



HAL
open science

Influence de la structuration de l'interface colloïdale sur la formulation et la biodisponibilité d'acides gras d'intérêt nutritionnel

Christine Bourgeois

► To cite this version:

Christine Bourgeois. Influence de la structuration de l'interface colloïdale sur la formulation et la biodisponibilité d'acides gras d'intérêt nutritionnel. Chimie théorique et/ou physique. Université de Bordeaux; Université Laval (Québec, Canada), 2018. Français. NNT : 2018BORD0379 . tel-02090577

HAL Id: tel-02090577

<https://theses.hal.science/tel-02090577>

Submitted on 4 Apr 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.



UNIVERSITÉ
LAVAL



Bordeaux INP
AQUITAINE

université
de **BORDEAUX**

THÈSE EN COTUTELLE INTERNATIONALE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

PH.D. SCIENCES DES ALIMENTS

De l'Université Laval – CANADA

DOCTEUR EN CHIMIE PHYSIQUE

De l'Université de Bordeaux – France

**INFLUENCE DE LA STRUCTURATION DE L'INTERFACE
COLLOÏDALE SUR LA FORMULATION
ET LA BIODISPONIBILITE D'ACIDES GRAS
D'INTERET NUTRITIONNEL**

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PAR

Christine BOURGEOIS

LE 10 DÉCEMBRE 2018 A QUÉBEC

Membres du jury

Président	Guillaume BRISSON , Professeur, Université Laval
Directrices	Maud CANSSELL , Professeure, Université de Bordeaux/Bordeaux INP Muriel SUBIRADE , Professeure, Université Laval
Rapporteurs	Marc ANTON , Directeur de recherche, INRA Nantes Dérick ROUSSEAU , Professeur, Ryerson University
Examineur	Fernando LEAL-CALDERON , Professeur, Université de Bordeaux/Bordeaux INP

Résumé

Les études épidémiologiques récentes montrent une consommation insuffisante d'acides gras polyinsaturés (AGPI) dans les pays occidentaux. Cependant, la sensibilité des AGPI à l'oxydation est l'une des premières causes de détérioration des qualités organoleptique et nutritionnelle dans les produits alimentaires. Parallèlement, les lipides présents dans les produits alimentaires se trouvent le plus souvent sous forme émulsionnée. Ainsi, les entreprises désirant formuler des produits alimentaires enrichis en AGPI adoptent des stratégies technologiques pour les stabiliser chimiquement et physiquement, tout en assurant leur biodisponibilité. Une de ces stratégies consiste à rechercher, dans la nature, des systèmes émulsifiés stables afin d'en extraire des molécules tensioactives d'intérêt et de mimer l'organisation des lipides. C'est dans ce contexte que des études portent, depuis quelques années, sur les corps lipidiques (Oil Bodies, OB), structures végétales naturelles de stockage des lipides des plantes oléagineuses, composées de phospholipides (PL) et de protéines (OBP).

L'objectif général de ce projet de thèse vise à maîtriser la formulation d'émulsions préparées uniquement à base de colza (huile, PL et OBP) par une meilleure connaissance des interactions PL : OBP, d'étudier la stabilité des émulsions d'un point de vue physicochimique en conditions de stockage et dans des conditions mimant les conditions gastro-intestinales et, enfin, d'évaluer l'influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des acides gras insaturés *in vivo* chez le rat.

Les études spectroscopiques des interactions PL modèles : OBP ont mis en évidence des interactions favorables à la stabilisation des émulsions entre les PL anioniques, les PL insaturés et les OBP. Ces résultats ont orienté le choix vers une lécithine de colza spécifique. Les interactions PL : OBP, modulées par le pH et le rapport PL : OBP, influencent la réalisation des émulsions, la quantité d'OBP adsorbées à l'interface et la stabilité physique des émulsions, avec un crémage prononcé pour les émulsions riches en protéines. La synergie PL : OBP à l'interface semble être un facteur décisif pour ralentir l'oxydation de l'huile de colza émulsifiée. Le comportement des émulsions, dans des conditions mimant celles du milieu gastro-intestinal, montre que la présence d'OBP à l'interface favorise la floculation des émulsions à pH acide (mimant celui de l'estomac), mais que cette floculation est réversible lorsque le pH est ramené à des valeurs proches de celle de l'intestin. La présence des OBP favorise l'activité de la lipase pancréatique *in vitro*. Finalement, l'interface composée de PL et d'OBP améliore la bioaccessibilité lymphatique des AGPI *in vivo* chez le rat.

En conclusion, nous avons montré qu'il est possible de formuler des émulsions uniquement à base de colza. Elles pourraient présenter une alternative intéressante aux émulsions stabilisées par des émulsifiants d'origine synthétique (politique clean label) ou d'origine animale (alimentation végétane).

Mots-clé : Émulsions, bioaccessibilité, oxydation, colza, interactions phospholipides-protéines

Summary

Recent epidemiologic studies show an insufficient intake of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in occidental countries. Besides, the sensibility of PUFA to oxidation is one of the major causes of organoleptic and nutritional quality deterioration in food products. Moreover, lipids in food products are often in an emulsified stage. Therefore, industrials that care to formulate PUFA enriched food products adopt technological strategies to protect and stabilize the lipids while improving their bioavailability. One of those strategies consists in looking for stable emulsified systems that already exist in nature, extract tensioactive molecules of interest and mimic the lipid state. In this context, several studies deal with oil bodies (OB), that are natural occurring structures involved in lipid storage in oleaginous plants, composed of proteins (OBP) and phospholipids (PL).

Therefore, the main objective of this PhD work is to manage emulsion formulation only based on rapeseed (oil, PL and OBP). This goes through: 1) an understanding of the interactions between PL and OBP; 2) a study of the stability of the emulsions under storage and gastrointestinal conditions, and finally, 3) an investigation of the influence of the emulsion interfacial composition on the bioavailability of PUFA in rats.

Spectroscopic studies of the model PL:OBP interactions showed favorable interactions for stabilizing the emulsions based on anionic PL, unsaturated PL and OBP. These results allowed choosing an adequate canola lecithin. The PL:OBP interactions, modulated by the pH and the PL:OB ratio, influences the formation of the emulsions, the quantity of OBP adsorbed at the interface and the physical stability of the emulsions while a pronounced creaming in emulsions rich in proteins is observed. The PL:OBP synergy at the interface seems to be a decisive factor to slow down the oxidation of the emulsified canola oil. The emulsion behavior in conditions that mimic those of the gastrointestinal track, shows that the presence of OBP at the interface favored the emulsion flocculation in gastric conditions at acid pH. However, the flocculation was reversible when the pH was readjusted to a value close to that of the intestine. OBP also increased the activity of the pancreatic lipase *in vitro*. Finally, the presence of PL and OBP at the interface increased the lymphatic bioaccessibility of the PUFA in rats.

On the whole, we showed that it is possible to manage emulsion formulation only based on canola products. This could be of great interest for clean labeling or vegan nutrition by subtracting synthetic emulsifiers or emulsifiers from animal origin, respectively.

Keywords : Emulsions, bioaccessibility, oxidation, canola/rapeseed, interactions phospholipids-proteins

Table des matières

Résumé.....	i
Summary.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.....	viii
Liste des tableaux.....	xi
Abréviations.....	xiii
Remerciements	xvi
Avant-Propos.....	xviii
Introduction générale	1
CHAPITRE I : État de l’art.....	3
1. Le colza : une source végétale d’intérêt.....	3
1.1. Huile de colza.....	5
1.2. Lécithine de colza.....	7
1.3. Tourteau de colza	9
2. Émulsions : rôle clé de l’interface colloïdale.....	11
2.1. Émulsions	11
2.1.1. <i>Principes de l’émulsification</i>	11
2.1.2. <i>Mécanismes de déstabilisation des émulsions</i>	12
2.1.3. <i>Les tensioactifs</i>	14
2.1.4. <i>Rôles des tensioactifs dans la mise en place de l’interface</i>	17
2.1.5. <i>Interactions des tensioactifs aux interfaces</i>	19
3. Les corps lipidiques	28
3.1. Les corps lipidiques	28
3.2. Les protéines des corps lipidiques	29
3.2.1. <i>Les oléosines</i>	29
3.2.2. <i>La caléosine</i>	32
3.3. Propriétés physicochimiques des corps lipidiques	34
3.3.1. <i>Stabilité physique des corps lipidiques</i>	34
3.3.2. <i>Stabilité chimique des corps lipidiques</i>	36

4. Problématique et objectifs	38
CHAPITRE II : Matériels et méthodes	41
1. Matières premières et produits.....	41
1.1. Tourteau.....	41
1.2. Lipides	41
2. Produits chimiques.....	41
3. Extraction des protéines et caractérisation du tourteau de colza et du concentrât protéique.....	42
3.1. Extraction des protéines	42
3.2. Caractérisation du tourteau et du concentrât protéique	43
3.2.1. <i>Dosage des protéines</i>	43
3.2.2. <i>Dosage des cendres</i>	43
3.2.3. <i>Dosage de la matière sèche et de l'humidité</i>	44
3.2.4. <i>Dosage des lipides totaux</i>	44
3.2.5. <i>Caractérisation qualitative des protéines de l'extrait</i>	45
3.2.6. <i>Dosage des polyphénols</i>	45
3.3. Caractérisation de la lécithine de colza	45
3.3.1. <i>Préparation des esters méthyliques d'acides gras</i>	45
3.3.2. <i>Chromatographie en phase gazeuse</i>	46
3.3.3. <i>Identification et quantification des phospholipides par résonance magnétique nucléaire du proton et du phosphore</i>	46
4. Caractérisation des interactions phospholipides-protéines par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.....	48
4.1. Préparation des liposomes	48
4.1.1. <i>Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier</i>	49
5. Préparation et caractérisation physicochimique des émulsions.....	50
5.1. Formulation et émulsification	50
5.2. Caractérisation physique des émulsions.....	51
5.2.1. <i>Microscopie en contraste de phase</i>	51
5.2.2. <i>Granulométrie laser</i>	52

Table des matières	
5.2.3. Diffraction dynamique de la lumière (diffraction laser).....	52
5.2.4. Indice de crémage.....	53
5.2.5. Quantification des protéines adsorbées aux interfaces.....	53
5.2.6. Recouvrement de surface.....	54
5.3. Caractérisation chimique des émulsions.....	55
5.3.1. Indice de peroxyde.....	55
5.3.2. Diènes conjugués.....	55
6. Caractérisation de la bioaccessibilité des émulsions : études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	56
6.1. Détermination du comportement des émulsions en conditions de digestion <i>in vitro</i>	56
6.1.1. Stabilité physique des émulsions aux variations de pH.....	56
6.1.2. Activité de la lipase pancréatique.....	56
6.2. Détermination de la bioaccessibilité des lipides : étude <i>in vivo</i> chez le rat.....	57
6.2.1. Approche expérimentale <i>in vivo</i> chez le rat.....	57
6.2.2. Dosage des acides gras des lipides totaux de la lymphe.....	58
7. Analyses statistiques.....	58
CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces.....	59
1. Étude des interactions PL : OBP par FTIR.....	60
1.1. Résumé de l'article en français.....	60
2. Interaction of oil bodies proteins with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy Christine Bourgeois, Ahmed I. Gomaa, Thierry Lefèvre, Maud Cansell and Muriel Subirade.....	61
Abstract.....	63
Keywords:.....	63
Abbreviations:.....	63
Introduction.....	64
Material and Methods.....	66
Materials.....	66
Extraction and characterization of oil bodies proteins.....	66
Protein content.....	66

<i>Protein identification</i>	67
PL membrane (liposome) preparation	67
Infrared spectroscopy	68
Statistical analysis	68
Results and discussion	69
<i>Oil bodies protein (OBP) in solution</i>	69
<i>Oil bodies proteins / dimyristoylphosphatidylcholine interactions</i>	70
<i>Oil bodies proteins / dimyristoylphosphatidylglycerol interactions</i>	72
<i>Oil bodies proteins /dipalmitoylphosphatidylglycerol interactions</i>	75
<i>Oil bodies proteins /dioleoylphosphatidylcholine interactions</i>	77
Conclusion	79
Acknowledgment	80
References	80
3. Principaux résultats et développement	84
3.1. Caractérisation du concentrât protéique	84
3.2. Étude spectroscopique infrarouge	85
4. Conclusion	88
CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza	90
1. Caractérisation et choix de la lécithine de colza	90
2. Formulation des émulsions et stabilité physique	92
2.1. Étude de faisabilité pour la préparation d'émulsions H/E	92
2.2. Caractérisation de la composition interfaciale des émulsions	96
2.3. Stabilité physique des émulsions à 4°C	99
2.3.1. Stabilité des émulsions à 60°C	104
3. Stabilité chimique des émulsions	104
3.1. Généralités sur l'oxydation des lipides	104
3.2. Étude de l'huile de colza en phase continue	107
3.3. Étude de l'huile de colza en émulsion	109

Table des matières	
4. Conclusion	111
CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides <i>in vivo</i> chez le rat	112
1. Étude de bioaccessibilité de l'huile de colza émulsifiée <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	116
1.1. Résumé de l'article en français	116
2. Emulsions based on oil bodies proteins and phospholipids. In vitro and in vivo studies, Christine Bourgeois, Leslie Couëdelo, Muriel Subirade et Maud Cansell.....	117
Abstract.....	119
Keywords:.....	119
Abbreviations:.....	119
Introduction.....	120
Materials and Methods	121
Materials.....	121
Oil bodies protein extraction	123
Emulsion formulation and characterization	124
Animals and surgical procedures	125
Fatty acid analysis of lymph total lipids.....	126
Statistical analysis	126
Results.....	126
Discussion.....	130
Acknowledgments	133
References.....	134
3. Principaux résultats.....	138
4. Conclusion	143
Conclusion	144
Bibliographie	148
Annexes	167
Annexe I.....	167

Liste des figures

Figure 1 : Procédé d'extraction de l'huile par pressage et extraction par solvant. Adapté de Daun et al. (2011)

Figure 2 : Représentation des forces d'attraction intermoléculaire à l'interface de deux liquides non miscibles. Adapté de Broil et Schott (2014)

Figure 3 : Mécanismes de déstabilisation des émulsions. Adapté de Piorkowski et McClements (2014)

Figure 4 : Représentation des forces d'attraction intermoléculaire à l'interface de deux liquides non miscibles sans (a) et avec (b) tensioactifs. Adapté de Broil et Schott (2014)

Figure 5 : Représentation de la conformation à l'interface de différents types de protéine. Rouge : section hydrophobe. Bleu : section hydrophile (a) caséine (b) β -lactoglobuline (c) oléosine (Rayner, 2015)

Figure 6 : Représentation schématique des conformations adoptées par des protéines flexibles ou globulaires en fonction de leur concentration surfacique à l'interface huile/eau (Berton 2011)

Figure 7 : Représentation de la compétition à l'interface entre les phospholipides (DPPC) et des protéines (β -caséine) en fonction de la concentration en phospholipides. Adapté de Caro et al. (2009).

Figure 8 : Interactions entre les PL chargés et les protéines. Adapté de Kotsmar et al. (2009)

Figure 9: Représentations modèle d'une interface mixte en multicouches par superposition de monocouches composé de PL et de protéines. Adapté de Chung et McClements (2014)

Figure 10 : Représentation d'un corps lipidique (Rayner, 2015) (a) (Tzen, 2012) (b)

Figure 11 : Représentation structurale du segment C-terminal au sein d'une monocouche de PL. Adapté de Tzen (2012)

Figure 12 : Représentations structurales potentielles du segment médian de l'oléosine au sein d'une monocouche de PL. A) monomère antiparallèle, B) baril à six brins β antiparallèles, C) oligomère parallèle, D) oligomère antiparallèle, E) oligomère parallèle et antiparallèle, F) hélice α (Tzen et al., 2008)

Liste des figures

Figure 13: Représentation structurale de la caléosine au sein d'une monocouche de PL. Adapté de Tzen (2012)

Figure 14: Perturbation et relaxation du moment magnétique (Bardeau, 2015)

Figure 15 : Exemple de spectre infrarouge pour un phospholipide et ses différentes régions d'absorbance identifiées (Lefèvre, 2013)

Figure 16 : Représentation des différentes couches de crémage

Figure 17 : Représentation d'un segment protéique en hélices α inséré au sein d'une monocouche de phospholipides. Adapté de Foot et al. (2007)

Figure 18 : Représentation schématique des conformations adoptées par des phospholipides transmembranaires en présence de protéines transmembranaires pour une protéine seule (a), représentation schématique de la condensation capillaire du domaine lipidique entre deux de protéines transmembranaires (b). Les chaînes d'acides gras des PL représentées en blanc sont celles perturbées par l'ancrage des protéines (Mouritsen et Bagatolli, 2015)

Figure 19 : Composition en phospholipides des lécithines Caldic (🌀) et Lasenor (■)

Figure 20 : Composition des familles d'acides gras des lécithines Caldic (🌀) et Lasenor (■)

Figure 21 : Courbes de distribution de la taille des gouttelettes pour les émulsions à différents rapports PL : OBP : 1 : 0 (—), 1 : 1 (—), 2 : 3 (—), 1 : 2 (—) et 1 : 3 (—) à pH 5,5 (a) et 7,5 (b)

Figure 22 : Clichés de microscopie en contraste de phase pour les émulsions à différents rapports PL : OBP : 1:0 (a, f), 1 : 1 (b, g), 2 : 3 (c, h), 1 : 2 (d, i) et 1 : 3 (e, j) à pH 5,5 (a-e) et pH 7,5 (f-j)

Figure 23 : Proportion de protéines adsorbées aux interfaces pour les émulsions à différents rapports PL : OBP : 1 : 1 (—), 2 : 3 (—), 1 : 2 (—) et 1 : 3 (—) à pH 5,5 et 7,5

Figure 24 : Représentation d'un corps lipidique de maïs. Adapté de Tzen et Huang (1992)

Figure 25 : Photo illustrant le crémage des émulsions à différents rapports PL : OBP : 1 : 1, 2 : 3, 1 : 2 et 1 : 3 à pH 5,5 et 7,5 après 6h de stockage à 4°C

Figure 26 : Suivi de la distribution moyenne des gouttelettes pour des émulsions représentatives à différents rapports PL : OBP : (a) 1 : 0 (—), (b) 1 : 1 (—), (c) 2 : 3 (—), (d) 1 : 2 (—) et € 1 : 3 (—) à pH 5,5 (couleur) et 7,5 (noir) sur 28 jours, à 4°C

Figure 27 : Valeurs de D[4,3] pour les émulsions à différents rapports PL : OBP à pH 5,5 et avec du Tween 80 au jour 0 (■), au jour 7 à 4°C (■) et au jour 7 à 60°C (✂)

Figure 28 : Schéma général de l'oxydation des lipides impliquant des réactions multiples et simultanées proposé par Schaich (2005)

Figure 29 : Formation des diènes conjugués

Figure 30 : Relation entre l'indice de peroxyde et l'absorbance spécifique (densité optique à 233 nm normalisée par la concentration de lipides) représentative des diènes conjugués pour l'huile de colza entreposée à 60°C

Figure 31 : Évolution de l'oxydation (Absorbance spécifique (densité optique à 233 nm normalisée par la concentration de lipides)) pour l'huile de colza en phase continue seule (—), en mélange avec la lécithine de colza (0,5%) (—·), le concentrat protéique à 0,5% (—·) et 1,5% (—·) entreposés à 60°C pendant 7 jours

Figure 32 : Évolution de l'oxydation (Absorbance spécifique (densité optique à 233 nm normalisée par la concentration de lipides)) pour l'huile de colza en phase continue (—), le mélange d'huile de colza et de lécithine en phase continue (—·), l'émulsion stabilisée par du Tween 80 (—), les émulsions à différents rapports PL : OBP 1 : 0 (—), 1 : 1 (—) et 1 : 3 (—), les mélanges d'huile de colza et d'OBP en phase continue 0,5% (—·) et 1,5% (—·) entreposées à 60°C pendant 7 jours

Figure 33 Représentation schématique du captage et du devenir intra-entérocytaire des acides gras

Figure 34 : Observations microscopiques des émulsions avec des rapport PL : OBP 1 : 0 (a, d, g), 1 : 1 (b, e, h) et 1 : 3(c, f, i) immédiatement après préparation (a-c), immédiatement après l'acidification à pH 1,5 (d-f) et après 3h à pH 1,5 (g-i)

Figure 35 : Activité de la lipase pancréatique pour les émulsions avec un rapport PL : OBP de 1 : 0 (■), 1 : 1 (■) et 1 : 3 (■) en conditions *in vitro* à 37°C.

Figure 36 : Quantification des acides gras lymphatiques totaux pour l'huile en phase continue (■), les émulsions avec des rapports PL : OBP 1 : 0 (■) et 1 : 3 (■)

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux acides gras insaturés de l'huile de colza

Tableau 2: Composition typique (%) en phospholipides et en acides gras de la lécithine de colza

Tableau 3 : Composition typique du tourteau délipidé de colza (sur une base d'humidité de 12%)

Tableau 4 : Contribution des groupes chimiques dans le calcul du HLB (Davies, 1957)

Tableau 5 : Tableau récapitulatif non exhaustif présentant des exemples d'étude portant sur des interfaces colloïdales mixtes PL : protéines

Tableau 6 : Composition typique du tourteau délipidé de colza

Tableau 7 : Composition des corps lipidiques en phospholipides

Tableau 8 : Liste non-exhaustive des émulsifiants généralement reconnus inoffensifs (GRAS) et leur numéro de règlement selon les autorités nord-américaines et européennes (FederalRegister, 2015, Hasenhuettl, 2008)

Tableau 9 : Liste non exhaustive des émulsifiants utilisés comme additifs alimentaires directs et leur numéro de règlement selon les autorités nord-américaines et européennes (FederalRegister, 2015, Hasenhuettl, 2008)

Tableau 10 : Provenance et pureté des produits et solvants utilisés

Tableau 11 : Température de transition des phospholipides purs

Tableau 12 : Tableau des compositions des formulations des émulsions huile dans eau (20% m/m)

Tableau 13 : Conditions expérimentales simulant le pH et le temps de résidence du tractus gastrointestinal (Couedelo et al., 2011)

Tableau 14 : Composition du tourteau de colza et de l'extrait protéiques

Tableau 15 : Synthèse des interactions PL : OBP d'après les résultats obtenus en FTIR

Tableau 16 : Moyenne des diamètres moyens en volume (D(4,3)) juste après fabrication correspondant à 5 préparations d'émulsion indépendantes aux pH 5,5 et 7,5 pour différents rapports PL : OBP

Tableau 17 : Recouvrement interfacial des OBP pour les émulsions à différents rapports PL : OBP à pH 5,5 et 7,5

Tableau 18 : Indice de crémage pour les émulsions à différents rapports PL : OBP à pH 5,5 et 7,5

Tableau 19 : Composition en acides gras totaux dans la lymphe

Tableau 20 : Composition en phospholipides et en acides gras de la lécithine de colza et l'huile de colza

Tableau 21 : Tableau des acides gras de la lécithine

AA	: Acide Arachidonique
AG	: Acides Gras
AGL	: Acides Gras Libres
AGMI	: Acides Gras Monoinsaturés
AGPI	: Acides Gras Polyinsaturés
AGS	: Acides Gras Saturés
ALA	: Acide α -Linoléinique
AOAC	: Association of Official Analytical Chemists
CANOLA	: Canadian Oil, Low Acid erucic
CD	: Diènes Conjugués ou Conjugated Dienes
CPG	: Chromatographie en Phase Gazeuse
DAG	: Diacylglycérides ou Diacylglycérol
DCl	: Chlorure de Deutérium
DHA	: Acide Docosahexaénoïque
DO	: Densité Optique
DMPC	: Dimyristoylphosphatidylcholine
DMPG	: Dimyristoylphosphatidylglycérol
DOPC	: Dioléoylphosphatidylcholine
DOPE	: Dioléoylphosphatidylétholamine
DOPS	: Dioléoylphosphatidylsérine
DPPC	: Dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPG	: Dipalmitoylphosphatidylglycérol
EFPM	: Émulsifiants à Faible Poids Moléculaire
EMAG	: Esters Méthyliques d'Acides Gras
EPA	: Acide Eicosapentaénoïque
FDA	: Food and Drug Administration
FID	: Free Induction Decay
FTIR	: Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
GEA	: Équivalent d'Acide Gallique (Gallic Acid Equivalents)
GRAS	: Généralement reconnus inoffensifs ou Generally Recognized As Safe
HLB	: Balance Hydrophile-Lipophile
H/E	: Huile dans Eau

IP : Indice de peroxyde
LA : Acide Linoléique
MAG : Monoacylglycérides ou Monoacylglycérol
NaOD : Deutéroxyde de sodium
OB : Corps lipidiques ou Oil Bodies
OBP : Protéine du corps lipidique ou Oil Bodies Protein
PA : Acide phosphatidique
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidylethanolamine
PI : Phosphatidylinositol
PL : Phospholipides
PS : Phosphatidylsérine
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
SDS : Dodécyl Sulfate de Sodium
TA : Tensioactif
TAG : Triacylglycérides ou Triacylglycérol
UE : Union Européenne

« L'alimentation optimale est la médecine de l'avenir »

- Linus Pauling

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à remercier mes deux directrices, Maud Cansell et Muriel Subirade sans qui cette aventure n'aurait pu être possible. Vos conseils, votre rigueur, votre support et votre encadrement m'ont permis d'avancer et d'évoluer tant professionnellement que personnellement tout au long de la thèse. Vous avez su me motiver à me surpasser et à persévérer dans les moments difficiles. Maud, merci d'avoir su souligner adroitement mes forces et mes faiblesses. Tu as su me motiver à exploiter les ressources qui sont en moi et à vouloir m'améliorer constamment. Ton écoute, ta compréhension comme ta force et ton côté exigeant m'ont permis d'avancer même dans les moments où j'aurais aimé tout quitter. Muriel, merci d'avoir cru en moi dès le début de mes études graduées. Sans vous, toute cette aventure n'aurait pas eu lieu. Je tenterai de garder en tête l'importance de l'histoire à raconter !

J'exprime également tous mes remerciements aux membres de mon jury : Marc Anton et Dérick Rousseau d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, Guillaume Brisson et Fernando Leal-Calderon, d'être examinateur de mes travaux.

J'aimerais souligner la précieuse aide technique et le support moral offerts par Diane Gagnon. Merci pour ton écoute dans les moments difficiles et pour nos moments de complicité. Ta bonne humeur et ton positivisme ont emmiuté mon séjour québécois. Ma reconnaissance va également à Mathieu Delample. Ton écoute, tes conseils et surtout nos moments de rire ont été salutaires et ce, à plusieurs reprises !

Je veux également porter une attention particulière à Thierry Lefèvre. Tu as su me transmettre une partie de ta passion et ton expertise en spectroscopie. J'aimerais aussi souligner l'importance de la présence de Jean Toutain. Ton optimisme et tes apprentissages m'ont presque convaincue d'aimer la programmation.

Un merci spécial à Julien Monteil pour ta patience et ta disponibilité face aux adversités techniques que j'ai rencontrées et pour ta compréhension face aux différences culturelles. Durant cette thèse, j'ai également eu l'opportunité de travailler et échanger avec plusieurs professionnels dont Anne-Françoise, Axelle, Ahmed, Alain, Allison, Benoît, Crystel, Estelle, Étienne, François, Hélène, Raphaëlle, etc. Votre contribution et vos expertises respectives ont embelli mon passage aux études supérieures. Vous avez tous contribué à enrichir mon bagage scientifique. Je veux également souligner toute l'équipe de l'ITERG avec qui j'ai eu le privilège de travailler. Merci pour votre aide et votre accueil.

J'ai également eu la chance de participer à l'encadrement de plusieurs stagiaires. Clémence, Jad et Jean, je suis reconnaissante pour votre participation et votre investissement à la réalisation de ce projet de recherche. Travailler avec vous a enrichi mon expérience au sein du CBMN.

Bien sûr, je tiens à offrir un grand merci à tous mes collègues doctorants, post-doctorants et autres de part et d'autre de l'océan ; surtout les collègues du 3325 et les 4 filles du CBMN ! Les moments de décompression, de sport et de rire seront gravés dans ma mémoire.

Je dois également souligner la patience, l'écoute, l'humour et la compréhension de plusieurs personnes particulières sans qui cette aventure n'aurait pas été la même, Claudy, Karine, Émilie, Léo, Ingrid, Maëlle, Amandine. Merci de m'avoir rappelé que la vie d'un doctorant ne tient pas qu'à la thèse !

Je veux également souligner l'importance de mon mentor, Yankel Trégan. Ta présence dans ma vie professionnelle a élevé mes standards en matière de professionnalisme et d'exigence. Ta guidance m'a préparée aux contrariétés du doctorat.

Et, en dernier, mais non les moindres, je veux souligner la présence et le support de ma famille ; mes sœurs et mes parents. Les sœurs, je sais que je peux toujours compter sur vous quand le besoin se fait ressentir ! Les parents, l'importance que vous avez accordée à la culture et à l'éducation ainsi que vos encouragements m'ont permis de me réaliser dans toutes mes passions et mes projets. Ce bel héritage me suivra pour les projets à venir.

Avant-Propos

Ce doctorat a été effectué en partenariat entre l'Institut sur la Nutrition et les Aliments Fonctionnels (INAF – Université Laval – Département des sciences des aliments) sous la direction du Pr Muriel Subirade et l'Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets (CBMN – UMR 5248 – CNRS – Université de Bordeaux - Bordeaux INP) sous la direction du Pr Maud Cansell (Bordeaux INP). Ces travaux de thèse n'auraient pu avoir lieu sans la collaboration d'Ahmed Gomaa, Professionnel de recherche à l'INAF et de Leslie Couëdelo, ingénieur de recherche au Département de Nutrition, Métabolisme et Santé de l'Institut des corps gras (ITERG, Pessac). Ce projet a été financé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) dans le cadre du projet *Mécanisme de formation de particules fonctionnelles pour l'alimentation*.

Cette thèse se divise en 6 chapitres. Le premier chapitre présente une revue de la littérature traitant de l'importance de l'interface colloïdale dans la stabilité des émulsions avec une attention particulière portée sur les corps lipidiques comme sources de tensioactifs végétaux naturels. Ce chapitre permet de contextualiser le sujet de recherche, d'énoncer des hypothèses de travail et de formuler les objectifs à atteindre. Le deuxième chapitre détaille le matériel et les différentes méthodes utilisés. Les trois chapitres suivants présentent les principaux résultats obtenus au cours de ce projet. Finalement, le dernier chapitre conclut ce projet de doctorat et envisage les principales perspectives pour la suite des travaux dans ce domaine.

L'auteure de cette thèse a été en charge de la conception, de la planification, de l'exécution des expérimentations, de l'interprétation des résultats et de la rédaction des articles qui en découlent. Pr. Muriel Subirade et Pr. Maud Cansell, directrices de ce doctorat ont contribué à la conception des plans expérimentaux, à la discussion menant à l'analyse des résultats et à la révision des articles. Dr. Ahmed Gomaa a contribué à la réalisation expérimentale de l'étude des interactions lipides / protéines par spectroscopie infrarouge, à la discussion pour l'interprétation de ces résultats ainsi qu'à la révision de l'article scientifique publié en 2018. Dr. Leslie Couëdelo a contribué à la réalisation expérimentale de l'étude de bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat ainsi qu'à la révision de l'article scientifique qui sera soumis prochainement pour publication.

Avant-Propos

Ce travail de thèse a été valorisé par les contributions suivantes :

Publications :

- Bourgeois, C., Gomma, A., Lefèvre, T., Cansell, M., Subirade, M., *Interaction of oil bodies proteins with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy*. International Journal of Biological Macromolecules (soumis le 20 juin 2018).
- Bourgeois, C., Couédelo, L., Subirade, M., Cansell, M., *Emulsions based on oil bodies proteins and phospholipids. In vitro and in vivo studies* (en rédaction).

Communications orales :

- Bourgeois, C., Gomma, A., Lefèvre, T., Cansell, M., Subirade, M., *Influence of colloidal interface structuration on formulation and nutritional fatty acids bioavailability*, Biopolymers 2017, 29 novembre 2017, Nantes, France
- Bourgeois, C., Couedelo, L., Subirade, M., Cansell, M. *Influence of colloidal interface structuration on formulation and fatty acid bioaccessibility*, Journée scientifique du CBMN, 31 mai 2018, Talence, France
- Bourgeois, C., Gomma, A., Couedelo, L., Subirade, M., Cansell, M. *Influence of colloidal interface structuration on formulation and fatty acid bioaccessibility*, 3rd Food Structure and Functionality Forum Symposium, 3-6 juin 2018, Montréal, Canada

Communication par poster :

- Bourgeois, C, Gomma, A, Cansell, M, Subirade, M. *Optimization of the protection and bioavailability of nutritional fatty acids by structuration of colloidal interface: A study of interactions between oil bodies membrane proteins and phospholipids*, 19^{ème} Journée de l'École doctorale des sciences chimiques de l'Université de Bordeaux, 5 mai 2017, Talence, France

Introduction générale

Les acides gras polyinsaturés (AGPI), tels les acides gras (AG) oméga 3 (ou n-3) et oméga 6 (ou n-6), jouent un rôle majeur dans de nombreuses fonctions physiologiques (Riediger et al., 2009). Parmi ceux-ci, l'acide α -linoléique (18:3 n-3, ALA) et l'acide linoléique (18:2 n-6, LA), non synthétisés par l'organisme humain, sont dits indispensables et doivent être apportés par l'alimentation. Les études épidémiologiques démontrent un apport insuffisant d'ALA ainsi qu'un déséquilibre du rapport LA : ALA dans la majorité des pays occidentaux (AFSSA, 2017, Elmadfa et Kornsteiner, 2009, SantéCanada, 2006) justifiant la recherche de nouvelles stratégies pour favoriser les apports en AGPI n-3. Néanmoins, ces stratégies doivent prendre en considération la sensibilité des AGPI à l'oxydation qui est l'une des premières causes de la détérioration des qualités organoleptiques et nutritionnelles des aliments. Il s'agit d'une préoccupation majeure des industriels souhaitant formuler des produits enrichis en AGPI n-3, justifiant l'adoption de stratégies technologiques afin de les protéger (Cui et Decker, 2016).

Parallèlement, les AGPI n-3 étant apportés par des huiles, l'enrichissement des produits alimentaires passe souvent par l'utilisation de systèmes polyphasiques de type émulsion, stabilisés par des tensioactifs (TA) synthétiques ou naturels (Logan et al., 2013). Des études récentes ont démontré des corrélations positives entre l'exposition à certains TA de synthèse utilisés dans l'industrie agroalimentaire et le développement de l'obésité, de maladies métaboliques, de dérèglements dysbiotiques et de dérèglements du système immunitaire (Chassaing et al., 2015, Roberts et al., 2010). De plus, certaines sources d'émulsifiants naturels (lécithine d'œuf, protéines laitières, par exemple) sont associées à des risques allergéniques (Sicherer et Sampson, 2014). Enfin, les TA de synthèse ou naturels sont régulièrement utilisés en mélange et très peu d'études traitent des impacts d'un apport simultané de plusieurs TA sur les propriétés physicochimiques de systèmes colloïdaux ou sur la biodisponibilité des huiles émulsionnées.

Ce travail de thèse se place donc dans le contexte général de proposer des TA d'origine naturelle, alternatifs aux TA de synthèse et de caractériser les émulsions formulées tant sur le plan physicochimique que sur leur impact sur la biodisponibilité des AG de l'huile. Depuis quelques années, des recherches ont été menées sur les corps lipidiques en tant que structures naturelles présentes dans certaines plantes oléagineuses (Rayner, 2015). En effet, ces plantes emmagasinent leurs réserves lipidiques dans des structures dont la stabilité physique et chimique est assurée par une monocouche de phospholipides (PL) dans laquelle s'insère un

ensemble protéique composé très majoritairement d'oléosines (Jolivet et al., 2009). L'utilisation de ces protéines associées à des PL végétaux pourrait constituer une alternative intéressante non seulement aux TA de synthèse mais aussi aux TA naturels d'origine animale. Par conséquent, l'objectif général de ce projet de thèse vise à maîtriser la formulation d'émulsions à base d'oléosines et de PL, à caractériser les émulsions notamment au niveau de l'oxydation des lipides et, enfin, à comprendre l'impact de la formulation sur la biodisponibilité des AGPI n-3.

Pour atteindre ce but principal, plusieurs approches ont été investiguées et qui constituent les différents chapitres de ce document. La partie bibliographique permet de faire un état de l'art des connaissances actuelles sur les corps lipidiques et notamment des interactions entre l'oléosine et les PL. Compte-tenu du peu de données sur ces interactions, le premier chapitre expérimental de ce travail de thèse vise à caractériser l'impact de la nature des PL, notamment des têtes polaires et de la longueur des chaînes hydrocarbonées hydrophobes, sur les interactions entre l'oléosine extraite de tourteau de colza et des PL modèles à l'interface colloïdale. Le second chapitre expérimental vise à formuler et caractériser des émulsions huile dans eau (H/E) en utilisant les protéines extraites de tourteau de colza et des PL de colza dans différentes proportions. Les résultats de stabilité physique et chimique des émulsions sont interprétés en utilisant les données obtenues sur les systèmes modèles. Les émulsions sont ensuite placées dans différentes conditions mimant celles du milieu gastro-intestinal afin d'appréhender leur comportement vis-à-vis de facteurs physicochimiques impliqués dans la digestion. Le troisième chapitre expérimental présente l'influence de la composition de l'interface des émulsions sur la biodisponibilité des AG, notamment de l'ALA (18:3 n-3), *in vivo* chez le rat. Les résultats obtenus sont interprétés sur la base de l'étude *in vitro*. La conclusion vise à faire émerger une ou plusieurs formulations d'intérêt soit pour ses propriétés physicochimiques soit pour ses avantages nutritionnels, pour des applications en agroalimentaire et/ou en diététique.

CHAPITRE I : État de l'art

1. Le colza : une source végétale d'intérêt

Cette partie est dédiée au colza et vise à démontrer l'intérêt de cette ressource végétale oléagineuse, non seulement pour l'huile contenue dans les graines mais aussi pour des molécules à haute valeur ajoutée comme les PL et les protéines présentes dans les tourteaux.

Le colza, de la famille des crucifères, est cultivé depuis l'Antiquité. La composition équilibrée de son huile et de sa forte teneur en ALA (plus de 5% des AG totaux) le rend très intéressant pour la consommation humaine. Cependant, sa composition native en acide érucique (20:1) et en glucosinolates a soulevé des interrogations quant à l'impact de sa consommation sur la santé des consommateurs (Borg, 1975, Fenwick et Heaney, 1983). C'est pourquoi, dans les années 1970, des chercheurs de l'Université du Manitoba ont introduit un nouveau cultivar obtenu par sélection génétique contenant peu d'acide érucique et de glucosinolates (Stefansson et Kondra, 1975). L'attribution de la mention *Generally Recognized As Safe (GRAS)* attribuée par la Food and Drug Administration (FDA) et l'appui de l'American Heart Association ont conforté la consommation de l'huile de colza. En France, l'huile alimentaire issue d'organismes génétiquement modifiés étant interdite, les nouveaux types variétaux de colza « 0 » acide érucique ont été obtenus par sélection de lignées et d'hybrides. Ainsi, l'intérêt nutritionnel grandissant pour l'huile de colza s'est traduit par une augmentation drastique du nombre de cultivars exploités propulsant le colza au troisième rang de la production mondiale en oléagineux derrière le palme et le soja (USDA, 2017). Notons que le colza représente la principale culture oléagineuse au Canada (StatistiqueCanada, 2017) et en France (Prolea, 2013). Le terme *canola*, contraction pour CANadian Oil, Low Acid erucic, est utilisé en anglais pour distinguer les cultivars produisant des huiles pauvres en acide érucique et en glucosinolates (< 2% d'acide érucique et < 30 $\mu\text{mol/g}$ de glucosinolates) de ceux dont le contenu est élevé. En France, le terme *colza* représente les cultivars offrant une composition propre à la consommation humaine.

Les procédés de trituration et de raffinage à partir des graines de colza permettent l'obtention de plusieurs composés dont l'huile, la lécithine (définie ici comme un mélange de PL) issue de l'étape de dégommage et le tourteau, résidu solide obtenu après extraction de l'huile (Figure 1). Plus précisément, après un écaillage des graines afin de faciliter l'extraction de l'huile, un procédé de chauffage est appliqué, jouant un rôle important d'inhibition d'enzymes, dont les

lipases, conduisant à l'hydrolyse des lipides. Les graines sont ensuite pressées, permettant d'extraire de 60 à 70% de l'huile disponible (Daun et al., 2011). On obtient une huile brute de pression et un résidu solide, le tourteau, contenant encore environ 30% d'huile. Cette dernière est extraite du tourteau par solvant (isohexane). L'huile brute de pression et l'huile d'extraction sont alors mélangées pour entrer dans le processus de raffinage.

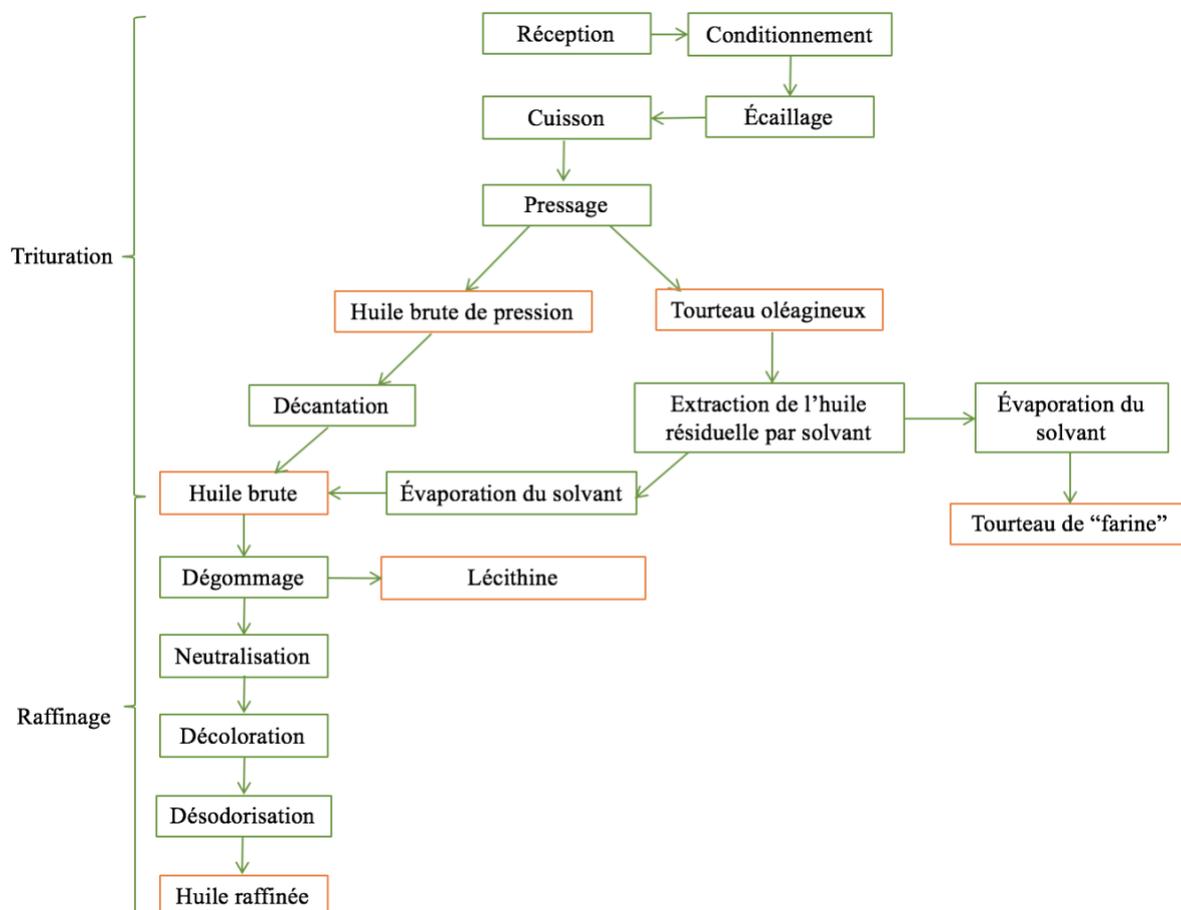


Figure 1: Procédé d'extraction de l'huile par pressage et extraction par solvant. Adapté de Daun et al. (2011)

Les étapes du raffinage visent à éliminer un certain nombre de composants considérés comme délétères vis-à-vis de la qualité de l'huile, dont font partie les PL. En effet, la présence de PL dans l'huile brute entraîne une acidification de l'huile, une oxydation des AG due à l'affinité des têtes polaires pour les métaux lourds, une diminution du rendement en huile due à leurs propriétés tensioactives, par entraînement des triglycérides (TAG), une désactivation des terres décolorantes utilisées en fin de raffinage et un colmatage rapide des filtres (Karleskind, 1992, Pages, 2008).

Les PL sont éliminés au début du raffinage lors de l'étape de démulcination ou dégommage. Le dégommage consiste à disperser, dans l'huile brute chauffée à 60°C, 1 à 3% d'acide phosphorique commercial à 75%. La présence de l'acide permet l'hydratation de certains PL

CHAPITRE I : État de l'art

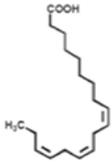
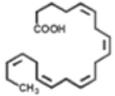
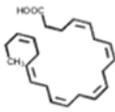
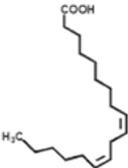
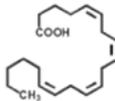
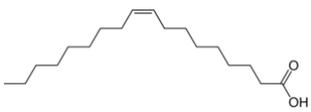
peu polaires (notamment l'acide phosphatidique (PA)) par la formation de sels monovalents. Après une phase de mélange de quelques dizaines de minutes, l'émulsion est chauffée à 90°C et hydratée avec 2 à 3% d'eau avant d'être brassée à nouveau pendant une vingtaine de minutes pour assurer l'hydratation de l'ensemble des PL. Le mélange est ensuite refroidi jusqu'à 50°C pour insolubiliser les phosphatides avant leur séparation par centrifugation (Karleskind, 1992). La « gomme » obtenue est séchée par évaporation. La lécithine brute est, par la suite, conservée à froid (van Nieuwenhuizen et Tomás, 2008). Elle peut encore contenir jusqu'à 33% d'huile. Ainsi, suivant le degré de pureté souhaité, une étape de déshuilage peut être réalisée par de l'acétone à froid (0 à 4°C) qui solubilise les TAG et précipite les PL.

1.1. Huile de colza

L'huile de colza est stockée au sein des graines corps lipidiques (oil bodies, OB) (§ I-3). C'est une huile dite linoléique car elle contient plus de 5% d'ALA. Elle se distingue des principales autres sources lipidiques alimentaires par son ratio en AG n-6 : n-3 variant de 2,5 à 2, sa forte teneur en AG monoinsaturés (AGMI) (> 50% des AG totaux) et, par conséquent, sa faible teneur en AG saturés (AGS). L'huile de colza est donc riche en LA (15 - 30%) et ALA (5 - 14%) (FOA et OMS, 1999) (Tableau 1). Ces deux AGPI indispensables se distinguent par leur rôle de précurseurs pour la bioconversion des AGPI n-3 et n-6 à plus longue chaîne dits essentiels, comme l'acide arachidonique (AA, 20:4, n-6), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5, n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6, n-3), dont les fonctions structurales et fonctionnelles sont déterminantes. Le DHA, dérivé de l'ALA, est également considéré par certaines autorités (ANSES, 2013) comme un AG indispensable, car son taux de conversion à partir de l'ALA est très faible (de l'ordre de 1 à 9 %) (Arterburn et al., 2006, Harnack et al., 2009, Legrand, 2010). Ces 5 AGPI se distinguent par leurs effets pléiotropiques bénéfiques : leur impact sur les concentrations de lipides circulants, les altérations structurales et fonctionnelles des membranes cellulaires dans lesquelles ils s'incorporent, leur implication dans la cascade de production d'eicosanoïdes et leur impact sur l'expression de certains gènes (Guesnet et al., 2005a, Riediger et al., 2009).

Outre sa richesse en AGPI, l'huile de colza présente une teneur importante en AGMI, notamment l'acide oléique (18:1, n-9) (51 - 70%) (FOA et OMS, 1999). Les AGMI ont des effets protecteurs sur les maladies cardiovasculaires et le syndrome métabolique via la modulation du profil lipidique, de la pression sanguine, du glucose sanguin et de la sensibilité à l'insuline (Gillingham et al., 2011).

Tableau 1: Principaux acides gras insaturés de l'huile de colza

<i>Acides Gras</i>	<i>Formule</i>	<i>Composition</i>
FOA and OMS (1999)		
Acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI n-3)		
<i>Acide α-linoléique (ALA)</i>		18:3 5-14 %
<i>Acide eicosapentaénoïque (EPA)</i>		20:5 > 1%
<i>Acide docosahexaénoïque (DHA)</i>		22:6 > 1%
Acides gras polyinsaturés oméga-6 (AGPI n-6)		
<i>Acide linoléique (LA)</i>		18:2 15-30 %
<i>Acide arachidonique (AA)</i>		20:4 > 1%
Acide gras monoinsaturé (AGMI)		
<i>Acide oléique</i>		18:1 51-70 %

CHAPITRE I : État de l'art

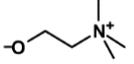
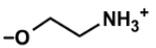
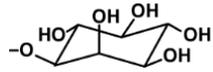
Ainsi, le profil lipidique de l'huile de colza répond aux recommandations de plusieurs autorités, dont l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) et Santé Canada, qui proposent notamment l'ingestion d'un ratio entre le LA (18:2 n-6) : et l'ALA (18:3 n-3) inférieur ou égal à 5 : 1 et une consommation en AGMI représentant au moins 20% l'apport énergétique total quotidien. Sa composition en AG confère également à l'huile de colza des allégations de richesse en AG insaturés et de diminution du cholestérol selon le gouvernement canadien (ACIA, 2017). De plus, sa faible composition en AGS, en AG *trans* et en cholestérol lui vaut l'appui de l'American Heart Association. En outre, elle est considérée comme une bonne source en vitamine E, un antioxydant naturel (CanolaCouncil, 2017).

1.2. Lécithine de colza

Pour l'industrie agroalimentaire, une lécithine correspond à un additif alimentaire (E322) composé d'un mélange de PL (teneur supérieure à 50 ou 60% suivant les législations), de cholestérol et de TAG (Hasenhuettl, 2008, Li et al., 2015a, van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008).

Les PL sont des molécules amphiphiles constituées d'une tête polaire comprenant une partie hydrophobe (généralement, 2 chaînes d'AG), un groupement phosphoryle sur lequel peut éventuellement être additionné un groupement azoté (choline, sérine ou éthanolamine), un sucre (inositol) ou un autre glycérol (Tableau 2). La lécithine de colza contient majoritairement de la phosphatidylcholine (PC), de la phosphatidyléthanolamine (PE) (PL zwitterioniques) et du phosphatidylinositol (PI) (PL anionique) (Tableau 2) (van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008, Xie et Dunford, 2017). La composition des chaînes acyles est caractérisée par la présence d'acide oléique (18:1) et de LA (18:2) (Xie et Dunford, 2017, van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008, Helmerich et Koehler, 2003) (Tableau 2).

Tableau 2: Composition typique (%) en phospholipides et en acides gras de la lécithine de colza

<i>Phospholipides (%)</i>	<i>Tête polaire</i>	<i>Composition de la lécithine de colza</i>		
		Helmerich and Keohler (2003)	van Nieuwenhuyzen et Tomás (2008)	Xie et al (2017)
<i>Phosphatidylcholine</i>		16 – 25	37	6 – 22
<i>Phosphatidyléthanolamine</i>		4 – 12	20	3 – 16
<i>Phosphatidylinositol</i>		11 – 14	22	29 – 33*
<i>Acide phosphatidique</i>	-H	3 – 7	9	
<i>Autres phospholipides</i>		2 – 15	6	7 - 26
<i>Acides gras des phospholipides totaux (%)</i>				
<i>Acide palmitique (16:0)</i>		n/d	7	6 – 11
<i>Acide stéarique (18:0)</i>		n/d	1	0,8 – 1,2
<i>Acide oléique (18:1)</i>		n/d	56	50
<i>Acide linoléique (18:2)</i>		n/d	25	31 – 36
<i>Acide linoléique (18:3)</i>		n/d	6	5 - 6
<i>Autres acides gras</i>		n/d	5	1 - 2

n/d : non déterminé

*pourcentage pour le PI et le PA

CHAPITRE I : État de l'art

1.3. Tourteau de colza

La composition des tourteaux reflète la variabilité de la nature des graines utilisées (lieu de la culture, conditions climatiques, cultivar) et, dans une moindre mesure, des conditions de procédé d'extraction de l'huile. La composition typique du tourteau de colza délipidé est présentée dans le Tableau 3 (Daun et al., 2011, Li et al., 2015b, CanolaCouncil, 2015).

Tableau 3 : Composition typique du tourteau délipidé de colza (sur une base d'humidité de 12%)

<i>Composition</i>			
	Daun et al (2011)	Canola Council (2015)	Li et al (2015)
<i>Protéines (%)</i>	36	37	39 – 44
<i>Lipides (%)</i>	3,5	n/d	n/d
<i>Cendre (%)</i>	6	7	7 – 10
<i>Fibres crues (%)</i>	12	11	13 – 17
<i>Fibres totales (%)</i>	n/d	32	28 – 41
<i>Glucosinolates ($\mu\text{mol/g}$)</i>	7	4	4 – 23

n/d : non déterminé

À l'heure actuelle, le tourteau est principalement utilisé pour l'alimentation animale, notamment pour sa forte teneur en protéines (36 - 39%), sa composition équilibrée en acides aminés essentiels et non-essentiels (Klockeman et al., 1997). De plus, les protéines de colza présentent un Score Chimique Corrigé de la Digestibilité de 0,83 – 0,93, soit un indice de digestibilité comparable à ceux de plusieurs sources de protéines animales comme les œufs (1,00), le lait (1,00) et le poisson (1,00). La qualité d'une source protéique se mesure aussi avec l'indice de digestibilité véritable de l'azote (nutriments digestibles totaux). Les protéines de colza, sous forme d'isolat ou d'hydrolysat, se caractérisent par des valeurs similaires de nutriments digestibles totaux (93,3 – 97,3% respectivement) à celles de plusieurs sources animales (œufs (98%), caséine (95%), collagène (95%)). Elles présentent une meilleure digestibilité que plusieurs sources végétales telles que le blé (91%) ou les haricots (78%) (Fleddermann et al., 2013).

Parmi les protéines de colza, on distingue :

- les protéines de stockage avec deux protéines majoritaires, la cruciférine (12S globuline) et la napine (2S albumine), représentant 32 – 60% et 20 – 45%

respectivement des protéines totales dans les graines de colza selon le stade de maturité de la graine (Höglund et al., 1991, Wanasundara, 2011). Ces dernières, produites durant la maturation, s'accumulent et se densifient dans des compartiments spécialisés, les corps protéiques, générés à partir des vacuoles de stockage des protéines, avant d'être utilisées comme source d'azote lors de la germination de la graine (Wanasundara, 2011).

- Les protéines de structure avec les OBP décrites ultérieurement (§ I-3) représentant 2 à 8% des protéines totales (Tzen et Huang, 1992, Wanasundara, 2011).

2. Émulsions : rôle clé de l'interface colloïdale

La stabilité des émulsions est corrélée principalement à la surface interfaciale générée lors de leur fabrication. À cette interface, s'adsorbent les TA grâce à leur nature amphiphile qui leur permet d'interagir avec les deux phases liquides non miscibles du mélange. L'adsorption de ces molécules permet de réduire la tension interfaciale entre les deux liquides et, ainsi, de participer à la stabilisation des gouttelettes formées et de prévenir la déstabilisation du système biphasique. Ce chapitre se place, dans un premier temps, au niveau macroscopique des émulsions (formation et destruction du système) et, dans un deuxième temps, au niveau moléculaire (rôles des TA et interactions aux interfaces).

Les émulsions sont des dispersions colloïdales composées de deux liquides non miscibles dont la phase dispersée se trouve sous forme de fines gouttelettes dans une phase continue. Dans le cas des émulsions directes H/E, représentant de nombreux systèmes alimentaires comme le lait, les sauces et les vinaigrettes industrielles, des gouttelettes d'huile sont dispersées dans une solution aqueuse. Ces matrices biphasiques sont instables thermodynamiquement : la séparation des phases non miscibles est donc inévitable. Cette séparation peut survenir en quelques minutes ou après plusieurs années. L'usage adéquat de tensioactifs permet de réaliser des formulations cinétiquement plus stables, on parle alors de systèmes métastables.

2.1. Émulsions

2.1.1. Principes de l'émulsification

L'émulsification consiste à amener suffisamment d'énergie au système polyphasique pour causer le fractionnement de la phase dispersée et l'adsorption des TA aux interfaces. Au sein de chaque phase liquide, les molécules, de même nature, interagissent entre elles selon une force d'attraction résultante nulle (Figure 2). Cependant, pour les molécules aux interfaces, la résultante des forces attractives (F_1) est non nulle et orientée vers l'intérieur de la gouttelette du liquide dispersé : c'est la tension de surface (ou tension interfaciale, γ) (Équation 1). Cette relation est définie selon l'énergie libre (ΔG) à fournir au système pour augmenter d'une surface ΔA l'interface de contact entre les deux phases.

$$\gamma = \frac{\Delta G}{\Delta A} \quad \text{Équation 1}$$

γ : Tension interfaciale exprimée en J/m^2 ou en N/m
 ΔG : Énergie libre à l'interface
 ΔA : Surface de contact entre les deux phases non miscibles

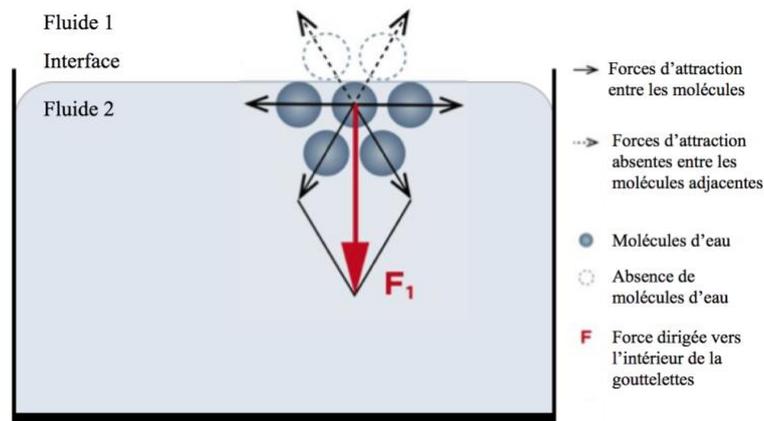


Figure 2 : Représentation des forces d'attraction intermoléculaire à l'interface de deux liquides non miscibles. Adapté de Broil et Schott (2014)

Le fractionnement de la phase dispersée cause l'augmentation de la surface de contact entre les deux phases non miscibles et requiert de l'énergie, appliquée sous forme mécanique. Les dispositifs conventionnels pour l'émulsification en industrie, comme les mélangeurs haute vitesse, les moulins colloïdaux, les sondes ultrasons, les homogénéisateurs haute pression et les micro-fluidiseurs, fournissent cette énergie (Britten, 2015, Leal-Calderon et al., 2007). Ces appareils soumettent les gouttelettes grossières à des contraintes de cisaillement, de cavitation, de turbulence, etc., selon un écoulement laminaire ou turbulent, qui engendrent leur fractionnement et, donc, la création de gouttelettes plus fines avec une distribution plus homogène.

