



HAL
open science

Impact de la forme moléculaire et supramoléculaire de vectorisation des acides gras polyinsaturés n-3 sur leur biodisponibilité: étude physico-chimique et in vivo chez le rat

Anthony Sehl

► To cite this version:

Anthony Sehl. Impact de la forme moléculaire et supramoléculaire de vectorisation des acides gras polyinsaturés n-3 sur leur biodisponibilité: étude physico-chimique et in vivo chez le rat. Chimie analytique. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT: 2019BORD0065 . tel-03226890

HAL Id: tel-03226890

<https://theses.hal.science/tel-03226890>

Submitted on 16 May 2021

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE PHYSIQUE

Par Anthony SEHL

**Impact de la forme moléculaire et supramoléculaire de
vectorisation des acides gras polyinsaturés n-3 sur leur
biodisponibilité**

Etudes physico-chimiques et in vivo chez le rat

Sous la direction du Pr. Maud CANSELL

Soutenue le : 15 mai 2019

Devant la commission d'examen formée de :

M. BRETILLON, Lionel	Directeur de recherche, CSGA, Dijon	Rapporteur
M. CARRIERE, Frédéric	Directeur de recherche, CNRS, Marseille	Rapporteur
M. LEAL-CALDERON, Fernando	Professeur, ENSCBP-Bordeaux INP, Pessac	Président
M. GUESNET, Philippe	Directeur de recherche	Examineur
Mme VAYSSE, Carole	Responsable NSBL, ITERG, Pessac	Examineur
Mme CANSELL, Maud	Professeur, ENSCBP-Bordeaux INP, Pessac	Directrice
Mme COUÉDELO, Leslie	Chef de projet, ITERG, Pessac	Invitée

« Je ne perds jamais, soit je gagne, soit j'apprends »,

Nelson Mandela

A toutes les personnes que j'ai croisées sur mon chemin, **Merci.**

Remerciements

Il est maintenant temps de clore ce chapitre de ma vie et de commencer par remercier l'ensemble des personnes que j'ai croisé sur ce long et fabuleux chemin qu'est la thèse.

Je tiens dans un premier temps à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse. Pr. Fernando Leal-Calderon, je vous remercie pour avoir consenti à présider ce jury. Je tiens à apporter ma profonde gratitude au Dr. Frédéric Carrière et au Dr. Lionel Bretilon pour le temps que vous m'avez consacré dans la lecture et l'examen de ce travail de thèse. Je remercie également le Dr. Philippe Guesnet et le Pr. Fernando Leal-Calderon pour avoir accepté d'examiner mon projet de thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance envers mes directrices de thèse, le Pr. Maud Cansell, le Dr. Carole Vaysse et le Dr. Leslie Couëdelo.

Maud, merci pour ta disponibilité, ta patience, la rigueur scientifique que tu as su m'inculquer et nos nombreux échanges professionnels mais aussi personnels. Merci pour ta passion et ton grand intérêt envers les liposomes marins, passion que tu as su me transmettre.

Carole, merci pour tout. Tu as toujours fait preuve d'une grande disponibilité et de précieux conseils tant sur la partie technique que rédactionnelle. Ton soutien sur les plans scientifiques et humains ont été d'une très grande aide. Nos précieux échanges sur le développement personnel me manqueront !

Leslie, je tiens à te remercier très chaleureusement. Après 4 années passées à travailler à tes côtés, je tiens profondément à te remercier pour tout ce que tu as pu m'apporter. Ton encadrement, ton soutien, la transmission de l'organisation mais aussi ton humour et ta bonne humeur. Merci de m'avoir donné ma chance, un mois de mai 2015 après une certaine lettre... Merci pour ces déplacements mouvementés riches en péripéties et émotions, ces déplacements qui nous ont bien fait rire et qui resteront gravés dans le marbre.

Un très grand merci à vous trois pour avoir cru en moi, pour m'avoir donné mes chances, pour m'avoir donné l'opportunité de me réaliser et de devenir le « scarabée » que je suis devenu.

Je remercie également l'ensemble de l'équipe « Nutrition » de l'ITERG, la famille de la Nut' : Ikram, Hélène, Benjamin, Laurence, Elise, Léa et Chloé pour votre soutien et votre aide à tous les niveaux, aussi bien technique que personnel. Merci pour ces midis où l'humour et la bonne humeur étaient de mise et permettaient de s'évader et d'alléger ces journées.

Je tiens à remercier l'équipe Analyse de l'ITERG et plus particulièrement Lionel Lagarderes, Hugues Griffon et Julien Escobessa pour votre aide, vos conseils ainsi que votre disponibilité sur le plan analytique. Merci à toi aussi, Florent Joffre pour nos nombreux échanges, ton humour mais aussi pour avoir testé mes limites lors de nos répétitions ! Je remercie de façon plus globale l'ensemble des collaborateurs de l'ITERG que j'ai croisés durant mon parcours et avec qui j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler et échanger.

Mes pensées vont également à l'ensemble des personnes du CBMN avec qui j'ai pu travailler, échanger mais aussi rigoler : Fernando Leal-Calderon, Raphaëlle Savoie, Christelle Harscoat-Schiavo, Christine (« ma petite cariboute »), Lucie, Cécile, Wafa et Ghita. Et non Julien, je ne t'oublie pas, ta bonne humeur (enfin...), nos échanges, mais aussi tes conseils techniques et ta disponibilité ont été d'une aide précieuse dans le bon déroulement de ce projet (*tu ne pourras plus dire que j'embaume le laboratoire maintenant...enfin, qui sait, un liposome marin peut se cacher dans n'importe quel coin du laboratoire...*).

Côté plus personnel, mes sentiments les plus chers sont dirigés vers mes parents, et en particulier toi, maman. Merci pour tout ce que tu m'as appris sur la belle histoire qu'est la vie, pour les valeurs que tu m'as inculquées afin que je devienne l'homme que je suis aujourd'hui mais aussi pour ton soutien sans faille. Ce travail de thèse est arrivé au bout et c'est en grande partie grâce à toi.

Mon affection va aussi à l'ensemble des amis et famille qui m'ont toujours soutenu et ont cru en moi : Patrice, mes sœurs (Pauline et Maureen), mon frère (Hugo), mes cousins (Gladys, Kewin, Camille), Carole, mamie, Florence, William, mes amis : Arthur, Florent, Valentin, Jeremy, Alicia, Alicia (bis), Camille, Candice et Aurélien, Marine, Clémentine et Arthur, Sophie, Guillaume, Léa et Steeve, Paul et Alisson, Maÿliss, ainsi qu'Assani... et sans oublier les Audoits : Nico, Jenny, Axel et Cléa.

Il faudrait de nombreuses pages pour remercier l'ensemble des personnes que j'ai croisé sur ce long et beau chemin, mais n'ayez aucun doute, je ne vous oublie pas. Alors à tous ceux qui ont été là pour moi, un seul mot certes court mais ô combien important : Merci !

Avant-propos

Ce travail de thèse a été effectué en collaboration entre le laboratoire « Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets » (CBMN, équipe Clip'In) de Pessac (33) sous la direction de Maud CANSELL (IPB/ENSCP) et le Département de Nutrition-Santé et Biochimie des Lipides de l'ITERG de Canéjan (33) sous la direction de Carole VAYSSE. Ce projet a été financé par l'Association Nationale Recherche Technologie (ANRT). Ce travail a permis d'émettre les communications suivantes :

- **Publications :**

Sehl A, Couédelo L, Fonseca L, Vaysse C, Cansell M (2018). A critical assessment of transmethylation procedures for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid quantification of lipid classes. *Food chemistry* 251:1-8.

Sehl A, Couédelo L, Chamekh-Coelho I, Vaysse C, Cansell M (2019). *In vitro* lipolysis and *in vivo* absorption of n-3 polyunsaturated fatty acids according to their chemical form. *British Journal of Nutrition*. (DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114519001491>)

- **Communications orales :**

Sehl A, Couédelo L, Vaysse C, Cansell M “*In vitro* lipolysis and *in vivo* absorption of omega-3 polyunsaturated fatty acids according to their chemical form”, Journée scientifique de l'école doctorale des sciences chimiques, 20 avril 2018, Talence, France

Sehl A, Coelho I, Couédelo L, Vaysse C, Cansell M “Influence of the n-3 fatty acid chemical form on their lipolysis and *in vivo* absorption”, EuroFedLipid, 17 septembre 2018, Belfast, Royaume-Uni.

Sehl A, Granet E, Couédelo L, Vaysse C, Cansell M “n-3 LC-PUFA are differently distributed into tissues according to their chemical form of intake”, EuroFedLipid, 17 septembre 2018, Belfast, Royaume-Uni.

Sehl A, Bourgeois C, Couëdelo L, Vaysse C, Subirade M, Cansell M “Impact de la formulation sur la biodisponibilité d’acides gras d’intérêt nutritionnel”, J-TECH, de l’alimentation à la nutrition, 13 Novembre 2018, Toulouse, France.

Sehl A, Couëdelo L, Coelho I, Granet E, Vaysse C, Cansell M “Effet de la forme moléculaire des AGPI-LC n-3 sur leur biodisponibilité nutritionnelle”, Webinaire ITERG, 15 Novembre 2018, Pessac, France.

- **Communications par affiche :**

Sehl A, Couëdelo L, Fonseca L, Vaysse C, Cansell M “Comparison of three (trans)methylation methods for n-3 LC-PUFA quantification in different lipid classes”, Journée scientifique du CBMN, 7 avril 2017, Pessac, France.

Sehl A, Couëdelo L, Fonseca L, Vaysse C, Cansell M “Comparison of three (trans)methylation methods for n-3 LC-PUFA quantification in different lipid classes”, Journée scientifique de l’école doctorale des sciences chimiques, 5 mai 2017, Talence, France.

Sehl A, Couëdelo L, Fonseca L, Vaysse C, Cansell M “Comparison of three (trans)methylation methods for n-3 LC-PUFA quantification in different lipid classes”, EuroFedLipid, 27-30 août 2017, Uppsala, Suède.

Sehl A, Couëdelo L, Coelho I, Vaysse C, Cansell M “ *In vitro* lipolysis and *in vivo* absorption of omega-3 polyunsaturated fatty acids according to their chemical form”, EuroFedLipid, 27-30 août 2017, Uppsala, Suède.

Sehl A, Coelho I, Couëdelo L, Vaysse C, Cansell M “Influence of marine phospholipid formulation on intestinal absorption of DHA”, EuroFedLipid, 16-19 septembre 2018, Belfast, Royaume-Unis.

Résumé

Impact de la forme moléculaire et supramoléculaire de vectorisation des acides gras polyinsaturés n-3 sur leur biodisponibilité

Etudes physico-chimiques et in vivo chez le rat

Les dernières données de consommation alimentaire de la population française démontrent que les apports nutritionnels en acide eicosapentaénoïque (EPA) et en acide docosahexaénoïque (DHA) sont nettement inférieurs aux recommandations fixées par l'Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). Compte tenu de leurs rôles physiologiques, l'amélioration de leur biodisponibilité est devenue une priorité nutritionnelle. La maîtrise des formes de vectorisation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série n-3 (AGPI-LC n-3) représente une piste d'intérêt afin de répondre à cette problématique. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse, visant à étudier l'influence de la forme moléculaire (*phospholipides (PL) vs triglycérides (TG)*) et/ou supramoléculaire (*phase continue, émulsion, liposomes*) de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur leur devenir métabolique.

La démarche expérimentale adoptée a consisté, dans un premier temps, à caractériser les différentes formes de vectorisation des AGPI-LC n-3 par un couplage de méthodes d'analyse physico-chimiques (microscopie optique, granulométrie, mesure des produits primaires et secondaires d'oxydation, lipolyse enzymatique). Les données obtenues ont permis de poser des hypothèses mécanistiques pour l'étude de la biodisponibilité chez le rat. Ainsi, dans un deuxième temps, l'étude *in vivo* a permis d'aborder (1) l'absorption intestinale des acides gras (AG) suite à un apport en bolus de lipides et (2) l'accrétion tissulaire suite à un régime de 8 semaines.

Les résultats indiquent que la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (*TG marins vs PL marins, en phase continue*) n'influence pas leur absorption intestinale mais plutôt leur incorporation dans les lipides lymphatiques, principaux transporteurs des AG alimentaires dans l'organisme. A l'inverse, la structuration des PL marins en milieu aqueux (*émulsion ou liposomes*), permet d'améliorer l'absorption de l'EPA et du DHA, de façon spécifique à la nature de la structuration supramoléculaire. Les résultats de l'accrétion tissulaire montrent qu'au terme des 8 semaines de régime, l'enrichissement tissulaire en AGPI-LC n-3 s'effectue de façon différente selon leur forme moléculaire de vectorisation. Ainsi, la consommation de TG marins favorise l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les lipides hépatiques, alors que la

supplémentation des régimes en PL marins permet d'orienter le DHA vers le cerveau et la rétine.

L'ensemble de ces résultats montre que le choix de la **forme moléculaire de vectorisation** des AGPI-LC n-3 (*PL vs TG*) peut être un moyen d'orienter leur incorporation tissulaire, alors que leur **structuration supramoléculaire** (*émulsion ou liposomes*), une stratégie pour moduler leur absorption intestinale.

Mots clés : Acides gras polyinsaturés oméga-3 ; acide eicosapentaénoïque ; acide docosahexaénoïque ; triglycérides ; phospholipides ; biodisponibilité.

Influence of the molecular and supramolecular form of targeting of n-3 polyunsaturated fatty acids on their bioavailability

Physicochemical and in vivo studies in rats

The latest data from the cross-sectional national French dietary study show that dietary intakes of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are significantly lower than those recommended by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Anses). Considering their physiological roles, improving their dietary intake has become a nutritional priority. The control of the different forms of n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LC-PUFA) intake represents an interesting way to address this issue. In this context, this thesis aims at studying the influence of the molecular form (*phospholipids (PL) vs triglycerides (TG)*) and/or supramolecular form (*bulk phase, emulsion, liposomes*) of n-3 LC-PUFA towards their bioavailability.

The experimental approach consisted in characterizing the different forms of n-3 LC-PUFA by coupling various physicochemical methods (optical microscopy, granulometry, measurement of primary and secondary oxidation products, enzymatic lipolysis). The data obtained made it possible to propose some mechanistic hypothesis for the bioavailability studies conducted in rat. Thus, in a second step, the *in vivo* study made addresses (1) the intestinal absorption of fatty acids following a single dose of lipids and (2) the lipid tissue accretion following an 8-week diet.

The data obtained from the intestinal absorption study indicate that the molecular form of n-3 LC-PUFA targeting (*marine TG vs marine PL, in continuous phase*) does not influence their intestinal absorption but rather their incorporation into lymphatic lipids, which are the main carriers for dietary fatty acids in the organism. Conversely, structuring marine PL (*emulsion or liposomes*) improves the EPA and DHA absorption, but differently according to the supramolecular form. The results concerning tissue accretion show that, after 8-week diet, the tissue enrichment in n-3 LC-PUFA is different according to the molecular form of targeting. The consumption of marine TG favours the incorporation of n-3 LC-PUFA into hepatic lipids, while the supplementation of diets with marine PL targets DHA preferentially to brain and retina.

All these results show that the **molecular form of targeting** (*PL vs TG*) of n-3 LC-PUFA can be a way for managing their tissue incorporation, whereas the **supramolecular organization** (*emulsion or liposomes*) can be envisaged to monitor their intestinal absorption.

Keywords: omega-3 polyunsaturated fatty acids; eicosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid; triglycerides; phospholipids; bioavailability.

Unité de recherche

Institut des corps gras (ITERG) – équipe Nutrition-Santé et Biochimie des lipides

ZA Pessac-Canéjan, 11 rue Gaspard Monge, 33610 Canéjan

Institut Chimie et Biologie des Membranes et Nano-objets – équipe CLIP'IN

Allée Geoffroy Saint Hilaire, Bât B14, 33600 Pessac

Ce travail de thèse a été réalisé dans le cadre d'une convention CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) n°2015-1182 entre l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT), l'ITERG et le laboratoire CBMN. Ce projet fait partie du programme de recherche de l'UMT ACTIA – FOLIES (formulation of lipid emulsified systems).



Sommaire

<i>Avant-propos</i>	1
<i>Résumé</i>	3
<i>Unité de recherche</i>	9
<i>Liste des figures</i>	17
<i>Liste des tableaux</i>	19
<i>Liste des abréviations</i>	23
Introduction générale	29
Chapitre 1 – Contexte bibliographique	33
1. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série n-3 et leurs intérêts nutritionnels ..	35
1.1. Les sources en AGPI-LC n-3	36
1.2. Les rôles physiologiques des AGPI-LC n-3	38
1.2.1. Un rôle structural en tant que composants des phospholipides membranaires	38
1.2.2. Un rôle des AGPI-LC n-3 en tant que précurseurs de molécules bioactives.....	39
1.2.3. Un rôle des AGPI-LC n-3 dans la régulation de l'expression génique	40
1.3. Les effets « santé » d'une supplémentation en AGPI-LC n-3	42
2. La biodisponibilité des lipides et les facteurs d'influence	45
2.1. Rappel sur la digestion et l'absorption intestinale des lipides alimentaires	45
2.2. Le transport des lipides depuis le compartiment lymphatique vers la circulation sanguine	50
2.3. Les facteurs modulant la biodisponibilité des AGPI-LC n-3.....	55
2.3.1. La modulation de la biodisponibilité d'une huile par l'échelle supramoléculaire : cas de l'émulsification d'une huile de poisson	56
2.3.2. La modulation de la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 par l'échelle moléculaire	58
2.3.2.1. La structure glycéridique des TG marins.....	58
2.3.2.2. Les espèces moléculaires des AGPI-LC n-3.....	60
3. Objectifs des travaux de thèse	75
Chapitre 2 – Matériels et méthodes	79
1. Matériels	81
1.1. Molécules lipidiques.....	81
1.1.1. Huiles végétales et marines.....	81
1.1.2. Lécithine marine et lécithines de soja	83
1.1.3. Autres produits.....	85
1.2. Modèle animal : le rat	87
2. Caractérisation des lipides	87
2.1. Extraction des lipides totaux selon la méthode de Folch.....	87
2.2. Séparation des fractions lipidiques par chromatographie sur couche mince	88
2.3. Extraction des fractions lipidiques du gel de silice après chromatographie sur couche mince	88
2.4. (Trans)méthylation des lipides	89
2.5. Analyse des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse	90
2.6. Analyse de la structure glycéridique des lipides par méthode enzymatique.....	91

2.6.1.	Structure des triglycérides des huiles végétales et marines et des triglycérides lymphatiques	91
2.6.2.	Structure des phospholipides de la lécithine marine et des phospholipides lymphatiques ..	92
3.	Préparation et caractérisation des formules lipidiques	93
3.1.	Préparation des formules lipidiques	93
3.1.1.	Fractionnement des phospholipides marins	93
3.1.2.	Composition des formules lipidiques	93
3.1.3.	Emulsification des formules lipidiques	97
3.1.4.	Préparation des liposomes	97
3.2.	Caractérisation physique des milieux dispersés.....	98
3.2.1.	Microscopie à contraste de phase.....	98
3.2.2.	Granulométrie laser	98
3.2.3.	Potentiel zêta ζ	98
3.3.	Caractérisation chimique des formules lipidiques	99
3.3.1.	Dosage des diènes conjugués dans les formules lipidiques	99
3.3.2.	Dosage des aldéhydes volatils	99
4.	Etude <i>in vitro</i> de la digestion gastro-intestinale des formules lipidiques.....	101
4.1.	Conditions <i>in vitro</i> de la digestion gastro-intestinale.....	101
4.2.	Extraction des lipides et détermination du taux de lipolyse	102
5.	Etude <i>in vivo</i> de l'absorption intestinale des lipides et du métabolisme entérocytaire.....	103
6.	Etude <i>in vivo</i> de l'accrétion tissulaire des AGPI-LC n-3	104
6.1.	Composition des régimes	104
6.2.	Protocole de supplémentation des rats	105
6.3.	Etude de l'accrétion des AGPI-LC n-3	105
6.4.	Caractérisation du plasma.....	106
6.4.1.	Cholestérolémie	106
6.4.2.	Dosage des lipoprotéines plasmatiques HDL et VLDL/LDL	107
6.4.3.	Triglycéridémie	107
6.5.	Etude de la peroxydation lipidique : dosage du dialdéhyde malonique dans le foie.....	108
6.6.	Etude du stress oxydant	109
6.6.1.	Analyse du monoxyde d'azote plasmatique.....	109
6.6.2.	Dosage des activités des enzymes du système antioxydant	110
6.6.2.1.	Préparation des extraits enzymatiques de foie.....	110
6.6.2.2.	Mesure de l'activité des enzymes antioxydantes	110
6.6.2.3.	Dosage des protéines totales.....	113
7.	Traitement statistique des données	113
Chapitre 3 – Résultats et discussions		117
1.	Caractérisation des formules lipidiques enrichies en AGPI-LC n-3.....	119
1.1.	Caractérisation physique des milieux dispersés.....	119
1.2.	Etude de la stabilité oxydative des formules lipidiques	122
1.2.1.	Effet antioxydant des phospholipides	124
1.2.2.	Stabilité chimique des formules lipidiques, en milieu dispersé	126
1.2.2.1.	Effet de l'émulsification sur l'oxydation des AGPI-LC n-3	126
1.2.2.2.	Effet de la structuration des PL marins en liposomes	128
1.3.	Etude <i>in vitro</i> de la lipolyse des formules lipidiques	130
1.4.	Conclusion	134

2. Métabolisme intestinal des AGPI-LC n-3 chez le rat en fonction de leur forme physico-chimique de vectorisation.....	135
2.1. Effet de la forme moléculaire des AGPI-LC n-3 (TG vs PL) en phase continue	137
2.1.1. Effet de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur leur absorption intestinale	137
2.1.2. Effet de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur leur incorporation dans les lipides lymphatiques.....	138
2.2. Effet de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (TG vs PL) sous forme d'émulsion ..	147
2.2.1. Effet de l'émulsification et de la nature de l'interface huile/eau sur l'absorption intestinale des acides gras	147
2.2.2. Effet de l'émulsification sur l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les lipides lymphatiques.....	151
2.3. Effet de la forme supramoléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (émulsion vs liposomes)..	157
2.3.1. Effet de la structuration des PL marins sur l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3	158
2.3.2. Effet de la structuration des PL marins sur l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les lipides lymphatiques	160
2.4. Conclusion	165
3. Devenir métabolique des AGPI-LC n-3 chez le rat	168
3.1. Modification du profil lipidique plasmatique	169
3.2. Etude de l'accrétion tissulaire des AGPI-LC n-3	171
3.2.1. Le foie et le plasma, organes clés du métabolisme lipidique	171
3.2.1.1. Le foie	171
3.2.1.2. Le plasma	174
3.2.1.3. Discussion.....	178
3.2.2. Les globules rouges, marqueurs de l'incorporation membranaire des AGPI-LC n-3	179
3.2.3. Le cerveau et la rétine : des tissus cibles pour les AGPI-LC n-3	181
3.2.3.1. Le cerveau	181
3.2.3.2. La rétine	186
3.2.3.3. Discussion.....	190
3.3. Etude du stress oxydant	191
3.3.1. Le MDA, marqueur de la peroxydation lipidique	192
3.3.2. Etude du système antioxydant	193
3.4. Discussion sur l'influence de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 : TG vs PL ..	196
Chapitre 4 – Conclusion et perspectives	201
Références bibliographiques	209
Annexes.....	237
Annexe 1 : Dosage des phospholipides par résonance magnétique nucléaire du phosphore (³¹P RMN)	239
Annexe 2 : A critical assessment of transmethylaton procedures for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid quantification of lipid classes. Sehl A., Couëdelo L., Fonseca L., Vaysse C., Cansell M. (2018). <i>Food Chem</i> 251, 1-8.....	241
Annexe 3 : Composition complète en acides gras des formules lipidiques.....	283
Annexe 4 : Dosage des tocophérols et tocotriénols des formules lipidiques par chromatographie liquide à haute performance.....	285
Annexe 5 : Composition nutritionnelle détaillée des régimes expérimentaux	287

Annexe 6 : Evaluation de la stabilité oxydative des régimes expérimentaux.....	289
Annexe 7 : Caractérisation des espèces moléculaire de PL du cerveau et de la rétine par spectrométrie de masse.....	291
Annexe 8 : Dosage de l'activité des enzymes catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase par kit enzymatique.....	293
Annexe 9 : Profil granulométrique des émulsions TG _{n-3} +PL _{veg} et TG _{veg} +PL _{n-3} et des liposomes préparés à partir des PL _{n-3}	297
Annexe 10 : In vitro lipolysis and in vivo absorption of omega-3 polyunsaturated fatty acids according to their chemical form. Sehl A., Couëdelo L., Chamekh-Coelho L., Vaysse C., Cansell M. (2019). <i>British Journal of Nutrition</i>	299

Liste des figures

Figure 1 : Schéma des principales fonctions physiologiques exercées par les AGPI-LC n-3 dans l'hépatocyte	42
Figure 2 : Schéma général des étapes de digestion et d'absorption intestinale des TG et PL alimentaires	48
Figure 3 : Principales voies de synthèse des lipides dans l'entérocyte	50
Figure 4 : Circulation des lipides et échanges avec les différents tissus <i>via</i> le métabolisme des lipoprotéines de faible densité (chylomicrons et LDL)	52
Figure 5 : Circulation des lipides et échanges avec les différents tissus hépatiques et extra-hépatiques <i>via</i> le métabolisme des lipoprotéines de haute densité.....	54
Figure 6 : Définition de l'acronyme SLAMENGI résumant l'ensemble des facteurs modulant la biodisponibilité des caroténoïdes selon West and Castenmiller, 1998	55
Figure 7 : Représentation schématique d'une émulsion	56
Figure 8 : Représentation schématique d'un liposome multilamellaire	73
Figure 9 : Représentation schématique de l'éthanololyse des TG par la lipase B (<i>Candida antarctica</i>).....	92
Figure 10 : Principe du dosage enzymatique du cholestérol total et libre	106
Figure 11 : Formation du complexe MDA/ TBA (image adaptée de www.Biotek.com)	109
Figure 12 : Principe des dosages des activités superoxide dismutase, catalase et glutathione peroxydase.....	112
Figure 13 : Observations en microscopie optique à contraste de phase des milieux dispersés.....	121
Figure 14 : Schéma général de la peroxydation lipidique impliquant des réactions multiples et simultanées, proposé par Schaich, 2012	123
Figure 15 : Schéma de la formation des diènes conjugués d'un acide gras.....	124
Figure 16 : Evolution cinétique de l'indice de diènes conjugués ($I_{DC} = DO_{232} / \text{mg de lipides}$) des formules lipidiques enrichies en huiles de poisson (○ TG _{n-3} ; △ TG _{n-3} +PL _{veg} ; □ TG _{veg} +PL _{n-3}), stockées à 60°C, dans des coupelles en cuivre.....	125
Figure 17 : Cinétique d'évolution de la concentration de propanal (nmoles de propanal/kg de lipides) de la formule TG _{n-3} +PL _{veg} en phase continue (—) et en émulsion (- - -), à 37°C	127
Figure 18 : Cinétique d'évolution de la concentration de propanal (nmoles de propanal/kg de lipides) pour différentes formes de structuration des PL marins de la formulation TG _{veg} +PL _{n-3} : en phase continue (—), en émulsion (- - -) et sous forme de liposomes (- ■ -), à 37°C.....	129
Figure 19 : Taux de lipolyse gastro-intestinale <i>in vitro</i> des formules lipidiques : TG _{veg} +PL _{veg} (◇), TG _{n-3} (○), TG _{n-3} +PL _{veg} (△) et TG _{veg} +PL _{n-3} (□) sur une cinétique de 90 minutes	132

Figure 20 : Hypothèses de la digestion, de l'absorption intestinale et de l'incorporation du DHA dans les lipides lymphatiques après un apport d'une formule en phase continue, enrichie en huiles de poisson supplémentées ou non en lécithine de soja (TG _{n-3} et TG _{n-3} +PL _{veg})	145
Figure 21 : Hypothèses de la digestion, de l'absorption intestinale et de l'incorporation du DHA dans les lipides lymphatiques après un apport d'une formule en phase continue, d'huiles végétales supplémentées en PL marins (TG _{veg} +PL _{n-3})	146
Figure 22 : Hypothèses de la digestion, de l'absorption intestinale et de l'incorporation des AG des formules lipidiques selon leur forme physique d'apport (phase continue vs en émulsion).....	156
Figure 23 : Hypothèses de la digestion, de l'absorption intestinale et de l'incorporation des AG estérifiés dans des PL marins selon leur forme physique d'apport (phase continue, émulsion ou liposomes)	164
Figure 24 : Profil en espèces moléculaires des phospholipides du cerveau, chez le rat soumis à 8 semaines de régime ¹	184
Figure 25 : Profil en espèces moléculaires des phospholipides de la rétine, chez le rat soumis à 8 semaines de régimes ¹	189
Figure 26 : Concentration hépatique en dialdéhyde malonique (nmol/mg de protéines hépatiques), comme marqueur de la peroxydation lipidique, chez le rat soumis à 8 semaines de régime ¹	192
Figure 27 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses de l'effet inducteur des AGPI-LC n-3 vis-à-vis de l'activité des enzymes antioxydantes.....	195

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de produits riches ou concentrés en EPA et en DHA	37
Tableau 2 : Caractéristiques des différentes lipoprotéines plasmatiques ¹ (adapté de Feingold and Grunfeld, 2000; Jonas, 2000; Ramasamy, 2014)	51
Tableau 3 : Répartition (%) en position <i>sn</i> -2 de l'EPA et du DHA des TG dans des huiles marines	58
Tableau 4 : Etudes conduites chez l'animal visant à comparer l'influence de la forme moléculaire (PL vs TG) d'apport des lipides sur la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 en période post-prandiale	61
Tableau 5 : Etudes conduites chez l'animal visant à comparer l'influence de la forme moléculaire (PL vs TG) d'apport des lipides sur la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 au cours de régime à court et long terme	62
Tableau 6 : Effets de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (TG vs PL) sur leur accrétion tissulaire	72
Tableau 7 : Profil en acides gras (moles%) des différentes huiles marines et végétales	82
Tableau 8 : Classes de phospholipides (% phospholipides totaux) de la lécithine marine et de la lécithine de soja identifiées par ³¹ P RMN	83
Tableau 9 : Profil en acides gras (moles%) des phospholipides de la lécithine marine et des lécithines de soja ..	84
Tableau 10 : Produits, pureté et origine utilisés	85
Tableau 11 : Composition des solvants de migration selon les espèces lipidiques à séparer	88
Tableau 12 : Temps de (trans)méthylation à 100°C utilisés	90
Tableau 13 : Standards internes utilisés pour la quantification pondérale des lipides	91
Tableau 14 : Composition des huiles et lécithine des 5 formules lipidiques utilisées	94
Tableau 15 : Profil en principaux acides gras (moles%) des formules lipidiques	95
Tableau 16 : Répartition (%) en position <i>sn</i> -2 des principaux acides gras des triglycérides du mélange d'huiles de poisson et des phospholipides marins utilisés dans les formules lipidiques	96
Tableau 17 : Composition des vitamines E (mg/ kg de matière grasse) des formules lipidiques	97
Tableau 18 : Volumes de formule lipidique utilisés pour la détermination des composés volatils dans l'espace de tête	100
Tableau 19 : Composition générale des régimes alimentaires (g/100 g de poudre sèche)	104
Tableau 20 : Tableau récapitulatif des différentes études menées dans ce travail de thèse	114
Tableau 21 : Profil en acides gras (moles%) et concentration (mg/mL de lymphé) des lipides totaux de la lymphé sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats	138

Tableau 22 : Profil en acides gras (moles%) et concentration (mg/mL de lymphé) des fractions lymphatiques TG et PL sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats.....	140
Tableau 23 : Répartition (%) en <i>sn</i> -2 des principaux acides gras estérifiés des TG et des PL lymphatiques sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats.....	141
Tableau 24 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux de la lymphé sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats	149
Tableau 25 : Profil en acides gras (moles%) et concentration (mg/mL de lymphé) des fractions lipidiques lymphatiques TG et PL sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats.....	152
Tableau 26 : Répartition (%) en <i>sn</i> -2 des principaux acides gras estérifiés des TG et des PL lymphatiques sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats.....	154
Tableau 27 : Profil en acides gras (moles%) et concentration (mg/mL de lymphé) des lipides totaux de la lymphé sur les 6h suivant l'administration de la formule supplémentée en PL marins (TG _{veg} +PL _{n-3}) sous trois formes physiques différentes.....	159
Tableau 28 : Profil en acides gras (moles%) et concentration (mg/mL de lymphé) des fractions TG et PL lymphatiques sur les 6h suivant l'administration de la formule supplémentée en PL marins (TG _{veg} +PL _{n-3}) sous trois formes physiques différentes	161
Tableau 29 : Répartition (%) en <i>sn</i> -2 des principaux acides gras estérifiés des TG et des PL lymphatiques sur les 6h suivant l'administration de la formule supplémentée en PL marins (TG _{veg} +PL _{n-3}) sous trois formes physiques différentes.....	162
Tableau 30 : Résumé des effets de la forme physico-chimique de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur la composition lipidique de la lymphé, sur les 6h suivant l'administration gastrique des différentes formules lipidiques chez le rat	166
Tableau 31 : Paramètres lipidiques du plasma (mmol/L de plasma) chez le rat soumis à 8 semaines de régime	169
Tableau 32 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux du foie chez le rat soumis à 8 semaines de régime	172
Tableau 33 : Profil en acides gras (moles%) des fractions phospholipides, triglycérides et esters de cholestérol du foie, chez le rat soumis à 8 semaines de régime	173
Tableau 34 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux du plasma chez le rat soumis à 8 semaines de régime	175
Tableau 35 : Profil en acides gras (moles%) des fractions phospholipides, triglycérides et esters de cholestérol du plasma, chez le rat soumis à 8 semaines de régime.....	176
Tableau 36 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux des globules rouges, chez le rat soumis à 8 semaines de régime	180
Tableau 37 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux du cerveau, chez le rat soumis à 8 semaines de régime	183

Tableau 38 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux de la rétine, chez le rat soumis à 8 semaines de régime	187
Tableau 39 : Taux plasmatique en monoxyde d'azote et activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase) dans le foie de rat après 8 semaines de régime	194
Tableau 40 : Résumé des effets de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur leur accrétion tissulaire chez le rat soumis à un régime de 8 semaines	197

Liste des abréviations

Σ	somme
α -GPC	α -glycérophosphorylcholine
4-HHE	4-hydroxyhexenal
4-HNE	4-hydroxynonenal
ABCA1	ATP-binding cassette A1
ACAT	acyl-CoA cholestérol acyl transférase
ACOT2	acyl-CoA thioestérase 2
ACS	acylCoA synthétase
AET	apport énergétique total
AG	acides gras
AGL	acides gras libres
AGL 17:0	acide heptadécanoïque
AGMI	acides gras monoinsaturés
AGPI	acides gras polyinsaturés
AGPI-LC	acides gras polyinsaturés à longue chaîne
AGS	acides gras saturés
ALA	acide α -linoléinique
ANC	apports nutritionnels conseillés
ANOVA	analyse de variance
Anses	Agence nationale de santé sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AOX	acyl-Coa oxydase
Apo	apolipoprotéine
ARA	acide arachidonique
AREDS2	age related eye disease study
ATP	adenosine triphosphate
BHT	hydroxytoluène butylé
CaCl ₂	chlorure de calcium

CAT	catalase
CCM	chromatographie sur couche mince
CEL	carboxyl ester lipase
CETP	protéine de transfert d'EC
ChREBP	protéine de liaison à l'élément de réponse des carbohydrates
CL-IP-SM/SM	chromatographie liquide en phase inverse couplée à un spectromètre de masse en tandem
CLHP	chromatographie liquide à haute performance
CM	chylomicrons
COX	cyclo-oxygénase
CPG	chromatographie en phase gazeuse
CYP	cytochrome P450
DCF	dichlorofluorescéine
DG	diglycéride
DGAT	diacylglycerol acyltransferase
DHA	acide docosahexaénoïque
DMLA	dégénérescence maculaire liée à l'âge
DPA	acide docosapentaénoïque
DTT	dithiothréitol
EC	ester de cholestérol
EC 22:0	5-cholesten-3 β -yl-docosanoate
EDTA	acide éthylènediaminetétraacétique
EEAG	ester éthylique d'acide gras
EMAG	ester méthylique d'acide gras
EPA	acide eicosapentaénoïque
FABP	protéine de liaison aux AG
FABPpm	protéine de liaison aux AG associée à la membrane plasmique
FAS	fatty acid synthase
FAT/CD36	transporteur d'AG/ cluster de différenciation 36
FATP	protéines de transport des AG
FID	détecteur à ionisation de flamme

G3P	glycérol-3-phosphate
GPAT	glycerol-3-phosphate acyltransferase
GPx	glutathion peroxydase
GR	globules rouges
GSH	glutathion sous sa forme réduite
GSSG	glutathion sous sa forme oxydée
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HCl	acide chlorhydrique
HDL	lipoprotéines de haute densité
HF	régime hyperlipidique
HMG-CoA réductase	hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A
HRP	peroxydase de raifort
I _{bc}	indice de diènes conjugués
IDL	lipoprotéines de densité intermédiaire
INCA	étude individuelle nationale des consommations alimentaires
KCl	chlorure de potassium
KI	iodure de potassium
LA	acide linoléique
LCAT	lécithine-cholestérol acyltransferase
LDL	lipoprotéines de faible densité
LDLr	récepteur aux LDL
LE	lipase endothéliale
LF	régime normolipidique
LH	lipase hépatique
LOX	lipoxygénase
LPA	acide lysophosphatidique
LPAAT	acide lysophosphatidique acyltransferase
LPCAT	lysophosphatidylcholine acyltransferase
LPL	lipoprotéine lipase
LRP	récepteur relaté du LDLr
LysoPL	lysophospholipide

LXR	récepteur hépatique X
MDA	dialdéhyde malonique
MG	monoglycéride
MGAT	monoacylglycerol acyltransferase
Mfsd2a	major facilitator superfamily domain-containing protein 2
MTTP	protéine de transfert microsomal de TG
NaCl	chlorure de sodium
NADP	nicotinamide adénine diphosphate
NaOH	hydroxyde de sodium (soude)
NADPH	nicotinamide adénine diphosphate hydrogénée
NAT-2	nutritional AMD treatment
NO	monoxyde d'azote
NO ₂ ⁻	nitrite
NO ₃ ⁻	nitrate
PA	acide phosphatidique
PAP	phosphatidate phosphatase
PBS	tampon phosphate salin
PC	phosphatidylcholine
PC 17:0	1,2-diheptadécanoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine
PE	phosphatidyléthanolamine
PG	phosphatidylglycérol
PI	phosphatidylinositol
PL	phospholipide
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLRP1/2	lipase pancréatique relatée 1/2
PLTP	protéine de transfert de PL
PNNS	programme national nutrition santé
Positions <i>sn</i> -1/3	positions externes du squelette glycérol
Position <i>sn</i> -2	position interne du squelette glycérol
PPAR	récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PS	phosphatidylsérine

RAR	récepteur à l'acide rétinoïque
RMN	résonance magnétique nucléaire
RXR	récepteur aux rétinoïdes
SAR1B	secretion associated Ras GTPase 1B
SCD1	stéaryl-CoA Désaturase 1
SM	sphingomyéline
SOD	superoxyde dismutase
SR-B1	scavenger receptor B1
SREBP	protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols
TBA	acide thiobarbiturique
TCA	acide trichloroacétique
TEP	tétraméthoxytétraéthoxypropane
TG	triglyceride
TG 17:0	1,2,3-triheptadécanoyl-sn-glycérol
TG _{veg}	phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3
TG _{veg} +PL _{veg}	formule dépourvue d'AGPI-LC n-3 à base d'huiles végétales supplémentées en lécithine de soja
TG_{n-3}	formule enrichie en huiles de poisson (<i>AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG</i>)
TG_{n-3}+PL_{veg}	formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (<i>AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG</i>)
TG _{veg} + PL_{n-3}	formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (<i>AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL</i>)
UV	ultraviolet
VLDL	lipoprotéines de très faible densité

Introduction générale

Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série oméga-3 (AGPI-LC n-3), *i.e.* l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), ont suscité un intérêt croissant depuis les années 1970, notamment suite à l'étude épidémiologique concernant les Esquimaux du Groenland (Bang and Dyerberg, 1972). Cette population caractérisée par une forte consommation de poissons (Bang et al., 1980) apparaissait relativement protégée des maladies cardio-vasculaires. Depuis, les études épidémiologiques et d'intervention se sont multipliées de sorte que les effets cardio-protecteurs des AGPI-LC n-3 sont maintenant très bien documentés. C'est pourquoi, en France, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) préconise une consommation quotidienne de 250 mg pour chacun des deux AGPI-LC n-3 (EPA et DHA) (Astorg et al., 2011). Or, les derniers résultats de consommation alimentaire de la population adulte française (18-79 ans) (3^{ème} étude individuelle nationale des consommations alimentaires - INCA 3, 2017) révèlent que, si l'apport quotidien moyen en lipides totaux est en adéquation avec les recommandations (34% de l'apport énergétique total (AET) pour des recommandations de 35-40%), les apports en EPA et en DHA sont nettement inférieurs aux avis officiels (Avis et rapport de l'Anses sur la 3^{ème} étude individuelle nationale des consommations alimentaires - INCA 3, 2017). Ainsi, les consommations actuelles moyennes en EPA et en DHA (respectivement, 117,3 et 169,2 mg/j) sont près de 50% et 30% inférieures aux préconisations. Ce déficit de consommation monte à 70% si on considère les consommations médianes (50,8 et 65,1 mg/j, pour l'EPA et le DHA, respectivement). C'est pourquoi l'une des priorités du Programme National Nutrition Santé (PNNS) est d'augmenter l'apport en AGPI-LC n-3 dans la population française, sans pour autant modifier l'apport en lipides totaux. Une des réponses apportées par l'industrie agroalimentaire a été la formulation d'aliments fonctionnels enrichis en AGPI n-3. Néanmoins, il est aujourd'hui admis que la quantité consommée d'un nutriment ne correspond pas à sa quantité biologiquement active : c'est la notion de **biodisponibilité**. En effet, avant d'atteindre l'organe cible, les nutriments sont soumis à des processus complexes allant de leur digestion et leur absorption intestinale (**bioaccessibilité**), en passant par leur transport dans l'organisme, jusqu'à leur accréation dans les différents tissus où ils seront métabolisés pour être dégradés, stockés ou utilisés à des fins physiologiques (**bioactivité**).

C'est dans le contexte d'une meilleure maîtrise de la biodisponibilité des nutriments par la formulation des lipides que s'inscrit ce travail de thèse. Plus précisément, les études

menées visent à comprendre l'influence des formes de vectorisation des AGPI-LC n-3, aussi bien moléculaires que supramoléculaires, sur la bioaccessibilité des lipides ainsi que sur leur devenir métabolique au niveau des tissus cibles. Le premier chapitre de ce manuscrit présente un état de l'art sur l'intérêt nutritionnel des AGPI-LC n-3 et les paramètres modulant la biodisponibilité de l'EPA et du DHA. L'ensemble des méthodes et techniques mises en œuvre pour les différentes études est présenté dans le deuxième chapitre. Trois axes constituent le chapitre « Résultats & discussion ». Le premier axe présente la caractérisation physico-chimique des différentes formules lipidiques enrichies en AGPI-LC n-3 qui sont utilisées dans les différentes études. Le deuxième axe concerne l'influence des formes de vectorisation, moléculaires et supramoléculaires, des AGPI-LC n-3 sur leur absorption intestinale et le métabolisme entérocytaire, étudié chez le rat *via* un modèle de fistulation du canal lymphatique. Enfin, le troisième axe expose l'impact de la forme moléculaire d'apport des AGPI-LC n-3 sur leur devenir métabolique dans certains tissus cibles suite à un régime à long terme, mené chez le rat. Etant donné que les AGPI n-3 sont sensibles à l'oxydation, nous aborderons aussi, dans cette dernière partie, les conséquences de l'apport d'un régime enrichi en AGPI-LC n-3 sur la peroxydation lipidique et le stress oxydant *in vivo*. Les différentes parties sont conclues par une approche mécanistique du métabolisme des lipides selon les formes moléculaires et supramoléculaires de vectorisation des AGPI-LC n-3. La conclusion générale permet de discuter de la pertinence de préconiser une ou des formulation(s) adéquate(s) en fonction des objectifs nutritionnels visés.

Chapitre 1

Contexte bibliographique

1. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la série n-3 et leurs intérêts nutritionnels

Parmi les AGPI n-3, trois acides gras tiennent un rôle majeur sur le plan nutritionnel : l'acide α -linoléique (ALA ; 18:3 n-3), l'EPA (20:5 n-3) et le DHA (22:6 n-3). Seuls les organismes du règne végétal ont la capacité de synthétiser l'ALA à partir de l'acide oléique (18:1 n-9) puisqu'ils possèdent les Δ 12- et Δ 15-désaturases, nécessaires à la désaturation de la chaîne carbonée des AG en C18. Ces enzymes étant absentes du règne animal, l'homme est incapable de synthétiser l'ALA. C'est pourquoi l'ALA est un acide gras (AG) dit **indispensable** et doit être apporté par l'alimentation. Au niveau hépatique, l'ALA peut servir de précurseur pour la synthèse des dérivés à longue chaîne. Ce processus fait intervenir les activités successives d'enzymes impliquées dans les étapes de désaturation (Δ 5- et Δ 6-désaturases) et d'élongation (élongases 2 et 5) de la chaîne carbonée. Cependant, seule une faible proportion d'ALA (<20%) est convertie en dérivés à longue chaîne, EPA (8 à 21%) et DHA (0,05 à 9%) (Burdge and Wootton, 2002 ; Arterburn et al., 2006 ; Harnack et al., 2009 ; Blanchard et al., 2013). Une des raisons pour lesquelles cette conversion est faible réside dans le fait que l'ALA est rapidement engagé dans la voie catabolique de la β -oxydation, limitant sa disponibilité pour la synthèse des AGPI-LC n-3 (Clouet et al., 1989 ; Vermunt et al., 2000 ; Burdge, 2004, 2006 ; Arterburn et al., 2006). De plus, les mêmes désaturases et élongases sont impliquées dans la biosynthèse des AGPI-LC n-6 (Nakamura and Nara, 2004). Il existe donc une compétition entre les deux voies de synthèse, celle des AGPI n-6 à partir de son précurseur l'acide linoléique (LA, 18:2 n-6) et celle des AGPI n-3 à partir de l'ALA, et ce d'autant plus que le rapport LA/ALA dans l'alimentation est de l'ordre de 10 à 20 (Jensen et al., 1997 ; Hussein et al., 2005 ; Simopoulos, 2010). Ainsi, la synthèse *de novo* des AGPI-LC n-3 à partir de l'ALA ne permet pas de couvrir les besoins physiologiques. C'est pourquoi l'EPA et le DHA, classés en tant qu'AG **essentiels**, doivent être apportés en quantité suffisante *via* l'alimentation. Cette partie vise donc à rappeler les sources alimentaires des AGPI-LC n-3, les intérêts physiologiques de ces AG ainsi que leurs effets protecteurs vis-à-vis de la prévention de certaines pathologies.

1.1. Les sources en AGPI-LC n-3

Les sources alimentaires d'AGPI-LC n-3 sont essentiellement issues du milieu marin. Les poissons gras, tels que le saumon ou le hareng, sont naturellement riches en EPA et DHA (entre 1,4 et 2,7 g d'EPA + DHA/100 g de chair selon les poissons considérés ; Table de composition nutritionnelle des aliments, Ciqual, 2017) (**Tableau 1**). Néanmoins, les problématiques d'ordre (1) écologique liée à la surpêche, (2) sanitaire en raison d'un risque de contamination aux métaux lourds, (3) sensorielle de par la forte odeur de poisson et, plus récemment (4) la désaffection pour les produits d'origine animale, ont poussé les industriels à chercher de nouvelles sources naturelles d'AGPI-LC n-3. C'est pourquoi, on assiste à un intérêt croissant pour les microorganismes tels que les microalgues (Guedes et al., 2011 ; Adarme-Vega et al., 2012 ; Echeverría et al., 2017).

Lorsque l'EPA et le DHA ne proviennent pas directement des aliments, de l'huile concentrée en AGPI-LC n-3 est utilisée soit pour enrichir certaines denrées (céréales, lait, jus de fruits, ...) (Kolanowski and Laufenberg, 2006), soit en tant que complément alimentaire (**Tableau 1**). Dans les huiles extraites de sources naturelles (*i.e.* poissons, algues), l'EPA et le DHA se trouvent estérifiés dans des molécules de triglycérides (TG). Les AGPI-LC n-3 peuvent également se trouver sous d'autres formes synthétiques (*i.e.* acides gras libres ou esters éthyliques), ou être ré-estérifiés dans des TG pour étendre les rapports EPA/DHA des huiles (Kolanowski and Laufenberg, 2006; Echeverría et al., 2017). Plus récemment, le marché des AGPI-LC n-3 a vu apparaître d'autres formes moléculaires d'apport de ces AG telles que les huiles issues du krill ou d'œufs de poisson, dans lesquelles l'EPA et le DHA sont estérifiés dans des molécules de phospholipides (PL).

Ainsi, les AGPI-LC n-3 peuvent se présenter sous différentes formes moléculaires *via* des ressources naturelles ou synthétiques. Appréhender leurs rôles physiologiques ainsi que leurs effets santé est donc une nécessité pour les autorités sanitaires et les industriels.

Tableau 1 : Exemples de produits riches ou concentrés en EPA et en DHA

	EPA	DHA
	<i>g/100 g de lipides</i>	
Huiles naturelles¹		
Poissons^a		
Saumon	13,0	18,2
Hareng	6,3	4,2
Sardine	10,1	10,7
Foie de morue	8,9	10,9
Microalgues^b		
Schizochytrium sp.		
Algae Omega (Nordic Naturals)	19,5	39,0
Omegavie® DHA 400 algae (Polaris)	ND	≈ 36*
Life's Omega 60 (DSM)	≈ 14*	≈ 27*
Crythecodinium cohnii		
DHASCO (DSM)	ND	≈ 36*
Huiles concentrées^{1, 2, b}		
Concentratred Omega-3 (Natural Nutra)	36	24
Omegavie® 1050 TG (Polaris)	≈ 9*	≈ 45*
Omegavie® EPA 70 (Polaris)	≈ 63*	ND
Omegavie® DHA 70 (Polaris)	ND	≈ 63*
Omegavie® DHA 650 algae (Polaris)	ND	≈ 59*
Autres sources^{3, b}		
Huiles de krill		
Huile de krill manganèse (Arkopharma)	>20	>11
Huile de krill NKO® (Dynveo)	15	9
Tri-Shield® (Herbalife)	9	6
PL issus d'œufs de hareng		
Lecimarine F50 (Novastell)	7 [‡]	18 [‡]
PL issus d'œufs de poule		
Eggomega DHA 8 (Novastell)	0	6 [‡]

¹ : AG estérifiés dans des triglycérides ; ² : concentration obtenue par distillation moléculaire et/ou par des procédés enzymatiques ou chimiques ; ³ : AG estérifiés au moins en partie dans des phospholipides.

^a : selon les données de la table de composition nutritionnelle des aliments, Ciqual, 2017 ; ^b : selon les données indiquées par le fournisseur

* valeurs calculées à partir des proportions (moles%) indiquées par le fournisseur et en estimant 900 mg d'AG/g d'huile ; † : valeurs internes obtenues par quantification des AG par CPG en présence d'un standard interne additionné à l'échantillon.

AGPI-LC n-3 : acides gras polyinsaturés à longue chaîne oméga-3 ; DHA : acide docosahexaénoïque ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; PL : phospholipides ; TG : triglycérides. ND : donnée non disponible.

