10.1002/jbmr.5650040404

Heaney, R., Recker, R., & Weaver, C. (1990). Absorbability of calcium sources: the limited role of solubility. *Calcified Tissue International*, *46*(5), 300–304.

Heaney, R., Smith, K., Recker, R., & Hinders, S. (1989). Meal effects on calcium absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *49*(2), 372–376.

Heinzerling, C. I., Stieger, M., Bult, J. H., & Smit, G. (2011). Individually Modified Saliva Delivery Changes the Perceived Intensity of Saltiness and Sourness. *Chemosensory Perception, Chemosensory Perception*, *4*, *4*(4, 4), 145, 145–153. https://doi.org/10.1007/s12078-011-9099-z, 10.1007/s12078-011-9099-z

Hellmig, S., Von Schöning, F., Gadow, C., Katsoulis, S., Hedderich, J., Fölsch, U. R., & Stüber, E. (2006). Gastric emptying time of fluids and solids in healthy subjects determined by 13C breath tests:

influence of age, sex and body mass index. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *21*(12), 1832–1838. https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04449.x

Holt, C., & Horne, D. (1996). The hairy casein micelle: Evolution of the concept and its implications for dairy processing. *Neth. Milk Dairy J.*, *50*, 1–27.

Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., Heiberger, R. M., Schuetzenmeister, A., Scheibe, S., & Hothorn, M. T. (2016). Package 'multcomp.' *Simultaneous Inference in General Parametric Models. Project for Statistical Computing, Vienna, Austria*. Retrieved from http://ftp5.gwdg.de/pub/misc/cran/web/packages/multcomp/multcomp.pdf

Hsu, H., Vavak, D., Satterlee, L., & Miller, G. (1977). A multienzyme technique for estimating protein digestibility. *Journal of Food Science*, *42*(5), 1269–1273.

Husebye, E., & Engedal, K. (1992). The patterns of motility are maintained in the human small intestine throughout the process of aging. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *27*(5), 397–404.

Husson, F., Josse, J., Le, S., & Mazet, J. (2017). FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining (Version 1.39). Retrieved from https://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR

Husson, F., Josse, J., Le, S., Mazet, J., & Husson, M. F. (2017). Package 'FactoMineR.' Retrieved from http://mirror.its.sfu.ca/mirror/CRAN/web/packages/FactoMineR/FactoMineR.pdf

Ikebe, K., Nokubi, T., Morii, K., Kashiwagi, J., & Furuya, M. (2005). Association of bite force with ageing and occlusal support in older adults. *Journal of Dentistry*, *33*(2), 131–137. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.09.002

International Dairy Federation, & International Standards Organisation. (2007). Milk and milk products–Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium contents–Method by flame atomic absorption spectrometric method. Joint Standard IDF 119/ISO 8070.

Jaime-Fonseca, M. R., Gouseti, O., Fryer, P. J., Wickham, M. S. J., & Bakalis, S. (2016). Digestion of starch in a dynamic small intestinal model. *European Journal of Nutrition*, *55*(8), 2377–2388. https://doi.org/10.1007/s00394-015-1044-5

Jalabert-Malbos, M.-L., Mishellany-Dutour, A., Woda, A., & Peyron, M.-A. (2007). Particle size distribution in the food bolus after mastication of natural foods. *Food Quality and Preference*, *18*(5), 803–812. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2007.01.010

Jiang, Z., Jiang, C., Chen, B., Koh, C. S., Yong, J.-H., Park, D.-H., … Lee, Y.-L. (2013). Age-associated changes in pancreatic exocrine secretion of the isolated perfused rat pancreas. *Laboratory Animal Research*, *29*(1), 19–26. https://doi.org/10.5625/lar.2013.29.1.19

Jin, Y., Yu, Y., Qi, Y., Wang, F., Yan, J., & Zou, H. (2016). Peptide profiling and the bioactivity character of yogurt in the simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Proteomics*, *141*, 24–46. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.010

Josse, A. R., Tang, J. E., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2010). Body composition and strength changes in women with milk and resistance exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, *42*(6), 1122–1130.

Jourdan, M., Deutz, N. E. P., Cynober, L., & Aussel, C. (2011). Features, Causes and Consequences of Splanchnic Sequestration of Amino Acid in Old Rats. *PLOS ONE*, *6*(11), e27002. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027002

Kaiser, M. J., Bauer, J. M., Rämsch, C., Uter, W., Guigoz, Y., Cederholm, T., … for the Mini Nutritional Assessment International Group. (2010). Frequency of Malnutrition in Older Adults: A Multinational Perspective Using the Mini Nutritional Assessment. *Journal of the American Geriatrics Society*, *58*(9), 1734–1738. https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2010.03016.x

Katelaris, P. H., Seow, F., Lin, B. P., Napoli, J., Ngu, M. C., & Jones, D. B. (1993). Effect of age, Helicobacter pylori infection, and gastritis with atrophy on serum gastrin and gastric acid secretion in healthy men. *Gut*, *34*(8), 1032–1037.

Katsanos, C. S. (2006). A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, *291*(2), E381–E387. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00488.2005

Katsanos, C. S., Chinkes, D. L., Paddon-Jones, D., Zhang, X., Aarsland, A., & Wolfe, R. R. (2008). Whey protein ingestion in elderly persons results in greater muscle protein accrual than ingestion of its constituent essential amino acid content. *Nutrition Research*, *28*(10), 651–658. https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.06.007

Katsanos, C. S., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Aarsland, A., & Wolfe, R. R. (2006). A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *291*(2), E381-387. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00488.2005

Kesse-Guyot, E., Bertrais, S., Péneau, S., Estaquio, C., Dauchet, L., Vergnaud, A.-C., … Bellisle, F. (2009). Dietary patterns and their sociodemographic and behavioural correlates in French middle-aged adults from the SU.VI.MAX cohort. *European Journal of Clinical Nutrition*, *63*(4), 521–528. https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602978

Kim, D. A., Cornec, M., & Narsimhan, G. (2005). Effect of thermal treatment on interfacial properties of β-lactoglobulin. *Journal of Colloid and Interface Science*, *285*(1), 100–109. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.10.044

Kim, S. B., Ki, K. S., Khan, M. A., Lee, W. S., Lee, H. J., Ahn, B. S., & Kim, H. S. (2007). Peptic and tryptic hydrolysis of native and heated whey protein to reduce its antigenicity. *Journal of Dairy Science*, *90*(9), 4043–4050. https://doi.org/10.3168/jds.2007-0169

Kimura, Y., Nomura, M., Sawada, Y., Muraoka, N., Kohno, N., & Ito, S. (2006). Evaluation of the effects of mastication and swallowing on gastric motility using electrogastrography. *The Journal of Medical Investigation*, *53*(3,4), 229–237. https://doi.org/10.2152/jmi.53.229

Kitabatake, N., & Kinekawa, Y.-I. (1998). Digestibility of Bovine Milk Whey Protein and β-Lactoglobulin in Vitro and in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(12), 4917–4923. https://doi.org/10.1021/jf9710903

Kong, F., & Singh, R. p. (2008a). A Model Stomach System to Investigate Disintegration Kinetics of Solid Foods during Gastric Digestion. *Journal of Food Science*, *73*(5), E202–E210. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00745.x

Kong, F., & Singh, R. p. (2008b). Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *Journal of Food Science*, *73*(5), R67–R80. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x

Konietschke, F., Placzek, M., Schaarschmidt, F., & Hothorn, L. (2015). nparcomp: an R software package for nonparametric multiple comparisons and simultaneous confidence intervals. *Journal of Statistical Software*, *64*, 1–17.

Koopman, R., & van Loon, L. J. C. (2009). Aging, exercise, and muscle protein metabolism. *Journal of Applied Physiology*, *106*(6), 2040–2048. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.91551.2008

Koopman, R., Wagenmakers, A. J. M., Manders, R. J. F., Zorenc, A. H. G., Senden, J. M. G., Gorselink, M., … van Loon, L. J. C. (2005). Combined ingestion of protein and free leucine with carbohydrate increases postexercise muscle protein synthesis in vivo in male subjects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *288*(4), E645–E653. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00413.2004

Kopf-Bolanz, K. A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R., & Egger, L. (2014). Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. *International Dairy Journal*, *35*(2), 130–138. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.012

Kopic, S., & Geibel, J. P. (2013). Gastric acid, calcium absorption, and their impact on bone health. *Physiological Reviews*, *93*(1), 189–268.

Korhonen, H., Pihlanto-Leppälä, A., Rantamäki, P., & Tupasela, T. (1998). The functional and biological properties of whey proteins : prospects for the development of functional foods. Retrieved from http://www.doria.fi/handle/10024/15212

Koshihara, M., Masuyama, R., Uehara, M., & Suzuki, K. (2004). Effect of dietary calcium: Phosphorus ratio on bone mineralization and intestinal calcium absorption in ovariectomized rats. *Biofactors*, *22*(1–4), 39–42.

Kostov, B., Bécue-Bertaut, M., & Husson, F. (2013). Multiple Factor Analysis for contingency tables in the FactoMineR package. *The R Journal*, *5*(1), 29–38.

Kremer, S. (2006). *Food perception and food liking with age*. Wageningen.

Kremer, S., Bult, J. H. F., Mojet, J., & Kroeze, J. H. A. (2007). Food Perception with Age and Its Relationship to Pleasantness. *Chemical Senses*, *32*(6), 591–602. https://doi.org/10.1093/chemse/bjm028

Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., & Christensen, H. B. (2014). lmerTest: tests for random and fixed effects for linear mixed effect models (lmer objects of lme4 package), v. 2.0–25. *See Http://Cran. r-Project. Org/Package= LmerTest*.

Kuznetsova, A., Brockhoff, P., Haubo, R., & Christensen, B. (2015). lmerTest: Tests for random and fixed effects for linear mixed effect models (lmer objects of lme4 package). Retrieved from https://cran.r-project.org/web/packages/lmerTest/index.html

Lacroix, M., Bon, C., Bos, C., Léonil, J., Benamouzig, R., Luengo, C., … Gaudichon, C. (2008). Ultra high temperature treatment, but not pasteurization, affects the postprandial kinetics of milk proteins in humans. *The Journal of Nutrition*, *138*(12), 2342–2347. https://doi.org/10.3945/jn.108.096990

Lacroix, M., Bos, C., Léonil, J., Airinei, G., Luengo, C., Daré, S., … others. (2006). Compared with casein or total milk protein, digestion of milk soluble proteins is too rapid to sustain the anabolic postprandial amino acid requirement. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(5), 1070–1079.

Laguna, L., Hetherington, M. M., Chen, J., Artigas, G., & Sarkar, A. (2016). Measuring eating capability, liking and difficulty perception of older adults: A textural consideration. *Food Quality and Preference*, *53*, 47–56. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.05.013

Laguna, L., Mingioni, M., Maitre, I., Vanwymelbeke, V., Pirttijärvi, T., Artigas, M. g., … Sarkar, A. (2016). Perception of Difficulties Encountered in Eating Process from European Elderlies' Perspective. *Journal of Texture Studies*, *47*(4), 342–352. https://doi.org/10.1111/jtxs.12192

Laguna, L., & Sarkar, A. (2016). Influence of mixed gel structuring with different degrees of matrix inhomogeneity on oral residence time. *Food Hydrocolloids*, *61*, 286–299. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.014

Laguna, L., Sarkar, A., Artigas, G., & Chen, J. (2015). A quantitative assessment of the eating capability in the elderly individuals. *Physiology & Behavior*, *147*, 274–281. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.04.052

Lamberg-Allardt, C., & Kemi, V. (2017). Interaction Between Calcium and Phosphorus and the Relationship to Bone Health. In *Clinical Aspects of Natural and Added Phosphorus in Foods* (pp. 145–157). Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6566-3_10

Lambers, T. T., Bosch, W. G. van den, & Jong, S. de. (2013). Fast and Slow Proteins: Modulation of the Gastric Behavior of Whey and Casein In Vitro. *Food Digestion*, *4*(1), 1–6. https://doi.org/10.1007/s13228-012-0028-7

Langsetmo, L., Shikany, J. M., Cawthon, P. M., Cauley, J. A., Taylor, B. C., Vo, T. N., … Ensrud, K. E. (2017). The Association Between Protein Intake by Source and Osteoporotic Fracture in Older Men: A Prospective Cohort Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, *32*(3), 592–600. https://doi.org/10.1002/jbmr.3058

Lassauzay, C., Peyron, M.-A., Albuisson, E., Dransfield, E., & Woda, A. (2000). Variability of the masticatory process during chewing of elastic model foods. *European Journal of Oral Sciences*, *108*(6), 484–492. https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2000.00866.x

Laugier, R., Bernard, J. P., Berthezene, P., & Dupuy, P. (1991). Changes in pancreatic exocrine secretion with age: pancreatic exocrine secretion does decrease in the elderly. *Digestion*, *50*(3–4), 202–211.