L'énergie mécanique apportée durant l'émulsification est souvent très élevée par rapport à l'énergie globale du système émulsionné. Une partie du surplus d'énergie est alors évacuée sous forme de chaleur (dissipation visqueuse). Ce nouvel état énergétique implique donc que l'émulsion va évoluer dans le temps selon plusieurs mécanismes de déstabilisation.

2.1.2. Mécanismes de déstabilisation des émulsions

Les principaux mécanismes de déstabilisation sont les séparations gravitationnelles (crémage et sédimentation), la floculation, la coalescence et le mûrissement d'Oswald (Figure 3).

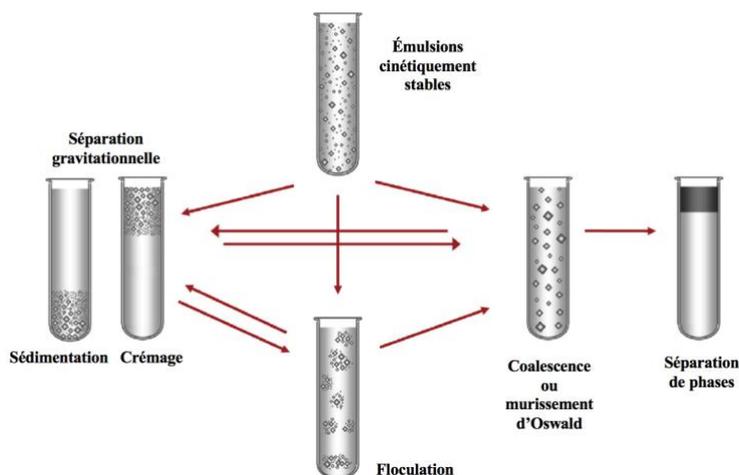


Figure 3 : Mécanismes de déstabilisation des émulsions. Adapté de Piorkowski et McClements (2014)

2.1.2.1. Crémage

Le crémage (ou la sédimentation dans les émulsions inverses eau dans huile) représente une forme de déstabilisation physique trouvée fréquemment dans les émulsions alimentaires. La différence de masse volumique entre les deux phases non miscibles favorise la migration et l'accumulation de la phase moins dense au-dessus de la phase plus dense. La vitesse de migration des gouttelettes est définie selon la loi de Stokes (Équation 2).

$$V = \frac{2r^2 g (\rho_d - \rho_c)}{9\eta} \quad \text{Équation 2}$$

- V : Vitesse de migration (m/s)
- r : Rayon des gouttelettes (m)
- g : Accélération gravitationnelle (m/s²)
- ρ_d : Masse volumique de la phase dispersée (kg/m³)
- ρ_c : Masse volumique de la phase continue (kg/m³)
- η : Viscosité de la phase continue (Pa.s)

Pour minimiser ce phénomène, les stratégies les plus utilisées dans les matrices alimentaires consistent à diminuer la taille des gouttelettes et/ou à augmenter la viscosité de la phase continue.

2.1.2.2. Floculation

La floculation est un phénomène de déstabilisation réversible des émulsions représenté par le développement de flocs (agrégation sous forme d'amas) des gouttelettes huileuses. Ces agrégats surviennent lorsque les gouttelettes entrent en collision et s'assemblent dû aux interactions entre les molécules interfaciales de gouttelettes différentes. La charge interfaciale et la fréquence de collisions entre les gouttelettes sont donc les deux facteurs principaux sous-jacents à ce mécanisme.

Notons que la quantité de TA peut également jouer un rôle dans ce type de déstabilisation. La floculation par pontage reflète une quantité insuffisante de TA pour recouvrir toute la surface des gouttelettes et induit l'adsorption du TA à la surface de plusieurs gouttelettes pour les stabiliser. A contrario, la floculation par déplétion reflète une quantité excédentaire de TA qui provoque leur association et permet la solubilisation de ces molécules dans la phase aqueuse.

2.1.2.3. Mûrissement d'Oswald

Le mûrissement d'Oswald est une forme de déstabilisation irréversible des émulsions qui correspond à un transfert de matière des petites gouttelettes vers les grandes. Selon la loi de Laplace (Équation 3), les petites gouttelettes d'une émulsion subissent une plus grande pression interne que les grandes. Si la pression exercée sur le liquide contenu dans les petites gouttelettes est suffisamment grande, leur contenu peut se solubiliser dans la phase continue (malgré leur très faible miscibilité) et migrer vers une zone de moins grande pression : les plus grandes gouttelettes (McBreen, 2015). Ce type de déstabilisation tend à augmenter la proportion de grosses gouttelettes et favorise le crémage des émulsions.

$$\Delta P = \frac{2\gamma}{\Delta r} \quad \text{Équation 3}$$

ΔP : Différentiel de pression entre l'intérieur et à l'extérieur de la gouttelette (N)

γ : Tension interfaciale (N/m)

Δr : Différentiel de rayon des gouttelettes (m)

2.1.2.4. Coalescence

La coalescence est un phénomène de déstabilisation irréversible qui consiste en la rupture partielle de l'interface et conduit à la fusion de plusieurs gouttelettes. Les mécanismes de la coalescence dépendent, notamment, de la facilité de l'interface à se rompre. Ils interviennent après le phénomène de floculation. Notons que l'augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques favorise le crémage et donc l'entassement des gouttelettes. Ce compactage augmente la pression exercée par les gouttelettes sur leurs voisines, encourageant à son tour la coalescence. On parle alors d'un phénomène autoentretenu.

2.1.3. Les tensioactifs

Il existe plusieurs stratégies pour permettre la fabrication des émulsions et limiter leur vitesse de déstabilisation. La sélection de TA en fait partie. Les TA, de par leur caractère amphiphile, possèdent une activité de surface et abaissent la tension interfaciale (Figure 4). L'affinité du TA pour les deux phases de l'émulsion diminue l'énergie libre à l'interface (ΔG) et favorise la formation des gouttelettes. En parallèle, les TA sont capables de générer des répulsions à

CHAPITRE I : État de l'art

longue portée entre les surfaces, susceptibles de protéger les gouttelettes contre les différents phénomènes d'instabilité. L'efficacité des tensioactifs dépend, notamment, de leurs propriétés mécaniques à l'interface et de leur résistance aux déformations de la membrane qu'ils créent. Ils se divisent généralement en deux catégories : les émulsifiants de faible poids moléculaire et les biopolymères amphiphiles.

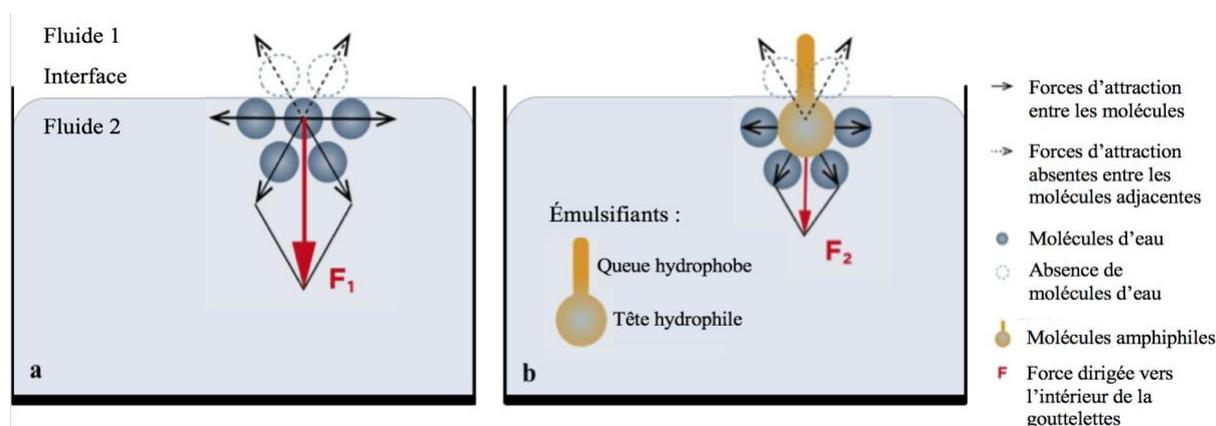


Figure 4 : Représentation des forces d'attraction intermoléculaire à l'interface de deux liquides non miscibles sans (a) et avec (b) tensioactifs. Adapté de Broil et Schott (2014)

2.1.3.1. Émulsifiants de faible poids moléculaire

Les émulsifiants de faible poids moléculaire (EFPM) sont constitués d'une ou de plusieurs chaînes carbonées apolaires lipophiles et d'une tête polaire hydrophile pouvant être anionique, cationique, zwitterionique ou non ionique. L'importance respective des deux parties confère à ces molécules des propriétés de solubilisation et d'affinité chimique qui déterminent leur usage. Parmi les TA couramment utilisés dans l'industrie agroalimentaire, on compte les surfactants tels que les esters de sucrose, les esters de polyglycérol, les esters de sorbitan (SPAN), leurs dérivés polyoxyéthylénés (polysorbate ou Tween) et les dérivés de lipides, notamment les monoglycérides (MAG), les diglycérides (DAG) et les PL (§ I-1.3) (Fameau et al., 2013).

Ces TA sont caractérisés par la valeur de la balance hydrophile-lipophile (HLB) calculée en tenant compte de la contribution des différentes fonctions chimiques (hydrophiles et hydrophobes) présentes dans la molécule (Équation 4). Ainsi, les fonctions hydrophiles contribuent positivement à la valeur de la HLB tandis que les carbones aliphatiques y contribuent négativement (Tableau 4).

$$HLB = 7 + \sum (\text{contribution des différentes fonctions chimiques}) \quad \text{Équation 4}$$

Tableau 4 : Contribution des groupes chimiques dans le calcul du HLB (Davies, 1957)

<i>Groupes hydrophiles</i>	<i>Contribution associée</i>	<i>Groupes lipophiles</i>	<i>Contribution associée</i>
$-SO_4^- Na^+$	38,7	$-CH-$	
$-COO^- K^+$	21,1	$-CH_2-$	- 0,475
$-COO^- Na^+$	19,1	$-CH_3$	
$=N-$	9,4	$=CH-$	
<i>ester span</i>	6,8		
<i>ester libre</i>	2,4		
$-COOH$	2,1		
<i>hydroxyl libre</i>	1,9		
$-O-$	1,3		
<i>hydroxyl span</i>	0,5		

La valeur HLB est un indice couramment utilisé pour prédire le type d'émulsion produit, car elle indique la phase dans laquelle le TA est le plus soluble et qui constitue la phase continue de l'émulsion. Cette échelle se répartit généralement entre des valeurs de 0 à 20, les valeurs élevées étant associées aux TA hydrophiles formant des émulsions directes (Bergensstahl, 2008). Cette méthode de calcul représente un bon outil pour estimer la solubilité des EFPM mais ne s'applique pas aux biopolymères. De plus, elle ne tient pas compte des conditions expérimentales qui peuvent influencer la solubilité des TA comme la température ou la force ionique.

2.1.3.2. Biopolymères amphiphiles

Les biopolymères amphiphiles regroupent majoritairement des protéines et certains hydrocolloïdes, dont la gomme arabique, les amidons modifiés, les celluloses modifiées et certaines pectines (Dickinson, 2009). En ce qui concerne les protéines, leurs propriétés tensioactives proviennent de la proportion des segments hydrophiles et lipophiles (structure primaire) et de la conformation (structures secondaire et tertiaire). On les classe généralement en deux grandes catégories : les protéines flexibles qui se déplient pour s'insérer à l'interface, comme les caséines (Figure 5a) et les protéines globulaires, dont le niveau de dénaturation est plus faible et est atteint plus lentement, comme la β -lactoglobuline (Figure 5b). Néanmoins, il existe une troisième catégorie de protéines, les protéines du corps lipidique (oil bodies proteins, OBP), avec une zone d'ancrage dans la phase lipidique plus importante. Les oléosines,

CHAPITRE I : État de l'art

représentantes principales des OBP, adoptent une conformation particulière une forme en parapluie (§ I-3.2) (Figure 5c).

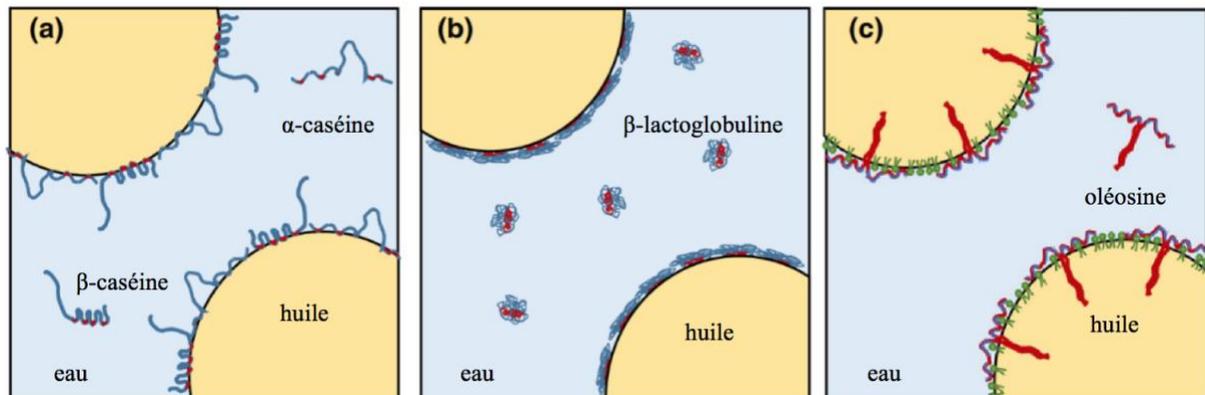


Figure 5 : Représentation de la conformation à l'interface de différents types de protéine. Rouge : section hydrophobe. Bleu : section hydrophile (a) caséine (b) β-lactoglobuline (c) oléosine (Rayner, 2015)

2.1.4. Rôles des tensioactifs dans la mise en place de l'interface

La création du film interfacial se déroule en trois grandes étapes : la migration, l'adsorption et le réarrangement des TA adsorbés.

2.1.4.1. Migration des TA à l'interface

La capacité de migration d'un TA vers l'interface est élément crucial de son efficacité à stabiliser les gouttelettes formées. Cette migration dépend (McClements, 2015) :

- de ses caractéristiques intrinsèques qui définissent son coefficient de diffusion (solubilité, valeur de la HLB, capacité de déformation);
- des propriétés des deux phases liquides (viscosité, force ionique);
- des conditions d'émulsification (température, pression).

2.1.4.2. Adsorption des TA à l'interface

Ces molécules tensioactives s'adsorbent à l'interface avec une énergie de l'ordre de $k_B T$, l'énergie thermique. Il existe alors un équilibre d'adsorption et de désorption des TA à l'interface. Plus la concentration de TA dans la phase dans laquelle il est soluble augmente, plus la concentration de molécules à l'interface est élevée (jusqu'à saturation de l'interface), et, donc, plus la tension de surface diminue.

2.1.4.3. Organisation et réarrangement des TA adsorbés

La conformation de l'interface lipidique influence ses propriétés : la nature et la concentration des TA ainsi que les propriétés physicochimiques du milieu aqueux déterminent les charges

électrostatiques et l'épaisseur de l'interface, responsables de la stabilité des émulsions (Anton et al., 2013, Berton-Carabin et al., 2014, McClements, 2015).

La structure des EFPM génère une monocouche interfaciale flexible très mince. Le faible encombrement stérique de ces émulsifiants leur permet de se compacter à l'interface et d'occuper jusqu'à 98 % de la surface disponible (Dickinson, 1992). Cette répartition très dense et fluide prévient la déstabilisation des émulsions par répulsion de charges (si les TA sont chargés) et par effet Marangoni (Nylander et al., 2008). L'effet Marangoni est un phénomène hydrodynamique. La diffusion rapide des EFPM lors de leur distribution non homogène quand une interface est comprimée ou étirée entraîne les molécules d'eau adjacentes. Ainsi, la diffusion du tensioactif vers le centre entraîne alors, par effet de friction, la phase continue vers la zone confinée. Ce déplacement d'eau restaure la quantité de solution entre les gouttelettes, prévenant leur agrégation (Vignes-Adler et Verlade, 2009).

Lors de leur adsorption à l'interface des gouttelettes lipidiques, les protéines adoptent, quant à elles, une conformation caractéristique permettant aux segments lipophiles de se retrouver dans la phase huileuse et aux segments hydrophiles de se retrouver dans la phase aqueuse, créant alors un film viscoélastique responsable de la stabilité des émulsions (Tcholakova et al., 2006). Ce film, dont la viscosité dépend de la flexibilité des protéines, est beaucoup plus épais que les interfaces composées d'EFPM, certains segments protéiques se dégageant même de la zone interfaciale. Les segments hydrophiles qui se retrouvent dans la phase aqueuse jouent un rôle clé dans la stabilisation des émulsions grâce aux répulsions électrostatiques, aux interactions intermoléculaires et aux répulsions stériques qu'ils engendrent. Lors de cette adsorption, la surface occupée par les segments protéiques représente seulement 30 à 40 % de l'aire disponible, contrairement aux EFPM qui occupent presque totalement la surface (Figure 6) (Dickinson, 1992). De plus, la conformation (compactage, multicouche, formation de liaisons covalentes, etc.) des protéines à l'interface est dépendante de leur nature et de leur concentration (Figure 6).

CHAPITRE I : État de l'art

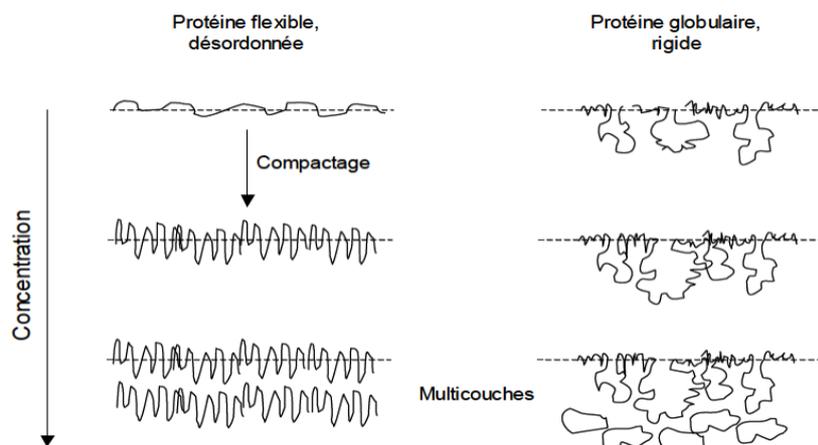


Figure 6 : Représentation schématique des conformations adoptées par des protéines flexibles ou globulaires en fonction de leur concentration surfacique à l'interface huile/eau (Berton 2011)

2.1.5. Interactions des tensioactifs aux interfaces

Le rôle des TA sur la formation et la stabilité physicochimique des émulsions est fréquemment étudié pour des systèmes modèles où les TA sont utilisés de façon individuelle. Cependant, plusieurs systèmes colloïdaux alimentaires, comme les globules gras du lait, le jaune d'œuf ou les OB végétaux, sont stabilisés par un mélange de TA. Lors de la formation de l'émulsion, la présence de plusieurs TA dans la formulation peut conduire à plusieurs situations : une coadsorption des TA à l'interface sans interaction spécifique entre les molécules, une compétition pour l'interface avec une espèce dominante, ou une synergie avec la mise en place d'interactions moléculaires ou supramoléculaires (Tableau 5). L'objet des sections suivantes se focalise sur les interactions PL : protéines aux interfaces.

2.1.5.1. Coadsorption des TA

La coadsorption des TA à l'interface implique qu'il y a peu, voire aucune interactions entre les TA : ils s'adsorbent de manière indépendante (McClements et Gumus, 2016). Les TA peuvent être répartis de manière uniforme ou sous forme de « rafts ». Les rafts ont été présentés par Simons et Ikonen (1997) comme une nouvelle organisation structurale des membranes cellulaires. Par la suite, la présence de ce type d'organisation des TA a aussi été mise en évidence au sein de matrices alimentaires comme les globules gras du lait (Lopez et al., 2015, Lopez et al., 2010). La coadsorption des TA peut survenir lorsque les deux TA sont incorporés avant l'homogénéisation du système ou lorsqu'un TA est ajouté post-émulsification. La disposition des TA à l'interface dépend de l'affinité des deux émulsifiants pour l'interface et de leur concentration (McClements et Gumus, 2016). Par exemple, pour une concentration initiale de 0,3% de caséine, un recouvrement interfacial de 1 mg/m^2 est observé. Il représente le recouvrement minimal requis pour assurer la stabilité des émulsions (Fang et Dalgleish

(1993). À cette concentration, les protéines s'étendent à l'interface laissant des « trous » dans le film protéique interfaciale et, par conséquent, des zones huileuses non recouvertes. En ajoutant des PL, ces derniers s'insèrent dans les zones non recouvertes par le film protéique augmentant la stabilité de l'émulsion. Dans le cadre d'une étude réalisée en couche monomoléculaire, Martinet et al. (2003) ont montré que les constituants tensioactifs des lipoprotéines de faible densité provenant du jaune d'œufs, dont les PL et les apoprotéines, se comportent de manière individuelle à l'interface et s'organisent selon des structures ressemblant à des « rafts ».

2.1.5.2. *Compétition pour l'interface*

La compétition entre des molécules tensioactives apparaît lorsque deux espèces ne peuvent coexister à l'interface pour former un film mixte. Dans ce scénario, la concentration des TA joue un rôle clé pour la détermination de l'espèce dominante à l'interface. À faible concentration des deux TA, les protéines dominent les PL de par leur affinité pour l'interface et leur encombrement stérique. À plus forte concentration des deux TA, les PL ont la capacité de se compacter plus efficacement à l'interface (Mackie et Wilde, 2005). Lorsque les deux TA sont présents en excès, les PL peuvent abaisser davantage la tension interfaciale que les protéines et, ainsi, les déplacer progressivement de l'interface (Dickinson et Woskett, 1989, Ettelaie et al., 2014, Munk et al., 2014, van Aken, 2003, Woodward et al., 2010). D'après des expériences réalisées en couche monomoléculaire, ce déplacement surviendrait en deux étapes. En premier lieu, la création d'interactions entre les PL et les protéines permettrait aux PL de s'approcher de l'interface. Ensuite, les PL déstabiliseraient les interactions protéine-protéine, entraînant l'expulsion des protéines de l'interface de sorte que les PL occupent la quasi-entière de la surface développée. (Pugnaroni et al., 2004, van Aken, 2003, Gunning et al., 2005) (Figure 7). Le phénomène de compétition est observé pour aussi bien pour des PL purs que pour des mélanges de PL (lécithine). Courthaudon et Dickinson (1991) ont montré qu'à partir d'un rapport de 8 : 1 (PL : protéine), la PC pure déplace la β -caséine de l'interface des gouttelettes à base d'huile végétale (soja) ou minérale (tétradécane). De même, Wang et al. (2017) ont montré qu'à faible concentration, une interaction synergique existe entre la lécithine de soja (mélange de différents PL) et les protéines du lactosérum, mais que pour des rapports supérieurs à 1 : 1, une compétition pour l'interface apparaît.

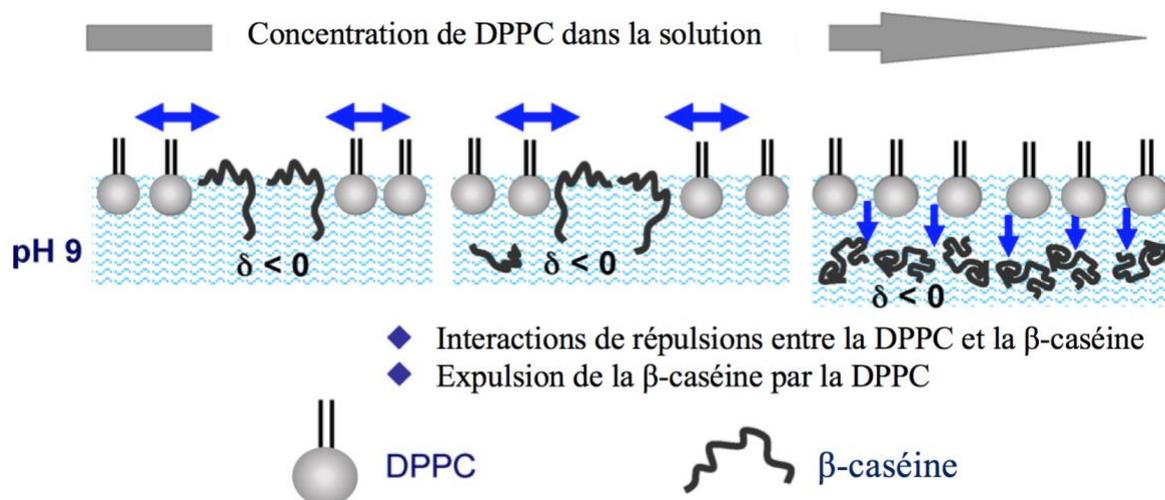


Figure 7 : Représentation de la compétition à l'interface entre les phospholipides (DPPC) et des protéines (β -caséine) en fonction de la concentration en phospholipides. Adapté de Caro et al. (2009).

Synergie des TA à l'interface

Certains couples PL : protéines peuvent interagir entre eux aboutissant soit à une multicouche par complexation moléculaire soit par superposition de monocouche (McClements et Gumus, 2016).

Le cas de la complexation de PL et de protéines se présente lorsque ces deux types de molécules se retrouvent simultanément à l'interface pour la création d'une interface dont la nature et l'intensité des interactions modifient de manière significative la structure et la cohésion de l'interface (Waninge et al., 2005, Caro et al., 2009, He et al., 2008). Le complexe issu des interactions PL : protéines aurait une énergie d'adsorption plus faible que le mélange des PL et des protéines et permettrait à une plus grande quantité de molécules de s'ancrer à l'interface (He et al., 2008). La complexation entre les TA peut prendre place dans la phase aqueuse : dans ce cas, c'est le complexe entier qui s'adsorbe à l'interface. Mais, la complexation peut aussi se produire directement à l'interface soit parce que l'ajout du deuxième TA a lieu après l'homogénéisation, soit parce que l'un des TA est dispersé dans la phase aqueuse et l'autre dans la phase huileuse (McClements et Gumus, 2016). Le phénomène de complexation peut impliquer des PL chargés et des protéines interagissant via des interactions de nature électrostatique. Les queues hydrophobes des PL se positionnent alors vers l'extérieur du complexe. A faible concentration en PL, cette complexation engendre une augmentation de l'hydrophobicité de l'assemblage moléculaire (Figure 8) (Kotsmar et al., 2009, Mackie et Wilde, 2005). Le complexe moléculaire a une activité de surface augmentée permettant un meilleur ancrage à l'interface (Mackie et Wilde, 2005).

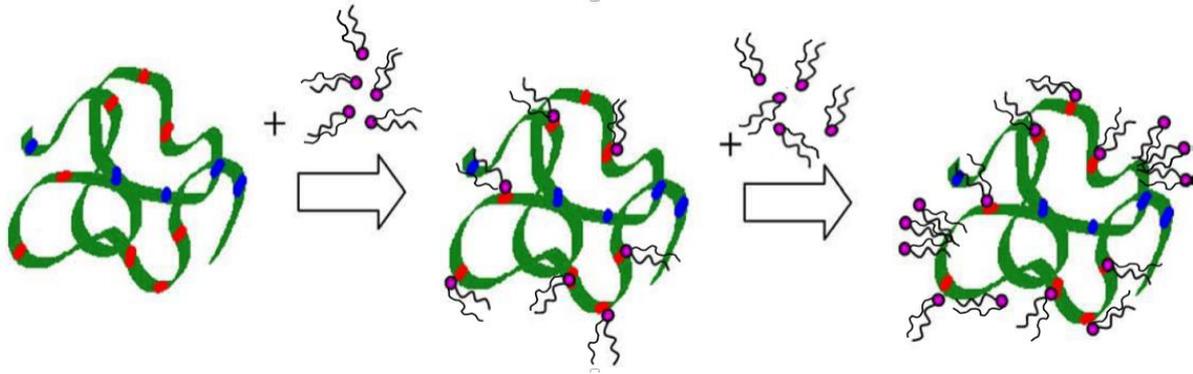


Figure 8 : Interactions entre les PL chargés et les protéines. Adapté de Kotsmar et al. (2009)

Si les PL sont présents en excès, une fois la charge de la protéine neutralisée, les PL s'ancrent via des interactions hydrophobes à la protéine (Figure 8). Ces derniers augmentent le caractère hydrophile du complexe et diminuent son affinité pour l'interface. Simultanément, une quantité des PL en excès se dirige vers l'interface et instaure un climat de compétition pour l'interface. Si les interactions protéine-protéine du film sont insuffisantes, la combinaison de ces deux événements (complexation et compétition à l'interface) mène à la rupture du film protéique et à l'expulsion des protéines de l'interface, maintenant dominée par les PL (Kotsmar et al., 2009, Mackie et Wilde, 2005).

La création d'une interface composée de multicouches par superposition de monocouches se met en place par l'assemblage de TA ayant des charges électriques différentes sans qu'il y ait complexation. Le premier TA s'adsorbe à l'interface et expose des charges dans le milieu aqueux. Ensuite, par la présence d'un TA de charge opposée, celui-ci vient s'adsorber pour créer une couche qui entoure l'interface déjà recouverte (Figure 9). Bien qu'une grande majorité de ces émulsions multicouches alimentaires soit plutôt composée de deux biopolymères (protéine-protéine, protéine-polysaccharide ou polysaccharide-polysaccharide) (McClements et Gumus, 2016, Dickinson, 2011), il existe des exemples dans la littérature d'émulsions à base de PL et de protéines qui adoptent cette conformation (Lu et al., 2004, Li et al., 2003). Par exemple, en étudiant la structure d'interfaces mixtes composées d'un mélange de PL (dioleoylphosphatidylsérine (DOPS), dioleoylphosphatidylétholamine (DOPE), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) et sphingomyéline) et de β -caséine ou de β -lactoglobuline par microscopie électronique à transmission, Waninge et al. (2005) ont observé plusieurs arrangements qui dépendent de la séquence d'ajout des TA. Pour des concentrations allant jusqu'à un recouvrement interfacial de $0,3 \text{ mg/m}^2$ et lorsque les deux TA sont présents lors de l'émulsification, l'interface présente une structure multicouche pour laquelle les PL sont directement à l'interface et les protéines s'assemblent par-dessus.

CHAPITRE I : État de l'art

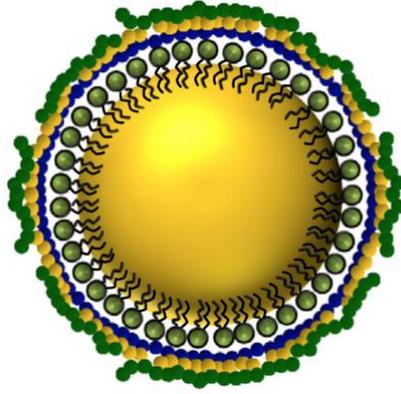


Figure 9: Représentations modèle d'une interface mixte en multicouches par superposition de monocouches composé de PL et de protéines. Adapté de Chung et McClements (2014)

Tableau 5 : Tableau récapitulatif non exhaustif présentant des exemples d'étude portant sur des interfaces colloïdales mixtes PL : protéines

<i>Émulsifiants</i>	<i>Type de mécanisme</i>	<i>Rapport PL : protéines</i>	<i>Nature de la phase dispersée</i>	<i>Nature de la phase aqueuse</i>	<i>Référence</i>
<i>PC de jaune d'œuf / caséine</i>	Coadsorption pour les rapports [4,9:1]-[49:1] pour une concentration de caséine de 0,3% Complexation pour les concentrations de protéines supérieures	[0,7 :1]-[49 :1]	Huile de soja	Solution tampon imidazole (20mM) pH7	Fang et Dalgleish (1993)
<i>PC de jaune d'œuf / β-caséine</i>	Compétition à partir du rapport [8 :1]	[0 :1] [2 :1][4 :1] [8 :1] [16 :1] [50 :1][100 :1]	Tétradécane ou Huile de soja	Solution tampon Bis-Tris propane (20mM) pH 7	Courthaudon et Dickinson (1991)
<i>Lécithine ou lysolécithine / Protéines du lactosérum</i>	Compétition pour PL solubilisés dans l'eau Coadsorption ou complexation pour PL solubilisés dans l'huile	[1 : 1,25] [1 : 2,5] [1:5]	Huile de tournesol	NaCl (0,5 ; 1,5%)	Sünder et al. (2001)
<i>Lécithine de soja / isolat de protéines du lactosérum</i>	Compétition pour des rapports. [1 :1]	[0 :1] [1 :8] [1 :4] [1 :2,7] [1 :2] [1 :1]	Huile de graine de pivoine	Eau distillée	Wang et al. (2017)
<i>PC du jaune d'œuf /β-lactoglobuline</i>	Complexation	[0 :1] [4 :1] [7 :1] [12 :1] [16 :1]	Tétradécane	Solution tampon Bis-Tris (20mM) pH 7	Dickinson et Yamamoto (1996)
<i>Lécithine de soja / isolat de protéines du lactosérum</i>	Complexation	[1 :1]	Huile de soja	Eau distillée pH 3 et 7	Mantovani et al. (2013)
<i>Lécithine de soja déshuilée, PC, PE / caséine de sodium</i>	Complexation	[5 :3]	Huile de foie de morue	Solution tampon d'acétate de sodium imidazole (10mM) pH 7,0	Garcia-Moreno et al. (2014)

CHAPITRE I : État de l'art

<i>Émulsifiants</i>	<i>Type de mécanisme</i>	<i>Rapport PL : protéines</i>	<i>Nature de la phase dispersée</i>	<i>Nature de la phase aqueuse</i>	<i>Référence</i>
<i>Lécithine de soja hydroxylée / isolat de protéines de lactosérum</i>	Complexation	[1 : 10]	Huile de maïs	Eau distillée (NaCl 0 – 200 mM) pH 6,8-7,0	Jiménez-Flores et al. (2005)
<i>PC de soja / isolat de protéine de soja natives ou dénaturées</i>	Complexation	[1 : 100] [1 : 50] [1 : 25] [1 : 10]	Huile de tournesol	NaCl (0 ; 40 ; 75 ou 100mM)	Scuriatti et al. (2003)
<i>Lécithine de soja / isolat de protéine de soja natives ou dénaturées</i>	Complexation	[1 : 10]	Huile de tournesol	Solution tampon phosphate (0,5M) pH 2,0 ; 5,5 ou 6,2	Comas et al. (2006)
<i>Lécithine du jaune d'oeuf / Albumine du sérum bovin, ovalbumine, conalbumine, β-lactoglobuline, lysozyme ou ovomucoïde.</i>	Complexation	[5 : 1] [50 : 1]	Huile d'arachide	Solution tampon d'acétate de sodium (0,1M) pH 3	Nakamura et al. (1988)
<i>PC pure de jaune d'œuf, PC vierge de jaune d'œuf ou PC vierge de soja / protéines du lactosérum</i>	Complexation	[10 : 1]	Tétradécane ou huile de maïs	Solution tampon d'acétate (20mM) (pH 3,0 ou 4,5) ou Solution tampon Bis-Tris propane (20mM) pH 7	Yamamoto et Araki (1997)
<i>DOPS, DOPE, DOPC et sphingomyéline / β-caséine ou β-lactoglobuline</i>	Multicouches	[1 : 1]	Miglyol 218	Solution tampon imidazole (20 mM) NaCl (50mM)	Waninge et al. (2005)

n/d : non déterminé

Le type d'interactions développées entre les PL et les protéines et, donc, les mécanismes à l'interface dépendent de plusieurs facteurs (Tableau 5) :

- Les interactions, qu'elles soient de répulsion ou d'attraction, sont principalement dictées par la charge des molécules (Maldonado-Valderrama et Patino, 2010, Mackie, 2004). L'état d'ionisation des différents groupements polaires des protéines et des PL est dépendant du pH de la phase aqueuse et l'accessibilité des groupements chargés (et donc leur possibilité d'interaction) est liée à la conformation des molécules (McClements, 2015). De façon générale, pour une concentration de TA donnée, pour des pH légèrement acides, les protéines, si elles sont sous leur point isoélectrique, vont plutôt exposer des charges positives. Ces charges positives peuvent interagir avec les groupements chargés négativement des PL anioniques et/ou zwitterioniques. Les interactions PL : protéines sont assez fortes et un effet synergique sur la stabilisation de l'interface est observé (Nakamura et al., 1988, Caro et al., 2009, Comas et al., 2006). Cependant, pour un pH très acide (pH 2), l'hydratation des PL provoque un gonflement de la tête polaire qui diminue les propriétés émulsifiantes et, par conséquent, diminue leur interaction avec les protéines pour la stabilisation d'une interface colloïdale mixte (Comas et al. (2006).
- La force ionique de la phase aqueuse joue un rôle clé dans la solubilisation des protéines (Scuriatti et al., 2003, Jiménez-Flores et al., 2005). De manière générale, de faibles concentrations de sel favorisent la solubilisation des protéines et augmentent leurs propriétés émulsifiantes, alors que de fortes concentrations vont plutôt favoriser la création d'interactions protéines-protéines qui ne sont plus disponibles pour stabiliser l'interface (McClements, 2015, Sünder et al., 2001).
- le rapport PL : protéines a une influence sur le comportement des TA à l'interface, notamment pour les interfaces où les TA forment des complexes (Wang et al., 2017, Courthaudon et Dickinson, 1991). A « faible » concentration des deux TA, la formation de complexes agit favorablement puisque ceux-ci démontrent une meilleure affinité pour l'interface. Cependant, à « forte » concentration des deux TA, cette complexation devient délétère pour le système. Par exemple, Wang et al. (2017) ont observé que pour les rapports PL : protéines de [1 : 8] à [1 : 2] il existe une interface mixte synergique, mais à partir des rapports [1 : 1], les PL de la lécithine délogent les protéines du lactosérum.

CHAPITRE I : État de l'art

- La conformation des protéines peut être modifiée par effet thermique ou variation de pH et peut révéler de nouvelles parties de structure capables d'interagir avec les PL (Jiménez-Flores et al., 2005, Scuriatti et al., 2003, Comas et al., 2006).
- La nature des PL peut impacter les interactions PL : protéines. Yamamoto et Araki (1997) observent que l'addition de lécithine vierge (54-67% de PC) à une émulsion stabilisée par de la β -lactoglobuline améliore davantage la stabilité de l'émulsion que l'addition de PC pure. La teneur en PL anioniques de la lécithine vierge, comme le PA ou le PI, serait à l'origine de ce pouvoir stabilisant via des forces électrostatiques et d'hydratation supérieures (Yamamoto et Araki, 1997, Rydhag et Wilton, 1981). Ces interactions entre les PL anioniques et les protéines (chargées positivement) sont plus fortes que celles développées avec les PL zwitterioniques (Mackie, 2004). Plusieurs études démontrent que ce comportement s'applique pour les systèmes composés de PL et de protéines couramment utilisées en agroalimentaire comme la β -lactoglobuline pure (Lefèvre et Subirade, 2000a, Lefèvre et Subirade, 2001, Junghans et al., 2010, Yamamoto et Araki, 1997), les isolats de protéines du lactosérum (Kasinos et al., 2013) et la β -caséine (Arêas et al., 1997).
- La phase de solubilisation des PL peut impacter les interactions PL : protéines ; la lécithine solubilisée dans la phase huileuse génère de meilleurs résultats de stabilisation synergique avec la β -lactoglobuline qu'avec la lécithine solubilisée dans l'eau (Yamamoto et Araki, 1997, Sünder et al., 2001).
- La séquence d'ajout des TA dans le procédé d'émulsification joue un rôle clé dans la création de l'interface (Waninge et al., 2005, van Nieuwenhuyzen et Szuhaj, 1998). Par exemple, pour des émulsions avec d'un mélange de lipides (DOPS, DOPE, DOPC, sphingomyéline) et de β -caséine ou de β -lactoglobuline, une interface mixte et stable peut être créée lorsque les deux TA sont présents lors de l'émulsification (Waninge et al. (2005). Les auteurs ont également démontré que les protéines en solution ne s'adsorbent que partiellement à l'interface lorsque celle-ci est déjà recouverte de PL (émulsification préalable avec les PL seulement).

En conclusion, plusieurs paramètres influencent la création de l'interface colloïdale et, par conséquent, la formation et la stabilité des émulsions. La présence et la nature des interactions PL : protéines aux interfaces mixtes définissent le devenir des émulsions comportant plusieurs TA. La compréhension de ces interactions est donc importante pour la formulation de matrices polydisperses alimentaires.

3. Les corps lipidiques

Cette deuxième partie du chapitre de l'étude bibliographique présente les connaissances sur la structure et la stabilité des corps lipidiques (oil bodies, OB). Les OB présente une structure naturelle stable présentant à l'interface un mélange PL et protéines d'origine végétale pouvant se substituer aux TA d'origine animale (lécithine d'œuf et protéines laitières) et les TA de synthèse.

3.1. Les corps lipidiques

Les corps lipidiques ou oléosomes sont des organelles sphériques, ayant un diamètre de 0,5 à 2 µm, où sont stockés les lipides nécessaires à la germination des graines des plantes (Tzen, 2012, Tzen et al., 1993, Chen et al., 2014) (Figure 10). L'interface des gouttelettes serait principalement composée d'une monocouche de PL totalement recouverte de protéines (OBP) (Jolivet 2009). Ces protéines représentant 0,5 à 4% du poids des OB (Tableau 6). Elles sont constituées d'une protéine majoritaire, l'oléosine, (75-90 %) (Tzen et al., 1993, Jolivet et al., 2006b, Jolivet et al., 2009) et des protéines minoritaires (environ 5%), la caléosine et la stéréoléosine (Jolivet et al., 2009) (Figure 10). Les études démontrent que le PL majoritaire des OB de colza est la phosphatidylcholine (PC) (Tzen et al., 1993, Katavic et al., 2006, Deleu et al., 2010). Cependant, la distribution des autres PL semble dépendre de la méthode d'extraction et de quantification. Katavic et al. (2006) montre la présence de phosphatidyléthanolamine (PE) et de PA comme PL minoritaire, ce qui diffère des autres études de quantification (Tableau 7). La proportion de PL et d'OBP à l'interface des OB de colza varie entre 1 : 1 et 1 : 2 (Tzen et al., 1993) (Tableau 6).

Tableau 6 : Composition typique du tourteau délipidé de colza

<i>Pourcentage massique (%)</i>	<i>Graines de colza</i>		<i>Corps lipidiques</i>
	Huang et al, (1992)	Tzen et al. (1993)	Jolivet et al. (2006)
<i>PL totaux</i>	1,9 – 2,7	0,6 – 2,0	n/d
<i>OBP</i>	0,4 – 1,6	0,6 – 3,5	3,4 – 3,9

n/d : non déterminé

CHAPITRE I : État de l'art

Tableau 7 : Composition des corps lipidiques en phospholipides

<i>Pourcentage massique (%)</i>	<i>Tzen et al. (1993)</i>	<i>Deleu et al. (2010)</i>
<i>PC</i>	59,9	40,2
<i>PE</i>	5,9	23,0
<i>PI</i>	14,0	11,6
<i>PS</i>	20,2	n/d
<i>PA</i>	0	7,3
<i>Autres PL</i>	0	17,9

n/d : non déterminé

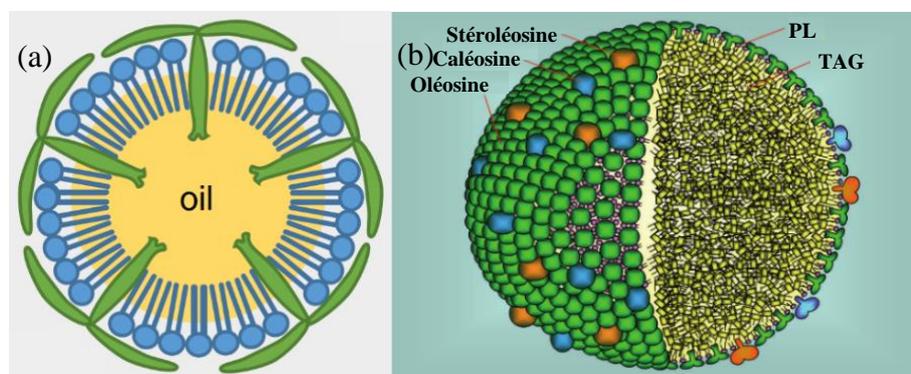


Figure 10 : Représentation d'un corps lipidique (Rayner, 2015) (a) (Tzen, 2012) (b)

3.2. Les protéines des corps lipidiques

3.2.1. Les oléosines

Les oléosines sont de petites protéines présentant plusieurs homologues de 15 à 23 kDa dans le colza, par exemple. Elles possèdent trois domaines structuraux, deux segments terminaux reliés par un segment médian, qui leur confèrent des propriétés pour la stabilisation physicochimique des gouttelettes lipidiques (Jolivet et al., 2009). Le domaine amphiphile à l'extrémité N-terminale de 50 à 70 résidus et le domaine hydrophile à l'extrémité C-terminale de longueur variable ont la propriété de se retrouver au niveau de la membrane de PL (Jolivet et al., 2009, Maurer et al., 2013, Frandsen et al., 2001). Ces deux domaines, unis à un troisième domaine hydrophobe dont le repliement est assuré par les nœuds de proline, créent une conformation en épingle à cheveux (Maurer et al., 2013) (Figure 10). Constitué d'environ 75 résidus aminés (~8 kDa), le domaine médian, très bien conservé au sein des plantes, représente la plus grande séquence hydrophobe trouvée parmi les protéines naturelles (Li et al., 2002, Jolivet et al., 2009) soit environ 40% de la séquence (Li et al., 2002). Ce segment, d'une

longueur d'environ 5 à 6 nm (Huang et Huang, 2017), s'insère à l'intérieur du corps lipidique pour mieux stabiliser la structure (Nikiforidis et al., 2013). Les oléosines sont classées selon deux isoformes : les oléosines de faibles poids moléculaires et celles de hauts poids moléculaires (Tzen et al., 1990), se différenciant par la présence ou l'absence d'une insertion très bien conservée de 18 résidus aminés au sein du segment C-terminal pour le colza (Jolivet et al., 2009). Dix-neuf séquences codant pour les oléosines se répartissent au sein de 5 orthologues présentant des séquences très bien conservées notamment au niveau du segment médian ou du segment C-terminal (Jolivet et al., 2009).

Bien que la structure du segment C-terminal varie à l'intérieur de la même famille (Jolivet et al., 2009), ce segment possède une région en hélices α conservées à travers les espèces végétales et qui rappelle la structure de certaines apolipoprotéines (Li et al., 1992, Tzen et Huang, 1992, Murphy et al., 1991) (Figure 11). Ce segment présente une séquence de 24 résidus aminés démontrant 54% de similarité avec l'apolipoprotéine-CII humaine suggérant que l'oléosine joue le même rôle de réception et d'activation des lipases digestives (Li et al., 1992).

La composition du segment N-terminal est très variable en termes de séquence de résidus aminés au sein des différents organismes végétaux. Ce segment adopterait différentes structures selon la provenance des OB (Li et al., 1993). Pour le colza, cette séquence a été décrite pour présenter plutôt une région en hélices α et des segments désordonnés (Li et al., 1992, Tzen et Huang, 1992).

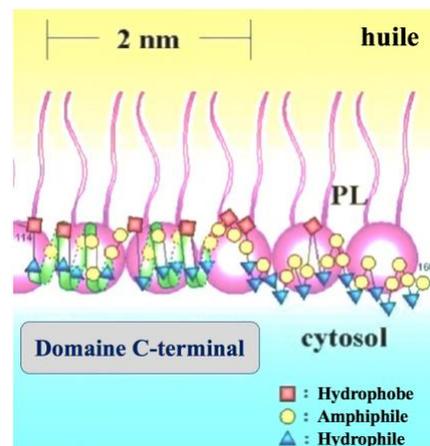


Figure 11 : Représentation structurale du segment C-terminal au sein d'une monocouche de PL. Adapté de Tzen (2012)

La composition en résidus aminés du segment médian (Jolivet et al., 2009), riche en résidus permettant la formation de liaisons hydrogène inter ou intramoléculaires (notamment des séquences glycine-glycine et glycine-sérine), permet la flexibilité de cette structure.

CHAPITRE I : État de l'art

Cependant, aucun consensus n'est trouvé pour définir la structure secondaire de ce segment. En effet, le caractère hydrophobe de l'oléosine complexifie le processus de solubilisation et donc les études structurales (Kim et al., 2007, Gohon et al., 2011). Ainsi, plusieurs études démontrent que la structure secondaire de l'oléosine est influencée par la nature du surfactant dans lequel elle est solubilisée. Par exemple, l'utilisation d'un détergent anionique comme le dodécylsulfate de sodium (SDS) ou d'amphipols tend à surreprésenter la proportion d'hélices α par rapport à l'utilisation de milieux comme des bicouches membranaires ressemblant davantage à l'environnement natif des OB (Lacey et al., 1998, Gohon et al., 2011, Vindigni et al., 2013). Les études de modélisation, de spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) et de dichroïsme circulaire proposent plusieurs conformations pour le segment médian (Tzen et al., 2008, Frandsen et al., 2001). Le premier modèle propose un domaine en « épingle à cheveux » composé de feuilletts β antiparallèles repliés par un nœud de proline créant deux brins parallèles s'insérant en profondeur dans le cœur lipidique (Tzen et Huang, 1992) (Figure 12A). Le deuxième modèle propose un repliement supplémentaire du segment créant une structure en baril à six brins β antiparallèles (Tzen, 2012) (Figure 12B). Li et al. (1992) ont observé la formation de dimères d'oléosines à des concentrations élevées de sels : les feuilletts β hydrophobes du segment médian interagiraient avec ceux des molécules voisines créant des homo-oligomères et ce, même en présence d'un dénaturant fort comme le SDS suggérant la formation de liaisons hydrogène entre les brins β (Li et al., 2002). Cette proposition mène à l'arrangement parallèle de brins β de différentes oléosines créant une structure quaternaire assemblée (Li et al., 2002, Li et al., 1992) (Figure 12C). Par extrapolation, d'autres conformations tertiaires et quaternaires composées de feuilletts β parallèles ou antiparallèles sont envisageables (Tzen et al., 2008) (Figure 12D ou E). Cependant, d'autres études présentent des résultats suggérant que le segment médian est plutôt formé par des hélices α (Alexander et al., 2002, Lacey et al., 1998, Maurer et al., 2013, Huang et Huang, 2017) (Figure 12F), ce qui est cohérent avec la conformation adoptée par les protéines membranaires qui sont normalement hélicoïdales (§ IV-3.2) (White, 2009, Epanand et al., 1990). En utilisant des procédés enzymatiques, Lacey et al. (1998) et Maurer et al. (2013) ont étudié la structure du segment médian imbriqué dans les OB en sectionnant les segments terminaux. Leurs résultats montrent que la partie insérée dans le cœur lipidique présente une plus grande proportion d'hélices α que dans la protéine native. En conclusion, malgré de nombreuses études, la structure secondaire du segment médian des oléosines n'est toujours pas élucidée. Tzen et al. (2008) suggèrent d'ailleurs qu'en tenant compte de la flexibilité intrinsèque de la protéine et

du caractère plastique environnant du cœur lipidique, il est envisageable qu'au sein d'un seul OB, plusieurs arrangements protéiques soient présents.

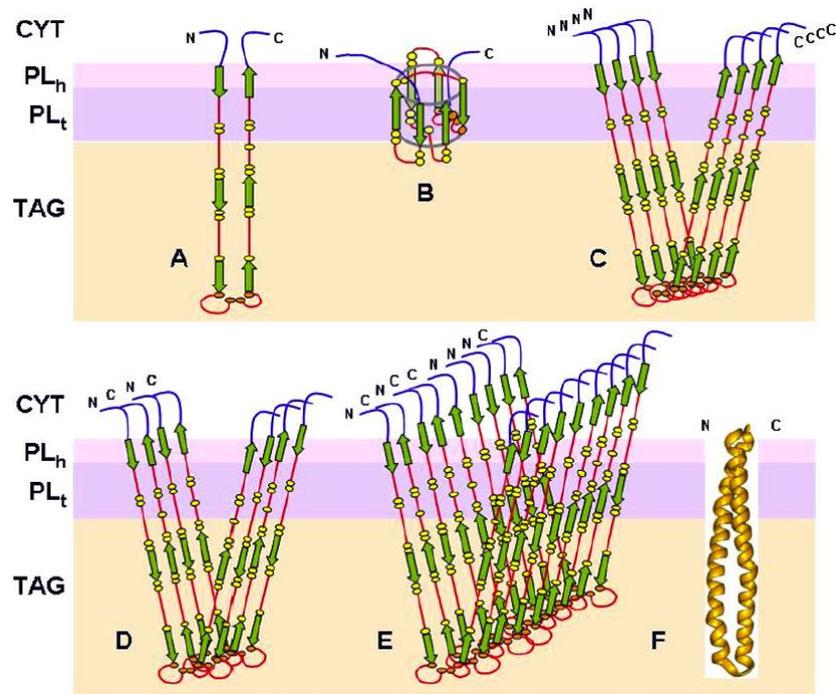


Figure 12 : Représentations structurales potentielles du segment médian de l'oléosine au sein d'une monocouche de PL. A) monomère antiparallèle, B) baril à six brins β antiparallèles, C) oligomère parallèle, D) oligomère antiparallèle, E) oligomère parallèle et antiparallèle, F) hélice α (Tzen et al., 2008)

CYT : Cytosol, PL_h : Tête polaire de phospholipide, PL_t : Chaînes hydrophobes de phospholipide, TAG : Triglycéride

Les oléosines ont démontré leur rôle clé dans la stabilisation des OB par encombrement stérique et répulsion électro-négative (Tzen et Huang, 1992, Capuano et al., 2007, Shimada et al., 2008). En prévenant la coalescence des OB, les oléosines agissent également pour la protection des dommages cellulaires induits par des cycles de congélation/décongélation dans les graines entières (Shimada et al., 2008). Elles pourraient constituer un facteur clé dans la germination des graines en étant impliquées dans la mobilisation des OB et possèderaient des activités enzymatiques, notamment des activités de monoacylglycérol acyltransférase et de phospholipase (Tzen, 2012). De plus, comme mentionné précédemment, la similarité structurale du segment C-terminal de l'oléosine avec l'apolipoprotéine-CII humaine suggère un rôle de réception et d'activation des lipases digestives (Li et al., 1992).

3.2.2. La caléosine

La caléosine est une petite protéine flexible d'environ 25 à 28 kDa. Elle constitue une protéine mineure au sein des OB de plusieurs espèces végétales. Cependant, les trois domaines structuraux de la caléosine sont bien conservés (Jiang et al., 2009). Sa structure secondaire,

CHAPITRE I : État de l'art

similaire à l'oléosine, se divise en 3 domaines. Un peu comme l'oléosine, sa grande flexibilité la rend susceptible à adopter différentes conformations selon le milieu dans lequel elle est solubilisée (notamment la polarité du solvant). En présence de solvants polaires, la caléosine présente d'abord, une augmentation des hélices α (26 à 39%). Puis, à forte dose de méthanol et d'isopropanol, elle semble se dénaturer et adopter une structure désordonnée faisant diminuer la proportion des hélices α (10%) (Purkrtova et al., 2007).

Malgré ses ressemblances avec l'oléosine, la caléosine présente des spécificités. Le segment C-terminal comprend plusieurs sites de phosphorylation impliqués dans la signalisation cellulaire. Le segment N-terminal comprend un motif de main EF défini par l'association de deux hélices α reliées par une boucle formée d'une douzaine de résidus aminés ayant la capacité de lier le calcium (Figure 13) d'où son nom cal-(protéine liant le calcium) éosine (du corps lipidique) (Chen et al., 1999). Cette séquence de 28 acides aminés. inclut une glycine et 5 acides aminés possédant un atome d'oxygène ; cette séquence d'acides aminés agit comme ligand du calcium (Chen et al., 1999, Frandsen et al., 2001). Par ailleurs, la caléosine présente une activité peroxydase. Son segment médian hydrophobe joue également un rôle d'ancre pour la protéine à l'interface des OB, mais est significativement plus court que celui de l'oléosine (Chen et al., 1999) (Figure 13), ne présentant qu'une trentaine de résidus aminés (Naested et al., 2000). À l'instar du segment médian de l'oléosine, la structure de la région en épingle à cheveux de la caléosine n'est pas clairement élucidée (Tzen, 2012). Adjacente à cette structure, se trouve une séquence de résidus aminés, riche en proline, susceptible d'adopter une forme de nœud et une hélice α qui pourrait contribuer à l'ancrage de la protéine à l'interface (Naested et al., 2000).

En plus d'être présentes à l'interface des OB de diverses plantes, les caléosines se retrouvent seules aux interfaces des OB dans des espèces plus primitives comme les cycas et les microalgues. Elles sont donc considérées comme des protéines structurelles plus primitives que les oléosines (Tzen, 2012). Elles sont également plus abondantes à l'interface que la majorité des protéines transmembranaires, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle clé dans la stabilité des organelles (Hernandez-Pizon et al., 2001). Elles possèdent un rôle de signalisation. Leur capacité à lier le calcium et leurs sites de phosphorylation suggèrent qu'elles jouent aussi un rôle dynamique dans l'ontogénie végétale en étant impliquées dans les signaux de signalisation de certaines fonctions biologiques (Tzen, 2012), comme le marquage et le transport des OB (Purkrtova et al., 2008, Tzen, 2012, Hernandez-Pizon et al., 2001). Elles permettent

l'accessibilité des lipides durant la germination en favorisant l'interaction des OB avec les vacuoles pour induire leur dégradation (Poxleitner et al., 2006).

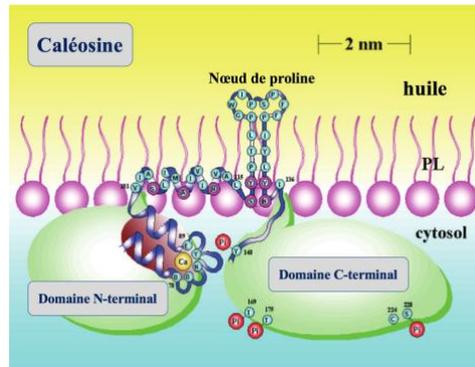


Figure 13: Représentation structurale de la caléosine au sein d'une monocouche de PL. Adapté de Tzen (2012)

3.3. Propriétés physicochimiques des corps lipidiques

Les propriétés des corps lipidiques peuvent être étudiées sur des OB natifs extraits des végétaux et analysés directement ou sur des structures formulées à partir des constituants des organelles OBP et/ou PL formant ainsi des OB reconstitués ou OB artificiels. Cette dernière approche permet d'obtenir une nouvelle structure d'encapsulation des huiles à base de TA naturels. La comparaison du comportement physicochimique des OB natifs et des OB formulés, OB reconstitués ou artificiels, doit tout de même être considérée avec précaution dans la mesure où les procédés d'extraction peuvent modifier certaines propriétés par rapport à celles d'origine, notamment, la composition en PL (van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008, Xie et Dunford, 2017, Katavic et al., 2006) ou la conformation des OBP (Rodrigues et al., 2012, Capuano et al., 2007).