1.2. Les rôles physiologiques des AGPI-LC n-3

Généralement, on attribue aux AGPI-LC n-3 trois grands rôles :

- **Energétique** : du fait de leur propension à être facilement oxydables
- **Structural** : en tant que composants des lipides membranaires des cellules
- **Fonctionnel**, en tant que :
 - **Précurseurs** de composés bioactifs lipidiques oxygénés, les oxylipines (eicosanoïdes, marésines..)
 - **Régulateurs** de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et glucides

Ces différents rôles ont été largement décrits dans la littérature (Calder, 2012, 2016 ; Hishikawa et al., 2017). Dans cette partie, nous ne rappellerons que brièvement les grandes fonctions exercées par l'EPA et le DHA.

1.2.1. Un rôle structural en tant que composants des phospholipides membranaires

Les AGPI-LC n-3 peuvent être estérifiés dans les PL, constituants majeurs des membranes cellulaires (Rode et al., 1982). Leur incorporation dans les membranes influence la fluidité, la perméabilité et la flexibilité des bicouches lipidiques, modulant ainsi l'activité d'enzymes membranaires, de transporteurs et de récepteurs impliqués dans les mécanismes de signalisation cellulaire (Guesnet et al., 2005 ; Hashimoto et al., 1999 ; Li and Hu, 2009 ; Malasanos and Stacpoole, 1991 ; Stillwell and Wassall, 2003). Par exemple, la présence d'AGPI-LC n-3 dans les PL des myocytes module l'activité des canaux ioniques impliqués dans l'excitabilité et la contractilité des cellules (Leaf et al., 2002 ; Xiao et al., 2005). Dans les membranes, l'EPA et le DHA altèrent la composition et l'organisation de microenvironnements structurés, qui sont riches en AG saturés, cholestérol et sphingolipides (*i.e.* les radeaux lipidiques ; « *lipid raft* »). Ces structures sont notamment impliquées dans les mécanismes de signalisation cellulaire et d'endo/exocytose (Stillwell, 2006 ; Turk and Chapkin, 2013). Ainsi, l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les membranes des cellules immunitaires (cellules T) induit un réarrangement du cytosquelette et perturbe le recrutement de protéines impliquées dans l'activation et la différenciation de ces cellules (Shaikh and Edidin, 2006 ; Hou et al., 2016).

De très nombreuses études ont aussi démontré les effets du DHA sur les structures neuronales et rétinienne, modulant leur activité (Horrocks and Farooqui, 2004 ; Bourre, 2006 ; Dyll, 2015). Notamment, chez le rat, le DHA est directement impliqué dans l'activité des protéines membranaires (*i.e.* canaux et pompes ioniques, transporteurs) (Gerbi et al., 1993, 1994, 1999 ; Yehuda et al., 2002) suggérant un rôle de cet AG dans l'excitabilité des cellules neuronales et dans les mécanismes de neurotransmission (Alessandri et al., 2004 ; Hishikawa et al., 2017). De plus, l'introduction de DHA dans les cellules photo-réceptrices de la rétine favoriserait la transformation de la rhodopsine, photo-pigment rétinien, en sa forme active, étape nécessaire pour les mécanismes de photo-transduction (Litman and Mitchell, 1996 ; Salem et al., 2001 ; Grossfield et al., 2006).

1.2.2. Un rôle des AGPI-LC n-3 en tant que précurseurs de molécules bioactives

Les AGPI-LC estérifiés dans les PL membranaires sont les précurseurs de métabolites lipidiques, ou oxylipines (Simopoulos, 2002). L'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) cytosolique permet de libérer, dans le cytoplasme les AGPI sous forme libre. Les AGPI peuvent alors emprunter des voies métaboliques d'oxygénation, d'hydroxylation et de peroxydation (Guesnet et al., 2005 ; Calder, 2010, 2015 ; Kremmyda et al., 2011 ; Gabbs et al., 2015) telles que :

- La voie de la **cyclo-oxygénase** (COX) à l'origine des prostaglandines et des thromboxanes
- La voie de **lipoxygénase** (LOX) générant les leucotriènes et les dérivés hydroperoxydes
- La voie du **cytochrome P450** (CYP) permettant la synthèse de composés époxydes et hydroperoxydes

Ces médiateurs lipidiques sont des métabolites issus des AGPI assurant des rôles clés dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, parmi lesquelles la pression sanguine et l'agrégation plaquettaire (Gabbs et al., 2015). Les oxylipines interviennent également dans la régulation de la réponse inflammatoire en modulant les voies de signalisation de l'inflammation, la chimiotaxie et la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires (Calder, 2015). Les oxylipines exercent des fonctionnalités généralement opposées en fonction de la famille d'AGPI dont ils sont issus (Serhan et al., 2008 ; Gabbs et al., 2015). Ainsi, on attribue aux oxylipines dérivées de l'ARA, des propriétés essentiellement pro-

inflammatoires. A l'inverse, les résolvines de la série E issues de l'EPA ainsi que les protectines, les marésines, et les résolvines de la série D issues du DHA, sont des médiateurs lipidiques qui ont tous des propriétés « anti-inflammatoires » au sens de « réduction de la réponse inflammatoire » (*i.e.* résolution de l'inflammation) (Serhan et al., 2008 ; Kremmyda et al., 2011 ; Gabbs et al., 2015). Comme ce sont les mêmes enzymes qui interviennent dans la synthèse des composés actifs issus des AGPI n-6 et n-3, il existe une compétition entre les deux familles d'AG (Siriwardhana et al., 2012). Ainsi, un déséquilibre alimentaire du ratio n-6/n-3 pourrait perturber les voies de synthèse des oxylipines. Notamment, si l'apport d'AGPI n-3 est insuffisant ou déséquilibré par rapport à celui des AGPI n-6, les métabolites issus de l'ARA, produits en plus grande quantité, favoriseraient l'induction de l'inflammation (Simopoulos, 2002).

1.2.3. Un rôle des AGPI-LC n-3 dans la régulation de l'expression génique

Il est admis aujourd'hui que les nutriments influencent les fonctions biochimiques et physiologiques de l'organisme par leurs effets géniques (Dang et al., 2014). Dans ce cadre, les AGPI modulent l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans les processus d'inflammation et le métabolisme lipidique et énergétique (Kaur et al., 2014). L'ensemble de ces processus géniques, combinant différentes voies de régulation, sont à l'origine des effets hypolipémifiants des AGPI-LC n-3. Au niveau cérébral, le DHA augmente l'expression de gènes impliqués dans la plasticité synaptique, la neurotransmission, la transduction de l'influx nerveux et la neurogenèse (Kitajka et al., 2004). Ces voies de régulation mettent en jeu des facteurs de transcription, dont des récepteurs nucléaires, que sont les récepteurs aux proliférateurs de peroxyosome (PPAR ; *peroxyosome proliferator activated receptor*, dont 3 isoformes (α , β/δ et γ) sont décrites), la protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols (SREBP-1c ; *sterol regulatory element binding protein-1c*), le récepteur à l'acide rétinoïque (RAR ; *retinoic acid receptor*), le récepteur hépatique X (LXR ; *liver X receptor*) et la protéine de liaison à l'élément de réponse des carbohydrates (ChREBP ; *Carbohydrate-responsive element-binding protein*).

Suite à l'hydrolyse des lipoprotéines plasmatiques ou de la remodulation des lipides intracellulaires (TG, PL), les AGPI-LC n-3 sous forme libre peuvent se fixer sur les différents facteurs de transcription et les activer (Ziouzenkova et al., 2003 ; Georgiadi and Kersten, 2012). Certains récepteurs nucléaires, dont les PPARs, peuvent également être activés par les

oxylipines dérivées des AGPI-LC n-3 (Kliwer et al., 1997). Ainsi, l'EPA et le DHA favorisent l'expression hépatique, cardiaque et musculaire d'enzymes impliquées dans le transport intracellulaire des lipides, la β -oxydation peroxysomale et mitochondriale des AG et le métabolisme du glucose *via* le PPAR α (Aoyama et al., 1998 ; Clarke, 2000 ; Pawar and Jump, 2003 ; Jump, 2008 ; McMullen et al., 2014). L'EPA et le DHA réduisent l'expression génique de protéines impliquées dans les processus anaboliques des lipides en inhibant ou supprimant, au niveau hépatique, l'expression et l'activité de SREBP-1c (Xu et al., 1999 ; Jump, 2008), réduisant ainsi la lipogénèse, l'assemblage des lipoprotéines hépatiques et la néoglucogénèse (Osborne, 2000 ; Horton et al., 2002). Enfin les AGPI-LC n-3 inhibent aussi les voies de signalisation de l'inflammation *via* les PPARs (Poynter and Daynes, 1998 ; Ricote et al., 1998 ; Ghosh and Karin, 2002 ; Novak et al., 2003 ; Hudert et al., 2006 ; Schmitz and Ecker, 2008) et diminuent l'expression des marqueurs inflammatoires et des molécules d'adhésion dans les macrophages (Barish, 2006 ; Tyagi et al., 2011).

En conclusion, les AGPI-LC n-3 interviennent dans les fonctions physiologiques soit de façon directe, en agissant sur la structure des membranes cellulaires ou l'expression génique, soit de façon indirecte, en tant que précurseurs de métabolites supérieurs. La **Figure 1** résume, à titre d'exemple, les principales fonctions exercées par les AGPI-LC n-3 au niveau hépatique.

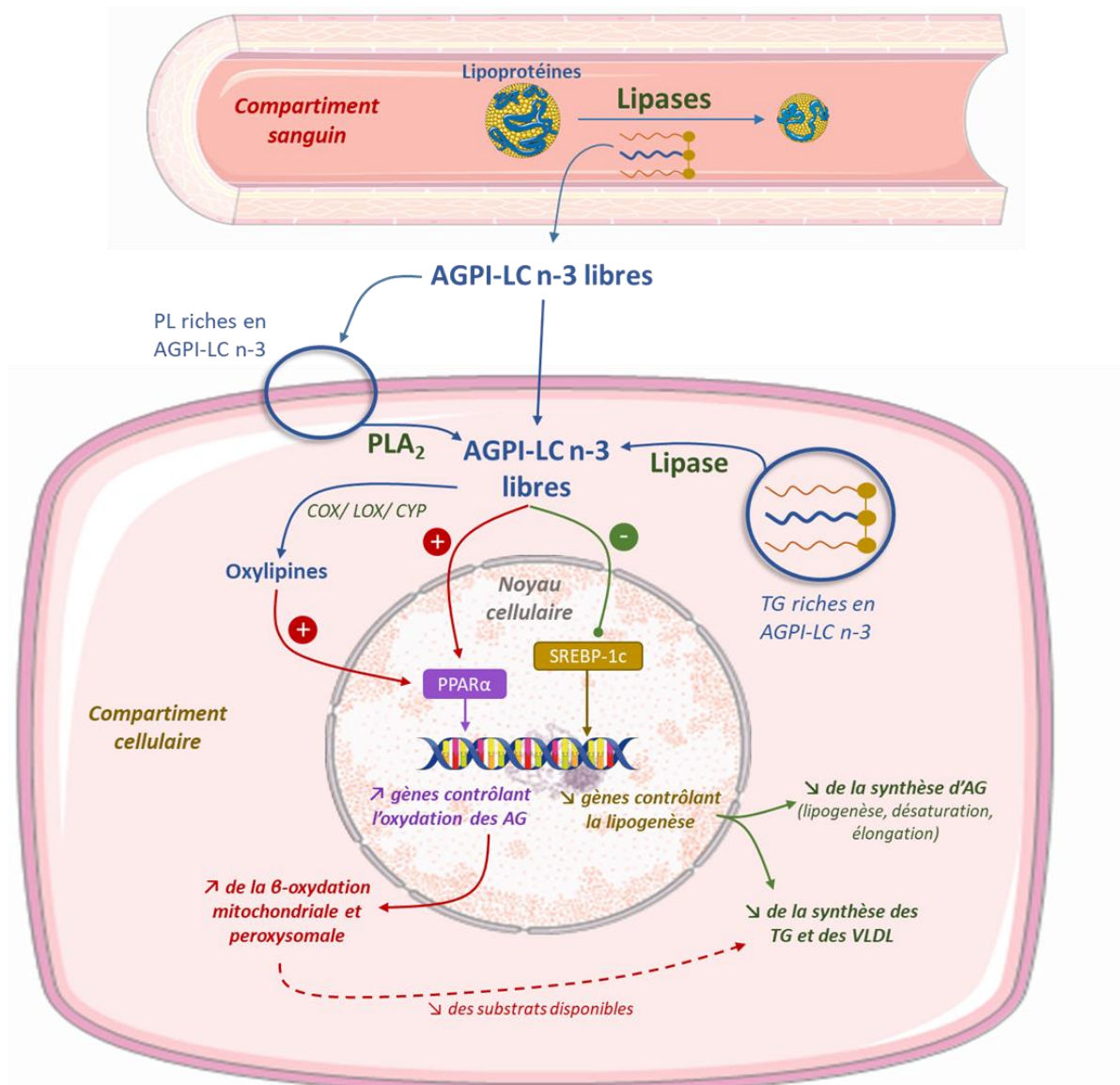


Figure 1 : Schéma des principales fonctions physiologiques exercées par les AGPI-LC n-3 dans l'hépatocyte

AG : acides gras ; AGPI-LC n-3 : acides gras polyinsaturés à longue chaîne oméga-3 ; Lipases : en considérant l'activité de la lipoprotéine lipase plasmatique (LPL) et de la lipase hépatique (LH) ; PL : phospholipides ; PLA₂ : phospholipase A₂ ; PPAR : récepteur aux proliférateurs de peroxysome ; SREBP-1c : protéine de liaison à l'élément de régulation des stérols ; TG : triglycérides ; VLDL : lipoprotéines de très faible densité.

1.3. Les effets « santé » d'une supplémentation en AGPI-LC n-3

De par leurs rôles directs ou indirects dans de nombreuses fonctions physiologiques, de multiples études conduites chez l'animal et chez l'homme, se sont attachées à démontrer que les AGPI-LC n-3 sont associés à des effets « santé » dans des pathologies de type cardiovasculaire, inflammatoire et neurodégénératif. Ils joueraient également un rôle vis-à-vis de la régulation des facteurs liés à l'obésité et au syndrome métabolique. Dans ce qui suit, nous allons donner quelques exemples d'études cliniques conduites chez l'homme montrant les effets préventifs d'une supplémentation en AGPI-LC n-3. Nous entendons ici par

« supplémentation » tout protocole expérimental visant à fournir des AGPI-LC n-3 à des doses supérieures aux apports nutritionnels conseillés (ANC).

La consommation d'AGPI-LC n-3 pourrait réduire ou retarder l'émergence des pathologies à composante inflammatoire exacerbée et notamment de l'arthrite rhumatoïde (Fortin et al., 1995 ; Cleland et al., 2003, 2006 ; Goldberg and Katz, 2007 ; Calder, 2010 ; Miles and Calder, 2012). Les résultats d'une supplémentation en AGPI-LC n-3 sont plus mitigés lorsqu'il s'agit des pathologies inflammatoires de l'intestin (Aslan and Triadafilopoulos, 1992 ; Middleton et al., 2002 ; Calder, 2009) ou l'asthme (Woods et al., 2002 ; Kremmyda et al., 2011) mais rapportent parfois une légère amélioration des symptômes.

Aucun consensus n'a pu être établi quant à l'influence d'une supplémentation en AGPI-LC n-3 sur la perte de poids et de la masse grasse (Warner et al., 1989 ; Brilla and Landerholm, 1990 ; Couet et al., 1997 ; Groh-Wargo et al., 2005 ; Hill et al., 2007 ; Kabir et al., 2007 ; Howe and Buckley, 2014). Néanmoins, une amélioration de la triglycéridémie, de la tolérance au glucose et de la résistance à l'insuline a pu être observée (Lorente-Cebrián et al., 2013 ; C. Chen et al., 2015 ; Gao et al., 2017), suggérant des effets bénéfiques vis-à-vis des désordres métaboliques liés à l'obésité.

Comme l'apport d'EPA ou de DHA diminue la triglycéridémie de 25 à 30% chez des sujets hypertriglycéridémiques (Harris, 1997 ; Mori et al., 2000 ; Dallongeville et al., 2010), les AGPI-LC n-3 ont des effets reconnus en termes de prévention primaire et secondaire vis-à-vis des maladies cardiovasculaires. Ces effets cardio-protecteurs ont d'abord été mis en évidence par des études épidémiologiques dans lesquelles l'incidence de pathologies cardiovasculaires était nettement plus faible dans les populations à forte consommation de poissons, comparativement à celles qui en consommaient peu (Bang and Dyerberg, 1972 ; Dyerberg et al., 1975 ; Albert et al., 2002 ; Hu et al., 2002 ; Simopoulos, 2002 ; He et al., 2004). Ces données ont par la suite été confirmées par des études cliniques visant à augmenter l'apport en EPA et en DHA chez des patients présentant des facteurs de risques ou des antécédents cardiovasculaires (Burr et al., 1989 ; Bucher et al., 2002 ; Marchioli et al., 2002 ; Yokoyama et al., 2007). Ainsi, la supplémentation en AGPI-LC n-3 (300-850 mg/jour) pour des durées variant de 2 à 3,5 ans diminue le taux de mortalité et les événements cardiovasculaires chez des patients coronariens, en comparaison des patients non supplémentés (Burr et al., 1989 ; Valagussa et al., 1999). De même, l'apport d'huile de poisson (1-2 g/jour) diminue la fréquence

cardiaque chez des sujets qui présentent une fréquence élevée (Mozaffarian et al., 2005) et réduit le taux de survenue de la fibrillation auriculaire après intervention chirurgicale cardiaque (Calò et al., 2005). Enfin, en complément d'un traitement à base de statines, l'apport d'EPA (1,8 g/jour) réduit de 19% la survenue des évènements coronariens majeurs chez des sujets hypercholestérolémiques (Yokoyama et al., 2007).

Parallèlement, de nouvelles données permettent d'attribuer aux AGPI-LC n-3 un rôle vis-à-vis du système neuronal (Majou, 2015). Les études épidémiologiques suggèrent qu'une consommation élevée de poisson serait associée à une diminution du risque de déclin cognitif, de démence et de la maladie d'Alzheimer (prévention primaire) (Kalmijn et al., 1997a, 1997b). Sur cette base, des études cliniques menées chez des sujets âgés sains ou atteints de troubles cognitifs légers à modérés démontrent que l'apport de DHA (900 mg à 1,7 g/jour) pendant 24 semaines à 1 an est associé à une amélioration des scores aux tests d'apprentissage et de mémoire (prévention secondaire) (Freund-Levi et al., 2008 ; Yurko-Mauro et al., 2010 ; Lee et al., 2013 ; Dyllal, 2015). Par ailleurs, le DHA semble plus efficace que l'EPA pour limiter le déclin cognitif. En effet, pour un apport similaire de 1,6 g/jour, l'EPA et le DHA améliorent le score au test de dépression mais seule la supplémentation en DHA modifie favorablement les performances mnésiques (Sinn et al., 2012). Les effets bénéfiques du DHA vis-à-vis des maladies neurodégénératives sont néanmoins limités dès l'émergence de la maladie d'Alzheimer (effet thérapeutique) et ne retarde que très légèrement le déclin cognitif (Quinn et al., 2010).

Au niveau de la rétine, les études épidémiologiques montrent qu'un apport élevé en AGPI-LC n-3 est associé à un risque plus faible de développer des pathologies oculaires telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Chong et al., 2008, 2009 ; Christen et al., 2011 ; Souied et al., 2013). D'un point de vue interventionnel, très peu d'études se sont intéressées à l'effet d'une supplémentation en AGPI-LC n-3 sur la prévention de la DMLA. Par exemple, dans l'étude AREDS2 (age related eye disease study), l'apport d'AGPI-LC n-3 ne réduit pas le risque de développer une DMLA sur le deuxième œil (Chew et al., 2013). A l'inverse, dans l'étude NAT-2 (Nutritional AMD treatment), le risque de développer une DMLA sur le deuxième œil est réduit de 68% chez les sujets présentant une forte incorporation érythrocytaire en EPA et DHA, suite à une supplémentation nutritionnelle en huile de poisson (Souied et al., 2013).

A l'appui des données scientifiques, les effets « santé » des AGPI-LC n-3 vis-à-vis des maladies cardiovasculaires, cérébrales et rétiniennes font l'objet d'allégations nutritionnelles. Ainsi, les allégations de santé générique « *l'acide eicosapentaénoïque et l'acide docosahexaénoïque contribuent à une fonction cardiaque normale* », « *l'acide docosahexaénoïque contribue au fonctionnement normal du cerveau* » et « *l'acide docosahexaénoïque contribue au maintien d'une vision normale* » peuvent être affichées pour des denrées alimentaires contenant au moins 40 mg d'EPA et de DHA pour 100 g de produit.

Eu égard aux diverses fonctions physiologiques reconnues ou pressenties qu'exercent les AGPI-LC n-3, et les effets santé qui en découlent, on comprend l'importance de maîtriser les facteurs d'apport de ces AG afin d'améliorer leur biodisponibilité dans l'organisme, en général, et dans les tissus cibles, en particulier.

2. La biodisponibilité des lipides et les facteurs d'influence

D'un point de vue nutritionnel, la **biodisponibilité** peut se définir comme étant la part d'un nutriment ingéré qui sera utilisable de façon ciblée par l'organisme. Ainsi, la biodisponibilité pourrait être considérée comme l'ensemble de deux processus séquentiels (Fernández-García et al., 2009) :

- La **bioaccessibilité**, correspondant à la part de nutriments libérée de la matrice alimentaire dans le tractus digestif (digestion), qui est absorbée au niveau intestinal et qui se retrouve au niveau lymphatique
- La **bioactivité**, qui inclut tous les événements liés au transport des nutriments dans la circulation sanguine jusqu'à leur accrétion dans les tissus où ils seront métabolisés ou stockés

2.1. Rappel sur la digestion et l'absorption intestinale des lipides alimentaires

La digestion consiste à hydrolyser les lipides alimentaires non assimilables en l'état (TG, PL, esters de cholestérol (EC)) en molécules plus petites qui peuvent être absorbées par l'intestin (acides gras libres (AGL), monoglycérides (MG) et lysophospholipides (lysoPL)), après leur solubilisation dans des micelles mixtes de sels biliaires.

La digestion des lipides commence dans l'estomac, même si la mastication assure une première action de mélange (Leal-Calderon and Cansell, 2012). L'action mécanique des

muscles de l'estomac permet aux lipides d'être incorporés dans des gouttelettes dispersées dans le milieu digestif (aqueux), générant ainsi une interface lipides/eau nécessaire à l'action des enzymes digestives. La digestion des TG débute dans l'estomac sous l'action de la lipase gastrique. L'origine de cette lipase diffère selon les espèces : elle est d'origine linguale chez les rongeurs (souris, rat) alors qu'elle est directement sécrétée dans les sucs gastriques chez les primates (singe, homme) (DeNigris et al., 1988). Quelle que soit son origine, la lipase gastrique est activée à pH acide (pH optimum entre 3 et 6) (Gargouri et al., 1986 ; Carrière et al., 1991) et présente une régiospécificité pour la position externe (*sn-3*) des TG alimentaires (Rogalska et al., 1990), pour laquelle elle a une activité d'autant plus importante que la chaîne hydrocarbonée est courte (Hamosh, 1990). L'activité de la lipase gastrique génère donc majoritairement des 1,2-diglycérides (1,2-DG) et AGL (Hamosh, 1990 ; Carrière et al., 1993) qui participent à la stabilisation des gouttelettes lipidiques (Armand, 2008). On considère aujourd'hui que la lipase gastrique assure entre 10 et 30% de l'hydrolyse totale des TG alimentaires (Hamosh et al., 1985 ; Bernbäck et al., 1989). De plus, il semble que son activité se poursuive au niveau intestinal, malgré un pH au-delà de son pH optimum, ce qui représenterait près de 17% de la lipolyse totale des TG alimentaires (Carrière et al., 1993). A notre connaissance, il n'existe pas de données concernant l'impact du degré d'insaturation sur l'activité de la lipase gastrique et, donc, son efficacité vis-à-vis des AGPI-LC n-3 en position *sn-3*.

Le chyme est ensuite libéré vers la lumière duodénale (vidange gastrique). L'arrivée de lipides au niveau intestinal, notamment des AGL issus de la lipolyse gastrique des TG, stimule la sécrétion de la cholécystokinine (Isaacs et al., 1987 ; Guimbaud et al., 1997), permettant la libération de sécrétions bilio-pancréatiques (Hildebrand et al., 1990). Les sucs pancréatiques sont composés de bicarbonate de sodium qui tamponne le pH acide du contenu stomacal et d'enzymes lipolytiques, protéolytiques et glycolytiques, qui assurent la continuité du processus de digestion. Ainsi, la digestion des TG se poursuit dans l'intestin sous l'action de la lipase pancréatique, active à un pH plus élevé (entre 6,5 et 9) (Embleton and Pouton, 1997) et régiospécifique des positions externes (*sn-1/3*) des TG, en générant des 2-MG et des AGL (Carrière et al., 1997). La lipase pancréatique nécessite la présence d'un cofacteur, la colipase qui lui assure son ancrage à l'interface huile/eau. *In vitro*, la lipase pancréatique est inhibée par les PL (Borgström, 1980) et les sels biliaires (Embleton et Pouton, 1997). De plus, son

activité *in vitro* dépend étroitement de la nature des AG qu'elle hydrolyse. En effet, de par leur configuration moléculaire (*i.e.* nombre et position des doubles liaisons), l'EPA et le DHA génèrent un encombrement stérique, réduisant la vitesse et l'efficacité d'hydrolyse de la lipase pancréatique, par rapport à des AG plus courts et moins insaturés (Bottino et al., 1967 ; Akanbi et al., 2014).

Les PL d'origine alimentaire ou hépatique sont hydrolysés uniquement dans l'intestin. La digestion des PL fait intervenir la PLA₂, spécifique de la position interne (*sn-2*), générant des 1-lysoPL et des AGL (Hanahan, 1954 ; Burke and Dennis, 2009). Contrairement à la lipase pancréatique, la PLA₂ ne présente pas de spécificité *in vitro* vis-à-vis de la nature des AG estérifiés dans les PL (Borgström, 1980 ; Jain and Rogers, 1989 ; Ghomashchi et al., 1991). Autrement dit, les PL seraient hydrolysés de façon indépendante de leur composition en AG, et donc de la présence d'AGPI-LC n-3. Néanmoins, l'activité de la PLA₂ semble être modulée par la nature de la tête polaire avec une action plus efficace sur des PL anioniques que zwitterioniques ; une charge de surface positive favorisant son ancrage à l'interface huile/eau. Si les PL doivent être hydrolysés pour être absorbés par les entérocytes, certaines études suggèrent qu'environ 20% des PL présents dans la lumière intestinale pourraient être absorbés, soit tels quels (Zierenberg and Grundy, 1982 ; Boucrot, 1983), soit sous forme totalement hydrolysée (Le Kim and Betzing, 1976).

D'autres enzymes, moins spécifiques, sont également libérées dans la lumière intestinale, parmi lesquelles les lipases pancréatiques relatées 1 et 2 (PLRP1/2) et la carboxyl ester lipase (CEL) (Armand, 2008). La PLRP1 est une enzyme inactive (Crenon et al., 1998a, 1998b), alors que la PLRP2 hydrolyse des molécules de TG, et de par son activité phospholipase A₁ hydrolyse également la position *sn-1* des PL (Lowe, 2000 ; Armand, 2008). Néanmoins, l'activité de la PLRP2 est 3 à 10 fois plus faible que celle de la lipase pancréatique (Lowe, 2000). La CEL, sécrétée puis adsorbée à la surface de l'entérocyte, est aussi abondante que la lipase pancréatique. Elle permet d'hydrolyser une grande variété de substrats tels que les tri-, di- et mono-glycérides, les PL, les EC (Hui and Howles, 2002).

La solubilité des produits d'hydrolyse générés (AGL, 2-MG, 1-lysoPL, cholestérol) est très faible dans l'eau. Ils doivent donc être solubilisés dans des micelles mixtes afin de diffuser à travers la couche d'eau non agitée pour être absorbés par les entérocytes (Phan and Tso, 2001). L'activité des pompes à proton de la membrane apicale des entérocytes assure

l'acidification de la couche d'eau non agitée (gradient de pH) permettant : (1) la dissociation des micelles mixtes (Beaslas et al., 2012) favorisant la libération des produits d'hydrolyse à proximité de la bordure en brosse intestinale et (2) la protonation des AGL. L'absorption des lipides par les entérocytes s'effectue selon deux modes : (1) une diffusion transmembranaire passive et (2) un transport facilité par l'activité de transporteurs membranaires. La diffusion passive intervient dès lors que la concentration lipidique extracellulaire est supérieure à la concentration intracellulaire, c'est-à-dire en période post-prandiale (Hussain, 2014). A noter que ce schéma concerne plutôt les AG à longue chaîne. Les acides gras à chaînes courte et moyenne peuvent échapper au processus de micellisation et être dirigés directement vers le foie via la veine porte. Lorsque le gradient de concentration en lipides n'est pas favorable (période inter-prandiale), l'activité de transporteurs membranaires permet d'assurer le passage intestinal des produits lipidiques. Plusieurs protéines membranaires ont été identifiées dans ce processus parmi lesquelles le transporteur d'AG ou cluster de différenciation 36 (FAT/CD36), les protéines de transport des AG (FATPs) et la protéine de liaison aux AG associée à la membrane plasmique (FABPpm) (Mansbach and Gorelick, 2007 ; Wang et al., 2013 ; Hussain, 2014).

La **Figure 2** résume les étapes de digestion et d'absorption intestinale des lipides alimentaires en période post-prandiale.

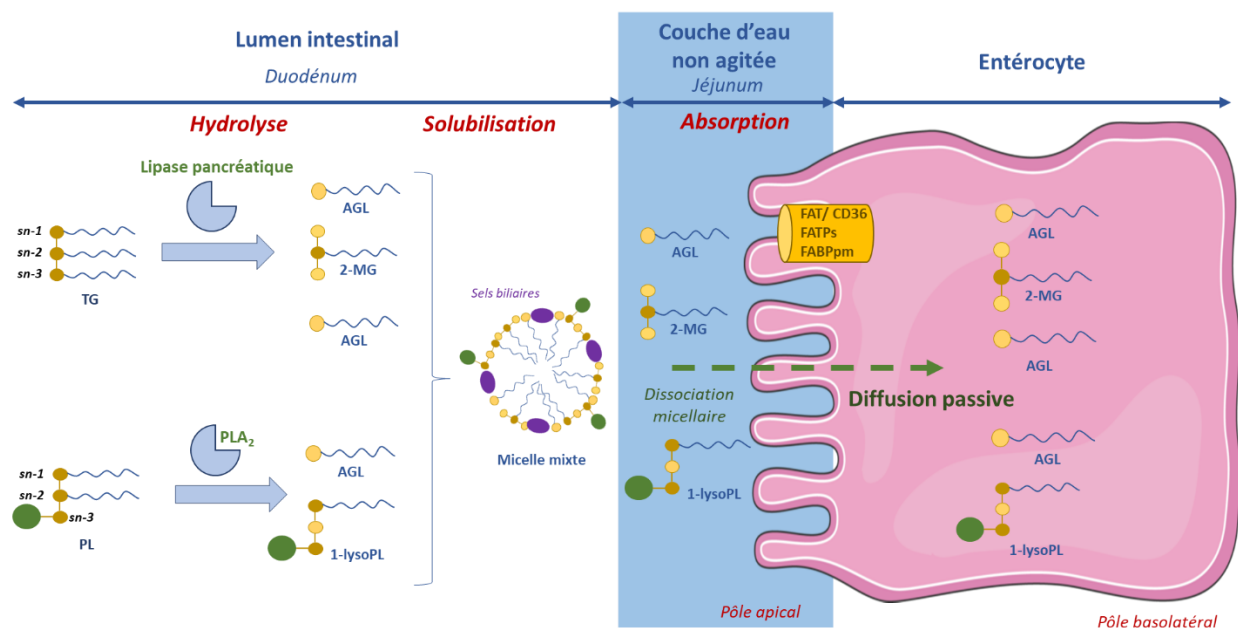


Figure 2 : Schéma général des étapes de digestion et d'absorption intestinale des TG et PL alimentaires

1-lysoPL : 1-lysophospholipide ; 2-MG : 2-monoglycéride ; AGL : acide gras libre ; FABPpm : protéine de liaison aux AG associée à la membrane plasmique ; FAT/CD 36 transporteur d'AG/cluster de différenciation 36 ; FATPs : protéines de transport des AG ; PL : phospholipide ; PLA₂ : phospholipase A₂ ; TG : triglycéride.

Une fois dans l'entérocyte, les lipides absorbés sont pris en charge par des protéines de transport intracellulaire (FABP ; *fatty acid binding protein*) pour être acheminés vers le réticulum endoplasmique où aura lieu la resynthèse en lipides complexes pour la formation des lipoprotéines intestinales, les chylomicrons (CM) (**Figure 3**) :

- **La voie du 2-MG** contribue à la synthèse de la majeure partie des TG (Polheim et al., 1973). Les AGL activés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthétase (ACS) sont estérifiés sur les positions *sn-1/3* des 2-MG absorbés, *via* les activités successives de la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT) et de la diacylglycérol acyltransférase (DGAT)
- **La voie de la réacylation des lysoPL** est prépondérante dans la synthèse des PL en période post-prandiale (Scow et al., 1967 ; Sato, 1970 ; Subbaiah et al., 1970). Les 1-lysoPL absorbés sont acylés en position interne (*sn-2*) par l'activité de la lysophosphatidylcholine acyltransférase (LPCAT)
- **La voie du glycérol-3-phosphate (G3P)** participe à la synthèse *de novo* des TG mais également des PL. Le G3P issu de la glycolyse suit une double acylation par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) et l'acide lysophosphatidique acyltransférase (LPAAT) pour former un acide phosphatidique (PA), lui-même déphosphorylé en 1,2-DG par la phosphatidate phosphatase (PAP). Les 1,2-DG obtenus peuvent être, soit acylés par la DGAT pour la synthèse des TG, soit utilisés pour la synthèse des PL.

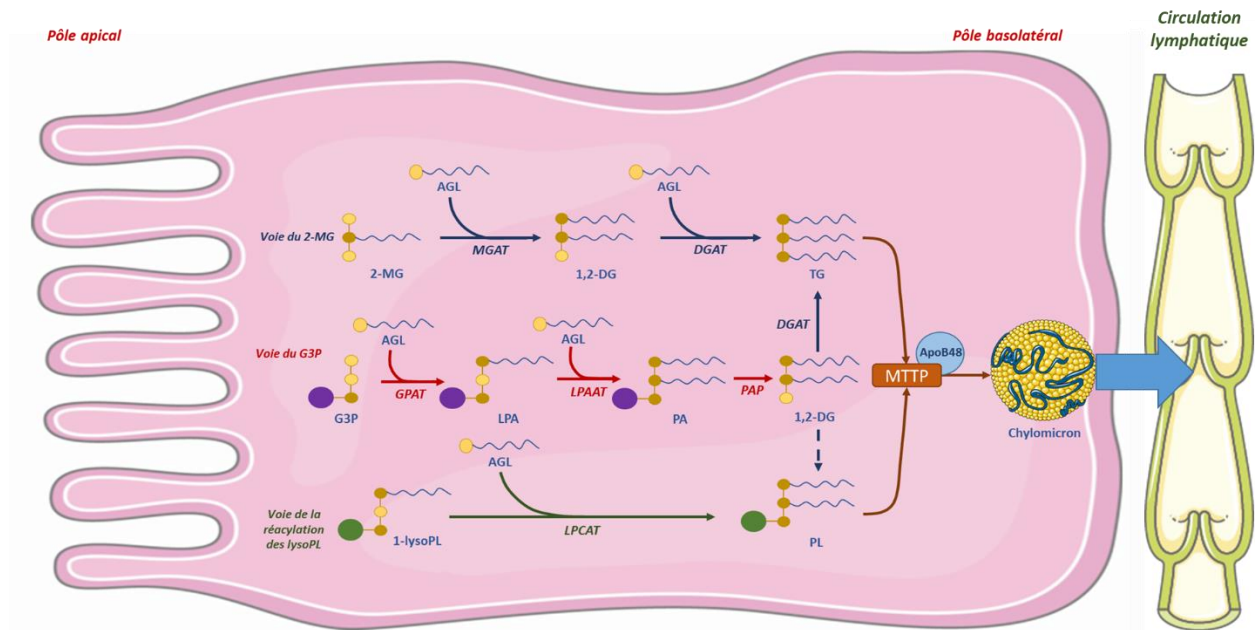


Figure 3 : Principales voies de synthèse des lipides dans l'entérocyte

1-LysoPL : 1 lysophospholipide ; 1,2-DG : 1,2-diglycérade ; 2-MG : 2-monoacylglycérade ; AGL : acide gras libre ; ApoB48 : apolipoprotéine B48 ; DGAT : diacylglycérade acyltransférase ; G3P : glycérol-3-phosphate ; GPAT : glycérol-3-phosphate acyltransférase ; LPA : acide lysophosphatidique ; LPAAT : acide lysophosphatidique acyltransférase ; LPCAT : lysophosphatidylcholine acyltransférase ; MGAT : monoacylglycérade acyltransférase ; MTTP : protéine de transfert microsomal de TG ; PA : acide phosphatidique ; PAP : phosphatidate phosphatase ; PL : phospholipide ; TG : triglycérade.

Les lipides synthétisés sont acheminés vers le réticulum endoplasmique où l'activité de la protéine de transfert microsomal de TG (MTTP) assure l'association des lipides néosynthétisés à l'apolipoprotéine B48 (ApoB48) (Hussain, 2000). Les vésicules (pré-chylomicrons) sont transférées vers l'appareil de Golgi où elles subissent des étapes de maturation en associant les lipides hydrophobes (TG, EC, vitamines) au cœur des CM et les lipides amphiphiles (PL) en surface (Tran et al., 2012 ; Hussain, 2014). A la fin de leur maturation, les CM quittent l'appareil de Golgi pour rejoindre le pôle basolatéral des entérocytes où ils sont libérés par exocytose vers la circulation lymphatique, sous l'action de la protéine Sar1b (*secretion associated Ras related GTPase 1B*).

2.2. Le transport des lipides depuis le compartiment lymphatique vers la circulation sanguine

Les CM libérés dans la circulation lymphatique rejoignent, par la veine cave supérieure, la circulation sanguine dans laquelle ils intègrent différentes apolipoprotéines dont l'ApoE, l'ApoC2 et l'ApoC3 (**Tableau 2**). Au cours de leur acheminement vers le foie, les TG des CM subissent l'activité catabolique de la lipoprotéine lipase plasmatique (LPL) adsorbée à la

surface de l'endothélium vasculaire et régiospécifique des positions *sn-1/3* des TG (Kheiroloom et al., 1992) (**Figure 4**). Les AGL libérés sont rapidement pris en charge par l'albumine sérique pour être captés par les tissus environnants. Les CM voient ainsi leur contenu en TG diminuer et forment des résidus de plus petite taille et plus denses : les remnants. En période post prandiale, la lipase hépatique (LH) participe également à l'épuration des structures en hydrolysant les TG des CM et des remnants (Shafi et al., 1994 ; Ramasamy, 2014). Les remnants sont ensuite internalisés dans le foie grâce à l'activité du récepteur au LDL (LDLr) et du récepteur relaté du LDLr (LRP) (Willnow, 1997 ; Redgrave, 2004). Au niveau du foie, les lipides sont à nouveau hydrolysés et s'engagent dans différentes voies métaboliques.

Tableau 2 : Caractéristiques des différentes lipoprotéines plasmatiques¹, adapté de Feingold and Grunfeld, 2000; Jonas, 2000; Ramasamy, 2014

Lipoprotéine	Densité (g/mL)	Taille (nm)	Lipides majoritaires	Apolipoprotéines majoritaires
Chylomicron	<0,930	75-1200	Triglycérides	ApoA1, A2, A4 ApoB48 ApoC1, C2, C3 ApoE
Chylomicron remnant	0,930-1,006	30-80	Triglycérides Esters de cholestérol	ApoB48 ApoE
VLDL	0,930-1,006	30-80	Triglycérides Esters de cholestérol Phospholipides	ApoB100 ApoC1, C2, C3 ApoE
IDL	1,006-1,019	25-35	Triglycérides Cholestérol	ApoB100 ApoC1, C2, C3 ApoE
LDL	1,019-1,063	18-25	Cholestérol	ApoB100 ApoE
HDL	1,063-1,210	5-12	Cholestérol Phospholipides	ApoA1, A2 ApoC1, C2, C3 ApoD ApoE

¹ : Apo : apolipoprotéine ; HDL : lipoprotéine de haute densité ; IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire ; LDL : lipoprotéine de faible densité ; VLDL : lipoprotéine de très faible densité.

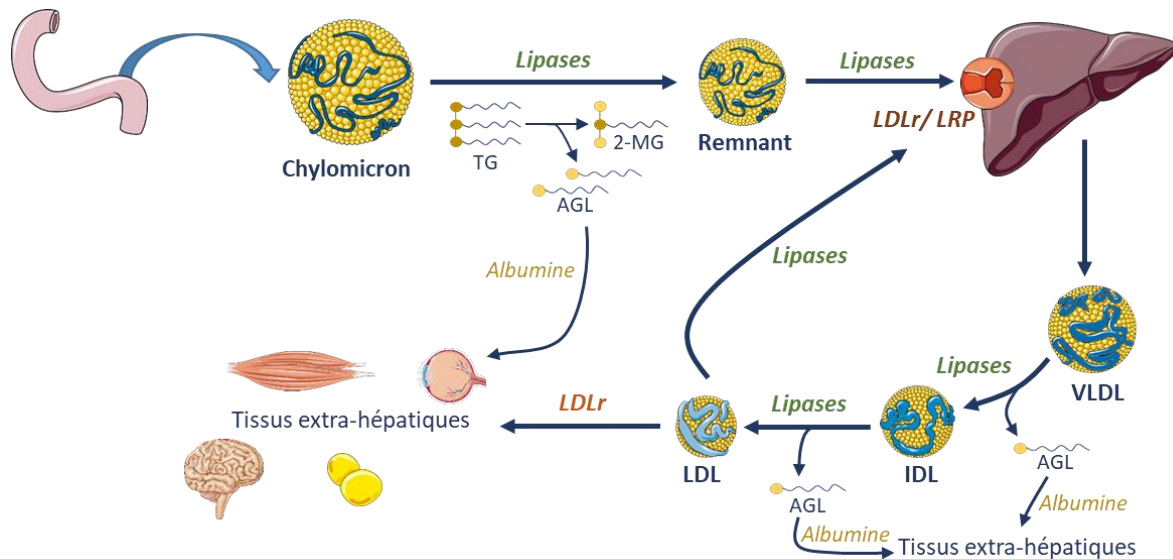


Figure 4 : Circulation des lipides et échanges avec les différents tissus *via* le métabolisme des lipoprotéines de faible densité (chylomicrons et LDL)

IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire ; LDL : lipoprotéine de faible densité ; LDLr : récepteur aux LDL ; Lipases : en considérant l'activité de la lipoprotéine lipase plasmatique (LPL) et de la lipase hépatique (LH) ; LRP : récepteur des lipoprotéines ; VLDL : lipoprotéine de très faible densité.

En période inter-prandiale, le foie assure la fourniture en lipides aux tissus extra-hépatiques *via* les lipoprotéines hépatiques de très faible densité : les VLDL (*very low density lipoproteins*). La synthèse et la sécrétion des VLDL font intervenir des mécanismes enzymatiques similaires à ceux de l'assemblage des chylomicrons au niveau des entérocytes, à ceci près qu'ils sont constitués de l'apoB100, forme non tronquée de l'apoB48 (Shelness and Sellers, 2001 ; Ramasamy, 2014) (**Tableau 2**). A leur sortie du foie et durant leur transport dans la circulation sanguine, les TG des VLDL sont hydrolysés par la LPL et la LH. Les VLDL s'appauvrissent progressivement en TG pour former des lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, *intermediate density lipoproteins*), puis des lipoprotéines de faible densité (LDL, *low density lipoproteins*). Les LDL sont finalement capturées par les tissus extra-hépatiques après interaction de l'apoE avec le LDLr, exprimé dans de nombreux tissus tels que le foie, le cerveau, le cœur, le muscle (Hussain et al., 1999) ainsi que la rétine (Tserentsoodol et al., 2006). Les AGL libérés au cours de l'épuration des lipoprotéines hépatiques sont captés par les tissus extra-hépatiques.

Les lipoprotéines de haute densité (HDL, *high density lipoproteins*) assurent le transport du cholestérol des tissus extra-hépatiques vers le foie. Ces lipoprotéines sont initialement sécrétées sous forme native (pré-HDL) correspondant à des particules rudimentaires constituées d'ApoA1 et de quelques molécules de PL. Les pré-HDL sont issues :

(1) d'une sécrétion directe par quelques tissus dont le foie et les entérocytes (Alpers et al., 1985 ; Eggerman et al., 1991 ; Tsujita et al., 2005) ou (2) d'un remodelage des lipoprotéines (**Figure 5**). Dans ce dernier cas, l'hydrolyse des TG des CM par la LPL déstabilise la surface phospholipidique des CM et libère quelques molécules de PL et d'ApoA1, qui par association forment les pré-HDL (Jean Dallongeville, 2006 ; Gautier et al., 2011). La protéine plasmatique de transfert de PL (PLTP : *phospholipid transfer protein*) joue un rôle important dans ce processus en facilitant les échanges (Jiang et al., 1999 ; Albers et al., 2012). Différents transporteurs et récepteurs membranaires sont impliqués dans l'enrichissement tissulaire des pré-HDL, dont notamment ABCA1 (*ATP-binding cassette A1*) qui favoriserait le transfert de cholestérol libre et de PL de la membrane des cellules vers les pré-HDL acceptrices. Le transfert de lipides vers les pré-HDL fournit ainsi les éléments nécessaires à leur maturation pour générer les lipoprotéines finales (HDL matures). La maturation des pré-HDL fait intervenir essentiellement une enzyme, la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT) qui permet l'acylation du cholestérol libre des pré-HDL à partir de PL membranaires, générant un EC et un lysoPL (Jonas, 2000). Les esters de cholestérol peuvent alors migrer du manteau lipidique vers le cœur des HDL. Au cours de leur transport dans la circulation sanguine, les HDL subissent l'activité des différentes enzymes visant à moduler leur contenu lipidique. Ainsi, chez l'homme, la protéine de transfert des EC (CETP : *cholesterylester transfer protein*) permet le transfert d'EC des HDL vers les lipoprotéines de faible densité (VLDL, LDL, IDL) en échange de molécules de TG. Ce processus aboutit à un appauvrissement en EC des HDL et un enrichissement en TG qui sont hydrolysés par la LH, libérant des AGL captés par les tissus environnants. Il est à noter que ce processus de transfert n'a pas lieu chez le rat et la souris puisqu'ils expriment une forme non active de la CETP (Haa and Barter, 1982 ; Hogarth et al., 2003). Les HDL sont également substrats de la lipase endothéliale (LE) exprimée à la surface de l'endothélium qui contribue à l'hydrolyse des PL. La LE présente une activité phospholipase A₁ en plus d'une activité lipase notamment envers les HDL et les CM (McCoy et al., 2002), générant un AGL et un 2-lysoPL pour chaque molécule de PL hydrolysée. Enfin, les HDL interagissent avec le récepteur SR-B1 (*scavenger receptor B1*) permettant la captation des lipoprotéines par le foie pour leur dégradation et l'utilisation des molécules lipidiques.

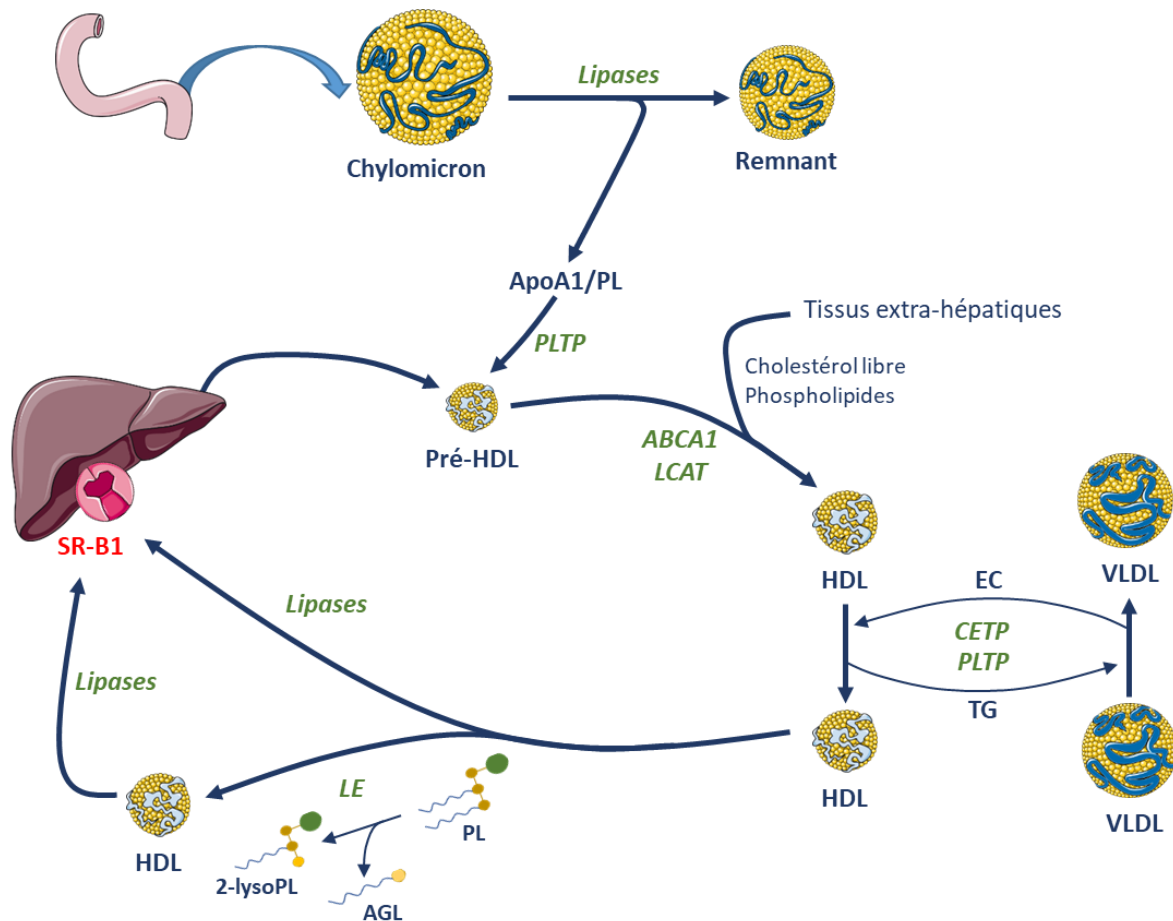


Figure 5 : Circulation des lipides et échanges avec les différents tissus hépatiques et extra-hépatiques via le métabolisme des lipoprotéines de haute densité

ABCA1 : ATP-binding cassette A1 ; AGL : acide gras libre ; ApoA1 : apolipoprotéine A1 ; CETP : protéine de transfert d'EC ; EC : ester de cholestérol ; HDL : lipoprotéine de haute densité ; LCAT : lécithine-cholestérol acyltransférase ; LE : lipase endothéliale ; Lipases : en considérant l'activité de la lipoprotéine lipase plasmatique (LPL) et de la lipase hépatique (LH) ; 2-lysoPL : sn-2 lysophospholipide ; PL : phospholipide ; PLTP : protéine de transfert de phospholipides ; SR-B1 : scavenger receptor B1 ; TG : triglycéride ; VLDL : lipoprotéine de très faible densité.