Le Feunteun, S., Barbé, F., Rémond, D., Ménard, O., Le Gouar, Y., Dupont, D., & Laroche, B. (2014). Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig In Vivo Data. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(4), 1099–1113. https://doi.org/10.1007/s11947-013-1116-6

Lee, A. W., & Cho, S. S. (2015). Association between phosphorus intake and bone health in the NHANES population. *Nutrition Journal*, *14*, 28. https://doi.org/10.1186/s12937-015-0017-0

Lee, Y. S., Noguchi, T., & Naito, H. (1983). Intestinal absorption of calcium in rats given diets containing casein or amino acid mixture: the role of casein phosphopeptides. *British Journal of Nutrition*, *49*(1), 67–76. https://doi.org/10.1079/BJN19830012

Levi, C. S., & Lesmes, U. (2014). Bi-compartmental elderly or adult dynamic digestion models applied to interrogate protein digestibility. *Food & Function*, *5*(10), 2402–2409.

Lisak, K., Toro-Sierra, J., Kulozik, U., Božanić, R., & Cheison, S. C. (2013). Chymotrypsin selectively digests β-lactoglobulin in whey protein isolate away from enzyme optimal conditions: potential for native α-lactalbumin purification. *The Journal of Dairy Research*, *80*(1), 14–20. https://doi.org/10.1017/S0022029912000416

Litten-Brown, J. C., Corson, A. M., & Clarke, L. (2010). Porcine models for the metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. *Animal*, *4*(6), 899–920. https://doi.org/10.1017/S1751731110000200

Lloyd, T., Martel, J. K., Rollings, N., Andon, M. B., Kulin, H., Demers, L. M., … Chinchilli, V. M. (1996). The effect of calcium supplementation and Tanner stage on bone density, content and area in teenage women. *Osteoporosis International*, *6*(4), 276–283.

Lorieau, L., Le Roux, L., Gaucheron, F., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D., & Floury, J. (2018). Bioaccessibility of four calcium sources in different whey-based dairy matrices assessed by in vitro digestion. *Food Chemistry*, *245*, 454–462. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.108

Lucy, C. A., MacDonald, A. M., & Gulcev, M. D. (2008). Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, *1184*(1), 81–105. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.114

Luiking, Y. C., Abrahamse, E., Ludwig, T., Boirie, Y., & Verlaan, S. (2016). Protein type and caloric density of protein supplements modulate postprandial amino acid profile through changes in gastrointestinal behaviour: A randomized trial. *Clinical Nutrition*, *35*(1), 48–58. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.02.013

Luiking, Y. C., Deutz, N. E., Memelink, R. G., Verlaan, S., & Wolfe, R. R. (2014). Postprandial muscle protein synthesis is higher after a high whey protein, leucine-enriched supplement than after a dairy-like product in healthy older people: a randomized controlled trial. *Nutrition Journal*, *13*(1), 9.

Lundin, L., Golding, M., & Wooster, T. J. (2008). Understanding food structure and function in developing food for appetite control. *Nutrition & Dietetics*, *65*, S79–S85. https://doi.org/10.1111/j.1747-0080.2008.00266.x

Luo, Q., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2015). Digestion of protein and protein gels in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(1), 161–168. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.087

Luo, Q., Borst, J. W., Westphal, A. H., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2017). Pepsin diffusivity in whey protein gels and its effect on gastric digestion. *Food Hydrocolloids*, *66*, 318–325. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.046

Macierzanka, A., Boettger, F., Lansonneur, L., Groizard, R., Jean, A.-S., Rigby, N. M., … Mackie, A. R. (2012). The effect of gel structure on the kinetics of simulated gastrointestinal digestion of bovine beta-lactoglobulin. *Food Chemistry*, *134*(4), 2156–2163. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.018

Madsen, J. L., & Graff, J. (2004). Effects of ageing on gastrointestinal motor function. *Age and Ageing*, *33*(2), 154–159. https://doi.org/10.1093/ageing/afh040

Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Xavier Malcata, F. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, *40*(10), 1197–1211. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005

Mahé, S., Roos, N., Benamouzig, R., Davin, L., Luengo, C., Gagnon, L., … Tomé, D. (1996). Gastrojejunal kinetics and the digestion of [15N]beta-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *63*(4), 546–552.

Maitre, I., Van Wymelbeke, V., Amand, M., Vigneau, E., Issanchou, S., & Sulmont-Rossé, C. (2014). Food pickiness in the elderly: Relationship with dependency and malnutrition. *Food Quality and Preference*, *32*(Part B), 145–151. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.04.003

Mak, T. N., & Caldeira, S. (2014). The Role of Nutrition in Active and Healthy Ageing. Retrieved from http://alimentation-sante.org/wp-content/uploads/2014/11/lbna26666enn.pdf

Marciani, L., Gowland, P. A., Spiller, R. C., Manoj, P., Moore, R. J., Young, P., & Fillery-Travis, A. J. (2001). Effect of meal viscosity and nutrients on satiety, intragastric dilution, and emptying assessed by MRI. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *280*(6), G1227–G1233. https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.6.G1227

Marsset-Baglieri, A., Fromentin, G., Airinei, G., Pedersen, C., Léonil, J., Piedcoq, J., … Gaudichon, C. (2014). Milk protein fractions moderately extend the duration of satiety compared with carbohydrates independently of their digestive kinetics in overweight subjects. *British Journal of Nutrition*, *112*(4), 557–564.

Martin, V., Ratel, S., Siracusa, J., Le Ruyet, P., Savary-Auzeloux, I., Combaret, L., … Dardevet, D. (2013). Whey Proteins Are More Efficient than Casein in the Recovery of Muscle Functional Properties following a Casting Induced Muscle Atrophy. *PLoS ONE*, *8*(9), e75408. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075408

Masuyama, R., Nakaya, Y., Katsumata, S., Kajita, Y., Uehara, M., Tanaka, S., … Suzuki, K. (2003). Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, *18*(7), 1217–1226.

Mat, D. J. L., Cattenoz, T., Souchon, I., Michon, C., & Le Feunteun, S. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*, *239*(Supplement C), 268–275. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.115

Matković, V., Kostial, K., Simonović, I., Buzina, R., Brodarec, A., & Nordin, B. E. (1979). Bone status and fracture rates in two regions of Yugoslavia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *32*(3), 540–549.

Mekmene, O., Le Graët, Y., & Gaucheron, F. (2010). Theoretical model for calculating ionic equilibria in milk as a function of pH: comparison to experiment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(7), 4440–4447.

Ménard, O., & Dupont, D. (2014). Atouts et limites des modèles de digestion gastro-intestinale : de l'in vitro à l'in vivo. *Innovations Agronomiques*, *36*, 27–41.

Ménard, O., Picque, D., & Dupont, D. (2015). The DIDGI® System. In *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 73–81). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_8

Miller, B. F. (2007). Human muscle protein synthesis after physical activity and feeding. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, *35*(2), 50–55.

Mills, E. N. C., Sancho, A. I., Rigby, N. M., Jenkins, J. A., & Mackie, A. R. (2009). Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Molecular Nutrition & Food Research*, *53*(8), 963–969. https://doi.org/10.1002/mnfr.200800236

Minekus, M. (2015). The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). In *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 37–46). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_5

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., … Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, *5*(6), 1113.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., … others. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food–an international consensus. *Food & Function*, *5*(6), 1113–1124.

Mioche, L., Bourdiol, P., & Peyron, M.-A. (2004). Influence of age on mastication: effects on eating behaviour. *Nutrition Research Reviews*, *17*(01), 43. https://doi.org/10.1079/NRR200375

Mishellany-Dutour, A., Renaud, J., Peyron, M.-A., Rimek, F., & Woda, A. (2008). Is the goal of mastication reached in young dentates, aged dentates and aged denture wearers? *British Journal of Nutrition*, *99*(1), 121–128. https://doi.org/10.1017/S0007114507795284

Mitchell, W. K., Wilkinson, D. J., Phillips, B. E., Lund, J. N., Smith, K., & Atherton, P. J. (2016). Human Skeletal Muscle Protein Metabolism Responses to Amino Acid Nutrition. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, *7*(4), 828S–838S. https://doi.org/10.3945/an.115.011650

Mondino, A., Bongiovanni, G., Fumero, S., & Rossi, L. (1972). An improved method of plasma deproteination with sulphosalicylic acid for determining amino acids and related compounds. *Journal of Chromatography A*, *74*(2), 255–263. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)86154-9

Morell, P., Fiszman, S., Llorca, E., & Hernando, I. (2017). Designing added-protein yogurts: Relationship between in vitro digestion behavior and structure. *Food Hydrocolloids*, *72*, 27–34. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.026

Mosca, A. C., & Chen, J. (2017). Food-saliva interactions: Mechanisms and implications. *Trends in Food Science & Technology*, *66*(Supplement C), 125–134. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.005

Müller, F., Naharro, M., & Carlsson, G. E. (2007). What are the prevalence and incidence of tooth loss in the adult and elderly population in Europe? *Clinical Oral Implants Research*, *18*, 2–14. https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01459.x

Narva, M., Kärkkäinen, M., Poussa, T., Lamberg-Allardt, C., & Korpela, R. (2003). Caseinphosphopeptides in Milk and Fermented Milk Do Not Affect Calcium Metabolism Acutely in Postmenopausal Women. *Journal of the American College of Nutrition*, *22*(1), 88–93. https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719280

Nguyen, T. T. P., Bhandari, B., Cichero, J., & Prakash, S. (2015). Gastrointestinal digestion of dairy and soy proteins in infant formulas: An in vitro study. *Food Research International*, *76*, 348–358. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.030

Nicklas, T., O'Neil, C., & Fulgoni, V. (2009). The role of dairy in meeting the recommendations for shortfall nutrients in the American diet. *Journal of the American College of Nutrition*, *28 Suppl 1*, 73S–81S.

Nicolai, T., Britten, M., & Schmitt, C. (2011). β-Lactoglobulin and WPI aggregates: Formation, structure and applications. *Food Hydrocolloids*, *25*(8), 1945–1962. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.006

Nilsson, M., Holst, J. J., & Björck, I. M. (2007). Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(4), 996–1004.

Nilsson, M., Stenberg, M., Frid, A. H., Holst, J. J., & Björck, I. M. (2004). Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *80*(5), 1246–1253.

Noguchi, K., Gel, Y., Brunner, E., & Konietschke, F. (2012). nparLD: an R software package for the nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. *Journal of Statistical Software*.

O'Donovan, D., Hausken, T., Lei, Y., Russo, A., Keogh, J., Horowitz, M., & Jones, K. L. (2005). Effect of Aging on Transpyloric Flow, Gastric Emptying, and Intragastric Distribution In Healthy Humans—Impact on Glycemia. *Digestive Diseases and Sciences*, *50*(4), 671–676. https://doi.org/10.1007/s10620-005-2555-3

Oldfield, D. J., Singh, H., Taylor, M. W., & Pearce, K. N. (2000). Heat-induced interactions of β-lactoglobulin and α-lactalbumin with the casein micelle in pH-adjusted skim milk. *International Dairy Journal*, *10*(8), 509–518. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00087-X

O'Loughlin, I. B., Murray, B. A., Kelly, P. M., FitzGerald, R. J., & Brodkorb, A. (2012). Enzymatic Hydrolysis of Heat-Induced Aggregates of Whey Protein Isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(19), 4895–4904. https://doi.org/10.1021/jf205213n

Panouillé, M., Saint-Eve, A., & Souchon., I. (2016). Instrumental methods for bolus characterization during oral processing to understand food perceptions. *Current Opinion in Food Science*. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.05.002

Park, H. S., Kim, D.-K., Lee, S. Y., & Park, K.-H. (2017). The effect of aging on mastication and swallowing parameters according to the hardness change of solid food. *Journal of Texture Studies*, n/a-n/a. https://doi.org/10.1111/jtxs.12249

Patterson, J. K., Lei, X. G., & Miller, D. D. (2008). The Pig as an Experimental Model for Elucidating the Mechanisms Governing Dietary Influence on Mineral Absorption. *Experimental Biology and Medicine*, *233*(6), 651–664. https://doi.org/10.3181/0709-MR-262

Pennings, B., Boirie, Y., Senden, J. M. G., Gijsen, A. P., Kuipers, H., & van Loon, L. J. C. (2011). Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *93*(5), 997–1005. https://doi.org/10.3945/ajcn.110.008102

Pennings, B., Groen, B. B. L., van Dijk, J.-W., de Lange, A., Kiskini, A., Kuklinski, M., … van Loon, L. J. C. (2013). Minced beef is more rapidly digested and absorbed than beef steak, resulting in greater postprandial protein retention in older men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *98*(1), 121–128. https://doi.org/10.3945/ajcn.112.051201

Pennings, B., Groen, B., de Lange, A., Gijsen, A. P., Zorenc, A. H., Senden, J. M. G., & van Loon, L. J. C. (2012). Amino acid absorption and subsequent muscle protein accretion following graded intakes of whey protein in elderly men. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, *302*(8), E992–E999. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00517.2011

Pera, P., Bucca, C., Borro, P., Bernocco, C., De Lillo, A., & Carossa, S. (2002). Influence of Mastication on Gastric Emptying. *Journal of Dental Research*, *81*(3), 179–181. https://doi.org/10.1177/0810179

Perales, S., Barberá, R., Lagarda, J., & Farré, R. (2005). Bioavailability of calcium from milk-based formulas and fruit juices containing milk and cereals estimated by in vitro methods (solubility, dialyzability,

and uptake and transport by Caco-2 cells). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(9), 3721–3726.