3.3.1. Stabilité physique des corps lipidiques

Les OB présentent la stabilité physique la plus efficace parmi toutes les organelles naturelles de stockage des lipides (Waschatko et al., 2012). Par exemple, Tzen et Huang, (1992) ont montré que les OB isolés à partir de maïs sont stables (ni coalescence, ni d'agrégation) pendant plus de 24 h à 24°C. Cette stabilité résulterait de la conformation tridimensionnelle des OBP, qui se différencie des protéines flexibles et des protéines globulaires (§ I-2.1.3.2) et engendrerait une structuration de l'interface colloïdale bien particulière. Plusieurs auteurs suggèrent l'existence d'interactions entre les PL et les OBP (Li et al., 1992, Tzen et Huang, 1992, Nikiforidis et al., 2013) favorisant l'adsorption des protéines (Bettini et al., 2014). La possibilité que le domaine hydrophobe des OBP puisse atteindre le cœur lipidique pour interagir avec les TAG et ainsi permettre un ancrage solide des protéines est également émise

CHAPITRE I : État de l'art

(Roux et al., 2004). La présence des deux TA à l'interface, les PL et les OBP, stabiliserait les systèmes colloïdaux par des mécanismes pondérateurs (répulsion électrostatique, répulsion stérique, etc.) attribués par chacun des TA (§ I-2.1.4.3) et par la présence d'interactions PL : OBP pour la formation d'une interface mixte (§ I-2.1.5) (Deleu et al., 2010). En effet, l'encombrement stérique et la répulsion électronégative générés par l'abondance d'OBP et de PL à la surface des corps lipidiques confèrent une très grande résistance physicochimique à ces derniers (Tzen, 2012). La grande flexibilité des OBP natives permet la création d'un film interfacial élastique et robuste autour des gouttelettes d'huile (Nikiforidis et al., 2013) dont l'épaisseur est proportionnelle à la quantité d'OBP présentes (Siloto et al., 2006, Ting et al., 1996, Tzen et al., 1993). Par ailleurs, les études rhéologiques montrent que les PL et les OBP se lient fermement à la surface et maintiennent l'élasticité de la couche interfaciale. En outre, les interactions PL : OBP permettraient la formation d'un film interfacial rigide et élastique qui permet de s'ajuster rapidement aux contraintes de déformation et ainsi de prévenir la rupture de l'interface (Deleu et al., 2010). Le rôle des OBP dans la stabilité physique des OB natifs semble prépondérant. Lorsque les OB sont exposés à un traitement enzymatique avec de la trypsine, ils coalescent (Tzen et Huang, 1992). En revanche, lorsque les OB sont soumis à l'action des phospholipases (A2 ou C), les OB résistent à la lipolyse et aucune coalescence n'est observée (Tzen et Huang, 1992). Iwanaga et al. (2007) ont démontré la résistance des OB de soja aux températures élevées (90°C, 20 minutes), au pH très acide (pH 2) et aux fortes concentrations de sel (250 mM de NaCl). Similairement, lorsque les OB sont placés dans un environnement à pH proche de leur pI (6,5), ils présentent rapidement des phénomènes d'agrégation. Cette agrégation est réversible si les OB sont placés à pH neutre (Huang, 1992). Le caractère hydrophobe des OBP et leur solubilité limitée (Gohon et al., 2011) complexifient leur usage dans le cadre d'études sur la reconstitution des OB. Il existe tout de même plusieurs études qui démontrent leur capacité émulsifiante. D'abord, la reconstitution d'OB montre que la présence de PL est essentielle à la formation d'émulsions à base d'OBP (Tzen et Huang, 1992, Li et al., 2002, Deleu et al., 2010). De plus, la coalescence des OB reconstitués est faible lorsque la quantité d'OBP est supérieure à celle de PL (PL : OBP de 0,015 et 0,5) contrairement à ce qui est observé pour les rapports PL : OBP de 5 ou 50 (Deleu et al., 2010). Par ailleurs, les OBP diminuent la tension interfaciale plus rapidement que plusieurs protéines laitières ce qui témoigne de leur caractère grandement amphiphile et par conséquent de leur très grande affinité pour les interfaces. Par ailleurs, l'adsorption des OBP permet d'abaisser la tension interfaciale aussi bas que 4,8 mN/m (Deleu et al., 2010). Wijesundera et al. (2013b) ont montré que la

reconstitution d'OB à partir d'OBP extraites de tourteau de colza est possible. Les OB reconstitués ont un diamètre moyen de 3 μm . Dans cette étude, les OB reconstitués sont plus stables à 40°C qu'à 4°C; la taille moyenne des gouttelettes augmentant d'un facteur 1,5 et 4, respectivement.

3.3.2. Stabilité chimique des corps lipidiques

Les huiles végétales contiennent une grande quantité d'AGPI sensibles à l'oxydation. L'oxydation des AG altère les qualités nutritionnelles des huiles par la formation de radicaux libres. Les qualités organoleptiques des matrices alimentaires dans lesquelles ils sont incorporés se détériorent également par la formation de composés secondaires d'oxydation (aldéhydes, acides). Dans les cas des systèmes émulsifiés, la composition de l'interface colloïdale joue un rôle prépondérant dans l'oxydabilité des AG (Berton et al., 2011, Berton-Carabin et al., 2014).

Les OB natifs confèrent une excellente protection contre l'oxydation inhérente à leur structure au sein des graines oléagineuses (Gray et al., 2010). Par exemple, pour les OB extraits des graines de colza, stockés 8 jours à température ambiante ou à 60°C, l'indice de peroxyde (PV) et la teneur en 2,4 heptadiénal sont plus faibles que celles mesurées pour des émulsions stabilisées par du Tween 40 (Shen et al., 2012). Des résultats comparables ont été observés pour des OB provenant de graines d'*Echium* (Gray et al., 2010), de soja (Chen et al., 2012) et de tournesol (Fisk et al. (2008). De plus, Kapchie et al. (2013) ont montré que la congélation, la lyophilisation et le chauffage (95°C pendant 5 minutes) affectent peu la stabilité chimique des OB évaluée par la mesure des produits primaires d'oxydation (PV) ou des produits secondaires (dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique). Un court traitement thermique peut même améliorer la stabilité oxydative des OB par l'inactivation des enzymes oxydatives (Chen et al., 2012). La présence de protéines exogènes aux OB (protéines non associées aux OB) peut également influencer la stabilité chimique de la structure. Cependant, les données sont contradictoires. Alors que les protéines exogènes des OB du maïs semblent protéger les AG contre l'oxydation (Karkani et al., 2013), celles du soja semblent plutôt la favoriser (Zhao et al., 2016).

Très peu d'études concernent la stabilité chimique des OB reconstitués. Shen et al. (2012) ont obtenu des OB reconstitués plus stables que des émulsions stabilisées par du Tween 40 (mesures de PV et de la teneur en heptadiénal) après un stockage de 10 jours à 40°C. De même, la valeur de PV pour les OB reconstitués entreposés à 40°C pendant 23 jours est

CHAPITRE I : État de l'art

significativement inférieure à celles des émulsions stabilisées par de la caséine de sodium, un isolat de protéines de colza seules (dont les protéines majoritaires sont la cruciférine et la napine (§ I-1.3) ou un mélange d'isolat de protéines de colza et de PL(Wijesundera et al., 2013b).

La stabilité chimique des OB ou des OB reconstitués peut provenir des propriétés antioxydantes des PL et/ou des OBP, mais aussi de la barrière physicochimique créée par l'interaction entre les PL et les OBP à l'interface des corps lipidiques (Gray et al., 2010, Payne et al., 2014).

4. Problématique et objectifs

La FDA divise les émulsifiants en deux catégories, les molécules GRAS, dont l'innocuité est reconnue par la majorité des scientifiques et des entités gouvernementales dont l'Union Européenne (UE) (Tableau 8) et les additifs alimentaires directs, dont l'innocuité est acceptée à moins grande échelle et à des doses plus restreintes (FederalRegister, 2015) (Tableau 9).

Tableau 8 : Liste non-exhaustive des émulsifiants généralement reconnus inoffensifs (GRAS) et leur numéro de règlement selon les autorités nord-américaines et européennes (FederalRegister, 2015, Hasenhuettl, 2008)

<i>Émulsifiants</i>	<i>Numéro de règlement</i>	
	U.S. FDA	UE
<i>Esters diacétyltartriques des mono et diglycérides d'acide gras</i>	184.1101	E472e
<i>Lécithines</i>	184.1400	E322
<i>Monoglycérides et diglycérides</i>	184.1505	E471

Tableau 9 : Liste non exhaustive des émulsifiants utilisés comme additifs alimentaires directs et leur numéro de règlement selon les autorités nord-américaines et européennes (FederalRegister, 2015, Hasenhuettl, 2008)

<i>Émulsifiants</i>	<i>Numéro de règlement</i>	
	U.S. FDA	UE
<i>Esters acétiques des mono et diglycérides</i>	172.828	E472a
<i>Esters citriques des mono et diglycérides</i>	172.832	E472c
<i>Polysorbate 80</i>	172.840	E433

Dans la catégorie des émulsifiants *GRAS*, on trouve les MAG et des DAG qui sont naturellement générés chez l'Homme lors de la digestion des lipides, ainsi que les lécithines, sécrétées dans les sels biliaires. Industriellement, les MAG et DAG utilisés comme additifs alimentaires sont produits par glycérolyse des TAG ou par estérification du glycérol (EFEMA, 2015). Les lécithines sont des extraits d'œuf ou constituent des sous-produits de raffinage des huiles lorsqu'elles sont d'origine végétale comme la lécithine de colza (§ I-1.2).

Récemment, l'usage des émulsifiants de synthèse appartenant à la catégorie des additifs alimentaires directs a été remis en question. En effet, plusieurs études démontrent que l'exposition à certains de ces émulsifiants engendre l'altération des structures et des sécrétions du tractus gastro-intestinal (TGI) pouvant mener au développement de pathologies comme des maladies auto-immunes et des maladies inflammatoires intestinales chroniques (Csaki, 2011, Lerner et Matthias, 2015). Des études récentes corrént les événements dysbiotiques (altération du microbiote intestinal) dus à l'exposition aux émulsifiants et l'inflammation

CHAPITRE I : État de l'art

chronique, le développement de maladies métaboliques et le développement de l'obésité (Chassaing et al., 2015, Schippa et Conte, 2014). Il apparaît donc important de trouver des substituts à ces additifs synthétiques afin d'assurer la santé des consommateurs. Une stratégie consiste à identifier des systèmes naturels émulsifiés afin d'en extraire les molécules tensioactives pour formuler des émulsions. C'est dans ce contexte que l'intérêt s'est porté depuis quelques années sur les OB (Rayner, 2015) (§ I-3).

Les OB, composés d'OBP et de PL, sont donc des sources potentielles de tensioactifs naturels et d'origine végétale. Les PL sont intéressants car, outre, leur pouvoir tensioactif et antioxydant (Van Nieuwenhuyzen et Tomas, 2008), ils sont vecteurs d'AG d'intérêt nutritionnel (Cansell et al., 2003, Cui et Decker, 2016). Les OBP, quant à elles, présentent une structure en parapluie unique qui semble jouer un rôle primordial dans la stabilisation physique et chimique des émulsions (Wijesundera et al., 2013b). Nous avons montré à travers l'étude bibliographique (§ 3.3) que la structure supramoléculaire des OB reconstituées, par la combinaison des PL et OBP à l'interface, est importante pour la stabilisation physicochimique de l'huile en émulsion (Deleu et al., 2010, Rayner, 2015, Wijesundera et al., 2013b). Cependant, les interactions entre ces deux types de biomolécules et l'impact de la structuration de l'interface colloïdale sur la stabilité physicochimique sont encore mal compris. Quant à l'utilisation OB reconstituées *in vivo* et leur influence sur la biodisponibilité des AG, elles n'ont jamais été abordées à notre connaissance.

Parallèlement, la valorisation des co et sous-produits issus de l'industrie devient une préoccupation majeure des politiques de développement durable et responsabilité sociétale. A ce titre, les tourteaux, coproduits de l'extraction des huiles, sont très peu utilisés pour l'alimentation humaine malgré leur richesse en protéines (Gerzhova, 2016) et en PL (Cansell et al., 2017a) alors qu'ils possèdent des propriétés technologiques (Gerzhova, 2016, Joseph et al., 2018a) et nutritionnelles intéressantes (Klockeman et al., 1997, Fleddermann et al., 2013).

C'est dans ce contexte à la fois de recherche de nouveaux TA de type GRAS et de valorisation de coproduits que s'inscrit ce travail de thèse. Parallèlement, aux études de formulation et stabilisation d'émulsion, notre intérêt se porte aussi sur des aspects nutritionnels : l'apport d'AGPI n-3 et l'impact de la formulation sur leur biodisponibilité. La stratégie choisie consiste à utiliser le colza comme source des différents constituants des émulsions : OBP extraites des tourteaux, lécithine issue de l'étape de démulcination des huiles et l'huile de colza, huile ALA, extraite des graines. L'objectif général de ce projet de doctorat vise à maîtriser la formulation de ces émulsions 100% végétales par une meilleure connaissance des interactions

PL : OBP, d'étudier la stabilité des émulsions d'un point de vue physicochimique en conditions de stockage ou dans des conditions mimant les conditions gastro-intestinales et, enfin, d'évaluer l'influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des AG insaturés *in vivo* chez le rat. Pour atteindre cet objectif, nous nous proposons de répondre aux problématiques suivantes :

Quelle est la nature des interactions entre les OBP et les PL ? Cette étude passe par la connaissance de l'impact de la nature des têtes hydrophiles et de la longueur des chaînes hydrophobes des PL sur l'organisation des OBP. Pour ce faire, des PL modèles ou la lécithine de colza sont utilisés. La caractérisation des interactions entre les PL et les OBP au niveau moléculaire est abordée via l'étude de la structure moléculaire des protéines et du thermotropisme des PL par spectroscopie infrarouge ;

Comment la composition de l'interface influence-t-elle la mise en œuvre des émulsions huile dans eau et la stabilité physicochimique des émulsions ? Cette problématique est abordée par la formulation d'émulsions de taille contrôlée et présentant des rapports PL : OBP variables. La caractérisation physique (taille des gouttes) et chimique (oxydation des lipides de l'huile) est étudiée au cours du temps pour évaluer la stabilité des émulsions au cours du stockage ;

La composition de l'interface influence-t-elle la digestibilité et la bioaccessibilité des AGPI de l'huile de colza en émulsion ? Les émulsions sont placées dans des conditions mimant celles du milieu gastro-intestinal pour recueillir des éléments d'interprétation de l'étude *in vivo*. Parallèlement, cette étude est abordée par l'absorption lymphatique des AG et notamment de l'ALA chez le rat, sur une cinétique de 24 heures.

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

1. Matières premières et produits

1.1. Tourteau

Le tourteau de colza délipidé est offert par Bungee Canada (Oakville, Ontario) et entreposé à -18°C avant utilisation.

1.2. Lipides

La lécithine de colza est offerte par Lasenor (Espagne). La dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), le dimyristoylphosphatidylglycérol (DMPG), le dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG) et la DOPC proviennent d'Avanti Polar Lipids Inc (Alabama, USA). L'huile de colza de marque Rustica provient d'un magasin local (France).

2. Produits chimiques

Les différents produits et solvants utilisés sont répertoriés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Provenance et pureté des produits et solvants utilisés

<i>Produits et solvants</i>	Pureté	Fournisseur
<i>Acétone</i>	Grade pur	Xilab, France
<i>Acide acétique</i>	99%	Sigma Aldrich, France
<i>Acide chlorhydrique</i>	8N	Xilab, France
<i>Acide chlorhydrique deutéré</i>	1N	Sigma Aldrich, France
<i>β-mercaptoéthanol</i>		Bio-Rad, France
<i>Trifluorure de bore- Méthanol</i>	14%	Sigma Aldrich, France
<i>Bleu de Coomassie R-250</i>		Bio-Rad, Canada
<i>Chloroforme</i>	99.25%	JT Braker, France
<i>Chloroforme deutéré</i>	99.8%	Eurisotop, France
<i>Chlorure de deutérium</i>	1N	Sigma Aldrich, France
<i>Deuteroxyde de sodium</i>	1N	Sigma Aldrich, France
<i>Eau deutérée</i>		Eurisotop, France

<i>Produits et solvants</i>	Pureté	Fournisseur
<i>Acide éthylènediaminetétraacétique</i>		Sigma Aldrich, France
<i>Acide gallique</i>		Sigma Aldrich, France
<i>Carbonate de sodium</i>		Sigma Aldrich, France
<i>Éthanol</i>	99.65%	Xilab, France
<i>Ether de pétrole</i>		Anachemia, Canada
<i>Extrait pancréatique de porc (P7545)</i>		Sigma Aldrich, France
<i>Hydroxyde de sodium</i>	8N	Sigma Aldrich, France
<i>Iode</i>		VWR International, France
<i>Isooctane</i>		Sigma Aldrich, France
<i>Méthanol</i>	LC-MS grade	VWR International, France
<i>Méthanol deutéré</i>	99.8%	Eurisotop, France
<i>Oxyde deutéré</i>		Sigma Aldrich, France
<i>Réactif Folin-Ciocalteu</i>		Sigma Aldrich, France
<i>Tampon de charge Laemlli</i>		Bio-Rad, France
<i>Triphénylphosphate</i>	≥99%	Sigma Aldrich, France
<i>Standards Dual Xtra™ WesternC</i>		Bio-Rad, Canada
<i>Standards pour la CPG (TAG 17 :0)</i>		Sigma Aldrich, France
<i>Standard pour les EMAG (PC 15 : 0)</i>		Sigma Aldrich, France

3. Extraction des protéines et caractérisation du tourteau de colza et du concentrât protéique

3.1. Extraction des protéines

Les protéines sont extraites du tourteau de colza selon une adaptation de la procédure décrite par Wijesundera et al. (2013b). Cinq cents grammes de tourteau de colza sont mélangés à 4,5 L d'eau déionisée et laissés à macérer pendant 12 heures. Le pH de la suspension est ajusté à 12 à l'aide d'une solution d'hydroxide de sodium (NaOH, 4 N). Après 30 minutes sous agitation, la suspension est centrifugée à 10 000 g (Avanti J26XP) pendant 15 minutes. Le

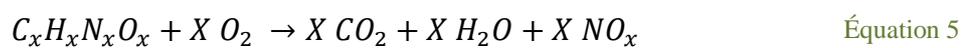
CHAPITRE II : Matériels et méthodes

surnageant est recueilli, filtré sur une gaze en coton. Le pH de la solution est abaissé à 6,5, le point isoélectrique des OBP, par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (1 N). Après 30 minutes d'agitation, la solution est centrifugée (5000 g, 30 minutes) et le précipité est recueilli. Après un lavage à l'eau distillée, le pH est réajusté à 6,5 et la suspension est centrifugée à nouveau. Une fois prélevé, l'extrait solide est congelé, lyophilisé et entreposé à température ambiante. Le concentrât protéique ainsi obtenu est nommé OBP. La quantité de protéines contenues dans les formulations est rapportée à la quantité de protéines dans le concentrât.

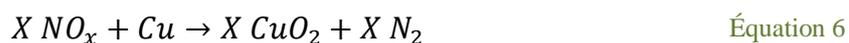
3.2. Caractérisation du tourteau et du concentrât protéique

3.2.1. Dosage des protéines

Le dosage des protéines du tourteau de colza et d'OBP est réalisé selon la méthode officielle AOAC 992.23 applicable pour les céréales et les oléagineux (méthode générique de combustion (méthode de Dumas)) (Horwitz et Latimer, 2005). Du tourteau de colza ou le concentrât d'OBP (1,5 g) est pesé dans une cupule d'aluminium puis insérés dans un bruleur (Truspec FO-428, LECO, USA). Le carbone et l'azote présents dans l'échantillon réagissent avec l'oxygène formant du dioxyde de carbone, de l'eau et de l'oxyde d'azote (Équation 5).



Puis, les gaz sont balayés à travers du cuivre chaud permettant la captation de l'oxygène et ainsi la formation d'oxyde d'azote en azote pur (Équation 6).



Du Lecosorb et du perchlorate de magnésium captent le dioxyde de carbone et l'eau, isolant l'azote libéré lors de la pyrolyse afin qu'il puisse être détecté par conductivité thermique différentielle avec le gaz vecteur (argon). L'équivalence en protéines est déterminée à l'aide d'un facteur de conversion de l'azote de 5,9 (Maurer et al., 2013) (Équation 7).

$$\text{Quantité } N_2 \times \text{Facteur de conversion} = \text{Quantité de protéines} \quad \text{Équation 7}$$

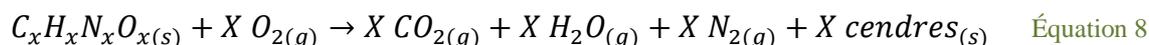
Le dosage des protéines est réalisé sur le tourteau de colza et le concentrât d'OBP en triplicata.

3.2.2. Dosage des cendres

Le dosage des cendres du tourteau de colza et le concentrât d'OBP est réalisé selon la méthode officielle AOAC 923.03 (méthode directe) (Horwitz et Latimer, 2005). Les cendres représentent l'ensemble des composés inorganiques comme les minéraux (calcium, potassium, etc.) contenus dans l'échantillon. Du tourteau ou du concentrât d'OBP (1,5 g) est pesé et déposé

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

dans une cupule. L'échantillon est déposé dans un four à 550°C jusqu'à ce que tout le produit soit réduit en cendres (Équation 8).



L'échantillon calciné est refroidi dans un dessiccateur et pesé. Le taux de cendres est donné par la formule :

$$\frac{\text{Quantité cendre}}{\text{Masse de l'échantillon}} = \text{Taux de cendre} \quad \text{Équation 9}$$

Le dosage des cendres est réalisé sur le tourteau de colza et le concentrât d'OBP en duplicata.

3.2.3. Dosage de la matière sèche et de l'humidité

Le dosage de la matière sèche et de l'humidité du tourteau de colza et le concentrât d'OBP est réalisé selon la méthode officielle AOAC 925.09 (méthode du four à vide) (Isotemp, ThermoFisher, USA) (Horwitz et Latimer, 2005). La méthode consiste à déposer 1,5 g de produit dans un plat parfaitement sec (séchage à 98-100°C). Le produit est chauffé à 98-100°C dans une chambre à vide partiel (pression ≤ 25 mm Hg (3.3 kPa)) jusqu'à atteindre un poids fixe (environ 5 heures). Puis, l'ensemble est retiré du four, refroidi dans un dessiccateur et pesé. La quantité de la matière sèche est déterminée par la quantité de farine résiduelle et l'humidité par méthode indirecte (Équation 10).

$$H = E - F_r \quad \text{Équation 10}$$

H : Humidité

E : Échantillon

F_r : Farine résiduelle

Le dosage de la matière sèche et de l'humidité est réalisé sur le tourteau de colza et le concentrât d'OBP en duplicata.

3.2.4. Dosage des lipides totaux

Le dosage des lipides du tourteau de colza et du concentrât d'OBP est réalisé par la méthode Soxhlet à l'éther de pétrole, méthode officielle AOAC 945.16 (Horwitz et Latimer, 2005). Deux grammes de tourteau de colza ou d'OBP sont déposés dans une cartouche de cellulose puis insérés dans l'appareil d'extraction Soxhlet. L'éther de pétrole circule dans l'appareil solubilisant les lipides. Le solvant est évaporé et la quantité de lipides est pesée. La teneur en lipides totaux est donnée par la formule :

$$\frac{\text{Quantité cendre}}{\text{Masse de l'échantillon}} = \text{Taux de cendre} \quad \text{Équation 11}$$

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Le dosage des lipides totaux est réalisé sur le tourteau de colza et le concentrât d'OBP en triplicata.

3.2.5. Caractérisation qualitative des protéines de l'extrait

Les protéines contenues dans le concentrât d'OBP sont caractérisées par gel d'électrophorèse (protocole adapté de Laemmli (1970)). Une solution de tampon de charge Laemmli et de β -mercaptoéthanol (selon un ratio 20 : 1) est ajoutée aux OBP puis chauffée à 90°C pour permettre la dénaturation des protéines. Les puits du gel de polyacrylamide sont remplis par l'échantillon protéique ou par les standards Dual Xtra™ WesternC. Le gel est ensuite opéré durant 1 heure à 15 mA. Le gel est coloré à l'aide de la solution aqueuse (bleu de Coomassie R-250 1% m/v, acide acétique 10% v/v, éthanol 40% v/v) pendant 12 heures et mis en décoloration (méthanol 10% v/v, acide acétique 10% v/v) pour la nuit. Le gel est observé à l'aide d'un imageur Chemidoc XRS (Biorad, France).

3.2.6. Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux du tourteau de colza et du concentrât d'OBP est réalisé par dosage colorimétrique (protocole adapté de Singleton et al. (1999)). Vingt-cinq mL d'un mélange d'acétone et d'eau (70 : 30) sont ajoutés à 2 grammes de tourteau de colza ou de concentrât protéique et agité pendant 40 minutes. La suspension est ensuite centrifugée (2000 g pendant 5 minutes, Aventi J-301 Centrifuge, Beckman Coulter, USA) et le surnageant est prélevé et mis de côté. Le procédé est répété une deuxième fois et les surnageants sont rassemblés. Un volume d'échantillon est prélevé et dilué dans de l'eau déminéralisée à un ratio de 1 : 16. Puis, la solution est mise en contact avec une solution de réactif Folin-Ciocalteu (1 : 17) et de carbonate de sodium (1 : 10) et mis sous obscurité pendant 2 heures. Les échantillons sont placés sur une plaque à 96 puits et l'absorbance est mesurée en spectroscopie visible à 750 nm (Spark 10M, Tecan). La concentration en polyphénols est calculée à l'aide d'une gamme étalon à base d'acide gallique et exprimé en mg d'équivalent d'acide gallique(GAE)/g d'échantillon.

3.3. Caractérisation de la lécithine de colza

3.3.1. Préparation des esters méthyliques d'acides gras

Les AG de la lécithine sont transméthylés selon la méthode de Morrison et Smith (1964). L'équivalent de 1 mg de lécithine et de 0,1 mg d'un standard interne (PC 15 : 0 à hauteur de 10%) est additionné à 1 mL de solution méthanolique de trifluorure de bore (14% m/v). Le tube est fermé hermétiquement et incubé 20 minutes à 100°C. Après addition de 2 mL

d'isooctane et 1 mL de soude (5 N), l'échantillon est homogénéisé (vortex, 30 secondes) puis centrifugé (1050 g, 10 min, 4°C ; Sorvall ST-40R ; Thermo Scientific, Waltham, Etats-Unis). La phase organique contenant les esters méthyliques d'AG (EMAG) est prélevée. L'extraction est répétée trois fois par ajout de 2 mL d'isooctane. Les EMAG sont rassemblés, concentrés par évaporation du solvant, lavés à l'aide de 1 mL d'eau distillée puis stockés à 4°C en attendant d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

3.3.2. Chromatographie en phase gazeuse

La CPG consiste en la séparation de composés volatils selon leur point d'ébullition et leur polarité. Les composés sont transportés par un gaz vecteur non réactif (phase mobile) à travers une colonne capillaire contenant la phase stationnaire.

Les EMAG sont analysés par CPG (TRACE GC, Thermo Scientific). Ils sont injectés dans une colonne capillaire de silice greffée (BPX70, 60 m x 0,25 mm, film de 0,25 µm ; SGE, France). La pression d'entrée du gaz vecteur (dihydrogène) est fixée à 1 Bar. Le volume de la solution injecté varie entre 1 et 2 µL en mode d'injection split pour un rapport de fuite de 1:80. Le programme de température est de 160°C, la température augmente jusqu'à 180°C à une vitesse de 1,3°C/min, puis se maintient pendant 65 minutes avant d'augmenter de 25°C/min jusqu'à 230°C pendant 15 minutes. L'injecteur et le détecteur sont utilisés à température maintenue de 250 et 280°C, respectivement. L'identification des AG est obtenue par comparaison des temps de rétention avec ceux d'étalons chromatographiés dans les mêmes conditions et sur le même chromatographe. L'intégration des pics d'AG est réalisée par le logiciel Chromquest (Thermofonigan, Courtaboeuf, France). La quantification pondérale des EMAG est obtenue grâce à l'ajout d'un standard interne (PC 15:0) additionné à l'échantillon, avec un ratio 3 : 2 par rapport à la lécithine, avant toute manipulation.

3.3.3. Identification et quantification des phospholipides par résonance magnétique nucléaire du proton et du phosphore

La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire (RMN) consiste en l'étude des propriétés magnétiques des noyaux (possédant un spin nucléaire non nul : le nombre de protons et de neutrons est impair) soumis à l'action conjointe de deux champs magnétiques ; un champ magnétique statique intense B_0 et un champ électromagnétique tournant B_1 . Les noyaux placés dans un champ magnétique intense s'orientent de manière parallèle au champ il en résulte une aimantation macroscopique ou moment magnétique noté M_0 . Par ailleurs, les noyaux adoptent un mouvement de précession selon une fréquence dite de Larmor ν_0 (Équation 12).

$$\nu_0 = \frac{-\gamma B_0}{2\pi} \quad \text{Équation 12}$$

γ : Rapport gyromagnétique

Pour basculer le moment magnétique M_0 le long de l'axe y (Figure 14), le champ B_1 , perpendiculaire à B_0 et oscillant à une fréquence ν_0 , est appliqué. À la suite de l'arrêt de l'application du champ B_1 , un phénomène de relaxation est observé. Ce phénomène composé d'une relaxation longitudinale selon l'axe z et une relaxation transversale selon le plan xy engendre un signal nommé Free Induction Decay (FID) : c'est le signal RMN. L'application d'une transformée de Fourier sur le FID (signal acquis dans le domaine temps) permet l'obtention d'un spectre dont le déplacement chimique des raies (position en fréquence) est caractéristique de l'environnement électronique du noyau et dont la largeur est dépendante de la dynamique des molécules.

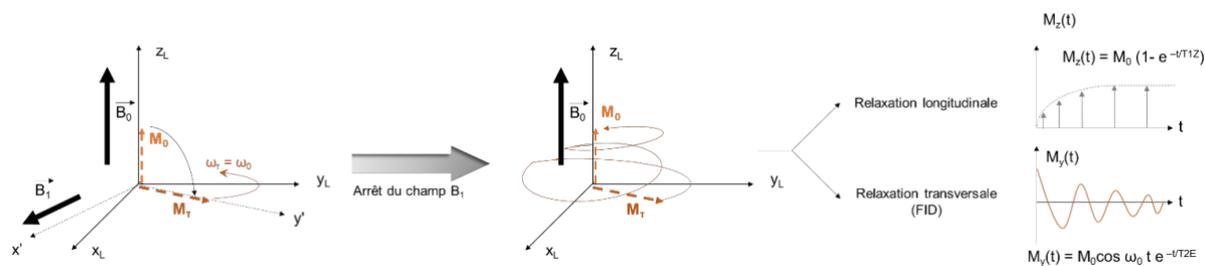


Figure 14: Perturbation et relaxation du moment magnétique (Bardeau, 2015)

L'identification et la quantification des PL sont réalisées à l'aide d'un spectromètre à résonance magnétique nucléaire Bruker Avance III HD 400 (Bruker Biospin, France) équipé d'une sonde 5 mm $^1\text{H}/^31\text{P}$ de type Smart Probe travaillant à la fréquence de résonance de 162 MHz pour le phosphore. Le déplacement chimique spécifique des noyaux phosphore entre -1 ppm et 2 ppm (caractéristique des phosphates) permet l'identification des PL. Vingt mg de lécithine de colza sont séchés sous flux d'azote puis solubilisés avec 330 μL de chloroforme deutéré (CDCl_3), 130 μL de méthanol deutéré (MeOD), 30 μL d'acide éthylènediaminetétraacétique à (2 nM, pH 6) et 50 μL de solution de triphénylphosphate préalablement préparée à une concentration de 2 mg/mL dans un mélange $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ (7 : 1 ; v/v). Les échantillons de lécithines, contenus dans des tubes de verre de 5 mm de diamètre, sont maintenus à $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ lors des analyses. Les paramètres du spectromètre à RMN sont ajustés de façon à appliquer une impulsion $\pi/2$ de 15 μs avec un découplage des protons pendant l'acquisition, une fenêtre spectrale de 50 kHz, un nombre de scans variant de 10 à 40 k selon la concentration, un nombre de points de 32 K, et un temps de recyclage de 10s. Le traitement des spectres est effectué grâce au logiciel Topspin 3.5. L'intégration des pics de résonance est réalisée à l'aide du logiciel

DmFit (Massiot et al., 2002). Leur comparaison avec les déplacements chimiques de la littérature (Estrada et al., 2008) permet l'identification des classes de PL. La comparaison avec l'intensité du pic du triphénylphosphate permet la quantification des classes de PL.

4. Caractérisation des interactions phospholipides-protéines par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

4.1. Préparation des liposomes

Le protocole de préparation des liposomes est adapté de celui décrit par Lefèvre et Subirade (2000a). Les liposomes sont formés par la dispersion des différents PL (DMPC, DOPC, DMPG et DPPG) à une concentration de 14,7% m/v dans de l'eau deutérée (D₂O) par des variations successives de températures au-dessus et en-dessous de leur température de transition respective (Tableau 11). Les suspensions de PL sont chauffées 10°C au-dessus de la température de transition de phase du PL dans un bain marie, mélangées (vortex) durant 3 minutes, refroidies dans de la glace pour le DMPC, le DMPG et le DPPG et dans un bain d'azote liquide pour le DOPC. Un total de 3 cycles de chauffage/refroidissement est appliqué. Puis, le potentiel de deutérium (pD) est ajusté à l'aide de chlorure de deutérium (DCl) et de deutéroxyde de sodium (NaOD) à 5,0 et 7,5 respectivement. Parallèlement, une solution d'OBP à 6,25% m/v dans du D₂O dont le pD est ajusté à 5,0 et 7,5 est mise sous agitation pendant 48 heures à 4°C. La solution d'OBP est ajoutée aux liposomes et 3 nouveaux cycles thermiques sont réalisés. La suspension finale est caractérisée par une concentration de 10% m/v en PL et 2% m/v en protéines (soit 2% d'OBP). Puis, le pD est réajusté pour l'obtention de suspensions à pD finaux de 5,0 et de 7,5.

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

Tableau 11 : Température de transition des phospholipides purs

<i>Phospholipides purs</i>	<i>Température de transition (°C)</i>
<i>DMPC</i>	23
<i>DOPC</i>	-17
<i>DMPG</i>	23
<i>DPPG</i>	41

4.1.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

La FTIR consiste à étudier les spectres électromagnétiques produits lors des transitions énergétiques intramoléculaires vibrationnelles et rotationnelles. La force des liens intramoléculaires et la masse des atomes impliquées se traduisent par une fréquence d'oscillation caractéristique, responsable de l'absorption énergétique des molécules sous la forme d'interférogrammes détectés par l'appareil. Cette distribution spectrale est soumise à une transformée de Fourier résultant en un spectre infrarouge, distribution énergétique dépendante du nombre d'ondes. Cette technique permet notamment d'investiguer les interactions PL : protéine par l'étude de la structure secondaire des protéines et du thermotropisme des PL.

Les spectres infrarouges sont acquis à l'aide d'appareils FTIR Nicolet Magna 560 ou Nicolet Nexus 870 (ThermoScientific, Madison, WI) équipés d'un détecteur Mercure-Cadmium-Tellurure refroidi à l'azote liquide et analysés grâce au logiciel Omnic 8.2. Un volume de 20 μL des suspensions de liposomes est inséré entre deux fenêtres de CaF_2 (Thermo Fisher Scientific, USA) séparées par un espaceur de teflon (International Crystal Lab, USA) et placé dans une cellule thermostatée. L'échantillon est refroidi à 15°C puis, les spectres sont recueillis de 15 à 80°C avec une acquisition tous les 2°C de 15 à 40°C et tous les 5°C jusqu'à 80°C . La suspension est refroidie de nouveau à 21°C , pour une nouvelle acquisition. Les plages de température sont appliquées en s'assurant de respecter une période de stabilisation de la température de 3 minutes, entre chaque acquisition. Les spectres sont acquis en utilisant 128 interférogrammes à une résolution de 4 cm^{-1} et sous une apodisation Happ-Genzel. La vapeur d'eau est soustraite des spectres quand nécessaire. Une correction basale linéaire à trois points est appliquée de 4000 à 800 cm^{-1} passant par 1900 cm^{-1} (couvrant la région de vibration des CH symétriques et asymétriques) et de 1800 à 1500 cm^{-1} (couvrant la région amide I et celle des vibrations carbonyle [$\nu(\text{C}=\text{O})$]). La région de 3000 à 2800 cm^{-1} (vibration CH) et la région 1800 à 1500 cm^{-1} sont normalisées. Une déconvolution de Fourier est appliquée sur la région

Amide I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) avec une largeur de bande de 22 et un facteur d'accentuation de 2,2 et sur la région de vibration carbonyle ($1780-1700\text{ cm}^{-1}$) avec une largeur de bande de 24 et un facteur d'accentuation de 2.4. La Figure 15 présente un exemple de spectre infrarouge typique pour la phosphatidylcholine dans l'eau lourde avec les régions d'absorbance des différents groupements chimiques.

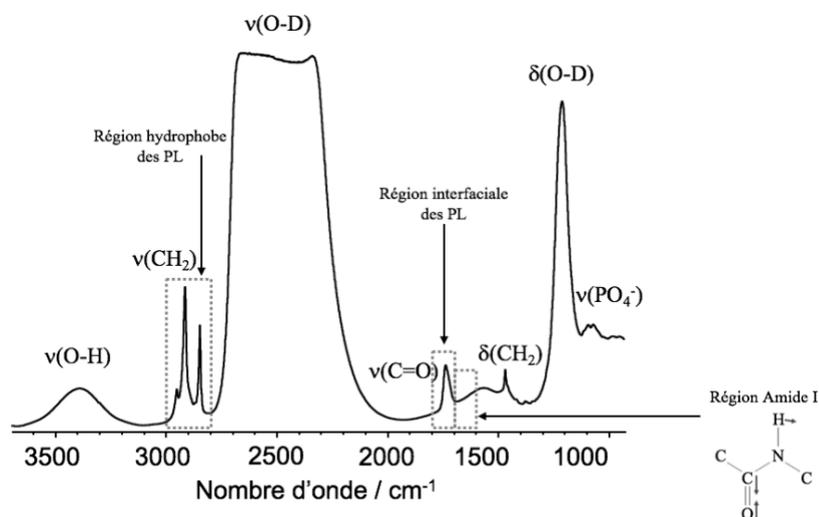


Figure 15 : Exemple de spectre infrarouge pour un phospholipide et ses différentes régions d'absorbance identifiées (Lefèvre, 2013)

5. Préparation et caractérisation physicochimique des émulsions

5.1. Formulation et émulsification

La solution mère d'OBP est préparée en solubilisant 22,9% m/m de concentrât dans de l'eau distillée sous agitation pendant 24 heures à 4°C et à pH 5,5 et 7,5 respectivement. Compte-tenu de la pureté du concentrât d'OBP, la concentration en protéines est de 20% m/m. La solution mère de PL est obtenue par dissolution de 32,7% m/m de lécithine dans l'huile de colza, agitée pendant 72 heures avant utilisation. Compte-tenu de la pureté en PL de la lécithine de colza, la concentration en PL est de 20% m/m.

Les émulsions H/E pour les études de stabilité physicochimique, de digestion *in vitro* et de bioaccessibilité *in vivo* chez le rat sont réalisées par simple agitation mécanique, méthode facilement transposable dans l'industrie agroalimentaire. Les émulsions concentrées sont réalisées à l'aide d'un fouet développé au laboratoire et motorisé à l'aide d'un appareil rotatif (IKA, Staufen, Allemagne). Les PL sont préalablement dissous dans l'huile de colza et la solution huileuse est incorporée graduellement et de façon contrôlée à l'aide d'une ampoule à décanter dans la phase aqueuse (eau déionisée) contenant ou non les OBP. Différentes

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

émulsions concentrées sont réalisées à différentes concentrations d'huile et différents ratios PL : OBP (80% m/m d'huile de colza pour le rapport PL : OBP 1:0, 70% m/m d'huile de colza pour le rapport 1:1; 2:3 et 1:2 et 67,5% m/m d'huile de colza pour le rapport PL : OBP 1:3 compte-tenu de la viscosité de la solution protéique). Toutes les émulsions concentrées sont diluées par ajout d'une phase aqueuse (eau déionisée) pour atteindre une concentration finale en huile de 20% m/m et en PL de 0,5% m/m. Pour les études de stabilité dans le temps, de l'azide de sodium est ajouté à hauteur de 0,01 % (m/v). Le présente les compositions des formulations colloïdales utilisées.

Tableau 12 : Tableau des compositions des formulations des émulsions huile dans eau (20% m/m)

<i>Procédé</i>	<i>Huile</i>	<i>EFPM</i>	<i>pH</i>	<i>OBP</i>	<i>Rapport</i>	
	%	%		%	PL : OBP	
				0	1 : 0	
				0,5	1 : 1	
			5,5	0,75	2 : 3	
				1	1 : 2	
				1,5	1 : 3	
<i>Fouet</i>	Colza	20	Lécithine	0,5		
				0	1 : 0	
				0,5	1 : 1	
			7,5	0,75	2 : 3	
				1	1 : 2	
				1,5	1 : 3	
		Tween 80	0,5	5,5	0	n/a

n/a : non applicable

5.2. Caractérisation physique des émulsions

5.2.1. Microscopie en contraste de phase

La morphologie des gouttelettes d'huile des émulsions est caractérisée par microscopie à contraste de phase (BX51, Olympus) avec un microscope équipé d'une caméra vidéo (ColorView I, Soft Imaging System) permettant l'acquisition de clichés grâce au logiciel analySIS docu (Olympus Soft Imagine Solutions GmbH). Cette technique est utilisée pour

confirmer la taille mesurée par granulométrie et visualiser l'état de dispersion des gouttelettes des émulsions réalisées au jour de leur fabrication (J0). Elle sert également au suivi de la morphologie des gouttes des émulsions diluées au cours du temps (étude sur un mois).

5.2.2. Granulométrie laser

La taille des gouttelettes et leur distribution sont caractérisées par granulométrie laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Royaume-Uni). Le principe de cette méthode consiste à mesurer la variation angulaire de l'intensité de la lumière dispersée lorsqu'un rayon lumineux traverse un échantillon de particules en solution. Les données de diffraction sont analysées afin de calculer la taille des particules grâce à la théorie de Mie.

Un échantillon d'émulsion est injecté dans la cellule de circulation jusqu'à saturation désirée (10%) du système optique. Les émulsions formulées avec les OBP sont diluées avant analyse dans une solution de SDS (0,01%) pour désagréger les gouttelettes. Le diamètre moyen en volume des particules, $D_{[4,3]}$ (Équation 13), le diamètre moyen en surface des particules, $D_{[3,2]}$ (Équation 14) et leur uniformité, U , (Équation 15) sont utilisés comme indicateurs de la taille des gouttelettes et de l'uniformité de la dispersion au jour de leur fabrication. Le suivi de ces paramètres pour les émulsions diluées et entreposées à 4°C est réalisé au cours du temps (étude sur un mois).

$$D_{[4,3]} = \frac{D_i^4 n_i}{D_i^3 n_i} \quad \text{Équation 13}$$

$$D_{[3,2]} = \frac{D_i^3 n_i}{D_i^2 n_i} \quad \text{Équation 14}$$

$$\text{Uniformité} = \frac{V_i |D_{50} - D_i|}{D_{50} V_i} \quad \text{Équation 15}$$

D_i : Diamètre de la gouttelette i de la distribution
 n_i : Nombre de gouttelettes de diamètre D_i de la distribution
 V_i : Volume des gouttelettes de diamètre D_i de la distribution

5.2.3. Diffraction dynamique de la lumière (diffraction laser)

La taille des chylomicrons et leur distribution sont caractérisées par diffraction dynamique de la lumière (Vasco[®], Cordouan, France). Le principe de cette technique consiste à mesurer les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée par l'échantillon selon sa taille et sa vitesse de déplacement due au mouvement brownien. La relation entre la taille et la vitesse de déplacement des particules est définie par l'équation de Stokes-Einstein (Équation 16) et permet de déterminer leur rayon (R_h).

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} \quad \text{Équation 16}$$

D : Diffusivité
 k : Constante de Boltzmann
 T : Température (en Kelvin)
 η : Viscosité de la phase dispersante
 R_h : Rayon hydrodynamique des particules sphériques

Un volume de solution lymphatique est injecté dans la cellule de lecture. Selon l'approche algorithmique de l'analyse des cumulants, la taille moyenne pondérée (Z-average) et l'indice de polydispersité (PdI) sont utilisés comme indicateur de la taille des chylomicrons et de l'uniformité de la dispersion.

5.2.4. Indice de crémage

L'indice de crémage est déterminé pour évaluer la stabilité macroscopique d'une émulsion. L'émulsion se stratifie en deux couches visibles à l'œil nu : une couche blanche, la crème, et une couche translucide ou transparente, la phase aqueuse (Figure 16).

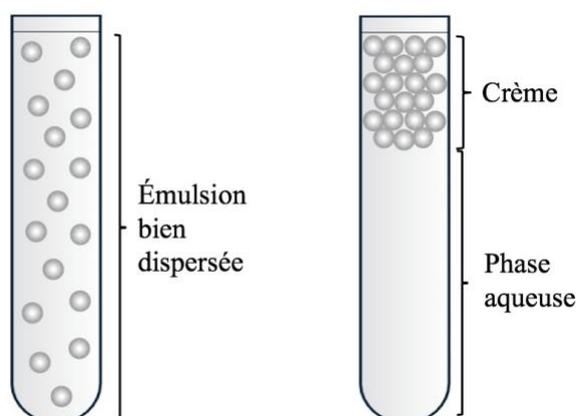


Figure 16 : Représentation des différentes couches de crémage

La hauteur de la couche de la phase aqueuse et celle de l'émulsion sont mesurées. L'indice de crémage est calculé selon la formule (Équation 17).

$$\text{Indice de crémage} = \frac{H_s}{H_E} \times 100 \quad \text{Équation 17}$$

H_s : Hauteur de la phase aqueuse
 H_E : Hauteur totale de l'émulsion

5.2.5. Quantification des protéines adsorbées aux interfaces

La quantification des protéines aux interfaces se fait par méthode indirecte à l'aide d'un dosage de Bradford sur la phase continue de l'émulsion (Bradford, 1976). Le dosage de Bradford (Bio-Rad, France) consiste à faire réagir un agent colorant, le Brilliant Blue G avec les protéines en

solution. La réaction engendre une complexation des deux molécules détectables en spectroscopie à une longueur d'onde comprise entre 465 et 595 nm.

Les émulsions sont centrifugées à 1000 g (5 minutes, Aventi J-301 Centrifuge, Beckman Coulter, USA) permettant le crémage de l'émulsion et une séparation nette de la couche de crème et de la phase aqueuse. Un volume de phase aqueuse est placé sur une plaque à 96 puits. Les échantillons sont mis en contact avec une solution de réactif de Bradford. La plaque est ensuite agitée et lue en spectroscopie visible (Spark 10M, Tecan) à 595 nm. L'absorbance est traitée à l'aide d'une gamme étalon à base d'OBP qui permet le calcul de la concentration en protéine dans la phase aqueuse de l'émulsion. Ainsi, en dosant les protéines libres dans la phase aqueuse, il est possible de déterminer la quantité de protéines adsorbées aux interfaces.

5.2.6. Recouvrement de surface

Le recouvrement de surface des gouttes par les OBP est classiquement défini par la masse d'émulsifiant par unité de surface développée par les gouttelettes lipidiques de l'émulsion. Il est exprimé en mg de protéines/m². Le recouvrement des gouttes par les OBP est calculé utilisant le diamètre moyen en surface des gouttelettes d'émulsion déterminé par granulométrie et la quantité de protéines adsorbées à l'interface déterminée par dosage de Bradford (cf § 5.2.5) (Équation 18) (McClements, 2015).

$$\text{Recouvrement de surface} = \frac{m_{OBP} \times OBP_{ads}}{\frac{6V_d}{D[3,2]}} \quad \text{Équation 18}$$

m_{OBP} : Masse d'OBP totale introduite dans la formulation (g)

OBP_{ads} : Pourcentage d'OBP adsorbées à l'interface (%)

V_d : Volume d'huile dans l'émulsion (m³)

$D[3,2]$: Diamètre moyen en surface des particules (m)

Connaissant la surface occupée par une molécule d'OBP (8,1 nm²) (Tzen & Huang, 1992) et la masse molaire d'une oléosine (19000 g/mol) (Tzen & Huang, 1992), il est possible d'estimer la surface occupée par les protéines adsorbées (en faisant l'hypothèse qu'il n'y a pas de changement de conformation et en assimilant le concentrât protéique à des oléosines pures).

$$\text{Surface développée par les protéines} = \frac{m_{OBP} \times OBP_{ads}}{M} \times N_A \times 8,1 \quad \text{Équation 19}$$

m_{OBP} : Masse d'OBP totale introduite dans la formulation (g)

OBP_{ads} : Pourcentage d'OBP adsorbées à l'interface (%)

M : Masse molaire (g/mol)

N_A : Nombre d'Avogadro : 6,022. 10²³

Ce calcul permet d'avoir une première approximation de la surface développée par les protéines comparativement à celle développée par les gouttes d'huile $\left(\frac{6V_d}{D[3,2]}\right)$.

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

5.3. Caractérisation chimique des émulsions

L'oxydation des AGPI conduit à des produits primaires d'oxydation dont les hydroperoxydes et les diènes conjugués (CD) par délocalisation transitoire des doubles liaisons. L'évolution de l'oxydation peut se suivre par la mesure de l'indice de peroxyde (IP) et l'absorbance spécifique des CD. À ces fins, l'huile de colza et les émulsions à pH 5,5 (Tableau 12) sont déposées dans une étuve à 60°C et retirées à 48, 72, 96 et 168 heures.

5.3.1. Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde (IP) est défini par la quantité d'oxygène actif des peroxydes (meq O₂) contenus dans un kilogramme d'huile. Les dosages sont réalisés selon la méthode normalisée normes française (NF ISO 3960). La détermination de l'IP consiste à dissoudre 2 g d'huile dans un mélange de chloroforme et d'acide acétique (2 : 3 v/v) auquel une solution aqueuse d'iodure de potassium est ajoutée. Le mélange est agité et mis à l'obscurité pendant 5 minutes. Un volume d'eau distillée est ajouté afin d'arrêter la réaction. Du thiodène est ajouté en tant qu'indicateur coloré. Puis, la titration de l'iode libéré se réalise à l'aide d'une solution de thiosulfate de sodium (0,01 N) (Équation 20).

$$IP = \frac{(V_1 - V_0) \times T \times 1000}{m} \quad \text{Équation 20}$$

V₁ : Volume de solution titrée de thiosulfate de sodium (mL)

V₀ : Volume de solution de thiosulfate de sodium pour le blanc (mL)

T : Normalité exacte de la solution titrée de thiosulfate de sodium

m : Masse de l'échantillon (g)

Les dosages d'IP de l'huile ont été réalisés en duplicata par l'ITERG.

5.3.2. Diènes conjugués

Les CD absorbent dans l'UV, à une longueur d'onde de 233 nm. Le suivi de l'oxydation des lipides est ainsi réalisé par la détermination de la teneur en CD par spectroscopie UV.

La quantification de la formation de CD est adaptée du protocole décrit par Berton et al. (2011). Un volume d'huile ou d'émulsion est mélangé à un mélange d'hexane et d'isooctane (3 : 1 v/v) afin de solubiliser les PL et les TAG et de les extraire. La solution est agitée (vortex) et centrifugée (2000 g pendant 5 minutes, Aventi J-301 Centrifuge, Beckman Coulter, USA). Puis, le surnageant est prélevé, séché et entreposé à -18°C jusqu'à l'analyse spectroscopique. Les lipides extraits sont ensuite solubilisés dans de l'hexane et soumis à une lecture de densité optique à 233 nm (Hitachi UH5300, Japan). Les mesures de DO sont normalisées par la masse de lipides et par unité de volume de la solution (Abs/mg.mL⁻¹). La valeur des CD est exprimée selon l'équation suivante (Wettansinghe et Shahidi, 1999) (Équation 21).

$$\text{Valeur CD} = \frac{A_{233\text{nm}}}{c \times l} \quad \text{Équation 21}$$

Valeur CD : Valeur de diènes conjugués

$A_{233\text{nm}}$: Absorbance à 233 nm

c : Concentration en huile (mg/mL)

l : Largeur de la cuve (cm)

6. Caractérisation de la bioaccessibilité des émulsions : études *in vitro* et *in vivo*

6.1. Détermination du comportement des émulsions en conditions de digestion *in vitro*

6.1.1. Stabilité physique des émulsions aux variations de pH

Les émulsions à pH 5,5 (Tableau 12) sont incubées à différents pH en utilisant la séquence pH initial, pH gastrique et pH intestinal et différents temps durant la phase gastrique de manière à simuler les conditions environnementales de l'estomac et de l'intestin (Tableau 13). Les paramètres morphologiques des gouttelettes sont ensuite déterminés par microscopie en contraste de phase (§ II-5.2.1) et granulométrie laser (§ II-5.2.2).

Tableau 13 : Conditions expérimentales simulant le pH et le temps de résidence du tractus gastrointestinal (Couedelo et al., 2011)

<i>Milieu</i>	<i>Initial</i>	<i>Gastrique</i>	<i>Intestinal</i>
<i>pH</i>	5,5	1,5- 3,5	7,4
<i>Temps de séjour (h)</i>	0	0,5 – 1 – 1,5 – 2 – 3	2
<i>Température (°C)</i>	37	37	37

Afin d'évaluer l'activité pancréatique (§ II-6.1.2), les émulsions sont incubées à pH 8 à 37°C sous agitation pour une durée d'environ une heure. Pour s'assurer que la taille des gouttelettes n'interfère pas avec l'activité enzymatique, nous avons également testé la stabilité des émulsions sous ces conditions.

6.1.2. Activité de la lipase pancréatique

La détermination de l'activité de la lipase pancréatique envers les émulsions est réalisée à l'aide du pHstat (Titroline alpha 10 plus, Scott Instrument) selon une adaptation du protocole décrit dans Couedelo et al. (2011). Cette technique quantifie la production d'AG libérés lors de leur hydrolyse grâce à la quantité de NaOH ajoutée, nécessaire pour maintenir une émulsion à pH

CHAPITRE II : Matériels et méthodes

constant. La pente de la droite à l'origine permet de calculer l'activité de la lipase pancréatique. La lipase pancréatique provient d'un extrait de pancréas porcine (P7545, Sigma Aldrich, France) contenant un mélange enzymatique de lipase, de phospholipase, d'amylase, de trypsine, de ribonucléase et de protéase.

Les émulsions (Tableau 12) sont mises en contact avec d'extrait pancréatique (0,1 mg/mL d'émulsion) dispersé dans une solution de CaCl₂ à 2 mM. L'unité de titration automatique de l'appareil est programmée de façon que le pH de la solution contenant l'émulsion et les enzymes soit maintenu à pH 8 à l'aide d'une solution de NaOH à 0,025 M. L'activité de la lipase est calculée à partir de la pente provenant de la courbe de titration (Équation 22). Les quantités des solutions sont déterminées afin d'atteindre des conditions de saturation.

$$Ac = \frac{C - a}{P} \quad \text{Équation 22}$$

Ac : Activité lipasique à pH 8 (mEq/min/g d'enzyme)

C : Concentration de la solution de soude utilisée pour la titration (mEq/mL)

a : Pente moyenne (mL soude/min)

P : Prise d'essai (lipase) (g)

Les études sont réalisées à 37°C en plusieurs exemplaires (n=6).

6.2. Détermination de la bioaccessibilité des lipides : étude *in vivo* chez le rat

6.2.1. Approche expérimentale *in vivo* chez le rat

Les expérimentations sont réalisées par l'administration unique de 2 mL d'une émulsion calibrée à 20% d'huile ou d'une charge de 1,6 mL d'eau et de 0,4 mL d'huile par injection intragastrique chez le rat Wistar à jeun depuis 12 heures pour une mesure indirecte de la biodisponibilité (protocole décrit dans Couedelo et al. (2015)). Les rats sont mis sous anesthésie générale puis, le canal lymphatique thoracique est fistulé pour dériver la circulation lymphatique. La lymphe est ensuite collectée pendant 24 heures puis est entreposée à -80°C pour une analyse des chylomicrons (taille et composition en AG). Ces tests sont réalisés sur trois groupes expérimentaux composés de 5 rats mâles Wistar de poids moyen (400 g) correspondant à trois formulations :

- une émulsion stabilisée par des PL seulement,
- une émulsion stabilisée par PL : OBP à un ratio 1:3,
- un volume d'huile de colza en phase continue.

6.2.2. Dosage des acides gras des lipides totaux de la lymphe

Les AG de la lymphe sont transméthylés selon la méthode de Lepage et Roy (1986). L'équivalent de 6 mg de lipides de lymphe et d'un standard interne (TAG 17 : 0) à hauteur de 10% est additionné de 2 mL d'une solution de méthanol : isooctane (4:1 v/v) et de 0,2 mL de chlorure d'acétyle. Le tube est fermé hermétiquement et incubé 60 minutes à 100°C sous agitation puis refroidi sur glace. Après addition de 5 mL de Na₂CO₃ (6% m/v), l'échantillon est homogénéisé (vortex, 30 secondes) puis centrifugé (1050 g, 10 min, 4°C ; Sorvall ST-40R ; Thermo Scientific, Waltham, Etats-Unis). La phase organique contenant les esters méthyliques d'AG est prélevée puis stockée à 4°C en attente d'analyse par CPG. Les EMAG sont analysés dans les mêmes conditions chromatographiques que celle précédemment décrites (§ II-3.3.2).

7. Analyses statistiques

Les traitements statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel SAS. Les données, recueillies par triplicata, sont exprimées par des valeurs moyennes avec leur écart-type. Les analyses statistiques intergroupes sont réalisées par analyse de variance à une direction (ANOVA). Puis, les données sont analysées par test Least Significant Difference (LSD). Les données sont considérées comme significativement différentes lors d'une p-value < 0,05.