Les lipoprotéines assurent ainsi la fourniture des différents organes en lipides. Le foie capte les lipides alimentaires *via* les CM résiduels (remnants) ou *via* les AGL issus de l'hydrolyse des lipoprotéines. Les tissus extra-hépatiques s'enrichissent en AG provenant, soit des lipoprotéines issues du foie (VLDL/ LDL), soit du catabolisme des lipoprotéines (CM, VLDL/LDL). Une fois dans les tissus, les AG peuvent suivre différentes voies métaboliques dont la β -oxydation assurant l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire, ou le stockage.

La biodisponibilité des lipides apparaît donc comme un ensemble de processus physico-chimiques et métaboliques complexes. Elle est influencée par de nombreux facteurs qui sont décrits dans la partie suivante en se focalisant sur les études portant sur les AGPI-LC n-3.

2.3. Les facteurs modulant la biodisponibilité des AGPI-LC n-3

En 1998, une équipe de chercheurs hollandais a proposé l'acronyme SLAMENGHI pour se rappeler les principaux facteurs modulant la biodisponibilité des caroténoïdes (West and Castenmiller, 1998) (**Figure 6**). Ces facteurs peuvent également s'appliquer à la biodisponibilité des AG. Dans cette partie, nous proposons de nous focaliser sur les paramètres de formulation (S et L de SLAMENGHI) et leur impact sur la biodisponibilité des AGPI-LC n-3. Il est important de préciser, que la comparaison des études est souvent délicate. En effet, les plans expérimentaux varient de façon importante en termes de quantités d'AGPI-LC n-3 utilisées, de nature des matrices alimentaires ou de durées étudiées. Par ailleurs, comme explicité dans l'acronyme SLAMENGHI, de nombreux autres facteurs, non étudiés de manière formelle, peuvent influencer les résultats. C'est pourquoi les études de bioaccessibilité et de bioactivité conduites chez l'animal et chez l'homme rapportent parfois des résultats qui semblent discordants.



Figure 6 : Définition de l'acronyme SLAMENGHI résumant l'ensemble des facteurs modulant la biodisponibilité des caroténoïdes selon West and Castenmiller, 1998

2.3.1. La modulation de la biodisponibilité d'une huile par l'échelle supramoléculaire : cas de l'émulsification d'une huile de poisson

L'émulsification est le procédé permettant d'obtenir, à partir de deux liquides non miscibles, une dispersion de gouttelettes d'un liquide dans l'autre (**Figure 7**). D'un point de vue physique, cela implique la déformation puis la fragmentation d'une goutte en plusieurs gouttes plus petites. D'un point de vue chimique, cela nécessite l'utilisation de molécules tensio-actives pour stabiliser les interfaces créées.

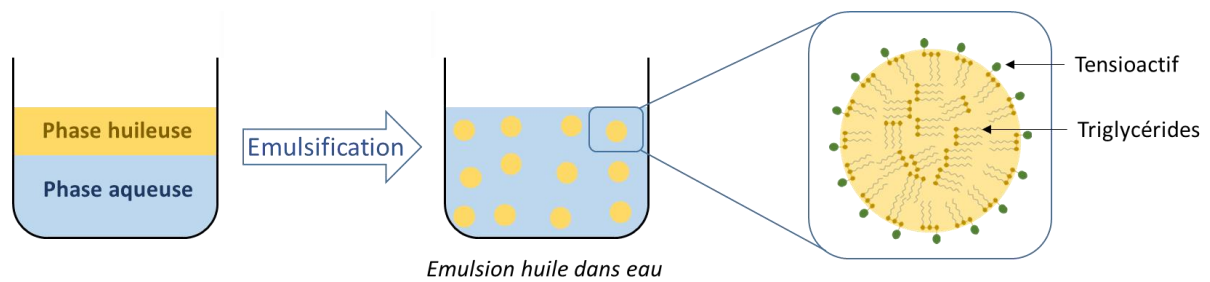


Figure 7 : Représentation schématique d'une émulsion

Des études menées chez l'homme montrent que l'émulsification d'une huile de poisson favorise l'absorption des AGPI-LC n-3 (Garaiova et al., 2007 ; Schram et al., 2007 ; Raatz et al., 2009 ; Ottestad et al., 2016). Notamment, le pic d'absorption apparaît de façon plus précoce et avec une amplitude plus importante lorsque l'huile de poisson est émulsionnée comparativement à l'huile administrée en phase continue. Les mécanismes avancés pour expliquer l'augmentation de la biodisponibilité d'une huile en milieu dispersé sont issus de données concernant les huiles végétales et, à notre connaissance, ces paramètres n'ont pas été étudiés avec des huiles marines. Parmi ces hypothèses figurent :

- L'existence de gouttelettes lipidiques préformées améliorant l'efficacité de la vidange gastrique (Borel et al., 1994 ; Armand et al., 1999)
- La présence d'une interface lipides/eau favorisant l'ancrage de la lipase pancréatique et *in fine* l'hydrolyse des TG (Borgström, 1980 ; Vors et al., 2016)
- Une micellisation des produits d'hydrolyse favorisée, associée à une hydrolyse des TG plus importante (Nacka et al., 2001 ; Couëdelo et al., 2011 ; Nguyen et al., 2019a, 2019b)

- Une augmentation de l'absorption intestinale par diffusion passive des produits d'hydrolyse due à un gradient de concentration en lipides plus important suite à une meilleure activité de la lipase pancréatique (Couëdelo et al., 2011, 2015)

Si l'interface a une telle importance dans l'amélioration de la biodisponibilité des lipides, on comprend aisément que sa composition et sa stabilité sont deux critères qui influencent la bioaccessibilité des TG alimentaires. Au cours du passage des colloïdes dans le tractus gastro-intestinal, les dynamiques physiologiques (brassage, sels biliaires, enzymes, produits d'hydrolyse) et physico-chimiques (pH, température, forces ioniques) peuvent influencer l'état physico-chimique des émulsions (Marcianni 2007 ; McClements et al., 2009). La stabilité d'une émulsion génère *in vitro*, un degré d'hydrolyse supérieur à une émulsion agrégée au niveau intestinal (Singh et al., 2009 ; Golding and Wooster, 2010 ; Golding et al., 2011). Une émulsion stable est associée chez l'homme, à une vidange gastrique plus lente et une absorption plasmatique plus rapide qu'une émulsion instable (Goetze et al., 2007 ; Marciani et al., 2007). La stabilité des émulsions est étroitement liée à la nature des agents tensioactifs. Par exemple, de par leur point isoélectrique proche du pH gastrique et leur protéolyse dans l'estomac, les protéines sont moins efficaces que les PL pour stabiliser les émulsions dans les conditions gastro-intestinales (Singh et al., 2009 ; Golding and Wooster, 2010 ; Golding et al., 2011 ; Singh and Sarkar, 2011). Par contre, les émulsions fines stabilisées par des PL subissent des phénomènes de coalescence à pH acide pour aboutir à des gouttelettes de diamètre compris entre 10 et 20 μm , *in vitro* (Couëdelo et al., 2011) et chez l'homme (Armand et al., 1999, 1996 ; Favé et al., 2004). Des études semblent démontrer qu'une émulsion fine, *i.e.* de granulométrie inférieure à 10 μm , favoriserait la digestion des lipides *in vitro* (Armand et al., 1992 ; Borel et al., 1994), *in vivo* (Borel et al., 1994) et chez l'homme (Armand et al., 1999 ; Armand, 2007) et retarderait la vidange gastrique comparativement à une émulsion grossière. Au-delà de 20 μm , le phénomène de coalescence tendrait à s'intensifier jusqu'à la destruction de l'émulsion. De fait, la nature des agents tensioactifs utilisés pour stabiliser les émulsions, module également l'étape de lipolyse gastro-intestinale. L'émulsification d'une huile de soja avec des protéines laitières (caséinate de sodium ou protéines de lactosérum) favorise l'activité *in vitro* de la lipase pancréatique par rapport à l'utilisation de PL ou d'un surfactant non ionique (tween 20) (Mun et al., 2007). A l'inverse, l'utilisation de la lécithine de soja pour stabiliser les émulsions d'huiles linoléiques

(colza ou lin) ou de fraction oléique de lait, améliore la lipolyse gastro-intestinale *in vitro* comparativement à du caséinate de sodium ou à un surfactant non ionique (tween 80) (Vors et al., 2012 ; Couëdelo et al., 2015). Cette efficacité enzymatique observée *in vitro* avec les PL est souvent cohérente avec les études *in vivo* d'absorption intestinale (Couëdelo et al., 2015 ; Lecomte et al., 2015). Par exemple, l'émulsification de l'huile de lin avec des PL améliore la biodisponibilité lymphatique de l'ALA chez le rat comparativement à une émulsion stabilisée par du caséinate de sodium (Couëdelo et al., 2015). Néanmoins, cet effet stimulant des PL sur l'activité des lipases digestives serait en lien avec la composition en espèces moléculaires de PL (Singh 2009, Mun 2007). En effet, la lipase gastrique humaine présente une plus forte activité lorsque l'interface des gouttelettes lipidiques est constituée de phosphatidylcholine (PC), de phosphatidylinositol (PI) ou de phosphatidylsérine (PS) plutôt que phosphatidyléthanolamine (PE) ou de sphingomyéline (SM) (Favé et al., 2007).

2.3.2. La modulation de la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 par l'échelle moléculaire

2.3.2.1. La structure glycéridique des TG marins

Les AGPI-LC n-3 sont essentiellement consommés sous forme de TG constitutifs de produits marins (poisson ou huile marine). Néanmoins, tous les TG marins n'ont pas la même la structure glycéridique (**Tableau 3**). Ainsi, dans les huiles de poisson, le DHA est estérifié à plus de 50% en position *sn-2* alors que l'EPA est distribué de façon plus aléatoire (30% en position *sn-2*) sur le squelette glycérol. Une particularité des huiles de mammifères marins (phoque, baleine) est l'estérification quasi exclusive des AGPI-LC n-3 en positions *sn-1/3* (Brockerhoff et al., 1968 ; Aursand et al., 1995).

Tableau 3 : Répartition (%) en position *sn-2* de l'EPA et du DHA des TG dans des huiles marines

Huiles	EPA	DHA
<i>% estérification en position sn-2 du glycérol</i>		
Huile de saumon ¹	46,1	50,6
Huile de thon et de sardine ²	37,3	52,1
Huile de foie de morue ³	37,8	74,4
Huile de phoque ³	4,6	3,2

Données issues de Christensen et al., 1994, 1995¹ ; Yoshida et al., 1996² ; Aursand et al., 1995³.

EPA : acide eicosapentaénoïque ; DHA : acide docosahexaénoïque.

Les quelques données concernant le devenir métabolique des AGPI-LC n-3 selon leur position dans les TG alimentaires sont issues d'études ayant utilisé, soit des huiles interestérifiées (Porsgaard and Høy, 2000), soit des huiles naturelles. Dans cette partie, nous avons choisi de discuter uniquement des études utilisant des huiles naturelles avec un profil en AG comparable.

En accord avec les études de digestibilité *in vitro*, l'EPA et le DHA sont mieux absorbés chez le rat lorsqu'ils sont fournis *via* l'huile de poisson par rapport à l'huile de phoque (Christensen et al., 1994 ; Yoshida et al., 1996). En effet, la différence de structure glycéridique entre les TG marins conduit à une activité lipasique plus élevée pour les huiles de poisson par rapport aux huiles de mammifères marins (Bottino et al., 1967 ; Akanbi et al., 2014). Comme déjà évoqué, l'activité de la lipase serait réduite lorsque des AGPI-LC n-3 sont présents en position *sn-1/3* des TG, du fait d'un encombrement stérique généré par la configuration moléculaire de l'EPA et du DHA.

La différence de structure des TG alimentaires se répercute sur celle des TG lymphatiques. Ainsi, l'apport d'une huile de poisson où les AGPI-LC n-3 sont distribués de manière équimolaire sur les 3 positions du glycérol conduit à une répartition du DHA équivalente entre les 3 positions des TG lymphatiques alors que l'apport d'huile de phoque (AGPI-LC n-3 exclusivement en *sn-1/3*) induit un enrichissement en AGPI-LC n-3 sur les positions *sn-1/3* des TG lymphatiques (Christensen and Høy, 1996). Cette répartition est conservée dans le plasma après intubation de l'huile de poisson et de phoque à des rats (Yoshida et al., 1996). Cette différence de structure moléculaire des TG lymphatiques semble influencer le devenir métabolique des lipoprotéines intestinales. Ainsi, chez l'animal, l'apport d'huile de phoque est plus efficace pour diminuer la teneur en TG et en cholestérol des lipoprotéines (Yoshida et al., 1996 ; Ikeda et al., 1998) et permet une meilleure épuration des CM du compartiment plasmatique (Christensen et al., 1995 ; Dubey et al., 2011), comparativement à l'huile de poisson. Une hypothèse avancée pour expliquer ces résultats est la plus forte inhibition du facteur de transcription SREBP-1c, impliqué dans la synthèse hépatique des lipides (Dubey et al., 2011). La proportion d'EPA est augmentée dans la fraction PE des plaquettes et du foie après consommation d'huile de phoque, sur du court terme (3 semaines de régime) (Yoshida et al., 1996) et sur du plus long terme (160 jours de régime) (Ikeda et al., 1998). En revanche, l'utilisation d'huile de poisson induit une accréation des AGPI-

LC n-3 près de 50% plus élevée dans les TG hépatiques (Ikeda et al., 1998). Ainsi, en position *sn-2* des TG alimentaires, les AGPI-LC n-3 seraient davantage disposés à rejoindre le foie alors qu'estérifiés en positions *sn-1/3*, ils seraient plus enclins à être captés par les tissus périphériques (Ackman, 1988). La différence de vectorisation des AG serait en partie due à la régiospécificité de la LPL plasmatique en libérant les AG en positions *sn-1/3* des TG des CM. Ces résultats sont à moduler puisque, chez le rat nouveau-né, la supplémentation en huile de phoque ou en huile de poisson ne module pas l'accrétion tissulaire des AGPI-LC n-3, que ce soit dans le cerveau, le foie ou le tissu adipeux (Christensen and Høy, 1992) et n'influence pas les performances mnésiques des rats (Jensen et al., 1996 ; Sommer Hartvigsen et al., 2004).

En conclusion, au vu des quelques études de la littérature ayant trait aux huiles naturelles, si la structure moléculaire des TG de l'huile semble bien moduler celle des TG lymphatiques et plasmatiques, l'influence sur le devenir métabolique des AGPI-LC n-3 est moins bien démontrée, notamment en termes d'accrétion tissulaire.

2.3.2.2. Les espèces moléculaires des AGPI-LC n-3

Bien qu'ils soient majoritairement consommés sous forme de TG, les AGPI-LC n-3 peuvent également être vectorisés par d'autres classes de lipides, parmi lesquelles : les esters éthyliques, les PL ou plus simplement les AGL. L'objectif de ce travail de thèse étant de comparer les formes TG et PL, nous ne présenterons que les études sur la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 ayant utilisé des formes pures de PL et de TG. Les **tableaux 4 et 5** recensent les études conduites chez l'animal, en période post-prandiale ou au travers de régimes alimentaires. Dans ce dernier cas, elles sont classées par durée croissante de régime.

Tableau 4 : Etudes conduites chez l'animal visant à comparer l'influence de la forme moléculaire (PL vs TG) d'apport des lipides sur la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 en période post-prandiale¹

Étude	Modèle animal et âge	Formes d'apport des AGPI-LC n-3	Quantités d'AGPI-LC n-3 consommées	Durée	Principaux résultats
Murota et al., 2018	Rats mâles Wistar Âge : NC	PL : PL d'œufs de saumon TG : Huile de poisson	PL 28 mg DHA/kg de masse corporelle TG 26 mg DHA/kg de masse corporelle	Cinétique de 0 à 6h	- Absorption intestinale du DHA PL = TG - Incorporation du DHA dans les TG lymphatiques PL = TG - Incorporation du DHA dans les PL lymphatiques PL > TG
Kitson et al., 2016 <i>Expérience radiotraceur</i>	Rats mâles Long Evans 11 semaines	[U-³H]TG-DHA [U-³H]PC-DHA	Dose unique TG-DHA : 454,5 mmol PC-DHA : 192,5 mmol	Cinétique de 0 à 6h	- Radioactivité cérébrale PL > TG - Radioactivité des TG plasmatiques TG > PL - Radioactivité des EC plasmatiques PL > TG
Graf et al., 2010	Rats Sprague-Dawley 2, 4 et 10 semaines	TG-[¹⁴C]DHA TG-[¹⁴C]DHA combinée à de la PC 16:0/18:1 PC-[¹⁴C]DHA	Dose unique 2 mg/kg de masse corporelle	24h	- Accrétion du DHA au niveau du cerveau, de la rétine, du foie, des poumons, des reins PL > TG <i>Uniquement chez les rats âgés de 10 semaines</i> - Addition de PC 16:0/18:1 aux TG-DHA sans effet

¹ : AGPI-LC : acides gras polyinsaturés à longue chaîne ; DHA : acide docosahexaénoïque ; NC : non communiqué ; PC : phosphatidylcholine ; PL : phospholipides ; TG : triglycérides.

Tableau 5 : Etudes conduites chez l'animal visant à comparer l'influence de la forme moléculaire (PL vs TG) d'apport des lipides sur la biodisponibilité des AGPI-LC n-3 au cours de régime à court et long terme¹

Étude	Modèle animal et âge	% de lipides dans la ration alimentaire	Formes d'apport des AGPI-LC n-3	Quantités d'AGPI-LC n-3 consommées	Durée	Principaux résultats
Tang et al., 2012	Souris Balb/c mâle	Low Fat : 5% High Fat : 22% Régime	TG : huile de poisson/huile d'algue PL : PL d'œufs de calamar	EPA 1,9 g/kg de régime DHA 5,1 g/kg de régime	1 semaine	<ul style="list-style-type: none"> - Prise de poids PL < TG en LF Aucune différence en HF - Taux en TG plasmatiques PL < TG en LF Aucune différence en HF - Accrétion hépatique du DHA PL = TG en LF et HF - Accrétion cérébrale du DHA PL = TG en LF et HF
Ding et al., 2013	Souris Balb/c	LF : 5% HF : 22% Régime	PL : PL d'œuf de calamar TG : huile de poisson/huile d'algue	EPA 1,8 g/kg de régime DHA 5 g/kg de régime	1 semaine	<ul style="list-style-type: none"> - Accrétion hépatique du AGPI-LC n-3 PL = TG en LF et HF - Accrétion adipeuse du AGPI-LC n-3 TG > PL en LF, TG = PL en HF - Accrétion musculaire des AGPI-LC n-3 TG = PL en LF et HF - Accrétion cérébrale des AGPI-LC n-3 TG = PL en LF et HF
Liu et al., 2014	Porc 16 jours	≈5% Régime	TG-[U-¹³C]DHA PC-[U-¹³C]DHA	Dose unique TG-DHA : 86 mg PC-DHA : 20 mg	6 jours	<ul style="list-style-type: none"> - Marquage cérébral, hépatique, érythrocytaire, rétinien PL > TG - Réquisition tissulaire du DHA alimentaire TG > PL

Étude	Modèle animal et âge	% de lipides dans la ration alimentaire	Formes d'apport des AGPI-LC n-3	Quantités d'AGPI-LC n-3 consommées	Durée	Principaux résultats
Wu et al., 2017	Souris ICR Nouveaux-nés (mère déficiente en AGPI n-3)	7% lipides Régime	DHA-PC : PL d'œufs de calamar DHA-TG+PC : DHA-TG + PL d'œufs de poule DHA-TG+α-GPC* <i>*α-glycerophosphorylcholine</i>	DHA-PC : EPA : 1,6 moles% DHA : 4,2 moles% DHA-TG+PC : EPA : 0,4 moles% DHA : 5,3 moles% DHA-TG+α-GPC EPA : 0,5 moles% DHA : 5,2 moles%	2, 4, 7 et 14 jours	- Accrétion cérébrale du DHA PL > TG - Accrétion hépatique du DHA TG > PL - Accrétion érythrocytaire du DHA PL > TG
Rossmeis et al., 2012 <i>Etude de biodisponibilité</i>	Souris C57/BL6 13 semaines	35% Régime	HF-ω3TG : huile de poisson HF-ω3PL : PL de poissons	EPA 0,3 à 8,2 g/kg de régime DHA 0,9 à 22,5 g/kg de régime	2 semaines	- Accrétion plasmatique de l'EPA (<i>linéaire</i>) PL > TG - Accrétion plasmatique du DHA (<i>non linéaire</i>) PL = TG
Mathews et al., 2002	Porc nouveau-nés	30% Formule laitière	Contrôle : sans AGPI-LC PL : PL d'œuf (2,5 %) TG : huiles marines + à 2,7% de lécithine soja	DHA : 0,9 g/kg de régime (0,3 g DHA/ 100 g de lipides)	16 jours	- Accrétion plasmatique du DHA PL = TG
Amate et al., 2001b <i>Expérience 1</i>	Rats femelles Wistar	3,9% Régime	Contrôle : pas d'AGPI-LC TF-TG : huiles de thon et de champignon PB-PL : PL issus de cerveau de porc	DHA : 0,9 moles%* <i>*(AG totaux)</i>	3 semaines	- Excrétion des lipides PL > TG - % d'EPA et de DHA dans les fèces PL > TG

Étude	Modèle animal et âge	% de lipides dans la ration alimentaire	Formes d'apport des AGPI-LC n-3	Quantités d'AGPI-LC n-3 consommées	Durée	Principaux résultats
Amate et al., 2001b <i>Expérience 2</i>	Rats femelles Wistar	3,9% Régime	EG-TG : TG de jaune d'œuf (<i>ré-estérification</i>) EG-PL : PL de jaune d'œufs	DHA : 0,9 moles%* <i>*(AG totaux)</i>	3 semaines	- Prise alimentaire, excrétion des lipides et profil en AG des fèces PL = TG
Song et al., 2000	Rats mâles Sprague-Dawley 4 semaines	15% Régime	TG PL	DHA : 90 mg/ 100g de masse corporelle TG EPA 3,8 moles%* DHA 7,0 moles%* PL EPA 1,9 moles%* DHA 7,1 moles%* <i>*(AG totaux)</i>	3 semaines	- Accrétion plasmatique, hépatique et rénale du DHA TG > PL
Song and Miyazawa, 2001	Rats mâles Sprague-Dawley 3 semaines	15% Régime	TG PL : PL de jaune d'œufs	DHA : 140 mg/ 100g de masse corporelle TG EPA 3,1 moles%* DHA 10,7 moles%* PL EPA 1,5 moles%* DHA 10,7 moles%* <i>*(AG totaux)</i>	3 semaines	- Accrétion plasmatique et hépatique du DHA TG > PL

Étude	Modèle animal et âge	% de lipides dans la ration alimentaire	Formes d'apport des AGPI-LC n-3	Quantités d'AGPI-LC n-3 consommées	Durée	Principaux résultats
Gázquez et al., 2017a	Rats femelles Wistar 12 semaines	7% Régime	DHA-TG : huile d'algue DHA-PL : PL d'œufs	DHA-TG (+2% PL) DHA 2,7 moles%* 12% PL-DHA DHA 2,5 moles%* 38% PL-DHA DHA 9 moles%* *(AG totaux)	27 jours (1 semaine avant gestation + 20 jours de gestation)	- Accrétion plasmatique, placentaire et fœtale du DHA PL = TG
Amate et al., 2001a	Porc 5 jours	6,8% Formule laitière	TF-TG : huiles de thon et de champignons E-PL : PL de jaune d'œufs	DHA : 0,3 moles%* *(AG totaux)	4 semaines	- Accrétion plasmatique et lipoprotéique du DHA PL = TG - Accrétion du DHA dans les PL-LDL TG > PL - Accrétion du DHA dans les PL-HDL PL > TG
Kitson et al., 2016 <i>Expérience supplémentation</i>	Rats mâle Long Evans 11 semaines	10% Régime	FO : huile de poisson PL : d'œufs de hareng FO + PL	DHA : 2 moles%* *(AG totaux)	4 semaines	- Accrétion cérébrale du DHA PL = TG
Hiratsuka et al., 2008	Souris femelle Balb/c 4 semaines	10% Régime	TG PL	DHA : 3 moles %* *(AG totaux)	5 semaines <i>Diabète au bout de 2 semaines</i>	- Accrétion cérébrale du DHA TG = PL Mais seul le groupe PL diffère du contrôle

Étude	Modèle animal et âge	% de lipides dans la ration alimentaire	Formes d'apport des AGPI-LC n-3	Quantités d'AGPI-LC n-3 consommées	Durée	Principaux résultats
Valenzuela et al., 2005	Rats femelles Wistar 3-4 semaines	8% Régime	TG PL	DHA : 8 mg /kg de masse corporelle	Non gestantes : 40 jours Gestantes : 63 jours Allaitantes : 84 jours	<ul style="list-style-type: none"> - Accrétion plasmatique du DHA PL = TG - Accrétion érythrocytaire du DHA PL > TG <i>Chez les femelles gestantes et non gestantes</i> - Accrétion hépatique et adipeuse du DHA PL > TG <i>Chez les femelles gestantes uniquement</i> - Accrétion du DHA dans le lait maternel PL > TG
Gázquez et al., 2017b	Porcs femelles âgées 12 semaines	3-4% Régime	TG PL	DHA 330 mg/ j de DHA DHA 0,8 moles%* <i>(AG totaux)</i>	40 jours <i>(dernier tiers de gestation)</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Accrétion plasmatique, lipoprotéique et placentaire du DHA PL > TG - Accrétion fœtale du DHA PL = TG
Che et al., 2018	Souris C57BL/6J	22,5% Régime	TG-DHA PL-DHA : PL d'œufs de calamars TG-DHA + PL* <i>*PL d'œufs de poules</i>	EPA : 1,2 g/kg de régime DHA : 3,8 g/kg de régime	6 semaines	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction de la triglycéridémie, cholestérolémie et HDL PL = TG - Réduction des TG hépatiques PL tend > TG - Accrétion de l'EPA et du DHA dans les PL de foie PL = TG - Accrétion dans les TG de foie : <ul style="list-style-type: none"> ○ EPA PL = TG ○ DHA TG > PL - Accrétion cérébrale du DHA PL = TG

Étude	Modèle animal et âge	% de lipides dans la ration alimentaire	Formes d'apport des AGPI-LC n-3	Quantités d'AGPI-LC n-3 consommées	Durée	Principaux résultats
Destailats et al., 2018	Rats mâle Wistar 6 semaines	20% Régime	TG PL	TG 0,29 g DHA/ 100 g de régime sec PL 0,34 g DHA/ 100 g de régime sec	60 jours	- Accrétion plasmatique et érythrocytaire du DHA PL > TG - Accrétion cérébrale et rétinienne du DHA PL = TG
Awada et al., 2013	Souris mâle C57BL/6 8 semaines	20% Régime	TG PL	TG 0,2 mg EPA /g de régime 2,8 mg DHA/g de régime PL 0,4 mg EPA /g de régime 3,9 mg DHA g de régime	8 semaines	- Accrétion plasmatique du DHA TG > PL - Effet des n-3 sur l'inflammation et le stress oxydant TG = PL
Rossmesl et al., 2012 <i>Etude prévention de l'obésité</i>	Souris C57/BL6 13 semaines	35% Régime	HF-ω3TG : huile de poisson HF-ω3PL : PL de poissons	HF-ω3TG 30 g EPA+DHA/kg de régime HF-ω3PL 10 g EPA+DHA/kg de régime 30 g EPA+DHA/kg de régime	9 semaines	- Réduction des TG, des AGL plasmatiques et des TG hépatiques PL > TG - Accrétion hépatique et adipeuse du DHA TG = PL Accrétion de l'EPA dans les PL foie PL > TG - Accrétion plasmatique des AGPI-LC n-3 PL > TG - % hépatiques et musculaires de PE 38:6, PE 40:6, PI 38:5 et PI 40:4 PL > TG

Étude	Modèle animal et âge	% de lipides dans la ration alimentaire	Formes d'apport des AGPI-LC n-3	Quantités d'AGPI-LC n-3 consommées	Durée	Principaux résultats
Rossmesl et al., 2012 <i>Etude inversion de l'obésité</i>	Souris C57/BL6 13 semaines	35% Régime	HF-ω3TG : huile de poisson HF-ω3PL : PL de poissons	30 g EPA+DHA/kg de régime	9 semaines (après régime obésogène de 4 mois)	<ul style="list-style-type: none"> - Réduction des TG, des AGL et du cholestérol plasmatiques PL = TG - Réduction des lipides hépatiques PL > TG - Augmentation de l'expression génique hépatique de : <ul style="list-style-type: none"> ○ AOX : PL > TG ○ ACOT2 : PL = TG - Réduction de l'expression génique hépatique de : <ul style="list-style-type: none"> ○ FAS : PL > TG ○ SCD1 : PL = TG
Aïd et al., 2005	Rats femelles Wistar + descendance mâle	6 à 11% Régime	TG : huile de poisson E-PL : PL d'œufs	TG EPA : 0,2 à 0,8 g/kg de régime DHA : 0,9 à 2,9 g/kg de régime PL EPA : 0,2 à 0,5 g/kg de régime DHA : 1,0 à 2,9 g/kg de régime	13 semaines (2 semaines avant fécondation Descendance : 2 premiers mois de vie)	<ul style="list-style-type: none"> - Profil en AG du lait maternel PL = TG - Accrétion cérébrale (PC & PE) du DHA PL = TG

¹ : α -GPC : α -glycérophosphorylcholine ; ACOT2 : acyl-CoA Thioestérase 2 ; AG : acides gras ; AGL : acides gras libres ; AGPI-LC : acides gras polyinsaturés à longue chaîne ; AOX : acyl-CoA oxydase ; DHA : acide docosahexaénoïque ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; FAS : fatty acid synthase ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; HF : régime hyperlipidique ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; LF : régime normolipidique ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PI : phosphatidylinositol ; PL : phospholipides ; SCD1 : stéaryl-CoA désaturase 1 ; TG : triglycérides.

Avant de discuter des différentes études de biodisponibilité des AGPI-LC n-3 en fonction du vecteur moléculaire PL ou TG, il est important de souligner que la comparaison des groupes d'une même étude ainsi que la comparaison des études entre elles sont très délicates car d'autres facteurs que la nature des lipides entrent en jeu :

- **Le groupe contrôle.** Dans de nombreuses études, les PL sont dilués dans des huiles végétales et le groupe contrôle est composé uniquement d'huile de poisson (Valenzuela et al., 2005 ; Rossmeisl et al., 2012 ; Ding et al., 2013 ; Destailats et al., 2018 ; Murota et al., 2018). Or, des études récentes montrent que la présence de PL dans la ration alimentaire influence le métabolisme des lipides. Notamment, l'apport de PL végétaux favorise l'enrichissement plasmatique et érythrocytaire en AGPI-LC n-3 fournis sous forme de TG (van Wijk et al., 2016) et augmente de façon dose dépendante la teneur en AG totaux et en TG hépatiques (Gázquez et al., 2017a). Ainsi, pour pouvoir comparer l'effet de la forme de vectorisation des AGPI-LC n-3, il conviendrait que la quantité d'AG et la nature des lipides administrés soient identiques dans les différents groupes expérimentaux. Dans ce cas, le seul paramètre de variation serait la forme moléculaire des lipides sur laquelle sont estérifiés les AG.
- **L'espèce animale.** Les études de supplémentation utilisent majoritairement des rats. Mais, certaines sont réalisées avec des souris, des hamsters ou des porcs. Les rats sont largement utilisés puisque l'on considère que leur système digestif met en jeu les mêmes enzymes digestives que l'homme et à des concentrations similaires. Ils représentent donc un modèle de choix pour étudier les premières étapes de la biodisponibilité. Néanmoins, il convient de rappeler que les rats expriment une forme non active de CETP qui influence le devenir métabolique des lipoprotéines plasmatiques et, de fait, le transport des AG dans la circulation sanguine. A la différence du modèle murin, le hamster exprime une forme active de CETP et un plus haut taux de VLDL, en faisant un meilleur modèle pour l'étude du métabolisme des lipoprotéines (Suckling and Jackson, 1993). Au sein d'une même espèce de rat, l'expression génique de protéines impliquées dans le métabolisme hépatique et adipocytaire des lipides peut varier selon la souche considérée. Ainsi, chez le *Sprague-Dawley*, le PPAR α présente une expression génique près de 5 fois supérieure à celle retrouvée chez le *Wistar* (Miranda et al., 2018), ce qui impacte leur réponse face à un

régime hyper-calorique. Par ailleurs, les souches *Wistar*, *Long-Evans* et *Sprague-Dawley* diffèrent par l'activité des $\Delta 5$ - et $\Delta 6$ -désaturases (de Antueno et al., 1994). De même, chez la souris, la souche *Balb/C* présente une plus forte expression d'enzymes impliquées dans la β -oxydation hépatique (PPAR α , acylCoA oxydase, carnitine palmitoyltransferase-1) que la souche *C57/BL6* (Haramizu et al., 2009), ce qui la rend moins sensible au régime obésogène. Des études s'accordent à dire que le porc offre de nombreux avantages pour l'étude de la nutrition lipidique du nouveau-né. En effet, il présente des similarités avec l'homme vis-à-vis du développement intestinal, du métabolisme digestif, absorptif et lipoprotéique, du développement cérébral et la myélinisation ainsi qu'au niveau de la composition en AG du lait maternel (Innis, 1993).

- **L'âge des animaux.** Lorsque cela est mentionné, on constate qu'au démarrage des études, l'âge des animaux varie de quelques jours à 13 semaines. Or, la maturité des systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme lipidique et l'accrétion tissulaire des AG varient avec l'âge. Par exemple, une étude menée chez des rats âgés de 2, 4 et 10 semaines montre que les PL marins favorisent l'accrétion cérébrale du DHA uniquement chez les animaux âgés de 10 semaines (Graf et al., 2010).
- **La durée de la supplémentation.** La durée de supplémentation varie de 0 à 13 semaines selon les études considérées. Or, l'accrétion tissulaire des AGPI-LC n-3 pourrait être influencée par la durée de la supplémentation nutritionnelle. Ainsi, chez l'homme, la cinétique d'accrétion des AGPI-LC n-3 évolue jusqu'à atteindre un plateau, dont la hauteur dépend des quantités apportées, de la nature des AG mais aussi des tissus et des fractions lipidiques considérées (Katan et al., 1997 ; Arterburn et al., 2006 ; Cao et al., 2006). Si on s'autorise la transposition de ces données à l'animal, l'état stationnaire pour une concentration d'AG dans un tissu pourrait varier (valeur de la concentration et temps pour atteindre cette valeur) selon la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3.
- **Le mode de supplémentation.** Dans la plupart des études référencées précédemment, les animaux reçoivent leur apport en lipides *via* un régime *ad libitum*. Néanmoins, dans quelques études, les animaux sont intubés et reçoivent la dose journalière en lipides en une seule prise. L'apport d'une quantité importante de lipides sur un temps

relativement court pourrait influencer aussi bien les étapes de bioaccessibilité que le métabolisme hépatique des lipides.

- **Les quantités consommées et les teneurs en lipides de la ration alimentaire.** Toutes les études n'expriment pas les apports nutritionnels avec la même unité, la comparaison des études est donc délicate. Or, il est important de comparer des études utilisant des doses de lipides et, notamment d'AGPI-LC n-3, similaires afin de s'assurer que les voies du métabolisme lipidique mises en jeu sont les mêmes. En effet, un régime hyperlipidique augmente l'accrétion cérébrale du DHA et réduit son incorporation dans le tissu adipeux comparativement à un régime normolipidique (Ding et al., 2013). De plus, chez le rat, l'EPA et le DHA présentent profil d'accrétion différent. Ainsi, l'accrétion plasmatique de l'EPA est linéairement corrélée à son apport dans le régime alors qu'elle suit une courbe logarithme pour le DHA (effet de saturation) (Rossmeisl et al., 2012).
- **Le rapport DHA/EPA.** Quelques données récentes suggèrent que le ratio DHA/EPA est important à considérer, ces deux acides gras n'ayant pas les mêmes devenir métaboliques et donc n'engendrant pas nécessairement les mêmes effets « santé » (Méndez et al., 2013 ; Molinar-Toribio et al., 2015 ; Liu et al., 2016 ; Shang et al., 2017). Dans les études recensées, ce rapport DHA/EPA varie entre 1,8 et 14. Comme nous l'avons mentionné, l'EPA et le DHA ne suivent pas la même cinétique d'accrétion dans le plasma des souris soumis à un régime obésogène (Rossmeisl et al., 2012). En effet, alors que celle du DHA sature dès 7 g/kg de régime, celle de l'EPA s'effectue de façon linéaire en fonction de sa quantité dans la ration alimentaire. De plus, au niveau du cerveau et de la rétine, le DHA représente un des AG majoritaires, alors que l'EPA y est presque absent. Enfin, le panel d'oxylipines produits à partir de l'EPA est beaucoup plus large que celui issu du DHA.

Malgré ces restrictions, il est intéressant de classer les études selon les enrichissements en AGPI-LC n-3 observés et la forme moléculaire de vectorisation, PL ou TG, aboutissant aux meilleurs résultats. Le **tableau 6** montre qu'il n'y a pas de consensus qui permettrait de préconiser une forme de vectorisation des AG plutôt qu'une autre. On remarque aussi que les résultats sont très dépendants du marqueur ou des tissus analysés.

Tableau 6 : Effets de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (TG, PL) sur leur accrétion tissulaire

PL > TG ¹	PL = TG	TG > PL
- Amate et al. 2001 <i>DHA dans les PL des HDL</i>	- Mathews et al. 2002 <i>DHA dans le plasma</i>	- Amate et al. 2001 <i>DHA dans les PL des LDL</i>
- Cansell et al. 2006 <i>EPA dans les EC du plasma</i> <i>DHA dans les TG et EC du plasma</i>	- Valenzuela et al. 2005 <i>DHA dans le plasma</i>	- Kitson et al. 2016^d <i>DHA* dans les TG</i> <i>plasmatiques</i>
- Rossmeisl et al. 2012^a <i>EPA dans le plasma</i>	- Rossmeisl et al. 2012^a <i>DHA dans le plasma</i>	- Awada et al. 2013 <i>DHA dans le plasma</i>
- Gazquez et al. 2017 <i>Plasma, lipoprotéines</i> <i>plasmatiques, placenta</i>	- Amate et al. 2001 <i>DHA dans plasma et les</i> <i>lipoprotéines</i>	- Song et Miyazawa 2000 <i>DHA dans le plasma et le</i> <i>foie</i>
- Quazquez et al. 2017b <i>DHA dans le plasma, les</i> <i>lipoprotéines et le placenta</i>	- Gazquez et al. 2017a <i>DHA dans le plasma, le</i> <i>placenta et le fœtus</i>	- Song et al. 2000 <i>DHA dans le plasma, le</i> <i>foie et les reins</i>
- Destailats et al. 2018 <i>DHA dans le plasma et les GR</i>	- Rossmeisl et al. 2012^b <i>DHA dans le foie et le tissu</i> <i>adipeux</i>	- Wu et al. 2017 <i>DHA dans le foie</i>
- Rossmeisl et al. 2012^b <i>AGPI-LC n-3 dans le plasma</i> <i>EPA dans les PL du foie</i>	- Che et al. 2018 <i>EPA dans les TG de foie</i> <i>EPA et DHA dans les PL de</i> <i>foie</i> <i>DHA dans le cerveau</i>	- Che et al. 2018 <i>DHA dans les TG de foie</i>
- Valenzuela et al. 2005 <i>DHA dans le foie, les GR, le tissu</i> <i>adipeux et le lait maternel</i>	- Tang et al. 2012 <i>DHA dans le foie et le cerveau</i>	- Ding et al. 2013 <i>AGPI-LC n-3 dans le tissu</i> <i>adipeux</i>
- Liu et al. 2014^c <i>DHA* dans le cerveau, le foie, les</i> <i>GR et la rétine</i>	- Kitson et al. 2016^e <i>DHA dans le cerveau</i>	
- Wu et al. 2017 <i>DHA dans le cerveau et les GR</i>	- Hiratsuka et al. 1997 <i>DHA dans le cerveau</i>	
- Kitson et al. 2016^d <i>DHA* dans le cerveau et les EC</i> <i>plasmatiques</i>	- Ding et al. 2013 <i>AGPI-LC n-3 dans le foie, le</i> <i>cerveau et le muscle</i>	
- Graf et al. 2010 <i>DHA dans le cerveau, la rétine, le</i> <i>foie, le poumon et les reins</i>	- Destailats et al. 2018 <i>DHA dans le cerveau et la</i> <i>rétine</i>	
	- Aïd et al. 2005 <i>DHA dans le lait maternel et</i> <i>le cerveau</i>	
	- Gazquez et al. 2017b <i>DHA dans le fœtus</i>	

¹: EPA : acide eicosapentaénoïque ; DHA : acide docosahexaénoïque ; GR : globules rouges ; PL : phospholipide ; TG : triglycéride.

^a : Rossmeisl et al. 2012, étude de biodisponibilité ; ^b : Rossmeisl et al. 2012, étude de prévention de l'obésité ; ^c : Liu et al. 2014, utilisation de DHA marqué ([U-¹³C]DHA ; DHA*) ; ^d : Kitson et al. 2016, expérience radiotraceur, utilisation de DHA marqué ([U-³H]DHA ; DHA*) ; ^e : Kitson et al. 2016, expérience de supplémentation.

Les études présentées jusqu'à présent concernaient les formes alimentaires TG ou PL, riches en AGPI-LC n-3, fournies en phase continue. Dans le cas des PL, certaines études ont utilisé leur capacité d'auto-assemblage pour les administrer sous forme de liposomes. En effet, la nature amphiphile des PL est à l'origine de leur propriété d'auto-assemblage en phase aqueuse. Les phospholipides s'agencent de manière à minimiser les interactions entre les chaînes carbonées hydrophobes et les molécules d'eau. Ainsi, en milieu aqueux, les queues apolaires se regroupent au centre d'une bicouche et les têtes polaires sont exposées au milieu aqueux. Les phospholipides forment ainsi une particule sphérique appelée liposome (**Figure 8**).

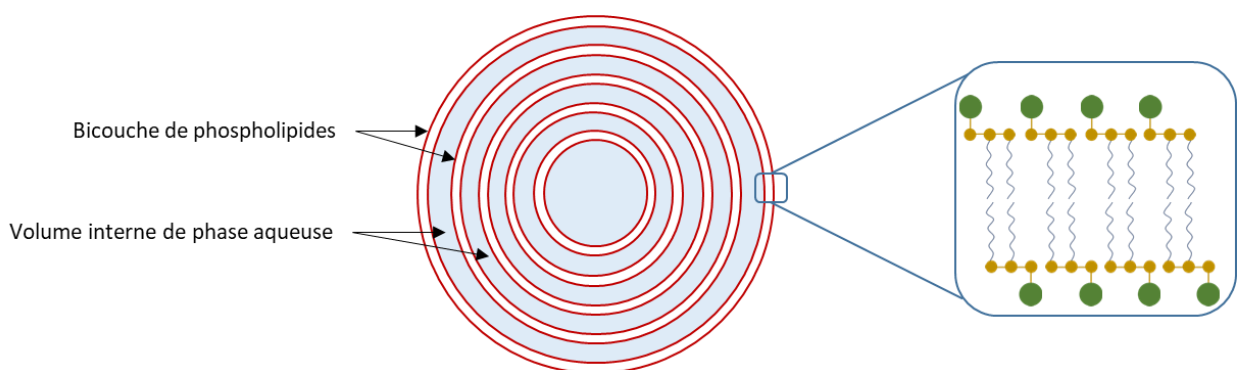


Figure 8 : Représentation schématique d'un liposome multilamellaire

De façon générale, les AGPI-LC n-3 sont absorbés de façon plus efficace lorsqu'ils sont intubés sous forme de liposomes à base de PL marins comparativement à une huile de poisson, chez le rat (Cansell et al., 2003). Même si leur incorporation dans les fractions lipidiques de la lymphe se fait indépendamment de la forme moléculaire d'apport, les liposomes permettent d'améliorer les proportions d'EPA et de DHA dans les TG et PL lymphatiques par rapport à l'huile de poisson. D'un point de vue structural, l'apport de PL marins réduit respectivement de 50% et 38% l'estérification de l'EPA et du DHA en position *sn*-2 des TG lymphatiques, comparativement à l'apport de TG marins. Dans le plasma, l'apport de liposomes ou d'huile de poisson, chez le rat, pendant 13 jours, se traduit par un effet hypotriglycéridémiant similaire pour les deux types de régime (Cansell et al., 2006), mais l'accrétion plasmatique des AGPI-LC n-3 est en faveur des liposomes. Si les résultats vont dans le sens des PL marins, il est difficile de les attribuer uniquement à la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3, puisque ces derniers sont structurés sous forme de liposomes, alors que l'huile de poisson est fournie en phase continue. Dans cette étude, il faut également

prendre en compte que l'apport de 100% PL ou de 100% TG peut induire une réorientation des voies de synthèse des lipides dans l'entérocyte.

A notre connaissance peu d'études comparant TG vs PL ont été menées chez l'homme et la plupart concerne l'utilisation de l'huile de krill de par son taux élevé en PL (40-60%) (European Food Safety Authority (EFSA), 2009; Castro-Gómez et al., 2015). Dans une étude clinique en cross-over, randomisée en double aveugle, l'apport de 600 mg d'AGPI-LC n-3 (EPA et DHA) sous forme d'huile de krill, durant 4 semaines, augmente les taux d'EPA, d'acide docosapentaénoïque (DPA) et de DHA dans les érythrocytes, comparativement à un apport d'huile de poisson (Ramprasath et al., 2013). L'accrétion d'AGPI-LC n-3 dans les érythrocytes semble être d'autant plus importante que le taux de PL alimentaires est important (Ramprasath et al., 2015). Selon une autre étude, l'apport d'huile de krill permet d'améliorer le statut plasmatique en EPA de façon plus efficace que l'huile de poisson, alors qu'aucune différence n'est trouvée au niveau du DHA (Maki et al., 2009). Néanmoins, dans cette étude, bien que l'apport en EPA soit identique entre les groupes, les teneurs alimentaires en DHA sont près de 2 fois plus faibles dans le groupe soumis à l'huile de krill que dans celui recevant l'huile de poisson (97% de variation). Les auteurs concluent que le DHA apporté sous forme d'huile de krill est au moins aussi bien absorbé que le DHA apporté sous forme d'huile de poisson. En revanche, d'autres études ne sont pas aussi concluantes quant à une meilleure biodisponibilité des AGPI-LC n-3 sous forme de PL marins. Ainsi, la consommation d'EPA et de DHA pendant 28 jours (Yurko-Mauro et al., 2015) ou en dose unique (Schuchardt et al., 2011) selon qu'ils soient sous forme d'huile de poisson ou sous forme d'huile de krill n'induit pas de différence au niveau des taux plasmatiques et érythrocytaires des AGPI-LC n-3. En conclusion, si l'effet santé de l'huile de krill ne peut être remis en question (Burri and Johnsen, 2015 ; Ulven and Holven, 2015 ; Ursoniu et al., 2017), l'attribution de ses propriétés est difficilement attribuable aux seuls PL en raison de la complexité du profil lipidique de cette huile et de la présence d'antioxydants tels que l'astaxanthine absente des huiles de poisson.

3. Objectifs des travaux de thèse

L'étude bibliographique a fait ressortir les rôles physiologiques des AGPI-LC n-3 et l'intérêt de les consommer en quantité adéquate afin de prévenir un certain nombre de pathologies (cardio-vasculaires, inflammatoires, neurodégénératives). Eu égard aux consommations actuelles, il devient donc indispensable d'augmenter les apports en AGPI-LC n-3, sans modifier l'apport en lipides totaux, qui lui respecte les recommandations. Une des stratégies actuellement en développement consiste à jouer sur des paramètres de vectorisation des AGPI-LC n-3 pour améliorer leur biodisponibilité. Les études réalisées jusqu'à présent mettent en évidence deux pistes : (1) l'émulsification de l'huile et (2) l'estérification des AGPI-LC n-3 dans des PL. Si l'intérêt de l'émulsification ne fait plus de doute, les données obtenues à ce jour sont essentiellement issues d'études avec des huiles végétales et peu d'études ont prouvé ces effets avec des huiles marines. Par ailleurs, la plus-value nutritionnelle des PL par rapport à la forme TG, classiquement consommée, reste encore à démontrer. Il semble que l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les TG lymphatiques après un apport de PL marins conduise à une externalisation du DHA. Ces AGPI pourraient ainsi emprunter des voies métaboliques différentes conduisant à une bioactivité fonction du type de lipides marins ingérés. Néanmoins, la plupart des études se sont concentrées sur l'accrétion tissulaire et peu de données sont disponibles vis-à-vis des étapes précoces (*i.e.* digestion, absorption, métabolisme entérocytaire), étapes conditionnant la bioactivité des AGPI-LC n-3. De plus, du fait de l'absence de formulations comparables entre les groupes (rapport DHA/EPA par exemple), de la non prise en compte du rôle intrinsèque des PL (hormis support d'AG), de l'oxydabilité éventuelle des formulations, il est difficile de tirer des conclusions claires quant à l'intérêt des PL marins par rapport aux TG marins.

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans la maîtrise des paramètres nutritionnels visant à améliorer la biodisponibilité des AGPI-LC n-3. L'objectif final est de pouvoir préconiser une ou des formes de vectorisation des AGPI-LC n-3, notamment du DHA, à l'échelle moléculaire ou supramoléculaire, pour un effet biologique ciblé. L'originalité de ce travail repose sur la formulation de mélanges lipidiques présentant : (1) un profil et des quantités en AG, dont AGPI-LC n-3, comparables et (2) un ratio DHA/EPA similaire. De plus, les résultats sont issus de l'utilisation de différentes approches expérimentales du métabolisme lipidique qui sont complémentaires, à savoir la lipolyse gastro-intestinale *in vitro* et l'absorption intestinale et

l'accrétion tissulaire *in vivo*. Une telle méthodologie nous permet ainsi d'évaluer l'effet d'un seul facteur à la fois, *i.e.* forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 ou forme physique de dispersion des lipides, sur la bioaccessibilité et la bioactivité des AGPI-LC n-3.

Afin de répondre à cette problématique, trois études, constituant les trois parties du chapitre « Résultats et discussion », ont été menées :

- La **première partie** s'attache à formuler les lipides que ce soit en phase continue ou en milieu dispersé. Il est important de noter que, malgré un intérêt grandissant pour les PL marins, l'approvisionnement reste encore difficile. Nous avons donc recherché des sources de PL compatibles avec nos exigences (rapport DHA/EPA, pureté, ...) puis réalisé des mélanges avec des huiles végétales. Le même travail a été réalisé avec les huiles marines. La caractérisation des molécules de PL par résonance magnétique nucléaire (RMN) a été réalisée par Axelle Grélard (Institut Européen de Chimie et de Biologie, Pessac, France). Différents types de milieux dispersés (émulsions, liposomes) ont ensuite été formulés et caractérisés. Une attention particulière a été portée sur la stabilité oxydative des AGPI-LC n-3 qui est une question majeure à résoudre en vue de l'utilisation industrielle de ce type de systèmes. Parallèlement, la digestibilité des AGPI-LC n-3 a été étudiée en fonction de leur forme moléculaire par titrimétrie (pH-Stat). La question sous-jacente de cette approche étant : est-il possible de prédire la bioaccessibilité de formules lipidiques en utilisant un modèle *in vitro* ?
- La **deuxième partie** porte sur l'influence des formes physico-chimiques de vectorisation des AGPI-LC n-3 vis-à-vis de leur absorption intestinale *in vivo* et du métabolisme entérocytaire des lipides néo-synthétisés. Plus précisément, cette partie traite de l'influence (1) de la forme moléculaire d'apport des AGPI-LC n-3 (TG marins vs PL marins), (2) de l'effet de l'émulsification de l'huile de poisson et l'importance de l'interface huile/eau (phase continue vs émulsion) et (3) de la structuration des PL marins (émulsion vs liposomes). Ces études ont été conduites chez le rat, par un modèle de fistulation du canal lymphatique ; la lymphe a été analysée au pic d'absorption des lipides (6 heures). Dans cette partie, il s'agit de répondre à la question suivante : la forme de vectorisation des AGPI-LC n-3, à

l'échelle moléculaire ou supramoléculaire, module-t-elle de manière différenciée la bioaccessibilité de ces AG par rapport aux AG totaux ?