Peram, M. R., Loveday, S. M., Ye, A., & Singh, H. (2013). In vitro gastric digestion of heat-induced aggregates of β-lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, *96*(1), 63–74. https://doi.org/10.3168/jds.2012-5896

Percival, R. S., Challacombe, S., & Marsh, P. D. (1994). Flow Rates of Resting Whole and Stimulated Parotid Saliva in Relation to Age and Gender. *Journal of Dental Research*, *73*(8), 1416–1420. https://doi.org/10.1177/00220345940730080401

Pérez, A. V., Picotto, G., Carpentieri, A. R., Rivoira, M. A., Peralta López, M. E., & Tolosa de Talamoni, N. G. (2008). Minireview on Regulation of Intestinal Calcium Absorption. *Digestion*, *77*(1), 22–34. https://doi.org/10.1159/000116623

Permyakov, E. A., & Berliner, L. J. (2000). α-Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*, *473*(3), 269–274. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01546-5

Peyron, M., Lassauzay, C., & Woda, A. (2002). Effects of increased hardness on jaw movement and muscle activity during chewing of visco-elastic model foods. *Experimental Brain Research*, *142*(1), 41–51. https://doi.org/10.1007/s00221-001-0916-5

Peyron, M.-A., & Woda, A. (2016). An update about artificial mastication. *Current Opinion in Food Science*, *9*(Supplement C), 21–28. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.03.006

Peyron, M.-A., Woda, A., Bourdiol, P., & Hennequin, M. (2017). Age-related changes in mastication. *Journal of Oral Rehabilitation*, *44*(4), 299–312. https://doi.org/10.1111/joor.12478

Picariello, G., Miralles, B., Mamone, G., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Addeo, F., & Ferranti, P. (2015). Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, *59*(5), 948–956. https://doi.org/10.1002/mnfr.201400856

Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., EISPACK, Heisterkamp, S., & Van Willigen, B. (2017). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models (Version 3.1-131). Retrieved from https://cran.r-project.org/web/packages/nlme/index.html

Poinot, P., Arvisenet, G., Grua-Priol, J., Fillonneau, C., & Prost, C. (2009). Use of an artificial mouth to study bread aroma. *Food Research International*, *42*(5), 717–726. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.020

Pointillart, A., & Guéguen, L. (2003). Intérêts nutritionels du calcium et du phosphore des produits laitiers. In *Minéraux et produits laitiers* (TEC & DOC).

Pons, M., & Fiszman, S. M. (1996). Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. *Journal of Texture Studies*, *27*(6), 597–624.

Preedy, V. (Ed.). (2015). *Calcium chemistry, analysis, function and effects*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Qi, X. L., Brownlow, S., Holt, C., & Sellers, P. (1995). Thermal denaturation of β-lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1248*(1), 43–49. https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)00225-6

Rahaman, T., Vasiljevic, T., & Ramchandran, L. (2016). Effect of processing on conformational changes of food proteins related to allergenicity. *Trends in Food Science & Technology*, *49*(Supplement C), 24–34. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.001

Raynaud, A., Revel-Delhom, C., Haslé, M. A., Lecocq, J.-M., Lefèvre, M. M.-P., Lurcel, J., … Perette, M. M.-A. (2007). Stratégie de prise en charge en cas de dénutrition protéino-énergétique chez la personne âgée Management strategies in cases of protein-energy malnutrition in the elderly. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, *21*, 120–133.

Recker, R. (1985). Calcium absorption and achlorhydria. *New England Journal of Medicine*, *313*(2), 70–73.

Reddy, I. M., Kella, N. K. D., & Kinsella, J. E. (1988). Structural and conformational basis of the resistance of .beta.-lactoglobulin to peptic and chymotryptic digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *36*(4), 737–741. https://doi.org/10.1021/jf00082a015

Reinwald, S., Weaver, C., & Kester, J. (2008). The health benefits of calcium citrate malate: a review of the supporting science. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 54, pp. 219–346). Elsevier.

Rémond, D., Machebeuf, M., Yven, C., Buffière, C., Mioche, L., Mosoni, L., & Mirand, P. P. (2007). Postprandial whole-body protein metabolism after a meat meal is influenced by chewing efficiency in elderly subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *85*(5), 1286–1292.

Rémond, D., Shahar, D. R., Gille, D., Pinto, P., Kachal, J., Peyron, M.-A., … others. (2015). Understanding the gastrointestinal tract of the elderly to develop dietary solutions that prevent malnutrition. *Oncotarget*, *6*(16), 13858.

Repoux, M., Labouré, H., Courcoux, P., Andriot, I., Sémon, É., Yven, C., … Guichard, E. (2012). Combined effect of cheese characteristics and food oral processing on *in vivo* aroma release: *In vivo* aroma release during cheeses oral processing. *Flavour and Fragrance Journal*, *27*(6), 414–423. https://doi.org/10.1002/ffj.3110

Rieu, I., Balage, M., Sornet, C., Giraudet, C., Pujos, E., Grizard, J., … Dardevet, D. (2006). Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia: Leucine and protein metabolism in the elderly. *The Journal of Physiology*, *575*(1), 305–315. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.110742

Rinaldi, L., Gauthier, S. F., Britten, M., & Turgeon, S. L. (2014). In vitro gastrointestinal digestion of liquid and semi-liquid dairy matrixes. *LWT - Food Science and Technology*, *57*(1), 99–105. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.01.026

Rinaldi, L., Rioux, L.-E., Britten, M., & Turgeon, S. L. (2015). In vitro bioaccessibility of peptides and amino acids from yogurt made with starch, pectin, or β-glucan. *International Dairy Journal*, *46*(Supplement C), 39–45. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.09.005

Roininen, K., Fillion, L., Kilcast, D., & Lähteenmäki, L. (2004). Exploring difficult textural properties of fruit and vegetables for the elderly in Finland and the United Kingdom. *Food Quality and Preference*, *15*(6), 517–530. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2003.11.003

Rondanelli, M., Faliva, M., Monteferrario, F., Peroni, G., Repaci, E., Allieri, F., & Perna, S. (2015). Novel Insights on Nutrient Management of Sarcopenia in Elderly. *BioMed Research International*, *2015*, 1–14. https://doi.org/10.1155/2015/524948

Rossi, F. (2015). Calcium digestibility using in vivo, in vitro and ex vivo techniques. In V. Preedy (Ed.), *Calcium chemistry, analysis, function and effects* (pp. 164–178). Cambridge: Royal Society of Chemistry.

Rowan, A. M., Moughan, P. J., Wilson, M. N., Maher, K., & Tasman-Jones, C. (1994). Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *British Journal of Nutrition*, *71*(1), 29–42. https://doi.org/10.1079/BJN19940108

Sah, B. N. P., McAinch, A. J., & Vasiljevic, T. (2016). Modulation of bovine whey protein digestion in gastrointestinal tract: A comprehensive review. *International Dairy Journal*, *62*(Supplement C), 10–18. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.07.003

Sahni, S., Mangano, K. M., Tucker, K. L., Kiel, D. P., Casey, V. A., & Hannan, M. T. (2014). Protective association of milk intake on the risk of hip fracture: results from the Framingham Original Cohort. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *29*(8), 1756–1762. https://doi.org/10.1002/jbmr.2219

Sanchón, J., Fernández-Tomé, S., Miralles, B., Hernández-Ledesma, B., Tomé, D., Gaudichon, C., & Recio, I. (2018). Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation. *Food Chemistry*, *239*(Supplement C), 486–494. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.134

Savarino, V., Mela, G. S., Scalabrini, P., Sumberaz, A., Fera, G., & Celle, G. (1988). 24-hour study of intragastric acidity in duodenal ulcer patients and normal subjects using continuous intraluminal pH-metry. *Digestive Diseases and Sciences*, *33*(9), 1077–1080. https://doi.org/10.1007/BF01535781

Sayd, T., Peyron, M.-A., Viet, S., & Sante-Lhoutellier, V. (2016). Impact of mastication on the gastric digestion of frankfurters : case of elderly. In *62. International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST)* (p. np). Bangkok, Thailand. Retrieved from https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01602806

Schulze, K. (2006). Imaging and modelling of digestion in the stomach and the duodenum. *Neurogastroenterology & Motility*, *18*(3), 172–183. https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2006.00759.x

Schwartz, C., Vandenberghe-Descamps, M., Sulmont-Rossé, C., Tournier, C., & Feron, G. (2017). Behavioral and physiological determinants of food choice and consumption at sensitive periods of the life span, a focus on infants and elderly. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.008

Schwartz, J. B., Kane, L., & Bikle, D. (2016). Response of Vitamin D Concentration to Vitamin D_3 Administration in Older Adults without Sun Exposure: A Randomized Double-Blind Trial. *Journal of the American Geriatrics Society*, *64*(1), 65–72. https://doi.org/10.1111/jgs.13774

Schweiger, U., Warnhoff, M., Pahl, J., & Pirke, K. M. (1986). Effects of carbohydrate and protein meals on plasma large neutral amino acids, glucose, and insulin plasma levels of anorectic patients. *Metabolism*, *35*(10), 938–943.

Scopacasa, F., Wishart, J. M., Horowitz, M., Morris, H. A., & Need, A. G. (2004). Relation between calcium absorption and serum calcitriol in normal men: evidence for age-related intestinal resistance to calcitriol. *European Journal of Clinical Nutrition*, *58*(2), 264–269. https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601777

Seal, C. J., & Heaton, F. W. (1983). Chemical factors affecting the intestinal absorption of zinc in vitro and in vivo. *British Journal of Nutrition*, *50*(02), 317–324.

Serra-Prat, M., Mans, E., Palomera, E., & Clavé, P. (2013). Gastrointestinal peptides, gastrointestinal motility, and anorexia of aging in frail elderly persons. *Neurogastroenterology & Motility*, *25*(4), 291-e245. https://doi.org/10.1111/nmo.12055

Shani-Levi, C., Alvito, P., Andrés, A., Assunção, R., Barberá, R., Blanquet-Diot, S., … Lesmes, U. (2017). Extending in vitro digestion models to specific human populations: Perspectives, practical tools and bio-relevant information. *Special Issues from the 29th EFFoST International Conference*, *60*(Supplement C), 52–63. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.10.017

Siebrecht, S. (2013). Magnesium Bisglycinate as safe form for minerals supplementation in human nutrition. *International Journal of Orthomolecular and Related Medicine*.

Simonian, H. P., Vo, L., Doma, S., Fisher, R. S., & Parkman, H. P. (2005). Regional Postprandial Differences in pH Within the Stomach and Gastroesophageal Junction. *Digestive Diseases and Sciences*, *50*(12), 2276–2285. https://doi.org/10.1007/s10620-005-3048-0

Singh, H., Ye, A., & Ferrua, M. J. (2015). Aspects of food structures in the digestive tract. *Current Opinion in Food Science*, *3*(Supplement C), 85–93. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.06.007

Singh, T. K., Øiseth, S. K., Lundin, L., & Day, L. (2014). Influence of heat and shear induced protein aggregation on the in vitro digestion rate of whey proteins. *Food Funct.*, *5*(11), 2686–2698. https://doi.org/10.1039/C4FO00454J

So, C., & Pierluissi, E. (2012). Attitudes and expectations regarding exercise in the hospital of hospitalized older adults: a qualitative study. *Journal of the American Geriatrics Society*, *60*(4), 713–718. https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2012.03900.x

Stokes, J. R., Boehm, M. W., & Baier, S. K. (2013). Oral processing, texture and mouthfeel: From rheology to tribology and beyond. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *18*(4), 349–359. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2013.04.010

Sulmont-Rossé, C., Maitre, I., & Issanchou, S. (2010). Âge, perception chimiosensorielle et préférences alimentaires. *Gérontologie et société*, *134*(3), 87. https://doi.org/10.3917/gs.134.0087

Sulmont-Rossé, C., Van Wymelbeke, V., & Maitre, I. (2016). Perception des odeurs et préférences alimentaires chez la population âgée : quel impact sur la prise alimentaire et le statut nutritionnel ? *Nutritions & Endocrinologie*, *14*(77), 92–95.