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

Les interactions PL-protéines influencent la structure de l'interface colloïdale et par conséquent, la stabilité physicochimique des émulsions. À ce jour, peu d'informations concernant les interactions entre les OBP et les PL sont disponibles (Deleu et al., 2010, Nikiforidis et al., 2013). À l'instar des membranes végétales naturelles, la monocouche interfaciale des OB montre une présence majoritaire de PL zwitterioniques, tels que PC et PE (Katavic et al., 2006, Millichip et al., 1996). Il semble que la composition de cette monocouche joue un rôle décisif sur l'intégration des OBP au sein de l'interface de l'organelle. En effet, lors de la création des OB au sein des cellules des oléagineux, la présence de PL anioniques comme PI et PA, augmente significativement l'efficacité de l'intégration des OBP au sein de la monocouche de PL composant l'interface de l'organelle (Chen et Tzen, 2001). Ces résultats suggèrent que les PL anioniques jouent un rôle clé dans le ciblage ou l'assemblage des OBP au sein de la membrane des OB (Tzen, 2012). Au vu de ces résultats, il semble exister des interactions électrostatiques entre les PL anioniques et certaines régions des OBP. Néanmoins, ces interactions pourraient être caractérisées plus finement, non seulement en fonction de la tête polaire des PL mais aussi en fonction de la nature des chaînes d'AG.

Dans ce contexte, nous avons abordés l'étude des interactions PL : protéines en utilisant la spectroscopie infrarouge. Les TAG des huiles contenus dans une émulsion sont visibles sur les spectres FTIR puisque leurs chaînes acyles causent l'apparition d'un pic important dans la région associée à la vibration des groupements méthylènes (CH₂). Dans le cadre d'une étude des interactions PL : protéine, l'existence de ce pic empêche l'étude du comportement des chaînes grasses des PL qui vibrent dans la même région. Ainsi, pour l'étude des interactions PL : OBP en FTIR, nous avons choisi de travailler avec des PL se présentant sous la forme de membranes modèles plutôt que d'étudier les interactions à l'interface d'émulsions.

Cette étude vise à :

- i) Définir l'impact de l'incorporation des OBP sur la structure moléculaire des membranes modèles composées de PL de nature différente et ce, en fonction de la température ;
- ii) Caractériser l'impact de l'incorporation des OBP sur le thermotropisme de PL modèles ;

- iii) Déterminer si la nature des têtes polaires, la longueur et le degré d'insaturation des chaînes acyles des PL influencent la nature des interactions OBP.

1. Étude des interactions PL : OBP par FTIR

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans un journal à comité de lecture et est présenté ci-après. Cet article a été soumis au International Journal of Biological Macromolecules le 20 juin 2018.

1.1. Résumé de l'article en français

Dans cette étude, la FTIR est utilisée pour investiguer les interactions entre les protéines du corps lipidique (OBP) et des phospholipides (PL) modèles. Des PL variant en longueur de chaîne et en tête polaire ont été utilisés ; deux PL zwitterioniques, dimyristoylphosphatidylcholine et dioleoylphosphatidylcholine et deux PL anioniques, dimyristoylphosphatidylglycérol, dipalmitoylphosphatidylglycérol. Les changements de l'état physique des lipides et la dénaturation des protéines ont été examinés en fonction de la température de 20 à 80°C. Les OBP en solution sont composées de structures désordonnées et de feuilletts β démontrant des signes d'agrégation. Les PL anioniques interagissent avec OBP alors que PL zwitterioniques n'interagissent que très peu avec elles. Les PL insaturés promeuvent la structure d'hélice α au sein des OBP. Les interactions entre OBP et PL dépendent de la charge des protéines incitant l'adoption de différentes conformations protéiques. En conclusion, l'étude a montré que l'usage d'OBP et de PL anioniques pourrait mener au développement d'émulsions stables.

2. Interaction of oil bodies proteins with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy
Christine Bourgeois, Ahmed I. Gomaa, Thierry Lefèvre, Maud Cansell and Muriel Subirade

Interaction of oil bodies proteins with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy

Christine Bourgeois^{1,2}, Ahmed I. Gomaa¹, Thierry Lefèvre³, Maud Cansell² and Muriel Subirade¹

¹ Institute of Nutrition and Functional Food (INAF), Department of food sciences, University Laval, Quebec, Quebec, Canada

² Institute of Chemistry and Biology of Membranes and Nano-objects (CBMN), University of Bordeaux, Bordeaux INP, UMR 5248, Pessac, France

³ Department of Chemistry, Regroupement Québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines (PROTEO), Centre de recherche sur les matériaux avancés (CERMA), Centre québécois sur les matériaux fonctionnels (CQMF), Université Laval, Québec, Canada

.

.

¹**Corresponding Author:** 2425 rue de l'Agriculture, Pavillon Paul-Comtois, Université Laval, Québec city, Québec, Canada, G1V 0A6. Tel.: + 1-418-656-2131 x4278; Fax: + 1-418-656-3353. E-mail: muriel.subirade@fsaa.ulaval.ca

Abstract

It is crucial to develop new natural sources of emulsifiers to substitute the synthetic molecules. An ideal emulsifying system exist in plants that is consisting of oil bodies proteins and phospholipids. In this study, Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy was used to investigate the interactions between oil bodies proteins (OBP) and model phospholipid (PL) membranes. The secondary structure and PL thermotropism were investigated. Different PL varying in chain length and polar head were used including two zwitterionic phospholipids, dimyristoylphosphatidylcholine and dioleoylphosphatidylcholine, and two anionic phospholipids, dimyristoylphosphatidylglycerol, dipalmitoylphosphatidylglycerol. The changes in lipid physical state and protein denaturation were investigated as a function of temperature from 20 to 80°C. OBP in solution is composed of unordered structures and β -sheets with signs of aggregation. Anionic PL interacts with OBP whereas zwitterionic PL does not or only slightly interacts with the protein. Unsaturated PL promoted the α -helix structure in OBP. The interactions between OBP and PL depended on the protein charge inducing different protein conformations. Overall, the study showed that OBP and commercial anionic phospholipids have a potential in developing stable emulsifier for food industry.

Keywords:

Oil body proteins; Phospholipids; Emulsifiers; FTIR

Abbreviations:

DCI, deuterium chloride solution, DMPC, dimyristoylphosphatidylcholine, DMPG, dimyristoylphosphatidylglycerol, DOPC, dioleoylphosphatidylcholine, DPPG, dipalmitoylphosphatidylglycerol, D₂O, deuterated oxide, FTIR, Fourier transform-infrared, NaOD, sodium deuterioxide, OB, oil body, OBP, oil bodies proteins, PA, phosphatidic acid, PC, phosphatidylcholine, PE, phosphatidyletholamine, PI, phosphatidylinositol, PL, phospholipids, PUFA, polyunsaturated fatty acid.

Introduction

Many food products, such as margarines, ice creams and dressings are composed of dispersed immiscible phases (aqueous phase or oil phase) that require emulsifiers to be stabilized. However, recent studies demonstrated a strong correlation between the consumption of certain synthetic emulsifiers that are currently used in the food industry and the development of obesity, metabolic diseases, dysbiotic disorders and immune system disorders (Chassaing et al., 2015, Csaki, 2011, Schippa et Conte, 2014, Lerner et Matthias, 2015). Thus, it is urgent to substitute these synthetic emulsifiers by natural ingredients. Among those that are commonly used, lecithin is mainly composed of phospholipids (PL). Lecithin occupies a special place because of their polyunsaturated fatty acids (PUFA) intrinsic contribution and the improved bioavailability of its healthy lipids (Couedelo et al., 2015) while protecting them from oxidation (Cansell et al., 2003, Cui et Decker, 2016). On the other hand, since they confer poor emulsion stabilization, it is of interest to mix them with proteins such as oleosin to increase physicochemical stability by mimicking the natural emulsification system of oil bodies (Wijesundera et al., 2013b).

In this context, it is crucial to develop new natural sources of emulsifiers to either substitute the synthetic molecules or to widen the range of natural molecule available and to study their oil/water interfacial properties.

Many food colloidal systems like milk fat globules, egg yolk or oil bodies are composed of a mix of PL and proteins. An ideal emulsifying system that exists in plants is consisting of oil bodies proteins and phospholipids. The formation and stability of these food polydispersed systems are influenced by the interactions at the emulsifiers interfaces (Maldonado-Valderrama et Patino, 2010, McClements, 2015). Oil bodies (OB) are spherical organelles of 0.5 to 2 μm that store the lipids necessary for the germination of plant seeds (Tzen, 2012, Tzen et al., 1993, Chen et al., 2014). The interface of these biological structures is composed of a PL monolayer in which proteins are inserted providing the protein coverage of the PL head groups (Tzen et Huang, 1992, Frandsen et al., 2001). The oil bodies proteins (OBP) found at the interface are mainly represented by oleosins (75-90% of the total proteins) associated with minor proteins, caleosins and steroleosins (Zhao et al., 2016, Jolivet et al., 2009). In canola, oleosins are small proteins (15 to 23 kDa) with three structural domains. The amphiphilic N-terminal and hydrophilic C-terminal domains are adsorbed at the surface of oil bodies (Jolivet et al., 2009, Maurer et al., 2013) and are joined by a long hydrophobic segment (8 kDa) (Nikiforidis et al.,

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

2013). The hydrophobic segment, the longest hydrophobic sequence found in known proteins, is folded due to proline knots that give to the segment a hairpin configuration (Jolivet et al., 2009, Li et al., 2002). This segment is embedded in the lipid core, reinforcing the OB structure stability giving them ideal emulsifying properties (Nikiforidis et al., 2013). Because the nature of the surfactant used to solubilize oleosins influences its configuration, there is no consensus on their secondary structure. For example, the use of anionic detergents such as sodium dodecyl sulfate tends to increase the α -helix proportion compared to OB membrane (Vindigni et al., 2013, Gohon et al., 2011). Caleosins have a larger molecular weight than oleosin (25 to 28 kDa) and their secondary structure is similar to that of oleosin. Due to their conformation at the interface, caleosins also exhibit good emulsifying properties like oleosin (Furse et al., 2013).

The composition of PL monolayers depend on the vegetal species. In canola seeds, it is mainly composed of phosphatidylcholine (PC), phosphatidyletholamine (PE), phosphatidic acid (PA) and phosphatidylinositol (PI) (Katavic et al., 2006). It has been suggested that negatively charged PL, like PI, preferentially interact with oleosin by promoting their adsorption at oil bodies interface (Chen et Tzen, 2001). Moreover, oleosin and caleosin interactions with PL should provide an interface layer contributing to the physical and oxidative stability of this OB (Roux et al., 2004). However, to our knowledge, the interactions of OBP with PL have not been investigated in detail. Therefore, the purpose of this study is to better characterize the interactions between OBP and PL.

In the present study, we have used Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy to investigate the molecular basis of OBP–lipid interactions. FTIR spectroscopy is an efficient tool to monitor protein secondary structure and protein lipid interactions in biological mimicking systems (Potvin-Fournier et al., 2016, Subirade et al., 1995a) and in food emulsion type system (Lefèvre et Subirade, 2000a, Mohan et al., 2016, Lefèvre et Subirade, 2003). In this study, we have used model membranes to study the conformational changes of OBP and lipids induced by their interactions, information that can lead to a better stabilization of emulsified system. Different PL varying in their chain length and polar head were used, i.e. two zwitterionic phospholipids, dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), and two anionic phospholipids, dimyristoylphosphatidylglycerol (DMPG), dipalmitoylphosphatidylglycerol (DPPG). Moreover, in order to study the impact of the protein charge on the interactions between OBP

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces and PL, experiments were conducted at pH 7.5 and 5.0 that are above and below the isoelectric point of OBP (pI 6.5), respectively (Tzen et al., 1993).

Material and Methods

Materials

The canola meal was kindly provided by Bungee Canada (Oakville, ON, Canada). Sodium hydroxide beads were purchased from VWR (St. Catharines, ON, Canada) and hydrochloric acid was from ThermoFisher (Burlington, ON, Canada). Acetic acid (95% v/v), ethanol (99% v/v) and methanol (99% v/v), deuterated oxide (D₂O), sodium deuterioxide solution 40 wt. % (NaOD), and deuterium chloride solution 35 wt. % (DCl) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Synthetic PL, DMPC, DMPG, DPPG, and DOPC were provided by Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Laemmli buffer solution, β -mercaptoethanol, Dual XtraTTM Western C standard and blue of Coomassie R-250 were purchased from Bio-rad (Canada).

Extraction and characterization of oil bodies proteins

OBP were extracted from canola meal according to a procedure adapted from Wijesundera et al. (Wijesundera et al., 2013a). Canola meal (500 g) was mixed with 4.5 L of distilled water and soaked overnight. The pH of the solution was adjusted to 12.0 with 4 M NaOH solution, stirred for 30 minutes and, then, centrifuged at 10,000 g for 15 minutes. The supernatant was collected and filtered on a cheesecloth. The pH was readjusted to 6.5 with 1 M HCl solution and stirred for 30 minutes. Then, the solution was centrifuged at 5,000 g for 30 minutes. The precipitate was collected, washed with distilled water, and the pH was readjusted to 6.5 before centrifugation (5,000 g, 30 minutes). The precipitate was collected, frozen, lyophilized and stored at room temperature until use.

Protein content

Protein content was determined using official analysis methods as recommended by the *Association of official Analytical Chemists* (AOAC) The extract obtained by isoelectric point precipitation contained 87% of proteins as measured by Dumas method (AOAC 992.23) (Horwitz et Latimer, 2005).

Protein identification

OBP were characterized by gel electrophoresis according to Laemmli (Laemmli, 1970) with modifications. A solution of Laemmli buffer solution and β -mercaptoethanol (ratio 20:1) was added to OBP then heated to 90 °C. Then, the wells of a polyacrylamide gel were injected with the protein samples. A Dual XtraT™ Western C was used as a standard. The gel was run for 75 minutes and stained using a buffer contains Coomassie blue R-250 (1% w/v), acetic acid (10% v/v) and ethanol (40% v/v). Then, the gel was destained overnight at room temperature using a buffer containing methanol (10% v/v) and acetic acid (10% v/v). The gel was scanned using a Chemidoc XRS imager (Biorad, Canada). The electrophoretic pattern of the protein concentrate (Figure 1) clearly showed several bands that were attributed to 17-19 kDa oleosins (major band), 21-22 kDa oleosins, 26 kDa caleosins and 28-29 kDa caleosins according to Zhao et al and Jolivet et al (Zhao et al., 2016, Jolivet et al., 2009).

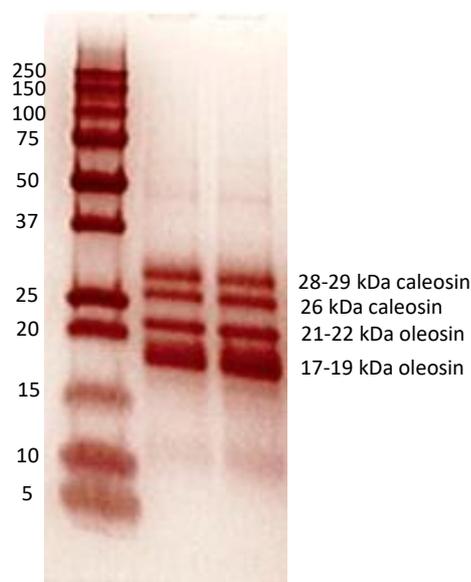


Figure 1 : Electrophoresis gel of oil bodies proteins extracted from canola meal by isoelectric point precipitation

PL membrane (liposome) preparation

PL model membranes were prepared using a freeze-thaw methodology adapted from Lefèvre and al. (Lefèvre et Subirade, 2000a). Each PL, i.e. DMPC, DMPG, DPPG or DOPC, was dissolved into D₂O at a concentration of 14.7% w/v and stirred at 10 °C above its phase transition temperature, for 3 minutes. Then, PL dispersion was cooled on ice (or liquid nitrogen for DOPC) and vortexed for 3 minutes. This cycle was repeated three times. Protein solutions were prepared by dissolving protein concentrate into D₂O (6.25% w/v) and stored for 48 h at 4°C to insure complete deuteration of the proteins. pD was adjusted just before incorporation

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces in PL membrane with NaOD and DCI to 7.5 and 5.0, respectively. These pD values were selected to ensure OBP solubilization and avoid protein precipitation (pI of 6.5 (Tzen et al., 1993)). The protein solution was added to the PL membrane to a final ratio of 2:10 w/w using the same method as previously described for the liposome preparation. All samples were prepared under a nitrogen-supplemented atmosphere to prevent water contamination.

Infrared spectroscopy

IR spectra were acquired using a Nicolet Magna 560 (Thermo Scientific, Madison, WI) equipped with a nitrogen-cooled MCT detector. The experiments were performed in D₂O in order to avoid the overlap with the O-H bending vibration of H₂O. The temperature ramp was controlled using a temperature regulator homemade device (OMEGA). The temperature was increased from 15 to 80 °C with a 2 °C step from 16 to 40 °C and a 5 °C step up to 80 °C. Once the final temperature was reached, a 3 min-stabilization period was applied. A sample volume of about 20 µL was inserted between two CaF₂ windows (Thermo Fisher Scientific, USA) spaced by a 0.025 mm Teflon spacer (International Crystal Lab, USA). Spectra were acquired by accumulating 128 interferograms at a resolution of 4 cm⁻¹ using a Happ-Genzel apodization. Spectra analysis was performed using the Omnic 8.2 software. Secondary structure changes of OBP were characterized using the amide I' region. The PL hydration and conformational changes were observed in the carbonyl stretching region and the symmetric and asymmetric CH stretching regions of the spectra, respectively. Even if all samples were prepared under a nitrogen-supplemented atmosphere to prevent water contamination, the water vapor contribution was subtracted if necessary. A three-point linear baseline correction was applied from 4000 to 800 cm⁻¹ (encompassing the symmetric and asymmetric CH stretching regions) and from 1800 and 1500 cm⁻¹ (encompassing the carbonyl stretching [$\nu(\text{C}=\text{O})$] and amide I' regions). The 3000-2800 cm⁻¹ (CH stretching) and 1800-1500 cm⁻¹ regions were normalized by mathematical operation. Fourier self-deconvolution was performed to the amide I' region (1700-1600 cm⁻¹) with a bandwidth of 22 cm⁻¹ and an enhancement factor of 2.2, and with a bandwidth of 24 cm⁻¹ and an enhancement factor of 2.4 for the carbonyl stretching (1780-1700 cm⁻¹). All experiments were performed in duplicate. Variation in IR measurements was less than 2 %.

Statistical analysis

Unless otherwise mentioned, all experiments were performed in triplicate. Results were expressed as average \pm SD.

Results and discussion

FTIR spectroscopy is known to be an efficient and powerful tool to monitor protein secondary structure, lipid hydrocarbon chain conformation, and protein lipid interactions in biological mimicking systems (Potvin-Fournier et al., 2016, Subirade et al., 1995a) and in food emulsion system (Lefèvre et Subirade, 2000a, Mohan et al., 2016, Lefèvre et Subirade, 2003). In this study we have selected different PL to allow studying the influence of the polar head group nature and that of the acyl part (chain length degree of unsaturation degree). Thus, DMPC and DMPG were selected to emphasize the difference between a zwitterionic PL and an anionic one. DMPG and DPPG pointed out the effect of the length of the PL hydrocarbon chain. DMPC and DOPC were chosen to determine the impact of chain unsaturation.

Oil bodies protein (OBP) in solution

Figure 2 shows the deconvolved amide I' band of OBP in aqueous solution at different temperatures and pD 7.5 (Fig. 2a) and pD 5.0 (Fig. 2b). Amide I region is a major protein band that is sensitive to different secondary structure elements. At pD 7.5 ($> pI$), the IR spectrum of OBP in the aqueous solution at 20°C showed two major peaks at 1633 cm^{-1} and near 1648 cm^{-1} attributed to β -sheet and unordered structures, respectively (Arrondo et al., 1993). There were also less intense components at 1614 and 1683 cm^{-1} associated with intermolecular anti-parallel β -sheets resulting from protein aggregation (Clark et al., 1981). These signs of aggregation are due to the high alkaline pH used during extraction of the proteins (Achouri et al., 2012). Upon heating, intermolecular anti-parallel β -sheet components at 1614 and 1683 cm^{-1} increase to the expense of the native β -sheet component at 1633 cm^{-1} suggesting that proteins unfold and aggregate with heating (Achouri et al., 2012, Li et al., 1992). This phenomenon started at around 55°C and continued until 80°C (data not shown). After cooling, part of OBP regained the regular (non-aggregated) β -sheets (1630 cm^{-1}) with remaining unordered protein segments (1643 cm^{-1}) and the anti-parallel β -sheets showing that the aggregation was irreversible.

At pD 5.0 ($< pI$), OBP in aqueous solution at 20°C adopted a conformation composed principally of β -sheets (band at 1633 cm^{-1}), unordered structures (band at 1641 cm^{-1}) and α helix (band at 1652 cm^{-1}). The existence of α helix configuration indicated that positively charged OBP partially adopted a more structured configuration. Regardless of this difference in initial configuration, OBP showed the same thermal behavior as that observed at pD 7.5 apart from the aggregation phenomenon that seemed to be slightly more intense at pD 5.0 as judged from

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

the intensity of the 1614- and 1683- cm^{-1} components. These results showed that at acidic pD the positive charge of protein modified OBP secondary structure by increasing the α helix content and promoted aggregate formation in solution. As suggested by Tzen et al. (Tzen et al., 2008), OBP medial hydrophobic segment might change its conformational structure within the lipid core of OB to anchor solely or arrange into homo oligomers and to adopt parallel β -sheets, anti-parallel β -sheets, a mixture of those two or α -helix structure.

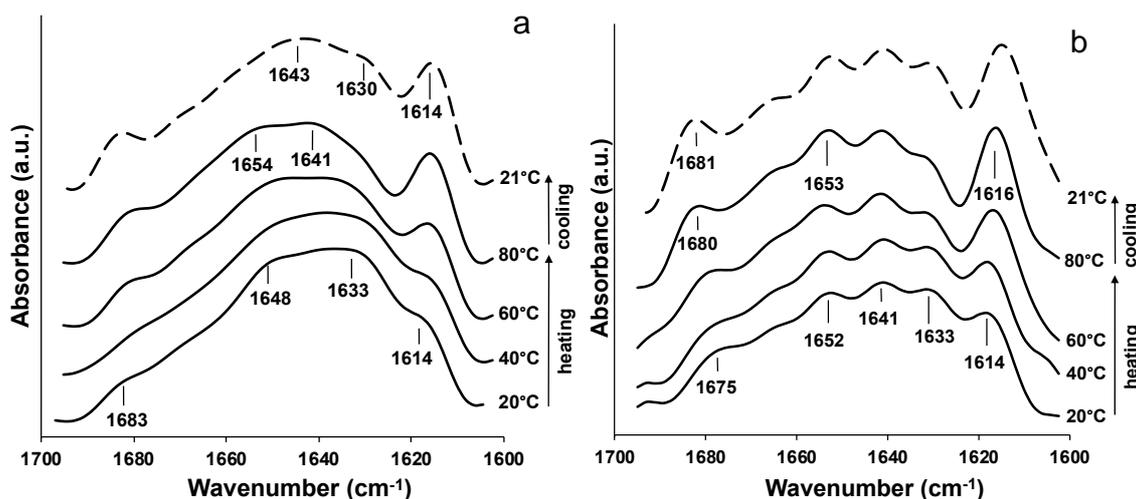


Figure 2 : Deconvolved FTIR absorption spectra in the amide I' region of OBP in D_2O solution (2% w/v) at pD 7.5 (a) and pD 5.0 (b) as a function of temperature during a heating and cooling cycle.

Oil bodies proteins / dimyristoylphosphatidylcholine interactions

PC was used because it is the major zwitterionic PL in vegetal membranes, commonly representing more than half the total PL in vegetal oil bodies (Katavic et al., 2006, Tzen et Huang, 1992). Figure 3 shows the deconvolved amide I' region spectra of OBP in the presence of DMPC at pD 7.5 (Fig. 3a) and 5.0 (Fig. 3b) and different temperatures. At 20°C, in the presence of DMPC membranes at pD 7.5, OBP presented the same components as in solution but with an increased proportion of unordered structures at 1641 cm^{-1} . The anti-parallel β -sheets at 1614 and 1681 cm^{-1} were still detected, suggesting that an aggregation phenomenon occurred at the interface similar to in solution. Upon heating in presence of DMPC membranes, α helix at 1656 cm^{-1} (1654 cm^{-1} in solution) and intermolecular anti-parallel β -sheet structure at 1618 and 1683 cm^{-1} appeared. The thermal aggregation phenomenon started at the same temperature as in the aqueous solution, around 55°C (data not shown). The thermal behavior is basically the same than in aqueous solution, suggesting only slight interactions between the protein and PC vesicles. After cooling in presence of DMPC membranes, the signs of aggregation remained, however, parallel chain β -sheets were more pronounced than in water

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

as shown by the peak at 1635 cm^{-1} which was as intense as that at 1647 cm^{-1} suggesting that the DMPC environment promoted a slightly more structured configuration after thermal denaturation.

At pD 5.0, in the presence of DMPC membranes (Fig 3b), OBP adopted a secondary structure similar to that observed at pD 7.5 with a slight increase of the peak around 1654 cm^{-1} associated with an α helix configuration showing that positively charged proteins partially adopted a more structured configuration. Although, when existed in solution, OBP show less α helix when adsorbed into a PL membrane. Moreover, OBP showed the same thermal behavior as that observed at pD 7.5 apart from the aggregation phenomenon that seemed to be slightly more intense at pD 5.0. The results confirmed that, the presence of DMPC as in water, the positive charge of protein promoted the α helix structure.

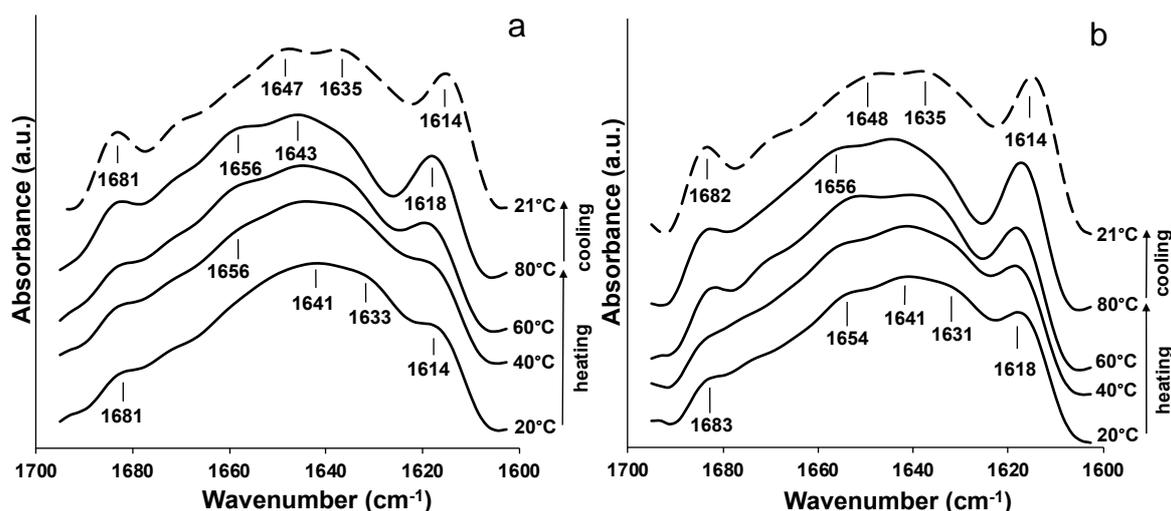


Figure 3 : Deconvoluted FTIR absorption spectra in the amide I' region of OBP in presence of DMPC membranes at a protein-to-lipid ratio of 2:10 w/w, at pD 7.5 (a) and pD 5.0 (b) as a function of temperature during a heating and cooling cycle.

Since the IR spectra in the symmetric and asymmetric CH stretching regions (centered at 2920 and 2850 cm^{-1}) showed similar results, the asymmetric region (around 2920 cm^{-1}) was only presented in Figure 4 (Lefèvre et Subirade, 2000b). The spectra of DMPC in the acyl chain region in the presence or absence of OBP at pD 7.5 (Fig. 4a) and 5.0 (Fig. 4b) showed a significant wavenumber shift at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ attributed to the chain melting phase transition of DMPC in agreement with (Silvius, 1982). For the two pD studied, the phase transition temperature of DMPC was not affected by the presence of OBP. The presence of OBP at pD 7.5, increased the asymmetric methylene stretching number, $\nu_{\text{as}}(\text{CH}_2)$, wavenumber in the

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces liquid-crystalline phase. This shift could be associated with an increase in *gauche* conformers in PL acyl chains associated with a conformational disorder in the lipophilic region of the PL bilayer (Qin et al., 2009). This phenomenon was also observed at pD 5.0 both in the gel and the liquid-crystalline phases, suggesting that interactions with DMPC membranes were slightly enhanced with the acidic form of OBP. Thus, these results showed that the incorporation of the hydrophobic medial segment of the proteins hindered the lipophilic core disturbing the acyl chain order (Lefèvre et Subirade, 2000a). In addition, at acid pD, the presence of OBP seemed to generate a second wavenumber shift at 55°C that might correspond to the protein denaturation, increasing the hindrance in the bilayer. When the membrane systems were cooled to 21 °C, lower wavenumber values were observed for pure DMPC systems compared to that obtained in presence of OBP. This suggested that the protein interactions with the DMPC membranes that took place during the heating period were not totally reversible.

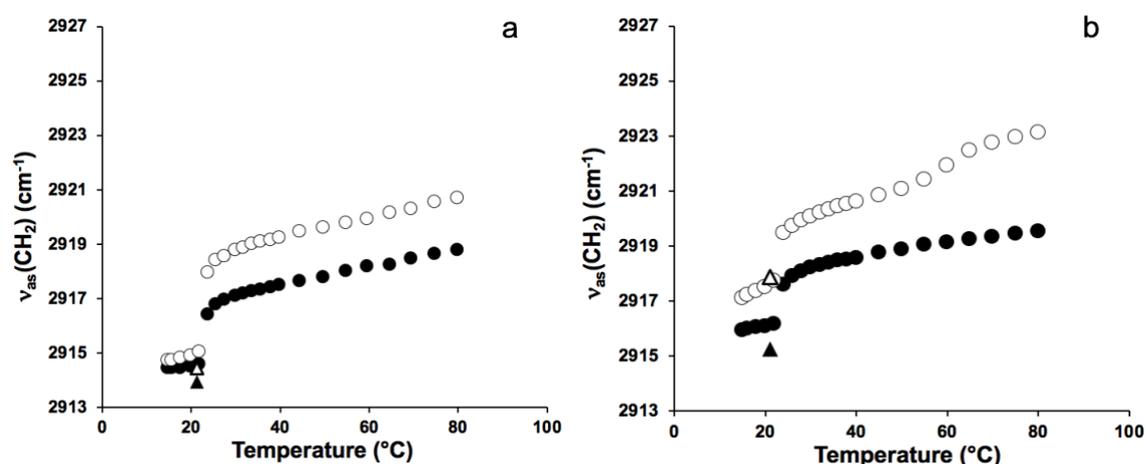


Figure 4 : Temperature dependence of the wave number of the asymmetric methylene stretching $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ vibration bands of DMPC at pD 7.5 (a) and pD 5.0 (b) for pure DMPC membranes (●) and for DMPC in the presence of OBP at a protein-to-lipid ratio of 2:10 w/w, (○). Points obtained at 21°C after the cooling cycle for pure DMPC membranes (▲) and for DMPC in the presence of OBP (△).

Oil bodies proteins / dimyristoylphosphatidylglycerol interactions

In order to assess the effect of the polar head on the interactions between OBP and PL, OBP were placed in presence of DMPG, an anionic PL. Figure 5 shows the deconvolved amide I' region spectra of OBP in presence of DMPG membranes at pD 7.5 (Fig. 5a) and at pD 5.0 (Fig. 5b) for a temperature ramp from 20°C to 80°C followed by cooling down to 21°C. In the presence of DMPG membranes at pD 7.5, OBP at 20°C seemed to adopt a more unordered structure (1643 cm^{-1}) to the detriment of β -sheets (1632 cm^{-1}) (Fig. 5a) as compared with OBP in DMPC where a mix of β -sheet (1633 cm^{-1}) and unordered structure (1641 cm^{-1}) were more prominent as mentioned earlier. In addition, at 20°C, OBP in the presence of DMPG showed

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

signs of a slight aggregation as indicated by the intermolecular antiparallel β -sheets (1616 cm^{-1}). However, when heated, the spectra rise mainly at 1652 cm^{-1} representing an α -helix increase and a minor increase at 1639 cm^{-1} representing unordered structure at the expense of the parallel β -sheet chains (1632 cm^{-1}). In contrast with DMPC, the random structure of OBP in DMPG were underrepresented compared to the helical structure observed, giving OBP a well-ordered conformation. Interestingly, in the presence of an anionic phospholipid (such as DMPG), OBP antiparallel β -sheet chains (1616 cm^{-1}) tended to disappear, DMPG preventing thermal denaturation and thus, protein aggregation. This suggested that these interactions occurred at the interface implying the PL polar head group at proximity of OBP amphiphilic region. When cooled down, OBP readopted similar main structures (unordered and parallel β -sheets) as the non-heated samples indicating the complete reversibility of the structural changes in these conditions. Furthermore, when cooled down, OBP showed less antiparallel β -sheets than before the thermal treatment suggesting that the heating process might help the incorporation of proteins within the anionic model membrane. At pD 5.0, in the presence of DMPG membranes, OBP showed more prominent unordered structures (1643 cm^{-1}) than parallel β -sheets (1633 cm^{-1}). Moreover, helical (1652 cm^{-1}) and unordered (1641 cm^{-1}) components were increased at the expense of β -sheets (1632 cm^{-1}) with temperature. At acid pD, although a helical structure was still prominent, more unordered structures were observed than at pD 7.5. Regarding antiparallel β -sheets (1618 and 1983 cm^{-1}), they seemed stable through the thermal process suggesting that this configuration was not consecutive to thermal denaturation but, more likely, corresponded to an intrinsic secondary structure where OBP units interact with themselves forming hydrophobic interactions between antiparallel β -sheets.

The difference in the impact of pD on the secondary structure of OBP suggest that electric charges may be implicated in the interaction between anionic PL DMPG and OBP. Therefore, proteins interacted with PL differently according to their charge. When proteins are negatively charged (pD 7.5), their basic amino acids can interact with anionic PL through electrostatic interactions since the amphiphilic segments of oleosins (Jolivet et al., 2009) and caleosins (Song et al., 2014) are relatively rich in those amino acids. On the other hand, when proteins are positively charged (pD 5.0) protein-PL and protein-protein interactions took place illustrated by the constant amount of antiparallel β -sheets content in the spectra. The adsorption of OBP into the anionic PL model membrane created strong interactions that prevent denaturation. Therefore, as suggested by Tzen et al. (Tzen et al., 2008), OBP medial

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

hydrophobic segment might change its conformational structure within the lipid core of anionic PL to anchor solely or arrange into homo oligomers and to adopt parallel β -sheets, anti-parallel β -sheets, a mixture of those two or α -helix structure.

Accordingly, the DMPG negative charge seems to induce a great influence on interactions between PL and proteins since the structural and thermal behavioral changes observed through temperature ramp were not exhibited in the presence of zwitterionic DMPC (Fig. 3a and 3b). Similar results have also been observed with β -lactoglobulin and casein where they strongly interacted with anionic PL, inducing a protein-PL complex, promoting protein unfolding whereas they had a weak binding with the zwitterionic or non-ionic PL (Lefèvre et Subirade, 2000a, Lefèvre et Subirade, 2001, Goddard et Ananthapadmanabhan, 1993, Kasinos et al., 2013). Moreover, in order to explain the different configurations at pD 7.5 and 5.0, in addition to the protein charge, the charge of the PL head group seemed to play a role in the interactions between PL membranes and OBP.

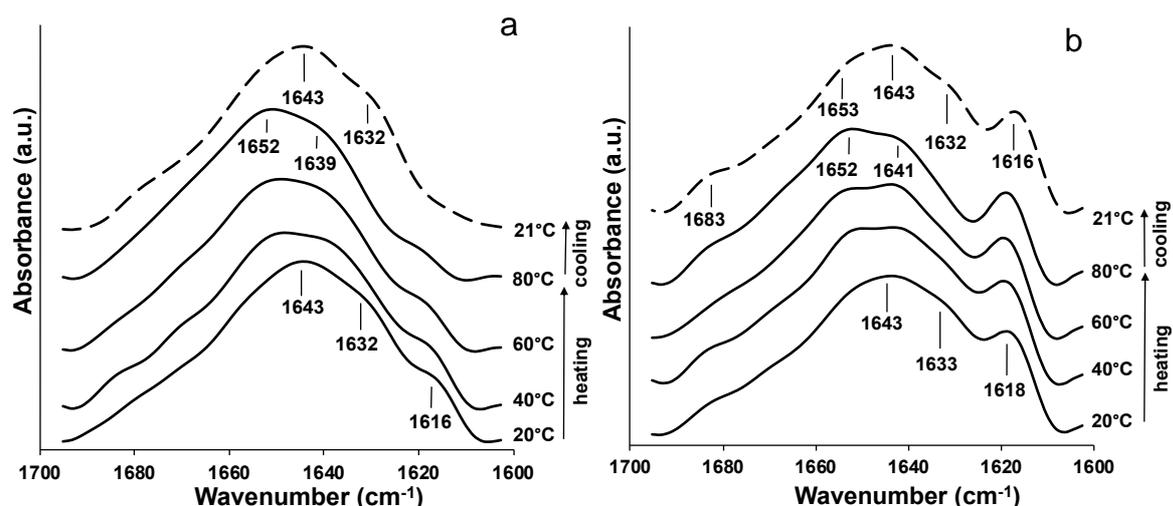


Figure 5 : Deconvoluted FTIR absorption spectra in the amide I' region of OBP in presence of DMPG membranes at a protein-to-lipid ratio of 2:10 w/w, at pD 7.5 (a) and pD 5.0 (b) as a function of temperature during a heating and cooling cycle.

Figure 6 presents IR spectra of the DMPG in the acyl chain region in presence or absence of OBP at pD 7.5 (Fig. 6a) and 5.0 (Fig. 6b). A significant wavenumber peak shift at $24 \pm 2^\circ\text{C}$ was attributed to the main phase transition of DMPG (Riske et al., 1997). As for DMPC, at both pD, the phase transition temperature of DMPG was not affected by the presence of OBP (Ragoonanan et al., 2008). In the liquid-crystalline phase, wavenumbers were not impacted by the presence of OBP. However, at both pD, the wavenumbers associated with the gel phase were significantly higher in presence of the proteins, suggesting that their adsorption in the PL

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

model membrane disturbed the alignment of the PL acyl chain causing disorder in the bilayer (Lewis et McElhaney, 2013).

After cooling down the pure PL, the acyl chains presented wavenumbers that are lower than the wavenumbers during the heating process. This hysteresis effect is known to undergo in PL phase transition (Qin et al., 2009). However, the presence of OBP in the bilayer impacted the PL organization so that the wavenumber associated with the cooled down state were in phase with the wavenumber of the heating curve. This result shows that the presence of OBP impacts the energy level associated with the return to the initial state as if the presence of the proteins created a delay in the readoption of the gel phase.

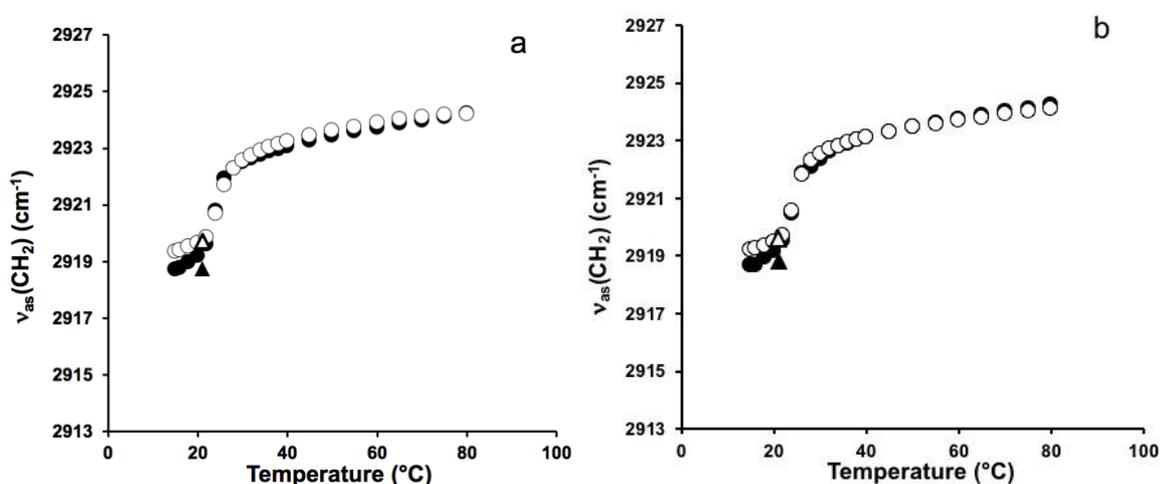


Figure 6 : Temperature dependence of the wave number of the asymmetric methylene stretching $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ vibration bands of DMPG at pD 7.5 (a) and pD 5.0 (b) for pure DMPG membranes (●) and for DMPC in the presence of OBP at a protein-to-lipid ratio of 2:10 w/w, (○). Points obtained at 21 $^{\circ}\text{C}$ after the cooling cycle for pure DMPG membranes (▲) and for DMPC in the presence of OBP (△).

Oil bodies proteins /dipalmitoylphosphatidylglycerol interactions

Figure 7 shows the deconvolved amide I' region spectra of OBP in presence of DPPG membranes at pD 7.5 for a temperature ramp from 20 $^{\circ}\text{C}$ to 80 $^{\circ}\text{C}$ followed by a cooling down to 21 $^{\circ}\text{C}$. Results at 20 $^{\circ}\text{C}$ were similar to those obtained with DMPG with unordered structure (1642 cm^{-1}) being more prominent than parallel β -sheet chains (1633 cm^{-1}) the presence of an α -helix structure (1650 cm^{-1}). Moreover, the absence of anti-parallel β -sheet chains (1615 cm^{-1}) suggested the presence of strong protein-phospholipid interactions protecting the proteins from the thermal aggregation presumably due to their adsorption at the interface. During the heating process, less α -helix structure (1657 cm^{-1}) were presented than with DMPG suggesting that the existence of long saturated fatty acid chain promoted a stable configuration, with

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

stronger interactions. As a result, the IR spectra after the thermal cycle and subsequent cooling were very similar.

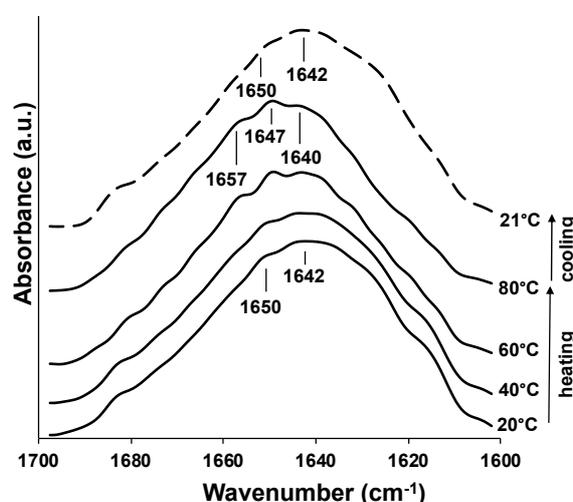


Figure 7 : Deconvoluted FTIR absorption spectra in the amide I region of OBP in presence of DPPG membranes at a protein-to-lipid ratio of 2:10 w/w, at pD 7.5 as a function of temperature during a heating and cooling cycle.

Figure 8 presents the DPPG acyl chain region IR spectra in presence or absence of OBP at pD 7.5. The significant wavenumber peak shift at $41 \pm 2^\circ\text{C}$ was attributed to the main phase transition of DPPG (Jacobson et Papahadjopoulos, 1975). As for DMPG, the phase transitions temperature of DPPG were not affected by the presence of OBP nor were the wavenumbers in the liquid-crystalline phase ($45\text{-}80^\circ\text{C}$). In contrast, the wavenumbers associated with the gel phase were significantly higher in presence of OBP, suggesting strong interactions between the proteins and the PL causing disorders in the bilayer (Lewis et McElhaney, 2013). The similar IR patterns observed also for DMPG as mentioned previously, suggested that the length of the saturated acyl chain influenced the interactions of OBP with PL. However, such impact was not important enough to disturb the PL transition phase temperature as it was remained at 24 and 41°C respectively for DMPG and DPPG nor did it changed the sharpness of the transition that occurred over only 2 to 4°C .

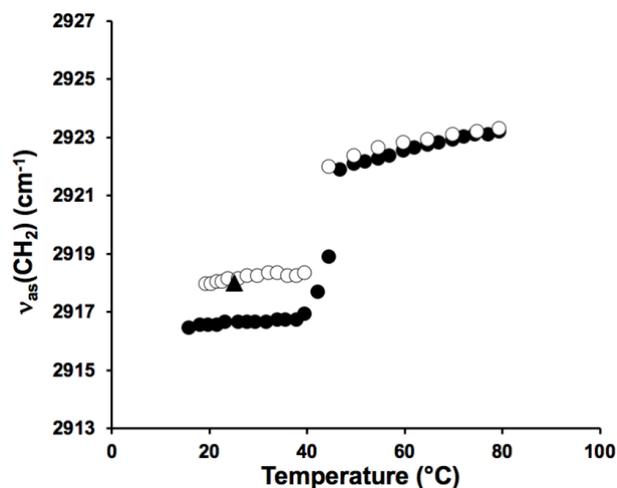


Figure 8 : Temperature dependence of the wave number of the asymmetric methylene stretching $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ vibration bands of DPPG at pD 7.5 for pure DPPG membranes (●) and for DMPC in the presence of OBP at a protein-to-lipid ratio of 2:10 w/w, (○). Points obtained at 21 °C after the cooling cycle for pure DMPC membranes (▲) and for DMPC in the presence of OBP (△).

Oil bodies proteins /dioleoylphosphatidylcholine interactions

In order to assess the influence of the unsaturation degree of the fatty acid chain on OBP/PL interactions, DOPC was used. Moreover, DOPC resembles the natural OB composition which is mainly composed of unsaturated PC (Katavic et al., 2006). Figure 9 shows the deconvolved amide I' region spectra of OBP in presence of DOPC membranes at pD 7.5 (Fig. 9a) and at pD 5.0 (Fig. 9b) for a temperature ramp from 20 °C to 80 °C followed by cooling down to 21 °C. IR spectra of OBP before heating showed a more prominent α helix configuration. Moreover, with increasing temperature, the proportion of α -helix configuration and the random structure became the main structures as indicated by the increasing the peaks at 1654 and 1637 cm^{-1} , respectively. The α -helix structure was kept even after the system was cooled down. The α -helix structure is commonly adopted by transmembrane proteins (White, 2009) creating an optimal three-dimensional structure where the nonpolar face of α -helix creates hydrophobic interactions with nonpolar fragments of PL (Erand et al., 1990). Therefore, the presence of unsaturated fatty acids seemed to promote an OBP configuration resembling that of transmembrane proteins. Nonetheless, the presence of DOPC did not prevent the protein aggregation upon heating as indicated by the appearance of the intermolecular anti-parallel β -sheet structure (1616 cm^{-1}). This suggested that DOPC interactions with OBP were not strong enough to prevent the protein denaturation. The signs of aggregation both started around 55 °C (data not shown). At pD 5.0, in presence of DOPC (Fig. 4d), OBP adopted the same secondary

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

structure and showed the same thermal behavior as that observed at pD 7.5. This suggested that hydrophobic interactions between the hydrophobic domain of the protein and the lipid core were independent of the net charge of the protein.

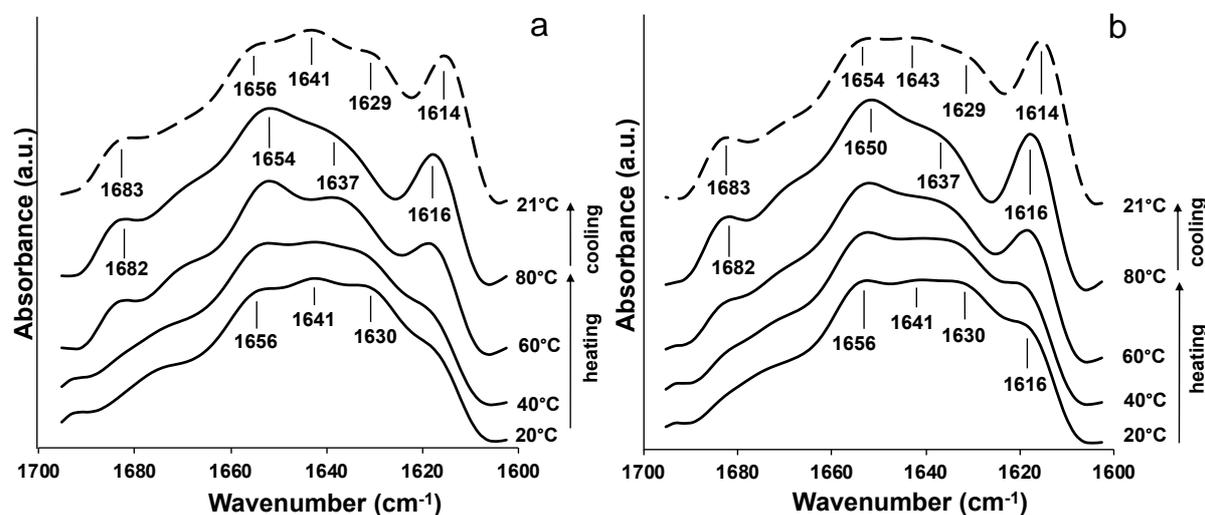
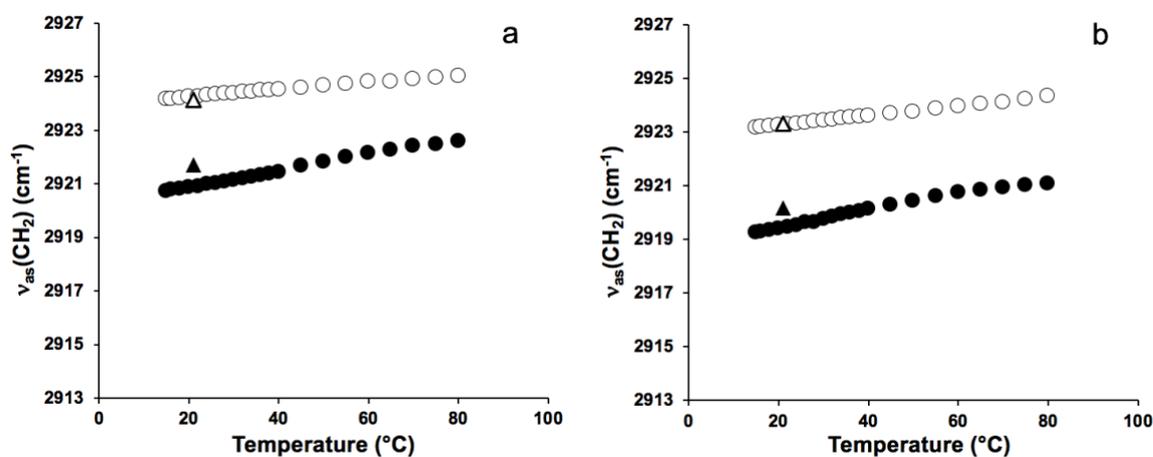


Figure 9 : Deconvoluted FTIR absorption spectra in the amide I' region of OBP in presence of DOPC membranes at a protein-to-lipid ratio of 2:10 w/w, at pD 7.5 as a function of temperature during a heating and cooling cycle.

Figure 10 shows the DOPC acyl chain region IR spectra in presence or absence of OBP at pD 7.5 (Fig. 10a) and 5.0 (Fig. 10b). The DOPC phase transition was not observed in the temperature range studied because it occurs between $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-15.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ragoonanan et al., 2010). Accordingly, only the liquid-crystalline phase was observed. For both pDs, the presence of OBP in the PL bilayer was associated with higher wavenumbers suggesting that the adsorption of OBP increased the disorder in PL acyl chain region. Moreover, as observed with DMPC, the presence of OBP modified the energy level and eliminate the hysteresis observed in pure PL, represented by a wavenumber shift during the cooling down (at $21\text{ }^{\circ}\text{C}$) so that wavenumber is similar to that during the heating period.



CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

Figure 10 : Temperature dependence of the wave number of the asymmetric methylene stretching $\nu_{as}(\text{CH}_2)$ vibration bands of DOPC at pD 7.5 for pure DPPG membranes (●) and for DMPC in the presence of OBP at a protein-to-lipid ratio of 2:10 w/w, (○). Points obtained at 21°C after the cooling cycle for pure DMPC membranes (▲) and for DMPC in the presence of OBP (△).

Conclusion

FTIR spectroscopy allowed the investigation of the molecular interactions between OBP and different model phospholipids. Changes in the PL bilayer configuration in the presence of OBP and changes in OBP secondary structure depended on the nature of PL.

On one side, anionic PL such as DMPG and DPPG interacted strongly enough with OBP to prevent their thermal denaturation when heated in contrast to DMPC and DOPC suggesting electrostatic interactions taking place between the polar head group of PL and the proteins. The absence of disturbance in the bilayer in the liquid-crystalline phase suggests that OBP interact mainly at the interface instead of in the core. These interactions depended on the protein charge inducing different configurations at the interface. On the other side, increasing the hydrophobic interactions between OBP and PL with long saturated fatty acid chain (DPPG vs DMPG) allowed OBP to adopt a more stable configuration. Moreover, unsaturated PL such as DOPC tended to promote α helix conformation in OBP suggesting hydrophobic interactions with the lipid core of the model membrane and a possible transmembrane conformation. These results are supported by the fact that we can observe hindrance in the bilayer at both the gel and the liquid-crystalline phase. Overall, none of these interactions were strong enough to affect PL transition temperature no matter the nature of the PL membrane. Our results show that OBP extracted from canola meal interact with pure PL when incorporated into PL model membrane and give hints of the interactions that could occur in reconstituted OB. In order to use them in food emulsion, the use of commercial phospholipids such as lecithin would be more suitable. Commercial vegetal lecithins are mainly composed of unsaturated PL (90%) and contain up to 35% of anionic PL (van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008, Xie et Dunford, 2017). In regards of our results, a chemical profile with a great amount of anionic PL can favor OBP-PL interactions at oil-in-water emulsions and offer a good physicochemical stabilization of those food matrices. On the whole, this study provided some data indicating that commercial lecithin could efficiently interact with OBP in order to formulate stable emulsions only based on plant emulsifiers.

Acknowledgment

We acknowledge the NSERC for their financial support. We also thank Diane Gagnon for her technical assistance.

References

- [1] B. Chassaing, O. Koren, J.K. Goodrich, A.C. Poole, S. Srinivasan, R.E. Ley, A.T. Gewirtz, Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome, *Nature* 519(7541) (2015) 92-6.
- [2] K.F. Csaki, Synthetic surfactant food additives can cause intestinal barrier dysfunction, *Med Hypotheses* 76(5) (2011) 676-81.
- [3] S. Schippa, M.P. Conte, Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health, *Nutrients* 6(12) (2014) 5786-805.
- [4] A. Lerner, T. Matthias, Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease, *Autoimmun Rev* 14(6) (2015) 479-89.
- [5] L. Couedelo, S. Amara, M. Lecomte, E. Meugnier, J. Monteil, L. Fonseca, G. Pineau, M. Cansell, F. Carriere, M.C. Michalski, C. Vaysse, Impact of various emulsifiers on ALA bioavailability and chylomicron synthesis through changes in gastrointestinal lipolysis, *Food Funct* 6(5) (2015) 1726-35.
- [6] M. Cansell, F. Nacka, N. Combe, Marine Lipid-Based Liposome Increase *in vivo* FA Bioavailability, *Lipids* 38(5) (2003) 551-9.
- [7] L. Cui, E.A. Decker, Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants?, *J Sci Food Agric* DOI 10.1002/jsfa.7320 (2015).
- [8] C. Wijesundera, T. Boiteau, X. Xu, Z. Shen, P. Watkins, A. Logan, Stabilization of fish oil-in-water emulsions with oleosin extracted from canola meal, *J Food Sci* 78(9) (2013) C1340-7.
- [9] J. Maldonado-Valderrama, J.M.R. Patino, Interfacial rheology of protein–surfactant mixtures, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15(4) (2010) 271-282.
- [10] D.J. McClements, *Food Emulsions: principles, practices, and techniques*. 2nd ed, CRC Press (2005) 233 p.
- [11] J.T.C. Tzen, Integral Proteins in Plant Oil Bodies, *ISRN Botany 2012* (2012) 1-16.
- [12] J.T.C. Tzen, Y.-Z. Cao, P. Laurent, C. Ratnayake, A.H.C. Huang, Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species, *Plant Physiol.* 101 (1993) 267-76.
- [13] Y. Chen, L. Zhao, Y. Cao, X. Kong, Y. Hua, Oleosins (24 and 18 kDa) are hydrolyzed not only in extracted soybean oil bodies but also in soybean germination, *J Agric Food Chem* 62(4) (2014) 956-65.
- [14] J.T. Tzen, A.H.C. Huang, Surface Structure and Properties of Plant Seed Oil Bodies, the *journal of Cell Biology* 117(2) (1992) 327-35.
- [15] G.I. Frandsen, J. Mundy, J.T. Tzen, Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin, *Physiologia Plantarum* 112 (2001) 301-7.