- La **troisième partie** consiste à étudier l'impact de la forme moléculaire d'apport des AGPI-LC n-3 (TG vs PL) sur leur accréation tissulaire, par un régime à long terme mené chez le rat. L'analyse du profil en PL des lipides cérébraux et rétiniens en spectrométrie de masse est le fruit d'un travail collaboratif avec Corinne Buré (CBMN, Bordeaux, France). Les recommandations actuelles de l'ANSES visent à augmenter les apports en AGPI-LC n-3, or peu de données sont disponibles concernant l'effet d'une telle supplémentation sur du long terme. Notamment, les AGPI-LC n-3 sont hautement sensibles à la peroxydation lipidique, processus largement incriminé dans l'étiologie de pathologies cardio-vasculaires et neurodégénératives. Ainsi, l'effet d'une telle supplémentation sur le statut oxydatif des animaux sera abordé vis-à-vis de la peroxydation lipidique et du stress oxydant *in vivo*. Cette partie vise à tenter de faire le lien entre les résultats de bioaccessibilité et le devenir métabolique des AGPI-LC n-3.

Chapitre 2

Matériels et méthodes

1. Matériels

1.1. Molécules lipidiques

1.1.1. Huiles végétales et marines

Les huiles de poisson utilisées (Omégavie 1812 TG et Tuna oil 25% DHA) sont fournies par Polaris (France). Dès réception et, après chaque prélèvement, les huiles sont passées sous courant d'azote et conservées à -20°C afin de limiter toute oxydation chimique des AGPI.

Les huiles de coprah, de palme et de pépin de raisin proviennent, respectivement, de chez Végétaline (Uniliver, Pays-Bas), Greentech (ADM-SIO, France) et Lesieur (Avril, France). Les huiles de lin et de tournesol oléique sont commercialisées par Bioplanète (France). Après chaque échantillonnage, les huiles végétales sont passées sous courant d'azote et sont conservées à 4°C.

La composition en AG des huiles (**Tableau 7**) est analysée par chromatographie en phase gazeuse (CPG) après (trans)méthylation des AG (Cf. Chapitre 2, 2.4. et 2.5.).

Tableau 7 : Profil en acides gras (moles%) des différentes huiles marines et végétales

	Huile de coprah	Huile de palme	Huile de lin	Huile de pépin de raisin	Huile de tournesol oléique	Huile Omégavie 1812 TG	Huile Tuna oil 25% DHA
<i>Acides gras (moles%)</i>							
Σ AGS	99,5	50,0	10,7	10,9	5,8	28,1	28,9
12:0	52,9	0,3	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
14:0	21,8	0,9	0,0	0,1	0,0	7,0	3,8
16:0	11,3	43,6	5,6	6,8	3,1	15,9	18,3
18:0	13,2	4,7	4,7	3,8	1,7	3,4	4,9
Σ AGMI	0,4	40,9	19,2	16,9	91,9	26,5	27,4
16:1 n-7	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	8,3	5,1
16:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,3
18:1 n-11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,4	0,4
18:1 n-9	0,3	39,8	17,7	15,7	90,6	7,4	14,2
18:1 n-7	0,0	0,7	0,8	0,7	0,8	3,1	2,7
20:1 n-11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2
20:1 n-7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2
20:1 n-9	0,0	0,1	0,2	0,2	0,3	1,5	1,4
22:1 n-11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	0,6
22:1 n-9	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,2	0,2
24:1 n-9	0,0	0,1	0,2	0,2	0,3	0,4	0,5
Σ AGPI	0,1	9,0	70,1	72,3	2,2	45,0	43,3
Σ AGPI n-6	0,1	8,6	14,1	71,7	2,2	3,9	6,1
18:2 n-6	0,1	8,6	14,1	71,7	2,2	1,6	2,3
18:3 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2
20:3 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2
20:4 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	1,8
22:4 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2
22:5 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	1,2
Σ AGPI n-3	0,0	0,2	56,0	0,3	0,0	40,7	37,0
18:3 n-3	0,0	0,2	56,0	0,3	0,0	0,9	0,7
18:4 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,5	1,1
20:4 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,6
20:5 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,1	8,2
22:5 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	1,6
22:6 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,0	24,2

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

1.1.2. Lécithine marine et lécithines de soja

La lécithine marine (Lecimarine F50), fournie par Novastell (France), est extraite d'œufs de hareng. D'après le fournisseur, cette lécithine est composée à 44% de PL et à 56% de lipides neutres, qui sont majoritairement des TG. La lécithine de soja délipidée provient de chez Nat&Form (France) et n'est composée que de PL.

Les lécithines de soja et marine sont caractérisées en termes de profil en PL (**Tableau 8**) et en AG (**Tableau 9**). Le profil en PL est déterminé par résonance magnétique nucléaire du phosphore (^{31}P RMN) par Axelle Grélard (CBMN) (Cf. **Annexe 1**) et la composition des AG est analysée par CPG après transméthylation (Cf. Chapitre 2, 2.4. et 2.5.).

Tableau 8 : Classes de phospholipides (% phospholipides totaux) de la lécithine marine et de la lécithine de soja identifiées par ^{31}P RMN

	Lécithine de soja	Lécithine marine
	<i>Phospholipides (% phospholipides totaux)</i>	
Phosphatidylcholine	31,7	73,8
Phosphatidylinositol	29,3	3,5
Phosphatidyléthanolamine	29,6	5,2
Phosphatidylsérine	5,4	0,0
Acide phosphatidique	4,0	1,2
Sphingomyéline	0,0	2,9
Lysophosphatidylcholine	0,0	9,2

Tableau 9 : Profil en acides gras (moles%) des phospholipides de la lécithine marine et de la lécithine de soja

	Lécithine marine	Lécithine de soja
<i>Acides gras (moles%)</i>		
Σ AGS	23,6	25,3
12:0	0,0	0,0
14:0	3,5	0,1
16:0	17,3	21,2
18:0	1,5	3,1
Σ AGMI	18,4	19,1
16:1 n-7	3,1	0,2
16:1 n-9	0,5	0,0
18:1 n-11	1,1	0,0
18:1 n-9	7,6	16,8
18:1 n-7	3,0	1,7
20:1 n-11	0,2	0,0
20:1 n-9	0,0	0,1
20:1 n-7	0,1	0,0
22:1 n-11	0,8	0,0
24:1 n-9	0,8	0,0
Σ AGPI	58,0	55,7
Σ AGPI n-6	2,5	50,7
18:2 n-6	1,0	50,7
20:3 n-6	0,1	0,0
20:4 n-6	0,6	0,0
22:4 n-6	0,1	0,0
22:5 n-6	0,4	0,0
Σ AGPI n-3	55,5	4,8
18:3 n-3	0,8	4,7
18:4 n-3	1,0	0,1
20:4 n-3	0,8	0,0
20:5 n-3	13,6	0,0
22:5 n-3	2,3	0,0
22:6 n-3	36,5	0,0

Σ: somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés

1.1.3. Autres produits

Le **Tableau 10** liste l'ensemble des produits utilisés dans ce travail de thèse.

Tableau 10 : Produits, pureté et origine utilisés

Produits	Pureté	Fournisseur
Solvants		
Acétone	Grade analytique	Thermo Fisher Scientific
Butanol	Grade analytique	Thermo Fisher Scientific
Chloroforme	Grade analytique	Thermo Fisher Scientific
Ethanol	Grade analytique (>99,8%)	Thermo Fisher Scientific
Ether diéthylique	Grade HPLC ¹	Thermo Fisher Scientific
Isooctane	Grade HPLC	Thermo Fisher Scientific
Méthanol	Grade HPLC	Thermo Fisher Scientific
Acides/ bases		
Acide acétique glacial	Grade analytique	Thermo Fisher Scientific
Acide chlorhydrique	Grade analytique	Thermo Fisher Scientific
Acide formique	Grade analytique	VWR
Acide perchlorique	Grade analytique	Thermo Fisher Scientific
Hydroxyde de potassium	Grade analytique	Thermo Fisher Scientific
Soude 5 N		Chem-Lab
Réactifs		
Acide trichloroacétique (TCA)	Grade ACS ² (>99%)	Sigma-Aldrich
Antiprotéases		Sigma-Aldrich
Carbonate de sodium	99,5%	Acros Organics
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	Grade ACS	VWR
Chlorure de potassium (KCl)	99%	Thermo Fisher Scientific
Chlorure de sodium (NaCl)	>99%	Thermo Fisher Scientific
Désoxycholate de sodium	>97%	Sigma-Aldrich
Dichlorofluorescéine (DCF)	>90%	Sigma-Aldrich
Dithiothréitol (DTT)	>97%	Sigma-Aldrich

Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA)	Grade analytique	Thermo Fisher Scientific
Formate d'ammonium	Grade MS ³ (>99%)	Sigma-Aldrich
Hydroxytoluène butylé (BHT)	>99%	Sigma-Aldrich
Iodure de potassium (KI)	>99%	VWR
Iotect		VWR
Méthoxyde de sodium	Grade ACS	Sigma-Aldrich
Méthylcellulose		Sigma-Aldrich
Réactif de Bradford		Sigma-Aldrich
Saccharose	>99,5%	Sigma-Aldrich
Tampon phosphate salin (PBS)		Sigma-Aldrich
Tétraméthoxytétraéthoxypropane (TEP)	>95%	Sigma-Aldrich
Thiodène		Thermo Fisher Scientific
Thiosulfate de sodium		VWR
Trifluorure de Bore		Sigma-Aldrich
Enzymes		
Extrait pancréatique de porc		Sigma-Aldrich
Lipase B, <i>Candida antarctica</i>	>2000 U/g (1 U=1 µEq AG/h)	Sigma-Aldrich
Phospholipase A2, venin d'abeille	600-2400U/g (1 U=1 µEq AG/h)	Sigma-Aldrich
Standards		
1,2-diheptadécanoyl-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (PC 17:0)	>99%	Avanti Polar Lipids
1,2,3-triheptadécanoyl-sn-glycérol (TG 17:0)	>99%	Nu-Chek-Prep
5-cholesten-3β-yl-docosanoate (EC 22:0)	>99%	Nu-Chek-Prep
Acide heptadécanoïque (AGL 17:0)	>99%	Nu-Chek-Prep
Albumine sérique de bœuf	1,9-2,05 mg/mL	Sigma-Aldrich
Hexanal	>97%	Sigma-Aldrich
Propanal	>97%	Sigma-Aldrich
δ-tocophérol	>90%	Sigma-Aldrich
Produits vétérinaires		
Buprénorphine		Axience
Isoflurane		Zoetis
Kétamine		Axience
Lidocaïne		Ceva
Pentobarbital sodique		Axience
Xylazine		Axience

¹ : Grade HPLC : grade chromatographie liquide à haute performance.

² : Grade ACS : grade validé par la société chimique américaine (American Chemical Society).

³ : Grade MS : grade spectrométrie de masse.

1.2. Modèle animal : le rat

Les études *in vivo* sont menées sur des rats mâles de la souche Wistar, âgés de 8 semaines (300 g), provenant de l'élevage Janvier (France). A réception, les rats sont placés dans des cages transparentes (480 x 375 x 210 mm) et acclimatés sous un régime normocalorique et normolipidique (Aliment entretien A04, SAFE, France) pendant 8 jours. Les rats sont nourris *ad libitum* et disposent d'eau à volonté. Les animaux sont élevés dans une animalerie conventionnelle (Université de Bordeaux, France) dans des conditions de température ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) et d'hydrométrie constantes (60%), avec un cycle jour/nuit de 12 h/12 h. Les expériences sont réalisées en conformité avec le comité d'éthique local de Bordeaux. Les procédures utilisées sont conformes à la directive européenne 2010/63 concernant la manipulation des animaux de laboratoire et la formation des personnels.

2. Caractérisation des lipides

2.1. Extraction des lipides totaux selon la méthode de Folch

Les lipides totaux contenus dans les milieux biologiques (lymphe, plasma et tissus) ou dans les régimes sont extraits en utilisant un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) à raison de 20 volumes par volume de matériel (Folch et al., 1957). Au terme d'une heure d'agitation, 0,2 volume d'une solution de chlorure de potassium (KCl à 0,8% dans l'eau ; m/v) par volume du mélange d'extraction est ajouté pour permettre la séparation des phases hydroalcoolique et chloroformique. Le mélange est mis sous agitation pendant 5 minutes avant d'être centrifugé (1 050 g ; 5 min ; 4°C ; Sorval ST 40R, Thermo-Scientific, Etats-Unis). La phase chloroformique est récupérée et lavée trois fois par un volume équivalent de la phase hydroalcoolique précédemment éliminée (chloroforme/méthanol/KCl à 0,8% (3/48/47 ; v/v/v)). La phase chloroformique finale est filtrée (papier filtre standard ; Thermo Fisher Scientific) en utilisant un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Le filtrat est séché par un évaporateur rotatif, mis en solution dans du chloroforme, filtré sur un filtre en microfibre de verre (Whatmann ; Thermo Fisher Scientific) afin d'éliminer toutes traces d'eau puis évaporé sous courant d'azote. L'extrait sec est remis en solution dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) et conservé à -20°C jusqu'aux analyses.

2.2. Séparation des fractions lipidiques par chromatographie sur couche mince

Les différentes classes de lipides des tissus sont séparées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les échantillons de lipides totaux sont séchés sous courant d'azote et repris dans un volume précis d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Ils sont ensuite déposés sur une plaque de verre recouverte d'un gel de silice (TLC silica gel 60, 20 x 20 cm ; Merck, Allemagne). La migration est réalisée dans une cuve saturée en solvant. La phase mobile utilisée est adaptée aux espèces lipidiques à séparer (**Tableau 11**).

Tableau 11 : Composition des solvants de migration selon les espèces lipidiques à séparer

Solvants	Proportion des solvants (volume)	Espèces à séparer
Ether diéthylique/acétone	60/20	Lipides polaires et apolaires
Hexane/éter diéthylique/ acide acétique	80/20/1	PL, 2-MG, stérols, DG, AGL, TG et EC
Hexane/éter diéthylique/ acide formique	70/30/1	2-MG, DG, esters éthyliques d'AG et TG
Chloroforme/méthanol/eau	65/25/4	PL, lysoPL, AGL
Ether diéthylique/acétone	60/20 <i>1^{ère} migration</i>	Lipides polaires et lipides apolaires
Chloroforme/méthanol/acide acétique/eau	50/37,5/3,5/2 <i>2^{ème} migration</i>	PL selon la nature de la tête polaire

2-MG : 2-monoglycérides ; AGL : acides gras libres ; DG : diglycérides ; EC : esters de cholestérol ; LysoPL : lysophospholipides ; PL : phospholipides ; TG : triglycérides.

Après migration, une solution de 2,7-dichlorofluorescéine (DCF) à 0,2% dans l'éthanol est vaporisée sur les plaques de silice afin de révéler les différentes fractions lipidiques sous lumière ultraviolets (UV) à 254 nm. Les zones fluorescentes correspondant aux différentes fractions lipidiques sont identifiées à l'aide des rapports de front des standards lipidiques chromatographiés dans les mêmes conditions et sur la même plaque.

2.3. Extraction des fractions lipidiques du gel de silice après chromatographie sur couche mince

Après identification, les fractions lipidiques sont extraites de la silice par addition de 2,5 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Après homogénéisation et centrifugation (1 050 g, 5 min, 20°C), la phase organique est prélevée. Cent µL d'eau distillée et 2 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) sont ajoutés à la phase de silice. Après

séparation des phases par centrifugation (1 050 g, 5 min, 20°C), la phase organique est collectée. L'extraction des fractions lipidiques du gel de silice prend fin par addition de 2 mL de méthanol à la silice puis centrifugation (1 050 g, 5 min, 20°C). Les phases organiques sont regroupées puis séchées sous azote. Enfin, la DCF est éliminée des extraits lipidiques par ajout de 0,4 mL d'une solution de chlorure de potassium (KCl à 0,8% dans de l'eau distillée ; m/v) et 2 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) aux extraits secs. Après élimination de la phase aqueuse, la phase organique est lavée 2 fois par addition de 0,8 mL d'un mélange composé de chloroforme, de méthanol et d'une solution aqueuse de KCl à 0,8% (m/v) (15/240/235 ; v/v/v). La phase chloroformique finale contenant les lipides est séchée sous azote, reprise dans un volume de chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) puis stockée à -20 °C en attente des analyses.

2.4. (Trans)méthylation des lipides

La méthode de (trans)méthylation des lipides, *i.e.* lipides totaux et fractions lipidiques issus des études *in vitro* et *in vivo*, huiles et lécithines, est inspirée de Castro-Gómez et al., 2014. Préalablement, nous avons montré que cette méthode, basée sur une catalyse séquentiellement basique puis acide, est efficace sur l'ensemble des classes lipidiques étudiées (PL, TG, AGL, EC) riches en AGPI-LC n-3, prises de façon individuelle (fractions pures) ou en mélange complexe (matrice biologique) (Sehl et al., 2018) (Cf. **Annexe 2**).

Les échantillons secs sont repris dans 2,5 mL de méthoxyde de sodium puis incubés 10 minutes à 80°C sous agitation. Après ajout de 3 mL d'une solution d'acide sulfurique dans du méthanol (1 M ; pH 1), la (trans)méthylation des échantillons s'effectue à 100°C. Le temps de réaction dépend de la fraction lipidique considérée (**Tableau 12**). L'ajout de 2 mL d'hexane et de 7,5 mL d'une solution aqueuse de carbonate de sodium (6% ; m/v), suivi d'une étape de centrifugation (1 218 g, 10 min, 4°C) permet la séparation de la phase aqueuse de la phase organique contenant les esters méthyliques d'acides gras (EMAG). Cette dernière est prélevée puis évaporée sous courant d'azote. L'extrait sec est repris dans un volume d'isooctane et stocké à 4°C en attente d'analyse par CPG (Cf. Chapitre 2, 2.5.).

Tableau 12 : Temps de (trans)méthylation à 100°C utilisés

Fraction lipidique	Temps d'incubation à 100°C (min)
Lipides neutres (MG, DG, AGL, TG et EC)	45
PL sans sphingomyéline	45
PL avec sphingomyéline	90

AGL : acides gras libres ; DG : diglycérides ; EC : esters de cholestérol ; MG : monoglycérides ; PL : phospholipides ; TG : triglycérides.

2.5. Analyse des esters méthyliques d'acides gras par chromatographie en phase gazeuse

Le profil en AG des EMAG est analysé par CPG couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les EMAG sont injectés dans une colonne capillaire de silice greffée (ZB-FAME, 60 m x 0,25 mm, épaisseur du film : 0,20 µm ; Phenomenex, Etats-Unis). L'injecteur et le détecteur sont soumis à une température de 250°C et 280°C, respectivement. La pression d'entrée du gaz vecteur (dihydrogène) est fixée à 1,2 Bar. Le volume de solution injecté varie entre 1 et 2 µL en mode split et le rapport de fuite varie de 21 à 81 selon la concentration des EMAG. La programmation de température de la colonne est la suivante : après 31 minutes à 160°C, la température augmente de 5°C/min jusqu'à 195°C. Cette température est maintenue constante pendant 15 minutes avant d'augmenter de 35°C/min jusqu'à une température de 230°C, maintenue pendant 20 minutes.

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 à l'aide du logiciel ChromQuest (Thermo Fisher Scientific). La quantification pondérale des EMAG est obtenue grâce à un standard interne (**Tableau 13**) ajouté à l'échantillon en quantité précisément mesurée, avant toute manipulation.

Tableau 13 : Standards internes utilisés pour la quantification pondérale des lipides

Standard interne	Lipides quantifiés
1,2,3-triheptadécanoyl- <i>sn</i> -glycérol TG 17:0	<ul style="list-style-type: none"> - AG totaux des huiles et formules lipidiques - AG totaux à chaque point de la cinétique de lipolyse - AG des lipides totaux et de la fraction TG de la lymphe - AG des lipides totaux et de la fraction TG du foie et du plasma
1,2-diheptadécanoyl- <i>sn</i> -glycéro-3-phosphatidylcholine PC 17:0	<ul style="list-style-type: none"> - AG totaux des lécithines - AG des lipides totaux et de la fraction PL de la lymphe - AG de la fraction PL du foie et du plasma - AG des lipides totaux du cerveau
Acide héptadécanoïque AGL 17:0	<ul style="list-style-type: none"> - AGL libres à chaque point de la cinétique de lipolyse
5-cholesten-3 β -yl-docosanoate EC 22:0	<ul style="list-style-type: none"> - AG de la fraction EC du foie et du plasma

AG : acides gras ; AGL : acides gras libres ; EC : esters de cholestérol ; PC : phosphatidylcholine ; PL : phospholipides ; TG : triglycérides.

2.6. Analyse de la structure glycéridique des lipides par méthode enzymatique

2.6.1. Structure des triglycérides des huiles végétales et marines et des triglycérides lymphatiques

Les méthodes enzymatiques conventionnelles pour déterminer la structure glycéridique des TG consistent à hydrolyser les lipides par une lipase spécifique des positions *sn*-1/3, généralement la lipase pancréatique de porc, puis à séparer les 2-MG issus de l'hydrolyse par CCM. Néanmoins, cette enzyme ne peut être utilisée pour des TG d'origine marine du fait d'une forte résistance à l'hydrolyse due à l'encombrement stérique des AGPI-LC (Bottino et al., 1967 ; Akanbi et al., 2014). Ainsi, afin d'analyser la structure glycéridique de TG riches en AGPI-LC, de nouvelles méthodes ont été développées utilisant des lipases dont la spécificité vis-à-vis des AG est faible (Shimada et al., 2003). C'est le cas de la lipase B de *Candida Antartica*, régiospécifique des positions *sn*-1/3 des TG.

La méthode utilisée dans nos études est basée sur celle décrite par Watanabe et al., 2015, avec quelques modifications. Cette méthode est une éthanolyse des TG qui libère des 2-MG, DG et esters éthyliques d'AG (EEAG) (**Figure 9**).

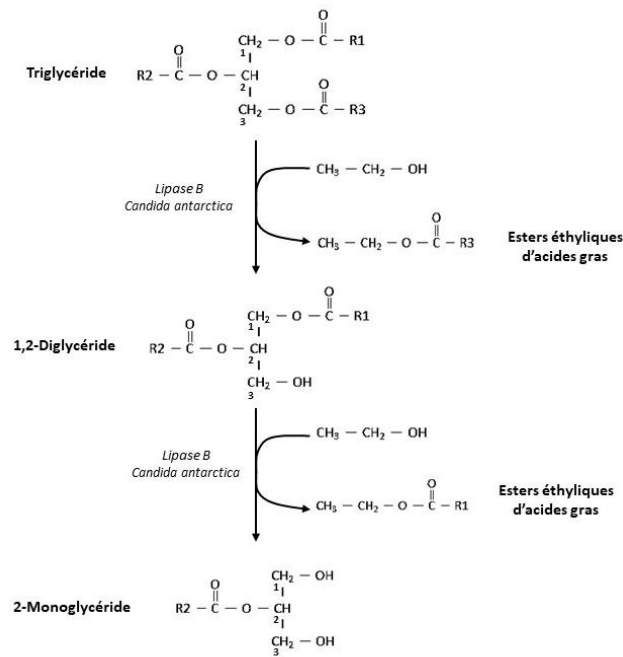


Figure 9 : Représentation schématique de l'éthanololyse des TG par la lipase B (*Candida antarctica*)

Plus précisément, 3 mg de TG sont dilués dans 1 mL d'une solution d'enzyme (4 mg de lipase/mL dans l'éthanol). Le mélange réactionnel est mis à incuber, sous agitation, pendant 3 heures à 30°C. L'ensemble des lipides (TG et produits d'hydrolyse) sont extraits 6 fois par l'addition de 10 mL d'éther diéthylique, séché à l'évaporateur rotatif puis repris dans un volume connu de chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Les TG et leurs produits d'hydrolyse (2-MG, EEAG, et DG) sont séparés par CCM dans un éluant composé d'hexane, d'éther diéthylique et d'acide formique (70/30/1 ; v/v/v). Après révélation à la DCF, les 2-MG sont transméthylés (Cf. Chapitre 2, 2.4.) et le profil en AG est analysé par CPG (Cf. Chapitre 2, 2.5.).

La proportion de chaque AG estérifié en position *sn-2* des TG est calculée à partir de l'AG considéré, présent dans les 2-MG et dans les TG totaux, selon la formule suivante :

$$\% \text{ AG en position } sn-2 = \frac{\% \text{ AG dans les 2-MG}}{(\% \text{ AG dans les TG}) \times 3} \times 100$$

2.6.2. Structure des phospholipides de la lécithine marine et des phospholipides lymphatiques

La distribution des AG en position *sn-2* des PL est obtenue selon la méthode enzymatique décrite par Wolff et al., 1985, en utilisant la PLA₂ de venin d'abeille, régiospécifique de la position *sn-2* des PL libérant un 1-lysoPL et un AGL. Deux mg de PL et 150

μL d'une solution aqueuse de PLA_2 (1 mg/mL ; CaCl_2 3 mM) sont ajoutés à 1 mL d'éther diéthylique. Le mélange réactionnel est incubé 1 heure à 30°C sous agitation. La réaction est arrêtée par évaporation du solvant sous azote. Les produits de dégradation des PL (LysoPL et AGL) sont séparés par CCM dans un éluant composé de chloroforme, méthanol et d'eau distillée (65/25/4 ; v/v/v). Après révélation à la DCF, les AGL sont méthylés (Cf. Chapitre 2, 2.4.) et le profil en AG est analysé par CPG (Cf. Chapitre 2, 2.5.).

La proportion de chaque AG en position *sn*-2 des PL est calculée à partir de l'AG considéré, présent dans les acides gras libres et dans les PL totaux, selon la formule suivante :

$$\% \text{ AG en position } sn-2 = \frac{\% \text{ AGL des PL}}{(\% \text{ AG dans les PL}) \times 2} \times 100$$

3. Préparation et caractérisation des formules lipidiques

3.1. Préparation des formules lipidiques

3.1.1. Fractionnement des phospholipides marins

Les lipides polaires étant insolubles dans l'acétone (Pimentel et al., 2018), le fractionnement d'une lécithine par l'acétone glacé représente une méthode simple et efficace pour extraire les PL. Pour cela, 1 g de lécithine marine est dissout dans 1 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Après addition de 20 mL d'acétone glacé (-20°C), l'échantillon est rapidement homogénéisé au vortex (30 sec) et centrifugé (1 050 g, 5 min, 4°C). Le surnageant contenant les lipides apolaires est éliminé et le précipité contenant les lipides polaires est dissout dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). L'extraction est répétée trois fois sur le précipité. L'ensemble des phases contenant les lipides polaires est passé sous courant d'azote puis stocké à -20°C .

3.1.2. Composition des formules lipidiques

Cinq formules lipidiques ont été préparées au cours de ce travail de thèse.

- Deux formules lipidiques, composées uniquement de lipides végétaux, sont exemptes d'AGPI-LC n-3 (notées TG_{veg} et $\text{TG}_{\text{veg}}+\text{PL}_{\text{veg}}$).

- Trois sources d'AGPI-LC n-3 sont élaborées afin que l'EPA et le DHA soient estérifiés, soit sur des TG (formules à base d'huiles de poisson notées **TG_{n-3}** et **TG_{n-3}+PL_{veg}**), soit sur des PL (formule contenant les PL issus de la lécithine marine notée **TG_{veg}+PL_{n-3}**).

Les PL sont des vecteurs d'AGPI-LC n-3 mais ils ont également des propriétés émulsifiantes. Afin de faire la différence entre ces deux fonctionnalités, la formule à base d'huiles de poisson est supplémentée avec 10% de lécithine de soja (formule notée **TG_{n-3}+PL_{veg}**). La composition des formules en huiles et PL est présentée dans le **Tableau 14**.

Tableau 14 : Composition des huiles et lécithine des 5 formules lipidiques utilisées

	TG_{veg}¹	TG_{veg}+PL_{veg}	TG_{n-3}	TG_{n-3}+PL_{veg}	TG_{veg}+PL_{n-3}
<i>g/100g de formulation</i>					
Huile de lin	1	-	1	-	1
Huile de coprah	6	6	5	5	5
Huile de pépin de raisin	6	-	5	-	5
Huile de palme	30	29	28	24	26
Huile de tournesol oléique	57	50	50	50	50
Mélange d'huiles marines ²	-	-	11	11	-
PL marins ³	-	-	-	-	13
Lécithine de soja	-	15	-	10	-

¹ : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{veg}+PL_{veg} : formule dépourvue d'AGPI-LC n-3 à base d'huiles végétales supplémentées en lécithine de soja ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

² : Mélange d'huiles de poisson 1812 TG et Tuna oil 25% DHA (1/10, m/m).

³ : Phospholipides extraits de la lécithine marine.

Une attention particulière a été portée sur l'élaboration des formules, de sorte que les cinq formules présentent : (1) une composition des AG saturés et monoinsaturés du même ordre de grandeur et (2) un rapport DHA/EPA des PL marins similaire à celui des formules **TG_{n-3}** et **TG_{n-3}+PL_{veg}** par combinaison des huiles de poisson. La composition des principaux AG des 5 formules lipidiques est présentée dans le **Tableau 15**, la composition complète est donnée **Annexe 3**.

Tableau 15 : Profil en principaux acides gras (moles%) des formules lipidiques

	TG _{veg} ¹	TG _{veg} +PL _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
<i>Acides gras (moles%)</i>					
Σ AGS	25,8	26,7	25,7	25,0	25,0
12:0	3,0	2,8	2,6	2,6	2,7
14:0	1,4	1,6	1,7	1,7	1,5
16:0	16,1	17,4	17,0	16,7	16,5
18:0	3,4	3,9	3,6	3,1	3,3
Σ AGMI	65,7	63,5	61,6	63,3	62,9
18:1 n-9	64,6	62,2	58,8	60,9	61,2
Σ AGPI	9,4	9,9	12,6	11,5	12,1
Σ AGPI n-6	8,5	9,2	8,2	7,0	8,0
18:2 n-6	8,5	9,2	7,8	6,6	8,0
20:4 n-6	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1
Σ AGPI n-3	0,7	0,7	4,3	4,4	3,9
18:3 n-3	0,7	0,6	0,7	0,4	0,7
20:5 n-3	0,0	0,0	0,9	1,0	0,8
22:5 n-3	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1
22:6 n-3	0,0	0,0	2,2	2,5	2,2

¹ : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{veg}+PL_{veg} : formule dépourvue d'AGPI-LC n-3 à base d'huiles végétales supplémentées en lécithine de soja ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).
 Σ : sommes ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

La structure glycéridique des TG présents dans le mélange d'huiles de poisson et les PL marins est caractérisée par méthode enzymatique (Cf. Chapitre 2, 2.6.). Le **Tableau 16** présente la proportion des principaux AG en position *sn*-2 des TG et des PL marins.

Tableau 16 : Répartition (%) en position *sn*-2 des principaux acides gras des triglycérides du mélange d'huiles de poisson et des phospholipides marins utilisés dans les formules lipidiques

	TG _{n-3} ¹	PL _{n-3} ²
	% estérification en position <i>sn</i> -2 du glycérol	
Σ AGS	28,4	13,2
14:0	47,3	7,0
16:0	28,8	12,3
18:0	10,0	27,7
Σ AGMI	24,4	22,3
16:1 n-7	34,7	25,0
18:1 n-9	25,9	33,1
18:1 n-7	25,9	16,0
20:1 n-9	15,8	18,7
Σ AGPI	41,6	76,4
Σ AGPI n-6	31,9	53,3
18:2 n-6	32,1	46,1
20:4 n-6	33,1	79,2
Σ AGPI n-3	42,9	77,0
18:3 n-3	30,1	36,6
20:5 n-3	26,1	74,2
22:5 n-3	43,0	78,0
22:6 n-3	50,6	79,9

¹ : mélange d'huiles de poisson Omégavie 1812 TG et Tuna oil 25% DHA (1/10 ; m/m).

² : phospholipides extraits de la lécithine marine.

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

La teneur en antioxydants des formules des lipidiques (tocophérols et tocotriénols) a été dosée en interne (ITERG), par chromatographie liquide à haute performance 5CLHP), selon le protocole décrit en **Annexe 4**.

Tableau 17 : Composition des vitamines E (mg/ kg de matière grasse) des formules lipidiques¹

	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
<i>Composés vitaminiques E (mg/ kg de matière grasse)</i>				
α-tocophérol	319	376	373	356
β-tocophérol	8	18	18	16
γ-tocophérol	12	81	85	10
δ-tocophérol	0	34	38	2
Tocophérols totaux	340	508	516	383
α-tocotriénol	65	58	46	55
β- tocotriénol	4	4	4	4
γ- tocotriénol	92	86	66	81
δ- tocotriénol	16	18	15	16
Tocotriénols totaux	177	166	131	156
Activité vitaminique E <i>(mg d'équivalent α-tocophérol/kg de matière grasse)</i>	32,5	39,3	39,3	36,5

¹ : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

3.1.3. Emulsification des formules lipidiques

L'émulsification consiste à homogénéiser deux liquides non miscibles en utilisant un procédé mécanique. Dans cette étude, les émulsions huile dans eau sont préparées en utilisant un système turbulent (Ultra-turrax Janke & KunKel, équipé d'un axe générateur (10 mm, S25-N-10G – IKA)). Les émulsions sont réalisées à partir des formules enrichies en AGPI-LC n-3 et stabilisées par du désoxycholate de sodium (0,45% ; m/m) et soit de la lécithine de soja (TG_{n-3}+PL_{veg}), soit des PL marins (TG_{veg}+PL_{n-3}) dans les proportions indiquées dans le **Tableau 14**. Les émulsions sont obtenues en versant les formules lipidiques dans l'eau. La vitesse d'homogénéisation est fixée à 9 500 tours/min pendant 5 minutes. L'émulsification est réalisée sous courant d'azote et dans la glace pour limiter les réactions d'oxydation des AGPI.

3.1.4. Préparation des liposomes

Les liposomes sont préparés à partir des PL marins extraits de la lécithine marine. Après extraction, les PL sont séchés dans un ballon à l'aide d'un évaporateur rotatif (bain marie à 30°C). Le film de PL ainsi obtenu est hydraté avec un volume d'eau (eau distillée ; pH 7,4)

ajusté selon la concentration en PL souhaitée (130 mg/mL), et laissé sous agitation rotative à température ambiante sous azote jusqu'à complète dispersion des PL.

3.2. Caractérisation physique des milieux dispersés

3.2.1. Microscopie à contraste de phase

Les systèmes colloïdaux (émulsions, liposomes) sont analysés qualitativement par microscopie à contraste de phase qui permet l'observation d'objets peu absorbants, présentant un indice de réfraction différent de celui du milieu environnant. Le microscope utilisé est un microscope optique à contraste interférentiel Olympus BX51 X40 (Olympus, Allemagne) équipé d'un objectif à immersion huile de grossissement 100 et d'ouverture numérique de 1,30. Une caméra vidéo équipée d'un dispositif à augmentation analogique de contraste (caméra CCD, Colorview I, Soft Imaging System, Olympus) permet de visualiser et d'enregistrer les images qui sont numérisées pour être retraitées grâce au logiciel Analysis (Olympus).

3.2.2. Granulométrie laser

Le diamètre moyen des gouttes d'huile des émulsions et des liposomes est déterminé par granulométrie laser (Mastersizer 2000 Hydro SM, équipé d'un laser Helium-Néon, Malvern Instruments S.A, Royaume-Uni). La diffraction laser repose sur le principe de dispersion de la lumière par les particules en solution à des angles inversement proportionnels à leur taille. Ainsi, les grosses particules diffusent la lumière à de petits angles, alors que les petites particules la dévient à de grands angles. Les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée sont mesurées par une série de détecteurs afin de calculer le diamètre moyen des particules, selon la théorie de Mie qui décrit la diffusion élastique, sans modification de la longueur d'onde, d'une onde électromagnétique par des particules.

Les analyses sont réalisées dans l'eau (indice de réfraction 1,330) en considérant un indice de réfraction des particules lipidiques de 1,460.

3.2.3. Potentiel zêta ζ

Le potentiel zêta ζ est une caractéristique des suspensions colloïdales qui reflète le potentiel de surface des particules. Le potentiel zêta ζ est mesuré selon la méthode d'électrophorèse laser Doppler (Zeta Sizer, WallisTM, Cordouan Technologies, France). Elle

consiste à mesurer, par effet Doppler, la modification de la fréquence d'un laser émis par interaction avec la suspension, due au mouvement électrophorétique des particules.

Les analyses sont réalisées à une température de 25°C au pH des émulsions, en considérant comme solvant l'eau (constante diélectrique 78,06 ; viscosité 0,888 cP). Les données sont traitées avec le logiciel ZetaQ (Cordouan) inhérent au Zeta Sizer, selon la fonction de Smoluchowski.

3.3. Caractérisation chimique des formules lipidiques

3.3.1. Dosage des diènes conjugués dans les formules lipidiques

La mesure de l'indice de diènes conjugués (I_{DC}) représente une méthode simple, rapide et sans solvant organique chloré permettant d'évaluer le degré d'oxydation primaire d'huiles riches en AGPI. Les diènes conjugués sont issus d'un réarrangement électronique des doubles liaisons des hydroperoxydes. De nombreuses études montrent une très bonne corrélation entre l'indice de peroxydes et les diènes conjugués (Shahidi et al., 1994). Néanmoins, il n'existe pas de valeur normative pour les diènes conjugués.

Environ 10 mg de lipides sont prélevés et dissous dans 10 mL d'isooctane. Un volume de 250 μ L est ajouté dans des puits d'une microplaque de titration en quartz. L'absorbance correspondant au pic d'absorption des diènes conjugués, *i.e.* 232 nm, est lue au lecteur de microplaque (Synergy HTX, Biotek, Etats-Unis).

L'indice de diènes conjugués est calculé par le rapport suivant :

$$I_{DC} = \frac{DO_{232}}{C_{Lipides}}$$

Où I_{DC} : indice de diènes conjugués ; DO_{232} : absorbance de l'échantillon à 232 nm ; $C_{Lipides}$: concentration des lipides de l'échantillon précisément mesurée.

3.3.2. Dosage des aldéhydes volatils

La peroxydation lipidique prend fin avec les étapes de terminaison générant des produits secondaires d'oxydation non radicalaires, dont des aldéhydes volatils. Ces aldéhydes sont détectables et quantifiables par CPG couplée à l'espace de tête. La nature des aldéhydes volatils libérés au cours de la peroxydation témoigne de la famille d'AGPI dont ils sont issus.

Ainsi, le propanal dérive spécifiquement de l'oxydation des AGPI n-3, alors que l'hexanal et le pentanal dérivent de l'oxydation des AGPI n-6.

Un volume correspondant à 1 mL de lipides (formulations lipidiques en phase continue, en émulsion ou liposomes) est placé dans un flacon de 10 mL hermétiquement scellé de sorte que le rapport entre le volume de lipides et celui de l'air (espace de tête) soit similaire ($R \approx 0,1$) pour chaque échantillon. Les aldéhydes mesurés dans l'espace de tête représentent la part à l'équilibre entre la phase liquide et la phase gazeuse. Les flacons sont incubés à 37°C, à l'obscurité. Au terme du temps d'incubation imparti (entre 0 et 24h), les échantillons sont immédiatement congelés à -20°C pour arrêter toute réaction d'oxydation, en attente des analyses par CPG.

Tableau 18 : Volumes de formule lipidique utilisés pour la détermination des composés volatils dans l'espace de tête

	Formules en phase continue ¹	Formules en émulsion ²	Liposomes ³
Volume air (mL)	9	8	8,2
Volume échantillon (mL)	1	2	1,8

¹ : Formules $TG_{n-3}+PL_{veg}$ et $TG_{veg}+PL_{n-3}$ en phase continue.

² : Formules $TG_{n-3}+PL_{veg}$ et $TG_{veg}+PL_{n-3}$ en émulsion (lipides 50%).

³ : Formule $TG_{veg}+PL_{n-3}$ dans laquelle les PL_{n-3} sont structurés en liposomes (1 mL de liposomes PL_{n-3} (0,11 g/ mL) + 0,71 g de mélange d'huiles végétales TG_{veg}).

TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; $TG_{n-3}+PL_{veg}$: formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; $TG_{veg}+PL_{n-3}$: formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Les composés présents dans l'espace de tête sont prélevés, par accumulation, sur une fibre adsorbante (SPME : solid phase microextraction ; fibre SPME DBC/carboxen/PDMS ; Sigma-Aldrich). L'analyse est ensuite réalisée par CPG (GC 7090A, Agilent, Etats-Unis) équipé d'une colonne polaire (ZB-WAX, 60 m x 0,25 mm, épaisseur du film : 0,25 μ m ; Phenomenex) et d'un analyseur de masse simple quadripôle (MSD 5975C, Agilent). La température de l'injecteur est fixée à 260°C. L'analyseur de masse est composé d'une source d'ionisation et d'un analyseur quadripôle, fixés à une température de 230°C et 150°C, respectivement. Le programme de température appliqué à la colonne est le suivant : la température est maintenue à 40°C pendant 10 minutes, puis augmente de 3°C/min jusqu'à 70°C puis s'élève de 20°C/ min jusqu'à 200°C. La pression d'entrée du gaz vecteur est fixée à 1,6 Bar (débit d'hydrogène de 1,5 mL/min).

Les résultats obtenus sont exploités à l'aide du logiciel GC/MSD ChemStation (Agilent) inhérent à la CPG, où, pour chaque échantillon, les aldéhydes sont identifiés par leur temps de rétention. Afin de corriger les variations d'aires dues à l'injection et à l'adsorption sur la fibre, des étalons deutérés purs (propanal et hexanal) sont ajoutés aux échantillons. Les aires sous les pics correspondant au propanal et à l'hexanal sont ensuite normalisées en fonction de l'aire des étalons ajoutés puis quantifiées à l'aide de gammes d'étalonnage. Ces gammes sont réalisées à partir de solutions standards d'aldéhydes purs (propanal et hexanal) dissous dans les formules lipidiques en phase continue non oxydées et analysées dans les mêmes conditions que les échantillons.

4. Etude *in vitro* de la digestion gastro-intestinale des formules lipidiques

4.1. Conditions *in vitro* de la digestion gastro-intestinale

La lipolyse enzymatique des formules lipidiques est suivie par titrimétrie *in vitro* (pH-Stat). L'hydrolyse des liaisons ester AG-glycérol par les lipases digestives conduit à la libération d'AGL acidifiant le milieu. Le principe utilisé dans cette méthode consiste à neutraliser l'acidification du milieu réactionnel avec une solution de soude afin de maintenir un pH constant de 7,5.

Le protocole expérimental utilisé dans ce travail de thèse est adapté de Carrière et al., 2000 et Minekus et al., 2014 avec quelques modifications. Dans un premier temps, une émulsion de formule lipidique à 25% (m/m), stabilisée par 1,4% (m/v) de méthylcellulose, est préparée. L'émulsion est diluée au quart dans une solution tampon composée de 0,6% (m/v) de méthylcellulose, de NaCl (150 mM), de CaCl₂ (1,4 mM) et de déoxycholate de sodium (20 mM), pour un volume total de 20 mL. Le mélange réactionnel est incubé sous agitation magnétique, à 37°C au bain-marie et le pH est ajusté à 5,5 par addition d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,1 N). La lipolyse gastrique est initiée par addition de 3 mL d'un broyat de langue de rat (0,2% (m/v) dans du sérum physiologique à 0,9% (m/v) de NaCl) contenant la lipase gastrique. Le pH est maintenu à 5,5 pendant 30 min minutes *via* une titration automatique des AGL par une solution de soude à 0,1 M (pH-Stat Titrand, Metler Toledo, Etats-Unis). Au terme de la phase gastrique, le pH est rapidement ajusté à 7,5. La lipolyse duodénale est initiée par addition de 1 mL d'une solution aqueuse d'extrait pancréatique de porc (6,7 mg/mL ; pH 7,5) contenant l'ensemble des enzymes digestives (lipase pancréatique,

PLA₂, notamment). Le pH est maintenu constant à 7,5 pendant 60 minutes *via* titration automatique. Différents échantillons du milieu réactionnel sont collectés sur une période de temps de 0 à 90 min.

La lipolyse enzymatique est réalisée sur les 3 formules enrichies en AGPI-LC n-3 (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** ou **TG_{veg}+PL_{n-3}**) ainsi que sur la formule **TG_{veg}+PL_{veg}**, utilisée comme témoin. Les expériences sont réalisées en triplicat.

4.2. Extraction des lipides et détermination du taux de lipolyse

L'extraction des lipides, *i.e.* lipides non hydrolysés et produits d'hydrolyse, est réalisée extemporanément sur la totalité des échantillons (0,5 mL) en homogénéisant les prélèvements avec 200 µL d'HCl 0,1 N et 5 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Les échantillons sont agités vigoureusement puis centrifugés (1 050 g ; 5 min ; 4°C) afin de séparer les phases hydrophile et hydrophobe. La phase supérieure aqueuse est éliminée et la phase inférieure contenant les lipides est séchée sous courant d'azote, reprise dans 3 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) puis stockée à -20°C en attendant les analyses.

Les AGL, provenant de l'hydrolyse des TG et des PL, sont isolés par CCM en utilisant un éluant composé d'hexane, d'éther diéthylique et d'acide acétique (80/20/1 ; v/v/v). Les teneurs en AG libres, d'une part, et celle des lipides totaux, d'autre part, sont quantifiées par CPG, par addition d'un standard interne (TG 17:0 pour les AG des lipides totaux et AGL 17:0 pour les AGL), après (trans)méthylation des AG en EMAG.

A chaque point de la cinétique, le degré de lipolyse est calculé par :

$$\text{Degré de lipolyse} = \frac{\text{Quantité d'AGL}}{\text{Quantité d'AG}_{\text{totaux}}} \times 100$$

Où Quantité d'AGL : teneur en acides gras libres issus de l'hydrolyse des TG et PL, au temps T (mg/mL) ; Quantité d'AG_{totaux} : teneur en acides gras des lipides totaux de l'échantillon de formule lipidique (mg/mL).

5. Etude *in vivo* de l'absorption intestinale des lipides et du métabolisme entérocytaire

La technique de fistulation du canal lymphatique mésentérique du rat utilisée dans cette thèse est adaptée de la technique de Bolman (Bollman et al., 1948) avec quelques modifications (Couëdelo et al., 2011). Elle consiste à dégager, sous anesthésie générale (kétamine/xylazine ; 100/10 mg/g de masse corporelle), la zone thoracique et à fistuler le canal lymphatique thoracique au-dessus de la citerne de Pecquet. Un cathéter en polyéthylène (diamètre : 0,95 mm x 15 cm ; Biotrol, France) est inséré dans le canal afin de dériver la circulation lymphatique vers un tube à hémolyse, entreposé dans la glace, où la lymphe est récoltée. Les animaux sont maintenus à jeun 24 heures avant l'opération. Les animaux sont placés dans des cages de contention (228 mm x 89 mm) où ils disposent d'eau à volonté. Après l'intervention, les rats sont intubés oralement avec une dose unique équivalent à 1 g de lipides correspondant à 8 et 18 mg d'EPA et de DHA, respectivement. La lymphe est recueillie pendant les 6 heures post-intubation. Afin de prévenir la douleur, les rats reçoivent une injection intra-péritonéale de buprénorphine (0,02 mg/kg de masse corporelle) 1 heure avant et 2 heures après l'opération. A la fin de l'expérience, les rats sont euthanasiés par injection intra-péritonéale d'un mélange de pentobarbital sodique et de lidocaïne (60 mg et 20 mg/kg de masse corporelle, respectivement). Les expériences sont réalisées en conformité avec l'autorisation ministérielle 9217-2017031014448864 v9.

La composition de la lymphe est caractérisée en termes de :

- Profil en AG des lipides totaux et des fractions lipidiques TG et PL
- Structure glycéridique des fractions lipidiques TG et PL

Le diamètre hydrodynamique des chylomicrons est déterminé par diffusion dynamique de la lumière (Granulomètre Vasco, Cordouan Technologies) qui repose sur la mesure des fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée par les particules animées d'un mouvement Brownien. Le patron de diffraction obtenu permet de déterminer le rayon hydrodynamique des particules en utilisant l'équation de Stokes-Einstein qui relie la taille de l'objet à sa vitesse de déplacement.

Les mesures sont réalisées sur des échantillons de lymphe diluée au 1/100^{ème} avec du sérum physiologique (NaCl à 0,9% (m/v) dans de l'eau distillée). La viscosité du milieu est

estimée à 0,888 cP et l'indice de réfraction à 1,331. Les conditions analytiques sont les suivantes : intervalle de temps de 15 μ s entre deux mesures, nombre de canaux de 189, part réelle et imaginaire de 1,47 et 0,01, respectivement. La lumière diffractée est mesurée par un détecteur à un angle de 135°. L'analyse statistique est réalisée en suivant le modèle des cumulants. Le diamètre des chylomicrons est représenté par le diamètre moyen (Z-average), considérant une seule population de particules.

6. Etude *in vivo* de l'accrétion tissulaire des AGPI-LC n-3

6.1. Composition des régimes

Les régimes alimentaires sont préparés au laboratoire. Chaque formule lipidique (**TG_{n-3}**; **TG_{n-3}+PL_{veg}**; **TG_{veg}+PL_{n-3}** et **TG_{veg}**) est mélangée à hauteur de 5% (m/m) à de la poudre alipidique à 1% de cholestérol (SAFE) et homogénéisée au pétrin (B20 ; Dito-Sama, Italie). La composition générale des régimes est présentée dans le **Tableau 19** et détaillée en **Annexe 5**. La proportion de formule lipidique est ajustée afin que les animaux des 3 groupes consomment, chacun, la même quantité d'EPA (0,4 g/kg de régime) et de DHA (1 g/kg de régime). La composition des AG des formules lipidiques a été présentée dans le **Tableau 15**.

Tableau 19 : Composition générale des régimes alimentaires (g/100 g de poudre sèche)¹

	TG_{veg}	TG_{n-3}	TG_{n-3} + PL_{veg}	TG_{veg} + PL_{n-3}
<i>Ingrédients (g/100 g de poudre sèche)</i>				
Saccharose	6,8	6,8	6,8	6,8
Amidon de maïs	45,3	45,3	45,2	45,1
Cellulose	6,8	6,8	6,8	6,8
Caséine acide	27,2	27,2	27,1	27,1
Formules lipidiques	5	5	5,3	5,5
Cholestérol	1	1	1	1
Mélange de vitamines	1,4	1,4	1,4	1,4
Mélange de minéraux	6,8	6,8	6,8	6,8

¹ : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

6.2. Protocole de supplémentation des rats

Après une période d'acclimatation de 8 jours, les animaux sont aléatoirement randomisés dans un des 4 régimes expérimentaux suivants, pour une durée de 8 semaines (n=10 rats/ groupe) :

- Un régime supplémenté en huile de poisson (**TG_{n-3}**)
- Un régime supplémenté en huile de poisson additionné de lécithine de soja (**TG_{n-3}+PL_{veg}**)
- Un régime supplémenté en PL extraits de la lécithine marine (**TG_{veg}+PL_{n-3}**)
- Un régime contrôle à base d'huiles végétales, dépourvu d'AGPI-LC n-3 (**TG_{veg}**).

Les régimes expérimentaux sont apportés quotidiennement à raison de 25 g/rat/jour durant les 4 premières semaines, puis 30 g/rat/jour pour les 4 dernières semaines. A noter que la stabilité oxydative des AGPI-LC n-3 présents dans les régimes a été vérifiée sur une période de 24 heures, par la mesure de l'indice de diènes conjugués (**Annexe 6**). La prise de poids des rats est suivie par des pesées hebdomadaires.