Tagliaferri, C., Wittrant, Y., Davicco, M.-J., Walrand, S., & Coxam, V. (2015). Muscle and bone, two interconnected tissues. *Ageing Research Reviews*, *21*, 55–70. https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.03.002

Tai, V., Leung, W., Grey, A., Reid, I. R., & Bolland, M. J. (2015). Calcium intake and bone mineral density: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, *351*, h4183. https://doi.org/10.1136/bmj.h4183

Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H., & Sawada, J. (2003). Comparative Study of in Vitro Digestibility of Food Proteins and Effect of Preheating on the Digestion. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *26*(7), 969–973. https://doi.org/10.1248/bpb.26.969

Tang, J. E., Moore, D. R., Kujbida, G. W., Tarnopolsky, M. A., & Phillips, S. M. (2009). Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and

following resistance exercise in young men. *Journal of Applied Physiology*, *107*(3), 987–992. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00076.2009

Tarrega, A., Quiles, A., Morell, P., Fiszman, S., & Hernando, I. (2017). Importance of consumer perceptions in fiber-enriched food products. A case study with sponge cakes. *Food & Function*, *8*(2), 574–583. https://doi.org/10.1039/C6FO01022A

Teucher, B., Majsak-Newman, G., Dainty, J. R., McDonagh, D., FitzGerald, R. J., & Fairweather-Tait, S. J. (2006). Calcium absorption is not increased by caseinophosphopeptides. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *84*(1), 162–166. https://doi.org/10.1093/ajcn/84.1.162

Theobald, H. E. (2005). Dietary calcium and health. *Nutrition Bulletin*, *30*(3), 237–277.

Thévenot, J., Cauty, C., Legland, D., Dupont, D., & Floury, J. (2017). Pepsin diffusion in dairy gels depends on casein concentration and microstructure. *Food Chemistry*, *223*(Supplement C), 54–61. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.014

Thomas, D. K., Quinn, M. A., Saunders, D. H., & Greig, C. A. (2016). Protein Supplementation Does Not Significantly Augment the Effects of Resistance Exercise Training in Older Adults: A Systematic Review. *Journal of the American Medical Directors Association*, *17*(10), 959.e1-959.e9. https://doi.org/10.1016/j.jamda.2016.07.002

Thomas, R. C. (1976). The effect of carbon dioxide on the intracellular pH and buffering power of snail neurones. *The Journal of Physiology*, *255*(3), 715–735. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011305

Tieland, M., Dirks, M. L., van der Zwaluw, N., Verdijk, L. B., van de Rest, O., de Groot, L. C. P. G. M., & van Loon, L. J. C. (2012). Protein Supplementation Increases Muscle Mass Gain During Prolonged Resistance-Type Exercise Training in Frail Elderly People: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal of the American Medical Directors Association*, *13*(8), 713–719. https://doi.org/10.1016/j.jamda.2012.05.020

Tipton, K. D., Elliott, T. A., Cree, M. G., Aarsland, A. A., Sanford, A. P., & Wolfe, R. R. (2006). Stimulation of net muscle protein synthesis by whey protein ingestion before and after exercise. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, *292*(1), E71–E76. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00166.2006

Tipton, K. D., Rasmussen, B. B., Miller, S. L., Wolf, S. E., Owens-Stovall, S. K., Petrini, B. E., & Wolfe, R. R. (2001). Timing of amino acid-carbohydrate ingestion alters anabolic response of muscle to resistance exercise. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, *281*(2), E197–E206.

Tipton, K. D., & Wolfe, R. R. (2004). Protein and amino acids for athletes. *Journal of Sports Sciences*, *22*(1), 65–79. https://doi.org/10.1080/0264041031000140554

Tobey, N., Heizer, W., Yeh, R., Huang, T.-I., & Hoffner, C. (1985). Human Intestinal Brush Border Peptidases. *Gastroenterology*, *88*(4), 913–926. https://doi.org/10.1016/S0016-5085(85)80008-1

Toniazzo, M. P., Amorim, P. de S., Muniz, F. W. M. G., & Weidlich, P. (2017). Relationship of nutritional status and oral health in elderly: Systematic review with meta-analysis. *Clinical Nutrition*. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.03.014

Torigoe, T., Ito, K., Yamamoto, A., Kanki, A., Yasokawa, K., Tamada, T., & Yoshida, K. (2014). Age-Related Change of the Secretory Flow of Pancreatic Juice in the Main Pancreatic Duct: Evaluation With Cine-Dynamic MRCP Using Spatially Selective Inversion Recovery Pulse. *American Journal of Roentgenology*, *202*(5), 1022–1026. https://doi.org/10.2214/AJR.13.10852

Tournier, C., Sulmont-Rossé, C., Guichard, E., & Benkeblia (2007). Flavour perception: aroma, taste and texture interactions. Retrieved from http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2014017416

Tsuchita, H., Goto, T., Shimizu, T., Yonehara, Y., & Kuwata, T. (1996). Dietary Casein Phosphopeptides Prevent Bone Loss in Aged Ovariectomized Rats. *The Journal of Nutrition*, *126*(1), 86–93. https://doi.org/10.1093/jn/126.1.86

Urbain, J.-L. C., Siegel, J. A., Charkes, N. D., Maurer, A. H., Malmud, L. S., & Fisher, R. S. (1989). The two-component stomach: effects of meal particle size on fundal and antral emptying. *European Journal of Nuclear Medicine*, *15*(5), 254–259. https://doi.org/10.1007/BF00257543

U.S. Department of Agriculture/Economic Research Service. (2015, February). Nutrient availability data. Retrieved September 25, 2017, from https://www.ers.usda.gov/data-products/food-consumption-and-nutrient-intakes/food-consumption-and-nutrient-intakes/#Nutrient%20Intake%20Estimates

Vandenberghe-Descamps, M., Labouré, H., Prot, A., Septier, C., Tournier, C., Feron, G., & Sulmont-Rossé, C. (2016). Salivary flow decreases in healthy elderly people independently of dental status and drug intake: Salivary flow decreases in healthy elderly people. *Journal of Texture Studies*, n/a-n/a. https://doi.org/10.1111/jtxs.12191

Vandenberghe-Descamps, M., Labouré, H., Septier, C., Feron, G., & Sulmont-Rossé, C. (2017). Oral comfort: A new concept to understand elderly people's expectations in terms of food sensory characteristics. *Food Quality and Preference*. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.08.009

Vavrusova, M., & Skibsted, L. H. (2014). Calcium nutrition. Bioavailability and fortification. *LWT-Food Science and Technology*, *59*(2), 1198–1204.

Veldhorst, M. A., Nieuwenhuizen, A. G., Hochstenbach-Waelen, A., van Vught, A. J., Westerterp, K. R., Engelen, M. P., … Westerterp-Plantenga, M. S. (2009). Dose-dependent satiating effect of whey relative to casein or soy. *Physiology & Behavior*, *96*(4), 675–682.

Verheul, M., Roefs, S. P. F. M., & de Kruif, K. G. (1998). Kinetics of Heat-Induced Aggregation of β-Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(3), 896–903. https://doi.org/10.1021/jf970751t

Verreijen, A. M., Verlaan, S., Engberink, M. F., Swinkels, S., de Vogel-van den Bosch, J., & Weijs, P. J. (2015). A high whey protein-, leucine-, and vitamin D-enriched supplement preserves muscle mass during intentional weight loss in obese older adults: a double-blind randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, *101*(2), 279–286. https://doi.org/10.3945/ajcn.114.090290

Volpi, E., Kobayashi, H., Sheffield-Moore, M., Mittendorfer, B., & Wolfe, R. R. (2003). Essential amino acids are primarily responsible for the amino acid stimulation of muscle protein anabolism in healthy elderly adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *78*(2), 250–258.

Walls, A. W. G., & Steele, J. G. (2004). The relationship between oral health and nutrition in older people. *Mechanisms of Ageing and Development*, *125*(12), 853–857. https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.011

Wang, Z., Ichikawa, S., Kozu, H., Neves, M. A., Nakajima, M., Uemura, K., & Kobayashi, I. (2015). Direct observation and evaluation of cooked white and brown rice digestion by gastric digestion

simulator provided with peristaltic function. *Food Research International*, *71*(Supplement C), 16–22. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.002

Watanabe, Y., Tanimoto, M., Oba, N., Sanada, K., Miyachi, M., & Ishii, N. (2015). Effect of resistance training using bodyweight in the elderly: Comparison of resistance exercise movement between slow and normal speed movement: Exercise training using bodyweight in elderly. *Geriatrics & Gerontology International*, *15*(12), 1270–1277. https://doi.org/10.1111/ggi.12427

Welten, D. C., Kemper, H. C., Post, G. B., & van Staveren, W. A. (1995). A meta-analysis of the effect of calcium intake on bone mass in young and middle aged females and males. *The Journal of Nutrition*, *125*(11), 2802–2813.

Wiele, T. V. de, Abbeele, P. V. den, Ossieur, W., Possemiers, S., & Marzorati, M. (2015). The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). In *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 305–317). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_27

Winzenberg, T., Shaw, K., Fryer, J., & Jones, G. (2006). Effects of calcium supplementation on bone density in healthy children: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, *333*(7572), 775. https://doi.org/10.1136/bmj.38950.561400.55

Woda, A., Foster, K., Mishellany, A., & Peyron, M. A. (2006). Adaptation of healthy mastication to factors pertaining to the individual or to the food. *Physiology & Behavior*, *89*(1), 28–35. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.02.013

Woda, A., Mishellany, A., & Peyron, M.-A. (2006). The regulation of masticatory function and food bolus formation. *Journal of Oral Rehabilitation*, *33*(11), 840–849. https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2006.01626.x

Wu, L. C., & Kim, P. S. (1998). A specific hydrophobic core in the α-lactalbumin molten globule11Edited by P. E. Wright. *Journal of Molecular Biology*, *280*(1), 175–182. https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1825

Xu, Z., Tan, Z., Zhang, Q., Gui, Q., & Yang, Y. (2015). The effectiveness of leucine on muscle protein synthesis, lean body mass and leg lean mass accretion in older people: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, *113*(01), 25–34. https://doi.org/10.1017/S0007114514002475

Yokogoshi, H., & Wurtman, R. J. (1986). Meal composition and plasma amino acid ratios: effect of various proteins or carbohydrates, and of various protein concentrations. *Metabolism*, *35*(9), 837–842.

Yven, C., Bonnet, L., Cormier, D., Monier, S., & Mioche, L. (2006). Impaired mastication modifies the dynamics of bolus formation. *European Journal of Oral Sciences*, *114*(3), 184–190. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00348.x

Yven, C., Patarin, J., Magnin, A., Labouré, H., Repoux, M., Guichard, E., & Feron, G. (2012). Consequences of Individual Chewing Strategies on Bolus Rheological Properties at the Swallowing Threshold. *Journal of Texture Studies*, *43*(4), 309–318. https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2011.00340.x

Zhang, S., & Vardhanabhuti, B. (2014). Effect of initial protein concentration and pH on in vitro gastric digestion of heated whey proteins. *Food Chemistry*, *145*, 473–480. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.076

Zhao, J.-G., Zeng, X.-T., Wang, J., & Liu, L. (2017). Association Between Calcium or Vitamin D Supplementation and Fracture Incidence in Community-Dwelling Older Adults: A Systematic

Review and Meta-analysis. *JAMA*, *318*(24), 2466–2482. https://doi.org/10.1001/jama.2017.19344

Zhu, K., Kerr, D. A., Meng, X., Devine, A., Solah, V., Binns, C. W., & Prince, R. L. (2015). Two-Year Whey Protein Supplementation Did Not Enhance Muscle Mass and Physical Function in Well-Nourished Healthy Older Postmenopausal Women. *Journal of Nutrition*, *145*(11), 2520–2526. https://doi.org/10.3945/jn.115.218297

VII ANNEXES : LISTE DES COMMUNICATIONS

VII.1 PUBLICATIONS

- **Publications dans des revues à comité de lecture**

Lorieau, L., Le Roux, L., Gaucheron, F., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D., & Floury, J. (2018). Bioaccessibility of four calcium sources in different whey-based dairy matrices assessed by *in vitro* digestion. Food Chemistry, 245, 454–462. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.108

- **Publication en révision**

Lorieau, L., Halabi A., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D., & Floury, J. (in revision).Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino acid bioaccessiblity during *in vitro* digestion. Food Hydrocolloid.