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

- [16] L. Zhao, Y. Chen, Y. Chen, X. Kong, Y. Hua, Effects of pH on protein components of extracted oil bodies from diverse plant seeds and endogenous protease-induced oleosin hydrolysis, *Food Chem* 200 (2016) 125-33.
- [17] P. Jolivet, C. Boulard, A. Bellamy, C. Larre, M. Barre, H. Rogniaux, S. d'Andrea, T. Chardot, N. Nesi, Protein composition of oil bodies from mature *Brassica napus* seeds, *Proteomics* 9(12) (2009) 3268-84.
- [18] S. Maurer, G. Waschatko, D. Schach, B.I. Zielbauer, J. Dahl, T. Weidner, M. Bonn, T.A. Vilgis, The role of intact oleosin for stabilization and function of oleosomes, *J Phys Chem B* 117(44) (2013) 13872-83.
- [19] C.V. Nikiforidis, C. Ampatzidis, S. Lalou, E. Scholten, T.D. Karapantsios, V. Kiosseoglou, Purified oleosins at air–water interfaces, *Soft Matter* 9(4) (2013) 1354-1363.
- [20] M. Li, D.J. Murphy, K.H. Lee, R. Wilson, L.J. Smith, D.C. Clark, J.Y. Sung, Purification and structural characterization of the central hydrophobic domain of oleosin, *J Biol Chem* 277(40) (2002) 37888-95.
- [21] J.D. Vindigni, F. Wien, A. Giuliani, Z. Erpapazoglou, R. Tache, F. Jagic, T. Chardot, Y. Gohon, M. Froissard, Fold of an oleosin targeted to cellular oil bodies, *Biochim Biophys Acta* 1828(8) (2013) 1881-8.
- [22] Y. Gohon, J.D. Vindigni, A. Pallier, F. Wien, H. Celia, A. Giuliani, C. Tribet, T. Chardot, P. Briozzo, High water solubility and fold in amphipols of proteins with large hydrophobic regions: oleosins and caleosin from seed lipid bodies, *Biochim Biophys Acta* 1808(3) (2011) 706-16.
- [23] S. Furse, S. Liddell, C.A. Ortori, H. Williams, D.C. Neylon, D.J. Scott, D.A. Barrett, D.A. Gray, The lipidome and proteome of oil bodies from *Helianthus annuus* (common sunflower), *J Chem Biol* 6 (2013) 63-76.
- [24] V. Katavic, G.K. Agrawal, M. Hajduch, S.L. Harris, J.J. Thelen, Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two *Brassica napus* cultivars, *Proteomics* 6(16) (2006) 4586-98.
- [25] J.C.F. Chen, J.T.C. Tzen, An *in vitro* System to Examine the Effective Phospholipids and Structural Domain for Protein Targeting to Seed Oil Bodies, *Plant Cell Physiol* 42(11) (2001) 1245-52.
- [26] E. Roux, S. Baumberger, M.A.V. Axelox, T. Chardot, Oleosins of *Arabidopsis thaliana*: Expression in *Escherichia coli*, Purification, and Functional Properties, *J Agri Food Chem* 52 (2004) 5245-59.
- [27] K. Potvin-Fournier, T. Lefevre, A. Picard-Lafond, C. Marcotte, C. Dufresne, L. Cantin, C. Salesse, M. Auger, Discriminating Lipid- from Protein-Calcium Binding To Understand the Interaction between Recoverin and Phosphatidylglycerol Model Membranes, *Biochemistry* 55(24) (2016) 3481-91.
- [28] M. Subirade, C. Salesse, D. Marion, M. Pézolet, Interaction of a Nonspecific Wheat Lipid Transfer Protein with Phospholipid Monolayers Imaged by Fluorescence Microscopy and Studied by Infrared Spectroscopy, *Biophysical Journal* 69 (1995) 974-988.
- [29] T. Lefèvre, M. Subirade, Interaction of b-lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy, *Int. J. Biol Macromol.* 28 (2000) 59-67.

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

- [30] A. Mohan, D.J. McClements, C.C. Udenigwe, Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight, *Food Chem* 213 (2016) 143-8.
- [31] T. Lefèvre, M. Subirade, Formation of intermolecular β -sheet structures: a phenomenon relevant to protein film structure at oil–water interfaces of emulsions, *Journal of Colloid and Interface Science* 263(1) (2003) 59-67.
- [32] C. Wijesundera, T. Boiteau, X. Xinqing, S. Zhiping, P. Watkins, A. Logan, Stabilization of fish oil-in-water emulsions with oleosin extracted from canola meal, *Journal of Food Science* 78(9) (2013) C1340-C1347.
- [33] W. Horwitz, G.W. Latimer, *Official Methods of Analysis of AOAC International* 18th edition, Gaithersburg, Md. : AOAC International 2005.
- [34] U.K. Laemmli, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature* 227(5259) (1970) 680-5.
- [35] J.L.R. Arrondo, A. Muga, J. Castresana, F.M. Goni, Quantitative studies of the Structure of Proteins in solution by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy, *Prog Biophys. Molec Biol* 59 (1993) 23-56.
- [36] A.H. Clark, D.H.P. Saunderson, A. Suggett, Infrared and Laser-Raman Spectroscopic Studies of thermally-induced Globular Protein Gel, *Int. J. Peptide Protein Res* 17 (1981) 353-64.
- [37] A. Achouri, V. Nail, J.I. Boye, Sesame protein isolate: Fractionation, secondary structure and functional properties, *Food Research International* 46(1) (2012) 360-369.
- [38] M. Li, L.J. Smith, D.C. Clark, R. Wilson, D.J. Murphy, Secondary Structures of a New Class of Lipid Body Proteins from Oilseeds, *the journal of Cell Biology* 267(12) (1992) 8245-53.
- [39] J.T.C. Tzen, N.J. Roberts, R.W. Scott, Recent Biotechnological Applications Using Oleosins, *The Open Biotechnology Journal* 2(1) (2008) 13-21.
- [40] T. Lefèvre, M. Subirade, Interaction of β -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy, *International Journal of Biological Macromolecules* 28(1) (2000) 59-67.
- [41] D.J.R. Silvius, *Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1982.
- [42] S.-S. Qin, Z.-W. Yu, Y.-X. Yu, Structural Characterization on the Gel to Liquid-Crystal Phase Transition of Fully Hydrated DSPC and DSPE Bilayers, *J. Phys. Chem B* 113 (2009) 8114-23.
- [43] W. Song, Y. Qin, Y. Zhu, G. Yin, N. Wu, Y. Li, Y. Hu, Delineation of plant caleosin residues critical for functional divergence, positive selection and coevolution, *BMC Evolutionary Biology* 14(125) (2014) 1-14.
- [44] T. Lefèvre, M. Subirade, Conformational rearrangement of β -lactoglobulin upon interaction with an anionic membrane, *Biochim Biophys Acta* 1549 (2001) 37-50.
- [45] E. Goddard, K. Ananthapadmanabhan, *Interactions of surfactants with polymers and proteins*, CRC Press, London, 1993.

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

- [46] M. Kasinos, P. Sabatino, B. Vanloo, K. Gevaert, J.C. Martins, P. Van der Meeren, Effect of phospholipid molecular structure on its interaction with whey proteins in aqueous solution, *Food Hydrocolloids* 32(2) (2013) 312-321.
- [47] K.A. Riske, M.J. Politi, W.F. Reed, M.T. Lamy-Freund, Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPG dispersions, *Chemistry and Physics of Lipids* 89 (1997) 31-44.
- [48] V. Ragoonanan, J. Malsam, D.R. Bond, A. Aksan, Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*, *Biochim Biophys Acta* 1778(10) (2008) 2283-90.
- [49] R.N. Lewis, R.N. McElhaney, Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochim Biophys Acta* 1828(10) (2013) 2347-58.
- [50] K. Jacobson, D. Papahadjopoulos, Phase Transitions and Phase Separations in Phospholipid Membranes Induced by Changes in Temperature, pH, and Concentration of Bivalent Cations, *Biochemistry* 14(1) (1975) 152-61.
- [51] S.H. White, Biophysical dissection of membrane proteins, *Nature* 459(7245) (2009) 344-6.
- [52] R.M. Epand, J.P. Segrest, G.M. Anantharamaiah, Thermodynamics of the Binding of Human Apolipoprotein A-I to Dimyristoylphosphatidylglycerol, *The Journal of Biological Chemistry* 265(34) (1990) 20829-32.
- [53] V. Ragoonanan, T. Wiedmann, A. Aksan, Characterization of the Effect of NaCl and Trehalose on the Thermotropic Hysteresis of DOPC Lipids during Freeze/Thaw, *J. Phys. Chem B* 114 (2010) 16752-8.
- [54] W. van Nieuwenhuyzen, M.C. Tomás, Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies, *European Journal of Lipid Science and Technology* 110(5) (2008) 472-486.
- [55] M. Xie, N.T. Dunford, Lipid composition and emulsifying properties of canola lecithin from enzymatic degumming, *Food Chem* 218 (2017) 159-164.

3. Principaux résultats et développement

3.1. Caractérisation du concentrât protéique

La composition du tourteau de colza utilisé pour ce projet de doctorat est présentée au Tableau 14. Cette composition est similaire à celles décrites dans la littérature (Tableau 6).

L'extraction du concentrât protéique à partir du tourteau de colza est réalisé avec un taux d'extraction de 2 à 2,5%. La caractérisation de concentrât par la méthode de Dumas (AOAC 992.23) montre que l'extrait protéique obtenu par précipitation à l'aide du point d'isoélectrique contient 87,4 % de protéines en accord avec d'autres études (Horwitz et Latimer, 2005) (Tableau 14). Cette même méthode a démontré que le tourteau d'origine contenait 36,4% de protéines. En tenant compte de ces résultats et du taux d'extraction, on calcule que les protéines contenues dans le concentrât représentent 4,8 à 6% des protéines du tourteau, ce qui est cohérent avec les proportions d'OBP généralement publiées dans la littérature indiquant que les OBP représentent 2 à 8% des protéines totales (Huang, 1992, Wanasundara, 2011). De plus, le profil électrophorétique du concentrât protéique (Figure 1 de l'article) a clairement montré plusieurs bandes qui ont été attribuées à l'oléosine de 17-19 kDa, à l'oléosine de 21-22 kDa, à la caléosine de 26 kDa et à la caléosine de 28-29 kDa (Zhao et al., 2016, Jolivet et al., 2009). La densité de la bande de l'oléosine 17-19 kDa est nettement la plus intense démontrant qu'il s'agit de la protéine majoritaire du concentrât. Ce concentrât contient également 1,2 % de lipides. Bien qu'ils puissent éventuellement contribuer aux résultats, nous considérerons dans la suite de l'étude cette quantité comme négligeable par rapport aux lipides ajoutés dans les formulations. Les cendres représentent les composés inorganiques comme les sels présents dans le concentrât. Ces cendres peuvent provenir du tourteau ou de l'extraction par point isoélectrique (§ II-3.1). À cette concentration (1,9%), elles peuvent promouvoir la solubilité des protéines (§ I-2.1.5). Finalement, le dosage des phénols a démontré des concentrations cohérentes avec celles reportées dans la littérature qui se situent entre 14,8 et 21,0 mg GAE/g pour le tourteau de colza (Teh et al., 2014, Aleksander et al., 2008). La présence de glucides (sous forme de fibres) et de polyphénols peut contribuer à la stabilité physicochimique des émulsions et sera discutée dans le chapitre suivant (§IV-2 et IV-3). Un stock de concentrât d'OBP a été constitué à partir du même lot de tourteau. Le même stock a été utilisé pour toutes les expériences présentées dans ce travail de thèse.

Tableau 14 : Composition du tourteau de colza et de l'extrait protéiques

	<i>Protéines</i>	<i>Humidité</i>	<i>Lipides</i>	<i>Cendres</i>	<i>Glucides*</i>	<i>Polyphénols</i>
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(mg GAE/g)
<i>Tourteau de colza</i>	36,4 ± 0,2	10,2 ± 0,4	2,0 ± 0,2	7,5 ± 0,1	43,9 ± 0,9	20,5 ± 0,5
<i>Extrait protéique</i>	87,4 ± 0,3	2,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,9 ± 0,1	9,8 ± 0,6	17,7 ± 0,2

*Déterminé par pourcentage différentiel à partir de 100%
GAE : Équivalent d'acide gallique

Les valeurs pour l'humidité et les cendres sont une moyenne de 2 mesures indépendantes, celles pour le taux de protéines, de lipides et de polyphénols une moyenne de 3 mesures indépendantes.

3.2. Étude spectroscopique infrarouge

L'insertion de protéines au sein d'une couche de PL est décrite pour plusieurs systèmes naturels de transport des lipides comme les lipoprotéines du jaune d'œuf (Jolivet et al., 2006a, Martinet et al., 2003) et les globules gras du lait (Cavaletto et al., 2008, Singh et Gallier, 2017). La majorité de ces protéines membranaires présente un motif commun, l'hélice α (White, 2009). La face apolaire étendue de cette structure est optimale pour la création d'interactions apolaires avec des fragments lipidiques apolaires alors que la face polaire peut interagir avec la tête polaire des PL comme le présente la Figure 18 (Erand et al., 1990). L'étude de protéines hautement hélicoïdales, comme les apolipoprotéines, montre qu'elles ont normalement une solubilité limitée dans des solvants comme l'eau (Jolivet et al., 2006a, Benjawl et al., 2007), un peu comme les OBP (Gohon et al., 2011). De plus, la corrélation inverse entre leur stabilité en solution aqueuse et leur capacité à se lier aux lipides provient du caractère apolaire des hélices qui s'agrègent lorsqu'elles ne se retrouvent pas dans un environnement lipidique (Benjawl et al., 2007). En outre, certaines protéines hydrosolubles peuvent adopter ce comportement. L' α -lactalbumine, par exemple, voit son contenu en hélices α passer de 30% à 50% lorsqu'elle s'adsorbe dans une membrane de PL (van Dael et van Cauwelaert, 1988). Plusieurs protéines adoptent un comportement similaire lors de leur adsorption au sein des membranes notamment la β -lactoglobuline (Lefèvre et Subirade, 2001), les protéines de transfert de lipide du blé (Subirade et al., 1995b), des protéines de transport des AG (Galassi et al., 2018). van Dael et van Cauwelaert (1988) ont d'ailleurs démontré que l' α -lactalbumine adopte davantage d'hélices α et qu'elle crée des liaisons hydrophobes avec les AG des PL

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces lorsqu'un de ses segments s'insère à l'intérieur de la monocouche de PL (Figure 17). Ces deux phénomènes ne sont pas observés lorsque la protéine s'associe aux têtes polaires de PL et reste en position extérieure du domaine lipidique.

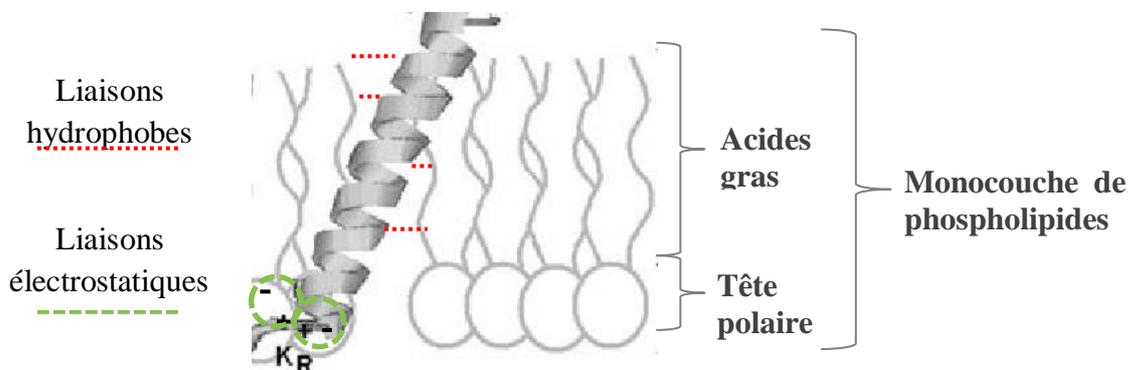


Figure 17 : Représentation d'un segment protéique en hélices α inséré au sein d'une monocouche de phospholipides. Adapté de Foot et al. (2007)

Outre les modifications conformationnelles des protéines lors de leur adsorption aux interfaces, l'insertion d'un segment protéique au sein d'une bicouche peut aussi créer des perturbations dans l'organisation des chaînes d'AG des PL. En effet, la pénétration de la bicouche par la protéine provoque une contrainte mécanique qui s'applique sur les PL adjacents à la protéine, développant éventuellement des interactions hydrophobes avec les AG des PL de la membrane (Figure 18a). La présence de plusieurs protéines au sein de la membrane peut également engendrer des interactions protéine-protéine qui peuvent encore condenser davantage les chaînes d'AG des PL (Figure 18b). Si les interactions hydrophobes entre les PL et les protéines sont suffisamment importantes, elles peuvent diminuer la coopérativité de la transition de phase des PL et ainsi augmenter la température de transition des chaînes d'AG.

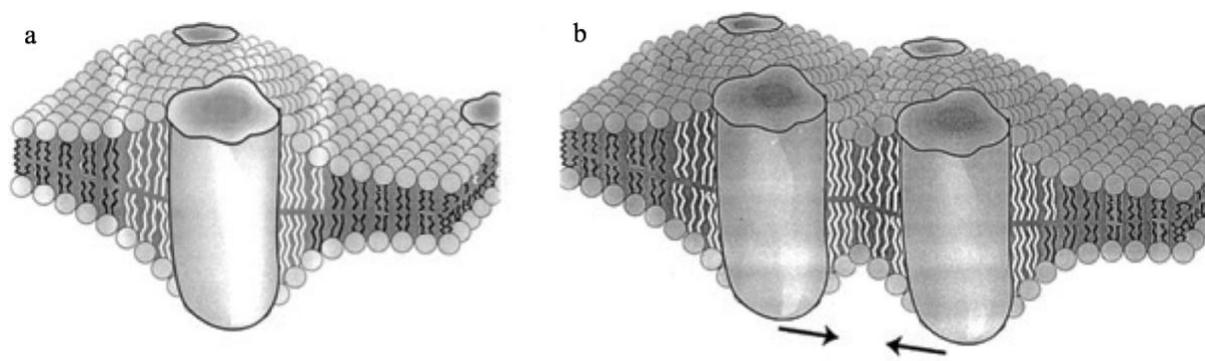


Figure 18 : Représentation schématique des conformations adoptées par des phospholipides transmembranaires en présence de protéines transmembranaires pour une protéine seule (a), représentation schématique de la condensation capillaire du domaine lipidique entre deux de protéines transmembranaires (b). Les chaînes d'acides gras des PL représentées en blanc sont celles perturbées par l'ancrage des protéines (Mouritsen et Bagatolli, 2015)

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

Dans ce travail de thèse, la spectroscopie FTIR a été utilisée pour l'étude des interactions moléculaires entre les OBP et différents PL modèles. Les changements de la conformation des AG de la membrane phospholipidique en présence d'OBP et les changements de structure secondaire des OBP sont dépendants de la nature de PL et de la charge des protéines. Les principaux résultats de cette étude sont résumés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Synthèse des interactions PL : OBP d'après les résultats obtenus en FTIR

	<i>Eau</i>	<i>DMPC</i>	<i>DMPG</i>	<i>DPPG</i>	<i>DOPC</i>
<i>Prévient la dénaturation</i>	-	-	+	+	-
<i>Présence d'hélices α à 20°C</i>	-	-	-	-	+
<i>Présence d'hélices α à 80°</i>	+	+	+	-	++
<i>Perturbation de la transition de phase</i>	-	-	-	-	n/d
<i>Interactions en phase gel</i>	n/a	+	+	+	+
<i>Interactions en phase cristal-liquide</i>	n/a	+	-	-	n/a

Dénaturation estimée par l'absence d'accroissement des feuilletts β antiparallèles

n/a : non applicable

n/d : non déterminé

Les PL anioniques, comme DMPG et DPPG, interagissent avec les OBP empêchant leur dénaturation thermique estimée par l'absence d'accroissement des feuilletts β antiparallèles. Ces résultats n'ont pas été observés en présence de PL zwitterioniques, comme DMPC et DOPC. Ceci suggère la mise en place d'interactions électrostatiques attractives entre la tête polaire des PL anioniques et les protéines. De plus, l'absence de perturbations dans la bicouche de PL anioniques en phase cristal-liquide, contrairement à ce qui est observé avec la DMPC, suggère que les OBP ne s'ancrent pas profondément au sein de cette bicouche. Cette observation appuie l'hypothèse de la présence d'interactions se situant principalement à l'interface, au niveau de la tête polaire chargée des PL.

Les OBP adoptent une conformation comportant une proportion plus importante d'hélices α lorsqu'elles sont incorporées au sein d'une bicouche de PL insaturés à température ambiante. Ce résultat suggère que l'insertion d'OBP au sein de PL insaturés a favorisé l'adoption d'une conformation tridimensionnelle similaire à celle des protéines transmembranaires. Ces résultats sont soutenus par le fait que nous observons des perturbations dans la bicouche en phase cristal-liquide. Cependant, contrairement aux PL saturés dont la température de

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces transition se situe dans la plage de température étudiée, la température de transition du DOPC se situe vers -17°C , il nous a donc été impossible d'investiguer si les interactions DOPC-OBP perturbent la transition de phase de ce PL. Ce type d'information aurait pu confirmer la présence de liaisons hydrophobes au cœur lipidique. Cependant, la présence de DOPC n'a pas empêché la dénaturation des OBP lors du chauffage, suggérant que les interactions DOPC qui favorisent la formation d'hélices α ne sont pas assez fortes pour préserver la conformation initiale des protéines.

La longueur de la chaîne acyle influence la conformation des protéines. En effet, en augmentant la longueur de la chaîne d'AGS (DPPG vs DMPG), les OBP conservent davantage une structure similaire à 20 et à 80°C . Le maintien d'une structure similaire signifie que la protéine subit moins de changement de la température et par conséquent, témoigne d'interactions plus fortes entre les AG des PL et les OBP. Ainsi, la longueur de la chaîne d'AGS au cœur des membranes a permis aux OBP d'adopter une conformation plus stable.

Il est également important de souligner que les OBP ont adopté des conformations différentes à l'interface selon le pH de la phase aqueuse. Le pH de la solution engendre un changement d'état d'ionisation et donc de charges exposées par les protéines pouvant influencer les interactions entre les PL et les protéines (§ I-2.1.5). Il est à noter que, pour toutes les conditions, les OBP chargées positivement (pH 5,5) présentent légèrement plus d'hélices α et de feuillettes β antiparallèles. Ceci peut se traduire par l'adoption de conformations différentes, simultanées ou non, au sein de la couche phospholipidique (§ I-3.2). Ainsi, la conformation que les OBP adoptent aux interfaces peut non seulement être influencée par la nature des PL, mais également par leur état d'ionisation. Finalement, de façon générale, aucune de ces interactions n'était suffisamment forte pour perturber la température de transition PL et ce, quelle que soit la nature des PL.

4. Conclusion

Ces résultats montrent que les OBP extraites du tourteau de colza sont capables d'interagir avec des PL purs organisés en phase lamellaire. De cette étude, il se dégage que :

- la conformation des OBP dépend du pH de la phase aqueuse ;
- les interactions entre les PL anioniques et les OBP sont suffisamment fortes pour prévenir la dénaturation des OBP ;

CHAPITRE III : Caractérisation des interactions PL : OBP aux interfaces

- une chaîne acyle à 16 atomes de carbone (DPPG) promeut une conformation protéique plus stable qu'une chaîne acyle à 14 atomes de carbone (DMPG) ;
- la présence d'insaturation (DOPC) favorise davantage l'adoption d'hélices α .

Les OB sont normalement composés d'un mélange de PL zwitterioniques (PC, PE) et de PL anioniques (PI, PA) dont la majorité sont insaturés (Tableau 7).

Cette étude spectroscopique a fourni quelques données indiquant les conditions qui privilégiaient les interactions PL : OBP. Il est possible que la grande stabilité physicochimique des OB (§ I-3.3.1) réside dans la variété d'interactions PL : protéines entre les chaînes acyles des PL insaturés et les têtes polaires des PL anioniques. Ainsi, pour les études physicochimiques ultérieures, nous avons sélectionné une lécithine de colza qui contenait une grande proportion de PL anioniques, sachant que l'origine végétale nous assurait la présence d'AG insaturés (90 %) (§ I-1.2) (van Nieuwenhuyzen et Tomás, 2008). Nous avons fait l'hypothèse que les interactions intermoléculaires observées pourraient également avoir lieu au sein d'OB reconstitués et aider à la stabilisation d'émulsions alimentaires.

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

Plusieurs matrices alimentaires comme les vinaigrettes, les boissons végétales, la crème fouettée, etc. sont composées de phases dispersées (phase aqueuse et phase huileuse) qui exigent l'usage d'émulsifiants pour assurer leur stabilité. L'un des objectifs de cette thèse est de formuler des émulsions à base de tensioactifs végétaux pouvant entrer dans la composition d'aliments courants. Pour cela, nous avons choisi d'étudier la faisabilité de formuler des émulsions H/E à base de tensioactifs issus du colza, i.e. PL et OBP. Les OBP sont extraites comme décrits précédemment (§ III-3.1). Les PL correspondent à une lécithine de colza dont les critères de choix sont issus de l'étude des interactions PL : OBP (§ III-3.2). Cette étude passe par la détermination du ou des rapport(s) PL : OBP les plus pertinents pour l'obtention d'émulsions cinétiquement stables d'un point de vue physique (sur une durée de 28 jours). Parallèlement, il est connu que la mise en émulsion d'une huile (en l'occurrence, l'huile de colza riche en AG insaturés) peut modifier sa cinétique d'oxydation. L'altération oxydative de l'huile de colza émulsionnée est donc aussi caractérisée.

1. Caractérisation et choix de la lécithine de colza

Les études FTIR ont mis en évidence l'existence d'interactions préférentielles entre les OBP et les PL anioniques et les OBP et les PL insaturés. L'hypothèse que nous avons émise est que ces interactions permettraient une meilleure stabilité physique des émulsions. Nous avons donc recherché des lécithines de colza, déshuilées, répondant aux critères de taux de PL anioniques. Les lécithines étant issues de colza, la richesse en AG insaturés était assurée de fait. Deux lécithines ont retenu notre attention : l'une proposée par la société Caldic, l'autre par Lasenor. La composition en PL des deux lécithines déterminée par RMN indique que le PL majoritaire est la PC dans des proportions similaires (39,7% et 39,0%, pour la lécithine Caldic et Lasenor, respectivement) (Figure 19). La différence entre les deux lécithines se fait sur les proportions de PI et de PE. La lécithine de Caldic est plus riche en PE (25,9 % vs 18,3%) de sorte que la proportion totale de PL zwitterioniques est de 65,6% vs 57,3% pour la lécithine de Lasenor. Cette dernière est plus riche en PI (26,5% vs 17,8 %), elle présente ainsi la proportion totale de PL anioniques la plus élevée (32,0 % vs 39,9 %). Il est intéressant de noter que, par rapport

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

aux compositions de la lécithine de colza reportée dans la littérature (Tableau 2), la lécithine de Lasenor est très riche en PL anioniques. Par rapport à la composition en PL des OB de colza, la composition de la lécithine de Lasenor est proche de celle reportée par Deleu et al. (2010) mais est moins riche en PC celle reportée par Tzen et al. (1993) (60 % de PC).

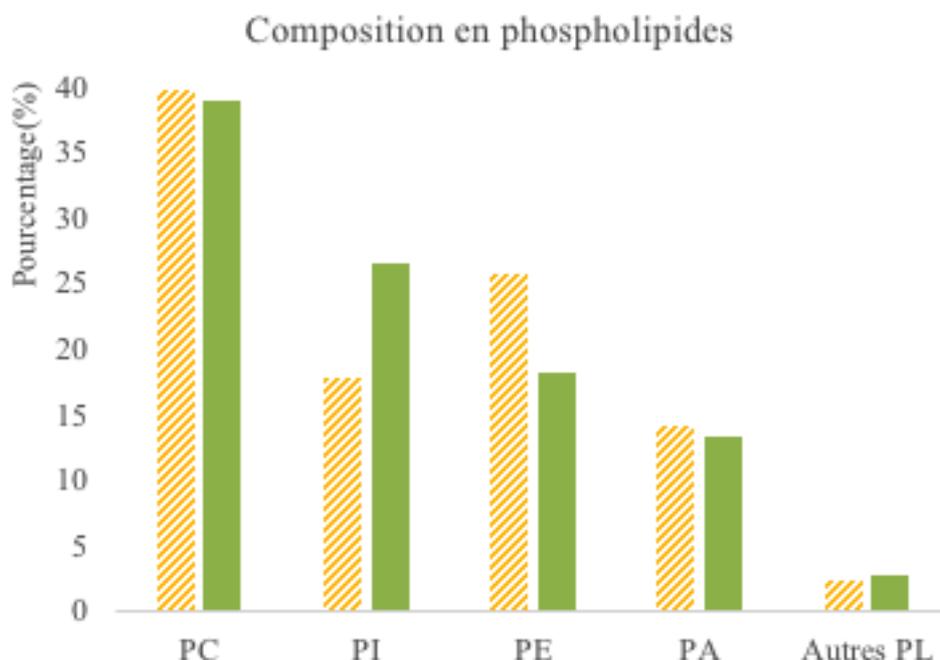


Figure 19 : Composition en phospholipides des lécithines Caldic (▨) et Lasenor (■)

PA : Acide phosphatidique, PC : Phosphatidylcholine, PE : Phosphatidyléthanolamine, PI : Phosphatidylinositol, PL : phospholipide

La composition en AG totaux des deux lécithines, déterminée par CPG, est présentée dans la Figure 20 pour les grandes familles d'AG et en Annexe I pour le détail des différents AG. Les compositions en AG des deux lécithines sont très similaires, même si le rapport n-6/n-3 est légèrement supérieur pour la lécithine Lasenor (5,9 vs 4,3, Figure 20). Les compositions des deux lécithines sont du même ordre que celles reportées dans la littérature (Tableau 2), ce qui suggère que ces espèces lipidiques sont peu impactées par l'origine du colza analysé (cultivar, conditions de culture (sol, climat ...)).

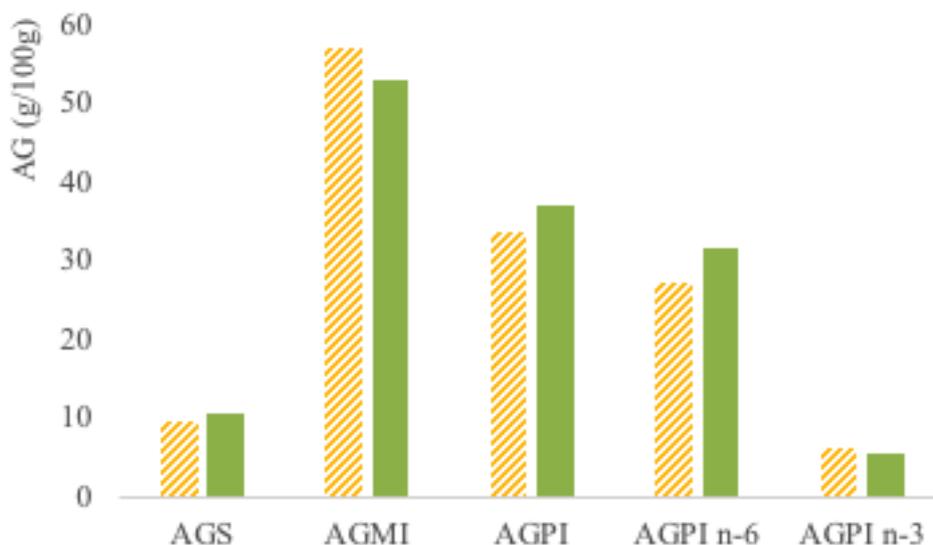


Figure 20 : Composition des familles d'acides gras des lécithines Caldic (▨) et Lasenor (■)

AGS : Acide gras saturé, AGMI : Acide gras monoinsaturé, AGPI : Acide gras polyinsaturé
AGS : Acide gras saturé

En conclusion, sur la base des résultats obtenus en FTIR et des analyses réalisées sur les deux lécithines, et selon l'hypothèse que les interactions PL : OBP pourraient conduire à une interface colloïdale aboutissant à des émulsions plus stables, notre choix s'est orienté vers la lécithine de colza de la société Lasenor pour la formulation des émulsions.

2. Formulation des émulsions et stabilité physique

2.1. Étude de faisabilité pour la préparation d'émulsions H/E

Afin de réduire l'impact de la taille des gouttelettes sur les études de stabilité physique et chimique ainsi que sur les études nutritionnelles, un des objectifs concernant la réalisation des émulsions était l'obtention d'émulsions présentant des tailles de gouttelettes similaires, indépendamment du rapport PL : OBP utilisé dans les formulations. Nous nous sommes fixés comme diamètre cible 10 μm . Cette taille est nettement plus importante que celle des OB natifs (0,5 à 2 μm) (Chen et al., 2004). Néanmoins, elle a été accessible pour toutes les formulations avec le même procédé d'émulsification. En effet, nous avons également réalisé des émulsions ciblant la taille des OB natifs (diamètre 1 μm), mais plusieurs formulations ont rapidement présenté un relargage d'huile.

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

La préparation des émulsions passe par une phase d'émulsions concentrées qui sont ensuite diluées pour obtenir des émulsions à 20% d'huile. Pour déterminer la taille unitaire des gouttelettes, les émulsions sont préalablement diluées dans une solution de SDS (0,01%) avant leur analyse par granulométrie laser. Ce TA est classiquement utilisé pour désagréger des amas éventuels de gouttelettes. La microscopie optique est utilisée pour conforter les mesures de granulométrie et visualiser un phénomène d'agrégation s'il existe.

Le principe de préparation d'émulsions présentant une distribution de taille des gouttelettes homogène repose sur le cisaillement d'émulsions concentrées (émulsions H/E à 67,5, 70 ou 80% d'huile, obtenues par agitation manuelle). La viscosité des émulsions concentrées se différencie de celles des émulsions diluées en ce sens qu'à partir d'une certaine concentration de la phase dispersée ($\phi = 0,64$), l'interface des gouttelettes se touche et les gouttelettes se déforment sous l'effet du compactage. La déformation des gouttelettes engendre un changement de viscosité créant des émulsions significativement plus rigides. L'augmentation de la rigidité de l'émulsion diminue l'énergie nécessaire pour engendrer le cisaillement et, donc, le fractionnement des gouttelettes d'huile (Leal-Calderon et al., 2007).

La préparation des émulsions concentrées a donc nécessité un ajustement des conditions d'émulsification (Tableau 16). Les émulsions formulées avec les OBP ont été réalisées avec une concentration en huile inférieure (67,5 et 70 vs 80% pour les émulsions sans OBP) afin d'éviter leur inversion de phase. À ces concentrations, elles nécessitent un apport en énergie plus important pour réduire la taille des gouttelettes étant donné que la viscosité de l'émulsion est plus faible. Parallèlement, l'ajout de protéines peut conduire à une augmentation de la viscosité de la phase aqueuse et/ou la présence d'interactions PL : OBP liées à leur adsorption à l'interface, nécessitant un apport d'énergie supplémentaire. Cette dernière explication est appuyée par les résultats de l'étude de Deleu et al. (2010) : pour un même procédé de fabrication, c'est à dire un apport d'énergie identique, l'ajout de protéines conduit à des émulsions de taille plus élevée (1,44 μm pour un rapport PL : OBP de 1 : 0 et 7,15 μm pour un rapport de 1 : 2). Pour ces auteurs, ce résultat correspond à une meilleure activité émulsifiante des PL associée à une action synergique du mélange PL et OBP mise en évidence par des mesures de tensions interfaciales.

À la lueur des résultats de FTIR, nous avons choisi de formuler les émulsions à deux pH se situant à des valeurs inférieures (5,5) et supérieures (7,5) du point isoélectrique des OBP du tourteau de colza (pI : 6,5) (Wijesundera et al., 2013b). Il n'y a pas d'influence du pH de la

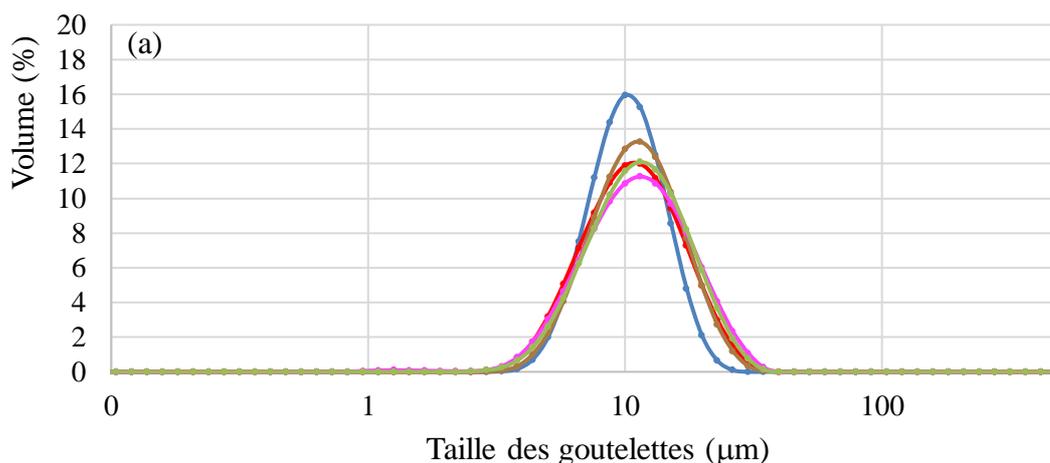
CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

phase aqueuse sur la taille des gouttes (c'est à dire pas de nécessité d'adapter les paramètres d'émulsification). Ce résultat est en adéquation avec le fait que la valeur de la pression interfaciale à l'équilibre est indépendante du pH et de la proportion de protéines (dans des rapports PL : OBP de 0,02 à 2) (Deleu et al., 2010).

Tableau 16 : Moyenne des diamètres moyens en volume (D(4,3)) juste après fabrication correspondant à 5 préparations d'émulsion indépendantes aux pH 5,5 et 7,5 pour différents rapports PL : OBP

<i>Composition</i>		<i>Paramètres d'émulsification</i>		<i>D[4,3] (μm)</i>	
<i>Rapport PL : OBP</i>	<i>Vitesse de rotation du fouet (rpm)</i>	<i>Temps d'émulsification (min)</i>	<i>pH 5,5</i>	<i>pH 7,5</i>	
1 : 0	1400	8	11 ± 2	12 ± 1	
1 : 1	1500	9	10 ± 1	11 ± 1	
2 : 3	1500	9	11 ± 1	12 ± 1	
1 : 2	1500	9	11 ± 3	12 ± 1	
1 : 3	1600	9	12 ± 3	13 ± 1	

La Figure 21 montre que les dix formulations étudiées présentent une distribution monodisperse et une taille de gouttes comparable aux alentours de 10 μm . Le procédé de préparation est reproductible puisqu'il correspond à 5 préparations indépendantes d'émulsion (Tableau 16).



CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

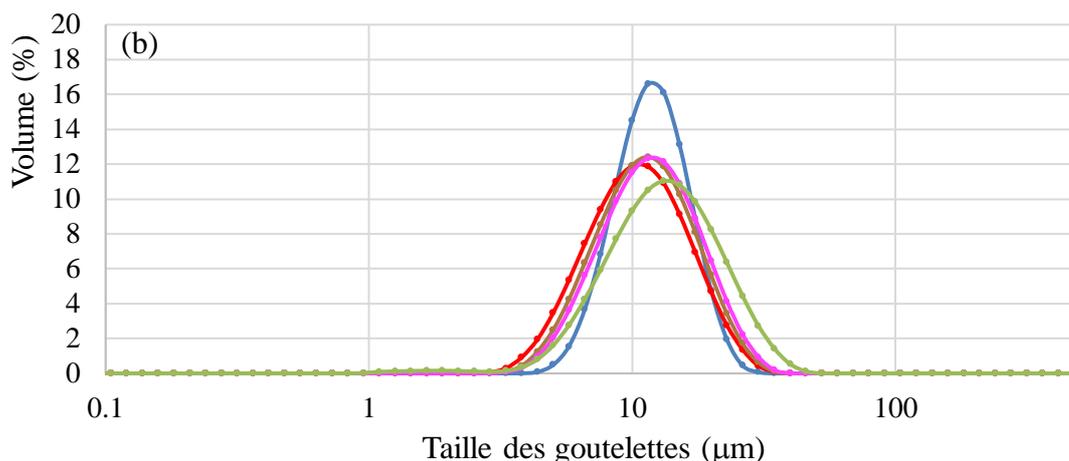


Figure 21 : Courbes de distribution de la taille des gouttelettes pour les émulsions à différents rapports PL : OBP : 1 : 0 (—), 1 : 1 (—), 2 : 3 (—), 1 : 2 (—) et 1 : 3 (—) à pH 5,5 (a) et 7,5 (b)

On remarque que l'uniformité de la distribution des émulsions sans protéine (PL : OBP 1 : 0) se situe entre 0,26 et 0,29 contrairement aux émulsions avec OBP (1 : 1, 2 : 3, 1 : 2 et 1 : 3) qui elles, présentent des uniformités de distribution plus élevées allant de 0,36 à 0,42. Le fait que la distribution des gouttelettes des émulsions avec OBP soit moins resserrée peut s'expliquer par l'augmentation de la viscosité de l'émulsion de par sa concentration en huile plus faible (Leal-Calderon et al., 2007). Ainsi, à concentration de TA suffisante, plus la concentration en huile d'une émulsion H/E augmente, plus l'uniformité de la distribution diminue (Dapčević Hadnađev et al. (2013).

Les clichés de microscopie confirment les résultats obtenus en granulométrie laser montrant une taille de gouttelettes autour du 10 µm et dont la distribution est monodisperse (Figure 22). On note la présence de floccs pour les émulsions dont la proportion d'OBP est supérieure à celle des PL. Plusieurs études reportent un phénomène de floculation pour des OBP reconstitués (Deleu et al., 2010, Wijesundera et al., 2013b). Cependant, suivant les auteurs, la floculation est plus importante avec les proportions de PL croissantes (Wijesundera et al., 2013b) ou avec les proportions de protéines croissantes (Deleu et al., 2010). Cette discordance apparente suggère que d'autres paramètres que le rapport PL : OBP doivent intervenir dans le comportement des émulsions : la taille des gouttes (et donc la couverture interfaciale par les émulsifiants), la concentration en huile (10 vs 38%), la concentration des TA, la nature de l'huile (huile de poisson vs trioléine), la nature des PL (lécithine de soja vs lécithine de colza). Nos résultats sont en accord avec ceux de Deleu et al. (2010), qui ont utilisé une lécithine de colza de composition en PL comparable. En absence de protéine et aux pH utilisés dans notre étude, les PL expriment une charge globalement négative qui permet la stabilisation les

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

émulsions grâce aux répulsions électrostatiques (Moncelli et al., 1994, Wang et Wang, 2008). L'ajout de protéines à l'interface modifie la charge interfaciale. Par exemple, à pH 5,5, la présence d'oléosine à l'interface réduit la charge nette des gouttelettes de 75 mV (interface constituée de PL uniquement) à 7 mV (Deleu et al., 2010). Ainsi, les forces attractives entre protéines prédomineraient sur les forces répulsives exercées par les PL. De manière plus surprenante, on note la présence d'agrégats également à pH 7,5, pH qui favorise les répulsions électrostatiques entre protéines. En regard aux résultats de quantité de protéines adsorbées et de couverture interfaciale discutés ultérieurement (§ IV-2.2), la floculation peut être expliquée par la pression osmotique créée par la fraction d'OBP présente dans la phase aqueuse qui génère de la floculation par déplétion. Ce comportement est à rapprocher de celui de la caséine de sodium (Dickinson et Golding, 1997). L'analogie se rapporte au fait que la caséine adopte une conformation micellaire en phase aqueuse, et que les OBP, de par leur solubilité limitée en phase aqueuse, adoptent une forme agrégée en solution (Gohon et al., 2011).

Il est à noter que le concentrât protéique d'OBP utilisé dans notre étude contient 9,8 % de glucides (§ III-3.1). En supposant qu'une partie de ces glucides soit des fibres, elles pourraient agir comme support pour la formation d'un réseau de gouttelettes pouvant contribuer à la stabilisation des gouttelettes lipidiques (Dickinson, 2017, Joseph et al., 2018a, Joseph et al., 2018b). Joseph et al. (2018a) montrent que les fibres contenues dans les tourteaux de colza peuvent contribuer à la stabilisation des gouttelettes d'huile ; les gouttelettes venant se « greffer » aux fibres créant un réseau de gouttelettes tout au long de celle-ci.

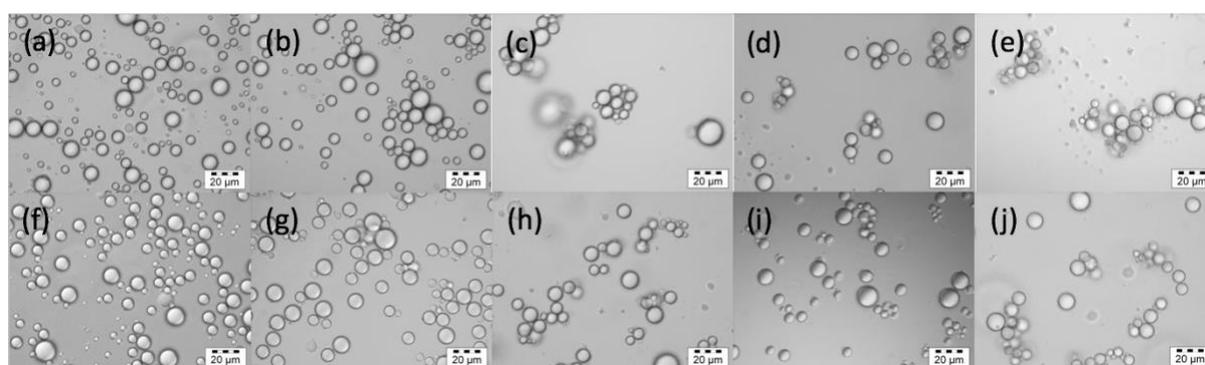


Figure 22 : Clichés de microscopie en contraste de phase pour les émulsions à différents rapports PL : OBP : 1:0 (a, f), 1 : 1 (b, g), 2 : 3 (c, h), 1 : 2 (d, i) et 1 : 3 (e, j) à pH 5,5 (a-e) et pH 7,5 (f-j)

2.2. Caractérisation de la composition interfaciale des émulsions

La quantité de protéines adsorbées aux interfaces est déterminée de manière indirecte en dosant la quantité de protéines dans la phase aqueuse (§ II-5.2.3). A pH 5,5, la quasi-totalité des OBP

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza (94 à 99%) présentes dans la formulation initiale des émulsions s'adsorbe à l'interface des gouttelettes (Figure 23). En revanche, à pH 7,5, le taux d'adsorption diminue fortement (de 40 à 55% selon le rapport PL : OBP) (Figure 23). Ainsi, quels que soient les rapports PL : OBP étudiés, un pH acide favorise l'adsorption des OBP à l'interface colloïdale contrairement au pH neutre.

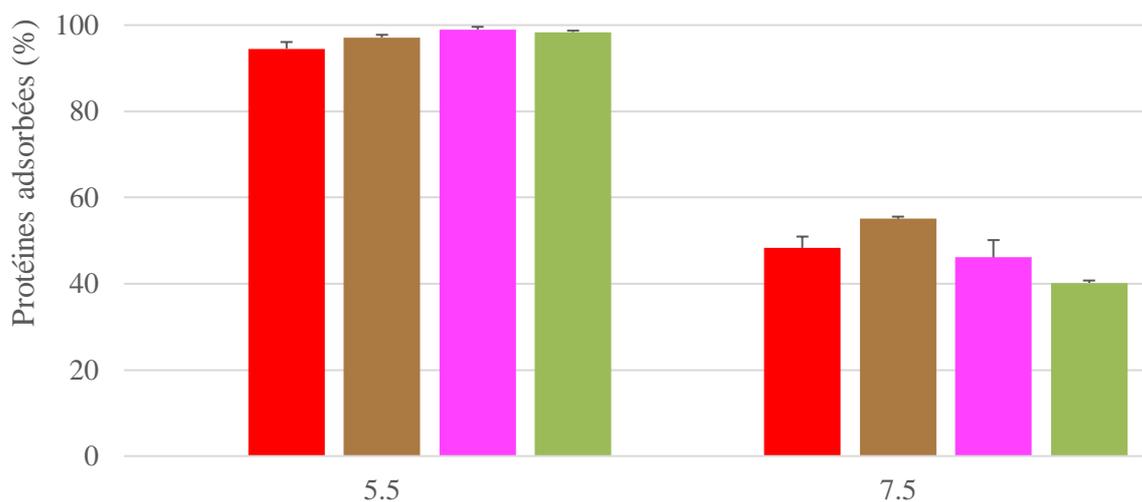


Figure 23 : Proportion de protéines adsorbées aux interfaces pour les émulsions à différents rapports PL : OBP : 1 : 1 (—), 2 : 3 (—), 1 : 2 (—) et 1 : 3 (—) à pH 5,5 et 7,5

Deleu et al. (2010) ont montré, grâce à des études de rhéologie interfaciale, que le module élastique des émulsions PL : oléosine à pH 5,5 est plus élevé qu'à pH 8,5 (un module élastique élevé étant associé à un film interfacial plus rigide et vraisemblablement à une meilleure stabilité interfaciale). Ce résultat proviendrait d'une meilleure interaction des oléosines à l'interface trioléine/eau quand leur charge nette est nulle, c'est à dire quand les répulsions électrostatiques intermoléculaires sont faibles (Deleu et al., 2010). Par ailleurs, grâce à l'étude de FTIR (§ III-3.2), nous avons montré qu'à pH 5,5, les OBP chargées positivement présentent un peu plus d'hélices α et de feuilletts β antiparallèles qu'à pH neutre, suggérant l'adoption de conformations différentes, au sein de la couche phospholipidique selon le pH du milieu étudié. Par transposition de ce résultat aux émulsions, la conformation des OBP adoptée à pH acide permettrait l'établissement d'interactions PL : OBP qui favoriserait la formation d'une interface mixte, alors qu'à pH neutre, il y aurait une compétition entre PL et protéines en faveur des espèces lipidiques.

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d’OBP issus de colza

Au vu des pourcentages d’adsorption des OBP, nous avons calculé le recouvrement de l’interface colloïdale par les OBP (§ II-5.2.6) (Tableau 17). À pH 5,5, la surface des gouttelettes présente une couverture protéique comportant deux à trois fois plus d’OBP qu’à pH 7,5.

Tableau 17 : Recouvrement interfacial des OBP pour les émulsions à différents rapports PL : OBP à pH 5,5 et 7,5

<i>Composition</i>	<i>Taux de recouvrement interfacial (g/m²)</i>		<i>Recouvrement par les protéines (m²)</i>	
	pH 5,5	pH 7,5	pH 5,5	pH 7,5
1 : 0	n/a	n/a	n/a	n/a
1 : 1	0,033	0,017	121,3	62,0
2 : 3	0,050	0,031	166,2	94,3
1 : 2	0,081	0,034	254,2	118,4
1 : 3	0,120	0,046	378,9	154,8

n/a : non applicable

Les valeurs de taux de recouvrement interfacial sont environ 15 fois plus importantes que celles retrouvées dans la littérature concernant les OB natifs, i.e. 0,0039 g de protéines/m² d’interface pour les OB issus de maïs et 0,0041 g de protéines/m² d’interface pour les OB issus de colza (Tzen et Huang, 1992, Ishii et al., 2017). Sur la base du taux de recouvrement des OB natifs, de la surface moyenne occupée par une molécule d’oléosine (environ 8,1 nm²) (Figure 24) 98 % de la surface des OB natifs seraient recouverts par les protéines (Tzen et Huang, 1992).

Nos résultats de recouvrement protéique à pH 7,5 sont plus proches de ceux calculés par Deleu et al. (2010) pour des OB reconstitués de colza (0,038 g de protéines/m² pour un rapport PL : OBP 1 :2). Deleu et al. (2010) ont montré que, selon le rapport PL:OBP, il peut exister une répartition non homogène des deux types de molécules suggérant la formation d’une interface multicouche (par complexation des PL et des OBP ou par superposition de monocouches de protéines) (Maget-Dana, 1999). Dans notre cas la surface développée par les gouttelettes d’émulsion (environ 13 m²) est très inférieure à celle développée par les protéines (Tableau 17). Cette observation va dans le sens de l’existence d’une multicouche de protéines à l’interface par accumulation d’agrégats protéiques et/ou de superposition de monocouches de TA (§ I-2.1.4.3). Cependant, on ne peut pas exclure non plus la possibilité d’une modification de la conformation des protéines à l’interface, le « parapluie » des oléosines se comprimant,

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

donnant lieu à une aire interfaciale inférieure à celle des OB natifs. Néanmoins, si on calcule l'aire moléculaire d'une molécule d'oléosine, sous forme de monocouche, à l'interface, à pH 5,5 on trouve $0,26 \text{ nm}^2$. Cette surface est très petite devant les $8,1 \text{ nm}^2$ proposés pour une oléosine dans un OB natif. Ainsi, nous ferons l'hypothèse que les oléosines à l'interface s'organisent en multicouche sans exclure une modification de leur conformation des OBP réduisant leur encombrement spatial par rapport aux OBP natives.

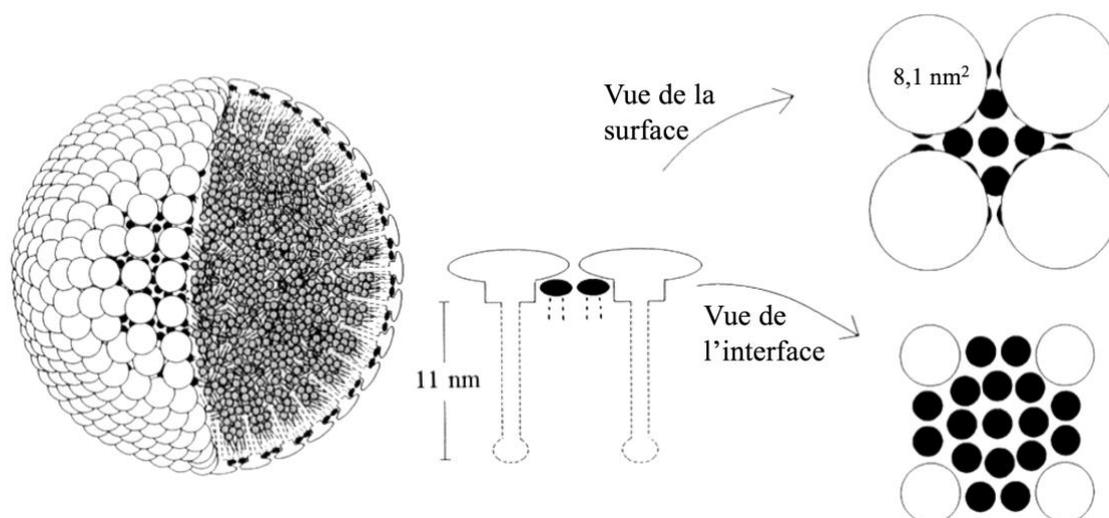


Figure 24 : Représentation d'un corps lipidique de maïs. Adapté de Tzen et Huang (1992)

2.3. Stabilité physique des émulsions à 4°C

Les dix formulations, entreposées à 4°C, présentent des signes de crémage dès les premières heures de stockage (Figure 25). Ce crémage est étroitement lié à la présence des agrégats révélés en microscopie optique (Figure 22). Il est quantifié par un indice de crémage (§ II-5.2.4) mesuré sur deux séries de formulations ($n=2$). Il est important de noter que ce crémage est réversible et que les gouttelettes colloïdales se redistribuent de façon homogène lors de l'agitation des émulsions.

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d’OBP issus de colza

Tableau 18 : Indice de crémage pour les émulsions à différents rapports PL : OBP à pH 5,5 et 7,5

<i>Composition</i>	<i>Indice de crémage (%)</i>		
	Rapport PL : OBP	pH 5,5	pH 7,5
1 : 0		66 ± 2	66 ± 2
1 : 1		39 ± 2	66 ± 2
2 : 3		35 ± 2	66 ± 2
1 : 2		30 ± 3	67 ± 2
1 : 3		28 ± 3	67 ± 2

Quel que soit le pH, pour un rapport PL : OBP de 1 : 0, les émulsions présentent un crémage important et une phase aqueuse opaque. Une analyse par diffraction dynamique de la lumière de la phase aqueuse après crémage indique la présence d’objets de taille allant de 400 à 500 nm. Ainsi, la présence de cette opacité dénoterait de la présence de objets de petites tailles qui sont d’ailleurs révélés par microscopie optique (Figure 21a et f).

Les émulsions formulées avec des OBP à pH 5,5 (indice de crémage allant de 28 à 39%) ont un crémage moins important que l’émulsion avec un rapport PL : OBP de 1 : 0 (66%). La Figure 25 illustre également que la phase aqueuse de ces émulsions (rapports PL : OBP de 1 : 1, 2 : 3, 1 : 2 et 1 : 3 à pH 5,5) est complètement transparente suggérant qu’il n’y a plus de gouttelettes dans cette phase. Comme mentionné précédemment, la présence d’OBP aux interfaces favorise la floculation. Ce phénomène tend à augmenter la taille des amas huileux (par agrégation) et par conséquent, favorise le crémage (§ I-2.1.2.1). Malgré la même quantité d’huile présente dans les émulsions avec des rapports PL : OBP de 1 : 1 à 1 : 3 à pH 5,5, la couche de crème est plus importante lorsque la quantité d’OBP est plus importante. Ce résultat peut être expliqué par le fait que l’état d’agrégats fort limite la dynamique et les possibilités de réarrangement des gouttelettes.

A pH 7,5, le comportement des émulsions est différent de celui à pH 5,5. La présence de protéines n’impacte pas l’indice de crémage qui est le plus important de tous (66-67%). En revanche la coloration de la phase aqueuse s’intensifie avec la proportion d’OBP croissante. Cette coloration pourrait correspondre à la fraction d’OBP non adsorbée (Figure 23) : plus la proportion d’OBP dans la formulation augmente, plus sa concentration en phase aqueuse augmente. La proportion moins importante d’OBP à l’interface, leur charge négative ainsi que

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

la différence de conformation qu'elles adoptent à l'interface peuvent expliquer que le compactage des gouttelettes soit plus prononcé qu'à pH 5,5.

La conformation adoptée par les OBP à pH 5,5 favoriserait davantage les interactions PL : OBP que la conformation à pH 7,5. Cette conformation est directement liée à la charge que les OBP expriment ; des OBP chargées positivement menant à la création d'un film interfacial plus épais et par conséquent à une couche de crème plus épaisse et moins dense.

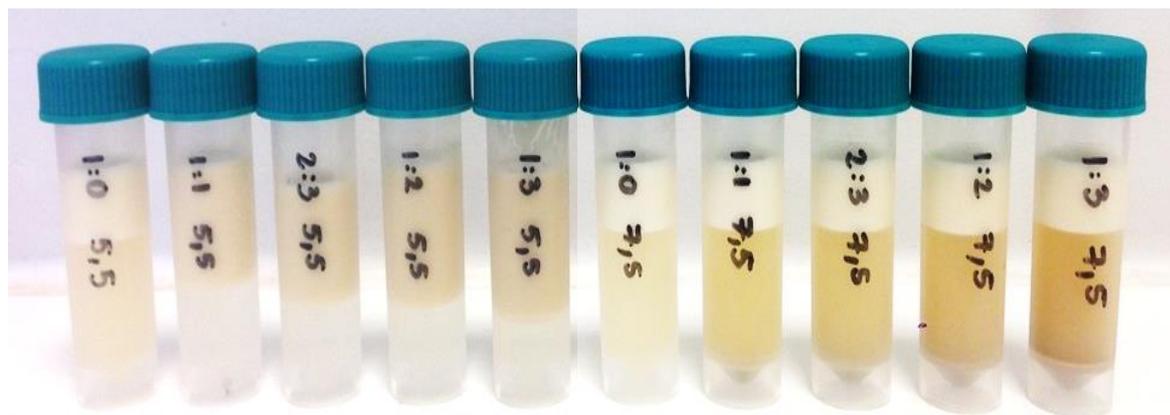


Figure 25 : Photo illustrant le crémage des émulsions à différents rapports PL : OBP : 1 : 1, 2 : 3, 1 : 2 et 1 : 3 à pH 5,5 et 7,5 après 6h de stockage à 4°C

La Figure 26a montre le suivi de la distribution de la taille des gouttelettes des émulsions sur une période d'un mois. Les émulsions à base de PL uniquement conservent la même taille de gouttelettes et la même uniformité durant cette période. Ainsi, aucune coalescence pour ces émulsions n'a été observée et ce, pour les deux pH étudiés. Ce résultat est en contradiction avec celui de Deleu et al. (2010) qui ont observé une coalescence très rapide des émulsions stabilisées (diamètre des gouttes 47 μm) uniquement par des PL sur une période de deux semaines. Cependant, d'autres études montrent que la lécithine de colza peut assurer la stabilité physique des émulsions à 4°C et à température ambiante (Li et al., 2018, Xie et Dunford, 2017).