Au terme des 8 semaines de régime, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Le sang et les organes cibles (foie, cerveau, rétine) sont prélevés. Une partie du foie (7 g) est prélevée, dispersée dans du sérum physiologique (NaCl à 9% (m/v) dans de l'eau distillée, pH 7,5) à une concentration finale de 1 g de foie/mL et homogénéisée extemporanément au Potter (1 500 tr/min, 5 min, 4°C ; Thermo Fisher Scientific). Le plasma est séparé des globules rouges par trois centrifugations successives (2 870 g, 20 min, 4°C) couplées à un lavage au sérum physiologique. Les compartiments biologiques (cerveau, rétine, plasma, globules rouges, foie et homogénats de foie) sont stockés à -80°C en attente de leurs analyses.

6.3. Etude de l'accrétion des AGPI-LC n-3

Le plasma, les globules rouges et les organes cibles (foie, cerveau et rétine) sont caractérisés en termes de profil en AG des lipides totaux. La composition des AG des fractions lipidiques, *i.e.* TG, PL et EC du plasma et du foie est déterminée. Pour chaque régime, les extraits lipidiques des rétines et du cerveau sont aléatoirement regroupés afin de générer 3 pools de lipides (1 mg/mL dans du chloroforme/ méthanol (v/v)) par groupe et par organe. Les

espèces de PL sont analysées en spectrométrie de masse par C. Buré (CBMN, CNRS) sur ces pools de lipides (**Annexe 7**).

6.4. Caractérisation du plasma

6.4.1. Cholestérolémie

Le cholestérol total (libre et estérifié) est dosé dans le plasma par un kit enzymatique (Sigma-Aldrich). Le principe du dosage (**Figure 10**) repose, d'une part, sur le dosage du cholestérol total, *i.e.* celui initialement libre et celui libéré par l'hydrolyse des EC par une cholestérol estérase. La réaction du cholestérol total avec une sonde de cholestérol permet la synthèse d'un précipité violet dont l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol. D'autre part, le dosage du cholestérol non estérifié est réalisé sans ajout de cholestérol estérase à l'échantillon.

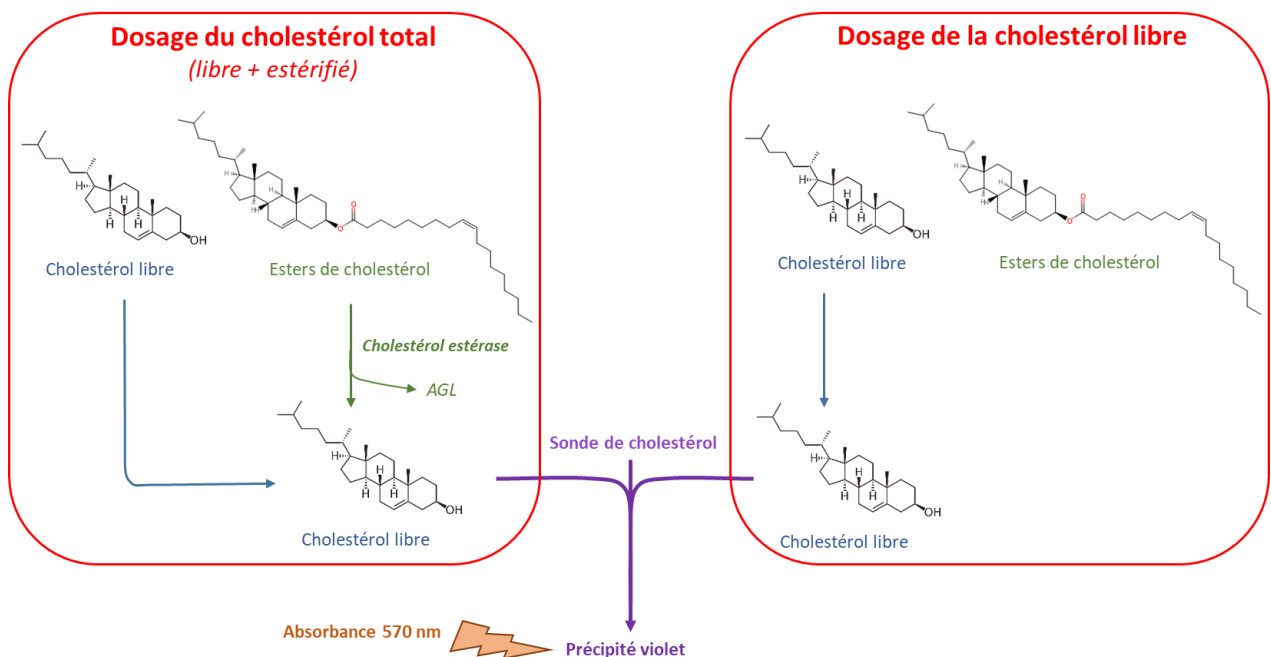


Figure 10 : Principe du dosage enzymatique du cholestérol total et libre
AGL : acides gras libres

Les échantillons de plasma sont dilués au 50^{ème} pour dosage du cholestérol total et au 13^{ème} pour dosage du cholestérol libre. La réaction enzymatique est initiée dans des microplaques de 96 puits où 50 μ L d'échantillon dilué sont additionnés de 50 μ L d'un mix réactionnel en présence ou non de cholestérol estérase et d'une sonde de cholestérol. Après 1 heure d'incubation à 37°C et à l'abri de la lumière, l'absorbance des échantillons est directement lue contre le blanc à 570 nm au lecteur de microplaque (Synergy HTX, Biotek). La

quantification du cholestérol présent dans l'échantillon est déterminée par comparaison des densités optiques à une courbe de référence réalisée à partir de concentrations croissantes d'une solution standard de cholestérol, analysées dans les mêmes conditions et sur la même microplaque que les échantillons.

La concentration en cholestérol total dans les échantillons (en mmol/ L de plasma) est obtenue par la relation suivante :

$$C = \left(\frac{Q}{V} \times F \right) / MM_{\text{cholestérol}}$$

Où C : concentration en cholestérol (mmol/L de plasma) ; Q : quantité de cholestérol dans l'échantillon (μg) ; V : volume d'échantillon (μL) ; F : facteur de dilution ; $MM_{\text{cholestérol}}$: masse moléculaire du cholestérol (386,65 g/mol).

La concentration en cholestérol estérifié est calculée par différence entre les concentrations en cholestérol total et en cholestérol libre.

6.4.2. Dosage des lipoprotéines plasmatiques HDL et VLDL/LDL

Les lipoprotéines HDL et LDL/VLDL sont dosées sur les échantillons de plasma par un kit enzymatique (Sigma-Aldrich). Les lipoprotéines HDL et LDL/VLDL sont préalablement séparées par addition de 100 μL de solution tampon de précipitation 2X à 100 μL d'échantillon. Les échantillons sont incubés 10 minutes à température ambiante puis centrifugés (2 000 g, 10 min, 4°C ; Centrifuge 5427R, Eppendorf, Allemagne). Le surnageant, contenant les HDL, est recueilli et le précipité, contenant les LDL et les VLDL, est suspendu dans 200 μL de solution tampon phosphate salin (PBS) (10 mM). Les HDL sont dilués au 10^{ème} et les LDL/VLDL sont dilués au 12^{ème}.

Les lipoprotéines plasmatiques sont quantifiées *via* le dosage du cholestérol total (Cf. Chapitre 2, 6.4.1.).

6.4.3. Triglycémie

Les TG sont dosés dans les échantillons de plasma grâce à un kit enzymatique (BioAssays system, Etats-Unis). Le principe repose sur le dosage du glycérol libéré après hydrolyse enzymatique des TG par une lipase. A 10 μL d'échantillon sont additionnés 100 μL de mix réactionnel constitué d'adénosine triphosphate (ATP), d'un colorant et d'enzymes. Le glycérol, libéré par hydrolyse totale des TG, est dosé par oxydation du colorant conduisant à

un précipité violet dont l'absorbance est lue à 570 nm au lecteur de microplaque (Synergy HTX, Biotek). La concentration en colorant oxydé est directement proportionnelle à la concentration en glycérol présent dans l'échantillon.

La quantification des TG plasmatiques (mmol/L de plasma) est réalisée grâce à une courbe étalon d'une solution de glycérol analysée dans les mêmes conditions et sur la même microplaque que les échantillons.

6.5. Etude de la peroxydation lipidique : dosage du dialdéhyde malonique dans le foie

Les substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBA) telles que le dialdéhyde malonique (MDA), sont des produits secondaires formés lors de l'oxydation des AGPI. Le MDA présent dans des échantillons biologiques est considéré comme un marqueur fiable de la peroxydation lipidique.

Le MDA est dosé dans les homogénats de foie selon une méthode modifiée de Buege and Aust, 1978. Le principe repose sur la formation d'un complexe MDA-TBA en milieu acide dont l'absorbance est mesurée à 535 nm (**Figure 11**). Dans un premier temps, une gamme de MDA est préparée à partir d'une solution de tétraméthoxytétraéthoxypropane (TEP). Pour cela, une solution acide de TEP à 1 µg/mL dans de l'acide chlorhydrique (0,1 N) est incubée 5 min à 90°C afin d'activer la conversion du TEP en MDA. Après refroidissement dans la glace, la gamme étalon est réalisée par des dilutions successives avec une solution aqueuse composée à 5% (m/v) d'acide trichloroacétique (TCA), 0,0004% (m/v) d'hydroxytoluène butylé (BHT) et 0,024% (m/v) d'EDTA. Les homogénats de foie sont soumis à une hydrolyse basique afin de libérer les AG et le MDA présents dans les échantillons. Pour cela, 500 µL d'homogénat sont ajoutés à une solution de soude (5 N) et 0,12 mM de BHT, puis incubés à 60°C pendant 30 minutes. Après refroidissement dans la glace et acidification à l'acide perchlorique (35% ; v/v), les échantillons sont soumis à un mélange réactionnel de TCA (5% ; m/v) et de TBA (0,125% ; m/v) dans une solution d'acide chlorhydrique (0,25 N). Les échantillons sont incubés (30 min à 95°C) puis 1,5 mL de butanol sont ajoutés. Après centrifugation (1 051 g, 10 min, 4°C), 200 µL de la phase butanol, contenant le complexe MDA-TBA, sont déposés dans une microplaque de 96 puits et l'absorbance des échantillons est lue à 535 nm.

La concentration en MDA des échantillons est obtenue par comparaison de la densité optique avec celle de la courbe standard de MDA, réalisée dans les mêmes conditions et sur la même microplaque. La teneur en MDA du foie est exprimée en nmol/mg de protéines totales de foie dans l'échantillon (cf. Chapitre 2, 6.6.2.3.).

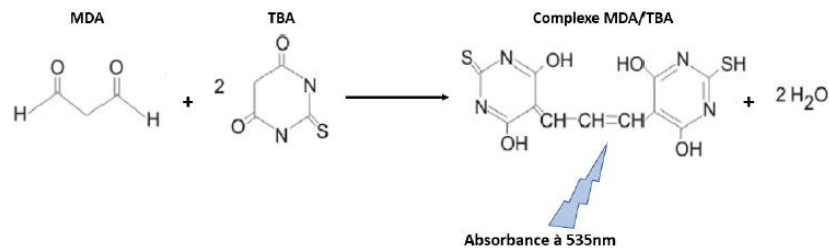


Figure 11 : Formation du complexe MDA/ TBA (image adaptée de www.Biotek.com)
MDA : dialdéhyde malonique ; TBA : acide thiobarbiturique

6.6. Etude du stress oxydant

6.6.1. Analyse du monoxyde d'azote plasmatique

Le monoxyde d'azote (NO) est dosé à l'aide d'un kit colorimétrique (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Le NO peut être présent dans les échantillons biologiques sous forme de nitrite (NO_2^-) et de nitrate (NO_3^-). Le principe du kit consiste à doser les ions nitrites (NO_2^-) issus de la réduction des ions nitrates (NO_3^-). Pour cela, 50 μL d'échantillon de plasma sont déposés dans une microplaque de titration auxquels sont ajoutés 25 μL de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et 25 μL de nitrate réductase, puis incubés 30 minutes à 37°C. Après réaction, 100 μL de réactif de Griess sont ajoutés aux puits. Le réactif de Griess, composé d'acide sulfanilique et d' α -naphtylamine, réagit avec les nitrites (NO_2^-) pour générer un composé azoïque de couleur rouge pâle dont l'absorbance, directement proportionnelle à la concentration en nitrite (NO_2^-) est mesurée à 540 nm, après 10 minutes d'incubation à température ambiante. La quantité de NO (μM) des échantillons est obtenue par comparaison de la densité optique avec une courbe étalon de nitrates, analysés dans les mêmes conditions et sur la même microplaque.

6.6.2. Dosage des activités des enzymes du système antioxydant

6.6.2.1. Préparation des extraits enzymatiques de foie

Les homogénats de foie de rats (Cf. Chapitre 2, 6.2.) sont dilués au 100^{ème} dans une solution tampon d'extraction (0,25 M Saccharose, 0,05 mM EDTA, 0,5 mM Dithiothreitol (DTT) ; pH 7,4) à 1% (v/v) d'un mélange d'antiprotéases (Sigma-Aldrich). Après centrifugation (1 400 g, 30 min, 4°C), le surnageant contenant l'extrait enzymatique est prélevé puis stocké à -20°C en attente des analyses.

6.6.2.2. Mesure de l'activité des enzymes antioxydantes

L'activité hépatique des enzymes antioxydantes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) et glutathion peroxydase (GPx) sont dosées à l'aide de kits colorimétriques. Les expériences sont réalisées sur les extraits enzymatiques de foie dilués (Cf. Chapitre 2, 6.6.2.1) au 100^{ème} pour l'activité CAT, au quart pour l'activité SOD et non dilués pour l'activité GPx. Les kits colorimétriques CAT et SOD proviennent de chez Arbor Assays (Etats-Unis), celui de la GPx de Biovision (Etats-Unis).

Le principe du dosage de l'activité SOD est basée sur la capacité de la SOD à inhiber le flux d'anions superoxydes (O_2^-) généré par le système xanthine/xanthine oxydase. Le dosage de l'activité CAT repose sur une compétition enzymatique entre la CAT présente dans l'échantillon et la peroxydase de raifort (HRP) vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'activité GPx est dosée indirectement par mesure de la concentration en nicotinamide adénine diphosphatase hydrogénée (NADPH). Lors de l'élimination des peroxydes lipidiques par la GPx, le glutathion (GSH) agit comme accepteur d'électrons et se transforme en sa forme oxydée (GSSG). Le principe du kit repose sur la capacité de la glutathion réductase, antagoniste de la GPx, à réduire le GSSG en GSH en utilisant le NADPH en tant que donneur de protons. Les modes opératoires de chacun des kits sont résumés dans la **Figure 12**. Le principe de chaque dosage est représenté dans l'**Annexe 8**.

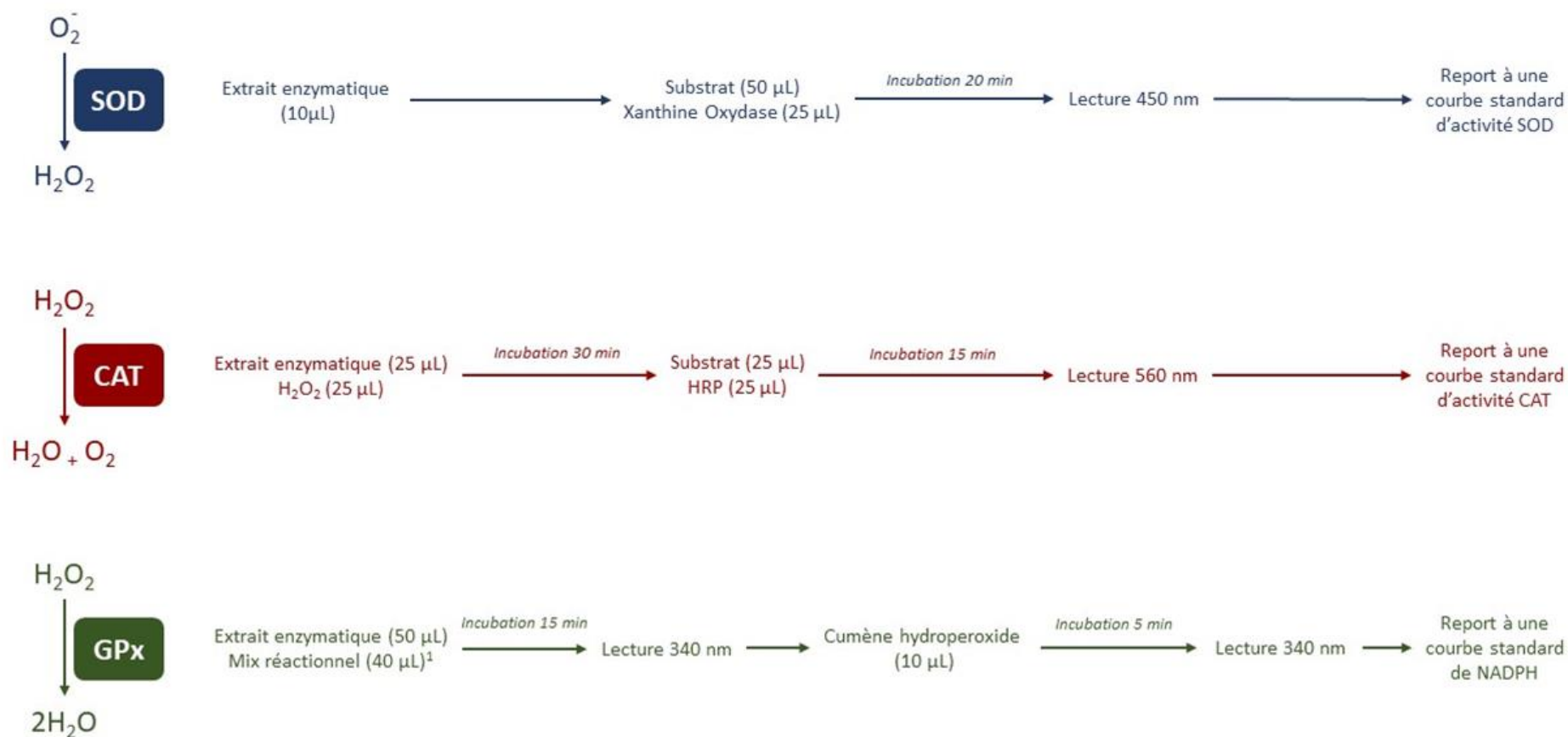
Les activités hépatiques des enzymes SOD et CAT ($\mu\text{mol}/\text{mL}/\text{min}$) des échantillons sont obtenues par comparaison de la densité optique avec une courbe standard réalisée avec des activités croissantes en SOD et en CAT respectivement, analysées dans les mêmes conditions et sur la même microplaque. Les activités (U/mg de protéines totales) sont normalisées en fonction de la quantité de protéines totales.

Pour l'activité de la GPx, la quantité de NADPH est obtenue par comparaison des données de deux lectures à celle d'une courbe étalon de NADPH, analysées dans les mêmes conditions et sur la même microplaque. La quantité de NADPH consommée est obtenue en calculant la différence entre la quantité de NADPH initiale et la quantité de NADPH restant après 5 minutes d'incubation.

L'activité hépatique de la GPx (U/mg de protéines totales) est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activité GPx (U/mg de protéines totales)} = \frac{[\text{NADPH}_{\text{consommé}}]}{\text{Temps d'incubation} \times Q_{\text{protéines}}}$$

[NADPH_{consommé}] : concentration de NADPH consommé sur 5 min d'incubation, déterminée après report des deux lectures (340 nm) à une courbe standard de NADPH ; Q_{protéines} : quantité de protéines totales déterminée selon la méthode de Bradford (Chapitre 2, 6.6.2.3.).



¹: le mix réactionnel est composé de NADPH (40 mM), glutathion réductase et de GSH

Figure 12 : Principe des dosages des activités superoxyde dismutase, catalase et glutathione peroxydase

CAT : catalase ; GPX : glutathion peroxydase ; GSH : glutathion sous sa forme réduite ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; HRP : peroxydase de raifort ; NADPH : nicotinamide adénosine dinucléotide phosphate ; O_2^- : anions superoxydes ; SOD : superoxyde dismutase.

6.6.2.3. Dosage des protéines totales

La méthode de Bradford (Bradford, 1976) est une méthode de dosage colorimétrique des protéines totales, basée sur la modification d'absorbance de l'échantillon après liaison du bleu de Coomassie avec les acides aminés basiques (arginine, histidine et lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans les protéines. Les protéines totales sont dosées dans les homogénats de foie, dilués à une concentration optimale pour les mesure du MDA et de l'activité des enzymes antioxydantes. Brièvement, 30 μ L d'échantillons sont introduits dans une microplaque de titration, auxquels sont ajoutés 170 μ L de réactif de Bradford (Sigma-Aldrich). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance des échantillons est lue à 595 nm. La concentration des protéines totales des échantillons est obtenue par comparaison de la densité optique d'une courbe étalon d'albumine sérique de bœuf (Sigma-Aldrich) réalisée dans les mêmes conditions et sur la même microplaque que les échantillons.

7. Traitement statistique des données

Les données sont exprimées par des valeurs moyennes avec leurs écarts types. Les comparaisons intergroupes sont réalisées sur la base de leurs moyennes respectives. Dans les études avec un nombre restreint d'échantillons ($n=3$), la significativité des résultats est déterminée soit par un test ANOVA à 2 facteurs suivi d'un test post-hoc de Bonferonni (analyses de la lipolyse gastro-intestinale) ou soit par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunns (analyses des PL cérébraux et rétinien en spectrométrie de masse), en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 7. Pour les études comportant un nombre d'échantillon supérieur ou égal à 6 (études d'absorption intestinale et de régime), les moyennes des groupes sont comparées grâce à une ANOVA à un facteur suivie d'un test post-hoc de Tukey, avec correction de Welch, en utilisant le logiciel R version 3.5.1 avec un package RCommander. Les groupes sont considérés comme significativement différents pour un $p < 0,05$.

Le **Tableau 20** présente l'ensemble des expériences et analyses réalisées au cours de ce travail de thèse.

Tableau 20 : Tableau récapitulatif des différentes études menées dans ce travail de thèse

Caractérisation des matières premières et des formules lipidiques	
Matières premières	<ul style="list-style-type: none"> - Composition en AG des lipides totaux (CPG) - Caractérisation des classes de PL de la lécithine de soja et des PL marins (RMN) - Structure glycéridique des TG et PL marins (méthodes enzymatiques + CPG)
Formules lipidiques (TG _{veg} , TG _{veg} +PL _{veg} , TG _{n-3} , TG _{n-3} +PL _{veg} et TG _{veg} +PL _{n-3})	<ul style="list-style-type: none"> - Composition en AG des lipides totaux (CPG) - Teneur en vitamine E des formules lipidiques (CLHP)
Etudes <i>in vitro</i>	
1. Caractérisation physique des milieux dispersés (TG _{n-3} +PL _{veg} et TG _{veg} +PL _{n-3})	<ul style="list-style-type: none"> - Emulsions : <ul style="list-style-type: none"> ○ Caractérisation de la taille (granulométrie) ○ Analyse de la morphologie (microscopie à contraste de phase) ○ Potentiel zêta (électrophorèse Doppler) - Liposomes : <ul style="list-style-type: none"> ○ Caractérisation de la taille (granulométrie) ○ Analyse de la morphologie (microscopie à contraste de phase)
2. Etude de la stabilité oxydative des formules lipidiques (TG _{n-3} , TG _{n-3} +PL _{veg} et TG _{veg} +PL _{n-3})	<ul style="list-style-type: none"> - En phase continue (indice de diènes conjugués) - En milieux dispersés (dosage du propanal, CPG couplée à l'espace de tête)
3. Lipolyse gastro-intestinale des formules lipidiques (TG _{veg} +PL _{veg} , TG _{n-3} , TG _{n-3} +PL _{veg} et TG _{veg} +PL _{n-3})	<ul style="list-style-type: none"> - Taux de lipolyse des formulations lipidiques (pH stat)

Etudes *in vivo*, chez le rat**1. Absorption intestinale et métabolisme entérocytaire*****in vivo***

Modèle de fistulation du canal lymphatique (rat)

*(TG_{n-3}, TG_{n-3}+PL_{veg} et TG_{veg}+PL_{n-3})**(phases continue, émulsion ou liposomes)*

- Teneur et composition en AG des lipides totaux et des fractions TG et PL lymphatiques (CPG, CCM)
- Structure glycéridique des TG et PL lymphatiques (*méthodes enzymatiques + CPG*)

- **Plasma :**

- o Teneur et composition en AG des lipides totaux (CPG)
- o Teneur et composition en AG des fractions TG, PL et EC (CCM, CPG)
- o TG plasmatiques (*Kit enzymatique*)
- o Cholestérol total, libre et estérifié (*kit enzymatique*)
- o Lipoprotéines HDL et LDL/VLDL (*kit enzymatiques*)
- o Taux en monoxyde d'azote (*kit enzymatique*)

2. Accrétion, peroxydation et stress oxydant *in vivo*

Modèle de régime normolipidique de 2 mois (rat)

(TG_{veg}, TG_{n-3}, TG_{n-3}+PL_{veg} et TG_{veg}+PL_{n-3})- **Globules rouges :**

- o Composition en AG des lipides totaux (CPG)

- **Foie :**

- o Teneur et composition en AG des lipides totaux (CPG)
- o Teneur et composition en AG des fractions TG, PL et EC (CCM, CPG)
- o Teneur en dialdéhyde malonique (*méthode colorimétrique*)
- o Activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT et GPx (*méthodes enzymatique*)

- **Cerveau :**

- o Teneur et composition en AG des lipides totaux (CPG)
- o Composition en espèces moléculaires de PL (*CL-IP-SM/SM*)

- **Rétine :**

- o Composition en AG des lipides totaux (CPG)
- o Composition en espèces moléculaires de PL (*CL-IP-MS/MS*)

CAT : catalase ; CCM : chromatographie sur couche mince ; CLHP : chromatographie liquide à haute performance ; CL-IP-MS/MS : chromatographie liquide en phase inverse couplée à un spectromètre de masse en tandem ; CPG : chromatographie en phase gazeuse ; EC : esters de cholestérol ; GPx : glutathion peroxydase ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL/VLDL : lipoprotéines de faible et très faible densité ; PL : phospholipides ; RMN : résonance magnétique nucléaire ; SOD : superoxyde dismutase ; TG : triglycérides.

TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{veg}+PL_{veg} : formule dépourvue d'AGPI-LC n-3 à base d'huiles végétales supplémentées en lécithine de soja ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Chapitre 3

Résultats et discussions

1. Caractérisation des formules lipidiques enrichies en AGPI-LC n-3

Différentes formulations des lipides sont élaborées pour évaluer, au travers des études nutritionnelles de biodisponibilité, l'influence de :

- La forme d'apport des AGPI-LC n-3 avec :
 - La nature chimique du vecteur moléculaire des AG ($TG_{n-3}+PL_{veg}$ vs $TG_{veg}+PL_{n-3}$; **en phase continue**)
 - La nature chimique du vecteur moléculaire des AG et la forme dispersée ou non de l'huile ($TG_{n-3}+PL_{veg}$ et $TG_{veg}+PL_{n-3}$, **phase continue vs émulsion**)
- L'organisation supramoléculaire des PL marins avec :
 - Une forme non structurée, dans laquelle les PL sont dilués dans un mélange d'huiles végétales ($TG_{veg}+PL_{n-3}$, **phase continue**)
 - Une forme émulsionnée où les PL se situent à l'interface huile/eau stabilisant les gouttelettes d'huile ($TG_{veg}+PL_{n-3}$, **émulsion**)
 - Une forme de type liposomes, dans laquelle les PL s'organisent en bicouches ($TG_{veg}+PL_{n-3}$, **liposomes**)

Il convient de caractériser, préalablement aux études *in vivo*, chacune des formules lipidiques afin de maîtriser les différents facteurs physico-chimiques pouvant influencer les résultats de biodisponibilité.

1.1. Caractérisation physique des milieux dispersés

Plusieurs études de la littérature ont montré que la biodisponibilité des lipides dépend de la taille des particules colloïdales administrées (Armand et al., 1992, 1999; Borel et al., 1994). C'est pourquoi nous avons caractérisé les paramètres morphologiques des systèmes colloïdaux utilisés : émulsions et liposomes.

En utilisant le même procédé d'émulsification (Ultra-turrax), le diamètre moyen des gouttelettes de l'émulsion $TG_{n-3}+PL_{veg}$ est près de 7 fois plus petit que celui de la formule $TG_{veg}+PL_{n-3}$ (populations centrées sur 11,1 μm et 74,6 μm , respectivement). Les profils granulométriques sont présentés **Annexe 9**. Ces diamètres moyens sont cohérents avec les observations faites en microscopie optique à contraste de phase (**Figures 13A et B**). En termes de potentiel de surface, la présence de lécithine de soja conduit à une charge globale

légèrement plus électronégative que l'utilisation de PL marins ($\zeta = -43,6 \pm 13,9$ mV pour l'émulsion **TG_{n-3}+PL_{veg}** vs $\zeta = -35,2 \pm 2,5$ mV pour l'émulsion **TG_{veg}+PL_{n-3}**).

Pour des conditions expérimentales données (température, pH, process, ...), la taille des gouttelettes est modulée par le rapport des viscosités de la phase dispersée et de la phase continue : plus la viscosité de l'huile augmente, plus la taille des gouttelettes lipidiques augmente (Pandolfi, 1981 ; Weiss and Muschiolik, 2007). Sachant que la viscosité de l'huile diminue quand la proportion d'AGPI augmente (Fasina et al., 2006 ; Yalcin et al., 2012), la présence d'huiles de poisson dans la formulation **TG_{n-3}+PL_{veg}** (11% ; m/m) pourrait contribuer à diminuer la viscosité de la phase dispersée et donc favoriser la formation de petites gouttes.

La nature des PL constituant les lécithines utilisées en tant qu'agents tensioactifs peut également moduler les caractéristiques morphologiques de l'émulsion (Komaiko et al., 2015). D'une part, les lécithines riches en PC présentent de meilleures propriétés émulsifiantes que celles riches en PE (Cabezas et al., 2012 ; Guiotto et al., 2013). Ces résultats vont à l'encontre d'une granulométrie plus fine observée pour l'émulsion **TG_{n-3}+PL_{veg}** puisque, dans la lécithine de soja, la proportion de PC (31,7%) est plus faible que dans les PL marins (73,8%). D'autre part, les forces électrostatiques développées entre les têtes polaires pourraient jouer sur la formation des gouttes et les tailles obtenues (Komaiko et al., 2015). Néanmoins, les potentiels zêta mesurés pour les deux types d'émulsion sont trop proches pour privilégier cette hypothèse. Enfin, plus le degré d'insaturation des chaînes d'acides gras des PL augmente (entre 0 et 3 doubles liaisons), plus la taille des gouttes est petite (Ishii and Nii, 2005). Néanmoins, aucun résultat n'est connu pour des degrés d'insaturation plus élevés.

Ainsi, la différence de taille de gouttes observée entre les émulsions **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}** proviendrait principalement d'une différence de viscosité des mélanges huileux.

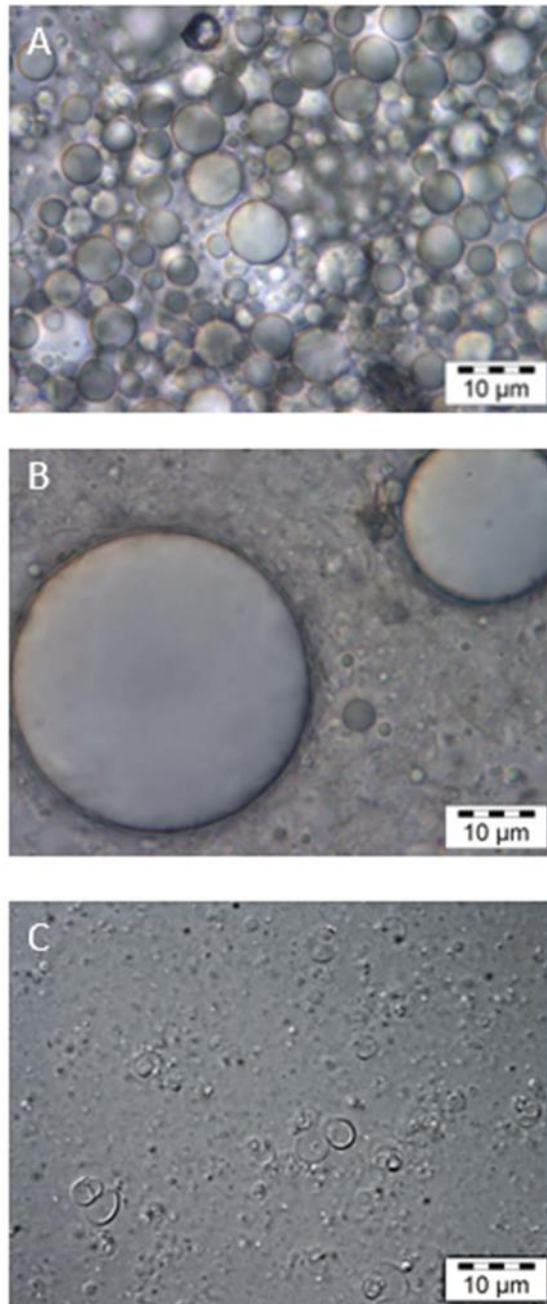


Figure 13 : Observations en microscopie optique à contraste de phase des milieux dispersés.

A/ Formule $TG_{n-3}+PL_{veg}$ en émulsion ; B/ Formule $TG_{veg}+PL_{n-3}$ en émulsion ; C/ Phospholipides marins structurés sous forme de liposomes.

$TG_{n-3}+PL_{veg}$: formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; $TG_{veg}+PL_{n-3}$: formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Les liposomes préparés à base de PL marins présentent des tailles relativement hétérogènes (**Figure 13C**). L'analyse granulométrique le confirme par la présence de deux populations de diamètres centrés sur 0,3 et 6,3 μm (diamètre moyen = 3,5 μm) (**Annexe 9**). Ces tailles et cette polydispersité sont en accord avec celles reportées pour des liposomes préparés par hydratation d'un film de lipides, avec une lécithine marine (Nacka et al., 2001 ; Moussaoui et al., 2002). La taille des liposomes et le nombre de bicouches sont très dépendants de la méthode de préparation utilisée. Avec une simple hydratation d'un film de lipides, les liposomes sont de tailles supérieures au micromètre, souvent polydisperses, et des structures multilamellaires sont observées (Lasic, 1993).

1.2. Etude de la stabilité oxydative des formules lipidiques

Du fait de leur nature chimique, les AGPI sont sensibles à la peroxydation lipidique (Holman and Elmer, 1947 ; Cosgrove et al., 1987). L'oxydation des 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 (Schaich, 2012). Ce phénomène est responsable de l'altération des propriétés sensorielles (rancissement oxydatif) et d'une diminution de la qualité nutritionnelle des huiles (perte des AGPI, de la vitamine E) (Cuvelier and Maillard, 2012 ; Yang and Chiang, 2017). Par ailleurs, l'oxydation des AGPI peut générer des produits suspectés néfastes pour la santé de l'individu (Guillén and Goicoechea, 2008 ; Cuvelier and Maillard, 2012).

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

- **L'initiation** où des agents pro-oxydants, les radicaux hydroxyles HO^\bullet ou l'apport d'énergie (lumière), extraient, par rupture homolytique, un atome d'hydrogène adjacent à une double liaison allylique ou bisallylique au sein d'un AG insaturé, formant ainsi un radical lipidique (L^\bullet).
- La **propagation**, étape dans laquelle le radical lipidique formé (L^\bullet) réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxyde (LOO^\bullet) instable, qui tend à se stabiliser en réagissant avec un autre AG insaturé, générant ainsi un hydroperoxyde (LOOH) et un autre radical lipidique (L^\bullet). Les hydroperoxydes peuvent se décomposer par scission homolytique de la liaison O-O, conduisant à de nouveaux radicaux alkoxydes libres : les radicaux $^\bullet\text{OL}$ et LO^\bullet . L'ensemble des radicaux libres entretient la phase de propagation.

- La **terminaison** où les radicaux libres, en forte concentration, se combinent pour former des produits non radicalaires, ce qui met fin aux cycles réactionnels. Les produits générés peuvent être des aldéhydes, des cétones, des alcools et des hydrocarbures

Cette description des processus de peroxydation lipidique reste simpliste devant les voies réactionnelles qui pourraient être réellement impliquées (**Figure 14**) (Schaich, 2012)

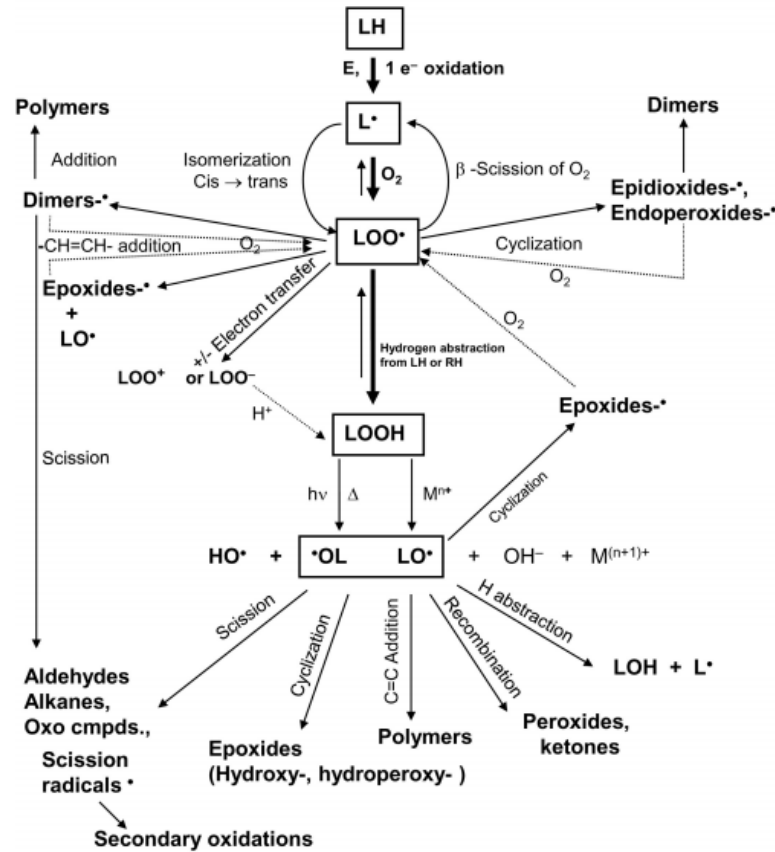


Figure 14 : Schéma général de la peroxydation lipidique impliquant des réactions multiples et simultanées, proposé par Schaich, 2012

Dans ce travail de thèse, le comportement oxydatif des formules enrichies en AGPI-LC n-3 est étudié dans des conditions d'auto-oxydation accélérées par la température (60°C) et pro-oxydantes par le métal (formules placées dans des coupelles en cuivre), pendant 48 heures. Cette étude permet d'évaluer l'oxydation des AG en fonction :

- De la présence de PL (**TG_{n-3}**+PL_{veg} vs **TG_{n-3}**)
- De la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (**TG_{n-3}**+PL_{veg} vs **TG_{veg}**+**PL_{n-3}**)

Pour l'étude de la stabilité oxydative des formules en phase continue, nous nous sommes focalisés sur la production des diènes conjugués. En effet, le dosage de ces espèces permet de déterminer la qualité des huiles et caractérise les produits primaires d'oxydation des AGPI. Les radicaux lipidiques, formés au cours de la phase d'initiation de la peroxydation des AGPI, tendent à se stabiliser par réarrangement moléculaire ; les doubles liaisons passant de la position non conjuguée à la position conjuguée (diènes et triènes conjugués) (**Figure 15**). Ainsi, il existe une forte corrélation entre l'indice de diènes conjugués et l'indice de peroxydes, (Shahidi et al., 1994 ; Marmesat et al., 2009). La détermination de l'indice de diènes conjugués est donc une mesure fiable et robuste pour le suivi de l'état d'oxydation de formules lipidiques riches en AGPI-LC n-3.

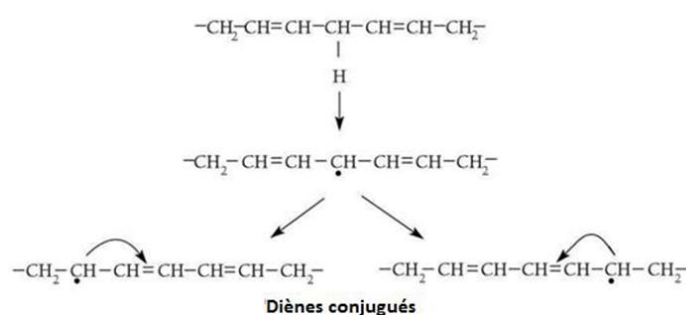


Figure 15 : Schéma de la formation des diènes conjugués d'un acide gras

1.2.1. Effet antioxydant des phospholipides

Dans nos conditions expérimentales, le mélange d'huiles (**TG_{n-3}**) s'oxyde rapidement avec une augmentation des produits primaires d'oxydation dès 8 heures de stockage (**Figure 16**). Bien que les études de la littérature n'utilisent pas toutes les mêmes conditions d'oxydation (*i.e.* température, présence de métaux, ...), ni les mêmes méthodes d'analyse (*i.e.* indice de peroxydes, indice de diènes conjugués), les huiles marines sont reconnues pour s'oxyder rapidement en raison de leur teneur élevée en AGPI-LC n-3 (Frankel, 1993).

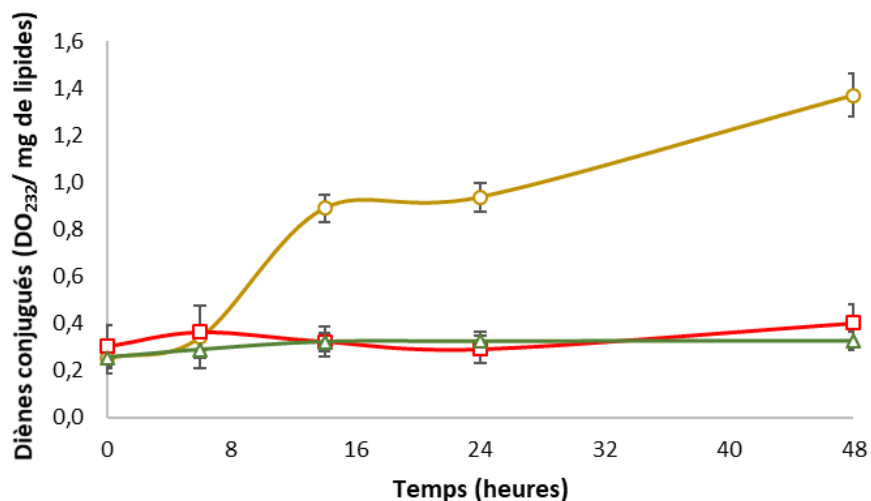


Figure 16 : Evolution cinétique de l'indice de diènes conjugués ($I_{DC}=DO_{232}/ \text{mg de lipides}$) des formules lipidiques enrichies en huiles de poisson (○ TG_{n-3} ; ▲ TG_{n-3}+PL_{veg} ; □ TG_{veg}+PL_{n-3}), stockées à 60°C, dans des coupelles en cuivre

TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

L'addition de 10% de lécithine de soja (TG_{n-3}+PL_{veg}) permet de prévenir l'oxydation des AG insaturés, puisqu'aucune variation de l'indice de diènes conjugués initial ($I_{dc}=0,3$) n'est enregistrée pendant 48 heures. Ces résultats sont en accord avec le rôle antioxydant évoqué pour les PL (King et al., 1992a, 1992b ; Bandarra et al., 1999 ; Lu et al., 2011 ; Cui and Decker, 2016 ; Lu et al., 2017). Bien que les effets positifs des PL vis-à-vis de la peroxydation lipidique ne soient pas clairement élucidés, ils sont généralement attribués aux fonctions chimiques de leur tête polaire de par :

- Le groupement phosphoryle, chargé négativement, qui permettrait la chélation d'ions métalliques tels que le fer et le cuivre, limitant ainsi le contact entre les agents pro-oxydants et les AGPI (Cui and Decker, 2016)
- Les fonctions amines de la PC et de la PE qui pourraient interagir directement avec les radicaux libres et bloquer les réactions de propagation (Lee and Choe, 2009 ; Lu et al., 2011, 2017)
- Les groupements amines de la PC et de la PE et le sucre réducteur de la PI qui permettraient de faciliter le transfert d'hydrogène ou d'électrons à l' α -tocophérol, favorisant sa régénération et retardant ainsi l'apparition des hydroperoxydes (Doert et al., 2012 ; Budilarto and Kamal-Eldin, 2015 ; Samdani et al., 2018). Dans ce cas, il s'agit d'un effet synergique entre les PL et l' α -tocophérol (Khan and Shahidi, 2000 ; Lu et al., 2011 ; Cui and Decker, 2016 ; Samdani et al., 2018).

Lorsque les AGPI-LC n-3 sont estérifiés dans des PL ($TG_{veg}+PL_{n-3}$), l'indice de diènes conjugués n'évolue pas au cours du temps et reste faible ($I_{dc}=0,3$) (**Figure 16**). Ces données sont en accord avec de nombreux travaux concernant la stabilité oxydative des PL marins (Lu et al., 2011, 2012a, 2012b, 2013). Les formules lipidiques présentent une composition en AG (**Tableau 15**) et en antioxydants (**Tableau 17**) similaires : elles peuvent donc être comparées afin d'étudier l'effet de la nature des lipides vecteurs d'AGPI-LC n-3 vis-à-vis de leur stabilité oxydative ($TG_{n-3}+PL_{veg}$ vs $TG_{veg}+PL_{n-3}$). Ainsi, dès lors que des PL sont présents dans une formulation, qu'ils comportent ou non les AGPI-LC n-3 ($TG_{n-3}+PL_{veg}$ et $TG_{veg}+PL_{n-3}$), ils ralentissent la formation des produits primaires d'oxydation. Autrement dit, dans nos conditions expérimentales, que les AGPI-LC n-3 soient vectorisés par des PL ($TG_{veg}+PL_{n-3}$) ou des TG ($TG_{n-3}+PL_{veg}$), la présence de 10% (m/m) de PL suffit à prévenir leur oxydation.

1.2.2. Stabilité chimique des formules lipidiques, en milieu dispersé

Du point de vue de l'oxydation, les émulsions huile dans eau constituent des systèmes plus complexes à étudier qu'une huile en phase continue. Due au risque d'évaporation de l'eau présente dans les milieux dispersés, les conditions d'auto-oxydation accélérées utilisées précédemment (*i.e.* 60°C) ne sont pas applicables. De plus, l'analyse des diènes conjugués nécessiterait, au préalable, une étape d'extraction des lipides qui peut augmenter le risque de peroxydation, en particulier lorsque celle-ci est déjà initiée. L'oxydation des émulsions est donc suivie directement sur les échantillons par le dosage du propanal, produit secondaire volatil caractéristique de l'oxydation des AGPI n-3 (Boyd et al., 1992). Ce protocole est également utilisé pour les liposomes.

1.2.2.1. Effet de l'émulsification sur l'oxydation des AGPI-LC n-3

La **Figure 17** présente l'évolution, au cours du temps, de la teneur en propanal pour la formule $TG_{n-3}+PL_{veg}$, en phase continue et en émulsion, à 37°C. La formule en phase continue est caractérisée par une évolution lente de la concentration en propanal (0,04 nmoles/kg de lipides/h) pour atteindre une teneur finale de 1,2 nmoles/kg de lipides à 24 heures. L'émulsification (*i.e.* fabrication de l'émulsion et état dispersé de l'huile) favorise l'oxydation de l'huile comme le montre, d'une part, le taux initial de propanal qui passe de 0,2 nmoles de propanal/kg de lipides pour la formule lipidique en phase continue à 1,3 nmoles de propanal/kg de lipides pour la même formule en émulsion. D'autre part, la vitesse de

formation du propanal est deux fois plus rapide en milieu dispersé qu'en phase continue (0,08 vs 0,04 nmoles de propanal/ kg de lipides/h, respectivement).

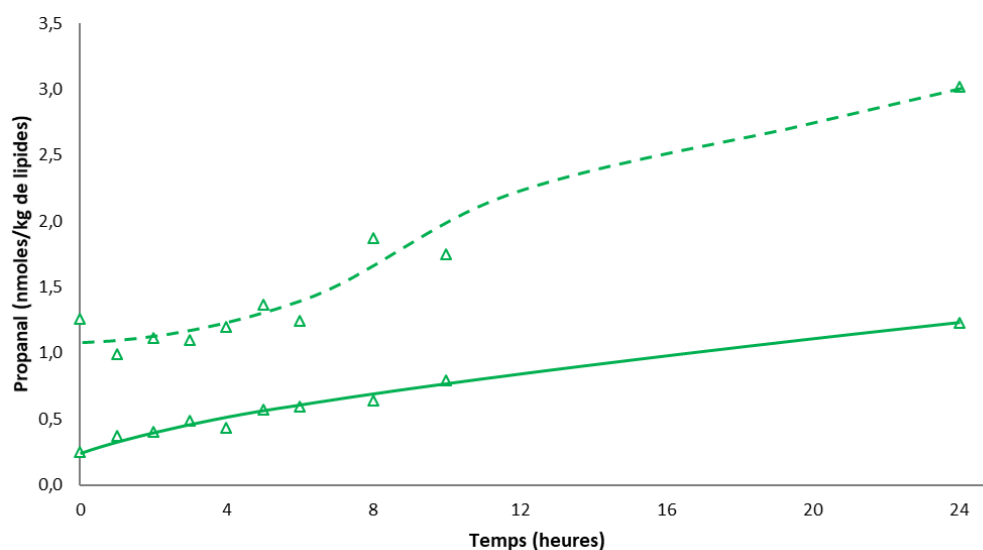


Figure 17 : Cinétique d'évolution de la concentration de propanal (nmoles de propanal/kg de lipides) de la formule $TG_{n-3}+PL_{veg}$ en phase continue (—) et en émulsion (---), à 37°C

$TG_{n-3}+PL_{veg}$: formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG).

Bien que les mécanismes de la peroxydation lipidique soient similaires en phases continue et émulsionnée, les cinétiques d'oxydation diffèrent de par : (1) les propriétés de l'interface des gouttelettes d'huile et (2) la répartition des molécules pro et antioxydantes, et des substrats oxydables entre les différentes phases (McClements and Decker, 2000). Il est donc aujourd'hui admis que le comportement oxydatif de l'huile varie en fonction de son état de dispersion (Berton-Carabin et al., 2014). Selon les formulations étudiées, l'émulsification de l'huile peut stimuler (McClements and Decker, 2000 ; Berton-Carabin et al., 2014) ou au contraire ralentir les réactions d'oxydation (Belhaj et al., 2010 ; Berton-Carabin et al., 2014). Dans le cas d'une accélération des processus d'oxydation en milieu dispersé, différents facteurs peuvent être impliqués :

- La création d'une interface huile/eau favoriserait l'accessibilité de la phase huileuse pour l'oxygène dissout dans la phase aqueuse (Berton-Carabin et al., 2014) ; l'oxygène étant 3 fois plus soluble dans l'huile que dans l'eau (Ke and Ackman, 1973).
- Le processus d'émulsification pourrait favoriser la production des radicaux libres par augmentation locale de la température en raison des contraintes de cisaillement (Mao et al., 2009 ; Berton-Carabin et al., 2014 ; Jacobsen, 2015)

- Du fait de leur polarité, les peroxydes migreraient préférentiellement vers la zone interfaciale, favorisant de manière très localisée les étapes de propagation de la peroxydation lipidique (Labuza and Jr, 1971 ; Decker and McClements, 2001).
- Le contact entre les AGPI et les agents pro-oxydants pourrait être privilégié suivant la nature de l'interface.