- **Publication soumise**

Lorieau L., Septier C., Laguerre A., Le Roux L., Hazart E., Ligneul A., Famelart M-H., Dupont D., Floury J., Feron G., & Labouré H. (submitted). Bolus quality and food comfortability of model cheeses for the elderly as influenced by their texture. Food Research International

- **Publications en rédaction**

Lorieau, L., Le Gouar Y., Henry G., Mao T.T., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D., & Floury, J. (In redaction) Whey-based cheese provide more postprandial plasma leucine than casein-based cheese: a pig study. Target journal: Food Chemistry

Lorieau L., Septier C., Laguerre A., Le Roux L., Hazart E., Ligneul A., Dupont D., Floury J., Vigneau E., Hanafi M., Feron G., & Labouré H. (in redaction). The influence of oral health of the elderly on the bolus formation and food comfortability of model cheeses. Target journal: Food & Function

VII.2 COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS

- **Journée francophone, France, Montpelier, Décembre 2016**

Mesure de la bioaccessibilité du calcium en digestion *in vitro* : impact de la source calcique et de la structure (liquide ou gélifiée) d'une matrice alimentaire, contenant des protéines sériques.

Lucie Lorieau* (1), Linda Le Roux (1), Frédéric Gaucheron (1), Amandine Ligneul (2), Etienne Hazart (2), Didier Dupont (1), Juliane Floury (1)

(1) UMR 1253 Science et Technologie du Lait et de l'oeuf, INRA-Agrocampus-Ouest, Rennes,
(2) Recherche et Développement, Lactalis, Retiers, 3

Le calcium est un élément essentiel pour le développement et le maintien de la masse osseuse chez l'Homme. Pourtant, en France, seulement 40% des seniors ont un apport suffisant en calcium [1]. En moyenne, la biodisponibilité du calcium est de 35% et varie en fonction des sources de calcium [2] et de la composition de l'aliment. Ce protocole permet d'estimer la bioaccessibilité du calcium pouvant être absorbé par l'organisme.
Quatre sources de calcium (carbonate de calcium, citrate malate de calcium, bisglycinate de calcium et phosphate de calcium laitier contenant respectivement 40 %, 23 %, 13 % et 28 % de calcium) ont été ajoutées à 0,5% dans l'eau (contrôle), et dans deux matrices constituées de protéines sériques [20 % lipides +24% protéines dont 23 % protéines sériques], sous forme liquide ou gélifiée par traitement thermique. Les matrices ont été digérées en double en suivant le protocole harmonisé INFOGEST de digestion *in vitro* statique. Les concentrations en calcium sous forme soluble et ionique, ainsi que le pH, ont été mesurées au cours de la digestion. L'ensemble des cinétiques ont été analysées à l'aide d'un test non paramétrique en mesures répétées.
Dans les matrices alimentaires, la totalité du calcium est sous forme soluble et majoritairement sous forme ionique en phase gastrique à pH 3. Puis en début de phase intestinale, le calcium s'insolubilise. Le phosphate de calcium laitier s'insolubilise plus rapidement que les autres sources lors du passage en phase intestinale ($p<0,001$). Sa concentration en calcium soluble en est alors de 17+/-3%, et est supérieure à 60% pour les trois autres sources de calcium. Ensuite, durant la phase intestinale, le pourcentage de calcium sous forme soluble augmente pour le calcium de phosphate laitier dans les matrices protéiques, alors qu'il diminue pour les trois autres sources de calcium. La concentration en calcium ionique suit les mêmes cinétiques. De plus, la structure de la matrice protéique (gel ou liquide) n'a pas d'impact sur la bioaccessibilité des différentes sources de calcium ($p>0,1$).
Le pH gastro-intestinal joue un rôle majeur sur la solubilité du calcium avec des différences selon les sources utilisées. En revanche, la gélification de la matrice protéique (majoritairement constituée de protéines sériques) n'a pas eu d'impact sur la solubilité des calciums testés. Cette description de la bioaccessibilité des sources de calcium au cours du parcours digestif, présentant des variations de pH très importantes, permet d'apporter des éléments de compréhension aux différences de biodisponibilité du calcium en fonction du segment intestinal. Il serait nécessaire de pouvoir corréler ces bioaccessibilités mesurées aux biodisponibilités évaluées *in vivo*.
Références : [1] CREDOC, "Consommation de compléments alimentaires en France, Exploitation de l'enquête INCA2 par le CREDOC."
[2] Bonjour et al., "Minerals and Vitamins in Bone Health."

MESURE DE LA BIOACCESSIBILITÉ DU CALCIUM EN DIGESTION IN VITRO

Impact de la source calcique et de la structure (liquide ou gélifiée) d'une matrice laitière, contenant des protéines sériques.

LUCIE LORIEAU[1], LINDA LE ROUX[1], FRÉDÉRIC GAUCHERON[1], DIDIER DUPONT[1], AMANDINE LIGNEUL[2], ETIENNE HAZART[2], JULIANE FLOURY[1]

Contexte

Le calcium est un élément essentiel pour le développement et le maintien de la masse osseuse chez l'Homme. Pourtant, en France, seulement 40% des séniors ont un apport suffisant en calcium.

L'absorption du calcium a majoritairement lieu dans la première partie de l'intestin. Cependant, cette absorption requiert une solubilisation préalable du calcium en phase gastrique. En moyenne, la biodisponibilité du calcium est de 35% et varie en fonction des sources de calcium et de la composition de l'aliment.

Objectif

Mieux comprendre l'absorption intestinale du calcium en estimant la bioaccessibilité du calcium :

- Selon sa forme chimique *(4 sources testées)*
- Selon la structure de la matrice laitière *(liquide vs solide)*

Méthodes

4 sources de calcium

Carbonate de calcium : $CaCO_3$ (39,9% Ca)

Calcium Citrate Malate : CCM (23,2% Ca)

Bisglycinate de calcium (13% Ca)

Calcium de phosphate laitier (28,5% Ca)

500mg de calcium pour 100g de produit

Matrices liquide et solide

Eau à pH 6,3 (ajusté avec HCl)

Matrices solide et liquide pH = 6,3

- 20% lipides
- 24% protéines (majoritairement sériques)
- 0,6% NaCl
- Glucono Delta Lactone pour ajuster le pH

Eau

Liquide

Gel thermocoagulé

Digestion *in vitro* : protocole INFOGEST

Phase Orale
1:1 de produit (broyé) et de fluide salivaire
2min pH 7

Phase Gastrique
1:1 avec du fluide gastrique + pepsine
2h pH 3

Phase Intestinale
1:1 avec du fluide intestinal + pancréatine + bile
2h pH 7

Minekus *et al.* 2014

Bioaccessibilité du calcium

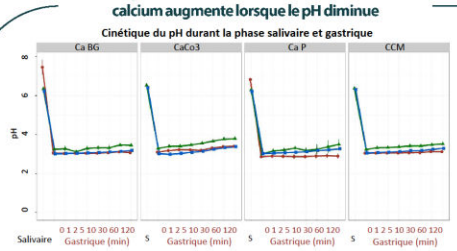
Calcium soluble : dosage en spectrométrie d'absorption atomique après ultrafiltration des digestas (3kDa)

Calcium sous forme ionique : dosage direct dans les digestas via une électrode à calcium ionique

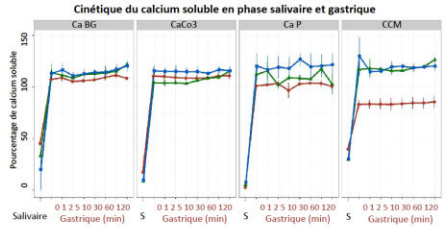
Résultats

Quelle que soit la source de calcium, la solubilité du calcium augmente lorsque le pH diminue

Cinétique du pH durant la phase salivaire et gastrique



Cinétique du calcium soluble en phase salivaire et gastrique

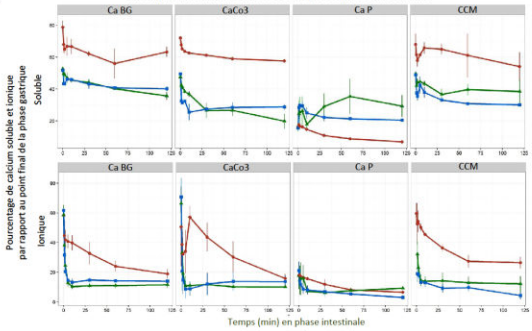


Type de matrice — Eau — Gel — Liquide

- Le pH évolue de manière similaire, pour les 4 sources de calcium en phase salivaire et gastrique
- Toutes les sources de calcium, excepté le CCM dans l'eau, sont entièrement solubilisées en début de phase gastrique, à pH 3.

En phase intestinale à pH 7, le calcium s'insolubilise. La cinétique d'insolubilisation varie en fonction des sources de calcium

Cinétique du calcium soluble et ionique en phase intestinale



Type de matrice — Eau — Gel — Liquide

- La structure de la matrice protéique (gel ou liquide) n'a pas d'impact sur la bioaccessibilité des différentes sources de calcium ($p>0,1$).
- En début de phase intestinale :
  - Quelle que soit la source de calcium, l'augmentation du pH entraine une forte insolubilisation du calcium, causée par sa réassociation avec d'autres molécules présentes dans les digestas
  - Le phosphate de calcium laitier s'insolubilise plus rapidement que les autres ($p<0,001$) car le phosphate et le calcium ont une forte affinité à pH 7
- Durant la phase intestinale :
  - Le pourcentage de Ca soluble augmente pour le calcium de phosphate laitier dans les matrices protéiques, alors qu'il diminue pour les trois autres sources de calcium
  - La concentration en calcium ionique suit les mêmes cinétiques quelle que soit la source de calcium.

Conclusion

- La gélification de la matrice protéique n'a pas d'impact sur la solubilité des sources de calciums testées par rapport à la matrice liquide
- En phase gastrique, la totalité du calcium est solubilisée. Puis en phase intestinale, le calcium passe rapidement sous forme insoluble par réassociation moléculaire
- La forte affinité entre le calcium et le phosphate entraîne un comportement particulier pour le phosphate de calcium laitier en phase intestinale

- Cette étude de la bioaccessibilité du calcium permet d'apporter des éléments de compréhension par rapport à l'utilisation de différentes sources de calcium en agro-alimentaire. Ces résultats de bioaccessibilité *in vitro* seront prochainement corrélés à des études de biodisponibilité du calcium par digestion *in vivo* sur modèle porc.

STLO
[1] UMR 1253 INRA / AGROCAMPUS OUEST STLO • Science et technologie du lait et de l'œuf
65 rue de Saint-Brieuc 35042 Rennes Cedex www6.rennes.inra.fr/stlo
[2] Lactalis Nutrition Santé

Projet : ANR AlimaSSenS

Journées Francophones de Nutrition
Montpellier, le 1 décembre 2016

- **International Conference on Food Digestion, France, Rennes, Avril 2017**

In vitro bioaccessibility of calcium in whey protein matrices depends on calcium sources, gastro-intestinal pH but not on the matrix structure

L. Lorieau (1)*, L. Le Roux (1), E. Hazart (2), A. Ligneul (2), D. Dupont (1), F. Gaucheron (1), J. Floury (1)

(1) INRA - Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, INRA Agrocampus, France ;

(2) Lactalis, France

Calcium is an essential mineral for the organism. Numerous calcium sources are available to enrich food products, but only calcium carbonate has been well studied. Calcium bioaccessibility depends mainly on solubility. Furthermore *in vitro* digestion allows to determine bioaccessibility and to identify the key parameters affecting it. The purpose of this study was to focus on the influence of gastro-intestinal pH variation, the effect of the food matrix structure and the calcium sources on calcium bioaccessibility.

Four calcium sources (calcium carbonate, calcium citrate malate, dairy calcium phosphate and calcium bisglycinate) were added at 0.5% (w/w) in water (control), and in whey protein matrices liquid or heat-induced gel. These matrices were digested under static conditions in duplicate, with the harmonized INFOGEST protocol (Minekus et al. 2014). Soluble and ionic calcium, and pH kinetics were followed during *in vitro* digestion. The kinetics were analyzed by nonparametric tests with repeated measurements.