La Figure 26 (b à e) montre le suivi de la distribution de la taille des gouttelettes pour une émulsion représentative de chaque formulation, sachant que 5 préparations indépendantes ont été réalisées pour chaque rapport PL : OBP. L'introduction d'OBP dans les formulations n'induit pas de changement significatif dans l'évolution de la taille des gouttelettes, et ce, pour les deux pH. Néanmoins, on note un diamètre des gouttes légèrement supérieur à pH neutre qui pourrait correspondre à un phénomène de coalescence. Ceci pourrait s'expliquer, en partie, par une couverture moindre de l'interface par les OBP. Le phénomène de coalescence à pH 7,5 serait limité du fait de la conformation des OBP. Quel que soit le pH, pour toutes les émulsions,

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza
aucun relargage d'huile n'est observé, contrairement à d'autres études (Deleu et al. 2010). En conclusion, bien qu'un crémage (réversible) soit observé pour les émulsions (Figure 23), nous considérons que la stabilité des émulsions est acceptable du fait des faibles variations de diamètre des gouttes.

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

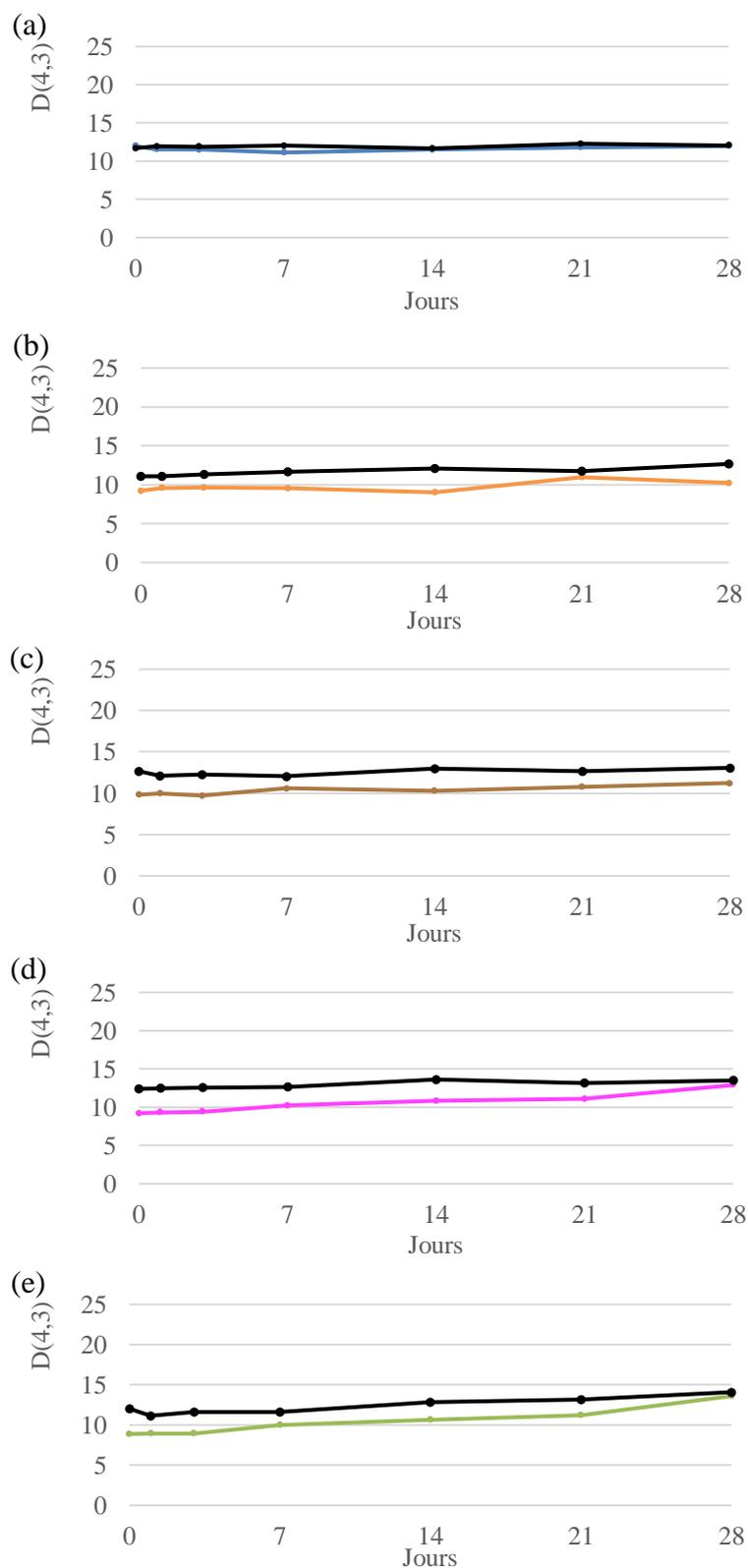


Figure 26 : Suivi de la distribution moyenne des gouttelettes pour des émulsions représentatives à différents rapports PL : OBP : (a) 1 : 0 (—), (b) 1 : 1 (—), (c) 2 : 3 (—), (d) 1 : 2 (—) et (e) 1 : 3 (—) à pH 5,5 (couleur) et 7,5 (noir) sur 28 jours, à 4°C

2.3.1. Stabilité des émulsions à 60°C

Afin de s'affranchir du rôle éventuel des protéines dans la phase aqueuse, nous avons limité les études suivantes aux émulsions avec des rapports PL : OBP de 1 : 0, 1 : 1 et 1 : 3 à pH 5,5. Un suivi en granulométrie des émulsions a été effectué à 60°C qui est la température à laquelle l'étude de stabilité oxydative a été réalisée. Il était donc important de connaître l'évolution de la taille des gouttelettes pendant le temps de l'étude.

Le suivi en granulométrie des émulsions (Figure 27) indique que toutes les émulsions conservent une taille comparable et stable pendant sept jours en étuve. (60°C). Les études en FTIR ont montré que les OBP commencent à se dénaturer vers 55°C. Le chauffage privilégie les hélices α et les feuillets β anti-parallèles. Ce changement de conformation ne semble pas avoir d'impact sur la stabilité des gouttelettes sur le temps de l'étude.

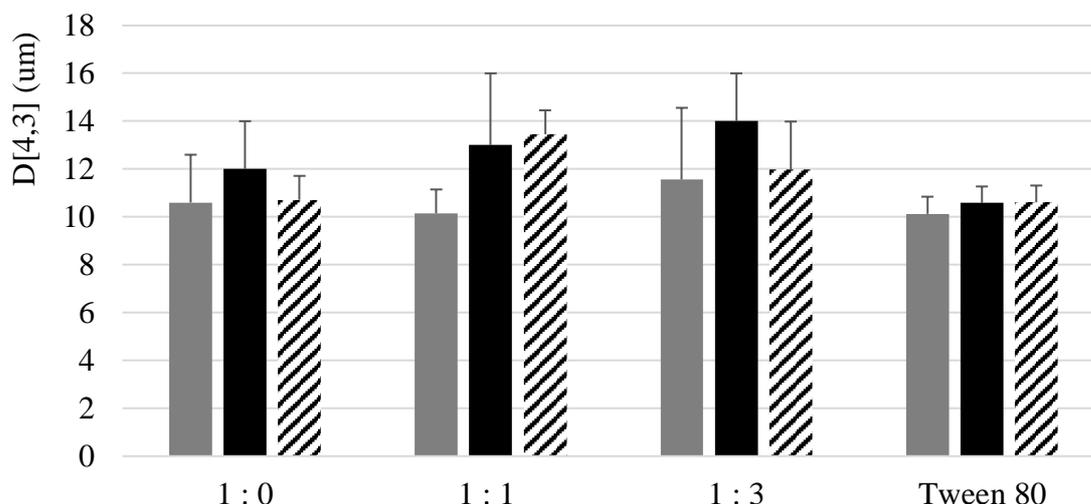


Figure 27 : Valeurs de D[4,3] pour les émulsions à différents rapports PL : OBP à pH 5,5 et avec du Tween 80 au jour 0 (■), au jour 7 à 4°C (■) et au jour 7 à 60°C (▨)

3. Stabilité chimique des émulsions

3.1. Généralités sur l'oxydation des lipides

L'oxydation et l'hydrolyse des lipides associés, également nommées rancissement oxydatif, altèrent les qualités nutritionnelles des lipides par la formation de radicaux libres et de composés potentiellement toxiques (Ursini et al., 1998, Kanazawa et al., 2002, Petersen et Doorn, 2004). Les qualités organoleptiques des matrices alimentaires dans lesquelles ils sont incorporés se détériorent également. Le rancissement oxydatif représente ainsi un des problèmes technologiques les plus importants de l'industrie agroalimentaire. L'oxydation des

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

lipides est un ensemble de réactions chimiques spontanées et irréversibles qui se définit comme l'attaque des AG insaturés par l'oxygène de l'air (Simic et al., 1992). L'oxydation, lipidique peut être, selon le milieu et les initiateurs mis en jeu, le résultat de plusieurs voies réactionnelles :

- l'auto-oxydation, initiée par la température, les ions métalliques ou les radicaux libres correspondant à des lipides déjà oxydés ;
- la photo-oxydation initiée par les rayons UV en présence de photo-sensibilisateurs
- l'oxydation enzymatique catalysée par le lipooxygénase et la cyclooxygénase.

Dans ce travail de thèse, nous nous placerons dans les conditions d'auto-oxydation.

L'oxydation des lipides est classiquement décomposée en trois étapes principales :

- l'initiation correspondant à la formation de radicaux lipidiques libres par rupture homolytique d'un atome d'hydrogène adjacent à une double liaison allylique ou bisallylique ;
- la propagation au cours de laquelle le radical alkyle formé pendant l'amorçage fixe très rapidement l'oxygène à l'état triplet et forme un radical peroxy instable. Ce dernier est capable d'arracher à son tour un hydrogène d'un AG insaturé et générer un hydroperoxyde et un nouveau radical qui réagit à son tour avec l'oxygène de sorte que la séquence de réactions déjà décrite se reproduit ;
- la terminaison correspondant aux réactions générant des composés non radicalaires, ce qui met fin aux cycles réactionnels.

Néanmoins, cette description de l'oxydation reste simpliste devant les voies réactionnelles qui pourraient être réellement impliquées (Schaich, 2012) (Figure 28).

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza non conjuguée à la position conjuguée ce qui produit les hydroperoxydes isomères contenant les liaisons diéniques et triéniques (Figure 29).

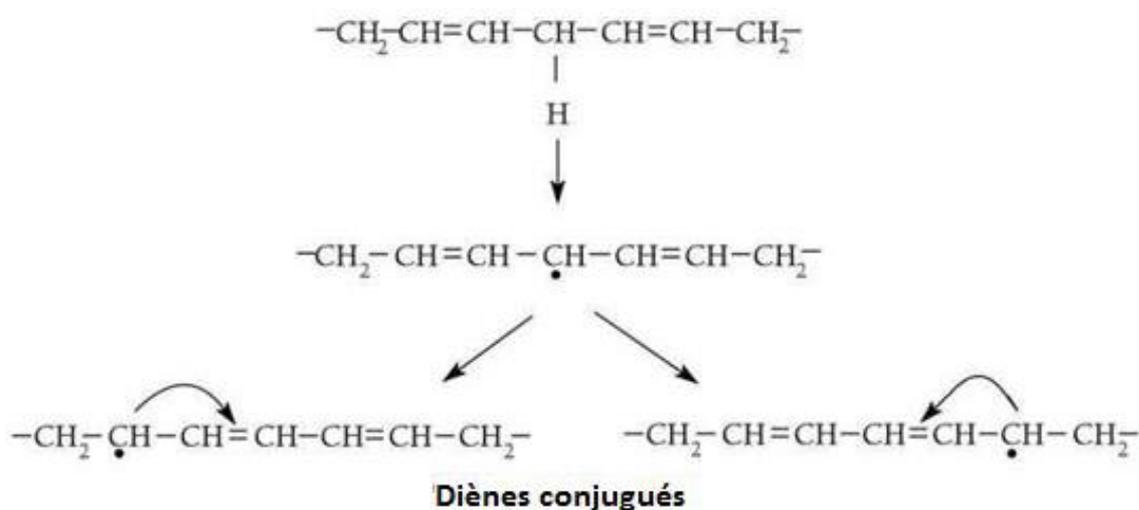


Figure 29 : Formation des diènes conjugués

De nombreuses études montrent une très bonne corrélation entre l' I_P et les CD (Marmesat et al., 2009, Shahidi et al., 1994). Néanmoins, comme il n'existe pas de valeur normative pour des CD nous avons dans un premier temps, établi cette corrélation pour l'huile de colza utilisée dans ce travail. Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé les émulsions précédemment décrites vis-à-vis de leur comportement oxydatif dans des conditions de stockage accéléré (60°C, à l'abri de la lumière).

3.2. Étude de l'huile de colza en phase continue

La Figure 30 montre la corrélation entre la valeur d' I_P et les CD pour l'huile de colza stockée en étuve à 60°C. Il est important de mentionner que l'huile de colza (avec ou sans lécithine) a été soumise à une agitation au fouet à 1400 rpm pour une durée de 8 minutes pour se placer dans les mêmes conditions de préparation que celles des émulsions. La pente de la droite dépend des conditions d'oxydation et de la nature de l'huile (Marmesat et al., 2009). Dans nos conditions, nous considérerons que l'huile est oxydée dès lors que l'absorbance spécifique à 233 nm est supérieure à 0,541.

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

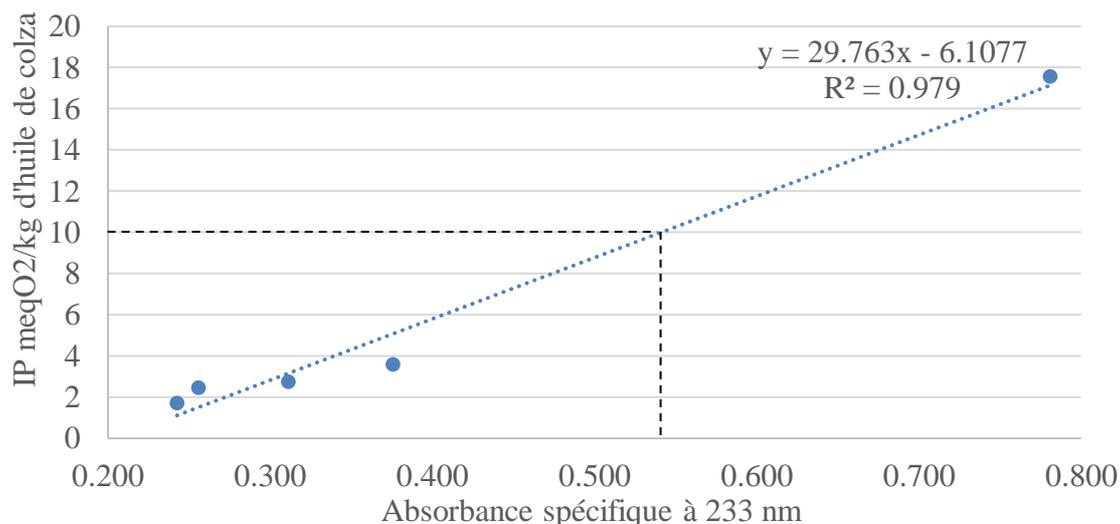


Figure 30 : Relation entre l'indice de peroxyde et l'absorbance spécifique (densité optique à 233 nm normalisée par la concentration de lipides) représentative des diènes conjugués pour l'huile de colza entreposée à 60°C

L'évolution de l'oxydation de l'huile, par mesure des CD (Figure 31), montre que l'huile en phase continue commence à s'oxyder après 4 jours en conditions d'oxydation accélérée. Lorsque la lécithine de colza (0,5%) est ajoutée à l'huile, aucune oxydation n'est mesurée à 7 jours. Les PL sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, (Bandarra et al., 1999, Judde et al., 2003). En effet, les PL peuvent intercepter les radicaux libres grâce au doublet libre de l'azote de la PC et de la PE (Koga et Terao, 1995) et former des complexes avec les métaux pro-oxydants (Pop, 2011, Carter et al., 2015). La présence de concentrât protéique à une concentration de 1,5 % dans l'huile en phase continue permet également de ralentir l'oxydation de l'huile. Les propriétés antioxydantes du concentrât peuvent provenir de la présence des polyphénols (§ III-3.1) (Shahidi et Ambigaipalan, 2015) et des propriétés intrinsèques des oléosines. Bien que des propriétés antioxydantes intrinsèques aux OBP n'aient pas été directement reportées, plusieurs protéines ont prouvé limiter l'oxydation par leur capacité à se lier aux métaux et à piéger les radicaux libres (Berton-Carabin et al., 2014).

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

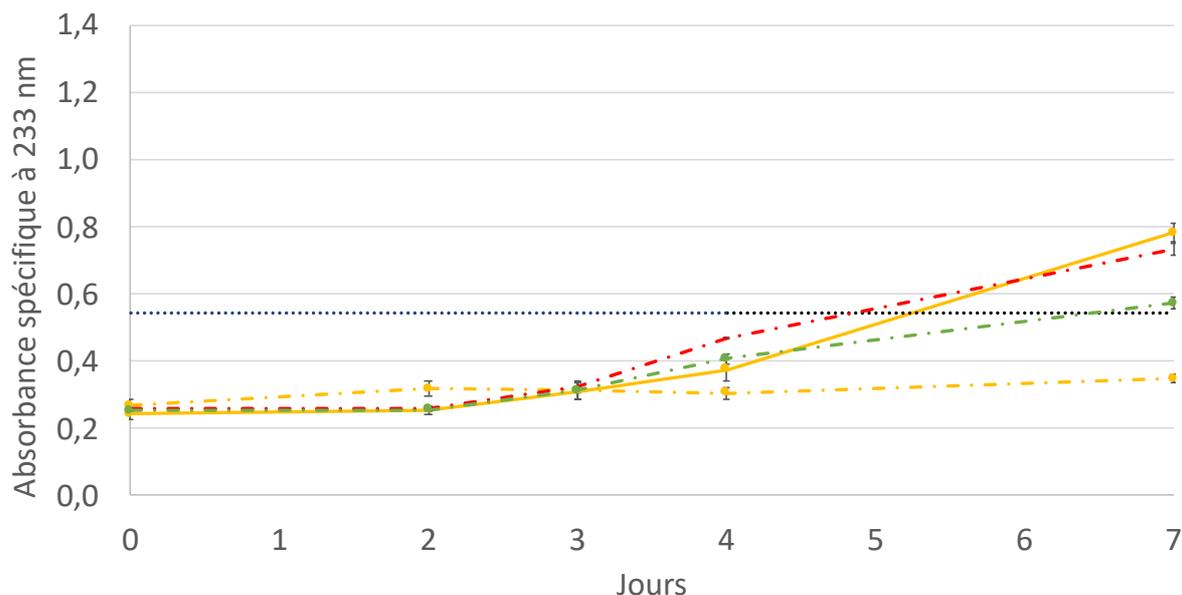


Figure 31 : Évolution de l'oxydation (Absorbance spécifique (densité optique à 233 nm normalisée par la concentration de lipides)) pour l'huile de colza en phase continue seule (—), en mélange avec la lécithine de colza (0,5%) (- - -), le concentrat protéique à 0,5% (- - -) et 1,5% (- - -) entreposés à 60°C pendant 7 jours

3.3. Étude de l'huile de colza en émulsion

Bien que l'oxydation des lipides dans les émulsions mette en jeu les mêmes réactions que celles qui se produisent en phase continue, les cinétiques d'oxydation sont différentes à cause des propriétés de l'interface des gouttelettes et du partage des molécules pro et antioxydantes, et des substrats oxydables entre les différentes phases (McClements et Decker, 2000). Il est donc maintenant admis que le comportement oxydatif de l'huile en phase continue et en émulsion est différent (Berton, 2011). Selon les formulations utilisées, la mise en émulsion favorise (Tan et Nakajima, 2005, McClements et Decker, 2000, Berton-Carabin et al., 2014) ou ralentit (Belhaj et al., 2010, Zou et Akoh, 2013, Galan et al., 2016) les réactions d'oxydation. Dans tous les cas, les études mettent en évidence l'influence des facteurs suivants :

- la nature de la phase grasse : proportion d'AG insaturés, position des AG sur le squelette glycérol, présence de composés mineurs ;
- la composition de la phase aqueuse : protéines non adsorbées, polysaccharides ;
- de la structure interfaciale étroitement liée à sa composition en tensioactifs ;
- la fraction volumique en huile.

La Figure 32 montre l'évolution oxydative des différentes formulations sur 7 jours. De manière générale, l'émulsification de l'huile de colza : 1) n'augmente pas de manière significative la teneur en CD suggérant que le procédé d'émulsification en soi n'oxyde pas l'huile et 2) favorise

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

son oxydation, quelles que soient les formulations considérées puisque les CD augmentent plus rapidement pour l'huile émulsifiée que pour l'huile en phase continue. Ce dernier phénomène peut être expliqué par l'augmentation de l'aire interfaciale ; une plus grande aire interfaciale procure une plus grande surface de contact qui favorise le contact avec les molécules prooxydantes, dont l'oxygène (Berton-Carabin et al., 2014). L'huile de colza stabilisée par du Tween 80 présente la plus forte oxydation. Par rapport au Tween 80, on retrouve le rôle antioxydant de la lécithine comme cela a été observé pour d'autres émulsions (Uluata et al., 2015, Haahr et Jacobsen, 2008). La présence d'OBP dans les formulations (rapports PL : OBP 1 : 1 et 1 : 3) permet de retarder encore davantage l'oxydation de l'huile de colza par rapport à l'émulsion à base de PL seuls : l'oxydation est d'autant plus ralentie que la quantité d'OBP est importante. Les propriétés antioxydantes des OBP sont telles qu'au jour 7, l'émulsion avec un rapport PL : OBP de 1 : 3 est moins oxydée que l'huile de colza non émulsifiée. D'une part, les propriétés antioxydantes intrinsèques des polyphénols et des protéines qui s'additionnent à celles des PL peuvent être à l'origine de cette protection. D'autre part, si on admet que les oléosines s'organisent en multicouche à l'interface, cela pourrait agir comme un écran physique face à la diffusion de l'oxygène, des espèces radicalaires et des molécules prooxydantes (Gray et al., 2010, Wijesundera et al., 2013b). Cette barrière pourrait être renforcée par les interactions entre les PL et les oléosines à l'interface (Garcia-Moreno et al., 2014). En effet, l'oléosine extraite du tourteau de colza, combinée avec de la lécithine de tournesol, permet une meilleure protection contre l'oxydation qu'un mélange d'isolat de protéines de colza (majoritairement composé de cruciférine et de napine) et de cette même lécithine (Wijesundera et al., 2013b).

CHAPITRE IV : Formulation et caractérisation des émulsions H/E à base de PL et d'OBP issus de colza

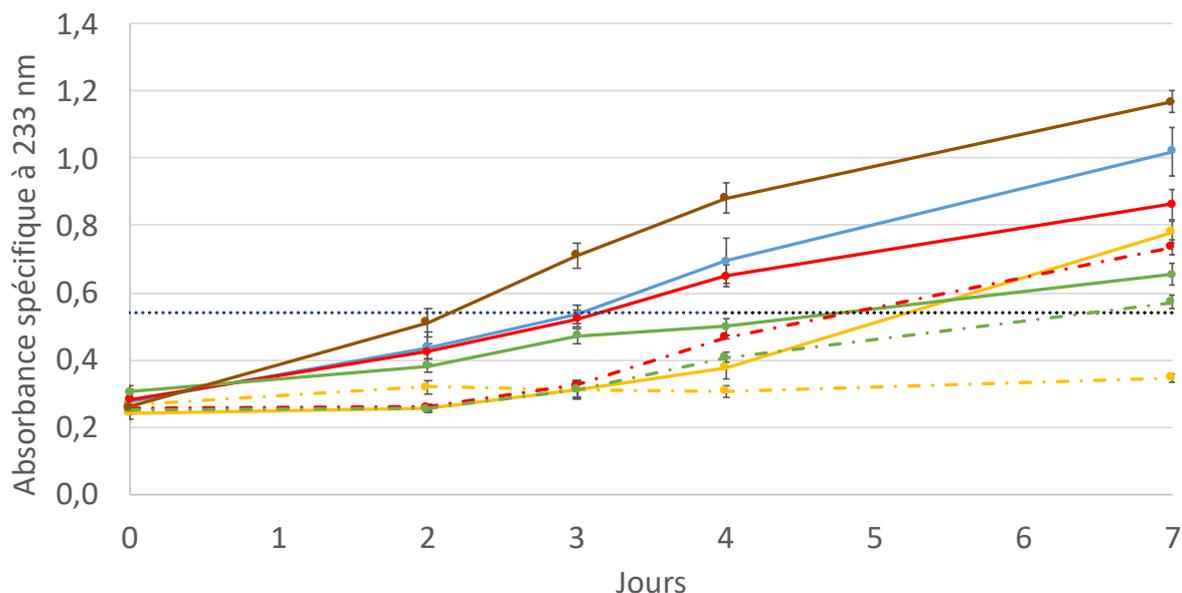


Figure 32 : Évolution de l'oxydation (Absorbance spécifique(densité optique à 233 nm normalisée par la concentration de lipides)) pour l'huile de colza en phase continue (—), le mélange d'huile de colza et de lécithine en phase continue (—·), l'émulsion stabilisée par du Tween 80 (—), les émulsions à différents rapports PL : OBP 1 : 0 (—), 1 : 1 (—) et 1 : 3(—), les mélanges d'huile de colza et d'OBP en phase continue 0,5% (—·) et 1,5% (—·) entreposés à 60°C pendant 7 jours

4. Conclusion

Nous avons montré que la composition interfaciale influence la réalisation et la stabilité physicochimique des émulsions à base de coproduits issus du colza. Le choix d'une lécithine riche en PL anioniques et la préparation des émulsions à deux pH positionnés de part et d'autre du pH isoélectrique des oléosines nous a permis de moduler les interactions PL : OBP. Ces interactions influencent la quantité d'OBP adsorbées à l'interface et la stabilité physique des émulsions avec un crémage marqué pour les émulsions riches en protéines. La synergie PL : oléosine à l'interface semble être un facteur décisif pour ralentir l'oxydation de l'huile de colza émulsifiée. Ainsi, malgré la déstabilisation des émulsions par crémage, le fait que la coalescence des gouttes soit limitée et l'oxydation des lipides émulsionnés ralentie, permet d'envisager l'utilisation de ces émulsions dans une étude de bioaccessibilité .

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

La digestion des lipides est un ensemble complexe de processus physicochimiques visant à rendre absorbables par les entérocytes des molécules initialement de grande taille et hydrophobes. La digestion des TAG commence dans l'estomac alors qu'ils sont mélangés aux sécrétions gastriques. Grâce au brassage mécanique (émulsification pylorique), il y a formation de gouttelettes dont l'interface est stabilisée par des molécules amphiphiles à savoir les émulsifiants alimentaires et les produits de la lipolyse gastrique (Armand, 1998). On assiste à ce niveau à une hydrolyse partielle des TAG alimentaires (10-30 %) par la lipase gastrique produisant des AG libres (AGL), des MAG et des DAG aux propriétés tensioactives (Wilde et Chu, 2011). Contrairement à la lipase pancréatique, l'activité de la lipase gastrique n'est pas inhibée par la présence de sels biliaires (Lengsfeld et al., 2005) et est peu influencée par la présence de PL (Embleton et Pouton, 1997). Au niveau du duodénum, le contenu gastrique entre ensuite en contact avec la bile et le suc pancréatique contenant des sels biliaires, des PL, de la colipase et de la lipase pancréatique. Les sels biliaires et les PL participent à la création et/ou au maintien d'une interface lipides/eau nécessaire à l'adsorption de la lipase pancréatique (Wickham et al., 1998). L'hydrolyse des TAG requiert l'intervention de la colipase, protéine qui lève l'effet inhibiteur des sels biliaires et qui permet à la lipase pancréatique de s'adsorber à l'interface lipides/eau où elle est activée. L'hydrolyse des TAG génère deux AGL et un 2-MAG du fait de la stéréospécificité de l'enzyme (Wilde et Chu, 2011, Desnuelle, 1961). La digestion des PL, quant à eux, se fait grâce à la phospholipase A₂ pancréatique qui hydrolyse les PL, libérant un AGL et un lysophospholipide (Hanahan, 1997, Wilton, 2008). Les sels biliaires assurent la solubilisation des produits issus de l'hydrolyse des TAG et des PL dans des micelles mixtes (Wickham et al., 1998). Ces dernières permettent d'augmenter la quantité de lipides présents au niveau des entérocytes en assurant leur transport à travers la couche d'eau non agitée (Shiau et al., 1985). Une fois au niveau de la membrane des entérocytes, les micelles se dissocient et libèrent les AGL et les 2-MAG qui traversent la membrane apicale, soit par diffusion passive, soit à l'aide de transporteurs protéiques (Vors, 2012, Shi et Burn, 2004, Petit et al., 2007) (Figure 33).

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

Arrivés dans les entérocytes, les AG s'associent aux transporteurs cytosoliques (Intestinal Fatty Acid Binding Proteins) qui assurent le trafic cellulaire (Hsu et Storch, 1996) et dirigent les AG vers le réticulum endoplasmique notamment pour resynthétiser les TAG. Cette synthèse se réalise selon deux voies différentes : la voie des 2-MAG (favorisée en période postprandiale) et la voie de l'acide phosphatidique (favorisée en période interprandiale ou de jeûne) (Mattson et Volpenhein, 1964, Johnston et Rao, 1967). Les lipides synthétisés s'associent à l'apo B48 au niveau du réticulum endoplasmique lisse et forment les chylomicrons (Anant et Davidson, 2001). Ces structures supramoléculaires sont ensuite enrichies en lipides (TAG, esters de cholestérol, vitamines, PL) au niveau de l'appareil de Golgi (Hussain, 2014, Cartwright et al., 2000). La protéine microsomale de transfert des TAG assure l'assemblage, la translocation au sein du réticulum endoplasmique et la sécrétion des lipoprotéines riches en TAG (Lagrost et al., 2003). Les chylomicrons finissent par fusionner avec la membrane basolatérale entérocytaire et rejoignent la circulation lymphatique par exocytose.

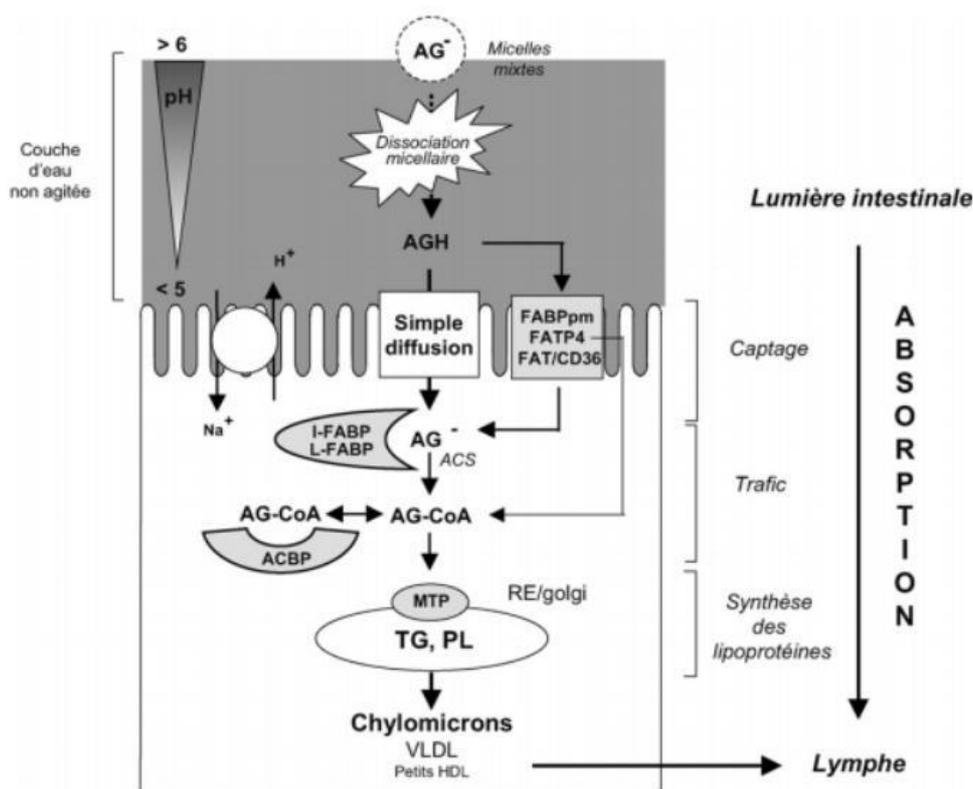


Figure 33 Représentation schématique du captage et du devenir intra-entérocytaire des acides gras
 ACBP : Acyl -CoA-binding protein, ACS : Acyl-CoA synthétases, AG : Acide gras, AGH :Acides gras protoné,
 EC : Esters de cholestérol, FABPpm : plasma membrane fatty acid-binding protein, FAT/CD36: fatty acid
 transporter, FATP4 : fatty acid transport protein 4, I-FABP : intestinal fatty acid-binding protein, L-FABP :
 Liver fatty acid-binding protein, MTP : Microsomal triglyceride transfer protein, PL : Phospholipide, TAG :
 Triacylglycérine (Petit et al., 2007)

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

La biodisponibilité des lipides correspond à la fraction lipidique assimilée et pouvant être utilisée par l'organisme. L'ensemble des étapes impliquées dans la cascade métabolique régularise cette fraction et influence la quantité disponible dans les différents compartiments. La bioaccessibilité correspond à la première phase de cette cinétique et fait référence à la portion lipidique qui est hydrolysée, solubilisée, absorbée, transportée, resynthétisée dans les entérocytes et relarguée dans la circulation systémique (McClements et al., 2009).

Lorsqu'on analyse les différents processus impliqués dans les premières étapes de la digestion (émulsification, hydrolyse des TAG par les lipases, solubilisation des produits d'hydrolyse dans les micelles mixtes), on conçoit aisément que la bioaccessibilité des lipides est influencée par un certain nombre de paramètres (Michalski et al., 2017, Hur et al., 2009, McClements et Li, 2010, Golding et Wooster, 2010) :

- la forme chimique des AG. De nombreuses études étudient l'influence des formes libres ou estérifiées (esters éthyliques et méthyliques, DAG, TAG, PL...) sur leur biodisponibilité (Amate et al., 2001, Ramirez et al., 2001). De même, la position de l'AG sur le squelette glycérol et la nature de cet AG (longueur de chaîne et degré d'insaturation) modulent aussi la digestibilité des lipides (Ramirez et al., 2001, Couedelo et al., 2012). L'influence de ces paramètres repose notamment sur la spécificité des enzymes digestives ;
- Contrairement à la plupart des enzymes qui agissent en phase aqueuse, les lipases agissent en milieu hétérogène, à l'interface lipide/eau, où elles s'y adsorbent. Il en résulte que l'activité de ces enzymes dépend autant de la "qualité" de cette interface que des paramètres plus classiques tels que le pH ou la force ionique du milieu. Des revues récentes recensent les principales études montrant comment la composition, la structure et les propriétés de l'émulsion peuvent influencer la digestion des lipides qui la constituent (Golding et Wooster, 2010, McClements et Li, 2010, Hur et al., 2011).

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

- la taille des globules gras. Des études *in vitro* montrent que la granulométrie des émulsions gouverne la fixation à l'interface lipidique puis l'activité des lipases gastrique (Borel et al., 1994) et pancréatique (Armand, 1998). Ainsi, chez le rat, une émulsion fine (0,6 μm) est deux fois plus vite hydrolysée dans l'estomac et le duodénum qu'une émulsion grossière (22 μm) (Borel et al., 1994). Des aspirats

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

gastriques, recueillis 4 heures après digestion, montrent que, chez l'Homme, la lipolyse gastrique d'une émulsion fine (0,7 μm) est supérieure (36%) à celle d'une émulsion grossière de 10 μm (16%). Toutefois, le pic d'absorption des TAG plasmatiques est retardé d'une heure avec l'émulsion fine comparativement à celui de l'émulsion grossière (Armand et al., 1999) ;

- la nature des tensioactifs utilisés pour stabiliser l'interface huile/eau. De façon générale, la diminution de la chaîne aliphatique des EFPM tend à augmenter la biodisponibilité des lipides émulsionnés au sein d'une même famille de TA (Tween, Span, etc.) (Speranza et al., 2013). Parmi ces EFPM, les interfaces stabilisées par des PL favorisent l'activité catalytique de la lipase et la sécrétion entérocytaire des TAG comparativement aux systèmes stabilisés par le caséinate de sodium (Vors et al., 2012). Couedelo et al. (2015) démontrent également que l'activité des lipases gastrique et intestinale *in vitro* ainsi que la bioaccessibilité des AG *in vivo* sont favorisées en présence de PL plutôt qu'en présence de Tween 80 et de caséinate de sodium. L'impact de protéines, utilisées comme émulsifiants, sur la digestion est moins clair puisque plusieurs résultats contradictoires sont publiés. D'une part, lors d'études *in vitro*, la présence de TA protéiques favorise l'adsorption des lipases digestives et leur activité hydrolytique par rapport à des EFPM (Mun et al., 2007). D'autre part, l'usage de TA protéiques laitiers, comme la caséine ou les protéines du lactosérum, ralentit la digestion des lipides par rapport aux émulsions stabilisées par les EFPM (Michalski et al., 2005, Keogh et al., 2011, Couedelo et al., 2015, Nassra et al., 2018) ;
- la stabilité des émulsions. Les variations de pH entre l'estomac et l'intestin peuvent déstabiliser les systèmes colloïdaux via des phénomènes de floculation/coalescence aboutissant à une disparition plus ou moins totale de l'interface initiale. Il a été montré qu'une émulsion stable physiquement à pH acide est associée, chez l'Homme, à une vidange gastrique plus lente et une absorption plasmatique des lipides plus rapide que lorsqu'une émulsion instable est utilisée (Goetze et al., 2007, Marciani et al., 2007, Li et al., 2012). La corrélation entre les résultats des études *in vitro* et ceux des études *in vivo* est parfois difficile à mettre en évidence (Van de Wiele et al., 2007). Néanmoins, la réalisation d'études *in vitro* dans des conditions mimant celles du tractus gastrointestinal peut permettre une meilleure compréhension des résultats obtenus lors des études *in vivo*.

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

C'est dans ce contexte que se situe notre étude qui vise donc à :

- i) Définir l'impact de la composition interfaciale, à l'aide de différents rapports PL : OBP sur la stabilité physique des émulsions exposées à des variations de pH mimant celles du tractus gastro-intestinal ;
- ii) Caractériser l'impact de la composition interfaciale sur l'activité *in vitro* de la lipase pancréatique ;
- iii) Déterminer l'impact de la formulation des émulsions sur l'absorption des AG chez le rat par une analyse des lipides lymphatiques.

1. Étude de bioaccessibilité de l'huile de colza émulsifiée *in vitro* et *in vivo*

Ce travail fera l'objet d'une publication dans un journal à comité de lecture et est présenté ci-après. La publication reprend une partie des résultats de formulation et de stabilité décrits précédemment et qui ne seront pas discutés ci-après.

1.1. Résumé de l'article en français

Nous avons préparé et caractérisé des émulsions avec différents rapports phospholipides (PL) : protéines du corps lipidique (OBP) issus du colza. Quel que soit le rapport PL : OBP étudié, les émulsions présentent un phénomène de crémage au cours du temps mais sans coalescence des gouttes. Par ailleurs, le rapport PL : OBP le plus élevé étudié (1 : 3) favorise la stabilité oxydative de l'huile de colza encapsulée. Les études *in vitro* dans des milieux simulant le milieu gastro-intestinal ont montré que les émulsions conservent une interface lors de l'acidification du milieu, malgré une floculation marquée pour les émulsions riches en protéines. La présence d'OBP à l'interface stimule l'activité de la lipase pancréatique *in vitro*. Ces résultats sont concordants avec l'étude *in vivo* chez le rat qui montre une meilleure bioaccessibilité lymphatique des AG totaux pour l'émulsion émulsionnée avec des OBP. Dans l'ensemble, cette étude montre l'importance de la composition de l'interface et plus précisément des interactions PL : OBP dans le comportement physicochimique des émulsions et le devenir métabolique des lipides.

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

2. Emulsions based on oil bodies proteins and phospholipids. In vitro and in vivo studies, Christine Bourgeois, Leslie Couëdelo, Muriel Subirade et Maud Cansell.

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

Emulsion based on oil bodies proteins and phospholipids. *In vitro* and *in vivo* studies

Christine Bourgeois^{1,2}, Leslie Couëdelo³, Muriel Subirade¹ and Maud Cansell²

¹ Institute of Nutrition and Functional Food (INAF), Department of food sciences, University Laval, Quebec, Quebec, Canada

² Institute of Chemistry and Biology of Membranes and Nano-objects (CBMN), University of Bordeaux, Bordeaux INP, UMR 5248, Pessac, France

³ ITERG, Nutrition Metabolism and Health Department, Pessac, France.

²**Corresponding Author**, 16 Avenue Pey-Berland, ENSCBP, Pessac, France, 33607. Tel.: + 33(0)5 40 00 66 95; Fax number: +33(0)5 56 37 03 36. E-mail: mcansell@enscbp.fr

Abstract

Emulsions were formulated with different ratios of phospholipids (PL) and proteins (OBP) extracted from rapeseed oil bodies (OB) in order to get oil droplets with an average size of 10 μm . Irrespectively of the studied PL:OBP ratio, a creaming phenomenon was observed with time, without any coalescence process. Interestingly, the emulsion with a PL:OBP of 1:3 protected rapeseed oil from oxidation, when stored at 60°C. Emulsion characterization in conditions that mimic those of the gastrointestinal tract showed that the oil/water interface was preserved upon acidification, although flocculation was observed for emulsions with high OBP proportions. This flocculation vanished after neutralisation in the intestinal conditions. The presence of OBP at the interface favoured pancreatic lipase activity. The bioavailability of fatty acids from rapeseed oil in emulsified forms versus a non-emulsified form was investigated in thoracic lymph duct-cannulated rats. Oil emulsification tended to increase total fatty acid concentration in lymph when the emulsion was only formulated with PL, but significantly favoured the extent of fatty acid recovery when PL were associated with OBP in the formulation (28.7 mg /ml for rats fed emulsion v. 16.1 mg /ml for rats fed oil; $P < 0.05$). This result could result, at least partly, from an increased *in vitro* lipase activity for emulsion based on PL and OBP.

Keywords:

oil bodies, phospholipids, bioavailability, emulsion, stability

Abbreviations:

FA, fatty acid, OB, oil bodies, OBP, oil body proteins; O/W emulsions, oil-in-water emulsions; PL, phospholipids; TAG, triacylglycerides;

Introduction

Nowadays, two main issues are questioned concerning lipid nutrition. The first one concerns lipid bioavailability and the different parameters of influence. The second one deals with lipid formulation and the research of clean label emulsifiers. These two issues are linked. Indeed, among the factors influencing lipid bioavailability, emulsification appears of major concern. Recent reviews reported how the formulation (type of lipids, nature of the emulsifiers) and the structure (interfacial properties, microstructure, droplet size) of emulsions influence lipid digestion (Hur et al., 2009, McClements et Li, 2010, Golding et Wooster, 2010, Michalski et al., 2013). One main reason explaining a better lipid bioavailability with emulsions accounts for lipases that act at the oil/water (O/W) interface where they need to adsorb prior to hydrolysis. Thus, all interface parameters such as the area available or the interface composition that can modulate the lipase adsorption and lipid catalysis have to be considered. Preliminary emulsification of lipids and small droplet size have been shown to favour the lipid digestion *in vitro* (Salvia-Trujillo et al., 2013) and *in vivo* both in animal models (Couedelo et al., 2011) and in human (Armand et al., 1999, Salvia-Trujillo et al., 2013, Tan et al., 2016). Concerning the interfacial composition, phospholipids (PL) have demonstrated to increase fatty acid (FA) bioaccessibility compared with Tween 80 (Couedelo et al., 2015) and caseins (Couedelo et al., 2015, Vors et al., 2012). The impact of the type of proteins used as emulsifiers on lipid digestion is unclear. Protein-stabilized emulsions favoured the adsorption of the digestive lipases and their hydrolytic activity compared with synthetic emulsifiers (Mun et al., 2007). In contrast, synthetic emulsifiers such as Tween 80 and sodium stearyl lactylate tended to increase the FA bioaccessibility compared with protein-stabilized emulsions (Couedelo et al., 2015, Nassra et al., 2018, White et al., 2009). Along with these studies, the use of synthetic emulsifiers has to be questioned. The exposure to some commonly used emulsifiers, such as Tween 80 and carboxymethylcellulose, is correlated to changes in the gastrointestinal tract structures and functionality leading to serious pathologies (Chassaing et al., 2015, Csaki, 2011, Schippa et Conte, 2014). It thus seems important to substitute these synthetic additives with natural ones to ensure the consumer health. In this regard, PL that are found in lecithins appear to be good candidates because of their natural character. However, since they confer poor emulsion stabilization, they are rarely used alone.

Oil bodies (OB) are natural spherical organelles of 0.5 to 2 μm that store the lipids necessary for the germination of plant seeds (Tzen, 2012, Tzen et al., 1993, Chen et al., 2014). The

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

interface of these structures is composed of a PL monolayer covered by proteins, among which oleosins represent 75-90% of the total proteins (Zhao et al., 2016, Jolivet et al., 2009). Oleosins from canola are small proteins (15 to 23 kDa) with three structural domains: an amphiphilic N-terminal domain and a hydrophilic C-terminal domain, both located at the surface of the OB (Jolivet et al., 2009, Maurer et al., 2013) and joined by a long hydrophobic segment (8 kDa) embedded in the lipid core (Nikiforidis et al., 2013). Several studies mimicking the OB supramolecular structure showed that the combination of both PL and OB protein (OBP) is decisive for the physicochemical stabilization of oil-in-water (O/W) emulsions (Deleu et al., 2010, Rayner, 2015, Wijesundera et al., 2013b). However, only few works dealt with OB and lipid bioavailability. Native OB extracted from whole grains and nuts showed a decreased *in vitro* digestibility (Gallier and Singh, 2012, Beisson et al., 2001, White et al., 2009) and *in vivo* lipid bioaccessibility (Gallier et al., 2017) notably because the PL/proteins coat slowed down lipid hydrolysis. When reconstituted OB were used, they increased cyclosporine A (Chen et al., 2005) and curcumin (Chang et al., 2013) bioaccessibility in blood rats. However, to our knowledge, no study investigated the FA bioaccessibility using reconstituted OB.

In this context, we intend to formulate OB only from canola oil and by-products (PL and OBP). We choose the PL composition of the lecithin on the basis of preferential interactions between anionic PL and OBP (Bourgeois et al., 2018). OB proteins were extracted from canola meal and showed that oleosin was the major protein (Bourgeois et al., 2018). Different PL:OBP ratios were assayed for the emulsion formulation. Emulsion stability was investigated notably in gastrointestinal like conditions. Overall, the objective of this study was to formulate 100% vegetable emulsions based on by-product ingredients for a better understanding of the emulsion behaviour and, especially, of emulsion interface composition on FA bioavailability in *in vivo* studies on rats.

Materials and Methods

Materials

The canola meal was kindly offered by Bungee Canada (Oakville, ON). Canola lecithin (Semilec) was kindly offered by Lasenor (Spain). Canola oil (Rustica) was supplied by a local shop (Pessac, France). The FA composition of the oil and of the lecithin was determined by gas chromatography (GC). Canola lecithin phospholipid profile was also characterized by ³¹P nuclear magnetic resonance as previously described by Cansell et al. (2017b). The canola oil

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat
and lecithin compositions are reported in Table 1. Porcine pancreatic extract and internal standards for GC, 1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (PC 15:0), 1,2,3-triheptadecanoyl-sn-glycerol (TG 17:0), were purchased from Sigma Aldrich (France). All the solvents were of analytical grade and purchased from Carlo Erba (Peypin, France) or from Sigma Aldrich (France).

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

Table 1: Phospholipid and fatty acid composition for canola lecithin and canola oil

	Canola lecithin	Canola oil
Phospholipid composition (%)		
Phosphatidylcholine	39	n/a
Phosphatidylethanolamine	27	n/a
Phosphatidylinositol	18	n/a
Phosphatidic acid	13	n/a
Other phospholipids	3	n/a
Fatty acid composition (%)		
16:0	8	4
18:0	2	2
18:1	49	65
18:2	31	19
18:3	5	7
20 : 4	< 1	< 1
Other FA	4	3

n/a : non applicable

Oil bodies protein extraction

OBP were extracted from canola meal according to the procedure described by Bourgeois et al. (2018). Briefly, the extraction was obtained by isoelectric point precipitation using a basic aqueous solution (pH 12). After centrifugation, the supernatant was collected, and the pH adjusted to 6.5. A second centrifugation allowed the recovery of a precipitate. The extract contained 87% of proteins as measured by Dumas method (AOAC 992.23) (Horwitz et Latimer, 2005). Oleosin was the major protein as observed by Laemmli SDS-PAGE gel (Bourgeois et al., 2018). Total polyphenol concentration was determined according to the method of Singleton et al. (1999) by using the Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Sigma Aldrich, France). The extinction was measured at 750 nm. Gallic acid (Sigma Aldrich, France) served as a standard for preparing the calibration curve. The polyphenol concentration in the protein extract was found equal to 17.7 meq GAE/g of OBP.

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

Emulsion formulation and characterization

Coarse O/W emulsions were prepared with a whip developed in the laboratory, motorized with a rotary device (IKA, Staufen, Germany). PL were dissolved beforehand in canola oil (4.2 % w/w) and the solution was gradually incorporated with a separating funnel in the aqueous phase (deionized water) containing or not OBP. The protein solution was adjusted at pH 5.5. Coarse emulsions were prepared with various PL:OBP ratios (1:0, 1:1 and 1:3). The emulsions were diluted with an aqueous phase to reach a final oil concentration of 20% w/w and the pH was readjusted at 5.5. Emulsions were stored at 4 °C until use. Emulsion preparation was repeated five times.

The quantification of proteins adsorbed at the interface was determined indirectly by means of a Bradford protein assay on the continuous phase of the emulsion (Bradford, 1976). After centrifugation (1000 g, 5 minutes), a volume of aqueous phase was collected, put in contact with the Bradford reactive (Bio-Rad, France) and read at 595 nm. Interfacial protein coverage was calculated using the OBP mass adsorbed, the surface-averaged diameter ($D_{[3,2]}$) determined using static light-scattering measurement, and the volume of oil in the emulsion.

Emulsion droplet morphology was characterized using an Olympus BX51 microscope equipped with a phase-contrast device (Zeiss, Germany) and a digital color camera (Leica, 2576 X 1932-pixel resolution). Volume-weighted averaged diameter ($D_{[4,3]}$) was determined by static light-scattering data transformation using a Mastersizer 2000 granulometer (Malvern Instruments S.A., USA). Physical characterization was performed at 4 °C for 28 days and at 60 °C for 7 days.

Lipid oxidation was assessed by the measurements of conjugated dienes produced in the early stages of the lipid oxidation process (Schaich, 2005). Lipid extraction from the different emulsions, stored at 60 °C, for 7 days, was performed using a solvent composed of hexane/isooctane (3/1 v/v) as described in (Berton et al., 2011). After mixing and centrifugation (2000 g for 5 minutes, Aventi J-301 Centrifuge, Beckman Coulter, USA), the supernatant was dried and stored à -18 °C until analysis. Conjugated diene concentration was deduced from optical density (OD) measurements at 233 nm, as described in (Dridi et al., 2016), using a Hitachi (U-2810) double beam spectrophotometer and a 1 cm thick quartz cell. Pre-weighted oil was dissolved in hexane to a final lipid concentration that ensured an absorbance measurement in the spectrophotometer linear range, so that OD was simply proportional to the conjugated diene concentration according to the Beer-Lambert's law. In order to take into

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

account the dilution factor imposed by the measuring conditions, the OD measured at 233 nm was normalized by the mass of lipids (mg) per unit volume of solution (mL) (Dridi et al., 2016).

The behaviour of the emulsions in conditions mimicking the gastrointestinal tract was assessed by placing the samples in acidic conditions (pH 1.5) using 5 M HCl solution from 0 to 3 h, at 37 °C in a thermostatic bath, under constant stirring. Then, the samples were neutralized by addition of 1 M NaOH solution to reach pH 7.5. After 30 minutes, the droplet diameter was measured and the emulsion was observed by optical microscopy. The protocol to follow lipid hydrolysis by pancreatic lipase was adapted from Couedelo et al. (2011) The enzymatic kinetics was monitored using a pH-stat (Titroline alpha Plus TA10 plus, SCHOTT Instrument, Germany). Experiments were performed at 37 °C in a thermostated bath. Experiments were conducted by mixing 10 mL of emulsion, 10 mL of distilled water and 2 mL of CaCl₂ solution (60 wt.%). The suspensions were adjusted to pH 8 automatically, using a 0.5 M NaOH solution. Then, 1 mL of pancreatic extract (1 mg/mL) was added to the reaction medium. Lipase activity was calculated from the initial slope of the titration curve and expressed as milliequivalents of FA released per min and per g of enzyme extract (mEq/min/g of enzyme). Enzyme concentrations were chosen to ensure substrate-saturating conditions. Lipase activities were determined at least on three different preparations for the three formulations (PL:OBP of 1:0, 1:1, and 1:3).

Animals and surgical procedures

In vivo experiments were performed by lipid intragastric injection into rats according to the protocol described in Couedelo et al. (2015). Male Wistar rats (8 weeks old, body weight 300-350 g) were obtained from Elevage JANVIER (Saint-Berthevin, France) and were randomly assigned to one of the dietary groups, i.e. canola oil in bulk phase or emulsified with PL:OBP ratios of 1:0 and 1:3. All experiments were carried out in compliance with the local ethics committee in Bordeaux, France (record no 2017031014448864). Rats were treated in accordance with the European Communities Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (2010/63/EU). All experiments conformed to the Guidelines for the Handling and Training of Laboratory Animals. Briefly, rats were housed for at least 3 days before the experiment in a controlled environment, with constant temperature and humidity with free water and food access. Rats were fed a fat-free diet (SAFE, Epinay, France) with free access to water 24 h before the surgery. Lymph collection was performed using a polyethylene catheter (i.d. 0.86 mm, o.d. 1.27 mm, Biotrol, Paris, France) inserted into the main mesenteric

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

lymph duct (Bollman et al., 1948). After surgery, rats were placed in individual restraining cages, in a warm environment with tap water freely available. A few hours later, 0.4 mL of canola oil, either as bulk oil or O/W emulsion, were administered through a gastric feeding tube, followed by 0.5ml of water. Lymph was collected at during the 24 h following the feeding.

Fatty acid analysis of lymph total lipids

The FA of total lipids in lymph were transmethylated according to the method of Lepage et Roy (1986). TG 17:0 was added as an internal standard for FA quantification. Fatty acid methyl esters were analyzed by GC on a BPX 70 capillary column (60-m long, 0.25- μ m film, 0.25-mm i.d., SGE, hydrogen as a carrier gas, the split ratio of 1:80). The GC system consisted of a gas chromatograph Focus GS (ThermoFinnigan, Courtaboeuf, France) equipped with a flame ionization detector maintained at 250 °C. The injector temperature was 250 °C. The column temperature was increased from 150 °C to 200 °C (1.3 °C/min), maintained at 200 °C for 20 minutes, increased from 200 °C to 235 °C (10 °C/min), and held at 235 °C for 20 minutes. Data handling was performed by Chromquest software (ThermoFinnigan, Courtaboeuf, France). FA methyl esters from Sigma Aldrich (France) of known composition were used as standards for column calibration. The variation in peak area between injections was less than 2%.

Statistical analysis

Unless otherwise stated, volume-weighted averaged diameter and conjugated diene measurements, and lipase activity experiments were performed in triplicate. Values are means \pm SD. *In vivo* experiments were performed on 6 rats for each formulation. Data are presented as means \pm SD. Data were analyzed by a one-way ANOVA and a Fisher's least significant difference test (LSD) with the version 9.0 of SAS software. Data are considered significantly different when $p < 0.05$.

Results

The quantification of protein in the aqueous phase indicated that, for the two PL:OBP ratios used, i.e. 1:1 or 1:3, 95-98% of the proteins were adsorbed at the oil/water interface. Emulsions were characterized in terms of droplet size distribution. The emulsification process parameters were adjusted in order to get mean diameter of the lipid droplets around 10 μ m, irrespectively the PL:OBP ratio (Table 2).

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

Table 2 : Droplet size of emulsions based on different PL:OBP ratios, just after preparation and stored in different conditions

Droplet mean diameter (D(4,3) in μm)	PL:OBP ¹		
	1:0	1:1	1:3
Just after preparation ²	11 \pm 2 ^a	10 \pm 1 ^a	12 \pm 3 ^a
After 28 days at 4 °C	12 \pm 2 ^a	13 \pm 3 ^a	14 \pm 2 ^a
After 7 days at 60 °C	11 \pm 1 ^a	13 \pm 1 ^a	12 \pm 2 ^a
Just after dilution at pH 1.5	13 \pm 1 ^a	12 \pm 2 ^a	12 \pm 2 ^a
After 3 h at pH 1.5 and 37 °C	14 \pm 2 ^a	35 \pm 10 ^b	11 \pm 2 ^a
After 30 min at pH 7.5 and 37 °C ³	14 \pm 3 ^a	34 \pm 10 ^b	12 \pm 1 ^a

¹PL:OBP ratio used for the emulsion formulations. Values are expressed as mean \pm SD, n=3 at least

²Emulsions were prepared at pH 5.5

³An acidification step of 3 h at pH 1.5 was applied previously to neutralization

Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different (P<0.05).

Optical microscopy observations confirmed these mean diameters (Fig. 1(a-c)) and pointed out a slight droplet flocculation for the higher protein content (PL:OBP ratio of 1:3). All emulsions showed no significant droplet coalescence nor oil release over a month of storage at 4 °C and over a week at 60 °C. However, for all emulsions, a creaming phenomenon was observed (Fig. 2). The creaming value, determined on the basis of the height of the aqueous phase, increased with increasing protein proportion (66 \pm 2, 39 \pm 2 and 28 \pm 3 %, for PL:OBP ratios of 1:0, 1:1 and 1:3, respectively). Because the creaming value is inversely proportional to the emulsion stability, adding OBP led to more stable emulsions. However, it was worth noting that the creaming was reversible after agitation.