Dans notre cas, les PL végétaux ne sont pas suffisants pour limiter l'oxydation des AGPI au cours de la phase d'émulsification de la formule enrichie en huiles de poisson ($TG_{n-3}+PL_{veg}$) malgré les précautions prises lors de la mise en émulsion de la formule, *i.e.* flux d'azote et basse température. De plus, lorsqu'ils sont à l'interface des gouttelettes, les PL pourraient même accélérer l'oxydation lipidique en favorisant le contact entre les AGPI et les agents pro-oxydants aqueux, par exemple par attraction électrostatique des cations bivalents avec les groupements phosphoryles des PL (Mei et al., 1998 ; Mancuso et al., 1999 ; McClements and Decker, 2000 ; Choi et al., 2010 ; Berton-Carabin et al., 2014).

1.2.2.2. Effet de la structuration des PL marins en liposomes

Les PL marins peuvent se présenter sous différentes formes : (1) en solution quand ils sont simplement dissous dans une masse d'huile, (2) en émulsion, où ils sont localisés à l'interface huile/eau et (3) en phase aqueuse sous forme de liposomes où ils s'organisent en une ou plusieurs bicouches. Pour les 3 formes, le profil en AG et les quantités en AGPI n-3 sont similaires. Afin d'assurer un rapport air/huile identique dans les 3 cas, la suspension de liposomes marins est additionnée du même mélange d'huiles végétales que celui utilisé pour la préparation de la formule $TG_{veg}+PL_{n-3}$. La stabilité oxydative des AGPI-LC n-3 est suivie par la concentration en propanal (nmoles/kg de lipides) au cours du temps, à 37°C, pour les 3 formes de présentation des PL marins (**Figure 18**).

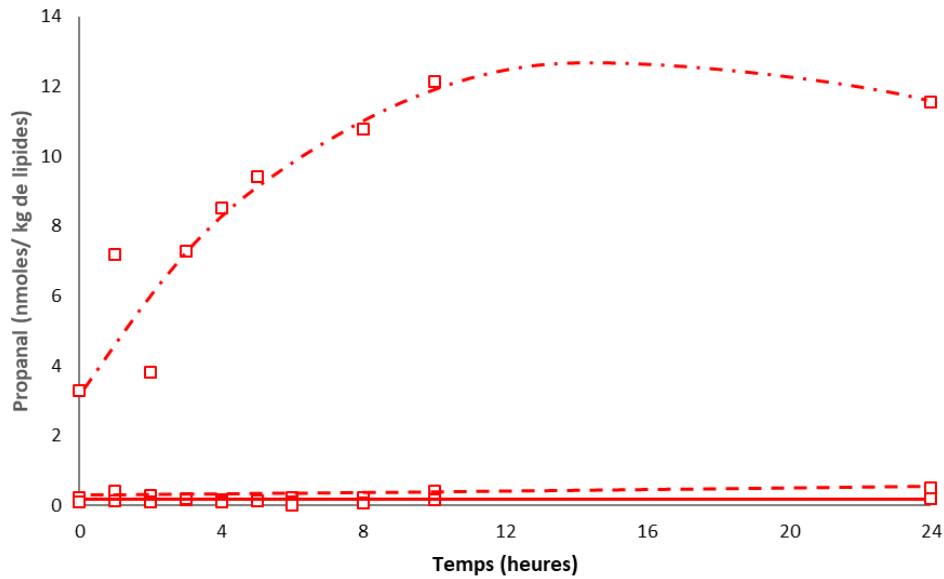


Figure 18 : Cinétique d'évolution de la concentration de propanal (nmoles de propanal/kg de lipides) pour différentes formes de structuration des PL marins de la formulation $TG_{veg}+PL_{n-3}$: en phase continue (—), en émulsion (---) et sous forme de liposomes (-.-), à 37°C

$TG_{veg}+PL_{n-3}$: formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

La formulation $TG_{veg}+PL_{n-3}$ en phase continue présente un taux initial de propanal faible (0,2 nmoles/kg de lipides), qui n'évolue pas sur les 24 heures de période de mesure. L'émulsification de cette formule n'entraîne pas de peroxydation significative des lipides, que ce soit en sortie de process (0,1 nmoles/kg de lipides, à T0) ou sur les 24 heures suivants l'émulsification (0,5 nmoles/kg de lipides). Par contre, la structuration des PL marins en liposomes se traduit par une teneur initiale en propanal nettement plus élevée (3,3 nmoles/kg de lipides), qui évolue rapidement au cours du temps (0,3 nmoles/kg de lipides/h) pour ensuite se stabiliser 10 heures après le process (11,5 nmoles propanal/kg de lipides).

Ainsi, lors de l'émulsification d'une huile, l'utilisation de PL marins est plus efficace pour limiter les réactions de peroxydation lipidique des AGPI-LC n-3 que la lécithine de soja au cours de l'étape de fabrication (0,5 nmoles propanal/ kg de lipides pour $TG_{veg}+PL_{n-3}$ en émulsion (Figure 18) vs 1,3 nmoles propanal/kg de lipides pour $TG_{n-3}+PL_{veg}$ en émulsion ; Figure 17) et au cours du stockage à 24h. Outre la différence de structure chimique (TG vs PL), ce résultat est en accord avec une étude montrant que la peroxydation du DHA en émulsion est inversement corrélée au diamètre des gouttelettes lipidiques (Gohtani et al., 1999). En effet, l'émulsion $TG_{veg}+PL_{n-3}$ est caractérisée par une taille de gouttes 7 fois plus grande (11,1 μm) que celle obtenue avec l'émulsion $TG_{n-3}+PL_{veg}$ (74,6 μm). Cette différence induit une

surface spécifique 10 fois plus petite, réduisant ainsi l'interface de contact entre l'oxygène, les agents pro-oxydants et les AGPI-LC n-3. Ce résultat est intéressant d'un point de vue organoleptique. En effet, la libération d'aldéhydes, produits volatils secondaires d'oxydation des AGPI-LC n-3, est en partie responsable de l'odeur désagréable de « poisson » (Hammer and Schieberle, 2013; Sae-leaw and Benjakul, 2014; Peinado et al., 2016). L'utilisation de PL marins pourrait donc être une piste intéressante pour la supplémentation de produits en AGPI-LC n-3, comme substitut aux huiles marines, pour améliorer les caractéristiques sensorielles des produits alimentaires.

Peu d'études se sont intéressées à la stabilité oxydative des liposomes préparés à partir de PL marins, mais elles montrent que les AGPI sont sensibles à l'oxydation (Nara et al., 1997 ; Nacka et al., 2001 ; Araseki et al., 2002) et que la stabilité oxydative des liposomes marins est très dépendante de la teneur en antioxydants. Par exemple, l'addition de 5 moles% d' α -tocophérol aux liposomes marins (1 mg/mL) est la quantité optimale de vitamine E pour prévenir l'oxydation des AGPI à pH 7,4 (Nacka et al., 2001). Dans notre cas, la précipitation des PL marins à l'acétone pourrait diminuer tout ou partie des tocophérols initialement présents dans la lécithine marine, favorisant les réactions d'oxydation au cours de la préparation des liposomes malgré les précautions prises (flux d'azote). Les réactions d'oxydation étant amorcées, elles se poursuivent au cours du stockage à la vitesse de 0,30 nmoles/kg de lipides/h malgré la présence des antioxydants des huiles végétales. Cet appauvrissement de la teneur en tocophérol associé à la petite taille des liposomes (diamètre 20 fois inférieur à celui des gouttelettes de l'émulsion) sont deux facteurs susceptibles de favoriser l'oxydation des AGPI n-3 contenus dans les lipides marins.

1.3. Etude *in vitro* de la lipolyse des formules lipidiques

Chacune des formules **TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}** est soumise à une lipolyse *in vitro*, simulant la phase gastrique de la digestion, en présence de lipase linguale de rat, puis la phase duodénale en présence de lipases pancréatiques de porc. Une quatrième formule uniquement à base de lipides d'origine végétale (**TG_{veg}+PL_{veg}**), dépourvue d'AGPI-LC n-3, est utilisée afin de tester l'influence de la nature des PL sur l'efficacité de la lipolyse.

Quelle que soit la structure vectrice (TG ou PL) des AG, le taux de lipolyse gastrique est nul (**Figure 19**). La lipase linguale de rat utilisée est inactive vis-à-vis des formulations

lipidiques étudiées. En revanche, au cours de la phase duodénale, les formules sont rapidement lipolysées, avec un taux de lipolyse qui diffère selon les lipides présents. Plus précisément après 90 minutes, la formule $TG_{veg}+PL_{veg}$ (*i.e.* dépourvue d'AGPI-LC n-3), présente le taux de lipolyse le plus élevé ($27,3 \pm 1,9\%$) et la formule $TG_{n-3}+PL_{veg}$ le taux le plus faible ($14,5 \pm 1,5\%$), soit une diminution de 47% du taux de lipolyse duodénale.

Lorsque les AGPI-LC n-3 sont vectorisés par des TG ou des PL (TG_{n-3} , $TG_{veg}+PL_{n-3}$ ou $TG_{n-3}+PL_{veg}$), le taux de lipolyse duodénale en fin de cinétique n'est pas significativement différent. Toutefois, on note que (1) l'ajout de PL issus de lécithine de soja dans la formule TG_{n-3} ($TG_{n-3}+PL_{veg}$) tend à réduire la lipolyse de 32% ($21,3 \pm 4,7\%$ et $14,5 \pm 1,5\%$ pour les formules TG_{n-3} et $TG_{n-3}+PL_{veg}$, respectivement) et (2) la lipolyse a tendance à être favorisée lorsque les AGPI-LC n-3 sont vectorisés par des PL plutôt que des TG ($21,5 \pm 4,3\%$ et $14,5 \pm 1,5\%$ pour les formules $TG_{veg}+PL_{n-3}$ et $TG_{n-3}+PL_{veg}$, respectivement).

La « vitesse » initiale de lipolyse duodénale est modulée selon la forme d'apport des lipides. En effet, la formule TG_{n-3} présente une lipolyse rapide, caractérisée par une forte augmentation de la libération d'AGL sur les 10 premières minutes ($1,2\%$ d'AGL libérés/min), alors que la vitesse de lipolyse des formules contenant des PL (indépendamment de la composition en AG des PL ; $TG_{veg}+PL_{n-3}$ et $TG_{n-3}+PL_{veg}$), est près de deux fois inférieure ($0,7\%$ d'AGL libérés/min pour chacune des formules) à celle observée pour la formule TG_{n-3} . Ainsi nos résultats suggèrent que la présence de PL dans une huile marine ou végétale ralentirait la vitesse de lipolyse et que la nature des PL jouerait sur le taux de lipolyse final.

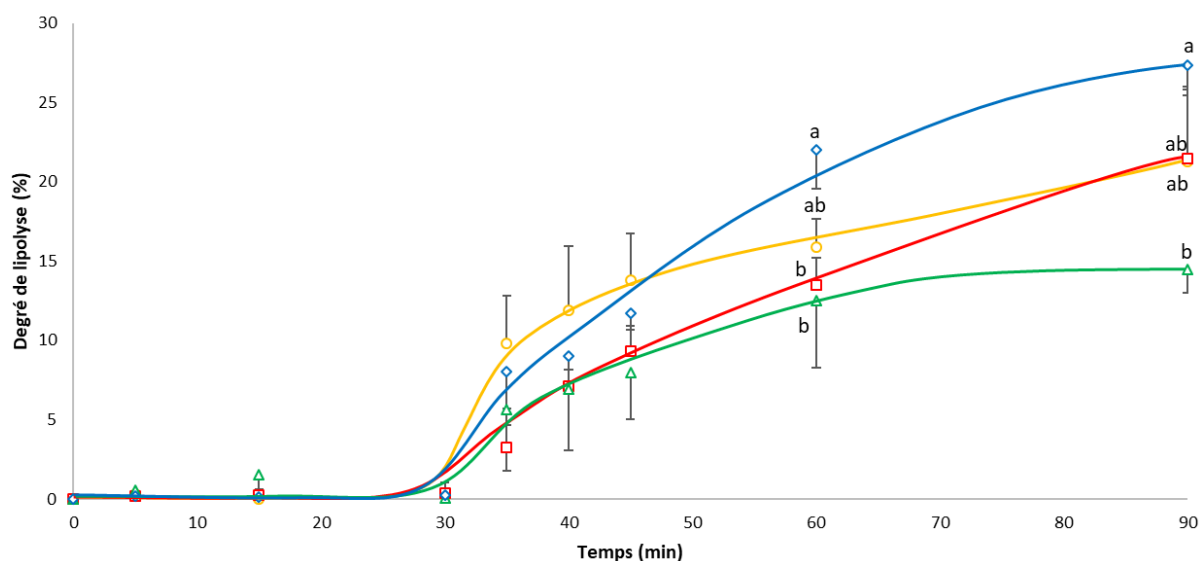


Figure 19 : Taux de lipolyse gastro-intestinale *in vitro* des formules lipidiques : TG_{veg}+PL_{veg} (◇), TG_{n-3} (○), TG_{n-3}+PL_{veg} (Δ) et TG_{veg}+PL_{n-3} (□) sur une cinétique de 90 minutes

TG_{veg}+PL_{veg} : formule dépourvue d'AGPI-LC n-3 à base d'huiles végétales supplémentées en lécithine de soja ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

La digestion gastro-intestinale est considérée comme l'étape limitante de la biodisponibilité des lipides. En effet, les lipides ingérés doivent être hydrolysés dans le tractus gastro-intestinal avant d'être incorporés dans des micelles mixtes de sels biliaires pour être absorbés par la bordure en brosse entérocytaire. La digestion des lipides a lieu principalement au niveau duodénal et représente près de 70% de la lipolyse totale (Hamosh et al., 1985 ; Carriere et al., 1993). En outre, le degré de lipolyse dépend de l'affinité des lipases pancréatiques vis-à-vis des espèces lipidiques. Ainsi, la présence d'AGPI-LC n-3 estérifiés en positions *sn-1/3* dans des molécules de TG réduit considérablement le degré de lipolyse *in vitro*. En effet, de par le nombre et la position des doubles liaisons (5-6 doubles liaisons), l'EPA et le DHA présentent une configuration moléculaire particulière, générant un encombrement stérique pour la lipase pancréatique, qui réduit son activité catalytique *in vitro* (Bottino et al., 1967 ; Akanbi et al., 2014).

En accord avec d'autres études, nous avons observé un effet inhibiteur de la lécithine de soja sur la lipolyse *in vitro* (Nishimukai et al., 2003 ; Couëdelo et al., 2011). Cette inhibition pourrait être due à l'hydratation des têtes polaires des PL créant une couche d'eau liée autour des gouttelettes lipidiques qui limiterait l'adsorption du complexe lipase/colipase à l'interface huile/eau, diminuant ainsi la disponibilité des TG pour l'hydrolyse (Borgström, 1980 ; Larsson

and Erlanson-Albertsson, 1986). Cependant, *in vivo*, la présence d'acides gras libres permettrait de lever cette inhibition, en augmentant la fixation du complexe lipase/colipase à l'interface (Larsson and Erlanson-Albertsson, 1986). De plus, cet effet inhibiteur semble être dépendant de la nature des PL. Différentes hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'effet de la composition en PL de l'interface sur l'efficacité de digestion *in vitro* :

- **Vis-à-vis de l'activité lipase.** Pour être actif, le système lipase/colipase doit se fixer à la surface des gouttelettes lipidiques. Cette fixation pourrait être influencée par les propriétés interfaciales des gouttes, qui sont dépendantes de la composition des PL utilisés (Erlanson-Albertsson, 1983). Ainsi, la présence de PC et de PE à l'interface induit une plus forte inhibition de l'activité de la lipase pancréatique qu'en présence de PI (Patton and Carey, 1981). Or, la lécithine de soja utilisée contient 29,6% de PI vs 5,2% pour les PL marins (**Tableau 8**), ce qui rend la composition de la formule TG_{veg}+PL_{veg} plus favorable à l'action de la lipase.
- **Vis-à-vis de l'activité phospholipase.** L'extrait pancréatique de porc utilisé dans cette étude contient de la PLA₂ dont l'activité est préférentiellement modulée par la nature de la tête polaire des PL plutôt que par la nature des AG estérifiés (de Haas et al., 1968 ; Jain and Rogers, 1989). Ainsi, la PLA₂ se fixe préférentiellement sur les PL anioniques (phosphatidylglycérol (PG), PA, PI, PS) plutôt que sur les PL zwitterioniques (PC et PE) (Ghomashchi et al., 1991 ; Singer et al., 2002 ; Bahnson, 2005). Les PL marins utilisés sont constitués d'une plus faible proportion en PL anioniques (5%), comparativement aux PL issus de la lécithine de soja (39%) (**Tableau 8**). Ceci pourrait expliquer l'activité plus faible de la PLA₂ avec la formule TG_{veg}+PL_{n-3} que la formule TG_{veg}+PL_{veg}.

1.4. Conclusion

Cette étude a montré l'importance de la composition interfaciale dans la préparation des émulsions et la stabilité physicochimique des milieux dispersés (*i.e.* émulsions et liposomes). Les résultats obtenus permettent de tirer les principales conclusions suivantes :

- Les PL peuvent être utilisés en tant qu'**agents tensioactifs** pour stabiliser des émulsions de type huile/eau. Néanmoins, de par leur composition, les PL marins sont moins efficaces, à quantités égales, que la lécithine de soja pour stabiliser les émulsions. En effet, la taille des gouttes ne peut pas être réduite par un système de cisaillement de type ultra turrax. Les moyens techniques existant au laboratoire pour réduire la granulométrie des émulsions (homogénéisateur à haute pression, cellule de Couette) ne peuvent pas être appliqués à nos systèmes. D'une part, les émulsions qui seront administrées aux rats sont composées à 50% (m/m) de phase huileuse, *i.e.* correspondant à des systèmes de viscosité élevée. Les forces de frottement qui s'appliqueraient, avec l'homogénéisateur à haute pression, à de tels systèmes élèveraient de façon importante la température des émulsions et induirait (1) leur déstructuration (déphasage) et (2) l'oxydation prématurée des AGPI-LC n-3. D'autre part, l'utilisation de la cellule de Couette est compatible avec nos émulsions visqueuses mais nécessite des volumes importants qui ne sont pas nécessaires pour la suite de nos expérimentations. Par ailleurs, au cours des étapes de digestion gastro-intestinale *in vivo*, les paramètres physico-chimiques (pH, température) et physiologiques (brassage, activités enzymatiques, sels biliaires) altèrent la granulométrie initiale des émulsions (McClements and Li, 2010 ; Couédelo et al., 2011 ; Parthasarathi et al., 2016) de sorte que la taille initiale des gouttes n'est pas préservée à l'arrivée dans la lumière intestinale. Pour ces raisons, nous avons fait le choix de ne pas réduire la granulométrie de l'émulsion. Nous avons donc fait l'hypothèse que les propriétés interfaciales et la structure moléculaire de vectorisation des AGPI n-3 prévaudraient, *in vivo*, sur la taille initiale des gouttes pour expliquer des différences de devenir métabolique des lipides.
- En phase continue, les PL, estérifiant ou non les AGPI-LC n-3, permettent de prévenir l'oxydation des AG insaturés, même dans des conditions d'oxydation accélérées. Les **propriétés antioxydantes** des PL sont conservées même lorsqu'ils sont vecteurs d'AGPI-LC n-3 (PL marins vs lécithine de soja). De même, en milieu dispersé, les

propriétés antioxydantes allouées aux PL marins sont conservées, suggérant que les PL marins représentent une source d'EPA et de DHA chimiquement plus stables que les TG.

- Les PL marins peuvent être structurés sous forme de **liposomes**. Ils représentent une autre forme physique d'apport nutritionnel en AG essentiels (EPA et DHA) que les émulsions, qui pourraient conduire à un métabolisme lipidique différent. Cependant, il faudra, dans ces conditions, prendre en compte le niveau supérieur d'oxydation des liposomes comparativement à un état émulsionné.
- Les propriétés interfaciales des émulsions ainsi que la nature des lipides influencent l'efficacité de **lipolyse**. Les résultats obtenus suggèrent que les AGPI-LC n-3 seraient plus facilement libérés au cours des étapes de digestion lorsqu'ils sont fournis sous forme de PL que de TG, ce qui, *in fine*, pourrait favoriser leur absorption intestinale *in vivo*.

2. Métabolisme intestinal des AGPI-LC n-3 chez le rat en fonction de leur forme physico-chimique de vectorisation

Malgré les campagnes du PNNS, les apports en AGPI-LC n-3 dans la population française sont encore trop faibles par rapport aux recommandations officielles (Astorg et al., 2011), alors que l'apport en lipides totaux est conforme aux ANC. Dans ce contexte, une stratégie pour couvrir les besoins physiologiques en EPA et en DHA consiste à augmenter leur biodisponibilité. Nous avons montré dans la partie bibliographique que la biodisponibilité des lipides alimentaires peut être modulée par des facteurs physico-chimiques d'apport (Cf. Chapitre 1, 2.3.). Or, les phases de digestion et d'absorption intestinale sont les premières étapes auxquelles sont confrontés les lipides alimentaires (notion de bioaccessibilité), et conditionnent ainsi leur accréation tissulaire et leur bioactivité dans l'organisme.

Depuis quelques années, le marché des AGPI-LC n-3 s'est diversifié avec l'émergence de nouvelles formes moléculaires de vectorisation, différentes de la forme TG classiquement ingérée *via* les huiles de poisson, comme l'huile de krill ou les lécithines marines. Le développement de ces nouveaux types d'apport des AGPI-LC n-3 doit s'accompagner d'une meilleure compréhension de leur mécanisme de digestion et de l'impact généré sur la biodisponibilité des AG à vectoriser. Comme nous l'avons déjà souligné, les quelques études

à ce sujet conduisent à des résultats discordants (Cf. Chapitre 1, 2.3.2.2.), et, dans la plus grande majorité, portent sur les étapes finales de la biodisponibilité (*i.e.* accrétion tissulaire, bioactivité). Le peu d'études qui se sont focalisées sur les étapes d'absorption intestinale des AGPI-LC n-3 en fonction de la forme moléculaire de vectorisation (*i.e.* TG vs PL), présentent des résultats équivoques (Cansell et al., 2003 ; Kitson et al., 2016 ; Murota et al., 2018). Par exemple, une étude rapporte que l'apport de PL marins favorise l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3 par rapport à un apport de TG marins (*i.e.* huile de poisson) (Cansell et al., 2003). Néanmoins, dans le protocole expérimental utilisé, trois paramètres peuvent influencer les étapes de digestion et d'absorption intestinale des AGPI-LC n-3 : (1) la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (TG vs PL), (2) la forme physique de présentation des lipides marins (PL en liposomes vs huile (TG) en phase continue) et (3) la composition de la matrice administrée (liposomes sans huile vs huile marine sans PL). De plus, selon d'autres études, la forme chimique de vectorisation des AGPI-LC n-3 impacterait préférentiellement leur incorporation dans les lipides lymphatiques (Murota et al., 2018) et plasmatiques (Kitson et al., 2016), plutôt que leur absorption intestinale.

Les études *in vivo* présentées dans cette partie se concentrent sur les phases d'absorption intestinale des AGPI-LC n-3 et de métabolisme entérocytaire des lipides lymphatiques néo-synthétisés. Une attention particulière est portée sur l'élaboration des formules lipidiques (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**) qui présentent :

- Un profil en AG similaire (**Tableau 15**), de sorte que les animaux de chaque groupe reçoivent une quantité d'AGPI-LC n-3 comparable (8,6 et 22,3 mg d'EPA et de DHA, respectivement).
- Une concentration en antioxydants équivalente (**Tableau 17**), ce qui permet d'émettre l'hypothèse qu'une diminution de l'absorption des AGPI n'est pas due à une oxydation au cours de la digestion des lipides.

De telles formules permettent d'évaluer le devenir intestinal de l'EPA et du DHA selon leur forme moléculaire de vectorisation (TG vs PL) sans être interféré par d'autres facteurs. Comme la concentration lymphatique en AG est maximale dès 5h après intubation des lipides (Couëdelo et al., 2015, 2011) et qu'il a été montré que la forme intra-moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (*i.e.* régio-localisation de l'AG dans les TG alimentaires) module essentiellement les périodes précoces de la digestion (Christensen et al., 1994), nous avons

choisi d'étudier la bioaccessibilité des AGPI-LC n-3 à travers l'analyse de la lymphe, sur les 6h suivants l'administration gastrique des formules lipidiques. La lymphe est caractérisée en termes (1) de profil et de concentration en AG des lipides totaux, (2) d'incorporation des AG dans les fractions lipidiques et (3) de régio-distribution des AG sur le squelette glycérol des TG et PL lymphatiques.

2.1. Effet de la forme moléculaire des AGPI-LC n-3 (TG vs PL) en phase continue

Dans cette première étude, les AGPI-LC n-3 sont vectorisés soit par des TG, supplémentés ou non en lécithine de soja (**TG_{n-3}** et **TG_{n-3}+PL_{veg}**), soit par des PL (**TG_{veg}+PL_{n-3}**). Les différentes formules lipidiques sont administrées aux animaux sous forme de phase continue.

2.1.1. Effet de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur leur absorption intestinale

Le **Tableau 21** présente le profil en acides gras des lipides totaux de la lymphe pour les trois groupes expérimentaux : **TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**. La concentration en AG totaux de la lymphe et le profil en AG des lipides totaux est similaire quel que soit le groupe considéré. De même, les proportions en EPA et en DHA sont comparables pour les deux formes moléculaires de vectorisation. Ces résultats vont dans le sens d'autres études qui utilisent des huiles marines (Chernenko et al., 1989 ; Christensen and Høy, 1996 ; Yoshida et al., 1996 ; Porsgaard and Høy, 2000), où le profil en AG de la lymphe reflète globalement celui des lipides alimentaires. Si on exprime les résultats en termes de concentrations en EPA et en DHA, elles sont également du même ordre de grandeur pour les 3 groupes de rats (**Tableau 21**). Ainsi dans nos conditions expérimentales, l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3, n'est pas modulée par leur forme moléculaire de vectorisation (TG vs PL).

Tableau 21 : Profil en acides gras (moles%) et concentration (mg/mL de lymphe) des lipides totaux de la lymphe sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats¹

	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
	Acides gras (moles%)		
Σ AGS	27,4 ± 1,5^{2a}	26,4 ± 1,0^a	26,3 ± 1,6^a
16:0	17,8 ± 1,0 ^a	18,5 ± 0,7 ^a	17,9 ± 1,0 ^a
18:0	4,8 ± 0,4 ^a	5,1 ± 0,8 ^a	5,0 ± 0,3 ^a
Σ AGMI	49,9 ± 3,5^a	52,4 ± 3,1^a	52,5 ± 3,8^a
18:1 n-9	45,5 ± 4,6 ^a	48,0 ± 3,5 ^a	48,8 ± 4,3 ^a
Σ AGPI	22,8 ± 2,8^a	21,2 ± 2,1^a	21,3 ± 3,0^a
Σ AGPI n-6	18,8 ± 2,6^a	17,3 ± 2,0^a	17,5 ± 2,5^a
18:2 n-6	14,2 ± 2,0 ^a	12,7 ± 1,3 ^a	13,5 ± 2,0 ^a
20:4 n-6	3,8 ± 0,7 ^a	3,8 ± 0,9 ^a	3,5 ± 0,7 ^a
Σ AGPI n-3	3,9 ± 0,2^a	3,8 ± 0,1^a	3,7 ± 0,9^a
18:3 n-3	1,1 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	1,0 ± 0,2 ^a
20:5 n-3	0,5 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,2 ^a
22:6 n-3	1,8 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,2 ^a	1,9 ± 0,7 ^a
AG totaux (mg/ mL de lymphe)	13,9 ± 4,0^a	15,5 ± 9,1^a	15,3 ± 5,6^a
EPA (µg/mL de lymphe)	88,6 ± 29,8 ^a	76,5 ± 39,4 ^a	57,2 ± 12,6 ^a
DHA (µg/mL de lymphe)	291,8 ± 103,8 ^a	241,2 ± 91,5 ^a	227,8 ± 73,2 ^a

¹ : Les rats ont reçu un bolus unique de l'une des formules suivantes : TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides monoinsaturés ; AGPI : acides polyinsaturés.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type, n=6 rats/ groupe. Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

2.1.2. Effet de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur leur incorporation dans les lipides lymphatiques

Au cours de la digestion gastro-intestinale, l'hydrolyse des lipides (majoritairement des TG et des PL) génère des produits (AGL, 2-MG et lysoPL) qui sont solubilisés dans des micelles mixtes de sels biliaires, pour être absorbés par les cellules intestinales de la barrière en brosse. Dans l'entérocyte, les produits de lipolyse sont re-synthétisés en lipides complexes, majoritairement des TG et des PL, compactés dans les CM pour être ensuite exportés, par exocytose, vers la lymphe avant de gagner la circulation sanguine. Dans nos conditions expérimentales, la caractérisation de la lymphe montre que les teneurs en AG totaux des TG

et PL lymphatiques sont similaires entre les groupes et représentent respectivement entre 9,1 et 12,2 et entre 1,1 et 1,2 mg/mL de lymphe (**Tableau 22**). Les TG constituent la fraction majoritaire des lipides lymphatiques (entre 66 et 79% des AG totaux), alors que les PL comptent pour 7 à 9% des AG totaux, selon les groupes. Ces résultats suggèrent que la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 n'affecte pas le profil en lipides de la lymphe et donc celui des CM. Ceci est cohérent avec l'homogénéité de taille des CM observée dans les trois groupes, *i.e.* diamètre moyen de 223 ± 28 nm pour le groupe **TG_{n-3}**, 248 ± 46 nm pour le groupe **TG_{n-3}+PL_{veg}** et 223 ± 47 nm pour le groupe **TG_{veg}+PL_{n-3}**. Ces données sont en accord avec des études montrant que (1) l'apport d'AGPI-LC n-3 sous forme de TG ou de PL conduit à des teneurs en TG et PL lymphatiques similaires, sur une cinétique de 6h post-administration (Murota et al., 2018) et (2) même si l'apport lipidique se fait uniquement avec des PL marins, la composition des CM est similaire à celle observée avec un apport d'huile de poisson (Cansell et al., 2003).

Dans la fraction TG (**Tableau 22**), les AG sont principalement représentés par les AGMI (54-55% des AG), les AGS (environ 26% des AG), les AGPI représentent environ 19% des AG. Parmi les AGPI, les acides gras de la série n-6 sont largement majoritaires (79-80% des AGPI totaux), avec près de 80% d'acide linoléique. Les AGPI n-3 (20% des AGPI totaux) sont représentés par l'ALA (25%), l'EPA (13%) et le DHA (49%).

Les PL lymphatiques sont principalement composés d'AGPI (46-48% des AG) et d'AGS (38-39% des AG) et, à degré moindre d'AGMI (13-14% des AG). Comparativement à la fraction TG, la fraction PL est plus riche en AGS et en APGI, notamment de la série n-6.

Tableau 22 : Profil en acides gras (moles%) et concentration (mg/mL de lymph) des fractions lymphatiques TG et PL sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats¹

	TG lymphatiques			PL lymphatiques		
	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
<i>Acides gras (moles%)</i>						
Σ AGS	26,3 ± 2,1^{2a}	25,9 ± 1,9^a	25,7 ± 1,9^a	39,5 ± 1,1^a	38,4 ± 1,2^a	39,2 ± 1,3^a
16:0	17,8 ± 1,0 ^a	18,4 ± 0,9 ^a	17,7 ± 1,0 ^a	20,4 ± 1,2 ^a	18,8 ± 0,8 ^b	19,9 ± 1,2 ^{ab}
18:0	4,0 ± 0,4 ^a	4,1 ± 0,5 ^a	4,0 ± 0,3 ^a	17,6 ± 1,1 ^a	18,3 ± 1,3 ^a	17,8 ± 1,1 ^a
Σ AGMI	53,6 ± 2,9^a	55,7 ± 3,4^a	55,9 ± 3,8^a	13,7 ± 2,6^a	13,4 ± 1,9^a	14,5 ± 3,2^a
18:1 n-9	49,0 ± 4,1 ^a	51,3 ± 3,8 ^a	52,3 ± 4,0 ^a	9,1 ± 2,8 ^a	8,7 ± 2,0 ^a	8,7 ± 3,5 ^a
Σ AGPI	20,1 ± 2,8^a	18,4 ± 1,7^a	18,6 ± 2,1^a	46,9 ± 2,0^a	48,2 ± 2,5^a	46,3 ± 2,4^a
Σ AGPI n-6	16,2 ± 2,4^a	14,6 ± 1,7^a	14,9 ± 1,6^a	43,7 ± 2,2^a	44,8 ± 2,4^a	42,3 ± 2,1^a
18:2 n-6	13,2 ± 2,1 ^a	11,7 ± 1,4 ^a	12,5 ± 1,5 ^a	23,9 ± 2,0 ^a	24,6 ± 1,7 ^a	24,2 ± 2,3 ^a
20:4 n-6	2,3 ± 0,4 ^a	2,3 ± 0,6 ^a	2,0 ± 0,4 ^a	18,2 ± 1,5 ^a	18,8 ± 2,3 ^a	16,9 ± 1,9 ^a
Σ AGPI n-3	3,8 ± 0,4^a	3,7 ± 0,1^a	3,5 ± 0,9^a	3,1 ± 0,2^a	3,3 ± 0,2^a	3,9 ± 1,1^a
18:3 n-3	1,1 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	1,0 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^b	0,3 ± 0,0 ^a
20:5 n-3	0,5 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,4 ^a
22:6 n-3	1,7 ± 0,2 ^a	1,9 ± 0,2 ^a	1,8 ± 0,7 ^a	1,6 ± 0,2 ^a	1,7 ± 0,3 ^a	2,1 ± 0,6 ^a
AG totaux (mg/ mL de lymph)	9,1 ± 2,5^a	12,2 ± 7,7^a	10,4 ± 4,9^a	1,2 ± 0,4^a	1,1 ± 0,6^a	1,1 ± 0,5^a
EPA (μg/mL de lymph)	49,7 ± 18,5 ^a	55,9 ± 18,9 ^a	35,0 ± 8,5 ^a	9,6 ± 4,0 ^a	11,6 ± 8,8 ^a	9,8 ± 3,1 ^a
DHA (μg/mL de lymph)	158,5 ± 53,6 ^a	183,3 ± 68,5 ^a	147,7 ± 53,8 ^a	18,6 ± 4,6 ^a	17,3 ± 7,0 ^a	19,3 ± 5,8 ^a

¹ : Les rats ont reçu un bolus unique de l'une des formules suivantes : **TG_{n-3}** : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; **TG_{n-3}+PL_{veg}** : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; **TG_{veg}+PL_{n-3}** : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides monoinsaturés ; AGPI : acides polyinsaturés.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type, n=6 rats/ groupe. Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

L'analyse des deux fractions lymphatiques, TG et PL, montre que le profil en AG est similaire quelle que soit la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3. De façon générale, l'EPA est incorporé préférentiellement dans les PL lymphatiques (0,8-1,1 moles%) que dans les TG lymphatiques (0,4-0,6 moles%), alors que le DHA est estérifié de façon équivalente entre les deux fractions lipidiques de la lymph (1,6-2,1 moles% dans les PL lymphatiques vs 1,7-1,9 dans les TG lymphatiques). Dans les PL lymphatiques, les taux en AGPI n-3, et plus particulièrement en DHA, tendent à être plus élevés (+30% ; p<0,12) dans le groupe TG_{veg}+PL_{n-3} par rapport aux groupes TG_{n-3} et TG_{n-3}+PL_{veg}. En revanche, en termes

quantitatif, chacune des deux fractions lipidiques est caractérisée par des teneurs équivalentes en AGPI-LC n-3 (**Tableau 22**).

Du fait de la spécificité des enzymes lipolytiques (lipase pancréatique, PLA₂), de la nature des lipides ingérés et de leur structure glycéridique (**Tableau 16**), les AG peuvent différemment régio-localisés dans les lipides lymphatiques selon qu'ils soient vectorisés par des PL ou des TG. Le **Tableau 23** présente la répartition des AG majoritaires en position *sn*-2 des TG et PL lymphatiques.

Tableau 23 : Répartition (%) en *sn*-2 des principaux acides gras estérifiés des TG et des PL lymphatiques sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats¹

	TG lymphatiques			PL lymphatiques		
	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
<i>% estérification en position sn-2 du glycérol</i>						
Σ AGS	31,6 ± 9,6^{2a}	27,2 ± 1,4^a	28,8 ± 3,4^a	20,6 ± 8,3^a	17,6 ± 10,1^a	13,7 ± 3,6^a
16:0	29,2 ± 6,8 ^a	29,1 ± 1,0 ^a	29,5 ± 2,1 ^a	22,3 ± 8,6 ^a	20,0 ± 11,1 ^a	14,7 ± 3,8 ^a
18:0	28,6 ± 5,8 ^a	22,7 ± 1,3 ^a	23,2 ± 3,7 ^a	17,4 ± 8,4 ^a	14,7 ± 9,6 ^a	10,9 ± 3,4 ^a
Σ AGMI	32,2 ± 3,3^a	34,0 ± 0,9^a	33,5 ± 1,2^a	38,2 ± 9,7^a	39,0 ± 4,9^a	35,7 ± 8,3^a
18:1 n-9	33,2 ± 3,4 ^a	35,0 ± 0,6 ^a	34,1 ± 0,9 ^a	43,1 ± 7,6 ^a	46,4 ± 4,5 ^a	46,8 ± 8,4 ^a
Σ AGPI	39,0 ± 4,6^a	39,9 ± 1,6^a	39,2 ± 1,5^a	78,6 ± 8,5^a	79,1 ± 9,2^a	85,7 ± 5,7^a
Σ AGPI n-6	41,0 ± 4,4^a	42,0 ± 1,7^a	43,1 ± 0,9^a	79,3 ± 9,3^a	79,6 ± 9,1^a	86,7 ± 6,4^a
18:2 n-6	44,3 ± 5,0 ^a	43,9 ± 2,0 ^a	44,9 ± 1,4 ^a	80,3 ± 5,5 ^a	79,3 ± 7,7 ^a	87,4 ± 7,4 ^a
20:4 n-6	28,6 ± 4,4 ^a	34,3 ± 2,3 ^b	32,1 ± 1,1 ^{ab}	79,8 ± 6,3 ^a	81,8 ± 11,6 ^a	87,6 ± 6,4 ^a
Σ AGPI n-3	30,3 ± 6,0^a	32,3 ± 1,5^a	23,9 ± 2,4^b	73,1 ± 11,1^a	73,4 ± 12,0^a	77,0 ± 13,7^a
18:3 n-3	31,2 ± 4,0 ^a	27,9 ± 1,4 ^a	31,4 ± 1,1 ^a	59,9 ± 6,1 ^{ab}	53,1 ± 5,1 ^a	63,5 ± 7,2 ^b
20:5 n-3	18,2 ± 3,5 ^{ab}	19,4 ± 2,0 ^a	14,5 ± 3,6 ^b	75,1 ± 7,3 ^a	83,5 ± 19,1 ^a	85,6 ± 11,7 ^a
22:6 n-3	30,4 ± 8,5 ^a	33,7 ± 1,7 ^a	17,3 ± 1,5 ^b	72,1 ± 5,1 ^a	73,7 ± 10,6 ^a	78,4 ± 19,7 ^a

¹ : Les rats ont reçu un bolus unique de l'une des formules suivantes : **TG_{n-3}** : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; **TG_{n-3}+PL_{veg}** : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; **TG_{veg}+PL_{n-3}** : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides monoinsaturés ; AGPI : acides polyinsaturés.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type, n=6 rats/groupe. Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

La plupart des AG sont distribués de façon équivalente entre les 3 positions des TG lymphatiques, exception faite de l'acide linoléique (18:2 n-6) qui est préférentiellement localisé en position *sn-2* (44-45%) et de l'EPA, majoritairement estérifié en position *sn-1/3* (82-86%). On note que la formule lipidique intubée aux rats influence significativement la distribution moléculaire de l'EPA ($p < 0,05$) et du DHA ($p < 0,001$) dans les TG lymphatiques.

Dans les groupes **TG_{n-3}** et **TG_{n-3}+PL_{veg}**, l'externalisation de l'EPA (18-19% en position *sn-2*) dans les TG lymphatiques est cohérente avec la distribution de cet AG dans les TG marins (22% en position *sn-2*, **Tableau 16**). Après hydrolyse au cours de la digestion, l'EPA est majoritairement absorbé sous forme libre, pour être incorporé dans les positions *sn-1/3* des TG lymphatiques, *via* la voie du 2-MG.

En revanche, malgré une proportion importante (50,6%) du DHA en position *sn-2* dans les TG marins (**Tableau 16**), on observe une distribution équimolaire du DHA entre les 3 positions des TG lymphatiques (30,4 à 33,7% DHA en position *sn-2* ; **Tableau 23**) pour les groupes **TG_{n-3}** et **TG_{n-3}+PL_{veg}**. Ainsi, la structure glycéridique des TG alimentaires n'est pas totalement conservée (60%) au niveau lymphatique. Ces résultats corroborent ceux de Christensen and Høy, qui montrent que l'apport d'huile de poisson (75% DHA en position *sn-2* des TG de l'huile) induit une distribution équivalente du DHA entre les 3 positions des TG lymphatiques (30% DHA en position *sn-2*) (Christensen and Høy, 1996). Ceci suggère qu'outre l'hydrolyse des TG au cours de la digestion, d'autres mécanismes pourraient être impliqués tels que (1) une isomérisation des 2-MG en 1-MG, qui pourraient ensuite servir de substrats à la lipase pancréatique (Mattson and Volpenhein, 1964), (2) une hydrolyse intraluminaire des 2-MG par la CEL (Bakala N'Goma et al., 2012) et/ou (3) une hydrolyse des 2-MG, absorbés dans l'entérocyte, par une lipase intracellulaire (Christensen and Høy, 1996 ; Chon et al., 2007 ; Couëdelo et al., 2012). Ces deux hypothèses permettent d'expliquer une augmentation de DHA libre qui enrichirait le pool entérocytaire d'AGL, pour participer à la synthèse des lipides lymphatiques. La voie du 2-MG, prépondérante dans la synthèse des TG lymphatiques (Cf. Chapitre 1, 2.1.), utiliserait (1) les 2-MG-DHA restants, comme précurseurs pour la synthèse de nouveaux TG, en conservant le DHA en position *sn-2*, et (2) le DHA libre pour les positions *sn-1/3*.

Dans les PL marins, l'EPA et le DHA sont majoritairement estérifiés en position *sn-2* (>74% AGPI-LC n-3 en position *sn-2*, **Tableau 16**) et se retrouvent très largement estérifiés en

positions *sn*-1/3 des TG lymphatiques (près de 85,5 et 82,7% en position *sn*-1/3 pour l'EPA et le DHA, respectivement, **Tableau 23**). Après hydrolyse des PL marins par la PLA₂, l'EPA et le DHA sont libérés et absorbés sous forme libre puis incorporés en positions *sn*-1/3 des TG lymphatiques *via* la voie du 2-MG. Néanmoins, près de 14% d'EPA et 17% de DHA sont retrouvés en position *sn*-2 des TG lymphatiques. Ceci suggère l'implication d'une seconde voie métabolique, celle du glycerol-3-phosphate (G3P) (Cf. Chapitre 1, 2.1.). La voie du G3P, minoritaire dans la resynthèse entérocytaire des TG, permet d'insérer une molécule d'EPA ou de DHA libre en position *sn*-2 des TG.

Concernant les PL lymphatiques (**Tableau 23**), les données révèlent que les AGPI-LC n-3 sont majoritairement greffés en position *sn*-2 ($\geq 72\%$ en position *sn*-2) quelle que soit leur forme moléculaire de vectorisation. Comme nous l'avons mentionné dans la partie bibliographique (Cf. chapitre 1. 2.1.), les PL sont majoritairement issus de la ré-acylation des lysoPL absorbés et dans une moindre mesure de la voie du G3P. Ces deux voies conduisent à l'insertion d'AGPI-LC n-3 libres, issus de l'hydrolyse des TG et PL alimentaires, en position *sn*-2 des PL lymphatiques.

Cette première étude a été menée dans le but de mettre en évidence l'influence de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur leur bioaccessibilité, dans une approche expérimentale où les espèces lipidiques étaient simplement mélangées et administrées en phase continue aux animaux. De façon générale, nous avons montré que les AGPI-LC n-3 sont absorbés de façon similaire qu'ils soient fournis sous forme de TG marins ou de PL marins. L'influence de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 a mise en évidence que les PL marins (1) tendent à favoriser l'incorporation du DHA dans les PL lymphatiques et (2) enrichissent les positions *sn*-1/3 des TG lymphatiques en DHA, comparé à un apport sous forme de TG marins (**TG_{n-3}** et **TG_{n-3}+PL_{veg}**).

Nous avons interprété ces résultats par la mise en jeu successive des 2 voies métaboliques en période postprandiale, qui sont impliquées dans la synthèse des TG lymphatiques (Couëdelo et al., 2017) : la voie du 2-MG et celle du G3P. Les PL lymphatiques, quant à eux, proviennent majoritairement de la re-acylation des 1-lysoPL absorbés (Scow et al., 1967 ; Nilsson, 1968 ; Mansbach, 1975, 1977 ; Davidson et al., 1991), favorisant l'incorporation des AGPI libres en position *sn*-2 (Hishikawa et al., 2008 ; Kazachkov et al., 2008 ; Zhao et al., 2008). Bien que peu de données concernent la régulation de la biosynthèse des

PL lymphatiques, la plus forte incorporation des AGPI-LC n-3 lors de l'utilisation de PL marins pourrait être attribuée à une plus forte teneur en AGPI-LC n-3 libres dans l'entérocyte, consécutivement à l'hydrolyse de la position *sn*-2 des PL marins par la PLA₂. Les AGPI-LC n-3 libres seraient alors disponibles pour être engagés dans les voies de resynthèse des PL lymphatiques.

Les **Figures 20** et **21** présentent des schémas récapitulatifs de l'ensemble des hypothèses formulées pour expliquer les différences d'incorporation du DHA dans les lipides lymphatiques. La **Figure 20** se concentre sur une vectorisation sous forme de TG (huiles de poisson) supplémentés ou non en lécithine de soja (**TG_{n-3}** et **TG_{n-3}+PL_{veg}**) et la **Figure 21** se focalise sur une vectorisation sous forme de PL (**TG_{veg}+PL_{n-3}**).

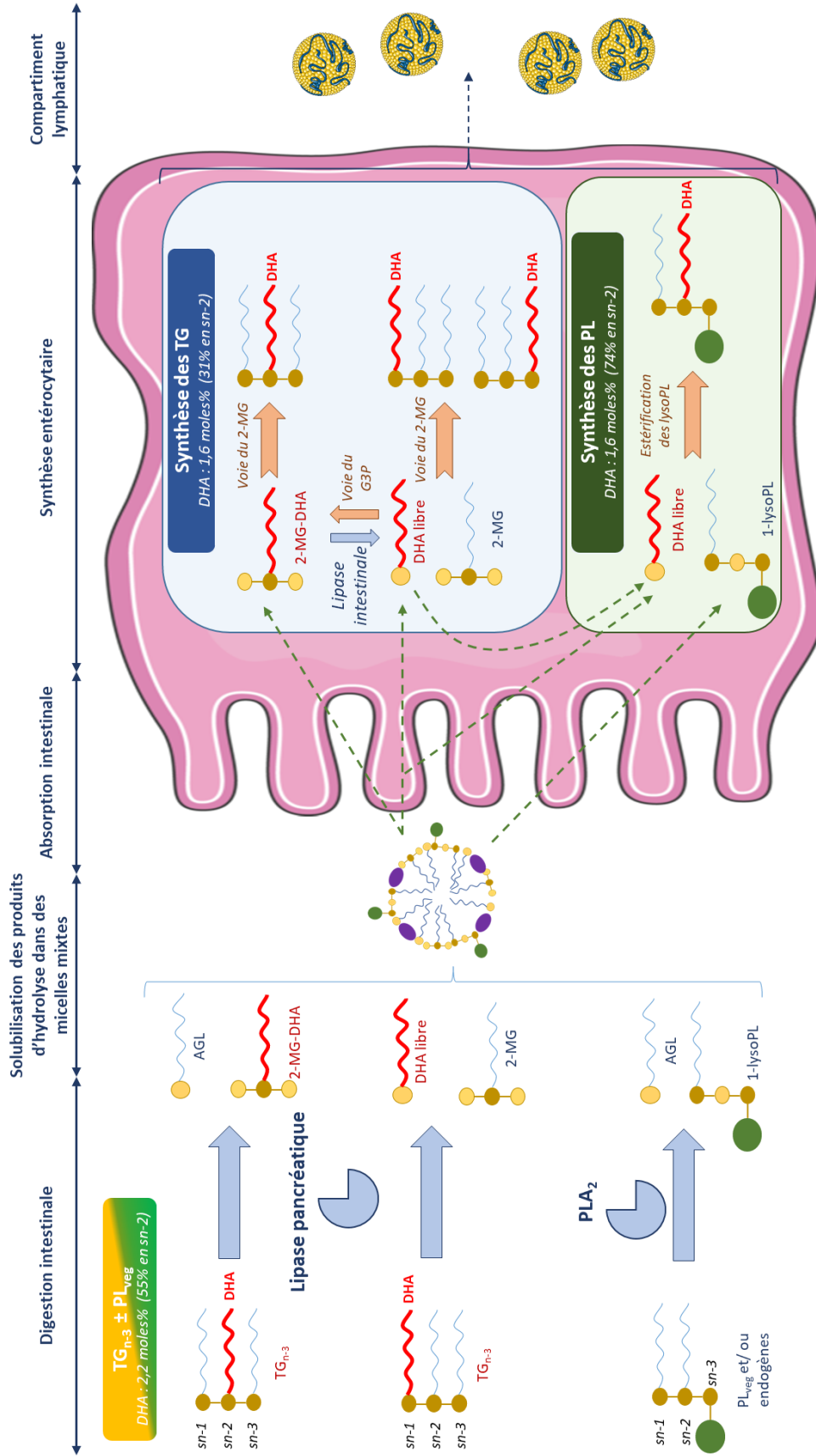


Figure 20 : Hypothèses de la digestion, de l'absorption intestinale et de l'incorporation du DHA dans les lipides lymphatiques après un apport d'une formule en phase continue, enrichie en huiles de poisson supplémentées ou non en lécithine de soja (TG_{n-3} et $TG_{n-3}+PL_{veg}$)

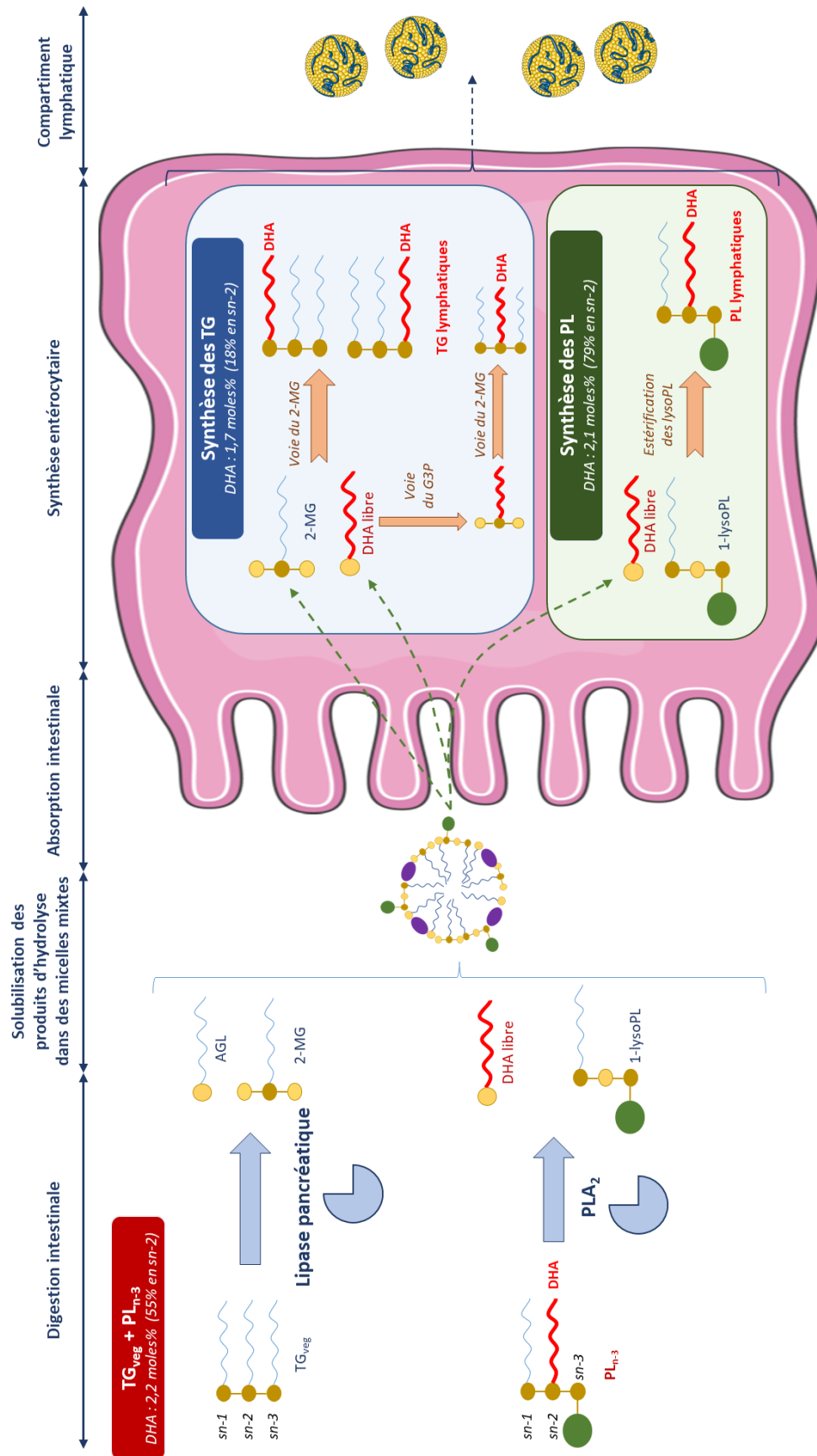


Figure 21 : Hypothèses de la digestion, de l'absorption intestinale et de l'incorporation du DHA dans les lipides lymphatiques après un apport d'une formule en phase continue, d'huiles végétales supplémentées en PL marins ($TG_{veg}+PL_{n-3}$)

Les PL ayant des propriétés émulsifiantes, nous allons maintenant complexifier la forme de vectorisation des AGPI-LC n-3 en jouant non seulement sur la forme moléculaire mais également sur l'arrangement supramoléculaire des lipides avec une première étude portant sur les systèmes émulsifiés (Cf. Chapitre 3, 2.2.) et une deuxième étude portant sur les liposomes (Cf. Chapitre 3, 2.3.).