Results showed that all calcium sources were soluble in the matrices, mainly as ionic form (Ca2+), during the gastric phase at pH 3, but that calcium insolubilisation occurred in the intestinal compartment at pH 7. Dairy calcium phosphate insolubilisation was quicker and more intense than for other calcium sources; its concentration of soluble calcium is 17+/-3%, instead of more than 60% for the three other calcium sources ($p<0.001$). In addition, gelation of whey proteins had not impact on calcium bioaccessibility (liquid vs. heat-induced gel: $p>0.1$).

These results provide new insights to better understand bioavailability differences between calcium sources and matrices. Further *in vivo* digestion experiments on a pig model will be achieved in order to confirm bioaccessibility and to measure the bioavailability of those different sources of calcium. It will finally provide a relation between the results from *in vitro* and *in vivo* models of digestion.

Acknowledgments: ANR-14-CE20-0003 AlimaSSenS (France)

IN VITRO DIGESTION OF FOUR CALCIUM SOURCES IN DIFFERENT DAIRY MATRICES

LUCIE LORIEAU[1], LINDA LE ROUX[1], FRÉDÉRIC GAUCHERON[1], DIDIER DUPONT[1], ETIENNE HAZART[2], JULIANE FLOURY[1]

Context

Calcium is a biologically relevant element to human health. This mineral is essential for bone formation. It is proved that eating food supplemented with calcium, allows the decrease of osteoporosis. The absorption of calcium occurs mostly in the first part of the small intestine, but it also requires a calcium solubilisation in the gastric phase (Recker, 1985).
Numerous calcium forms are available to supplement food, but their fractional absorption varies between 25% to 44% (Reinwald et al, 2008; Heaney et al, 1990).

Objective → **Comparing the bioaccessibility of 4 calcium forms in liquid and solid matrices to better understand the calcium absorption**

Methods

4 Calcium Sources

Calcium Carbonate: $CaCO_3$ (39,9% Ca)

Calcium Citrate Malate : CCM (23,2 % Ca)

Calcium Bisglycinate (13% Ca)

Dairy calcium phosphate (28,5% Ca)

→ 500mg of calcium per 100g of product

Liquids and Solid Matrices

Water at pH = 6,3 (pH adjust with HCL)

Liquid and solid matrices at pH = 6,3
- 20% lipid
- 24 % protein (mainly whey protein)
- 0,6% NaCl
- Glucono Delta Lactone to adjust pH

Water

Liquid

Heat-induced gel

in vitro digestion : INFOGEST protocol

Oral phase
Mix 1:1 with Simulated Salivary Fluid (SSF)
2 min, pH 7

Gastric Phase
Mix 1:1 with Simulated Gastric Fluid (SGF)
Pepsin (2000 U/mL)
2h, pH 3

Intestinal Phase
Mix 1:1 with Simulated Intestinal Fluid (SIF)
Enzymes
Pancreatin (based on trypsin 100 U/mL)
Bile (10mM)
2h, pH 7

Calcium Bioaccessibility

Soluble Calcium : Ultrafiltred Calcium (3kDa)
→ Atomic absorption spectroscopy

Ionized Cacium in whole digestas
→ Calcium-ion-selective electrode

Results

Calcium solubility increases as pH decreases, similarly whatever the source of calcium tested

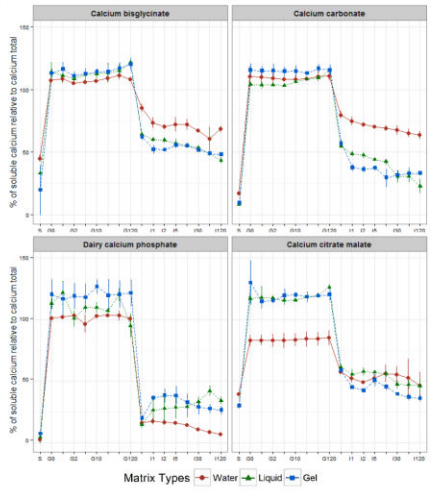


Figure 1 : Ratio of soluble to total calcium in different matrices during *in vitro* digestion.
S : Salivary phase G : Gastric phase I: Intestinal phase

- All calcium forms, except CCM in water, are solubilized at the beginning of the gastric phase, where the pH is 3.
- The solubility of calcium is the same in protein matrices and in water, proving that interaction phenomena between calcium and whey proteins are low.

In intestinal phase, only the behaviour of dairy calcium phosphate is different

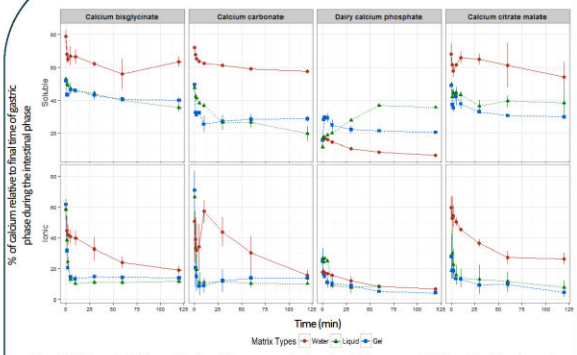


Figure 2 : Ratio of soluble and ionic calcium concentrations to calcium concentration of gastric phase at final time in different matrices during the intestinal phase.

- The decrease of calcium concentration is due to the reassociation of calcium with different molecules when the pH increases in the intestinal phase.
- Dairy calcium phosphate reassociation is faster and higher than for the other calcium sources, because of a ionic interaction between calcium and phosphate at pH 7
- Ionic calcium is the absorbable form in the intestine. Measurement of ionic calcium is difficult and this method is less robust than the soluble calcium measurement,

Conclusion

- All calcium are soluble in the gastric compartment where pH is about 3.
- In the intestinal compartment, the calcium reassociation is fast because of the rapid increase of the pH up to 7, but this trend depends on the calcium form.
- Dairy calcium phosphate has a particular behaviour in the intestinal compartment due to strong ionic interactions between calcium and phosphate.
- The gelification of whey protein matrix has no effect on calcium bioaccessibility compared to the liquid whey protein matrix.
- Finally, *in vitro* digestion does not reflect the entire complexity of *in vivo* digestion. It could be interesting to perform *in vivo* digestion in order to compare calcium bioaccessibility and bioavailability with these results.

STLO
1 UMR 1253 INRA / AGROCAMPUS OUEST STLO • Science et technologie du lait et de l'œuf, 65 rue de Saint-Brieuc 35042 Rennes Cedex www6.rennes.inra.fr/stlo
2 Lactalis Nutrition Santé

Sources :
- Recker, R. 1985. « Calcium Absorption and Achlorhydria ». New England Journal of Medicine 313 (2): 70-73.
- Reinwald S, Connie M. W, Kester J. 2008. « The Health Benefits of Calcium Citrate Malate: A Review of the Supporting Science ». In Advances in Food and Nutrition Research, 54:219-346. Elsevier.
- Heaney, R., Recker R. et Connie M. W. 1990. « Absorbability of calcium sources: the limited role of solubility ». Calcified Tissue International 46 (5): 300-304.

Does oral health affect food comfortability and bolus properties during consumption of dairy products in elderly population?

L. Lorieau (1), C. Septier (2), A. Prot (2), L. Le Roux (1), E. Hazart (3), A. Ligneul (3), M. Hanafi (4), D. Dupont (1), J. Floury (1), H. Labouré (5), G. Feron (2)

(1) INRA – UMR STLO Science & Technology of Milk & Eggs, INRA Agrocampus, France ;

(2) INRA - UMR CSGA Centre for Taste and Feeding Behavior, France ;

(3) Lactalis, France, (4) ONIRIS, France (5) Agrosup Dijon, France

The elderly population is growing increasingly. In 2030, 1/3 of the population will be over 60 years old. However this population has specific nutritional needs and often, oral impairments such as loss of tooth and/or decrease of salivary flow. Therefore it is necessary to develop foods adapted for the elderly, in terms of organoleptic properties and nutritional composition. In this context, the purpose of this work is to study the impact of oral impairments of elderly persons on food comfortability and bolus properties during the consumption of dairy products.

76 elderly persons (ages 66 to 88, 42 women and 34 men), with or without oral health problems in terms of dental and/or salivary status were recruited. Four dairy products with identical composition but different textures (soft, hard, pasty and dry) were studied. Food comfortability of the four dairy products was assessed by means of a questionnaire based on bolus formation, pain, and texture and flavor perception. The time and number of cycle required to form the bolus for elderly person consuming each product was measured (video) as rheological properties (compression test) and saliva incorporated (dry extract) in each bolus. Statistical analysis (correlation, ANOVA, multiblock analysis) of the data were performed.

Despite a wide array of texture, dairy products were comfortable for the elderly whatever their oral health. According to the food comfortability questionnaire, neither bolus formation, nor pain or organoleptic properties were significantly affected by the dental and/or salivary status of the elderly. The stimulated saliva flow was positively correlated with the amount of saliva incorporated in the bolus. Moreover dental status was correlated with the hardness of the bolus and results suggested that the dental status slightly affected the texture perception.

Finally, food comfortability of our products was not affected by the oral health contrary to the bolus properties.

Acknowledgments: ANR-14-CE20-0003 AlimaSSenS (France)

Does oral health affect food comfortability and bolus properties during consumption of dairy products in elderly population?

L. LORIEAU[1]*, C. SEPTIER[2], A. PROT[2], L. LE ROUX[1], E. HAZART[3], A. LIGNEUL[3], D. DUPONT[1], J. FLOURY[1], H. LABOURÉ[4], G. FERON[2]

Context & Objectives

Ageing

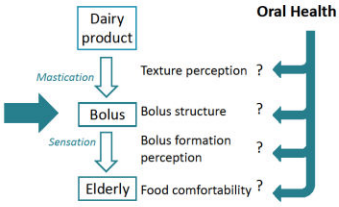
Oral Health Deterioration :

- ↘ muscle strength (Mioche *et al.* 2004)
- ↘ 38 % salivary flow (Vandenberghe-Descamps *et al*, 2016)
- ↗ toothless (Peyron et al. 2013)

Sensory losses : taste, olfactory, somatosensory

➡ Specific nutritional needs like protein and calcium which can be provided by dairy products

Food comfortability for elderlies, is described by the perception of bolus formation, the pain caused while eating, the texture and the flavour of food. Food is considered as comfortable when the bolus is easy to form, when there is no pain while eating, and when the texture is soft, not dry, nor doughy.
(Vandenberghe-Descamps *et al*, 2016)



Materials and Methods

76 subjects

Age	Sex		Dental status**		Stimulated flow saliva (mL/min)**
	Women	Men	Healthy (PDO* ≥7)	Unhealthy (PDO* ≤ 4)	
66 -88 Mean : 73,1	42	34	37	37	0,2-3,7 Mean: 1,5

*PDO : Posterior Dental Occlusion **Dental status and simulated flow saliva are independent variables

X

4 dairy products
Identical composition but a range of different texture

	Soft	Pasty	Hard	Dry
Sensorial	Soft and melting	Adhesive, pasty	Firm and hard	Dry and granular
Breakdown (N- compression 70%)	11+/-2	10+/-1,5	100+/-10	6+/-0,5

Session 1 : Questionnaire

1. General
This food is ...
Very uncomfortable ❑ to Very comfortable ❑

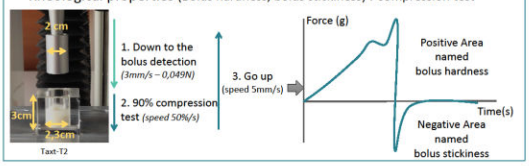
2. Bolus Formation
To cut this food with your incisor is
Impossible ❑ to Very easy ❑
Same scale for cutting with premolar, masticating, humidification with saliva, time and swallowing

3. Mouth pain
Does eating the food bring a burning or spicy sensation ?
Extremely ❑ to Not at all ❑
Same scale for muscular pain, articular pain, dental pain and gum pain

4. Texture and flavor
Is this food sticky ?
Extremely ❑ to Not at all ❑
Same scale for stringy, greasy, dry, doughy, melting, firm, and hard

Session 2 : Bolus formation

- Time and number of cycles : Video
- Saliva incorporated in bolus : Dry extract
- Rheological properties (Bolus hardness, bolus stickiness) : Compression test



Results

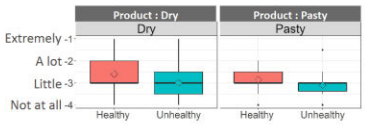
Group by product and then ANCOVA : X ~ Dental status + Flow Saliva+ Dental Status*Flow Saliva
ns (no signifiant) > 0,05 *<0,05 ** <0,01 *** <0,001