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

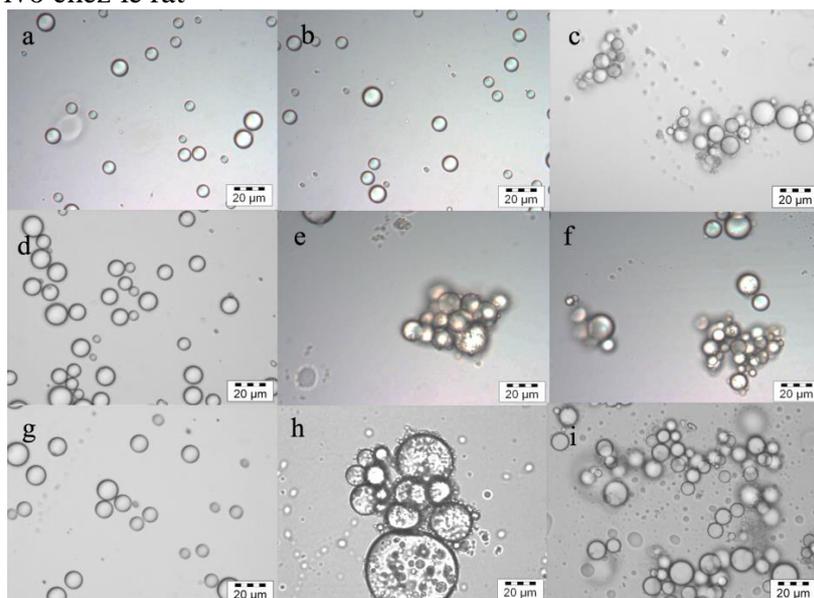


Figure 1: Microscopic observation of emulsions based on PL:OBP ratio of 1:0 (a, d, g), 1:1 (b, e, h) and 1:3 (c, f, i) just after preparation (a-c), just after acidification at pH 1.5 (d-f), and after 3 h storage at pH 1. (g-i).

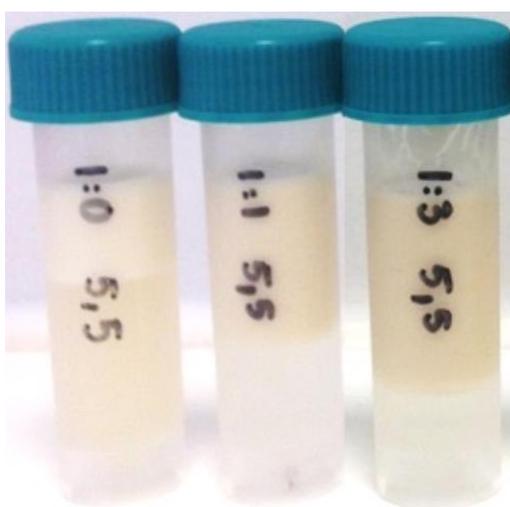


Figure 2 : Photo illustrating the creaming phenomenon observed for emulsions based on PL:OBP ratio of 1:0, 1:1 and 1:3 formulated at pH 5.5, after a 1 hour-storage, at 4 °C.

The emulsions were acidified (pH 1.5) and left up to 3 hours in acid conditions as to simulate the stomach conditions. For emulsions containing OBP (PL:OBP ratios of 1:1 and 1:3), droplets flocculated creating clusters while the emulsion only based on PL remained stable (Fig 1d-f). It is worth noting that coalescence only occurred in the emulsion with PL:OBP ratio of 1:1 leading to a significant increase in the droplet size (Table 2). In the physiological digestion process, food bolus can stay between 2 and 3 hours under acidic condition (stomach) before being neutralized (small intestine). In order to investigate this pH variation, emulsions stored under acidic medium (pH 1.5) up to 3 hours were then neutralized (pH 7.5). No size variation was observed upon neutralization (Table 2). During the whole process, no oil separation was observed.

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

Conjugated diene concentration allowed investigating the formation of hydroperoxides as primary products of oxidation. Indeed, a good correlation was evidenced between these two species (Schaich, 2005). The presence of OBP at the interface limited the oxidation compared with emulsions formulated only with PL (Fig. 3). Moreover, the greater the OBP concentration in the formulation, the slower the oxidation kinetics.

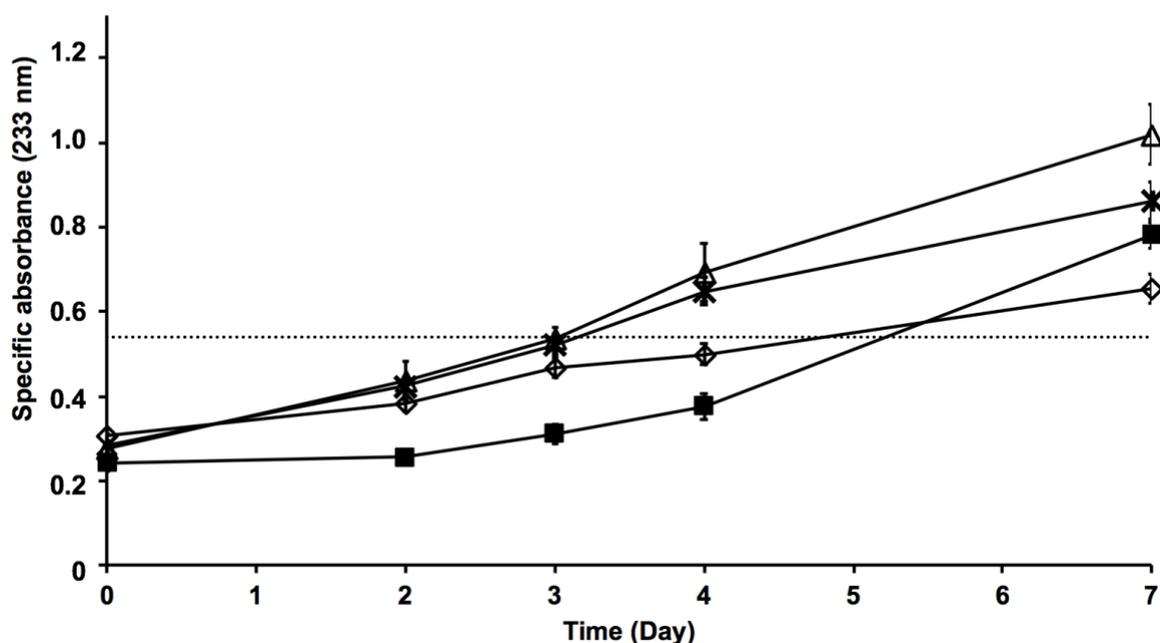


Figure 3 : Evolution of the specific absorbance of conjugated dienes (Optical density at 233nm normalized by the lipid concentration) of canola oil in bulk phase (■) and emulsified with a PL:OBP ratio of 1:0 (△), 1:1 (×), and 1:3(◇) and. The straight line represents the specific absorbance of conjugated dienes equivalent to a peroxide value of 15 milliequivalent O₂/kg of oil (maximum value recommended by the Codex Alimentarius to ensure the oil safety).

Table 3 presents the FA concentration and FA profile of total lipids recovered in lymph collected during 24 hours for rats fed canola oil in bulk phase or emulsified (PL:OBP ratios of 1:0 and 1:3). Emulsifying the oil with PL tended to increase the amount of total FA in lymph compared with bulk oil (Table 3). This tendency became significant when OBP was added to the emulsion formulation ($P < 0.05$) (Table 3). The fatty acid composition of chylomicron lipids of both rat groups mainly reflected the fatty acid profile of the dietary lipid source (Table 1). As expected, feeding rats with bulk canola oil or with an emulsified form increased the proportion of α -linolenic acid in the lymph compared with fasted rats (0.6 % (Couedelo et al., 2011)). A significant decrease in the proportion of endogenous fatty acids, palmitic acid (16:0) and arachidonic acid (20:4), was observed in the lymph, mainly due to a dilution of these fatty acids in TAG as a consequence of their low proportions in dietary lipids.

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

Table 3: Fatty acid composition of total lipids in lymph
PL:OBP¹

	PL:OBP ¹					
	Canola oil ²		1:0		1:3	
	g/100g of total fatty acid					
Σ SFA	32.6	± 6.5 ^b	25.5	± 2.9 ^a	28.9	± 3.4 ^{ab}
16:0	19.1	± 3.7 ^a	16.1	± 2.0 ^a	17.6	± 1.7 ^a
18:0	10.0	± 2.0 ^b	7.3	± 0.8 ^a	8.9	± 1.5 ^{ab}
Σ MUFA	27.5	± 8.5 ^a	33.2	± 9.5 ^a	30.5	± 4.7 ^a
18:1 n-9	22.0	± 9.2 ^a	27.6	± 9.4 ^a	24.6	± 4.8 ^a
Σ PUFA	39.8	± 3.0 ^a	41.3	± 7.9 ^a	40.5	± 1.7 ^a
Σ PUFA n-6	34.2	± 3.5 ^a	32.7	± 3.3 ^a	34.6	± 1.8 ^a
18:2 n-6	21.1	± 2.0 ^a	23.0	± 1.7 ^{ab}	23.7	± 1.7 ^b
20:4 n-6	12.5	± 3.4 ^b	8.8	± 2.7 ^a	9.9	± 2.5 ^{ab}
Σ PUFA n-3	5.6	± 1.0 ^a	5.8	± 0.4 ^a	5.7	± 0.8 ^a
18:3 n-3	3.4	± 1.7 ^a	4.3	± 0.5 ^a	4.0	± 1.1 ^a
20:5 n-3	0.3	± 0.1 ^a	0.2	± 0.1 ^a	0.2	± 0.1 ^a
22:5 n-3	0.4	± 0.2 ^a	0.2	± 0.1 ^a	0.3	± 0.2 ^a
22:6 n-3	1.6	± 0.4 ^b	1.1	± 0.2 ^a	1.2	± 0.3 ^{ab}
Total FA (mg/mL)	16.1	± 4.0 ^a	23.0	± 4.2 ^{ab}	28.7	± 5.9 ^b

¹PL :OBP ratio used for the emulsion formulation

²Canola oil in bulk phase

³Values are expressed as mean ± SD n=6

Statistical analysis did not find significant differences p>0.05, ANOVA followed by Fisher's least significant difference test.

Discussion

The main purpose of this study was to propose emulsions based on natural emulsifiers extracted from canola, i.e., PL and OBP, in view of subtracting synthetic emulsifiers and managing clean label emulsions. This study went through the determination of the most pertinent PL:OBP ratio to get stable emulsions, upon storage, from a physical and chemical point of view. This last point was all the more important than emulsions were based on canola oil, a plant oil rich in

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

PUFA sensitive to oxidation process. Besides these characterizations, the question of how this type of emulsions is digested is of great interest especially in view of increasing the bioavailability of FA with nutritional interest. That is the reason why *in vivo* experiments in rats were performed, the lymph analysis giving a good idea of the first step of the lipid metabolism process.

Previous studies showed that preferential interactions between OBP and anionic PL, on one hand, and OBP and unsaturated PL, on the other hand, could take place (Bourgeois et al., 2018). In order to reproduce these types of interactions in the reconstituted OB, a lecithin containing more than 30% of anionic PL was chosen (Table 1). Moreover, the lecithin originating from canola ensured more than 80% of unsaturated FA (Table 1). Emulsions were formulated with different PL:OBP ratios. Almost all proteins were present at the interface, so that the coverage surface by OBP was found equal to 0.033 and 0.120 g/m² for emulsion with PL:OBP of 1:1 and 1:3, respectively. These results were in agreement with that of Deleu et al. (2010). Taking into account the molecular area of oleosin would not exceed 3 nm² (Deleu et al., 2010), proteins would be organized as multilayers at the interface, although a drastic change in the protein conformation could not be excluded.

Irrespective of the formulation, emulsions with mean diameters around 10 µm could be obtained (Fig. 1). Flocculation was observed for the highest PL:OBP ratio (1:3) (Fig. 1c) in agreement with other studies showing that this phenomenon was more important than the increase amount of proteins (Deleu et al., 2010). At pH 5.5, PL should be negatively charged ensuring repulsive forces between the droplets that prevent aggregation (Wang et Wang, 2008, Moncelli et al., 1994) and proteins are under their isoelectric point (pI: 6.5) (Wijesundera et al., 2013b). Adding proteins in the formulation should modify the interface global charge, favouring attractive forces to take place. Upon storage, a creaming phenomenon was observed for all formulations (Fig. 2). Nevertheless, the droplet mean diameters did not significantly vary (Table 2) showing that the interface resisted to coalescence. As a result, no oil separation was observed after one month storage at 4 °C. The physical stability was also assessed at 60 °C to ensure that the droplet size did not vary in the conditions chosen to monitor the oxidation experiments (Table 2). Emulsification decreased canola oil oxidative stability as measured by conjugated dienes (Fig. 3) despite the antioxidant properties of PL (Bandarra et al., 1999, Judde et al., 2003). This may correspond to an increase of the interface in contact with the pro-oxidant species like oxygen (Berton-Carabin et al., 2014). However, adding OBP to the formulations

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

allowed delaying the oxidative process compared with the formulation only based on PL. Interestingly, for the higher PL:OBP ratio (1:3), the end point appeared to be less oxidized than canola oil in bulk phase. This may account for a sufficient amount of polyphenols present in the protein extract that would prevent oxidation (Shahidi et Ambigaipalan, 2015). Moreover, the structuration of oleosin at the interface in multilayers, likely acted as a physical barrier preventing the propagation reactions (Gray et al., 2010, Wijesundera et al., 2013b). This barrier could be more rigid when mixture of PL and OBP are used (Deleu et al., 2010, Nikiforidis et al., 2013).

Besides these results, the behaviour of the emulsions in *in vitro* gastrointestinal conditions was worth investigating before the *in vivo* study in rats. Indeed, this approach could help explaining differences in lipid bioavailability upon formulations. In contrast with the emulsion only based on PL, emulsions with OBP showed flocculation when exposed to acidic conditions (Fig. 1e, f). This could account for a change in OB conformation at the interface, weakening the intermolecular protein bonds and/or increasing the hydrophobic group exposure to solution (Li et al., 2016). In acid conditions, the formulation with PL:OBP of 1:1 exhibited droplet coalescence after 3 h storage (Table 2, Fig 1h). This suggested that this ratio was not adequate to maintain the emulsion physical stability upon acid conditions. Deleu et al. (2010) showed that depending on the PL:OBP ratio, the two types of molecules did not mix ideally, with synergic effects, based on electrostatic interactions between basic amino acid residues of oleosin and negative charges of PL. These interactions may be completely modified in acid conditions. However, as far as lipid digestion is concerned, it is worth noting that dispersed droplets remained after neutralization (Fig. 1i, j) (Table 2). We clearly demonstrated that emulsions formulated in presence of OBP favoured the pancreatic lipase activity. This was not the case for native OB showing a reduced lipase activity (Beisson et al., 2001, Gallier et Singh, 2012, Gallier et al., 2013, White et al., 2009). In this case, oleosins were assumed to limit TAG hydrolysis, acting as a shield on the PL monolayer (Tzen et Huang, 1992). However, other studies demonstrated that lipases can efficiently hydrolyze TAG without needing to hydrolyze the PL-OBP monolayer before (Beisson et al. 2001). This discrepancy could account for a different conformation of the OBP at the interface in native OB and reconstituted OB originated either from the extraction technics or from different interactions between OBP and PL. Although there is no experimental evidence of their ability to act as a receptor and activator of digestive lipase, the C-terminal segment of native oleosins presents 54% similarity to the human apolipoprotein-CII lipase binding site (Li et al., 1992, Tzen et Huang, 1992). Since the

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

latter acts as receiver and activator of the lipase responsible for the lipolysis at the chylomicrons interface, this structural similarity suggests that oleosins possess a similar role.

In the light of the obtained results, the emulsion with a PL:OBP ratio of 1:3 seemed a good candidate to favour FA bioavailability with its physical stability especially towards pH variations and promoting a high catalytic activity for the pancreatic lipase. Emulsification of canola oil increased total FA bioaccessibility in lymph. (Table 3). This was in agreement with previous studies showing increased intestinal FA absorption both in animal model (Couedelo et al., 2015, Couedelo et al., 2011) or in human (Garaiova et al., 2007, Couedelo et al., 2011) compared with bulk oil. Nevertheless, it is worth noting that, in the case of the PL-stabilized emulsion, in the same operating conditions, the total lipid lymphatic concentration was 32.5 mg/mL of lymph (Couedelo et al., 2011) while it was only 23 mg/mL of lymph in our study. This difference could result for the nature of the lecithin. To our knowledge, only few studies used native or reconstituted OB *in vivo*. Gallier et al. (2017) demonstrated that the administration of native almond OB was associated with a lower plasma triglyceride level in human than almond oil stabilized with milk protein. Regarding reconstituted OB, the use of recombinant caleosin increased by 50 % cyclosporine A bioavailability in rats compared with a PL-stabilized emulsion (Chen et al., 2005) The encapsulation of turmeric within reconstituted OB increased up to 50 times the bioavailability of this spice compared with an administration without encapsulation (Chang et al., 2013).

On the whole, we showed an emulsion formulated with a PL:OBP ratio of 1:3 led to a significant increase in the total FA bioaccessibility compared with oil in bulk form. This result could partly account for a physical stability of the emulsion droplets upon pH variation and an enhanced pancreatic lipase activity compared to PL-stabilized emulsion, as shown by *in vitro* experiments. In the sight of these results, reconstituted OB based on canola oil and canola by-products could represent an interesting clean label and eco-responsible food system promoting bioaccessibility of n-3 polyunsaturated fatty acids in the context of enriched food products.

Acknowledgments

The authors acknowledge the NSERC for their financial support. They also thank Laurence Fonseca and Ikram Chamek for their technical assistance.

References

- [1] S.J. Hur, E.A. Decker, D.J. McClements, Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion, *Food Chem* 114(1) (2009) 253-262.
- [2] D.J. McClements, Y. Li, Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components, *Adv Colloid Interface Sci* 159(2) (2010) 213-228.
- [3] M. Golding, T.J. Wooster, The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion, *Curr Opin Coll & Interf Sci* 15(1-2) (2010) 90-101.
- [4] M.C. Michalski, C. Genot, C. Gayet, C. Lopez, F. Fine, F. Joffre, J.L. Vendevre, J. Bouvier, J.M. Chardigny, K. Raynal-Ljutovac, Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism, *Prog Lipid Res* 52(4) (2013) 354-373.
- [5] L. Salvia-Trujillo, C. Qian, O. Martin-Belloso, D.J. McClements, Influence of particle size on lipid digestion and beta-carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions, *Food Chem* 141(2) (2013) 1472-1480.
- [6] L. Couedelo, C. Boue-Vaysse, L. Fonseca, E. Montesinos, S. Djoukitch, N. Combe, M. Cansell, Lymphatic absorption of alpha-linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion, *Br J Nutr* 105(7) (2011) 1026-1035.
- [7] M. Armand, B. Pasquier, M. André, P. Borel, M. Senft, J. Peyrot, J. Salducci, H. Portugal, V. Jaussan, D. Lairon, Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract, *Am J Clin Nutr* 70 (1999) 1096-1106.
- [8] K.W. Tan, L.J. Sun, K.K. Goh, C.J. Henry, Lipid droplet size and emulsification on postprandial glycemia, insulinemia and lipidemia, *Food Funct* 7(10) (2016) 4278-4284.
- [9] L. Couedelo, S. Amara, M. Lecomte, E. Meugnier, J. Monteil, L. Fonseca, G. Pineau, M. Cansell, F. Carriere, M.C. Michalski, C. Vaysse, Impact of various emulsifiers on ALA bioavailability and chylomicron synthesis through changes in gastrointestinal lipolysis, *Food Funct* 6(5) (2015) 1726-1735.
- [10] C. Vors, P. Capolino, C. Guerin, E. Meugnier, S. Pesenti, M.A. Chauvin, J. Monteil, N. Peretti, M. Cansell, F. Carriere, M.C. Michalski, Coupling in vitro gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions, *Food Funct* 3(5) (2012) 537-546.
- [11] S. Mun, E.A. Decker, D.J. McClements, Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase, *Food Res Int* 40(6) (2007) 770-781.
- [12] M. Nassra, C. Bourgeois, M. Subirade, P. Sauviant, C. Atgie, Oral administration of lipid oil-in-water emulsions performed with synthetic or protein-type emulsifiers differentially affects post-prandial triacylglycerolemia in rats, *J Physiol Biochem Diffusion en ligne avant l'impression* (2018).
- [13] D.A. White, I.D. Fisk, S. Makkhun, D.A. Gray, In vitro assessment of the bioaccessibility of tocopherol and fatty acids from sunflower oil bodies, *J Agri Food Chem* 57 (2009) 5720-5729.

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

- [14] B. Chassaing, O. Koren, J.K. Goodrich, A.C. Poole, S. Srinivasan, R.E. Ley, A.T. Gewirtz, Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome, *Nature* 519(7541) (2015) 92-96.
- [15] K.F. Csaki, Synthetic surfactant food additives can cause intestinal barrier dysfunction, *Med Hypotheses* 76(5) (2011) 676-681.
- [16] S. Schippa, M.P. Conte, Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health, *Nutrients* 6(12) (2014) 5786-5805.
- [17] J.T.C. Tzen, Integral proteins in plant oil bodies, *ISRN Botany 2012* (2012) 1-16.
- [18] J.T.C. Tzen, Y.-Z. Cao, P. Laurent, C. Ratnayake, A.H.C. Huang, Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species, *Plant Physiol.* 101 (1993) 267-276.
- [19] Y. Chen, L. Zhao, Y. Cao, X. Kong, Y. Hua, Oleosins (24 and 18 kDa) are hydrolyzed not only in extracted soybean oil bodies but also in soybean germination, *J Agric Food Chem* 62(4) (2014) 956-965.
- [20] L. Zhao, Y. Chen, Y. Chen, X. Kong, Y. Hua, Effects of pH on protein components of extracted oil bodies from diverse plant seeds and endogenous protease-induced oleosin hydrolysis, *Food Chem* 200 (2016) 125-133.
- [21] P. Jolivet, C. Boulard, A. Bellamy, C. Larre, M. Barre, H. Rogniaux, S. d'Andrea, T. Chardot, N. Nesi, Protein composition of oil bodies from mature *Brassica napus* seeds, *Proteomics* 9(12) (2009) 3268-3284.
- [22] S. Maurer, G. Waschatko, D. Schach, B.I. Zielbauer, J. Dahl, T. Weidner, M. Bonn, T.A. Vilgis, The role of intact oleosin for stabilization and function of oleosomes, *J Phys Chem B* 117(44) (2013) 13872-13883.
- [23] C.V. Nikiforidis, C. Ampatzidis, S. Lalou, E. Scholten, T.D. Karapantsios, V. Kiosseoglou, Purified oleosins at air-water interfaces, *Soft Matter* 9(4) (2013) 1354-1363.
- [24] M. Deleu, G. Vaca-Medina, J.F. Fabre, J. Roiz, R. Valentin, Z. Mouloungui, Interfacial properties of oleosins and phospholipids from rapeseed for the stability of oil bodies in aqueous medium, *Colloids Surf B Biointerfaces* 80(2) (2010) 125-132.
- [25] M. Rayner, Current status on novel ways for stabilizing food dispersions by oleosins, particles and microgels, *Curr Opin Food Sci* 3 (2015) 94-109.
- [26] C. Wijesundera, T. Boiteau, X. Xu, Z. Shen, P. Watkins, A. Logan, Stabilization of fish oil-in-water emulsions with oleosin extracted from canola meal, *J Food Sci* 78(9) (2013) C1340-1347.
- [27] S. Gallier, D. Acton, M. Garg, H. Singh, Natural and processed milk and oil body emulsions: Bioavailability, bioaccessibility and functionality, *Food Structure* 13 (2017) 13-23.
- [28] M.C.M. Chen, J.L. Wang, J.T. Tzen, Elevating bioavailability of cyclosporine A via encapsulation in artificial oil bodies stabilized by caleosin, *Biotechnol Prog* 21 (2005) 1297-1301.
- [29] M.T. Chang, T.R. Tsai, C.Y. Lee, Y.S. Wei, Y.J. Chen, C.R. Chen, J.T. Tzen, Elevating bioavailability of curcumin via encapsulation with a novel formulation of artificial oil bodies, *J Agric Food Chem* 61(40) (2013) 9666-9671.

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

- [30] C. Bourgeois, A. Gomma, T. Lefèvre, M. Cansell, M. Subirade, Interaction of oil bodies proteins with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy, *Int J Biol Macromol Submitted* (2018).
- [31] M. Cansell, T. Bardeau, E. Morvan, A. Grélard, C. Buré, P. Subra-Paternault, Phospholipid profiles of oleaginous pressed cakes using NMR and gas chromatography, *J Am Oil Chem Soc* 94(9) (2017) 1219-1223.
- [32] W. Horwitz, G.W. Latimer, Official methods of analysis of AOAC international 18th edition, Gaithersburg, Md. : AOAC International 2005.
- [33] V.L. Singleton, R. Orthofer, R. Lamuela-Raventos, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of flin-ciocalteu reagent, Packer, L. (Ed.), *Oxidants and Antioxidants, Part A* 299 (1999) 152-178.
- [34] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254.
- [35] K.M. Schaich, Lipid Oxidation: Theoretical Aspects. In Bailey's Industrial Oil and Fat Products, F. Shahidi, ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc (2005).
- [36] C. Berton, M.H. Ropers, M. Viau, C. Genot, Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation, *J Agric Food Chem* 59(9) (2011) 5052-5061.
- [37] W. Dridi, W. Essafi, M. Gargouri, F. Leal-Calderon, M. Cansell, Influence of formulation on the oxidative stability of water-in-oil emulsions, *Food Chem* 202 (2016) 205-211.
- [38] J.R. Bollman, J.C. Cain, J.H. Grindlay, Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine or thoracic duct of the rat, *J Lab Clin Med* 33(1349-1352) (1948).
- [39] G. Lepage, C.C. Roy, Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction, *J Lipid Res* 27 (1986) 114-120.
- [40] G. Wang, T. Wang, Oxidative stability of egg and soy lecithin as affected by transition metal ions and pH in emulsion, *J Agric Food Chem* 56 (2008) 11424-11431.
- [41] M.R. Moncelli, L. Becucci, R. Guidelli, The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes, *Biophys J* 66 (1994) 1969-1980.
- [42] N. Bandarra, R. Campos, I. Batista, M. Nunes, J. Empis, Antioxidant synergy of α -tocopherol and phospholipids, *J Am Oil Chem Soc* 76(8) (1999) 905-913.
- [43] A. Judde, P. Villeneuve, A. Rossignol-Castera, A. Le Guillou, Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols, *J Am Oil Chem Soc* 80 (2003) 1209-1215.
- [44] C.C. Berton-Carabin, M.-H. Ropers, C. Genot, Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: involvement of the interfacial layer, *Compr Rev Food Sci Food Saf* 13(5) (2014) 945-977.
- [45] F. Shahidi, P. Ambigaipalan, Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review, *J Func Foods* 18 (2015) 820-897.
- [46] D.A. Gray, G. Payne, D.J. McClements, E.A. Decker, M. Lad, Oxidative stability of *Echium plantagineum* seed oil bodies, *Eur J Lipid Sci Technol* 112(7) (2010) 741-749.
- [47] R. Li, Z. Wu, Y. Wang, L. Ding, Y. Wang, Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin, *Biotechnol Rep (Amst)* 9 (2016) 46-52.

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat

[48] F. Beisson, N. Féré, S. Bruley, R. Vouloury, R. Verger, V. Arondel, Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes, *Biochim Biophys Acta* 1531 (2001) 47-58.

[49] S. Gallier, H. Singh, Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion, *Food Funct* 3(5) (2012) 547-555.

[50] S. Gallier, H. Tate, H. Singh, In vitro gastric and intestinal digestion of a walnut oil body dispersion, *J Agric Food Chem* 61(2) (2013) 410-417.

[51] J.T. Tzen, A.H.C. Huang, Surface structure and properties of plant seed oil bodies, *J Cell Biol* 117(2) (1992) 327-335.

[52] M. Li, L.J. Smith, D.C. Clark, R. Wilson, D.J. Murphy, Secondary structures of a new class of lipid body proteins from oilseeds, *J Cell Biol* 267(12) (1992) 8245-8253.

[53] I. Garaiova, I.A. Guschina, S.F. Plummer, J. Tang, D. Wang, N.T. Plummer, A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification, *Nutr J* 6 (2007) 1-9.

3. Principaux résultats

Plusieurs auteurs suggèrent que les OBP, notamment les oléosines, ne se limiteraient pas à contribuer à la stabilisation des OB. Elles pourraient également accélérer la mobilisation des TAG par les lipases durant la germination en agissant potentiellement comme récepteur et/ou activateur de la lipase (Murphy et al., 1991, Vance et Huang, 1987). Cette hypothèse provient du fait que le segment C-terminal de l'oléosine présente des similarités avec l'apolipoprotéine-CII humaine (§ I-3.2) (Li et al., 1992, Murphy et al., 1991). Cependant, aucune étude ne démontre ce potentiel de régulation de la lipolyse par la liaison et l'activation des lipases (D'Andrea, 2016). D'ailleurs, les résultats de la digestion *in vitro* d'OB natifs montrent une diminution de l'efficacité des lipases gastrique et pancréatique sur des OB natifs extraits des amandes (Gallier et Singh, 2012, Beisson et al., 2001), des noix (Gallier et al., 2013) et des graines de tournesol (White et al., 2009). Par ailleurs, White et al. (2009) ont démontré que l'usage d'OB réduit la fraction bioaccessible du tocophérol et des AGL (0,6 et 8,4% respectivement) par rapport aux émulsions stabilisées par du polysorbate 20 (35 et 52%, respectivement) ou par un isolat de protéines du lactosérum (17 et 33%, respectivement). Cependant, une étude portant sur l'encapsulation de composés lipophiles dans des corps lipidiques reconstitués à base de tournesol a démontré qu'il s'agit d'un système plus efficace pour le relargage de saveurs qu'une émulsion stabilisée par la lécithine seule, suggérant que la couche protéique agirait comme réservoir des saveurs et arômes (Fisk et al., 2011). Dans une étude *in vivo* chez l'Homme, la consommation d'une émulsion stabilisée avec des protéines laitières a conduit à une augmentation plus importante des TAG plasmatique une heure après la prise alimentaire que la consommation d'OB natifs d'amande (Gallier et al., 2017). Néanmoins, après 6 heures, les concentrations de TAG plasmatiques étaient similaires pour les deux systèmes (Gallier et al., 2017). En ce qui concerne les OB reconstitués, une étude a démontré que l'utilisation de caléosine recombinante augmente de 50% la biodisponibilité de la cyclosporine A chez le rat par rapport à une émulsion stabilisée par des PL (Chen et al., 2005). Toujours chez ce modèle animal, l'encapsulation de curcuma au sein d'OB reconstitués augmente jusqu'à 50 fois la biodisponibilité de cette épice par rapport à une administration sans encapsulation (Chang et al., 2013).

Contrairement à l'émulsion stabilisée par des PL uniquement, les émulsions comportant des OBP (1:1 et 1:3) présentent un phénomène de floculation en condition acide (Figure 34). Les protéines sont connues pour changer de conformation aux interfaces selon le pH de la solution

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat et leur pI : un environnement acide affaiblit les liaisons intermoléculaires entre les protéines, augmente l'exposition des groupes hydrophobes vers la phase aqueuse et privilégie l'agrégation (Li et al., 2016). Seule l'émulsion avec un rapport PL : OBP de 1 : 1 montre des signes de coalescence (Figure 34e) avec un diamètre moyen des gouttes qui passe de 10 à 35 μm . Les interactions PL : OBP décrites précédemment (§ III-3.2 et § IV-2.2) dépendent des charges exposées par ces deux types de molécules (Li et al., 2016, Moncelli et al., 1994). A pH 1,5, on se situe non seulement en dessous du pI des OBP mais également en dessous du pKa de la fonction phosphoryle, de sorte que la charge des PL doit être modifiée. La coalescence observée pour l'émulsion avec un rapport PL : OBP de 1 : 1 suggère que les interactions entre PL et protéines sont plus faibles à pH acide favorisant une rupture de l'interface. Ce phénomène n'est pas observé lorsque la proportion de protéines est nulle (PL : OBP de 1 : 0) ou augmentée (PL : OBP de 1 : 3). Conformément à la simulation du processus de digestion physiologique, les émulsions ont été ensuite neutralisées. Pour toutes les formulations, la floculation est réversible, ce qui confirme l'impact des charges sur l'arrangement spatial des molécules à l'interface.

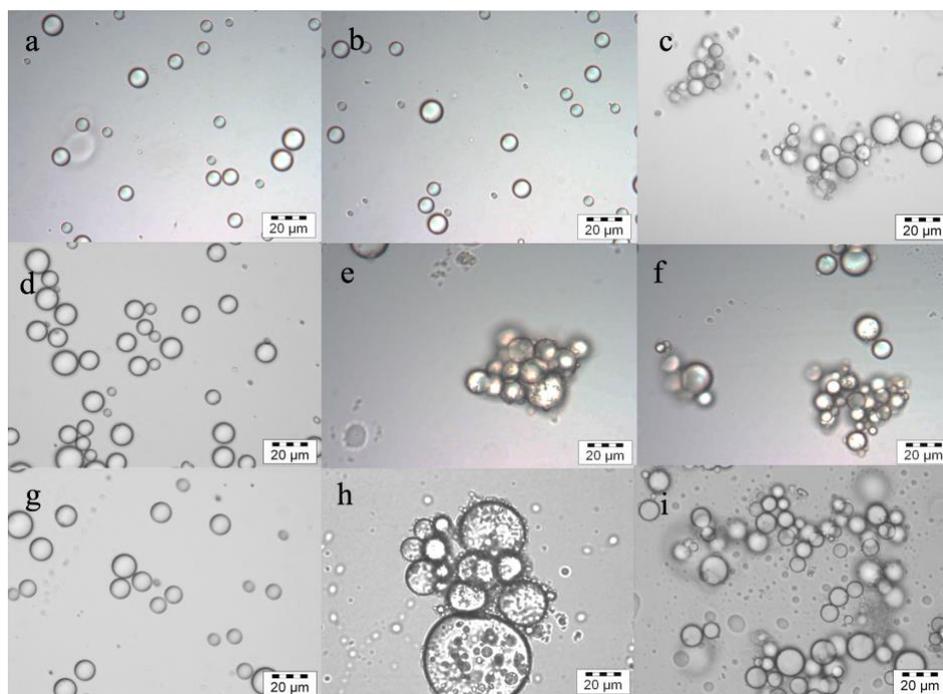


Figure 34 : Observations microscopiques des émulsions avec des rapport PL : OBP 1 : 0 (a, d, g), 1 : 1 (b, e, h) et 1 : 3(c, f, i) immédiatement après préparation (a-c), immédiatement après l'acidification à pH 1,5 (d-f) et après 3h à pH 1,5 (g-i)

Le comportement catalytique de la lipase pancréatique sur les émulsions avec un rapport PL : OBP de 1 : 0, 1 : 1 et 1 : 3 montre que l'activité de l'enzyme est favorisée par la proportion croissante de protéines (Figure 35).

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

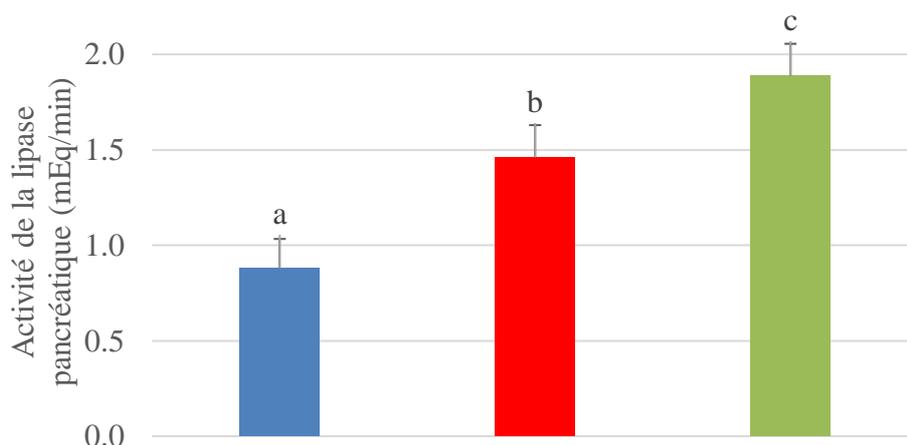


Figure 35 : Activité de la lipase pancréatique pour les émulsions avec un rapport PL : OBP de 1 : 0 (■), 1 : 1 (■) et 1 : 3 (■) en conditions *in vitro* à 37°C.

Ces résultats s'opposent à ceux obtenus pour les OB natifs (Beisson et al., 2001, Gallier et Singh, 2012, Gallier et al., 2013, White et al., 2009) pour lesquels les auteurs ont proposé que les OBP agissent comme bouclier et limitent l'hydrolyse des TAG (Tzen et Huang, 1992). Cette discordance pourrait provenir d'une différence de conformation des protéines à l'interface liée à un taux de recouvrement significativement différent (0,004 à 0,007 g de protéine/m² dans OB natifs (Tzen et Huang, 1992, Ishii et al., 2017) et 0,033 à 0,120 g de protéine/m² pour nos émulsions). Ainsi, un compactage des protéines à l'interface pourrait forcer le segment C-terminal des oléosines à s'exposer dans la phase aqueuse, à agir comme un récepteur et un activateur de la lipase (Murphy et al., 1991, Vance et Huang, 1987, Li et al., 1992), et par conséquent, à favoriser l'activité catalytique de l'enzyme. Par ailleurs, le suc pancréatique utilisé dans cette étude contient également de la phospholipase A2. L'accumulation de produits d'hydrolyse issus de l'activité de cette enzyme sur les PL pourrait favoriser l'adsorption de la lipase (Beisson et al., 2001) et/ou la formation de défauts à l'interface permettant une meilleure accessibilité des TAG (Beisson et al., 2001).

L'analyse des AG des lipides totaux la lymphe de rat montre clairement que la sécrétion des lipides a tendance à être plus élevée pour la formulation émulsionnée avec la lécithine de colza que pour l'huile en phase continue ($p = 0,08$) (Figure 36). Cette tendance devient significative pour l'émulsion à base de PL et d'OBP ($p < 0,05$).

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

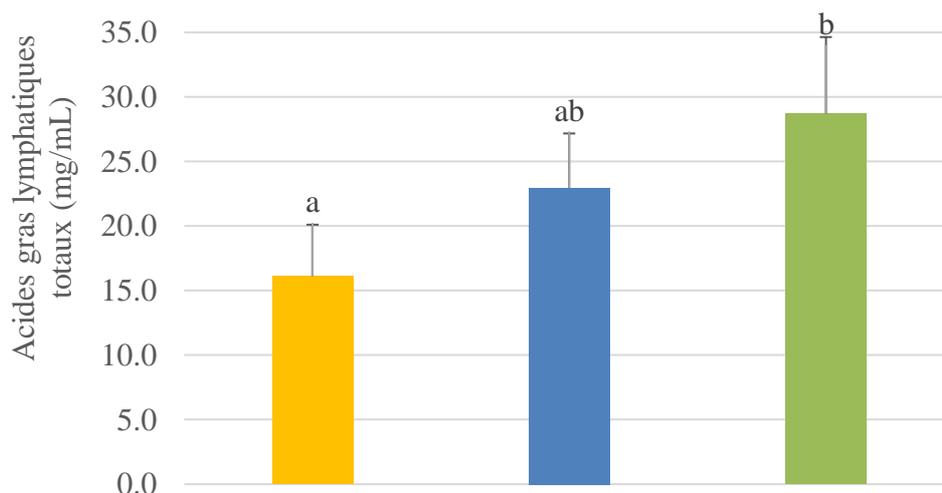


Figure 36 : Quantification des acides gras lymphatiques totaux pour l'huile en phase continue (■), les émulsions avec des rapports PL : OBP 1 : 0 (■) et 1 : 3 (■)

D'une part, les résultats obtenus chez le rat sont soutenus par les résultats de digestion *in vitro*, indiquant une activité catalytique de la lipase favorisée en présence d'OBP. D'autre part, nos résultats sont en accord avec des études précédentes qui montrent que l'absorption intestinale des AG émulsifiés est accrue chez le modèle animal (Couedelo et al., 2015, Couedelo et al., 2011) ou chez l'Homme (Garaiova et al., 2007, Couedelo et al., 2011) comparée à une administration en phase continue. Néanmoins, il est intéressant de noter que, dans le cas d'une émulsion stabilisée par une lécithine et dans les mêmes conditions opératoires, la concentration lymphatique en lipides totaux est de 32,5 mg/mL de lymph (Couedelo et al., 2011) alors qu'elle n'est que de 23 mg/mL de lymph dans notre étude. Cette différence pourrait provenir de la nature de la lécithine utilisée, i.e. lécithine de soja très riche en lysophospholipides (Couedelo et al., 2011). Des études *in vivo* ont montré l'avantage d'émulsions formulées avec des PL comparé à celles stabilisées avec des sels biliaires comme le taurocholate de sodium (Nishimukai et al., 2003), des molécules synthétiques comme Tween 80 ou même des émulsifiants naturels de sources animales comme la caséine (Couedelo et al., 2015). Cependant, à notre connaissance, peu d'études ont évalué l'impact des OB sur la bioaccessibilité des lipides et les résultats sont contradictoires. Pour les uns, les OB natifs diminueraient la bioaccessibilité des AG (Gallier et al., 2017). Pour d'autres, les OB reconstitués à base de caléosine augmenteraient la biodisponibilité de composés liposolubles (Chen et al., 2005, Chang et al., 2013).

En comparant la répartition des AG dans la lymph de rat à jeun et après intubation des formules lipidiques (Tableau 19), on note : 1) une diminution de la proportion des AGS et un enrichissement en ALA (18:3 n-3) cohérent avec la composition en AG de l'huile de colza

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides in vivo chez le rat (Tableau 20) ; 2) la présence d'AG d'origine endogène plus ou moins dilués comme l'acide arachidonique (20:4 n-6) et le DHA (22:6 n-3). Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature montrant que la composition en AG de la lymphe reflète celle des lipides alimentaires (Couedelo et al., 2011). Ainsi, la consommation d'huile de colza riche en AG insaturés enrichit la proportion de ces AG chez le rat (Porsgaard et Høy, 1998, Tatematsu et al., 2004) et chez l'Homme (Nielsen et al., 2002).

Tableau 19 : Composition en acides gras totaux dans la lymphe

	Formulations			
	Huile de colza ¹	PL : OBP 1:0	PL : OBP 1:3	À jeun
g/100g d'acides gras totaux				
Σ AGS	32,6 ± 6,5	25,5 ± 2,9	28,9 ± 3,4	35,4 ± 1,2
16:0	19,1 ± 3,7	16,1 ± 2,0	17,6 ± 1,7	22,1 ± 2,9
18:0	10,0 ± 2,0	7,3 ± 0,8	8,9 ± 1,5	10,3 ± 1,8
Σ AGMI	27,5 ± 8,5	33,2 ± 9,5	30,5 ± 4,7	27,2 ± 3,8
18:1 n-9	22,0 ± 9,2	27,6 ± 9,4	24,6 ± 4,8	14,4 ± 1,9
Σ AGPI	39,8 ± 3,0	41,3 ± 7,9	40,5 ± 1,7	37,3 ± 4,5
Σ AGPI n-6	34,2 ± 3,5	32,7 ± 3,3	34,6 ± 1,8	32,7 ± 4,3
18:2 n-6	21,1 ± 2,0	23,0 ± 1,7	23,7 ± 1,7	17,8 ± 2,5
20:4 n-6	12,5 ± 3,4	8,8 ± 2,7	9,9 ± 2,5	13,0 ± 2,6
Σ AGPI n-3	5,6 ± 1,0	5,8 ± 0,4	5,7 ± 0,8	4,3 ± 0,6
18:3 n-3	3,4 ± 1,7	4,3 ± 0,5	4,0 ± 1,1	0,7 ± 0,2
20:5 n-3	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1
22:5 n-3	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,4
22:6 n-3	1,6 ± 0,4	1,1 ± 0,2	1,2 ± 0,3	2,3 ± 0,4
AG totaux (mg/mL)	16,1 ± 4,0	23,0 ± 4,2	28,7 ± 5,9	8,5 ± 0,6

¹Huile de colza phase continue

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart-type ; n=6 rats

AGS : Acides gras saturés, AGMI : Acides gras monoinsaturés, AGPI: Acides gras polyinsaturés

CHAPITRE V : Influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des lipides *in vivo* chez le rat

Tableau 20 : Composition en phospholipides et en acides gras de la lécithine de colza et l'huile de colza

	Lécithine de colza	Huile de colza
Composition en phospholipide (%)		
Phosphatidylcholine	39	n/a
Phosphatidyléthanolamine	27	n/a
Phosphatidylinositol	18	n/a
Acide phosphatidique	13	n/a
Autres phospholipides	3	n/a
Composition en acides gras (%)		
16:0	8	4
18:0	2	2
18:1	49	65
18:2	31	19
18:3	5	7
20 : 4	< 1	< 1
Autres acides gras	4	3

n/a : non applicable

4. Conclusion

Les résultats de biodisponibilité de l'huile de colza vectorisée par des émulsions à base de PL avec et sans OBP montrent que l'émulsification, d'une part, et la présence de protéines de colza, d'autre part, améliorent significativement l'absorption des lipides chez le rat. Ces résultats peuvent être interprétés par le comportement des émulsions *in vitro*. En effet, les émulsions stabilisées par des rapports PL : OBP de 1 : 0 et 1 : 3 restent physiquement stables aux variations de pH. Le maintien d'une interface lorsque les émulsions arrivent au niveau intestinal favoriserait l'action catalytique de la lipase pancréatique par rapport à l'huile non préalablement émulsionnée. Par ailleurs, l'activité plus importante de la lipase pancréatique mesurée *in vitro* en présence d'OBP est en accord avec une bioaccessibilité lymphatique des AG totaux accrue pour l'émulsion avec un rapport PL : OBP de 1 : 3 suggérant le rôle de ces protéines dans la réception et l'activation des lipases digestives (Li et al., 1992, Murphy et al., 1991).

Conclusion

Les études épidémiologiques récentes montrent une consommation insuffisante d'AGPI dans les pays occidentaux. En outre, la sensibilité des AGPI à l'oxydation est l'une des premières causes de détérioration des qualités organoleptique et nutritionnelle dans les produits alimentaires. Parallèlement, les lipides présents dans les produits alimentaires se trouvent le plus souvent sous forme émulsionnée stabilisés par des TA synthétiques ou naturels (Logan et al., 2013). Ainsi, les entreprises désirant formuler des produits alimentaires enrichis en AGPI adoptent des stratégies technologiques pour les stabiliser chimiquement et physiquement, tout en assurant leur biodisponibilité. Cependant, des études récentes ont démontré des corrélations positives entre l'exposition à certains TA de synthèse utilisés dans l'industrie agroalimentaire et le développement de plusieurs pathologies. Il apparaît donc important de trouver des substituts à ces additifs synthétiques afin d'assurer la santé des consommateurs. C'est dans ce contexte que nous avons décidé de mimer la structure des OB, structures végétales naturelles de stockage des lipides des plantes oléagineuses, en extrayant les OBP qui les composent et en utilisant une lécithine végétale. Nous avons focalisé nos travaux sur les OBP de tourteau de colza afin de valoriser ce coproduit actuellement destiné uniquement à l'alimentation animale. L'extraction par point isoélectrique nous a permis d'obtenir un concentrât protéique contenant 87,4 % de protéines, dont la protéine principale est l'oléosine de 17-19kDa.

L'objectif de cette thèse était donc de maîtriser la formulation d'émulsions préparées uniquement à base de colza (huile, PL et OBP) par une meilleure connaissance des interactions PL : OBP, d'étudier la stabilité des émulsions d'un point de vue physicochimique en conditions de stockage et dans des conditions mimant les conditions gastro-intestinales et, enfin, d'évaluer l'influence de la composition de l'interface des émulsions sur la bioaccessibilité des acides gras insaturés *in vivo* chez le rat.

Pour atteindre cet objectif, nous avons abordé les problématiques suivantes :

Quelle est la nature des interactions entre les OBP et les PL ?

La présence d'interactions colloïdales mixtes à l'interface favorise la création d'émulsions stables. Bien que plusieurs auteurs aient proposé que la présence d'interactions PL : OBP à l'interface des OB soient à l'origine de la stabilité des OB (Deleu et al., 2010, Nikiforidis et al., 2013, Chen et Tzen, 2001, Tzen et Huang, 1992), peu de données sur ces interactions étaient disponibles à ce jour. La caractérisation des interactions entre les PL et les OBP au niveau moléculaire par spectroscopie infrarouge a montré que les OBP extraites du tourteau de colza

Conclusion

sont capables d'interagir avec des PL purs organisés en phase lamellaire. De cette étude, il se dégage que la conformation des OBP dépend du pH de la solution aqueuse ; un pH légèrement acide favorisant légèrement les interactions protéines-protéines et ce, indépendamment de l'environnement chimique. La nature des PL influence également les interactions PL : OBP. Les PL anioniques interagissent préférentiellement avec les OBP empêchant leur dénaturation thermique. Ce comportement et l'absence de perturbations dans la bicouche de PL anioniques suggèrent la mise en place d'interactions électrostatiques attractives entre la tête polaire des PL anioniques et les protéines se situant principalement à l'interface. De plus, la nature des chaînes hydrophobes des PL influence l'organisation des OBP. D'une part, l'augmentation de la longueur d'une chaîne acyle saturée promeut une conformation protéique plus stable, ce qui témoigne d'interactions plus fortes entre les PL et les OBP. D'autre part, la présence d'insaturation au niveau de la chaîne acyle favorise l'adoption d'hélices α , suggérant que l'insertion d'OBP au sein de PL insaturés favoriserait l'adoption d'une conformation similaire à celle des protéines transmembranaires (White, 2009). Les résultats de cette étude menée avec des PL modèles ont orienté le choix de la lécithine utilisée pour la formulation des émulsions. Nous avons donc sélectionné une lécithine de colza contenant une forte proportion de PL anioniques, sachant que l'origine végétale nous assurait la présence d'AG insaturés.

Comment la composition de l'interface influence-t-elle la mise en œuvre des émulsions huile dans eau et la stabilité physicochimique des émulsions ?

Sur la base d'émulsions de taille initiale contrôlée, nous avons montré que le rapport PL :OBP et donc la composition interfaciale influencent la réalisation et la stabilité physicochimique des émulsions à base de coproduits issus du colza. Le choix d'une lécithine riche en PL anioniques et la préparation des émulsions à deux pH positionnés de part et d'autre du pH isoélectrique des oléosines nous a permis de moduler la composition de l'interface : un environnement aqueux légèrement acide menant à une adsorption quasi-totale des OBP à l'interface suggérant la mise en place d'interactions électrostatiques entre les PL anioniques et les OBP chargées positivement. Les calculs de la quantité d'OBP adsorbées suggèrent la création d'une interface protéique multicouche et/ou une conformation des protéines différente qui différencieraient la structure des OB reconstitués de celle des OB natifs. Toutes les émulsions présentent un crémage marqué, mais réversible par agitation. Malgré cette déstabilisation, le fait que la coalescence des gouttes soit limitée permet de dire que la stabilité physique des émulsions est acceptable. Par ailleurs, la synergie PL : OBP à l'interface semble être un facteur décisif pour ralentir l'oxydation de l'huile de colza émulsifiée. Cette propriété pourrait résulter de l'effet

couplé des propriétés antioxydantes des PL et des OBP et de l'organisation des protéines à l'interface (conformation et/ou structure en multicouche pour des taux élevés de protéines), sans compter la présence de polyphénols dans le concentrât protéique utilisé.

La composition de l'interface influence-t-elle la digestibilité et la bioaccessibilité des AGPI de l'huile de colza en émulsion?

Pour l'étude *in vivo*, nous avons choisi la formulation assurant la plus grande proportion de protéines aux interfaces. Les études *in vitro* montrent que l'interface des émulsions est conservée lors des variations de pH mimant celles du milieu gastro-intestinal et que la présence d'OBP stimule l'activité de la lipase pancréatique. Ainsi, la conformation des OBP à l'interface pourrait forcer le segment C-terminal des oléosines à s'exposer dans la phase aqueuse, à agir comme un récepteur et un activateur de la lipase. Ces deux éléments peuvent expliquer l'augmentation de la bioaccessibilité lymphatique des AG totaux et donc des AG insaturés avec l'émulsion formulée en présence d'OBP, par rapport à l'huile non émulsionnée, d'une part, et l'émulsion formulée uniquement avec des PL, d'autre part.

Au vu de ces résultats, l'usage de PL et d'OBP pour la stabilisation d'émulsions apparaît comme un système d'additifs alimentaires intéressant. En effet, il favorise la bioaccessibilité des AG et améliore la protection de l'huile encapsulée contre l'oxydation. De plus, il respecte les attentes du clean label et entre dans les politiques de développement durable en valorisant un coproduit (tourteau) dans l'alimentation humaine. Ce système d'émulsifiants naturels à base de PL et de protéines végétales pourra contribuer, à terme, au développement de nouveaux aliments fonctionnels à base d'huiles insaturées dans le cadre de la prévention de maladies associées à de faibles apports en AGPI n-3 et ainsi répondre à une attente clairement exprimée par les consommateurs d'intégrer le concept santé à leur alimentation. Ces systèmes d'additifs pourraient également être utilisés dans le cadre de la formulation d'aliments spécialisés pour les gens avec des maladies comme l'insuffisance pancréatique qui limitent la digestion et l'absorption des lipides.

Néanmoins, afin de maîtriser toutes les fonctionnalités de ce type d'émulsion et avant de pouvoir les intégrer dans des produits alimentaires, un certain nombre de questions restent à élucider. D'un point de vue fondamental, la caractérisation des interactions entre les OBP et les PL peut être complétée par une étude en émulsion par titrage calorimétrique isotherme. Une telle étude permettrait de quantifier les affinités de liaison entre PL et OBP et de mieux comprendre la nature des interactions qui existent aux interfaces colloïdales des OB et ainsi les

Conclusion

forces qui agissent dans la stabilisation physicochimique de ces systèmes d'encapsulation d'huile. La structure de l'interface créée dans les systèmes reconstitués pourrait être analysée par microscopie à force atomique. Cette caractérisation du film interfacial à une échelle moléculaire pourrait permettre de distinguer les deux hypothèses avancées dans ce travail pour les protéines à forte concentration, i.e. organisation en multicouche ou changement de conformation. D'un point de vue plus appliqué, il serait aussi intéressant d'évaluer l'impact de la composition en PL (plus grande proportion de PL chargés, présence de lysophospholipides) sur les interactions PL : OBP et, par conséquent, sur la stabilité physique et chimique des émulsions (notamment pour diminuer les phénomènes de crémage) et leur devenir métabolique *in vivo*, chez le rat et, finalement, chez l'homme. La maîtrise de ces éléments est importante en vue d'intégrer ces émulsions dans des produits alimentaires.

Bibliographie

- ACHOURI, A., NAIL, V. & BOYE, J. I. 2012. Sesame protein isolate: fractionation, secondary structure and functional properties. *Food Research Int*, 46, 360-369.
- ACIA 2017. Allégations et mentions volotaires - Exigences d'étiquetage pour les matières grasses et huiles. In: ALIMENTS, A. C. D. I. D. (ed.). <http://www.inspection.gc.ca/aliments/etiquetage/l-etiquetage-des-aliments-pour-l-industrie/matieres-grasses-et-huiles/fra/1392751693435/1392751782638?chap=5>: Gouvernement du Canada.
- AFSSA 2017. Évolution des habitudes et modes de consommation, de nouveaux enjeux en matière de sécurité sanitaire et de nutrition (INCA 3) In: SANTÉ, M. D. L. S. E. D. L. & L'ALIMENTATION, M. D. L. A. E. D. (eds.). Maison-Alfort: ANSES.
- ALEKSANDER, S., MALGORZATA, N. & ELENORA, L. 2008. The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold pressed plant oils. *J Food Lipid*, 15, 137-149.
- ALEXANDER, L., SESSIONS, R., CLARKE, A., TATHAM, A., SHEWRY, P. & NAPIER, J. 2002. Characterization and modelling of the hydrophobic domain of a sunflower oleosin. *Planta*, 214, 546-551.
- AMATE, L., GIL, A. & RAMIREZ, M. 2001. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids from different sources affect fat and fatty acid excretions in rats. *J Nutr*, 131, 3216-3221.
- ANANT, S. & DAVIDSON, N. O. 2001. Molecular mechanisms of apolipoprotein B mRNA editing. *Curr Opin Lipid*, 12, 159-165.
- ANSES 2013. Les lipides. consulté sur <https://www.anses.fr/fr/content/les-lipides> le 15 juin 2015.
- ANTON, M., LECHEVALIEUR, V. & NAU, F. 2013. Les émulsions et les mousses à base d'oeufs. *Emulsions alimentaire et foisonnement*, Lavoisier, 427-477.
- ARÊAS, J. A. G., GRÖBNER, G. J., PELLACANI, L. B., GLAUBITZ, C. & WATTS, A. 1997. Use of solid-state 2H NMR for studying protein-lipid interactions at emulsions interfaces. *Mag Res Chem*, 35, S119-S124.
- ARMAND, M. 1998. Physicochemical properties of lipid emulsions : effect on fat digestion and absorption. *Cahiers de Nutrition et Diététique*, 33, 305-311.
- ARMAND, M., PASQUIER, B., ANDRÉ, M., BOREL, P., SENFT, M., PEYROT, J., SALDUCCI, J., PORTUGAL, H., JAUSSAN, V. & LAIRON, D. 1999. Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *Am J Clin Nutr*, 70, 1096-1106.
- ARRONDO, J. L. R., MUGA, A., CASTRESANA, J. & GONI, F. M. 1993. Quantitative studies of the Structure of Proteins in solution by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Prog Biophys Molec Biol*, 59, 23-56.
- ARTERBURN, L. M., HALL, E. B. & OKEN, H. 2006. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr* 83, 1467S-1476S.
- BANDARRA, N., CAMPOS, R., BATISTA, I., NUNES, M. & EMPIS, J. 1999. Antioxidant synergy of α -tocopherol and phospholipids. *J Am Oil Chem Soc*, 76, 905-913.