2.2. Effet de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (TG vs PL) sous forme d'émulsion

Selon certaines études, l'émulsification d'une huile améliore la bioaccessibilité des AG (Cf. Chapitre 1, 2.3.1.). Néanmoins, les études de biodisponibilité visant à étudier l'effet de l'émulsification portent essentiellement sur le devenir intestinal des AG issus de l'hydrolyse des TG et, à notre connaissance, aucune étude ne cible le devenir des AG vectorisés par les PL, utilisés comme émulsifiants. Cette étude vise donc à suivre, chez le rat, le devenir intestinal des AGPI-LC n-3 selon : (1) la forme physique d'apport de la phase huileuse (**TG_{n-3}+PL_{veg}**) en **phase continue** vs en **émulsion** et (2) la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 en phase émulsionnée ainsi que l'effet de l'interface huile/eau (**TG_{n-3}+PL_{veg}** vs **TG_{veg}+PL_{n-3} en émulsion**).

2.2.1. Effet de l'émulsification et de la nature de l'interface huile/eau sur l'absorption intestinale des acides gras

Le **Tableau 24** présente le profil en AG de la lymphe collectée pendant les 6h suivants l'administration des formules lipidiques (**TG_{n-3}+PL_{veg}** en **phase continue** et en **émulsion** et **TG_{veg}+PL_{n-3} en émulsion**).

L'émulsification de la formule **TG_{n-3}+PL_{veg}** tend à augmenter la concentration en AG des lipides totaux de la lymphe ($15,2 \pm 9,1$ vs $24,2 \pm 5,0$ mg/mL de lymphe pour le groupe **TG_{n-3}+PL_{veg}** en **phase continue** vs en **émulsion**, respectivement) mais sans différence significative ($p=0,21$). En revanche, les concentrations lymphatiques en EPA et en DHA sont significativement supérieures ($p<0,03$) d'un facteur 2 environ, à celles observées avec la phase continue (**Tableau 24**). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature montrant une assimilation globale en lipides, plus élevée avec une formule émulsionnée (Michalski et al., 2013). L'émulsification préalable de l'huile pourrait favoriser l'action de la lipase pancréatique en interagissant plus efficacement avec une interface préformée. Il en

résulterait (1) une concentration accrue de produits d'hydrolyse dans la lumière intestinale, favorable au phénomène de diffusion passive régissant l'entrée des AG dans l'entérocyte en période postprandiale, et (2) par voie de conséquence, un temps de séjour des AGPI-LC n-3 dans le tractus gastro-intestinale réduit, limitant leur exposition à des conditions favorables à leur oxydation (*i.e.* oxygène, température) (Larsson et al., 2016a, 2016b ; Dasilva et al., 2018). En termes de profil en AG, l'émulsification de la phase huileuse ne modifie globalement pas la composition des lipides lymphatiques totaux sauf en ce qui concerne les AGPI n-6 dont les proportions diminuent de 19% dans le groupe **TG_{n-3}+PL_{veg} en émulsion**. Cette diminution concerne à la fois l'acide linoléique et l'acide arachidonique.

Dans le cas des formules émulsionnées mais présentant des vecteurs moléculaires d'AGPI-LC n-3 différents (**TG_{veg}+PL_{n-3} en émulsion** vs **TG_{n-3}+PL_{veg} en émulsion**), la concentration lymphatique en AG dans les lipides totaux ne varie pas de manière significative. En revanche, le profil en AG des lipides lymphatiques est légèrement influencé par une vectorisation des AGPI-LC n-3 sous forme de PL marins avec (1) une augmentation de la proportion des AGS, (2) une diminution du taux d'EPA. Néanmoins d'un point de vue quantitatif, les concentrations lymphatiques en AGPI-LC n-3 sont similaires entre les deux formules émulsionnées (**Tableau 24**). Ces résultats suggèrent que, même si la création d'une interface préformée permet d'améliorer l'absorption intestinale des lipides, dans nos conditions expérimentales, ni la nature des lipides vecteurs des AGPI-LC n-3, ni la nature de l'interface huile/eau n'influencent son efficacité.

Tableau 24 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux de la lymphe sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats¹

	TG _{n-3} +PL _{veg} Phase continue	TG _{n-3} +PL _{veg} Emulsion	TG _{veg} +PL _{n-3} Emulsion
<i>Acides gras (moles%)</i>			
Σ AGS	26,4 ± 1,0^{2a}	26,4 ± 1,2^a	28,2 ± 0,9^b
16:0	18,5 ± 0,7 ^a	17,0 ± 0,7 ^b	18,1 ± 0,9 ^{ab}
18:0	5,1 ± 0,8 ^a	4,5 ± 0,2 ^a	4,6 ± 0,2 ^a
Σ AGMI	52,4 ± 3,1^a	55,3 ± 1,6^a	53,3 ± 2,0^a
18:1 n-9	48,0 ± 3,5 ^a	51,9 ± 1,5 ^a	50,5 ± 2,4 ^a
Σ AGPI	21,2 ± 2,1^a	18,2 ± 0,8^b	18,4 ± 1,3^b
Σ AGPI n-6	17,3 ± 2,0^a	14,0 ± 0,7^b	14,5 ± 0,8^b
18:2 n-6	12,7 ± 1,3 ^a	10,9 ± 0,6 ^b	12,0 ± 0,5 ^{ab}
20:4 n-6	3,8 ± 0,9 ^a	2,7 ± 0,3 ^b	2,3 ± 0,5 ^b
Σ AGPI n-3	3,8 ± 0,1^a	4,1 ± 0,2^a	3,8 ± 0,8^a
18:3 n-3	0,7 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,0 ^b
20:5 n-3	0,6 ± 0,0 ^{ab}	0,8 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,2 ^b
22:6 n-3	2,0 ± 0,2 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,6 ^a
AG totaux (mg/mL de lymphe)	15,5 ± 9,1^a	24,2 ± 5,0^a	28,2 ± 10,8^a
EPA (μg/mL de lymphe)	76,5 ± 39,4 ^a	186,0 ± 38,1 ^b	143,3 ± 53,1 ^{ab}
DHA (μg/mL de lymphe)	241,2 ± 91,5 ^a	534,2 ± 111,1 ^b	544,0 ± 187,1 ^b

¹ : Les rats ont reçu un bolus unique de l'une des formules suivantes : TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides monoinsaturés ; AGPI : acides polyinsaturés.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type, n=6 rats/groupe. Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Il est intéressant de noter que les différences d'activité de la lipase pancréatique observées *in vitro* entre les deux formulations lipidiques (Cf. Chapitre 3, 1.3.) ne se traduisent pas par des différences d'absorption intestinale *in vivo*. La non convergence des données *in vitro* et *in vivo* peut résulter de différences en termes de temps d'observation (1h pour l'étude *in vitro* vs 6h pour l'étude *in vivo*). De plus, dans les expériences *in vitro* les produits de la lipolyse s'accumulent, alors qu'*in vivo* ils sont solubilisés dans les micelles mixtes de sels biliaires pour être absorbés par les entérocytes, modifiant l'équilibre des espèces chimiques en présence, et donc les cinétiques enzymatiques. Les données de la lipolyse *in vitro* permettent une compréhension des mécanismes mis en jeu au niveau des interfaces. Même

si la charge de surface liée au profil en PL à l'interface peut moduler l'activité de la PLA₂ *in vitro* (Cf. Chapitre 3, 1.3.), notre étude montre que ce n'est pas le cas *in vivo*, pour les deux compositions en PL des lécithines utilisées (5% de PL anioniques pour les PL marins vs 39% pour la lécithine de soja).

Par ailleurs, les deux émulsions utilisées sont caractérisées par des tailles de gouttes différentes (11,1 et 74,6 µm pour les émulsions **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**, respectivement). Certaines études menées *in vitro* (Armand et al., 1992 ; Patrick Borel et al., 1994), chez l'animal (P. Borel et al., 1994) et chez l'homme (Armand et al., 1999 ; Armand, 2007) montrent que la taille des gouttelettes lipidiques permet de moduler la vitesse d'hydrolyse des TG par la lipase pancréatique. Notamment, une émulsion fine (de 0,46 à 0,7 µm selon les études considérées) serait plus rapidement hydrolysée dans le tractus gastro-intestinal qu'une émulsion grossière (3,18 à 22 µm selon les études considérées) et retarderait la vidange gastrique. Nos données ne confirment pas l'effet de la granulométrie de l'émulsion sur l'absorption intestinale *in vivo* puisque les deux émulsions conduisent à des concentrations lymphatiques en AG similaires. Cela suggère qu'au-delà d'une taille de 10 µm, la granulométrie de l'émulsion n'impacte plus la phase d'absorption intestinale et que seules des émulsions très fines (<10 µm) pourraient moduler l'efficacité de digestion et d'absorption intestinale des AG.

En conclusion, nos résultats révèlent que l'absorption des AGPI-LC n-3 est similaire, qu'ils soient vectorisés par des TG émulsionnés ou par des PL à l'interface huile/eau. Par conséquent, l'influence de l'émulsification vis-à-vis de la digestion et de l'absorption gastro-intestinale n'est pas seulement restreinte à l'activité de la lipase pancréatique mais semble également impliquer celle de la PLA₂ : la création d'une interface huile/ eau améliorerait l'activité des enzymes lipolytiques, indépendamment de leur nature. De plus, nos données suggèrent que, dans nos conditions expérimentales, l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3 s'effectue de façon indépendante des espèces moléculaires de la lécithine utilisée pour stabiliser l'émulsion (*i.e.* nature des AG et tête polaire des PL) et de la taille des gouttelettes (*i.e.* la surface développée et disponible pour interagir avec les enzymes lipolytiques).

2.2.2. Effet de l'émulsification sur l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les lipides lymphatiques

Comme précédemment, dans le cas des formules en phase continue, il est intéressant de prendre en compte les procédés de synthèse entérocytaire des lipides, en étudiant la composition des lipides lymphatiques suite à un apport de lipides sous forme émulsionnée. Ainsi, nous nous sommes attachés à suivre la composition en AG (**Tableau 25**) dans les deux fractions lipidiques principales de la lymphe, *i.e.* TG et PL, et ce pour les trois groupes expérimentaux (**TG_{n-3}+PL_{veg}** en **phase continue**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** en **émulsion** et **TG_{veg}+PL_{n-3}** en **émulsion**). Si les TG constituent toujours la fraction majoritaire des lipides lymphatiques, il semble que l'émulsification de la formule huileuse tende à augmenter la fraction TG (79% des AG totaux pour le groupe **TG_{n-3}+PL_{veg}** en **phase continue** vs 94-96% pour les groupes **TG_{n-3}+PL_{veg}** en **émulsion** et **TG_{veg}+PL_{n-3}** en **émulsion**), alors que les PL restent toujours minoritaires (5 à 7% des AG totaux, selon les groupes). En termes de profil en AG, les TG sont majoritairement caractérisés par des AGMI (57-59%), des AGS (25-27%) et dans une moindre mesure en AGPI (16%), notamment AGPI n-6 (12%). Comparativement à la fraction TG, la fraction PL est plus riche en AGS et en APGI, notamment de la série n-6.

L'émulsification de la formule enrichie en huiles de poisson (**TG_{n-3}+PL_{veg}** en **phase continue** vs **TG_{n-3}+PL_{veg}** en **émulsion**) tend à augmenter ($p=0,06$) la concentration en AG des TG lymphatiques sans pour autant augmenter celle en PL. Elle influence le profil en AG des TG et PL lymphatiques. On note, par exemple, une augmentation de la proportion en EPA ($p<0,03$) dans chacune des fractions lipidiques de la lymphe (TG et PL), sans modifications, toutefois, sur les taux en DHA. En termes quantitatifs, dans les TG lymphatiques, l'émulsification de la formule **TG_{n-3}+PL_{veg}** augmente significativement ($p<0,01$) les concentrations en EPA et en DHA (**Tableau 25**). Dans les PL lymphatiques, les teneurs en AGPI-LC n-3 atteignent des valeurs similaires quelle que soit la forme supramoléculaire de présentation (*i.e.* **phase continue** ou **émulsion**) de la formule **TG_{n-3}+PL_{veg}** (**Tableau 25**).

Tableau 25 : Profil en acides gras (moles%) et concentration (mg/mL de lymphe) des fractions lipidiques lymphatiques TG et PL sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats¹

	TG lymphatiques			PL lymphatiques		
	TG _{n-3} +PL _{veg} Phase continue	TG _{n-3} +PL _{veg} Emulsion	TG _{veg} +PL _{n-3} Emulsion	TG _{n-3} +PL _{veg} Phase continue	TG _{n-3} +PL _{veg} Emulsion	TG _{veg} +PL _{n-3} Emulsion
	<i>moles%</i>					
Σ AGS	25,9 ± 1,9^{2a}	25,1 ± 1,3^a	26,8 ± 1,2^a	38,4 ± 1,2^a	40,7 ± 1,0^{ab}	41,4 ± 0,9^b
16:0	18,4 ± 0,9 ^a	16,6 ± 0,8 ^b	17,7 ± 1,0 ^{ab}	18,8 ± 0,8 ^a	20,9 ± 1,0 ^b	21,3 ± 0,6 ^b
18:0	4,1 ± 0,5 ^a	3,5 ± 0,2 ^b	3,5 ± 0,2 ^b	18,3 ± 1,3 ^a	18,2 ± 0,6 ^a	18,2 ± 1,1 ^a
Σ AGMI	55,7 ± 3,4^a	59,0 ± 1,5^a	57,1 ± 1,8^a	13,4 ± 1,9^a	15,0 ± 1,3^a	14,0 ± 0,7^a
18:1 n-9	51,3 ± 3,8 ^a	55,5 ± 1,5 ^b	54,3 ± 2,2 ^{ab}	8,7 ± 2,0 ^a	11,4 ± 1,2 ^b	9,3 ± 1,0 ^{ab}
Σ AGPI	18,4 ± 1,7^a	15,8 ± 0,7^b	16,0 ± 1,0^b	48,2 ± 2,5^a	44,2 ± 1,4^b	44,5 ± 0,8^b
Σ AGPI n-6	14,6 ± 1,7^a	11,5 ± 0,6^b	12,2 ± 0,5^b	44,8 ± 2,4^a	40,7 ± 1,3^b	39,8 ± 1,0^b
18:2 n-6	11,7 ± 1,4 ^a	9,7 ± 0,6 ^b	10,8 ± 0,5 ^{ab}	24,6 ± 1,7 ^a	24,3 ± 1,4 ^a	25,5 ± 2,3 ^a
20:4 n-6	2,3 ± 0,6 ^a	1,5 ± 0,1 ^b	1,1 ± 0,2 ^b	18,8 ± 2,3 ^a	15,5 ± 1,6 ^b	13,4 ± 1,6 ^b
Σ AGPI n-3	3,7 ± 0,1^a	4,2 ± 0,2^a	3,8 ± 0,8^a	3,3 ± 0,2^a	3,6 ± 0,4^a	4,6 ± 0,5^b
18:3 n-3	0,7 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,0 ^b	0,3 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^b	0,3 ± 0,0 ^a
20:5 n-3	0,6 ± 0,0 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	0,5 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,2 ^b	1,5 ± 0,2 ^b
22:6 n-3	1,9 ± 0,2 ^a	2,2 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,6 ^a	1,7 ± 0,3 ^a	1,5 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,3 ^b
AG totaux (mg/mL de lymphe)	12,2 ± 7,7^a	23,2 ± 5,0^{ab}	26,5 ± 9,7^b	1,1 ± 0,6^a	1,2 ± 0,1^a	1,8 ± 0,7^a
EPA (μg/mL de lymphe)	55,9 ± 18,9 ^a	164,9 ± 35,0 ^b	117,4 ± 43,0 ^b	11,6 ± 8,8 ^a	16,7 ± 2,3 ^{ab}	26,4 ± 11,2 ^b
DHA (μg/mL de lymphe)	183,3 ± 68,5 ^a	518,1 ± 137,4 ^b	517,9 ± 210,2 ^b	17,3 ± 7,0 ^a	18,3 ± 2,2 ^a	43,8 ± 16,9 ^b

¹ : Les rats ont reçu un bolus unique de l'une des formules suivantes : TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides monoinsaturés ; AGPI : acides polyinsaturés.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type, n=6 rats/groupe. Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

En comparant les deux formules émulsionnées (TG_{veg}+PL_{n-3} en émulsion vs TG_{n-3}+PL_{veg} en émulsion), il apparaît que les proportions en AG dans chaque fraction lipidique (TG et PL lymphatiques) sont globalement similaires entre les deux groupes. Néanmoins, on note une légère diminution de la proportion d'EPA dans les TG lymphatiques (p<0,01) du groupe TG_{veg}+PL_{n-3} en émulsion. D'un point de vue quantitatif, les concentrations en EPA et en DHA dans les TG lymphatiques sont similaires pour les deux groupes d'émulsion (Tableau 25). Dans les PL lymphatiques, l'apport de PL marins émulsionnés (TG_{veg}+PL_{n-3} en émulsion) diminue légèrement le taux d'acide oléique (18:1 n-9 ; p=0,01) mais augmente, en contrepartie, ceux

en AGPI n-3, dont l'ALA (18:3 n-3) et le DHA ($p=0,01$), comme précédemment observé avec les formules en phase continue (Cf. Chapitre 3, 2.1.2.). Ces effets se répercutent sur les concentrations en AG, puisque l'apport de PL marins émulsionnés augmente significativement ($p=0,03$) la teneur en DHA dans les PL lymphatiques (**Tableau 25**). La concentration en EPA des PL lymphatiques n'est quant à elle pas modulée par la formulation des émulsions.

Dans cette étude, outre la forme physique de présentation (phase continue vs émulsion), les formulations varient en termes de vecteur moléculaire des AGPI-LC n-3 (TG marins vs PL marins) et donc de structure glycéridique. Nous avons donc analysé le degré d'estérification en position *sn-2* des AG dans les TG et PL lymphatiques pour les trois groupes expérimentaux (**Tableau 26**). Ni l'émulsification du mélange d'huiles marines, ni la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3, ni la nature de l'interface, n'influencent la distribution des AGS et AGMI sur le squelette glycérol de deux fractions de lipides lymphatiques étudiées (TG et PL). En revanche, l'émulsification des TG marins (**TG_{n-3}+PL_{veg}**) modifie la distribution de certains AGPI dans les fractions lipidiques lymphatiques. Dans les TG lymphatiques, le degré d'estérification de l'ALA en position *sn-2* ($31,7 \pm 2,0\%$) est légèrement augmenté dans la formule **TG_{n-3}+PL_{veg}** émulsifiée. Si l'EPA reste majoritairement estérifié en positions *sn-1/3* des TG lymphatiques ($>76\%$), l'émulsification augmente sa proportion en *sn-2* ($23,8 \pm 3,2\%$ vs $19,4 \pm 2,0\%$ pour les groupes **TG_{n-3}+PL_{veg}** en **émulsion** et **TG_{n-3}+PL_{veg}** en **phase continue**, respectivement). Dans les PL lymphatiques, les AGPI-LC n-3 sont essentiellement estérifiés en position *sn-2*, quelle que soit la forme physique d'apport de la formule **TG_{n-3}+PL_{veg}** (**phase continue** ou **émulsion**). Néanmoins, l'émulsification de la formule **TG_{n-3}+PL_{veg}** favorise la distribution du DHA en position *sn-2* ($90,4 \pm 0,3\%$; $p=0,01$).

L'apport de PL marins émulsionnés (**TG_{veg}+PL_{n-3}** en **émulsion**) préserve la distribution des AGPI-LC n-3, *i.e.* majoritairement en positions *sn-1/3* des TG lymphatiques et essentiellement en position *sn-2* des PL lymphatiques. Néanmoins, la comparaison des formules **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}** émulsionnées indique une diminution de 28% et 52% de la distribution de l'EPA et du DHA en position *sn-2* des TG lymphatiques ($p<0,01$) dans le groupe **TG_{veg}+PL_{n-3}** en **émulsion**. En revanche, dans les PL lymphatiques, chacun des deux AGPI-LC n-3 présente un degré d'estérification en position *sn-2* similaire quelle que soit la nature de la formule émulsionnée (**TG_{n-3}+PL_{veg}** en **émulsion** vs **TG_{veg}+PL_{n-3}** en **émulsion**).

Tableau 26 : Répartition (%) en *sn*-2 des principaux acides gras estérifiés des TG et des PL lymphatiques sur les 6h suivant l'administration des formules lipidiques aux rats¹

	TG lymphatiques			PL lymphatiques		
	TG _{n-3} +PL _{veg} ¹ Phase continue	TG _{n-3} +PL _{veg} Emulsion	TG _{veg} +PL _{n-3} Emulsion	TG _{n-3} +PL _{veg} Phase continue	TG _{n-3} +PL _{veg} Emulsion	TG _{veg} +PL _{n-3} Emulsion
	% estérification en <i>sn</i> -2 du glycérol					
Σ AGS	27,2 ± 1,4^{2a}	28,4 ± 2,4^a	25,6 ± 2,0^a	17,6 ± 10,1^a	11,4 ± 1,3^a	9,2 ± 1,5^a
16:0	29,1 ± 1,0 ^a	29,1 ± 2,0 ^a	26,5 ± 2,4 ^a	20,0 ± 11,1 ^a	12,3 ± 1,3 ^a	10,3 ± 1,6 ^a
18:0	22,7 ± 1,3 ^a	23,5 ± 3,5 ^a	21,3 ± 6,8 ^a	14,7 ± 9,6 ^a	9,3 ± 1,4 ^a	7,1 ± 1,6 ^a
Σ AGMI	34,0 ± 0,9^a	33,9 ± 1,2^a	35,2 ± 1,1^a	39,0 ± 4,9^a	39,4 ± 3,1^a	35,6 ± 2,6^a
18:1 n-9	35,0 ± 0,6 ^a	34,5 ± 1,2 ^a	36,0 ± 1,4 ^a	46,4 ± 4,4 ^a	44,4 ± 4,2 ^a	43,4 ± 2,3 ^a
Σ AGPI	39,9 ± 1,6^a	39,6 ± 2,6^a	40,1 ± 2,3^a	79,1 ± 9,2^a	89,4 ± 3,2^a	92,6 ± 1,1^b
Σ AGPI n-6	42,0 ± 1,7^a	43,2 ± 3,2^a	45,9 ± 2,9^a	79,6 ± 9,1^a	89,8 ± 3,0^a	93,3 ± 1,2^b
18:2 n-6	43,9 ± 2,0 ^a	44,7 ± 3,8 ^a	47,5 ± 3,2 ^a	79,3 ± 7,7 ^a	87,4 ± 2,4 ^a	92,4 ± 1,2 ^b
20:4 n-6	34,3 ± 2,3 ^a	37,4 ± 5,8 ^a	35,5 ± 1,8 ^a	81,8 ± 11,6 ^a	94,0 ± 4,3 ^a	96,3 ± 1,2 ^b
Σ AGPI n-3	32,3 ± 1,5^a	30,7 ± 1,6^a	22,3 ± 2,6^b	73,4 ± 12,0^a	84,6 ± 5,4^a	85,6 ± 1,3^a
18:3 n-3	27,9 ± 1,4 ^a	31,7 ± 2,0 ^b	36,5 ± 3,1 ^c	53,1 ± 5,1 ^a	53,2 ± 7,8 ^a	70,9 ± 11,0 ^b
20:5 n-3	19,4 ± 2,0 ^a	23,8 ± 3,2 ^b	17,2 ± 3,0 ^a	83,5 ± 19,1 ^a	93,3 ± 4,3 ^a	96,0 ± 1,8 ^a
22:6 n-3	33,7 ± 1,7 ^a	34,7 ± 3,7 ^a	16,7 ± 1,3 ^b	73,7 ± 10,6 ^a	90,4 ± 6,6 ^b	88,0 ± 3,0 ^b

¹ : Les rats ont reçu un bolus unique de l'une des formules suivantes : TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides monoinsaturés ; AGPI : acides polyinsaturés.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type, n=6 rats/groupe. Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Cette étude visait à suivre chez le rat, l'influence de : (1) l'émulsification d'une formule enrichie en huiles de poisson et (2) la nature de l'interface huile/eau couplée à la forme moléculaire de vectorisation sur l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3. De façon générale, cette étude confirme que l'émulsification d'une huile (marine ou végétale) augmente l'absorption intestinale des AG des formules lipidiques. Ainsi, cette forme physique d'apport semble augmenter l'efficacité des étapes de digestion et stimuler l'absorption intestinale. Cela a pour conséquence une modification du rapport TG/PL qui pourrait se répercuter sur les caractéristiques des CM. En effet, il a été montré qu'un apport de lipides sous forme émulsionnée génère une synthèse de CM plus nombreux et plus volumineux (Couëdelo et al., 2015). De plus, les CM volumineux sont plus facilement épurés du compartiment plasmatique sous l'activité de la LPL et joueraient ainsi un effet athéroprotecteur comparativement à des CM de petites tailles (Martins et al., 1996). L'activation des voies de synthèse des TG dans l'entérocyte par l'apport d'une huile de poisson émulsifiée (forme TG), ne modifie pas pour

autant, de manière significative, la distribution des AG sur le squelette glycérol. Ainsi, l'EPA reste essentiellement estérifié en positions *sn-1/3* des TG lymphatiques et en position *sn-2* des PL lymphatiques. Le DHA reste réparti de façon équimolaire entre les 3 positions des TG et en position *sn-2* des PL. En revanche, les voies métaboliques impliquées dans la resynthèse des lipides lymphatiques sont influencées par la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (TG vs PL). Notamment, sous forme de PL marins, le DHA est davantage incorporé dans les PL lymphatiques et majoritairement distribué en positions *sn-1/3* des TG lymphatiques, comme cela a déjà été observé et expliqué dans l'étude avec les formules en phase continue (Cf. Chapitre 3, 2.1.).

La **Figure 22** présente de façon schématique, les différentes hypothèses mécanistiques évoquées pour expliquer l'effet de l'émulsification des lipides marins sur la bioaccessibilité des AGPI-LC n-3.

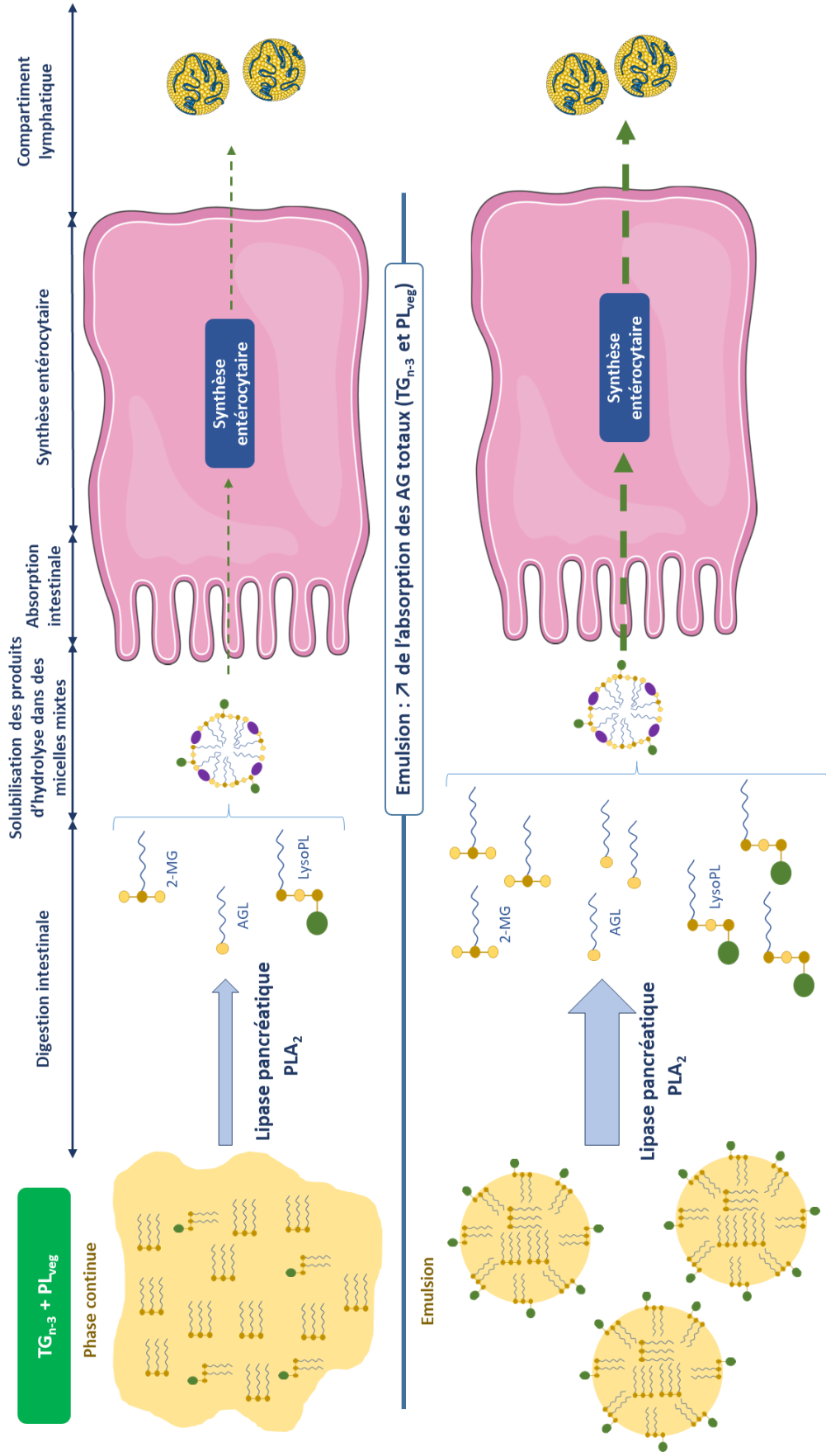


Figure 22 : Hypothèses de la digestion, de l'absorption intestinale et de l'incorporation des AG des formules lipidiques selon leur forme physique d'apport (phase continue vs en émulsion)

L'ensemble de ces résultats suggère que :

- La quantité d'AG bioaccessibles est davantage liée à l'existence d'une interface lipides/eau (comparaison des résultats $TG_{n-3}+PL_{veg}$ en **phase continue** vs $TG_{n-3}+PL_{veg}$ en **émulsion**) mais vraisemblablement moins à la nature de cette interface (comparaison des résultats $TG_{n-3}+PL_{veg}$ en **émulsion** vs $TG_{veg}+PL_{n-3}$ en **émulsion**)
- La répartition des AG sur le squelette glycérol des lipides lymphatiques (TG et PL) est davantage liée à la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (mêmes conclusions lors de la comparaison des résultats $TG_{n-3}+PL_{veg}$ en **émulsion** vs $TG_{veg}+PL_{n-3}$ en **émulsion** avec les mêmes systèmes en **phase continue**).

2.3. Effet de la forme supramoléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (émulsion vs liposomes)

Après avoir joué sur la fonctionnalité des PL en tant qu'émulsifiants, nous allons, dans cette partie, utiliser leur propriété d'auto-assemblage sous la forme de liposomes. A notre connaissance, seule une étude s'est focalisée sur l'absorption des AGPI-LC n-3, fournis sous forme de PL structurés en bicouches. Les résultats de cette étude révélaient que l'absorption lymphatique du DHA était améliorée de 66% lorsque les lipides étaient administrés sous forme de liposomes (PL) comparativement au groupe soumis à une huile de poisson (TG) non émulsionnée (Cansell et al., 2003). Cependant, conclure quant à l'effet de la structuration en liposomes des PL marins sur l'absorption intestinale des AG qu'ils estérifient, est donc discutable dans la mesure où plusieurs paramètres varient simultanément : **la forme moléculaire d'apport** des AGPI-LC n-3 (TG vs PL), **la forme physique** (PL en liposomes vs huile marine (TG) en phase continue) et **la composition de la matrice** administrée (liposomes sans huile et huile marine sans PL). L'objectif de notre étude est donc de définir de nouvelles conditions expérimentales permettant d'étudier, sans ambiguïté, l'influence de la structuration des PL sur la biodisponibilité intestinale des AGPI-LC n-3. Pour cela, la formule enrichie en PL marins ($TG_{veg}+PL_{n-3}$) est préparée sous trois formes différentes :

- *Non structurée*, où les PL marins sont dissous dans la phase huileuse végétale ($TG_{veg}+PL_{n-3}$ en **phase continue**)
- *Emulsionnée*, où les PL marins sont utilisés comme tensioactif pour stabiliser les gouttelettes lipidiques ($TG_{veg}+PL_{n-3}$ en **émulsion**) de la phase huileuse végétale

- *Structurée en bicouches dispersées dans l'huile*, où les PL marins forment des vésicules multilamellaires en présence d'une phase huileuse végétale (TG_{veg}+PL_{n-3} **liposomes**)

Comme dans les deux études précédentes, les formules lipidiques sont administrées aux rats par voie orale. Pour la formule TG_{veg}+PL_{n-3} **liposomes**, le mélange d'huiles végétales est administré après intubation des liposomes de sorte que les rats de chaque groupe reçoivent la même quantité de lipides (TG et PL), la même quantité d'AGPI-LC n-3 et une quantité similaire d'antioxydants. Ainsi, quelle que soit la forme supramoléculaire administrée, l'apport en AG, et notamment en EPA et en DHA, est strictement comparable entre les 3 groupes expérimentaux.

2.3.1. Effet de la structuration des PL marins sur l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3

Le **Tableau 27** présente le profil en AG des lipides totaux lymphatiques, sur les 6h après administration des formules. Alors que l'émulsification de l'huile avec des PL marins augmente de 84% la concentration en AG totaux dans la lymphe ($p < 0,05$), la structuration des PL marins en liposomes est sans effet sur ce paramètre. En revanche, si l'émulsification des PL marins modifie légèrement le profil en AG des lipides totaux lymphatiques, la structuration sous forme de liposomes augmente de 60% la proportion de l'EPA ($p = 0,04$) et tend ($p = 0,07$) à augmenter de 74% celle en DHA. D'un point de vue quantitatif, comparativement aux lipides en phase continue, chacune des deux formes structurées (**émulsion** et **liposomes**) augmente significativement d'un facteur supérieur à 2 les concentrations en EPA ($p < 0,02$) et en DHA ($p < 0,01$) (**Tableau 27**).

Tableau 27 : Profil en acides gras (moles%) et concentration (mg/mL de lymphe) des lipides totaux de la lymphe sur les 6h suivant l'administration de la formule supplémentée en PL marins (TG_{veg}+PL_{n-3}) sous trois formes physiques différentes¹

	Phase continue	Emulsion	Liposomes
<i>Acides gras (moles%)</i>			
Σ AGS	26,3 ± 1,6^{2a}	28,2 ± 0,9^a	27,3 ± 1,2^a
16:0	17,9 ± 1,0 ^a	18,1 ± 0,9 ^a	18,3 ± 1,0 ^a
18:0	5,0 ± 0,3 ^{ab}	4,6 ± 0,2 ^a	5,2 ± 0,2 ^b
Σ AGMI	52,5 ± 3,8^{ab}	53,3 ± 2,0^a	49,0 ± 3,2^b
18:1 n-9	48,8 ± 4,3 ^a	50,5 ± 2,4 ^a	45,5 ± 3,7 ^a
Σ AGPI	21,3 ± 3,0^{ab}	18,4 ± 1,3^a	23,7 ± 2,2^b
Σ AGPI n-6	17,5 ± 2,5^a	14,5 ± 0,8^b	18,0 ± 1,3^a
18:2 n-6	14,5 ± 2,0 ^a	12,0 ± 0,5 ^a	14,2 ± 1,6 ^a
20:4 n-6	3,5 ± 0,7 ^a	2,3 ± 0,5 ^b	3,4 ± 0,3 ^a
Σ AGPI n-3	3,7 ± 0,9^a	3,8 ± 0,8^{ab}	5,6 ± 1,9^b
18:3 n-3	1,0 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	0,9 ± 0,1 ^a
20:5 n-3	0,5 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,3 ^b
22:6 n-3	1,9 ± 0,7 ^a	2,0 ± 0,6 ^a	3,3 ± 1,5 ^a
AG totaux (mg/mL de lymphe)	15,3 ± 5,6^a	28,2 ± 10,8^b	16,9 ± 1,9^a
EPA (μg/mL de lymphe)	57,2 ± 12,6 ^a	143,3 ± 53,1 ^b	123,1 ± 33,1 ^b
DHA (μg/mL de lymphe)	227,8 ± 73,2 ^a	544,0 ± 187,1 ^b	497,8 ± 142,2 ^b

¹ : Les rats ont reçu un bolus unique de la formule TG_{veg}+PL_{n-3}, à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL), présentées sous forme de phase **continue**, d'**émulsion** ou de **liposomes**.

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides monoinsaturés ; AGPI : acides polyinsaturés.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type, n=6 rats/groupe. Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Les effets de l'émulsification par les PL marins vis-à-vis de l'absorption intestinale des AG ont été développés précédemment (Cf. Chapitre 3, 2.2.1.). Les résultats obtenus avec la structuration des PL marins en **liposomes** suggèrent que des mécanismes différents de digestion et/ou de métabolisme sont mis en œuvre. Différentes hypothèses peuvent être avancées :

- Une **activité de la PLA₂** plus importante lorsque les PL marins sont structurés en liposomes que lorsqu'ils sont présents en monocouche à l'interface des gouttes d'huile. En effet, dans les liposomes, les PL sont concentrés en surface et seraient davantage accessibles à l'enzyme. De plus, la structuration des PL en liposomes permet

de créer une interface spécifique pour cette enzyme alors que l'émulsification doit permettre l'ancrage de la PLA₂ pour l'hydrolyse des PL et de la lipase pancréatique pour celle des TG.

- La différence de **taille des objets**. Dans nos conditions expérimentales, les liposomes sont 20 fois plus petits que les gouttelettes lipidiques de l'émulsion (3,5 µm et 74,6 µm, pour les liposomes et l'émulsion, respectivement), générant ainsi une surface spécifique 100 fois plus grande pour les liposomes (20,2 m²/g) que celle développée par l'émulsion (0,24 m²/g). Ce paramètre serait plus favorable à l'adsorption de la PLA₂.

2.3.2. Effet de la structuration des PL marins sur l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les lipides lymphatiques

Le **Tableau 28** présente la composition en AG des deux fractions lipidiques de la lymphe (*i.e.* TG et PL) pour les trois formes supramoléculaires des PL_{n-3} étudiées. On note que, comparativement à la formule en **phase continue**, la structuration des lipides module différemment les concentrations lymphatiques en TG et PL. Ainsi, l'émulsification de la formule TG_{veg}+PL_{n-3} augmente significativement ($p < 0,01$), d'un facteur 2,5 la sécrétion de TG et de PL lymphatiques, alors que sa structuration en **liposomes** n'a pas d'impact sur ces espèces lipidiques. Dans les 3 groupes, les PL restent toujours minoritaires (5 à 6% des AG totaux). En termes de profil en AG, les TG sont majoritairement caractérisés par des AGMI (53-57%) et des AGS (26-27%). Comparativement à la fraction TG, la fraction PL est plus riche en AGS et en APGI, notamment de la série n-6.

En termes de profil en AG, les proportions en EPA et en DHA dans les TG et les PL lymphatiques ne sont pas modulées par l'émulsification des PL marins. En termes quantitatifs, l'apport de PL marins sous forme émulsionnée augmente significativement ($p < 0,01$) les concentrations en EPA et en DHA dans les TG et les PL lymphatiques (**Tableau 28**).

Tableau 28 : Profil en acides gras (moles%) et concentration (mg/mL de lymphe) des fractions TG et PL lymphatiques sur les 6h suivant l'administration de la formule supplémentée en PL marins (TG_{veg}+PL_{n-3}) sous trois formes physiques différentes¹

	TG lymphatiques			PL lymphatiques		
	Phase continue	Emulsion	Liposomes	Phase continue	Emulsion	Liposomes
<i>Acides gras (moles%)</i>						
Σ AGS	25,7 ± 1,9^{2a}	26,8 ± 1,2^a	26,3 ± 1,3^a	39,2 ± 1,3^a	41,4 ± 0,9^a	45,4 ± 2,9^b
16:0	17,7 ± 0,9 ^a	17,7 ± 1,0 ^a	18,0 ± 1,0 ^a	19,9 ± 1,2 ^a	21,3 ± 0,6 ^{ab}	22,7 ± 1,0 ^b
18:0	4,0 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,2 ^b	3,9 ± 0,2 ^a	17,8 ± 1,1 ^a	18,2 ± 1,1 ^a	18,4 ± 1,2 ^a
Σ AGMI	55,9 ± 3,8^a	57,1 ± 1,8^a	52,8 ± 3,3^a	14,5 ± 3,2^a	13,9 ± 0,8^{ab}	11,3 ± 1,5^b
18:1 n-9	52,2 ± 4,0 ^a	54,3 ± 2,2 ^a	49,4 ± 3,9 ^a	8,7 ± 3,5 ^a	9,3 ± 1,0 ^a	6,5 ± 1,6 ^a
Σ AGPI	18,6 ± 2,1^a	16,0 ± 1,0^a	20,8 ± 2,2^b	46,3 ± 2,4^a	44,4 ± 0,7^a	45,8 ± 1,6^a
Σ AGPI n-6	14,9 ± 1,6^a	12,1 ± 0,5^b	15,2 ± 1,4^a	42,3 ± 2,1^a	39,8 ± 1,0^b	40,3 ± 1,6^{ab}
18:2 n-6	12,5 ± 1,5 ^{ab}	10,8 ± 0,5 ^a	13,0 ± 1,4 ^b	24,2 ± 2,3 ^a	25,5 ± 2,3 ^a	22,2 ± 2,9 ^a
20:4 n-6	2,0 ± 0,4 ^a	1,1 ± 0,2 ^b	1,8 ± 0,2 ^a	16,9 ± 1,9 ^a	13,4 ± 1,5 ^b	17,2 ± 2,1 ^a
Σ AGPI n-3	3,5 ± 0,9^a	3,8 ± 0,8^{ab}	5,6 ± 1,9^b	3,9 ± 1,1^a	4,7 ± 0,5^{ab}	5,3 ± 1,2^b
18:3 n-3	1,0 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,0 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^a
20:5 n-3	0,4 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,3 ^a	1,1 ± 0,4 ^a	1,4 ± 0,2 ^{ab}	2,0 ± 0,8 ^b
22:6 n-3	1,8 ± 0,7 ^a	2,0 ± 0,6 ^a	3,3 ± 1,7 ^a	2,1 ± 0,6 ^a	2,4 ± 0,3 ^a	2,6 ± 0,4 ^a
AG totaux (mg/mL de lymphe)	10,4 ± 4,9^a	26,5 ± 9,7^b	9,7 ± 2,9^a	0,8 ± 0,4^a	1,8 ± 0,7^b	0,9 ± 0,2^a
EPA (µg/mL de lymphe)	35,0 ± 8,5 ^a	117,4 ± 43,0 ^b	75,1 ± 26,7 ^{ab}	9,8 ± 3,1 ^a	26,4 ± 11,2 ^b	13,7 ± 4,3 ^a
DHA (µg/mL de lymphe)	147,7 ± 53,8 ^a	517,9 ± 210,2 ^b	316,6 ± 134,5 ^{ab}	19,3 ± 5,8 ^a	43,8 ± 16,9 ^b	21,2 ± 5,7 ^a

¹ : Les rats ont reçu un bolus unique de la formule TG_{veg}+PL_{n-3}, à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL), présentées sous forme de phase **continue**, d'**émulsion** ou de **liposomes**.

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides monoinsaturés ; AGPI : acides polyinsaturés.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type, n=6 rats/ groupe. Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

La structuration des PL marins en **liposomes** augmente (p<0,04) de 60% et 36% les proportions en AGPI n-3 dans les TG et PL lymphatiques, respectivement. Plus précisément, dans les TG lymphatiques, la structuration des PL marins en **liposomes** tend à augmenter de 75% et 83% les proportions d'EPA (p=0,06) et de DHA (p=0,07) par rapport à la formule TG_{veg}+PL_{n-3} en **phase continue**. Concernant les PL lymphatiques, l'apport de **liposomes** marins augmente de 81% la proportion d'EPA, comparativement à la **phase continue**. D'un point de vue quantitatif, la structuration des PL marins en liposomes tend à augmenter d'un facteur 2 la concentration en EPA (p=0,13) et en DHA (p=0,12), uniquement dans les TG lymphatiques.

En effet, dans les PL lymphatiques, les teneurs en EPA et en DHA restent similaires, que les PL marins sont présentés en **phase continue** ou structurés en **liposomes** (Tableau 28).

Ainsi, en améliorant l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3, la structuration des PL marins en liposomes, module la synthèse des lipides lymphatiques. De fait, en augmentant le pool d'AGPI-LC n-3 intracellulaire, la resynthèse entérocytaire et l'incorporation des AGPI-LC n-3 seraient favorisées dans les diverses classes de lipides des CM. Dans ce cadre, nous avons déterminé leur degré d'estérification en position *sn*-2 dans les TG et PL lymphatiques (Tableau 29).

Tableau 29 : Répartition (%) en *sn*-2 des principaux acides gras estérifiés des TG et des PL lymphatiques sur les 6h suivant l'administration de la formule supplémentée en PL marins (TG_{veg}+PL_{n-3}) sous trois formes physiques différentes¹

	TG lymphatiques			PL lymphatiques		
	Phase continue	Emulsion	Liposomes	Phase continue	Emulsion	Liposomes
	% estérification en <i>sn</i> -2 du glycérol					
Σ AGS	28,8 ± 3,4^{2ab}	25,6 ± 2,0^a	32,5 ± 4,4^b	13,7 ± 3,6^a	9,2 ± 1,5^b	9,6 ± 1,8^b
16:0	29,5 ± 2,1 ^a	26,5 ± 2,4 ^a	35,0 ± 3,8 ^b	14,7 ± 3,8 ^a	10,3 ± 1,6 ^b	9,7 ± 1,6 ^b
18:0	23,2 ± 3,7 ^a	21,3 ± 6,8 ^a	32,7 ± 8,1 ^b	10,9 ± 3,4 ^a	7,1 ± 1,6 ^a	10,2 ± 2,7 ^a
Σ AGMI	33,5 ± 1,2^a	35,2 ± 1,1^a	33,8 ± 1,4^a	35,7 ± 8,3^a	35,6 ± 2,6^a	33,9 ± 3,7^a
18:1 n-9	34,1 ± 0,9 ^{ab}	36,0 ± 1,4 ^a	33,9 ± 1,8 ^b	46,8 ± 8,4 ^a	43,4 ± 2,3 ^a	45,4 ± 2,9 ^a
Σ AGPI	39,2 ± 1,5^a	40,1 ± 2,3^b	33,5 ± 2,9^b	85,7 ± 5,7^a	92,6 ± 1,1^b	91,5 ± 3,7^{ab}
Σ AGPI n-6	43,1 ± 0,9^a	45,9 ± 2,9^b	38,0 ± 4,9^b	86,7 ± 6,4^a	93,3 ± 1,2^a	92,5 ± 3,5^a
18:2 n-6	44,9 ± 1,4 ^a	47,5 ± 3,2 ^b	38,2 ± 5,6 ^b	87,4 ± 7,4 ^a	92,4 ± 1,2 ^a	89,4 ± 3,6 ^a
20:4 n-6	32,1 ± 1,1 ^a	35,5 ± 1,8 ^{ab}	37,5 ± 3,7 ^b	87,6 ± 6,4 ^a	96,3 ± 1,2 ^b	96,8 ± 4,0 ^b
Σ AGPI n-3	23,9 ± 2,4^a	22,3 ± 2,6^a	22,9 ± 2,9^a	77,0 ± 13,7^a	85,6 ± 1,3^a	85,3 ± 6,4^a
18:3 n-3	31,4 ± 1,1 ^a	36,5 ± 3,1 ^b	34,5 ± 0,6 ^b	63,5 ± 7,2 ^a	70,9 ± 11,0 ^a	42,1 ± 19,5 ^b
20:5 n-3	14,5 ± 3,6 ^a	17,2 ± 3,0 ^a	35,2 ± 7,4 ^b	85,6 ± 11,7 ^a	96,0 ± 1,8 ^{ab}	99,8 ± 5,9 ^b
22:6 n-3	17,3 ± 1,5 ^a	16,7 ± 1,3 ^a	18,7 ± 4,2 ^a	78,4 ± 19,7 ^a	88,0 ± 3,0 ^a	86,3 ± 6,0 ^a

¹ : Les rats ont reçu un bolus unique de la formule TG_{veg}+PL_{n-3}, à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL), présentées sous forme de phase **continue**, d'**émulsion** ou de **liposomes**.