The food comfortability and feeling of bolus formation are not affected by the oral health

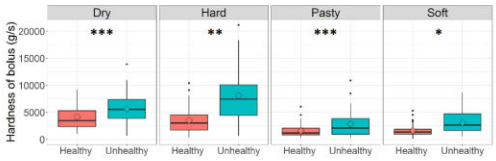
For the 4 products	Dental status	Flow Saliva	Dental Status*Flow Saliva
Confort	ns	ns	ns
Bolus formation (all descriptors)	ns	ns	ns
Mouth Pain (all descriptors)	ns	ns	ns

The dental status have a slight effect on the texture perception

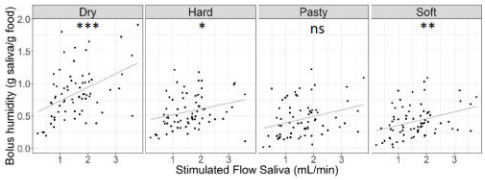
Product	Texture	Dental status	Flow Saliva	Dental Status*Flow Saliva
Dry	Dry	*	ns	ns
Pasty	Greasy	*	ns	ns
All other products and texture		ns	ns	ns



- The salivary flow is slightly positively correlated with the stickiness of bolus, and there is no interaction between the salivary flow and the dental status on the rheological properties of bolus
- **The bolus is harder for subjects with unhealthy dental status**

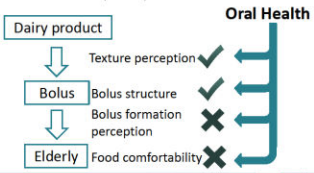


- There is no effect of the dental status, and no interaction between the dentals status and the salivary flow on the bolus humidity.
- **The humidity of bolus is positively correlated with stimulated salivary flow.**



Conclusion

- The bolus properties are affected by the oral health. An unhealthy dental status leads to an harder bolus, and a low salivary flow leads to a low bolus humidification.
- However, food comfortability of our products is not affected by the oral health. This can be explained by the fact that dairy products are easy to eat.
- In this ANR project, further experiment with food more difficult to eat will be achieved in order to analyze the impact of oral health on food comfortability.



STLO
1 INRA - Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA Agrocampus, France
2 INRA - UMR CSGA Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, France
3 Lactalis, France
4 Agrosup Dijon, France
Lucie.Lorieau@inra.fr

- **International Symposium on Minerals & Dairy. Chine, Wuxi, Septembre 2017**

Présentation orale :

L. Lorieau (1), F. Gaucheron (1)*, L. Le Roux (1), E. Hazart (2), A. Ligneul (2), D. Dupont (1), J. Floury (1)

(1) INRA - Science et Technologie du Lait et de l'Oeuf, INRA Agrocampus, France ;

(2) Lactalis, France

Calcium is an essential mineral for the organism. Numerous calcium sources are available to enrich food but only calcium carbonate has been well studied. Calcium bioaccessibility depends mainly on solubility. Furthermore *in vitro* digestion allows to determine bioaccessibility and to identify the key parameters affecting it. This study focused on the influence of the gastro-intestinal pH, the food structure and the calcium source on the bioaccessibility of the nutrient.

Four calcium sources (calcium carbonate, calcium citrate malate, dairy calcium phosphate and calcium bisglycinate) were added at 0.5% (w/w) in water (control), and in whey protein matrices as the liquid form or with heating to induce a gel. These matrices were digested under static conditions in duplicate, with the harmonized INFOGEST protocol (Minekus et al. 2014). Soluble and ionic calcium, and pH kinetics were followed during *in vitro* digestion. The kinetics were analyzed by nonparametric tests with repeated measurements.

Results showed that all calcium sources were soluble in the matrices, mainly as ionic form (Ca2+), during the gastric phase at pH 3, but that calcium become insoluble in the intestinal compartment at pH 7. This rise in calcium insolubility led to a fall of the nutrient bioaccessibility from 20 to 80%. Dairy calcium phosphate had a distinct behavior with an important fall of solubility in the intestinal compartment due to strong ionic interactions between calcium and phosphate. In addition, the organization of whey proteins in the food matrix had no effect on solubilisation of calcium and therefore on its bioaccessibility.

These results provide new insights to better understand bioavailability differences between calcium sources and matrices. Further *in vivo* digestion experiments on a pig model will be achieved in order to confirm bioaccessibility and to measure the bioavailability of those different sources of calcium. It will finally provide a relation between the results from *in vitro* and *in vivo* models of digestion.

Acknowledgments: ANR-14-CE20-0003 AlimaSSenS (France)

- **Food structure Digestion and Health, Australie, Sydney, Octobre 2017**

Présentation orale (et bourse de l'Agrocampus Ouest et du congrès pour pouvoir assister au congrès)

Development of product for elderly people: impact of the type of protein and matrix structures on the protein hydrolysis

L. Lorieau (1), Amira Halabi (1), A. Ligneul (2), E. Hazart (2), D. Dupont (1), J. Floury (1)

(1) INRA – UMR STLO Science & Technology of Milk & Eggs, INRA Agrocampus, France ;

(2) Lactalis, France,

In 2030, 1/3 of the European population will be over 60 years old. Elderly people exhibit specific nutritional needs, in particular they require higher protein intake. For this purpose, three dairy products were developed to provide a large amount of whey protein, known to be quickly digested and rich in leucine. Whey proteins allow a peak of leucine stimulating the muscle protein synthesis.

This study aimed to understand the influence of protein nature (whey or caseins), heat-induced protein denaturation and structure of the food matrix on the kinetics of proteolysis and the bioaccessibility of amino acids during a simulated gastrointestinal digestion. Three whey protein-based dairy products were designed with exactly the same composition (24% whey proteins, 20% fat) but different textures (more or less firm gels) were obtained by modulating the manufacturing process. The liquid and native whey protein emulsion was also studied as a control. Mozzarella cheese was studied as the casein gel control.

A multiscale characterization of the matrices was conducted including texture analysis, microstructure by confocal microscopy, and extent of heat induced whey protein denaturation. Protein digestion rates and amino acid liberation kinetics during the *in vitro* gastro-intestinal digestion (based on the INFOGEST protocol) were evaluated using biochemical analyses of digesta.

Results showed that both the degree of hydrolysis and the amino acid liberation were significantly higher in the casein-based gel than in whey protein matrices. The extent of protein hydrolysis was higher in the whey protein gels compared to the liquid control sample, due to a facilitated hydrolysis of the heat-denatured proteins compared to native proteins. Peptide release and amino acid bioaccessibility were however not significantly influenced by the matrix structure. Further studies, using an *in vivo* digestion model (in dynamic condition with gastric emptying) will allow to assess the amino acids bioavailability of these matrices.

Acknowledgments: ANR-14-CE20-0003 AlimaSSenS (France)

Does oral health affect food comfortability and bolus properties during consumption of dairy products in elderly population?

L. Lorieau (1), C. Septier (2), A. Prot (2), L. Le Roux (1), E. Hazart (3), A. Ligneul (3), M. Hanafi (4), D. Dupont (1), J. Floury (1), H. Labouré (5), G. Feron (2)

(1) INRA – UMR STLO Science & Technology of Milk & Eggs, INRA Agrocampus, France ;

(2) INRA - UMR CSGA Centre for Taste and Feeding Behavior, France ;

(3) Lactalis, France,(4) ONIRIS, France (5) Agrosup Dijon, France

The elderly population is growing increasingly. In 2030, 1/3 of the population will be over 60 years old. However this population has specific nutritional needs and often, oral impairments such as loss of tooth and/or decrease of salivary flow. Therefore it is necessary to develop foods adapted for the elderly, in terms of organoleptic properties and nutritional composition. In this context, the purpose of this work is to study the impact of oral impairments of elderly persons on food comfortability and bolus properties during the consumption of dairy products.

76 elderly persons (ages 66 to 88, 42 women and 34 men), with or without oral health problems in terms of dental and/or salivary status were recruited. Four dairy products with identical composition but different textures (soft, hard, pasty and dry) were studied. Food comfortability of the four dairy products was assessed by means of a questionnaire based on bolus formation, pain, and texture and flavor perception. The time and number of cycle required to form the bolus for elderly person consuming each product was measured (video) as rheological properties (compression test) and saliva incorporated (dry extract) in each bolus. Statistical analysis (correlation, ANOVA, multiblock analysis) of the data were performed.

Despite a wide array of texture, dairy products were comfortable for the elderly whatever their oral health. According to the food comfortability questionnaire, neither bolus formation, nor pain or organoleptic properties were significantly affected by the dental and/or salivary status of the elderly. The stimulated saliva flow was positively correlated with the amount of saliva incorporated in the bolus. Moreover dental status was correlated with the hardness of the bolus and results suggested that the dental status slightly affected the texture perception.

Finally, food comfortability of our products was not affected by the oral health contrary to the bolus properties.

Acknowledgments: ANR-14-CE20-0003 AlimaSSenS (France)

Does oral health affect food comfortability and bolus properties during consumption of dairy products in elderly population?

L. LORIEAU[1]*, C. SEPTIER[2], A. PROT[2], L. LE ROUX[1], E. HAZART[3], A. LIGNEUL[3], D. DUPONT[1], J. FLOURY[1], H. LABOURÉ[4], G. FERON[2]

Context & Objectives

Ageing

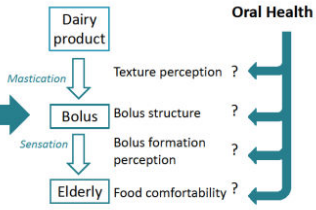
Oral Health Deterioration :

- ↘ muscle strength (Mioche *et al.* 2004)
- ↘ 38 % salivary flow (Vandenberghe-Descamps *et al*, 2016)
- ↗ toothless (Peyron et al. 2013)

Sensory losses : taste, olfactory, somatosensory

➡ Specific nutritional needs like protein and calcium which can be provided by dairy products

Food comfortability for elderlies, is described by the perception of bolus formation, the pain caused while eating, the texture and the flavour of food. Food is considered as comfortable when the bolus is easy to form, when there is no pain while eating, and when the texture is soft, not dry, nor doughy.
(Vandenberghe-Descamps *et al*, 2016)



Materials and Methods

76 subjects

Age	Sex		Dental status**		Stimulated flow saliva (mL/min)**
	Women	Men	Healthy (PDO* ≥7)	Unhealthy (PDO* ≤ 4)	
66 -88 Mean : 73,1	42	34	37	37	0,2-3,7 Mean: 1,5

*PDO : Posterior Dental Occlusion **Dental status and simulated flow saliva are independent variables

X

4 dairy products

Identical composition but a range of different texture

	Soft	Pasty	Hard	Dry
Sensorial	Soft and melting	Adhesive, pasty	Firm and hard	Dry and granular
Breakdown (N- compression 70%)	11+/-2	10+/-1,5	100+/-10	6+/-0,5

Session 1 : Questionnaire

1. General
This food is ...
Very uncomfortable ❑ to Very comfortable ❑

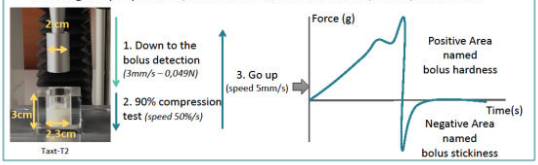
2. Bolus Formation
To cut this food with your incisor is
Impossible ❑ to Very easy ❑
Same scale for cutting with premolar, masticating, humidification with saliva, time and swallowing

3. Mouth pain
Does eating the food bring a burning or spicy sensation ?
Extremely ❑ to Not at all ❑
Same scale for muscular pain, articular pain, dental pain and gum pain

4. Texture and flavor
Is this food sticky ?
Extremely ❑ to Not at all ❑
Same scale for stringy, greasy, dry, doughy, melting, firm, and hard

Session 2 : Bolus formation

- Time and number of cycles : Video
- Saliva incorporated in bolus : Dry extract
- Rheological properties (Bolus hardness, bolus stickiness) : Compression test



Results

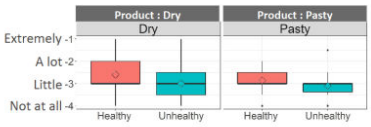
Group by product and then ANCOVA : *X* ~ Dental status + Flow Saliva+ Dental Status*Flow Saliva
ns (no signifiant) > 0,05 *<0,05 ** <0,01 *** <0,001

The food comfortability and feeling of bolus formation are not affected by the oral health