Bibliographie

- BARDEAU, T. 2015. *Phospholipides bio-sourcés riches en acides gras oméga 3 pour la formulation de liposomes*. Doctorat, Université de Bordeaux.
- BEISSON, F., FERTÉ, N., BRULEY, S., VOULTOURY, R., VERGER, R. & ARONDEL, V. 2001. Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1531, 47-58.
- BELHAJ, N., ARAB-TEHRANY, E. & LINDER, M. 2010. Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochem*, 45, 187-195.
- BENJAWL, S., JAYARAMAN, S. & GURSKY, O. 2007. Role of secondary structure in protein-phospholipid surface interactions: reconstitution and denaturation of apolipoprotein C-I:DMPC complexes. *Biochem J*, 46, 4184-4194.
- BERGENSTAHL, B. 2008. Physicochemical Aspects of an Emulsifier Functionality. In: HASENHUETTL, G. L. & HARTEL, R. W. (eds.) *Food Emulsifiers and Their Applications*. Second Edition ed. New York: Springer.
- BERTON, C. 2011. *Construction raisonnée d'interface pour protéger les lipides émulsionnés contre l'oxydation*. Doctorate, Université de Nantes.
- BERTON, C., ROPERS, M. H., VIAU, M. & GENOT, C. 2011. Contribution of the interfacial layer to the protection of emulsified lipids against oxidation. *J Agric Food Chem*, 59, 5052-5061.
- BERTON-CARABIN, C. C., ROPERS, M.-H. & GENOT, C. 2014. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: involvement of the interfacial layer. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 13, 945-977.
- BETTINI, S., SANTINO, A., GIANCANE, G. & VALLI, L. 2014. Reconstituted oil bodies characterization at the air/water and at the air/oil/water interfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 122, 12-18.
- BOLLMAN, J. R., CAIN, J. C. & GRINDLAY, J. H. 1948. Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine or thoracic duct of the rat. *J Lab Clin Med*, 33.
- BOREL, P., ARMAND, M., YTHIER, P., DUTOT, G., MELIN, C., SENFT, M., LAFONT, H. & LAIRON, D. 1994. Hydrolysis of emulsions with different triglycerides and droplet sizes by gastric lipase in vitro. Effect on pancreatic lipase activity. *J Nutr Biochem*, 5, 124-133.
- BORG, K. 1975. Physiopathological effects of rapeseed oil: a review. *Acta Med Scand Suppl.*, 585, 5-13.
- BOURGEOIS, C., GOMMA, A., LEFÈVRE, T., CANSSELL, M. & SUBIRADE, M. 2018. Interaction of oil bodies proteins with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. *Int J Biol Macromol*, Submitted.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- BRITTEN, M. 2015. Propriétés interfaciales des macromolécules: Principes et applications. In: CANADA, A. E. A. (ed.) *Macromolécules alimentaires*. Université Laval.
- BROIL, K. & SCHOTT, J. 2014. Effect of surfactants on the surface tension. *Didactics of Chemistry*. Bayreuth University.

- CANOLACOUNCIL 2015. Canola meal feeding guide. *In: CANADA, C. C. O. (ed.)*. Winnipeg.
- CANOLACOUNCIL 2017. Health benefits of Canola oil. <http://www.canolacouncil.org/oil-and-meal/canola-oil/health-benefits-of-canola-oil/>: Page consulté le 8 mars 2018.
- CANSELL, M., BARDEAU, T., MORVAN, E., GRÉLARD, A., BURÉ, C. & SUBRA-PATERNAULT, P. 2017a. Phospholipid Profiles of Oleaginous Pressed Cakes Using NMR and Gas Chromatography. *J Am Oil Chem Soc*, 94, 1219-23.
- CANSELL, M., BARDEAU, T., MORVAN, E., GRÉLARD, A., BURÉ, C. & SUBRA-PATERNAULT, P. 2017b. Phospholipid profiles of oleaginous pressed cakes using NMR and gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc*, 94, 1219-1223.
- CANSELL, M., NACKA, F. & COMBE, N. 2003. Marine lipid-based liposome increase *in vivo* FA bioavailability. *Lipids*, 38, 551-559.
- CAPUANO, F., BEAUDOIN, F., NAPIER, J. A. & SHEWRY, P. R. 2007. Properties and exploitation of oleosins. *Biotechnol Adv*, 25, 203-206.
- CARO, A. L., NIÑO, M. R. R. & PATINO, J. M. R. 2009. The effect of pH on structural, topographical, and rheological characteristics of β -casein–DPPC mixed monolayers spread at the air–water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 332, 180-191.
- CARTER, K. A., WANG, S., GENG, J., LUO, D., SHAO, S. & LOVELL, J. F. 2015. Metal chelation modulates phototherapeutic properties of mitoxantrone-loaded porphyrin-phospholipid liposomes. *Mol Pharm*, 13, 420-427.
- CARTWRIGHT, I. J., PLONNÉ, D. & HIGGINS, J. A. 2000. Intracellular events in the assembly of chylomicrons in rabbit enterocytes. *J Lipid Res*, 41, 1728-1739.
- CAVALETTO, M., GIUFFRIDA, M. G. & CONTI, A. 2008. Milk fat globule membrane components—*q* proteomic approach. *Bioactive components of milk. Advances in experimental medicine and biology*, 606, 129-141.
- CHANG, M. T., TSAI, T. R., LEE, C. Y., WEI, Y. S., CHEN, Y. J., CHEN, C. R. & TZEN, J. T. 2013. Elevating bioavailability of curcumin via encapsulation with a novel formulation of artificial oil bodies. *J Agric Food Chem*, 61, 9666-9671.
- CHASSAING, B., KOREN, O., GOODRICH, J. K., POOLE, A. C., SRINIVASAN, S., LEY, R. E. & GEWIRTZ, A. T. 2015. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature*, 519, 92-96.
- CHEN, B., MCCLEMENTS, D. J., GRAY, D. A. & DECKER, E. A. 2012. Physical and oxidative stability of pre-emulsified oil bodies extracted from soybeans. *Food Chem*, 132, 1514-1520.
- CHEN, J. C. F., TSAI, C. C. Y. & TZEN, J. T. 1999. Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds. *Plant Cell Physiol*, 40, 1079-1086.
- CHEN, J. C. F. & TZEN, J. T. C. 2001. An *in vitro* system to examine the effective phospholipids and structural domain for protein targeting to seed oil bodies. *Plant Cell Physiol*, 42, 1245-1252.
- CHEN, M. C. M., CHYAN, C. L., LEE, T. T. T., HUANG, S. H. & TZEN, J. T. C. 2004. Constitution of stable artificial oil bodies with triacylglycerol, phospholipid and caleosin. *J Agric Food Chem*, 52, 3982-3987.

Bibliographie

- CHEN, M. C. M., WANG, J. L. & TZEN, J. T. 2005. Elevating bioavailability of cyclosporine A via encapsulation in artificial oil bodies stabilized by caleosin. *Biotechnol Prog*, 21, 1297-1301.
- CHEN, Y., ZHAO, L., CAO, Y., KONG, X. & HUA, Y. 2014. Oleosins (24 and 18 kDa) are hydrolyzed not only in extracted soybean oil bodies but also in soybean germination. *J Agric Food Chem*, 62, 956-965.
- CHUNG, C. & MCCLEMENTS, D. J. 2014. Structure–function relationships in food emulsions: Improving food quality and sensory perception. *Food struc*, 1, 106-126.
- CLARK, A. H., SAUNDERSON, D. H. P. & SUGGETT, A. 1981. Infrared and laser-raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gel. *Int J Peptide Protein Res*, 17, 353-364.
- COMAS, D. I., WAGNER, J. R. & TOMÁS, M. C. 2006. Creaming stability of oil in water (O/W) emulsions: influence of pH on soybean protein–lecithin interaction. *Food Hydrocolloids*, 20, 990-996.
- COUEDELO, L., AMARA, S., LECOMTE, M., MEUGNIER, E., MONTEIL, J., FONSECA, L., PINEAU, G., CANSELL, M., CARRIERE, F., MICHALSKI, M. C. & VAYSSE, C. 2015. Impact of various emulsifiers on ALA bioavailability and chylomicron synthesis through changes in gastrointestinal lipolysis. *Food Funct*, 6, 1726-1735.
- COUEDELO, L., BOUE-VAYSSE, C., FONSECA, L., MONTESINOS, E., DJOUKITCH, S., COMBE, N. & CANSELL, M. 2011. Lymphatic absorption of alpha-linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion. *Br J Nutr*, 105, 1026-1035.
- COUEDELO, L., VAYSSE, C., VAIQUE, E., GUY, A., GOSSE, I., DURAND, T., PINET, S., CANSELL, M. & COMBE, N. 2012. The fraction of alpha-linolenic acid present in the sn-2 position of structured triacylglycerols decreases in lymph chylomicrons and plasma triacylglycerols during the course of lipid absorption in rats. *J Nutr*, 142, 70-75.
- COURTHAUDON, J. L. & DICKINSON, E. 1991. Competitive adsorption of lecithin and beta-casein in oil in water emulsions. *J Agric Food Chem*, 39, 1365-1368.
- CSAKI, K. F. 2011. Synthetic surfactant food additives can cause intestinal barrier dysfunction. *Med Hypotheses*, 76, 676-681.
- CUI, L. & DECKER, E. A. 2016. Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants? *J Sci Food Agric*, 96, 18-31.
- D'ANDREA, S. 2016. Lipid droplet mobilization: the different ways to loosen the purse strings. *Biochem*, 120, 17-27.
- DAPČEVIĆ HADNAĐEV, T., DOKIĆ, P., KRSTONOŠIĆ, V. & HADNAĐEV, M. 2013. Influence of oil phase concentration on droplet size distribution and stability of oil-in-water emulsions. *Eur J Lipid Sci Tech*, 115, 313-321.
- DAUN, J. K., ESKIN, N. A. M. & HICKLING, D. 2011. Canola: chemistry, production, processing and utilization. 1-372.
- DAVIES, J. T. 1957. A quantitative kinetic theory of emulsion type. I. physical chemistry of the emulsifying agent. *Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interfaces*, Proceedings of 2nd International Congress Surface Activity, 426-438.
- DELEU, M., VACA-MEDINA, G., FABRE, J. F., ROIZ, J., VALENTIN, R. & MOULOUNGUI, Z. 2010. Interfacial properties of oleosins and phospholipids from

- rapeseed for the stability of oil bodies in aqueous medium. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 80, 125-132.
- DESNUELLE, P. 1961. Pancreatic liase. *Adv Enzy Rel Subj Biochem*, 23, 129-161.
- DICKINSON, E. 1992. An introduction to food colloids. *Oxford*, Oxford University Press, 1-216.
- DICKINSON, E. 2009. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23, 1473-1482.
- DICKINSON, E. 2011. Mixed biopolymers at interfaces: Competitive adsorption and multilayer structures. *Food Hydrocolloids*, 25, 1966-1983.
- DICKINSON, E. 2017. Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams. *Food Hydrocolloids*, 68, 219-231.
- DICKINSON, E. & GOLDING, M. 1997. Depletion flocculation of emulsions containing unadsorbed sodium caseinate. *Food Hydrocoll*, 11, 13-18.
- DICKINSON, E. & WOSKETT, C. M. 1989. Competitive adsorption between proteins and small-molecule surfactants in foods emulsions. *Food Colloids*, 74-96.
- DICKINSON, E. & YAMAMOTO, Y. 1996. Effect of lecithin on the viscoelastic properties of beta-lactoglobulin-stabilized emulsion gels. *Food Hydrocolloids*, 10, 301-307.
- DRIDI, W., ESSAFI, W., GARGOURI, M., LEAL-CALDERON, F. & CANSELL, M. 2016. Influence of formulation on the oxidative stability of water-in-oil emulsions. *Food Chem*, 202, 205-211.
- EFEMA 2015. EFEMA index of food emulsifiers. June 2015 edition, 158p.
- ELMADFA, I. & KORNSTEINER, M. 2009. Dietary fat intake--a global perspective. *Ann Nutr Metab*, 54 Suppl 1, 8-14.
- EMBLETON, J. & POUTON, C. W. 1997. Structure and function of gastro-intestinal lipases. *Adv Drug Del Rev*, 25, 15-32.
- EPAND, R. M., SEGREST, J. P. & ANANTHARAMAIAH, G. M. 1990. Thermodynamics of the binding of human apolipoprotein A-I to dimyristoylphosphatidylglycerol. *J Biol Chem*, 265, 20829-20832.
- ESTRADA, R., STOLOWICH, N. & YAPPERT, M. C. 2008. Influence of temperature on ³¹P NMR chemical shifts of phospholipids and their metabolites I. In chloroform-methanol-water. *Anal Biochem*, 380, 41-50.
- ETTELAIE, R., DICKINSON, E. & PUGNALONI, L. 2014. First-order phase transition during displacement of amphiphilic biomacromolecules from interfaces by surfactant molecules. *J Phys Condens Matter*, 26, 1-13.
- FAMEAU, A.-L., ARNOULD, A., HOUINSOUS HOUSSOU, B. & DOULIEZ, J.-P. 2013. Tensioactifs, mousses et émulsions. *Emulsions alimentaires et foisonnement*, Lavoisier, 99-166.
- FANG, Y. & DALGLEISH, D. G. 1993. Casein adsorption on the surfaces of oil-in-water emulsions modified by lecithin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1, 357-364.
- FEDERALREGISTER 2015. Title 21. Code of Federal Regulations (Parts 170-199). *U.S. Government Printing Office*, Washington.

Bibliographie

- FENWICK, G. R. & HEANEY, R. K. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in cruciferous crops, foods and feedingstuffs. *Food Chem*, 11, 249-271.
- FISK, I. D., LINFORTH, R. S. T., TAYLOR, A. J. & GRAY, D. A. 2011. Aroma encapsulation and aroma delivery by oil body suspensions derived from sunflower seeds (*Helianthus annuus*). *Eur Food Res Technol*, 232, 905-910.
- FISK, I. D., WHITE, D. A., LAD, M. & GRAY, D. A. 2008. Oxidative stability of sunflower oil bodies. *Eur J Lipid Sci Technol*, 110, 962-968.
- FLEDDERMANN, M., FECHNER, A., ROSSLER, A., BAHR, M., PASTOR, A., LIEBERT, F. & JAHREIS, G. 2013. Nutritional evaluation of rapeseed protein compared to soy protein for quality, plasma amino acids, and nitrogen balance--a randomized cross-over intervention study in humans. *Clin Nutr*, 32, 519-526.
- FOA & OMS 1999. Norme pour les huiles végétales portant un nom spécifique. *Normes alimentaires internationales*.
- FOOT, N., ORGEIG, S., DONNELLAN, S., BERTOZZI, T. & DANIELS, C. 2007. Positive selection in the N-terminal extramembrane domain of lung surfactant protein C (SP-C) in marine mammals. *J Mol Evo*, 65, 12-22.
- FRANSEN, G. I., MUNDY, J. & TZEN, J. T. 2001. Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiol Plant*, 112, 301-307.
- FURSE, S., LIDDELL, S., ORTORI, C. A., WILLIAMS, H., NEYLON, D. C., SCOTT, D. J., BARRETT, D. A. & GRAY, D. A. 2013. The lipidome and proteome of oil bodies from *Helianthus annuus* (common sunflower). *J Chem Biol*, 6, 63-76.
- GALAN, A., LOSADA-BARREIRO, S. & BRAVO-DIAZ, C. 2016. A physicochemical study of the effects of acidity on the distribution and antioxidant efficiency of trolox in olive oil-in-water emulsions. *ChemPhysChem*, 17, 296-304.
- GALASSI, V. V., SALINAS, S. R. & MONTICH, G. G. 2018. Conformational changes, from beta-strand to alpha-helix, of the fatty acid-binding protein ReP1-NCXSQ in anionic lipid membranes: dependence with the vesicle curvature. *Eur Biophys J*, 47, 165-177.
- GALLIER, S., ACTON, D., GARG, M. & SINGH, H. 2017. Natural and processed milk and oil body emulsions: Bioavailability, bioaccessibility and functionality. *Food Structure*, 13, 13-23.
- GALLIER, S. & SINGH, H. 2012. Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion. *Food Funct*, 3, 547-555.
- GALLIER, S., TATE, H. & SINGH, H. 2013. In vitro gastric and intestinal digestion of a walnut oil body dispersion. *J Agric Food Chem*, 61, 410-417.
- GARAIOVA, I., GUSCHINA, I. A., PLUMMER, S. F., TANG, J., WANG, D. & PLUMMER, N. T. 2007. A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification. *Nutr J*, 6, 1-9.
- GARCIA-MORENO, P. J., FRISENFELDT HORN, A. & JACOBSEN, C. 2014. Influence of casein-phospholipid combinations as emulsifier on the physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem*, 62, 1142-1152.
- GERZHOVA, A. 2016. *Extraction des protéines de canola par des solutions aqueuses électro-activées, optimisation des conditions d'extraction et étude de leur propriétés technologiques*. Philosophiae Doctor, Université Laval.

- GILLINGHAM, L. G., HARRIS-JANZ, S. & JONES, P. J. 2011. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. *Lipids*, 46, 209-228.
- GODDARD, E. & ANANTHAPADMANABHAN, K. 1993. *Interactions of surfactants with polymers and proteins*, London, CRC Press.
- GOETZE, O., STEINGOETTER, A., MENNE, D., VAN DER VOORT, I., KWIATEK, M. A., BOESIGER, P., WEISHAUP, D., THUMSHIRN, M., FRIED, M. & SCHWIZER, W. 2007. The effect of macronutrients on gastric volume responses and gastric emptying in humans: A magnetic resonance imaging study. *Am Phys Gastr Liv Phys*, 292, 11-17.
- GOHON, Y., VINDIGNI, J. D., PALLIER, A., WIEN, F., CELIA, H., GIULIANI, A., TRIBET, C., CHARDOT, T. & BRIOZZO, P. 2011. High water solubility and fold in amphipols of proteins with large hydrophobic regions: oleosins and caleosin from seed lipid bodies. *Biochim Biophys Acta*, 1808, 706-716.
- GOLDING, M. & WOOSTER, T. J. 2010. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Curr Opin Coll & Interf Sci*, 15, 90-101.
- GRAY, D. A., PAYNE, G., MCCLEMENTS, D. J., DECKER, E. A. & LAD, M. 2010. Oxidative stability of Echium plantagineum seed oil bodies. *Eur J Lipid Sci Technol*, 112, 741-749.
- GUESNET, P., ALESSANDRI, J.-M., ASTORG, P., PIFFERI, F. & LAVIALLE, M. 2005a. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 12, 333-343.
- GUNNING, P. A., MACKIE, A. R., GUNNING, P. A., WILDE, P. J. & MORRIS, V. J. 2005. Molecular interactions in mixed protein ionic surfactant interfaces. *Food Colloids: interactions, Microstructure and Processing*, 12, 143-151.
- HAAHR, A.-M. & JACOBSEN, C. 2008. Emulsifier type, metal chelation and pH affect oxidative stability of n-3-enriched emulsions. *Eur J Lipid Sci Tech*, 110, 949-961.
- HANAHAH, D. J. 1997. *A Guide to Phospholipid Chemistry*, New York, Oxford University Press.
- HARNACK, K., ANDERSEN, G. & SOMOZA, V. 2009. Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. *Nutr Metab*, 6, 1-8.
- HASENHUETTL, G. L. 2008. Synthesis and commercial preparation of food emulsifiers. *Food Emulsifiers and Their Applications 2nd edition*, Springer, 11-38.
- HE, Q., ZHANG, Y., LU, G., MILLER, R., MOHWALD, H. & LI, J. 2008. Dynamic adsorption and characterization of phospholipid and mixed phospholipid/protein layers at liquid/liquid interfaces. *Adv Colloid Interface Sci*, 140, 67-76.
- HELMERICH, G. & KOEHLER, P. 2003. Comparison of methods for the quantitative determination of phospholipids in lecithins and flour improvers. *J Agric Food Chem*, 51, 6645-6651.
- HERNANDEZ-PIZON, I., PATEL, K. & MURPHY, D. J. 2001. The *Brassica napus* calcium-binding protein, caleosin, has distinct endoplasmic reticulum- and lipid body-associated isoforms. *Plant Physiol Biochem*, 39, 615-622.

Bibliographie

- HÖGLUND, A. S., RÖDIN, J., LARSSON, E. & RAKS, L. 1991. Distribution of napin and cruciferin in developing rape seed embryos. *Plant Physiol*, 98, 509-515.
- HORWITZ, W. & LATIMER, G. W. 2005. *Official methods of analysis of AOAC international 18th edition*, Gaithersburg, Md. : AOAC International.
- HSU, K. T. & STORCH, J. 1996. Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms. *J Biol Chem*, 271, 13317-13323.
- HUANG, A. H. C. 1992. Oil Bodies and Oleosins in seeds. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 43, 177-200.
- HUANG, C. Y. & HUANG, A. H. C. 2017. Unique motifs and length of hairpin in oleosin target the cytosolic side of endoplasmic reticulum and budding lipid droplet. *Plant Physiol*, 174, 2248-2260.
- HUR, S. J., DECKER, E. A. & MCCLEMENTS, D. J. 2009. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chem*, 114, 253-262.
- HUR, S. J., LIM, B. O., DECKER, E. A. & MCCLEMENTS, D. J. 2011. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chem*, 125, 1-12.
- HUSSAIN, M. M. 2014. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol*, 25, 200-206.
- ISHII, T., MATSUMIYA, K., NAMBU, Y., SAMOTO, M., YANAGISAWA, M. & MATSUMURA, Y. 2017. Interfacial and emulsifying properties of crude and purified soybean oil bodies. *Food Structure*, 12, 64-72.
- IWANAGA, D., GRAY, D. A., FISK, I. D., DECKER, E. A., WEISS, J. & MCCLEMENTS, D. J. 2007. Extraction and characterization of oil bodies from soy beans: a natural source of pre-emulsified soybean oil. *J Agric Food Chem*, 55, 8711-8716.
- JACOBSON, K. & PAPAHA DJOPOULOS, D. 1975. Phase Transitions and Phase Separations in Phospholipid Membranes Induced by Changes in Temperature, pH, and Concentration of Bivalent Cations. *Biochemistry*, 14, 152-61.
- JIANG, P. L., CHEN, J. C., CHIU, S. T. & TZEN, J. T. 2009. Stable oil bodies sheltered by a unique caleosin in cycad megagametophytes. *Plant Physiol Biochem*, 47, 1009-1016.
- JIMÉNEZ-FLORES, R., YE, A. & SINGH, H. 2005. Interactions of whey proteins during heat treatment of oil-in-water emulsions formed with whey protein isolate and hydroxylated lecithin. *J Agric Food Chem*, 53, 4213-4219.
- JOHNSTON, J. M. & RAO, G. A. 1967. Intestinal absorption of fat. *Protoplasma*, 63, 40-44.
- JOLIVET, P., BOULARD, C., BEAUMAL, T., CHARDOT, T. & ANTON, M. 2006a. Protein components of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *J Agric Food Chem*, 54, 4424-4429.
- JOLIVET, P., BOULARD, C., BELLAMY, A., LARRE, C., BARRE, M., ROGNIAUX, H., D'ANDREA, S., CHARDOT, T. & NESI, N. 2009. Protein composition of oil bodies from mature Brassica napus seeds. *Proteomics*, 9, 3268-3284.
- JOLIVET, P., TAILLIART, K., BOULARD, C., NESI, N. & CHARDOT, T. 2006b. Purification and protein composition of oil bodies from Brassica napus seeds. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 13, 426-430.

- JOSEPH, C., SAVOIRE, R., HARSCOAT-SCHIAVO, C., PINTORI, D., MONTEIL, J., FAURE, C. & LEAL-CALDERON, F. 2018a. Preparation of redispersable dry emulsions stabilized by plant material. *En soumission*.
- JOSEPH, C., SAVOIRE, R., HARSCOAT-SCHIAVO, C., PINTORI, D., MONTEIL, J., LEAL-CALDERON, F. & FAURE, C. 2018b. O/W Pickering emulsions stabilized by cocoa powder: Role of the emulsification process and of composition parameters. *Food Res Int*, Diffusion en ligne avant impression.
- JUDDE, A., VILLENEUVE, P., ROSSIGNOL-CASTERA, A. & LE GUILLOU, A. 2003. Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *J Am Oil Chem Soc*, 80, 1209-1215.
- JUNGHANS, A., CHAMPAGNE, C., CAYOT, P., LOUPIAC, C. & KOPER, I. 2010. Protein-lipid interactions at the air-water interface. *Langmuir*, 26, 12049-12053.
- KANAZAWA, A., SAWA, T., AKAIKE, T. & MAEDA, H. 2002. Dietary lipid peroxidation products and DHA damage in colon carcinogenesis. *Eur J Lipid Sci Technol*, 104, 439-447.
- KAPCHIE, V. N., YAO, L., HAUCK, C. C., WANG, T. & MURPHY, P. A. 2013. Oxidative stability of soybean oil in oleosomes as affected by pH and iron. *Food Chem*, 141, 2286-2293.
- KARKANI, O. A., NENADIS, N., NIKIFORIDIS, C. V. & KIOSSEOGLU, V. 2013. Effect of recovery methods on the oxidative and physical stability of oil body emulsions. *Food Chem*, 139, 640-648.
- KARLESKIND, A. 1992. *Manuel des corps gras, Tome 2*.
- KASINOS, M., SABATINO, P., VANLOO, B., GEVAERT, K., MARTINS, J. C. & VAN DER MEEREN, P. 2013. Effect of phospholipid molecular structure on its interaction with whey proteins in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 32, 312-321.
- KATAVIC, V., AGRAWAL, G. K., HAJDUCH, M., HARRIS, S. L. & THELEN, J. J. 2006. Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two Brassica napus cultivars. *Proteomics*, 6, 4586-4598.
- KEOGH, J. B., WOOSTER, T. J., GOLDING, M., DAY, L., OTTO, B. & CLIFTON, P. M. 2011. Slowly and rapidly digested fat emulsions are equally satiating but their triglycerides are differentially absorbed and metabolized in humans. *J Nutr*, 141, 809-815.
- KIM, H., KIM, S.-Y., HAN, N. S. & TAO, B. Y. 2007. Solubilization conditions for hydrophobic membrane protein, oleosin in soybeans. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 12, 542-547.
- KLOCKEMAN, D. M., TOLEDO, R. & SIMS, K. A. 1997. Isolation and characterization of defatted canola meal protein. *J Agric Food Chem*, 45, 3867-3870.
- KOGA, T. & TERAOKA, J. 1995. Phospholipids increase radical-scavenging activity of vitamin E in a bulk oil model system. *J Agri Food Chem*, 43, 1450-1454.
- KOTSMAR, C., PRADINES, V., ALAHVERDJIEVA, V. S., AKSENEENKO, E. V., FAINERMAN, V. B., KOVALCHUK, V. I., KRAGEL, J., LESER, M. E., NOSKOV, B. A. & MILLER, R. 2009. Thermodynamics, adsorption kinetics and rheology of mixed protein-surfactant interfacial layers. *Adv Colloid Interface Sci*, 150, 41-54.

Bibliographie

- LACEY, D. J., WELLNER, N., BEAUDOIN, F., NAPIER, J. A. & SHEWRY, P. R. 1998. Secondary structure of oleosins in oil bodies isolated from seeds of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem J.*, 334, 469-477.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LAGROST, L., MASSON, D. & CHAPMAN, J. 2003. *L'athérosclérose Physiologie, diagnostics, thérapeutiques*, Paris, Masson.
- LEAL-CALDERON, F., SCHMITT, V. & BIBETTE, J. 2007. Emulsification. In: LEAL-CALDERON, F., SCHMITT, V. & BIBETTE, J. (eds.) *Emulsion Science*. Second Edition ed. New York: Springer.
- LEFÈVRE, T. 2013. Spectroscopie IR, phospholipides, protéines et tutti quanti. *Réunion de goupe, Groupe Auger*. Québec, Canada: Université Laval.
- LEFÈVRE, T. & SUBIRADE, M. 2000a. Interaction of beta-lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. *Int J Biol Macromol*, 28, 59-67.
- LEFÈVRE, T. & SUBIRADE, M. 2000b. Interaction of β -lactoglobulin with phospholipid bilayers: a molecular level elucidation as revealed by infrared spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 28, 59-67.
- LEFÈVRE, T. & SUBIRADE, M. 2001. Conformational rearrangement of beta-lactoglobulin upon interaction with an anionic membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1549, 37-50.
- LEFÈVRE, T. & SUBIRADE, M. 2003. Formation of intermolecular β -sheet structures: a phenomenon relevant to protein film structure at oil-water interfaces of emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 263, 59-67.
- LEGRAND, P. 2010. Les nouveaux ANC en acides gras, une actualisation nécessaire. *C. d. R. e. d. I. Nutritionnelles.*, CholéDoc 118., 1-6.
- LENGSFELD, H., BEAUMIER-GALLON, G., CHAHINIAN, H., DE CARO, A., VERGER, R., LAUGIER, R. & CARRIÈRE, F. 2005. *Physiology of gastrointestinal lipolysis and therapeutical use of lipases and digestive lipase inhibitors*, Weinheim, G. Müller and S. Petry.
- LEPAGE, G. & ROY, C. C. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res*, 27, 114-120.
- LERNER, A. & MATTHIAS, T. 2015. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmun Rev*, 14, 479-489.
- LEWIS, R. N. & MCELHANEY, R. N. 2013. Membrane lipid phase transitions and phase organization studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1828, 2347-58.
- LI, J., PEDERSEN, J. N., ANANKANBIL, S. & GUO, Z. 2018. Enhanced fish oil-in-water emulsions enabled by rapeseed lecithins obtained under different processing conditions. *Food Chem*, 264, 233-240.
- LI, J., WANG, X., ZHANG, T., WANG, C., HUANG, Z., LUO, X. & DENG, Y. 2015a. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Pharm Sci*, 10, 81-98.

- LI, J. B., ZHANG, Y. & YAN, L. L. 2003. Multilayer formation on a curved drop surface. *Angew Chem Int Ed*, 40, 891-894.
- LI, M., KEDDIE, J. S., SMITH, L. J., CLARK, D. C. & MURPHY, D. J. 1993. Expression and characterization of the N-terminal domain of an oleosin protein from sunflower. *J Biol Chem*, 268, 17504-17512.
- LI, M., MURPHY, D. J., LEE, K. H., WILSON, R., SMITH, L. J., CLARK, D. C. & SUNG, J. Y. 2002. Purification and structural characterization of the central hydrophobic domain of oleosin. *J Biol Chem*, 277, 37888-37895.
- LI, M., SMITH, L. J., CLARK, D. C., WILSON, R. & MURPHY, D. J. 1992. Secondary structures of a new class of lipid body proteins from oilseeds. *J Cell Biol*, 267, 8245-8253.
- LI, P., WANG, F., WU, F., WANG, J., LIU, L. & LAI, C. 2015b. Chemical composition, energy and amino acid digestibility in double-low rapeseed meal fed to growing pigs. *J Anim Sci Biotechnol*, 6, 1-10.
- LI, R., WU, Z., WANG, Y., DING, L. & WANG, Y. 2016. Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin. *Biotechnol Rep (Amst)*, 9, 46-52.
- LI, Y., KIM, J., PARK, Y. & MCCLEMENTS, D. J. 2012. Modulation of lipid digestibility using structured emulsion-based delivery systems: comparison of in vivo and in vitro measurements. *Food Funct*, 3, 528-536.
- LOGAN, A., NIENABER, U. & XIANGQING, S. P. 2013. Lipid Oxidation: Challenges in Food Systems. *AOCS*, pp. 458.
- LOPEZ, C., CAUTY, C. & GUYOMARCH, F. 2015. Organization of lipids in milks, infant milk formulas and various dairy products: role of technological processes and potential impacts. *Dairy Sci Technol*, 95, 863-893.
- LOPEZ, C., MADEC, M.-N. & JIMENEZ-FLORES, R. 2010. Lipid rafts in the bovine milk fat globule membrane revealed by the lateral segregation of phospholipids and heterogeneous distribution of glycoproteins. *Food Chem*, 120, 22-33.
- LU, G., AN, Z. & LI, J. 2004. Biogenic capsules made of proteins and lipids. *Biochem Biophys Res Commun*, 315, 224-227.
- MACKIE, A. & WILDE, P. 2005. The role of interactions in defining the structure of mixed protein-surfactant interfaces. *Adv Colloid Interface Sci*, 117, 3-13.
- MACKIE, A. R. 2004. Structure of adsorbed layers of mixtures of proteins and surfactants. *Curr Opin Coll & Interf Sci*, 9, 357-361.
- MAGET-DANA, R. 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochem Biophys Acta*, 15, 109-140.
- MALDONADO-VALDERRAMA, J. & PATINO, J. M. R. 2010. Interfacial rheology of protein-surfactant mixtures. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 271-282.
- MANTOVANI, R. A., CAVALLIERI, A. L., NETTO, F. M. & CUNHA, R. L. 2013. Stability and in vitro digestibility of emulsions containing lecithin and whey proteins. *Food Funct*, 4, 1322-1331.

Bibliographie

- MARCIANI, L., WICKHAM, M., SINGH, G., BUSH, D., PICK, B., COX, E., FILLERY-TRAVIS, A., FAULKS, R., MARSDEN, C., GOWLAND, P. A. & SPILLER, R. C. 2007. Enhancement of intragastric acid stability of a fat emulsion meal delays gastric emptying and increases cholecystokinin release and gallbladder contraction. *Am J Phys Gastr Liv Phys*, 292, 1607-1613.
- MARMESAT, S., MORALES, A., VELASCO, J., RUIZ-MÉNDEZ, M. V. & DOBARGANES, M. C. 2009. Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *Grasas y Aceites*, 60, 155-160.
- MARTINET, V., SAULNIER, P., BEAUMAL, V., COURTHAUDON, J.-L. & ANTON, M. 2003. Surface properties of hen egg yolk low-density lipoproteins spread at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31, 185-194.
- MASSIOT, D., FAYON, F., CAPRON, M., KING, I., LE CALVÉ, S., ALONSO, B., DURAND, J.-O., BUJOLI, B., GAN, Z. & HOATSON, G. 2002. Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra. *Mag Res Chem*, 40, 70-76.
- MATTSON, F. H. & VOLPENHEIN, R. A. 1964. The digestion and absorption of triglycerides. *J Biol Chem*, 239, 2772-2777.
- MAURER, S., WASCHATKO, G., SCHACH, D., ZIELBAUER, B. I., DAHL, J., WEIDNER, T., BONN, M. & VILGIS, T. A. 2013. The role of intact oleosin for stabilization and function of oleosomes. *J Phys Chem B*, 117, 13872-13883.
- MCBREEN, P. H. 2015. Loi de Laplace. *Propriétés et réactivités des surfaces*. Université Laval.
- MCCLEMENTS, D. J. 2015. Food Emulsions: principles, practices, and techniques. 3rd ed. *CRC Press*, 690 pp.
- MCCLEMENTS, D. J. & DECKER, E. A. 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *J Food Sci*, 65, 1270-1282.
- MCCLEMENTS, D. J., DECKER, E. A. & PARK, Y. 2009. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49, 48-67.
- MCCLEMENTS, D. J. & GUMUS, C. E. 2016. Natural emulsifiers - Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Adv Colloid Interface Sci*, 234, 3-26.
- MCCLEMENTS, D. J. & LI, Y. 2010. Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv Colloid Interface Sci*, 159, 213-228.
- MICHALSKI, M.-C., VORS, C., LECOMTE, M. & LAUGERETTE, F. 2017. Impacts métaboliques et inflammatoires des matières grasses émulsionnées. *Oilseed fat crops lipids*, 24, 1-12.
- MICHALSKI, M. C., BRIARD, V., DESAGE, M. & GELOEN, A. 2005. The dispersion state of milk fat influences triglyceride metabolism in the rat-a 13CO₂ breath test study. *Eur J Nutr*, 44, 436-444.
- MICHALSKI, M. C., GENOT, C., GAYET, C., LOPEZ, C., FINE, F., JOFFRE, F., VENDEUVRE, J. L., BOUVIER, J., CHARDIGNY, J. M. & RAYNAL-LJUTOVAC,

- K. 2013. Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. *Prog Lipid Res*, 52, 354-373.
- MILLICHIP, M., TATHAM, A. S., JACKSON, F., GRIFFITHS, G., SHEWRY, P. R. & STOBART, A. K. 1996. Purification and characterization of oil-bodies (oleosomes) and oil-body boundary proteins (oleosins) from the developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochem J*, 314, 333-337.
- MOHAN, A., MCCLEMENTS, D. J. & UDENIGWE, C. C. 2016. Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. *Food Chem*, 213, 143-8.
- MONCELLI, M. R., BECUCCI, L. & GUIDELLI, R. 1994. The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes. *Biophys J*, 66, 1969-1980.
- MORRISON, W. R. & SMITH, L. M. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res*, 5, 600-608.
- MOURITSEN, O. G. & BAGATOLLI, L. A. 2015. Lipid domains in model membranes: a brief historical perspective. *Essays Biochem*, 57, 1-19.
- MUN, S., DECKER, E. A. & MCCLEMENTS, D. J. 2007. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Res Int*, 40, 770-781.
- MUNK, M. B., LARSEN, F. H., VAN DEN BERG, F. W., KNUDSEN, J. C. & ANDERSEN, M. L. 2014. Competitive displacement of sodium caseinate by low-molecular-weight emulsifiers and the effects on emulsion texture and rheology. *Langmuir*, 30, 8687-8696.
- MURPHY, D. J., KEEN, J. N., O'SULLIVAN, J. N., AU, D. M. Y., EDWARDS, E. W., JACKSON, P. J., CUMMINS, I., GIBBONS, T., SHAW, C. H. & RAYN, A. J. 1991. A class of amphipathic proteins associated with lipid storage bodies in plants. Possible similarities with animal serum apolipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1088, 86-94.
- NAESTED, H., FRANDBSEN, G. I., JAUH, G. Y., HERNANDEZ-PIZON, I., NIELSON, H. B., MURPHY, D. J., ROGERS, J. C. & MUNDY, J. 2000. Oleosins : Ca²⁺-binding proteins associated with lipid bodies. *Plant Mol Biol*, 44, 463-476.
- NAKAMURA, R., MIZUTANI, R., YANO, M. & HAYAKAWA, S. 1988. Enhancement of emulsifying properties of protein by sonicating with egg yolk lecithin. *J Agric Food Chem*, 36, 729-732.
- NASSRA, M., BOURGEOIS, C., SUBIRADE, M., SAUVANT, P. & ATGIE, C. 2018. Oral administration of lipid oil-in-water emulsions performed with synthetic or protein-type emulsifiers differentially affects post-prandial triacylglycerolemia in rats. *J Physiol Biochem*, Diffusion en ligne avant l'impression.
- NIELSEN, N. S., PEDERSEN, A., SANDSTRÖM, B., MARCKMANN, P. & HØY, C. E. 2002. Different effects of diets rich in olive oil, rapeseed oil and sunflower-seed oil on postprandial lipid and lipoprotein concentrations and on lipoprotein oxidation susceptibility. *Brit J Nut*, 87, 489-499.
- NIKIFORIDIS, C. V., AMPATZIDIS, C., LALOU, S., SCHOLTEN, E., KARAPANTSIOS, T. D. & KIOSSEOGLOU, V. 2013. Purified oleosins at air-water interfaces. *Soft Matter*, 9, 1354-1363.

Bibliographie

- NISHIMUKAI, M., HARA, H. & AOYAMA, Y. 2003. Enteral administration of soyabean lecithin enhanced lymphatic absorption of triacylglycerol in rats. *Brit J Nut*, 90, 565-571.
- NYLANDER, T., ARNEBRANT, T., BOS, M. & WILDE, P. 2008. Protein/emulsifier interactions. *Food Emulsifiers and Their Applications 2nd edition*, Springer, 89-172.
- PAGES, X. 2008. *Technologie des corps gras*, Tech de l'Ingénieur.
- PAYNE, G., LAD, M., FOSTER, T., KHOSLA, A. & GRAY, D. 2014. Composition and properties of the surface of oil bodies recovered from *Echium plantagineum*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 116, 88-92.
- PETERSEN, D. R. & DOORN, J. A. 2004. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med*, 37, 937-945.
- PETIT, V., NIOT, I., POIRIER, H. & BESNARD, P. 2007. Fatty acids intestinal absorption : facts and uncertainties. *Nutr Clin Met*, 21, 38-45.
- PIORKOWSKI, D. T. & MCCLEMENTS, D. J. 2014. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5-41.
- POP, F. 2011. Chemical stabilization of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during storage. *Food Sci Technol Int*, 17, 111-117.
- PORSGAARD, T. & HØY, C. E. 1998. Lymphatic transport in rats of several dietary fats differing in fatty acid profile and triacylglycerol structure. *J Nutr*, 130, 1619-1624.
- POTVIN-FOURNIER, K., LEFEVRE, T., PICARD-LAFOND, A., MARCOTTE, C., DUFRESNE, C., CANTIN, L., SALESSE, C. & AUGER, M. 2016. Discriminating Lipid- from Protein-Calcium Binding To Understand the Interaction between Recoverin and Phosphatidylglycerol Model Membranes. *Biochemistry*, 55, 3481-91.
- POXLEITNER, M., ROGERS, S. W., LACEY SAMUELS, A., BROWSE, J. & ROGERS, J. C. 2006. A role for caleosin in degradation of oil-body storage lipid during seed germination. *Plant J*, 47, 917-933.
- PROLEA 2013. Production de graines oléagineuses en France. *consulté sur <http://chimierenouvelable.org/index.php?id=1477> le 10 septembre 2018.*
- PUGNALONI, L. A., DICKINSON, E., ETTOLAIE, R., MACKIE, A. R. & WILDE, P. J. 2004. Competitive adsorption of proteins and low-molecular-weight surfactants: computer simulation and microscopic imaging. *Adv Colloid Interface Sci*, 107, 27-49.
- PURKRTOVA, Z., D'ANDREA, S., JOLIVET, P., LIPOVOVA, P., KRALOVA, B., KODICEK, M. & CHARDOT, T. 2007. Structural properties of caleosin: a MS and CD study. *Arch Biochem Biophys*, 464, 335-343.
- PURKRTOVA, Z., JOLIVET, P., MIQUEL, M. & CHARDOT, T. 2008. Structure and function of seed lipid-body-associated proteins. *C R Biol*, 331, 746-754.
- QIN, S.-S., YU, Z.-W. & YU, Y.-X. 2009. Structural Characterization on the Gel to Liquid-Crystal Phase Transition of Fully Hydrated DSPC and DSPE Bilayers. *J. Phys. Chem B*, 113, 8114-23.
- RAGOONANAN, V., MALSAM, J., BOND, D. R. & AKSAN, A. 2008. Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of *Geobacter sulfurreducens*. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 2283-90.

- RAGOONANAN, V., WIEDMANN, T. & AKSAN, A. 2010. Characterization of the Effect of NaCl and Trehalose on the Thermotropic Hysteresis of DOPC Lipids during Freeze/Thaw. *J. Phys. Chem B*, 114, 16752-8.
- RAMIREZ, M., AMATE, L. & GIL, A. 2001. Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources. *Early Hum Dev*, 65, 95-1001.
- RAYNER, M. 2015. Current status on novel ways for stabilizing food dispersions by oleosins, particles and microgels. *Curr Opin Food Sci*, 3, 94-109.
- RIEDIGER, N. D., OTHMAN, R. A., SUH, M. & MOGHADASIAN, M. H. 2009. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc*, 109, 668-679.
- RISKE, K. A., POLITI, M. J., REED, W. F. & LAMY-FREUND, M. T. 1997. Temperature and ionic strength dependent light scattering of DMPG dispersions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 89, 31-44.
- ROBERTS, C. L., KEITA, A. V., DUNCAN, S. H., O'KENNEDY, N., SODERHOLM, J. D., RHODES, J. M. & CAMPBELL, B. J. 2010. Translocation of Crohn's disease Escherichia coli across M-cells: contrasting effects of soluble plant fibres and emulsifiers. *Gut*, 59, 1331-1339.
- RODRIGUES, I. M., COELHO, J. F. J. & CARVALHO, M. G. V. S. 2012. Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseed plants: Methods, limitations and potential. *J Food Eng*, 109, 337-346.
- ROUX, E., BAUMBERGER, S., AXELOX, M. A. V. & CHARDOT, T. 2004. Oleosins of Arabidopsis thaliana : expression in Escherichia coli, purification and functional properties. *J Agri Food Chem*, 52, 5245-5259.
- RYDHAG, L. & WILTON, I. 1981. The function of phospholipids of soybean lecithin in emulsions. *J Am Oil Chem Soc*, 58, 830-837.
- SALVIA-TRUJILLO, L., QIAN, C., MARTIN-BELLOSO, O. & MCCLEMENTS, D. J. 2013. Influence of particle size on lipid digestion and beta-carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chem*, 141, 1472-1480.
- SANTÉCANADA 2006. Canadian Community Health Survey, Cycle 2.2, Nutrition (2004) A Guide to Accessing and Interpreting the Data. consulté sur http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/surveill/nutrition/commun/cchs_guide_escs-eng.php le 10 septembre 2018.
- SCHAICH, K. M. 2005. Lipid Oxidation: Theoretical Aspects. In Bailey's Industrial Oil and Fat Products. F. Shahidi, ed. , Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- SCHAICH, K. M. 2012. Thinking outside the classical chain reaction box of lipid oxidation. *Lipid Technol*, 24.
- SCHIPPA, S. & CONTE, M. P. 2014. Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health. *Nutrients*, 6, 5786-5805.
- SCURIATTI, M. P., TOMÁS, M. C. & WAGNER, J. R. 2003. Influence of soybean protein isolates-phosphatidylcholine interaction on the stability of oil-in-water emulsions. *J Am Oil Chem Soc*, 80, 1093-1100.
- SHAHIDI, F. & AMBIGAIPALAN, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J Func Foods*, 18, 820-897.

Bibliographie

- SHAHIDI, F., WANASUNDARA, U. & BRUNET, N. 1994. Oxidative stability of oil from blubber of harp seal (*Phoca groenlandica*) as assessed by NMR and standard procedures. *Food Res Int*, 27, 555-562.
- SHEN, Z., WIJESUNDERA, C. & YE, J.-H. 2012. Effect of seed heat-treatment on the oxidative stability of canola oil body emulsions. *Food Nutr Sci*, 03, 981-990.
- SHI, Y. & BURN, P. 2004. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 695-710.
- SHIAU, Y. F., FERNANDEZ, P., JACKSON, M. J. & MCMONAGLE, S. 1985. Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *Am J Phys*, 248, 608-617.
- SHIMADA, T. L., SHIMADA, T., TAKAHASHI, H., FUKAO, Y. & HARA-NISHIMURA, I. 2008. A novel role for oleosins in freezing tolerance of oilseeds in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 55, 798-809.
- SICHERER, S. H. & SAMPSON, H. A. 2014. Food allergy: Epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Allergy Clin Immunol*, 133, 291-307.
- SILOTO, R. M., FINDLAY, K., LOPEZ-VILLALOBOS, A., YEUNG, E. C., NYKIFORUK, C. L. & MOLONEY, M. M. 2006. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18, 1961-1974.
- SILVIUS, D. J. R. 1982. *Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins*, New York, John Wiley & Sons, Inc.,
- SIMIC, M. G., JOVANOVIC, S. V. & NIKI, E. 1992. Mechanisms of lipid oxidative processes and their inhibition. *Lipid Oxidation in Food*, ACS Symposium Series, Vol. 500, 14-32.
- SIMONS, K. & IKONEN, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387, 569-572.
- SINGH, H. & GALLIER, S. 2017. Nature's complex emulsion: The fat globules of milk. *Food Hydrocolloids*, 68, 81-89.
- SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R. & LAMUELA-RAVENTOS, R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of flin-ciocalteu reagent. *Packer, L. (Ed.), Oxidants and Antioxidants, Part A*, 299, 152-178.
- SONG, W., QIN, Y., ZHU, Y., YIN, G., WU, N., LI, Y. & HU, Y. 2014. Delineation of plant caleosin residues critical for functional divergence, positive selection and coevolution. *BMC Evolutionary Biology*, 14, 1-14.
- SPERANZA, A., CORRADINI, M. G., HARTMAN, T. G., RIBNICKY, D., OREN, A. & ROGERS, M. A. 2013. Influence of emulsifier structure on lipid bioaccessibility in oil-water nanoemulsions. *J Agric Food Chem*, 61, 1650-1655.
- STATISTIQUECANADA 2017. Superficie des grandes cultures. *consulté sur <https://www150.statcan.gc.ca/n1/daily-quotidien/170629/dq170629c-fra.htm> le 10 septembre 2018.*
- STEFANSSON, B. R. & KONDRA, Z. P. 1975. Tower Summer Rape. *Can J Plant Sci*, 55, 343-344.
- SUBIRADE, M., SALESSE, C., MARION, D. & PÉZOLET, M. 1995a. Interaction of a Nonspecific Wheat Lipid Transfer Protein with Phospholipid Monolayers Imaged by Fluorescence Microscopy and Studied by Infrared Spectroscopy. *Biophysical Journal*, 69, 974-988.

- SUBIRADE, M., SALESSE, C., MARION, D. & PÉZOLET, M. 1995b. Interaction of a nonspecific wheat lipid transfer protein with phospholipid monolayers imaged by fluorescence microscopy and studied by infrared spectroscopy. *Biophys J*, 69, 974-988.
- SÜNDER, A., SCHERZE, I. & MUSCHIOLIK, G. 2001. Physico-chemical characteristics of oil-in-water emulsions based on whey protein-phospholipid mixtures. *Coll Surf B: Biointerf*, 21, 75-85.
- TAN, C. & NAKAJIMA, M. 2005. β -Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chem*, 92, 661-671.
- TAN, K. W., SUN, L. J., GOH, K. K. & HENRY, C. J. 2016. Lipid droplet size and emulsification on postprandial glycemia, insulinemia and lipidemia. *Food Funct*, 7, 4278-4284.
- TATEMATSU, K., FUMA, S. Y., SATOH, J., ICHIKAWA, Y., FUJII, Y. & OKUYAMA, H. 2004. Dietary canola and soybean oil fed to SHRSP rat dams differently affect the growth and survival of their male pups. *J Nutr*, 134, 1347-1352.
- TCHOLAKOVA, S., DENKOV, N. D., SIDZHAKOVA, D. & CAMPBELL, B. J. 2006. Effect of thermal treatment, ionic strength, and pH on the short-term and long-term coalescence stability of beta-lactoglobulin emulsions. *Langmuir*, 22, 6042-6052.
- TEH, S. S., BEKHIT AEL, D. & BIRCH, J. 2014. Antioxidative polyphenols from defatted oilseed cakes: effect of solvents. *Antioxidants*, 3, 67-80.
- TING, J. T. L., LEE, K., RATNAYAKE, C., PLATT, K. A., BALSAMO, R. A. & HUANG, A. H. C. 1996. Oleosin genes in maize kernels having diverse oil contents are constitutively expressed independent of oil contents. *Planta*, 199, 158-165.
- TZEN, J. T. & HUANG, A. H. C. 1992. Surface structure and properties of plant seed oil bodies. *J Cell Biol*, 117, 327-335.
- TZEN, J. T., Y.K., L., CHAN, K. L. & HUANG, A. H. 1990. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species. *Plant Physiol*, 94, 1282-1289.
- TZEN, J. T. C. 2012. Integral proteins in plant oil bodies. *ISRN Botany*, 2012, 1-16.
- TZEN, J. T. C., CAO, Y.-Z., LAURENT, P., RATNAYAKE, C. & HUANG, A. H. C. 1993. Lipids, proteins, and structure of seed oil bodies from diverse species. *Plant Physiol.*, 101, 267-276.
- TZEN, J. T. C., ROBERTS, N. J. & SCOTT, R. W. 2008. Recent biotechnological applications using oleosins. *Open Biotech J*, 2, 13-21.
- ULUATA, S., MCCLEMENTS, D. J. & DECKER, E. A. 2015. Physical stability, autoxidation, and photosensitized oxidation of omega-3 oils in nanoemulsions prepared with natural and synthetic surfactants. *J Agric Food Chem*, 63, 9333-9340.
- URSINI, F., ZAMBURLINI, A., CAZZOLATO, G., MAIORINO, M., BITTOLO BON, G. & SEVANIAN, A. 1998. Postprandial plasma lipid hydroperoxides: A possible link between diet and atherosclerosis. *Free Radical Biol Med*, 25, 250-252.
- USDA 2017. Oilseeds : world markets and trade. In: SERVICE, U. S. D. O. A.-F. A. (ed.). Washington.

Bibliographie

- VAN AKEN, G. A. 2003. Competitive adsorption of protein and surfactants in highly concentrated emulsions: effect on coalescence mechanisms. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 213, 209-219.
- VAN DAEL, H. & VAN CAUWELAERT, F. 1988. The effect of α -lactalbumin on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine bilayers, studied by fluorescence polarization, differential scanning calorimetry and Raman spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 943, 126-136.
- VAN DE WIELE, T. R., OOMEN, A. G., WRAGG, J., CAVE, M., MINEKUS, M., HACK, A., CORNELIS, C., ROMPELBERG, C. J., DE ZWART, L. L., KLINCK, B., VAN WIJNEN, J., VERSTRAETE, W. & SIPS, A. J. 2007. Comparison of five in vitro digestion models to in vivo experimental results: lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 42, 1203-1211.
- VAN NIEUWENHUYZEN, W. & SZUHAI, B. F. 1998. Effects of lecithins and proteins on the stability of emulsions. *Fett/Lipid*, 100, 282-291.
- VAN NIEUWENHUYZEN, W. & TOMÁS, M. C. 2008. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur J Lipid Sci Technol*, 110, 472-486.
- VANCE, V. B. & HUANG, A. H. C. 1987. The major protein from lipid bodies of maize characterization and structure based on cDNA cloning. *J Biol Chem*, 262, 11275-11279.
- VIGNES-ADLER, M. & VERLADE, M. G. 2009. Surface Wwaves and dissipation solitons sustained by the Marangoni effect. *Handbook of Surface and Colloid Chemistry 3rd edition*, CRC Press, 91-106.
- VINDIGNI, J. D., WIEN, F., GIULIANI, A., ERPAPAZOGLU, Z., TACHE, R., JAGIC, F., CHARDOT, T., GOHON, Y. & FROISSARD, M. 2013. Fold of an oleosin targeted to cellular oil bodies. *Biochim Biophys Acta*, 1828, 1881-1888.
- VORS, C. 2012. Impact de la structure de la matière grasse sur l'absorption et le devenir métabolique des lipides et des endotoxines chez l'homme normo-pondéré ou obèse. *École doctorale interdisciplinaires Sciences-Santé*, Institut National des sciences appliqués de Lyon.
- VORS, C., CAPOLINO, P., GUERIN, C., MEUGNIER, E., PESENTI, S., CHAUVIN, M. A., MONTEIL, J., PERETTI, N., CANSELL, M., CARRIERE, F. & MICHALSKI, M. C. 2012. Coupling in vitro gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions. *Food Funct*, 3, 537-546.
- WANASUNDARA, J. P. 2011. Proteins of Brassicaceae oilseeds and their potential as a plant protein source. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51, 635-677.
- WANG, G. & WANG, T. 2008. Oxidative stability of egg and soy lecithin as affected by transition metal ions and pH in emulsion. *J Agric Food Chem*, 56, 11424-11431.
- WANG, S., SHI, Y., TU, Z., ZHANG, L., WANG, H., TIAN, M. & ZHANG, N. 2017. Influence of soy lecithin concentration on the physical properties of whey protein isolate-stabilized emulsion and microcapsule formation. *J Food Eng*, 207, 73-80.
- WANINGE, R., WALSTRA, P., BASTIANNIS, J., NIEUWENHUIJSE, H., NYLANDER, T., PAULSSON, M. & BERGENSTAHL, B. 2005. Competitive adsorption between B-casein or B-lactoglobulin and model milk membrane lipids at oil-water interfaces. *J Agric Food Chem*, 53, 716-724.

- WASCHATKO, G., SCHIEDT, B., VILGIS, T. A. & JUNGHANS, A. 2012. Soybean oleosomes behavior at the air-water interface. *J Phys Chem B*, 116, 10832-10841.
- WETTANSINGHE, M. & SHAHIDI, F. 1999. Evening Primrose Meal: A Source of Natural Antioxidants and Scavenger of Hydrogen Peroxide and Oxygen-Derived Free Radicals. *J. Agric. Food Chem*, 47, 1801-12.
- WHITE, D. A., FISK, I. D., MAKKHUN, S. & GRAY, D. A. 2009. In vitro assessment of the bioaccessibility of tocopherol and fatty acids from sunflower oil bodies. *J Agri Food Chem*, 57, 5720-5729.
- WHITE, S. H. 2009. Biophysical dissection of membrane proteins. *Nature*, 459, 344-346.
- WICKHAM, M., GARROOD, M., LENEY, J., WILSON, P. D. & FILLERY-TRAVIS, A. 1998. Modification of a phospholipid stabilized emulsion interface by bile salt: effect on pancreatic lipase activity. *J Lipid Res*, 39, 623-632.
- WIJESUNDERA, C., BOITEAU, T., XINQING, X., ZHIPING, S., WATKINS, P. & LOGAN, A. 2013a. Stabilization of fish oil-in-water emulsions with oleosin extracted from canola meal. *Journal of Food Science*, 78, C1340-C1347.
- WIJESUNDERA, C., BOITEAU, T., XU, X., SHEN, Z., WATKINS, P. & LOGAN, A. 2013b. Stabilization of fish oil-in-water emulsions with oleosin extracted from canola meal. *J Food Sci*, 78, C1340-1347.
- WILDE, P. J. & CHU, B. S. 2011. Interfacial & colloidal aspects of lipid digestion. *Adv Colloid Interface Sci*, 165, 14-22.
- WILTON, D. C. 2008. *Phospholipases, 5ème édition*, Eds Vance DE and Vance J E.
- WOODWARD, N. C., GUNNING, A. P., MALDONADO-VALDERRAMA, J., WILDE, P. J. & MORRIS, V. J. 2010. Probing the in situ competitive displacement of protein by nonionic surfactant using atomic force microscopy. *Langmuir*, 26, 12560-12566.
- XIE, M. & DUNFORD, N. T. 2017. Lipid composition and emulsifying properties of canola lecithin from enzymatic degumming. *Food Chem*, 218, 159-164.
- YAMAMOTO, Y. & ARAKI, M. 1997. Effects of lecithin addition in oil or water phase on the stability of emulsions made with whey proteins. *Biosci Biotechnol Biochem*, 61, 1791-1795.
- ZHAO, L., CHEN, Y., CHEN, Y., KONG, X. & HUA, Y. 2016. Effects of pH on protein components of extracted oil bodies from diverse plant seeds and endogenous protease-induced oleosin hydrolysis. *Food Chem*, 200, 125-133.
- ZOU, L. & AKOH, C. C. 2013. Characterisation and optimisation of physical and oxidative stability of structured lipid-based infant formula emulsion: effects of emulsifiers and biopolymer thickeners. *Food Chem*, 141, 2486-2494.

Annexe I

Tableau 21 : Tableau des acides gras de la lécithine

	Caldic	Lasenor
AGS	9,6	10,6
16:00	7,6	8,1
18:00	1,3	1,6
MUFA	56,9	52,7
18:1 n-9	52,9	49,3
PUFA	33,5	36,8
PUFA n-6	27,2	31,5
18:2 n-6	27,0	31,3
PUFA n-3	6,3	5,3
18:3 n-3	6,3	5,3
n-6 / n-3	4,3	5,9