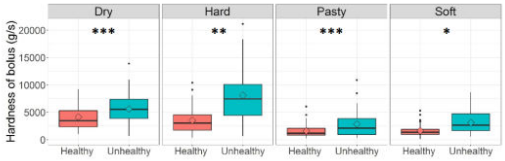
For the 4 products	Dental status	Flow Saliva	Dental Status*Flow Saliva
Confort	ns	ns	ns
Bolus formation (all descriptors)	ns	ns	ns
Mouth Pain (all descriptors)	ns	ns	ns

The dental status have a slight effect on the texture perception

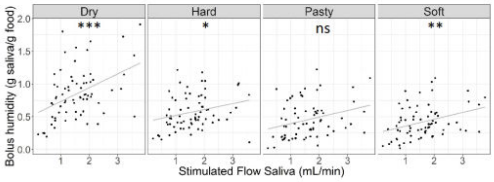
Product	Texture	Dental status	Flow Saliva	Dental Status*Flow Saliva
Dry	Dry	*	ns	ns
Pasty	Greasy	*	ns	ns
All other products and texture		ns	ns	ns



- The salivary flow is slightly positively correlated with the stickiness of bolus, and there is no interaction between the salivary flow and the dental status on the rheological properties of bolus
- **The bolus is harder for subjects with unhealthy dental status**

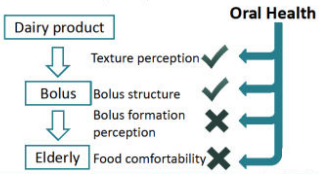


- There is no effect of the dental status, and no interaction between the dentals status and the salivary flow on the bolus humidity.
- **The humidity of bolus is positively correlated with stimulated salivary flow.**



Conclusion

- The bolus properties are affected by the oral health. An unhealthy dental status leads to an harder bolus, and a low salivary flow leads to a low bolus humidification.
- However, food comfortability of our products is not affected by the oral health. This can be explained by the fact that dairy products are easy to eat.
- In this ANR project, further experiment with food more difficult to eat will be achieved in order to analyze the impact of oral health on food comfortability.



STLO
1 INRA - Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA Agrocampus, France
2 INRA - UMR CSGA Centre des Sciences des Goût et de l'Alimentation, France
3 Lactalis, France
4 Agrosup Dijon, France
Lucie.Lorieau@inra.fr

- **Journée Francophone de nutrition, France, Nantes, Décembre 2017**

Développement de produits laitiers à destination des séniors : impact du type de protéines et de la structure de l'aliment sur l'hydrolyse des protéines.

Lucie Lorieau (1), Amira Halabi (1), Amandine Ligneul (2), Etienne Hazart (2), Didier Dupont (1), Juliane Floury (1)

(1) UMR 1253 – Science et Technologie du Lait et de l'Œuf, INRA Agrocampus, 65 rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes cedex, France

(2) Lactalis Recherche et Développement, France,

Introduction et but de l'étude :

Le vieillissement est associé à une baisse de la qualité de vie, notamment à cause du développement de pathologies comme la sarcopénie. Plusieurs stratégies nutritionnelles sont possibles pour retarder son apparition. Elles sont basées sur l'augmentation de la consommation d'aliments riches en protéines, comme les produits laitiers. De plus, les protéines du lactosérum sont reconnues pour leur richesse en leucine, et leur digestion rapide, qui favorise la synthèse musculaire. L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances nutritionnelles, en condition de digestion *in vitro*, de produits fromagers riches en protéines du lactosérum et de les comparer à celle d'un fromage traditionnel riche en caséines. Nous cherchons à déterminer comment la source protéique, la structure des matrices laitières et le niveau de dénaturation des protéines influencent la bioaccessibilité des acides aminés.

Matériel et méthodes :

Trois produits fromagers à base de protéines du lactosérum, de composition identique mais de texture variable (gels plus ou moins fermes), ont été obtenus en modulant le traitement thermique. Ils étaient comparés à deux témoins: un fromage du commerce à base de caséines et une version liquide (avant thermocoagulation des gels). La macrostructure des produits a été évaluée grâce à un test de compression, et leur microstructure en microscopie confocale. Le taux de dénaturation des protéines a été quantifié par dosage de l'azote soluble à pH 4,4 et total. Les digestions ont été réalisées selon le protocole de digestion *in vitro* INFOGEST. Les cinétiques de digestion des protéines et de libération des acides aminés ont été caractérisées par analyse biochimique des digestas : cinétiques d'hydrolyse par SDS-Page, libérations des peptides par la méthode OPA et des acides aminés par chromatographie ionique.

Résultats:

Les résultats montrent que le fromage à base de caséines présente le degré d'hydrolyse le plus élevé en phase intestinale (39% au temps final), en comparaison aux autres matrices. Concernant les matrices riches en protéines du lactosérum, les degrés d'hydrolyse obtenus en phase intestinale avec les gels sont supérieurs (19 à 28% au temps final) à celui obtenu avec la matrice liquide non traitée thermiquement (16%).

Bien que les produits à base de protéines du lactosérum contiennent 30% de plus de leucine que le fromage du commerce, la libération de leucine mesurée en fin de digestion est plus élevée pour le fromage du commerce (29%), que pour les gels de protéines du lactosérum (17%) et la matrice liquide (9%)

Conclusion :

Dans les produits gels, la dénaturation des protéines du lactosérum due au traitement thermique, facilite l'hydrolyse de ces protéines par les enzymes pancréatiques, améliorant ainsi la bioaccessibilité des acides aminés par rapport au produit liquide où les protéines sont natives. La bioaccessibilité des acides aminés est supérieure pour les fromages du commerce par rapport à celle des produits composés de protéines du lactosérum. Ceci s'explique par une hydrolyse plus élevée des caséines par la pepsine en phase gastrique, par rapport aux protéines du lactosérum.

Remerciement : ANR-14-CE20-0003 AlimaSSenS (France)

- **Présentation du projet de thèse : Miniposter**

VIII RESUME

Etude de la digestion et du confort en bouche de produits fromagers développés pour répondre aux besoins sensoriels et nutritionnels de la population sénior

Lors du vieillissement, les capacités sensorielles et l'efficacité masticatoire diminuent, affectant négativement l'alimentation des séniors. Ainsi, la formulation d'aliments adaptés aux besoins nutritionnels et sensoriels des seniors est un enjeu pour les années à venir.

L'objectif principal de cette thèse, intégrée au projet AlimaSSenS, est d'étudier l'impact de la texture de produits fromagers sur le confort en bouche et la biodisponibilité des acides aminés et du calcium.

Les fromages modèles développés ont la même composition mais des textures variables.
Des analyses sensorielles réalisées sur un panel de séniors, ainsi que des études de digestion *in vitro* et *in vivo* (sur modèle porcin) ont été réalisées.
Les résultats des digestions soulignent la pertinence d'intégrer les protéines sériques en tant que source protéique majeure dans les produits fromagers, afin de maximiser l'apport plasmatique en acides aminés essentiels. Cependant, la texture des fromages modèles n'a pas influencé la bioaccessibilité des acides aminés et du calcium. De plus, la bioaccessibilité du calcium est majoritairement liée aux pH intra-gastrique et -intestinal, plutôt qu'à sa forme chimique initiale. Enfin, l'étude sensorielle a mis en évidence que seules les textures perçues comme « sèches » étaient liées à une baisse importante du confort en bouche des séniors.
Ce travail souligne l'opportunité de développer des produits fromagers destinés aux séniors. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux avec des études cliniques pour connaître l'impact physiologique de ces produits sur la prévention de l'ostéoporose et de la sarcopénie.

Mots clés : Nutrition, Produits laitiers, Digestion, Protéines sériques, Calcium, Mastication

Digestion and oral comfort of cheese developed to meet the sensory and nutritional needs of the elderly

During aging, the sensory capacities and the mastication efficacy decrease negatively affecting the diet of the elderly. Yet, protein and calcium requirements increase with age. In this context, the formulation of foods adapted to the nutritional and sensory needs of the elderly is a challenge for the next years.

The main objective of this thesis, integrated into the project AlimaSSenS, is to study the impact of the texture of model cheeses, based on whey proteins and calcium fortified, on the oral comfort and on the bioavailability of amino acids and calcium.

The model cheeses developed have the same composition and variable textures. Sensory analysis were performed on a panel of people over 65, and *in vitro* and *in vivo* digestion studies (on porcine model) were conducted.

The results of the digestion studies highlighted the relevance of integrating whey proteins as a major protein source in dairy products, in order to maximize the bioavailability of essential amino acids. However, the texture of model cheeses did not significantly influence the bioaccessibility of amino acids and calcium. In addition, the bioaccessibility of calcium was mainly related to intra-gastric and intra-intestinal pH, rather than to the initial chemical form of its source of enrichment. Finally, the sensory study has shown that only the textures perceived as “dry” was linked to a significant decrease in the oral comfort.

This work highlights the opportunity to develop dairy products adapted for the elderly. Based on this work, it would be interesting to carry out clinical studies to know the physiological impact of these products on the prevention of osteoporosis and sarcopenia.

Keywords: Nutrition for elderly, Dairy products, Digestion, Whey protein, Calcium, Food oral processing

RÉSUMÉ

Étude de la digestion et du confort en bouche de produits fromagers développés pour répondre aux besoins sensoriels et nutritionnels de la population senior

Lors du vieillissement, les capacités sensorielles et l'efficacité masticatoire diminuent, affectant négativement l'alimentation des séniors. Ainsi, la formulation d'aliments adaptés aux besoins nutritionnels et sensoriels des seniors est un enjeu pour les années à venir.
L'objectif principal de cette thèse, intégrée au projet AlimaSSenS, est d'étudier l'impact de la texture de produits fromagers sur le confort en bouche et la biodisponibilité des acides aminés et du calcium.
Les fromages modèles développés ont la même composition mais des textures variables.
Des analyses sensorielles réalisées sur un panel de séniors, ainsi que des études de digestion in vitro et in vivo (sur modèle porcin) ont été réalisées.
Les résultats des digestions soulignent la pertinence d'intégrer les protéines sériques en tant que source protéique majeure dans les produits fromagers, afin de maximiser l'apport plasmatique en acides aminés essentiels. Cependant, la texture des fromages modèles n'a pas influencé la bioaccessibilité des acides aminés et du calcium. De plus, la bioaccessibilité du calcium est majoritairement liée aux pH intra-gastrique et -intestinal, plutôt qu'à sa forme chimique initiale. Enfin, l'étude sensorielle a mis en évidence que seules les textures perçues comme « sèches » étaient liées à une baisse importante du confort en bouche des séniors.
Ce travail souligne l'opportunité de développer des produits fromagers destinés aux séniors. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux avec des études cliniques pour connaître l'impact physiologique de ces produits sur la prévention de l'ostéoporose et de la sarcopénie.

Mots-clés : nutrition, produits laitiers, digestion, protéines sériques, calcium, mastication

ABSTRACT

Digestion and oral comfort of cheese developed to meet the sensory and nutritional needs of the elderly

During aging, the sensory capacities and the mastication efficacy decrease negatively affecting the diet of the elderly. Yet, protein and calcium requirements increase with age. In this context, the formulation of foods adapted to the nutritional and sensory needs of the elderly is a challenge for the next years.
The main objective of this thesis, integrated into the project AlimaSSenS, is to study the impact of the texture of model cheeses, based on whey proteins and calcium fortified, on the oral comfort and on the bioavailability of amino acids and calcium.
The model cheeses developed have the same composition and variable textures. Sensory analysis were performed on a panel of people over 65, and in vitro and in vivo digestion studies (on porcine model) were conducted.
The results of the digestion studies highlighted the relevance of integrating whey proteins as a major protein source in dairy products, in order to maximize the bioavailability of essential amino acids. However, the texture of model cheeses did not significantly influence the bioaccessibility of amino acids and calcium. In addition, the bioaccessibility of calcium was mainly related to intra-gastric and intra-intestinal pH, rather than to the initial chemical form of its source of enrichment. Finally, the sensory study has shown that only the textures perceived as "dry" was linked to a significant decrease in the oral comfort.
This work highlights the opportunity to develop dairy products adapted for the elderly. Based on this work, it would be interesting to carry out clinical studies to know the physiological impact of these products on the prevention of osteoporosis and sarcopenia.

Keywords: *Nutrition for elderly, Dairy products, Digestion, Whey protein, Calcium, Food oral processing*

AGROCAMPUS OUEST • Institut national supérieur des sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
65 rue de Saint-Brieuc – CS84215 – F-35042 Rennes Cedex
Tél. : 02 23 48 50 00
www.agrocampus-ouest.fr