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides monoinsaturés ; AGPI : acides polyinsaturés.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme d'une moyenne ± écart-type, n=6 rats/ groupe. Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Comparativement à la phase continue, l'émulsification des PL marins impacte l'incorporation des AG dans les TG lymphatiques, en favorisant l'internalisation des acides gras LA (18:2 n-6) et ALA (18:3 n-3) (p<0,01). L'EPA et le DHA ne sont pas impactés et restent presque exclusivement distribués en positions *sn*-1/3. La structuration des PL en liposomes conduit à une externalisation du LA (18:2 n-6) et favorise l'internalisation de l'ARA (20:4 n-6),

de l'ALA (18:3 n-3) et de l'EPA ($p < 0,01$). De façon intéressante, le degré d'estérification de l'EPA en position *sn-2* des TG lymphatiques est augmenté d'un facteur 2 ($p < 0,01$), comparativement aux deux autres groupes (en **phase continue** et en **émulsion**). Tout en gardant à l'esprit que l'EPA est un AG minoritaire de la lymphe (<1%), ces données suggèrent que l'augmentation spécifique du passage entérocytaire des AG issus des PL marins impacte la répartition des AG dans les voies de synthèse des TG lymphatiques. Cela se traduit par une modulation de la distribution de l'EPA qui passe d'une distribution majoritairement en positions *sn-1/3* des TG lymphatiques, dans le cas de PL en **phase continue** et en **émulsion**, à une répartition équimolaire entre les 3 positions, lorsqu'il est apporté sous forme **liposomes**. La répartition du DHA reste majoritairement en positions *sn-1/3*.

En ce qui concerne les PL lymphatiques, chacune des deux formules structurées (**émulsion** et **liposomes**) tend à augmenter la proportion en AGPI, notamment l'ARA (20:4 n-6), l'EPA et le DHA, en position *sn-2* des PL lymphatiques, au détriment de l'acide palmitique (16:0) ($p < 0,03$). L'externalisation de l'ALA est particulièrement notable dans le groupe **liposomes**.

Cette étude a été menée afin d'analyser l'effet de la structuration des PL marins (**émulsion** ou **liposomes**) sur la biodisponibilité intestinale des AGPI-LC n-3 qu'ils vectorisent. Les formules élaborées permettent de montrer que l'utilisation de PL marins, en tant qu'émulsifiant ou sous forme de liposomes, permet d'améliorer l'absorption intestinale de l'EPA et du DHA, mais de manière spécifique à la structuration. Plus précisément, l'émulsification de l'huile avec des PL marins augmente l'absorption intestinale de l'ensemble des AG totaux, issus de la lipolyse des TG et PL alimentaires, et sans spécificité de la nature des lipides et des AG. A l'inverse, la structuration des PL marins en liposomes augmente spécifiquement l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3. Ainsi, lorsqu'ils sont véhiculés par les PL, l'amélioration de la digestion et de l'absorption des AGPI-LC n-3 conduirait à des incorporations différentes dans les lipides lymphatiques, avec suivant les AG des répercussions sur leur position sur le squelette glycérol.

La **Figure 23** présente les hypothèses pouvant expliquer l'amélioration de l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3 selon la structuration des PL marins.

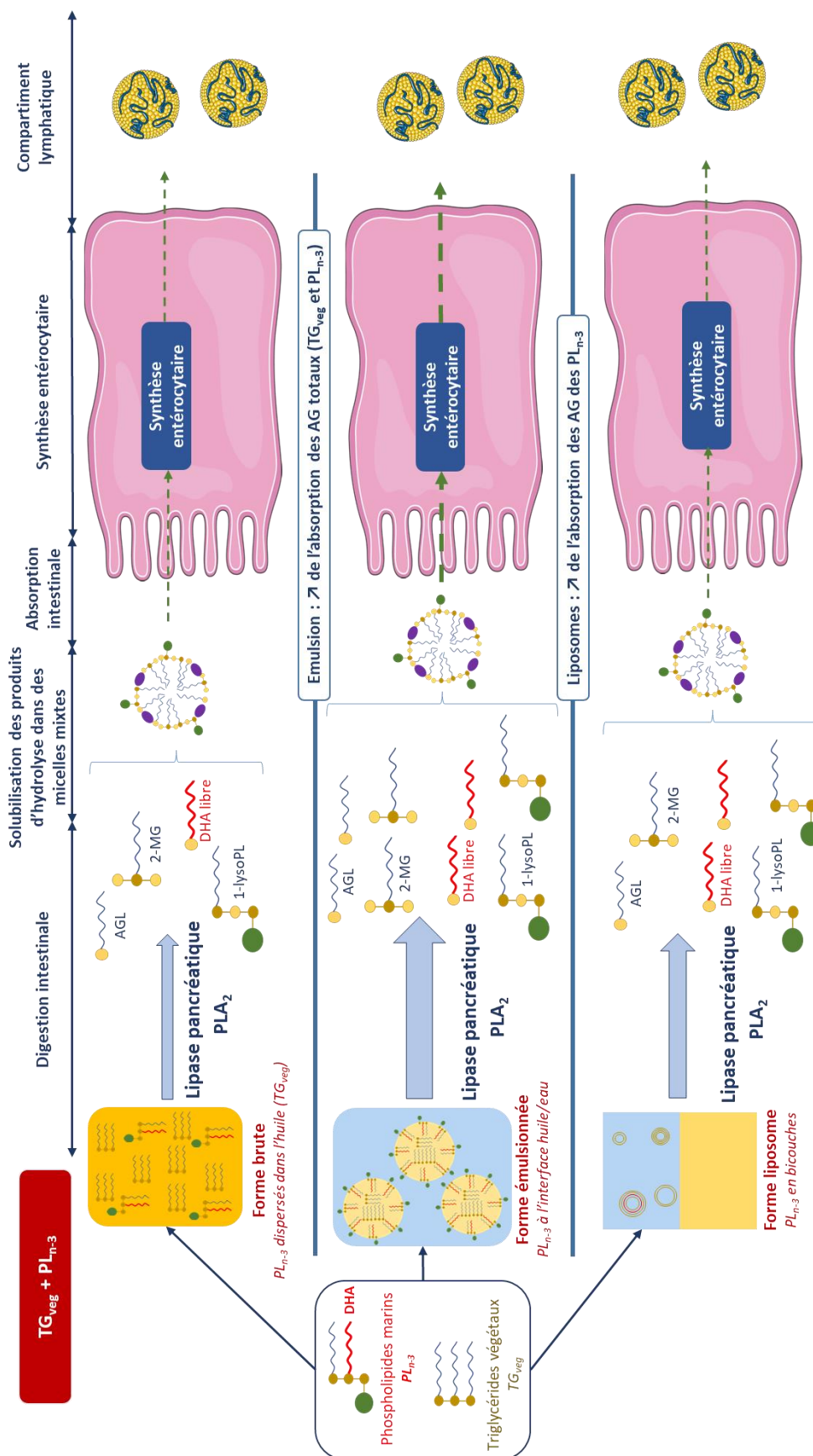


Figure 23 : Hypothèses de la digestion, de l'absorption intestinale et de l'incorporation des AG estérifiés dans des PL marins selon leur forme physique d'apport (phase continue, émulsion ou liposomes)

2.4. Conclusion

Le **Tableau 30** résume l'ensemble des résultats obtenus par l'analyse de la lymphe (*i.e.* lipides totaux, TG, PL et leur structure glycéridique) en fonction des formes moléculaires et supramoléculaires de vectorisation des AGPI-LC n-3.

Tableau 30 : Résumé des effets de la forme physico-chimique de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur la composition lipidique de la lymphe, sur les 6h suivants l'administration gastrique des différentes formules lipidiques chez le rat¹

	Effet de la forme moléculaire des AGPI-LC n-3 TG _{n-3} vs PL _{n-3}	Effet de l'émulsification des huiles marines TG _{n-3} +PL _{veg} Continue vs émulsion	Effet de la forme supramoléculaire des PL marins TG _{veg} +PL _{n-3} Continue vs émulsion/ liposomes
Lipides totaux lymphatiques			
AG totaux (mg/ mL de lymphe)	Similaire	Emulsion tend à ↗	Emulsion ↗ Liposomes pas d'effet
EPA (µg/ mL de lymphe)	Similaire	Emulsion ↗	Emulsion ↗ Liposomes ↗
DHA (µg/ mL de lymphe)	Similaire	Emulsion ↗	Emulsion ↗ Liposomes ↗
Triglycérides lymphatiques			
AG totaux (mg/ mL de lymphe)	Similaire	Emulsion ↗	Emulsion ↗ Liposomes pas d'effet
EPA (µg/ mL de lymphe)	Similaire	Emulsion ↗	Emulsion ↗ Liposomes tend à ↗
DHA (µg/ mL de lymphe)	Similaire	Emulsion ↗	Emulsion ↗ Liposomes tend à ↗
Répartition de l'EPA structure glycéridique	Distribution similaire : TG _{n-3} et PL _{n-3} : sn-1/3	Distribution similaire : Chaque groupe sn-1/3	Emulsion & phase continue : distribution similaire (sn-1/3) Liposomes : équimolaire
Répartition du DHA structure glycéridique	Distribution différente : TG _{n-3} : équimolaire PL _{n-3} : sn-1/3	Distribution similaire : Chaque groupe : équimolaire	Distribution similaire : Chaque groupe : sn-1/3
Phospholipides lymphatiques			
AG totaux (mg/ mL de lymphe)	Similaire	Similaire	Emulsion ↗ Liposomes pas d'effet
EPA (µg/ mL de lymphe)	Similaire	Similaire	Emulsion ↗ Liposomes pas d'effet
DHA (µg/ mL de lymphe)	Similaire	Similaire	Emulsion ↗ Liposomes pas d'effet
Répartition de l'EPA structure glycéridique	Distribution similaire : TG _{n-3} et PL _{n-3} : sn-2	Distribution similaire : majoritairement sn-2	Distribution similaire : majoritairement sn-2
Répartition du DHA structure glycéridique	Distribution similaire : TG _{n-3} et PL _{n-3} : sn-2	Distribution similaire : majoritairement sn-2	Distribution similaire : majoritairement sn-2

¹ TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

L'étude approfondie des lipides de la lymphe à la fois en termes de classes de lipides et de structure glycéridique a permis de faire des hypothèses en fonction de différentes formes de vectorisation des AGPI-LC n-3 quant aux mécanismes :

- **De lipolyse** des TG et PL mis en jeu et leurs répercussions sur la disponibilité des produits d'hydrolyse dans la lumière intestinale
- **Des voies métaboliques** mises en jeu lors de la resynthèse des AG dans les lipides néosynthétisés

Ainsi, cette étude a permis de démontrer que la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 impacte préférentiellement leur incorporation dans les lipides néosynthétisés, plutôt que leur absorption intestinale. Notamment, la vectorisation du DHA sous forme de PL marins, favorise son incorporation dans les PL lymphatiques et son externalisation dans les TG lymphatiques. A l'inverse, la formulation des lipides en milieu aqueux améliore l'efficacité de l'absorption intestinale, de façon dépendante de la nature de la structuration. Ainsi, l'émulsification d'une formule lipidique riche en AGPI-LC n-3 augmente l'absorption globale des AG, issus de l'hydrolyse des TG et PL, alors que la structuration des PL marins en liposomes favorise spécifiquement le passage des AGPI-LC n-3 au travers de la barrière intestinale.

Les différences observées pour l'EPA et le DHA en termes de concentration, proportion et/ou structure glycéridique dans les TG et PL lymphatiques pourraient se répercuter tant sur leur transport dans les lipides circulants que sur leur devenir métabolique, notamment en termes d'accrétion tissulaire. C'est pourquoi, une étude nutritionnelle à long terme a été menée chez l'animal (Chapitre 3, 3.), afin de déterminer si les différences d'incorporation dans les lipides lymphatiques influencent le devenir métabolique des AGPI-LC n-3, en termes d'accrétion tissulaire.

3. Devenir métabolique des AGPI-LC n-3 chez le rat

La biodisponibilité des AG prend en compte les étapes de digestion et d'absorption intestinale des AG alimentaires mais également leur incorporation dans les divers organes cibles dans lesquels ils sont métabolisés. Nous avons mis en évidence une influence de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (TG vs PL) sur leur bioaccessibilité, *i.e.* leur incorporation dans les lipides lymphatiques. Il s'agit à présent de savoir si les différences observées se répercutent sur le devenir métabolique des acides gras, notamment en termes d'accrétion tissulaire.

Dans ce contexte, des rats sont soumis à un des régimes normocaloriques et normolipidiques (5% lipides) suivants : **TG_{n-3}** ou **TG_{n-3}+PL_{veg}** ou **TG_{veg}+PL_{n-3}**. Les régimes sont élaborés de sorte que les rats reçoivent des quantités similaires en AGPI-LC n-3 (0,4 g EPA et 1,0 g DHA/kg de régime). Les teneurs en lécithine (5 g de PL/kg de régime) représentent moins de 1% de la composition totale du régime, ce qui est conforme avec la réglementation européenne pour les aliments présentant une restriction vis-à-vis des additifs alimentaires (Aguilar et al., 2017). Un groupe de rats soumis à un régime exempt d'AGPI-LC n-3 (TG_{veg}) est utilisé comme groupe contrôle, afin d'évaluer le niveau d'enrichissement tissulaire en EPA et en DHA. Les régimes sont préparés quotidiennement et les animaux y ont libre accès pendant 24h. Une étude préliminaire a montré que, dans nos conditions expérimentales, les régimes étudiés, *i.e.* **TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}** peuvent être considérés comme chimiquement stables au moment où les animaux les consomment (**Annexe 6**).

Au terme des 8 semaines de régime, l'incorporation et le devenir métabolique des AGPI-LC n-3 sont suivis (1) dans le foie et le plasma, en tant que tissus représentatifs du métabolisme lipidique, (2) dans les globules rouges comme marqueur général de l'incorporation des AG dans les lipides membranaires et (3) dans le cerveau et la rétine, deux organes où les rôles physiologiques des AGPI-LC n-3 sont essentiels. En termes d'interprétation, nous faisons l'hypothèse que les variations d'EPA et de DHA, observées dans les différents compartiments étudiés, résultent de leur apport nutritionnel et non de la bioconversion de leur précurseur : l'ALA. En effet, l'apport exogène en ALA des régimes utilisés représente moins de 0,7% des AG alimentaires.

3.1. Modification du profil lipidique plasmatique

Les paramètres lipidiques du plasma, après deux mois de régime enrichi en AGPI-LC n-3, sont présentés dans le **Tableau 31**. Ni la présence des AGPI-LC n-3, ni la nature du régime (*i.e.* forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 ou présence de PL) n'impactent de manière significative la triglycéridémie (entre 1,3 et 1,6 mmol/L de plasma, selon les groupes). En revanche, l'apport d'AGPI-LC n-3 sous forme d'huiles de poisson (**TG_{n-3}**) tend à diminuer de 18% ($p=0,14$) la cholestérolémie par rapport au groupe contrôle (TG_{veg}). La diminution devient significative ($p<0,05$) dès lors que les AGPI-LC n-3 sont vectorisés par des TG supplémentés à de la lécithine de soja (-27% ; **TG_{n-3}+PL_{veg}**) ou vectorisés par des PL (-22% ; TG_{veg}+**PL_{n-3}**). La concentration de cholestérol libre étant du même ordre de grandeur pour l'ensemble des groupes (entre 0,4 et 0,6 mmol/L de plasma), cette baisse significative est liée à la réduction ($p<0,05$) de la concentration en EC (-30% et -22% ; **TG_{n-3}+PL_{veg}** et TG_{veg}+**PL_{n-3}**, respectivement).

Les variations de concentration des lipides plasmatiques se répercutent uniquement sur la concentration en LDL/VLDL qui diminue de 24 à 31% ($p<0,05$) chez les animaux soumis aux régimes enrichis en huiles de poisson, supplémentées ou non en lécithine de soja (**TG_{n-3}** et **TG_{n-3}+PL_{veg}**) et tend à diminuer de 20% ($p=0,09$) chez les rats nourris avec un régime supplémenté en PL marins (TG_{veg}+**PL_{n-3}**).

Tableau 31 : Paramètres lipidiques du plasma (mmol/L de plasma) chez le rat soumis à 8 semaines de régime¹

	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
	<i>mmol/L de plasma</i>			
Triglycérides	1,5 ± 0,2 ^{2a}	1,5 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,3 ^a	1,3 ± 0,4 ^a
Cholestérol total	4,5 ± 0,8 ^a	3,7 ± 0,9 ^{ab}	3,3 ± 0,6 ^b	3,5 ± 1,0 ^b
Cholestérol libre	0,6 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,2 ^a
Cholestérol estérifié	4,0 ± 0,7 ^a	3,3 ± 0,7 ^{ab}	2,8 ± 0,6 ^b	3,1 ± 0,9 ^{ab}
HDL	1,9 ± 0,6 ^a	1,8 ± 0,2 ^a	1,5 ± 0,5 ^a	1,4 ± 0,3 ^a
LDL/VLDL	2,9 ± 0,4 ^a	2,0 ± 0,6 ^b	2,2 ± 0,7 ^b	2,3 ± 0,6 ^{ab}

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; VLDL : lipoprotéines de très faible densité.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type, n=10 rats/groupe.

Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes ($p<0,05$), ANOVA à 1 facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Les effets « santé » attribués aux AGPI-LC n-3 découlent en partie de leurs effets hypolipémifiants (Ruxton et al., 2004; Jacobson et al., 2012; Bradberry and Hilleman, 2013; Oscarsson and Hurt-Camejo, 2017). Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas observé d'effet hypotriglycéridémiant suite à l'enrichissement des régimes en AGPI-LC n-3. Mais, il convient de noter que les effets positifs des AGPI-LC n-3 vis-à-vis de la triglycéridémie ont été démontrés, pour la plupart, dans des études de prévention et de traitement des maladies cardiovasculaires, chez des sujets hyperlipidiques soumis quotidiennement à de fortes doses d'EPA et de DHA (Amate et al., 2001b). En revanche, nous avons mis en évidence un effet bénéfique des AGPI-LC n-3, d'une part, et des PL alimentaires, d'autre part, vis-à-vis du profil lipoprotéique chez le rat, et plus particulièrement sur le cholestérol estérifié dans les LDL/VLDL. Ces données sont en accord avec plusieurs études qui montrent qu'un régime enrichi en huile de poisson (1) permet d'augmenter la β -oxydation des AG et de diminuer la lipogenèse (Pawar and Jump, 2003 ; Harris and Bulchandani, 2006 ; Jump, 2008 ; McMullen et al., 2014 ; Oscarsson and Hurt-Camejo, 2017), réduisant ainsi la disponibilité des substrats pour la synthèse des lipoprotéines hépatiques et (2) pourrait réduire la synthèse hépatique du cholestérol en inhibant l'activité de la hydroxy-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) (Field et al., 1987 ; Choi et al., 1989 ; Oh et al., 2015). De plus, des effets bénéfiques de la lécithine alimentaire vis-à-vis de la cholestérolémie ont été rapportés (Cohn et al., 2008 ; Küllenberg et al., 2012). Par exemple, l'ajout de lécithine de soja à un régime hypercholestérolémiant diminue le taux plasmatique en cholestérol total (O'Brien and Corrigan, 1988) ainsi qu'en TG et en lipoprotéines non-HDL (Wilson et al., 1998). Le rôle des PL dans les mécanismes mis en jeu ne sont pas clairement élucidés. L'apport alimentaire de PL pourrait :

- Réduire l'absorption intestinale du cholestérol, par une interaction directe avec la membrane entérocytaire ou avec des transporteurs spécifiques et/ou une action indirecte sur la formation de micelles de grande taille limitant l'accessibilité du cholestérol pour son absorption (Jiang et al., 2001 ; Noh and Koo, 2003 ; Cohn et al., 2008, 2010).
- Influencer l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines. En l'occurrence, l'apport de PC semble augmenter l'activité de la LCAT et, à l'inverse, diminuer l'activité de l'acyl-CoA cholestérol acyl transférase (ACAT)

(LeBlanc et al., 2003 ; Cohn et al., 2008 ; Küllenberg et al., 2012). Ainsi, l'apport de PL favoriserait le catabolisme des lipoprotéines. De plus, près de 20% des PL alimentaires seraient absorbés sans hydrolyse préalable pour être incorporés dans des HDL, influençant directement le profil en lipoprotéines et, par conséquent, le devenir du cholestérol et des AG véhiculés (Zierenberg and Grundy, 1982 ; Boucrot, 1983).

3.2. Etude de l'accrétion tissulaire des AGPI-LC n-3

3.2.1. Le foie et le plasma, organes clés du métabolisme lipidique

3.2.1.1. Le foie

Le foie est l'organe clé intervenant dans le métabolisme et l'homéostasie lipidique chez l'homme. Il participe à la régulation du transport des lipides plasmatiques mis à disposition pour l'ensemble des tissus de l'organisme.

Par rapport au groupe contrôle, seul le régime supplémenté en PL marins ($TG_{veg}+PL_{n-3}$) conduit à une augmentation significative de la concentration hépatique en lipides totaux (+25%, $p=0,05$) (**Tableau 32**) et, plus précisément, en EC (+61% ; $p<0,01$) et en TG (+43% ; $p=0,04$) (**Tableau 33**). L'apport d'huiles de poisson (TG_{n-3}) augmente uniquement la teneur hépatique en TG (+44%, $p=0,02$) (**Tableau 33**). En revanche, la supplémentation des huiles de poisson en lécithine de soja ($TG_{n-3}+PL_{veg}$) ne modifie pas de manière significative les concentrations en lipides totaux et des fractions lipidiques par rapport au régime témoin (TG_{veg}).

Les proportions d'EPA et de DHA dans les lipides totaux du foie sont significativement augmentées ($p<0,01$) dans les groupes enrichis en lipides marins (TG_{n-3} , $TG_{n-3}+PL_{veg}$ et $TG_{veg}+PL_{n-3}$), et ce quelle que soit leur forme moléculaire de vectorisation. Cet enrichissement en AGPI-LC n-3 se retrouve dans l'ensemble des fractions lipidiques analysées (PL, TG et EC ; $p<0,01$) mais fait apparaître des variations selon la nature des AG et la fraction considérées. Ainsi, pour l'EPA, l'enrichissement est plus important dans la fraction PL (facteur 6 à 8) que dans la fraction EC (facteur 4 à 5) et TG (facteur 2 à 3). A l'inverse, pour le DHA, son incorporation se fait préférentiellement dans les fractions TG (facteur 5 à 8) et EC (facteur 4 à 5) plutôt que dans la fraction PL (facteur 1,7 à 1,8).

La supplémentation des huiles de poisson en lécithine de soja (**TG_{n-3}+PL_{veg}**) promeut l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les lipides hépatiques (+21% par rapport au groupe **TG_{n-3}** et +40% par rapport au groupe **TG_{veg}+PL_{n-3}**). Ce plus fort enrichissement s'effectue spécifiquement dans la fraction PL pour l'EPA et dans la fraction TG pour le DHA. A noter que, bien qu'il ne représente qu'un AG mineur (<1%), le taux en ALA tend à augmenter dans les fractions TG et EC du foie dans les groupes enrichis en lipides marins (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}** ; $p < 0,05$).

Tableau 32 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux du foie chez le rat soumis à 8 semaines de régime¹

	TG_{veg}	TG_{n-3}	TG_{n-3}+PL_{veg}	TG_{veg}+PL_{n-3}
<i>Acides gras (moles%)</i>				
Σ AGS	29,6 ± 1,2^{2a}	31,4 ± 2,0^a	30,5 ± 1,6^a	29,8 ± 1,8^a
16:0	20,1 ± 0,5 ^a	22,7 ± 1,4 ^b	21,5 ± 1,5 ^{ab}	21,4 ± 0,9 ^{ab}
18:0	8,0 ± 1,3 ^a	6,9 ± 0,9 ^a	7,4 ± 0,9 ^a	6,6 ± 1,7 ^a
Σ AGMI	48,7 ± 3,6^a	47,8 ± 2,7^a	47,0 ± 3,9^a	51,6 ± 2,9^a
18:1 n-9	34,1 ± 3,1 ^a	32,0 ± 3,6 ^a	32,6 ± 3,6 ^a	34,8 ± 3,0 ^a
18:1 n-7	6,4 ± 0,7 ^a	6,2 ± 0,7 ^a	6,5 ± 0,8 ^a	6,2 ± 1,1 ^a
Σ AGPI	21,4 ± 2,7^a	20,6 ± 1,6^a	22,3 ± 3,3^a	18,7 ± 2,2^a
Σ AGPI n-6	18,5 ± 2,3^a	15,2 ± 0,9^b	15,9 ± 2,2^b	14,1 ± 1,8^b
18:2 n-6	6,8 ± 1,0 ^a	8,1 ± 0,7 ^a	8,1 ± 1,6 ^a	8,1 ± 1,1 ^a
20:4 n-6	9,7 ± 1,2 ^a	5,8 ± 0,8 ^b	6,3 ± 0,8 ^b	5,4 ± 1,6 ^b
Σ AGPI n-3	2,7 ± 0,4^a	5,2 ± 0,9^{bc}	6,3 ± 1,3^b	4,5 ± 0,6^c
18:3 n-3	0,1 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,1 ^a
20:5 n-3	0,2 ± 0,0 ^a	0,9 ± 0,2 ^b	1,1 ± 0,1 ^c	0,8 ± 0,1 ^b
22:6 n-3	2,1 ± 0,4 ^a	3,6 ± 0,7 ^{bc}	4,4 ± 0,9 ^c	3,1 ± 0,6 ^b
n-6/n-3	7,1 ± 0,7 ^a	3,0 ± 0,5 ^b	2,6 ± 0,3 ^b	3,1 ± 0,4 ^b
Teneur en AG (mg/g de foie)	45,1 ± 4,2^a	51,2 ± 8,4^{ab}	46,1 ± 7,6^a	56,3 ± 9,2^b

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : **TG_{veg}** : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; **TG_{n-3}** : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; **TG_{n-3}+PL_{veg}** : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; **TG_{veg}+PL_{n-3}** : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; VLDL : lipoprotéines de très faible densité.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type, n=10 rats/groupe.

Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes ($p < 0,05$), ANOVA à 1 facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Tableau 33 : Profil en acides gras (moles%) des fractions phospholipides, triglycérides et esters de cholestérol du foie, chez le rat soumis à 8 semaines de régime¹

	Phospholipides				Triglycérides				Esters de cholestérol			
	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
<i>Acides gras (moles%)</i>												
Σ AGS	36,9 ± 1,2^{2a}	37,3 ± 1,2^{ab}	37,0 ± 1,7^a	38,7 ± 1,1^b	28,4 ± 1,4^a	30,3 ± 2,3^a	28,7 ± 1,7^a	29,1 ± 1,6^a	21,1 ± 2,3^a	23,2 ± 2,3^a	23,6 ± 2,8^a	21,4 ± 1,2^a
16:0	16,6 ± 0,7 ^a	18,0 ± 0,8 ^b	18,3 ± 1,2 ^b	18,1 ± 0,8 ^b	25,4 ± 1,4 ^a	26,6 ± 1,8 ^a	25,7 ± 1,7 ^a	25,9 ± 1,4 ^a	17,4 ± 1,7 ^a	19,0 ± 2,0 ^a	19,5 ± 2,0 ^a	17,8 ± 1,0 ^a
18:0	18,9 ± 1,6 ^a	17,9 ± 1,0 ^a	17,2 ± 2,2 ^a	18,8 ± 1,0 ^a	1,2 ± 0,2 ^a	1,6 ± 0,5 ^a	1,3 ± 0,3 ^a	1,5 ± 0,5 ^a	1,8 ± 0,3 ^a	1,8 ± 0,3 ^a	1,9 ± 0,5 ^a	1,5 ± 0,3 ^a
Σ AGMI	18,5 ± 1,8^{ab}	16,5 ± 1,6^a	19,6 ± 2,5^b	17,0 ± 1,6^a	64,8 ± 0,9^a	59,9 ± 1,4^b	62,6 ± 2,0^c	61,9 ± 2,0^c	73,1 ± 2,4^a	70,0 ± 2,1^b	70,2 ± 3,4^{ab}	72,5 ± 1,2^{ab}
18:1 n-9	9,2 ± 0,8 ^{ac}	7,8 ± 0,5 ^{bc}	9,9 ± 1,1 ^a	8,4 ± 0,5 ^c	49,4 ± 1,5 ^a	43,3 ± 2,2 ^b	47,5 ± 2,4 ^{ac}	46,2 ± 1,4 ^c	49,0 ± 2,1 ^a	43,5 ± 4,1 ^b	47,2 ± 3,2 ^a	46,7 ± 3,4 ^{ab}
Σ AGPI	44,4 ± 0,8^a	46,1 ± 1,3^b	43,3 ± 1,3^a	44,6 ± 1,3^{ab}	6,6 ± 1,3^a	9,2 ± 1,4^b	8,6 ± 2,6^{ab}	8,8 ± 1,8^{ab}	5,4 ± 0,7^a	6,7 ± 0,3^b	6,1 ± 1,2^{ab}	5,7 ± 0,6^a
Σ AGPI n-6	38,0 ± 0,8^a	33,6 ± 1,9^b	31,0 ± 1,8^c	33,1 ± 1,9^{bc}	6,1 ± 1,2^a	7,5 ± 1,3^a	6,2 ± 1,8^a	7,1 ± 1,4^a	5,0 ± 0,6^a	5,2 ± 0,2^a	4,7 ± 1,0^a	4,5 ± 0,5^a
18:2 n-6	10,1 ± 1,0 ^a	12,8 ± 1,3 ^b	12,6 ± 1,5 ^b	13,6 ± 1,3 ^b	5,1 ± 1,1 ^a	6,8 ± 1,1 ^b	5,6 ± 1,6 ^{ab}	6,6 ± 1,2 ^{ab}	3,3 ± 0,4 ^a	3,9 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,7 ^a	3,6 ± 0,4 ^a
20:4 n-6	23,9 ± 1,4 ^a	17,6 ± 1,4 ^b	15,4 ± 1,4 ^c	16,4 ± 1,4 ^{bc}	0,4 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,1 ^b	1,2 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,2 ^{bc}	1,0 ± 0,3 ^{ab}	0,7 ± 0,1 ^c
Σ AGPI n-3	5,8 ± 0,4^a	12,1 ± 1,1^b	11,9 ± 1,0^b	11,0 ± 1,1^b	0,4 ± 0,1^a	1,9 ± 0,4^{bc}	2,3 ± 1,0^b	1,5 ± 0,3^c	0,4 ± 0,1^a	1,4 ± 0,2^b	1,4 ± 0,2^{bc}	1,2 ± 0,2^c
18:3 n-3	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^{ab}	0,0 ± 0,0 ^{ab}	0,2 ± 0,0 ^{ac}	0,4 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,1 ^{cd}	0,3 ± 0,1 ^d	0,2 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1 ^c
20:5 n-3	0,3 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,2 ^b	2,4 ± 0,6 ^c	1,9 ± 0,2 ^{bc}	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,1 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1 ^{bc}	0,5 ± 0,1 ^c	0,4 ± 0,1 ^b
22:6 n-3	5,1 ± 0,4 ^a	9,4 ± 0,9 ^b	8,8 ± 0,9 ^b	8,5 ± 0,9 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,2 ^b	1,5 ± 0,6 ^c	0,9 ± 0,2 ^b	0,1 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^{bc}	0,5 ± 0,1 ^c	0,4 ± 0,1 ^b
n-6/n-3	6,6 ± 0,5 ^a	2,8 ± 0,4 ^b	2,6 ± 0,3 ^b	3,1 ± 0,4 ^b	14,6 ± 2,2 ^a	3,8 ± 0,9 ^b	3,0 ± 0,9 ^b	4,5 ± 0,9 ^b	15,0 ± 6,5 ^a	3,7 ± 0,8 ^b	3,5 ± 0,6 ^b	3,9 ± 0,7 ^b
Teneur en AG (mg/ g de foie)	17,5 ± 1,0^{ab}	16,2 ± 1,3^a	17,0 ± 0,8^{ab}	17,6 ± 1,3^b	16,8 ± 2,1^a	24,2 ± 6,6^b	18,0 ± 3,9^{ab}	24,0 ± 7,0^b	10,7 ± 4,2^a	11,6 ± 3,6^a	9,0 ± 4,1^a	17,2 ± 4,2^b

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; VLDL : lipoprotéines de très faible densité.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type, n=10 rats/groupe.

Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA à 1 facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey.

L'enrichissement en AGPI-LC n-3 observé dans les groupes **TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}** s'accompagne, de façon concomitante, d'une diminution de la proportion en AGPI n-6 de près de 16% dans les lipides totaux. Notamment, dans la fraction PL, les taux en ARA sont réduits de près d'un tiers alors que ceux en LA sont augmentés d'environ 30%.

De l'ensemble de ces données, il résulte une diminution du ratio n-6/n-3 d'un facteur 2 dans les lipides hépatiques et dans la fraction PL, et d'un facteur 4 dans les fractions TG et EC. Quel que soit le groupe enrichi en lipides marins (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**), ce ratio est inférieur à 5 dans les lipides hépatiques et dans les fractions analysées (PL, TG, EC).

En résumé, les régimes influencent différemment le profil lipidique du foie. L'apport de PL marins augmente la teneur en TG et en EC alors que l'apport d'huiles de poisson accroît uniquement la concentration en TG. La supplémentation des huiles de poisson en lécithine de soja permet de ramener la teneur en TG à celle du régime témoin et semble, donc, réguler la teneur hépatique en lipides. L'enrichissement des régimes en AGPI-LC n-3 se répercute sur l'ensemble des fractions lipidiques du foie mais de façon différente selon la nature des lipides du régime. D'une part, la supplémentation des huiles de poisson en lécithine de soja promeut l'accrétion hépatique des AGPI-LC n-3 vectorisés sous forme de TG. D'autre part, la vectorisation des AGPI-LC n-3 sous forme de TG favorise leur accrétion dans les lipides hépatiques par rapport à la forme de PL.

3.2.1.2. *Le plasma*

Le profil en acides gras du compartiment plasmatique est présenté dans le **Tableau 34** pour les lipides totaux et dans le **Tableau 35** pour les fractions lipidiques. Les teneurs en lipides totaux sont similaires quelle que soit la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (**Tableau 34**). Les teneurs plasmatiques en PL et TG sont du même ordre de grandeur entre les groupes (**Tableau 35**). En revanche, l'apport d'huiles de poisson, supplémentées ou non en PL (**TG_{n-3}** et **TG_{n-3}+PL_{veg}**), diminue d'un tiers environ ($p < 0,05$) la teneur en EC. Ces données rejoignent en partie celles observées au niveau des paramètres lipidiques du plasma où l'apport d'AGPI-LC n-3 sous forme de TG diminue la teneur en EC des LDL/VLDL, sans modification de la triglycéridémie (**Tableau 31**).

Tableau 34 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux du plasma chez le rat soumis à 8 semaines de régime¹

	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3+PLveg}	TG _{veg+PLn-3}
	<i>Acides gras (moles%)</i>			
Σ AGS	25,8 ± 0,8^{2a}	28,7 ± 1,2^b	27,3 ± 1,6^b	28,3 ± 1,3^b
16:0	17,4 ± 0,5 ^a	20,3 ± 1,2 ^b	19,3 ± 0,9 ^b	19,3 ± 1,0 ^b
18:0	6,8 ± 1,0 ^a	6,4 ± 0,9 ^a	6,1 ± 1,3 ^a	7,1 ± 1,0 ^a
Σ AGMI	48,6 ± 3,5^a	42,4 ± 3,3^b	47,8 ± 2,9^{ac}	44,0 ± 2,9^{bc}
18:1 n-9	35,6 ± 2,5 ^a	29,8 ± 1,8 ^b	34,9 ± 1,9 ^{ac}	31,8 ± 1,5 ^{bc}
18:1 n-7	5,6 ± 0,7 ^a	4,8 ± 0,7 ^a	5,3 ± 0,7 ^a	4,8 ± 0,8 ^a
Σ AGPI	25,4 ± 2,9^a	28,8 ± 2,8^b	24,9 ± 2,1^a	27,4 ± 2,3^{ab}
Σ AGPI n-6	23,0 ± 2,6^a	21,9 ± 2,6^a	17,9 ± 1,9^b	21,3 ± 2,2^a
18:2 n-6	9,2 ± 0,8 ^a	11,6 ± 1,1 ^b	10,3 ± 1,4 ^{ac}	11,3 ± 1,2 ^{bc}
20:4 n-6	11,6 ± 2,3 ^a	8,6 ± 1,9 ^b	6,6 ± 0,6 ^b	8,5 ± 1,5 ^b
Σ AGPI n-3	2,0 ± 0,3^a	6,6 ± 0,6^b	6,8 ± 0,8^b	5,8 ± 0,7^c
18:3 n-3	0,2 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,1 ^{ac}	0,4 ± 0,1 ^{bc}
20:5 n-3	0,4 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,2 ^b	1,9 ± 0,5 ^b	1,6 ± 0,2 ^b
22:6 n-3	1,3 ± 0,2 ^a	3,8 ± 0,4 ^b	4,0 ± 0,4 ^b	3,5 ± 0,6 ^b
n-6/n-3	11,3 ± 1,2 ^a	3,3 ± 0,5 ^b	2,8 ± 0,4 ^b	3,7 ± 0,5 ^b
Teneur en AG (mg/mL de plasma)	2,5 ± 0,6^a	2,3 ± 0,7^a	2,3 ± 0,3^a	2,0 ± 0,6^a

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3+PLveg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg+PLn-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; VLDL : lipoprotéines de très faible densité.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type, n=10 rats/groupe.

Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA à 1 facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Tableau 35 : Profil en acides gras (moles%) des fractions phospholipides, triglycérides et esters de cholestérol du plasma, chez le rat soumis à 8 semaines de régime¹

	Phospholipides				Triglycérides				Esters de cholestérol			
	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
	<i>Acides gras (moles%)</i>											
Σ AGS	41,8 ± 1,5^{2a}	41,9 ± 1,8^a	39,9 ± 1,7^a	41,9 ± 2,0^a	25,8 ± 0,9^a	26,8 ± 1,3^a	26,3 ± 1,6^a	27,3 ± 1,4^a	15,9 ± 1,1^a	16,9 ± 1,1^{ab}	17,2 ± 1,8^{ab}	17,5 ± 0,6^b
16:0	20,0 ± 1,1 ^a	21,1 ± 1,0 ^{ab}	20,4 ± 1,3 ^{ab}	21,6 ± 1,0 ^b	21,9 ± 0,9 ^a	22,2 ± 1,2 ^a	21,8 ± 1,3 ^a	22,9 ± 1,6 ^a	12,5 ± 0,9 ^a	13,3 ± 1,0 ^a	12,9 ± 1,3 ^a	13,5 ± 0,2 ^a
18:0	20,7 ± 2,6 ^a	19,2 ± 1,6 ^{ab}	17,8 ± 2,5 ^b	18,5 ± 1,9 ^{ab}	2,1 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,5 ^a	2,5 ± 0,2 ^a	2,3 ± 0,4 ^a	2,0 ± 0,8 ^a	1,9 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,5 ^a	1,8 ± 0,4 ^a
Σ AGMI	19,8 ± 1,8^{ab}	17,5 ± 1,5^a	20,8 ± 2,7^b	18,1 ± 2,5^a	60,2 ± 2,8^a	54,6 ± 2,3^b	57,9 ± 2,4^a	54,7 ± 2,7^b	58,0 ± 4,4^a	54,0 ± 4,9^a	53,2 ± 10,0^a	52,8 ± 6,6^a
18:1 n-9	11,1 ± 0,7 ^a	9,8 ± 0,5 ^b	11,9 ± 1,4 ^a	9,7 ± 0,9 ^b	46,8 ± 1,9 ^a	42,4 ± 1,1 ^b	45,3 ± 2,0 ^a	42,0 ± 1,4 ^b	40,8 ± 4,1 ^a	37,4 ± 6,4 ^a	37,5 ± 7,4 ^a	34,7 ± 3,0 ^a
Σ AGPI	38,1 ± 1,0^a	40,4 ± 1,0^b	39,1 ± 1,6^{ab}	39,8 ± 1,1^b	12,9 ± 1,9^a	18,5 ± 2,2^b	15,1 ± 1,3^a	18,0 ± 2,1^b	25,4 ± 5,2^a	29,0 ± 5,5^a	29,4 ± 10,7^a	29,5 ± 6,5^a
Σ AGPI n-6	34,4 ± 0,8^a	33,0 ± 1,2^{ab}	30,8 ± 1,6^c	32,0 ± 1,2^{bc}	10,9 ± 1,5^a	11,6 ± 1,3^a	8,7 ± 1,8^b	10,9 ± 1,5^a	24,2 ± 5,0^a	25,0 ± 4,7^a	24,6 ± 9,3^a	25,4 ± 6,1^a
18:2 n-6	12,8 ± 0,7 ^a	16,3 ± 1,5 ^b	16,1 ± 1,4 ^b	15,8 ± 1,1 ^b	7,9 ± 1,0 ^a	9,7 ± 1,1 ^b	7,2 ± 1,7 ^a	9,2 ± 1,4 ^a	6,9 ± 0,9 ^a	9,9 ± 1,3 ^b	9,7 ± 2,5 ^b	9,8 ± 1,8 ^b
20:4 n-6	18,5 ± 1,6 ^a	13,8 ± 1,5 ^b	11,5 ± 1,1 ^b	13,3 ± 1,9 ^b	1,4 ± 0,6 ^a	0,8 ± 0,2 ^b	0,8 ± 0,3 ^b	0,8 ± 0,1 ^b	16,0 ± 4,2 ^a	14,2 ± 3,5 ^a	13,9 ± 6,9 ^a	14,6 ± 4,4 ^a
Σ AGPI n-3	3,1 ± 0,3^a	6,2 ± 0,9^b	7,6 ± 0,7^b	7,2 ± 0,5^b	1,7 ± 0,4^a	6,7 ± 1,2^b	6,6 ± 0,8^b	6,8 ± 1,0^b	1,0 ± 0,1^a	3,8 ± 1,0^b	4,7 ± 1,5^b	4,0 ± 0,5^b
18:3 n-3	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,1 ^c	0,3 ± 0,1 ^{bc}
20:5 n-3	0,2 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,2 ^b	1,7 ± 0,2 ^c	1,4 ± 0,2 ^{bc}	0,2 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,3 ^b	1,0 ± 0,2 ^b	1,0 ± 0,2 ^b	0,4 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,8 ^b	3,1 ± 1,3 ^b	2,5 ± 0,4 ^b
22:6 n-3	2,5 ± 0,2 ^a	5,0 ± 0,8 ^b	5,3 ± 0,7 ^b	5,3 ± 0,5 ^b	0,6 ± 0,2 ^a	4,2 ± 1,0 ^b	4,2 ± 0,6 ^b	4,0 ± 0,8 ^b	0,3 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,1 ^b	1,0 ± 0,3 ^b	1,0 ± 0,2 ^b
n-6/n-3	11,2 ± 1,1 ^a	4,9 ± 0,7 ^b	4,1 ± 0,5 ^b	4,4 ± 0,4 ^b	6,6 ± 1,0 ^a	1,8 ± 0,3 ^b	1,3 ± 0,3 ^b	1,7 ± 0,3 ^b	27,0 ± 8,4 ^a	6,6 ± 0,9 ^b	5,3 ± 1,0 ^b	6,3 ± 1,0 ^b
Teneur en AG (mg/ g de foie)	0,7 ± 0,1^a	0,5 ± 0,2^a	0,6 ± 0,1^a	0,5 ± 0,1^a	1,0 ± 0,4^a	1,8 ± 1,5^a	1,0 ± 0,3^a	2,1 ± 0,8^a	0,8 ± 0,2^a	0,6 ± 0,1^{bc}	0,5 ± 0,1^c	0,8 ± 0,2^{ab}

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; VLDL : lipoprotéines de très faible densité.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type, n=10 rats/groupe.

Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA à 1 facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Un régime enrichi en AGPI-LC n-3 améliore d'un facteur 3 à 4 ($p < 0,01$) le statut en EPA et en DHA des lipides totaux du plasma, et ce indépendamment de leur forme moléculaire de vectorisation (**Tableau 34**). Cet enrichissement se répercute sur l'ensemble des fractions analysées (PL, TG et EC ; $p < 0,01$; **Tableau 35**). L'augmentation des taux en EPA s'effectue de façon plus importante dans les fractions PL (facteur 7 à 9) et EC (facteur 6 à 8) que dans la fraction TG (facteur 5). L'enrichissement en DHA, quant à lui, est plus important dans la fraction TG (facteur 7) que dans les fractions PL et EC (facteur 2 et 3, respectivement). Ces données sont en accord avec les études chez l'homme où l'apport d'huile de poisson se traduit par des enrichissements différents selon la fraction lipidique et l'AG considérés : l'EPA étant principalement incorporé dans les EC et les PL alors que le DHA enrichit préférentiellement les PL et TG (Vidgren et al., 1997 ; Zuijdgeest-van Leeuwen et al., 1999 ; Browning et al., 2012). La supplémentation des huiles de poisson en lécithine de soja favorise l'incorporation de l'EPA dans la fraction PL. Dans les autres fractions lipidiques, l'accrétion plasmatique des AGPI-LC n-3 s'effectue de façon similaire quelle que soit la nature du régime (*i.e.* présence ou absence de PL) et la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (TG vs PL). Comme dans le cas du foie, bien qu'il soit peu représenté ($< 1\%$), le taux en ALA tend à augmenter dans les lipides plasmatiques et notamment dans les fractions TG et EC ($p < 0,05$) des groupes de rats soumis aux régimes enrichis en lipides marins (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**).

L'apport nutritionnel d'AGPI-LC n-3 (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**) réduit d'un tiers la proportion en ARA dans les lipides plasmatiques, et notamment dans les fractions TG (-43% ; $p < 0,03$) et PL (-30% ; $p < 0,01$). Les taux en LA sont augmentés de près d'un quart dans les lipides plasmatiques ($p < 0,01$) et plus particulièrement dans les fractions EC (+40% ; $p < 0,01$) et PL (+25% ; $p < 0,01$). Ces données sont cohérentes avec celles observées au niveau du foie.

L'augmentation des taux en AGPI n-3 associée à la diminution des AGPI n-6 induit une diminution du ratio n-6/n-3 d'un facteur 3 dans les lipides plasmatiques, d'un facteur 2 dans la fraction PL et d'un facteur 4 dans les fractions TG et EC. Quel que soit le groupe enrichi en lipides marins (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**), ce ratio est inférieur à 7 dans les lipides plasmatiques et dans les fractions analysées (PL, TG, EC).

En résumé, l'apport d'huiles de poisson supplémentées ou non en lécithine de soja (TG_{n-3} et $TG_{n-3}+PL_{veg}$) réduit la teneur plasmatique en EC, alors que l'utilisation de PL marins ($TG_{veg}+PL_{n-3}$) ne modifie pas le profil lipidique du plasma. L'enrichissement des fractions lipidiques en AGPI-LC n-3 est effectif dans l'ensemble des fractions analysées, sans effet significatif de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (TG vs PL).

3.2.1.3. Discussion

Il est bien admis que le profil en AG des tissus (*i.e.* plasma, foie, globules rouges, cœur, muscle, reins, ...) est intimement lié à la composition des régimes alimentaires (Moussa et al., 1996 ; Valenzuela et al., 2005 ; Igarashi et al., 2007 ; Rossmeisl et al., 2012). Ainsi, en accord avec les données de la littérature, l'apport de régimes enrichis en AGPI-LC n-3 permet d'améliorer le statut hépatique et plasmatique en EPA et en DHA.

La supplémentation des huiles de poissons en lécithine de soja permet de réguler les taux de TG hépatiques et plasmatiques tout en favorisant l'accrétion en AGPI-LC n-3 dans le foie. Comme évoqué précédemment, l'apport de PL pourrait moduler le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques et, par ce biais, influencer la biodisponibilité des AG véhiculés. Les données de la littérature concernant les effets d'une supplémentation en lécithine sur l'accrétion tissulaire des AGPI-LC n-3 sont contradictoires. Par exemple, l'addition de 0,4 à 1,0% de lécithine de soja à la ration alimentaire augmente l'accrétion plasmatique en AGPI-LC n-3 chez le rat, après 2 à 3 semaines de régimes expérimentaux (van Wijk et al., 2016). A l'inverse, l'ajout de 1,7% de PL d'œuf à un régime riche en AGPI-LC n-3 (hyperlipidique), ne modifie pas la biodisponibilité hépatique et plasmatique de l'EPA et du DHA chez le rat, après 6 semaines. (Che et al., 2018).

L'accrétion hépatique des AGPI-LC n-3 est favorisée lorsqu'ils sont vectorisés par des TG marins comparativement à des PL marins ($TG_{veg}+PL_{n-3}$ vs $TG_{veg}+PL_{n-3}$). Les quelques données de la littérature reportent des résultats discordants vis-à-vis de l'accrétion tissulaire des AGPI-LC n-3, où la forme TG marins est, soit moins efficace (Valenzuela et al., 2005 ; Liu et al., 2014), soit aussi efficace (Rossmeisl et al., 2012 ; Tang et al., 2012 ; Ding et al., 2013) ou soit plus efficace (Song et al., 2000 ; Song and Miyazawa, 2001 ; Wu et al., 2017 ; Che et al., 2018) que la forme PL marins.

Curieusement, les observations faites au niveau hépatique ne sont pas confirmées au niveau plasmatique, où aucun effet de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 n'a pu être établi. Chez l'homme, l'accrétion des AGPI-LC n-3 augmente de façon logarithmique au cours de la durée de supplémentation jusqu'à atteindre un plateau, dont la cinétique et l'amplitude dépendent des quantités ingérées, de la nature des AG mais aussi des tissus et des fractions lipidiques considérées (Katan et al., 1997 ; Arterburn et al., 2006 ; Cao et al., 2006). Or, le plasma est le compartiment dont la composition se modifie le plus rapidement. Ainsi, comme la quantité d'AGPI-LC n-3 est identique pour les différents régimes, il est possible que l'accrétion plasmatique des AGPI-LC n-3 ait atteint un état d'équilibre chez les rats de sorte qu'il n'est plus possible d'observer un effet de la forme moléculaire de vectorisation dans ce tissu après 8 semaines de régime.

D'un point de vue de la bioconversion des AG, nous avons montré, en accord avec les données de la littérature, que l'apport nutritionnel d'AGPI-LC n-3 exerce un effet régulateur inhibiteur sur les voies enzymatiques de bioconversion (désaturases et élongases) communes aux deux familles d'AGPI et notamment sur la $\Delta 6$ -désaturase (Raz et al., 1998). Ainsi, l'apport d'AGPI-LC n-3 favorise l'accumulation hépatique et plasmatique du LA et de l'ALA qui ne sont pas utilisés pour la synthèse de dérivés à longue chaîne. On assiste notamment à une inhibition de la synthèse d'ARA à partir du LA. Compte tenu que l'ARA est précurseur de métabolites pro-inflammatoires (Cf. Chapitre 1, 1.2.2.), sa réduction dans le tissu hépatique peut s'avérer intéressante dans le cadre de la prévention de processus inflammatoires. Cette accrétion des AGPI-LC n-3, associée à la régulation de la bioconversion des AG précurseurs, permet de diminuer le ratio n-6/n-3 dans l'ensemble des lipides hépatiques et plasmatiques indépendamment de la forme de vectorisation des AG.

3.2.2. Les globules rouges, marqueurs de l'incorporation membranaire des AGPI-LC n-3

Il est admis que les AGPI-LC s'incorporent préférentiellement dans les PL, constituants structuraux et fonctionnels majeurs des membranes cellulaires (Rode et al., 1982). L'enrichissement en AGPI-LC dans les PL promeut la fluidité et la flexibilité des membranes biologiques modulant ainsi l'activité des protéines associées. Compte-tenu de leur composition lipidique (près de 50% de PL), les érythrocytes sont considérés comme un biomarqueur fiable de l'incorporation membranaire des AGPI-LC, et notamment du DHA

(Virtanen et al., 1998 ; Kuratko and Salem, 2009 ; Serra-Majem et al., 2012 ; Létondor et al., 2014).

Le **Tableau 36** présente le profil en AG des lipides totaux des globules rouges (GR) pour les différents groupes de rats. De façon générale, l'enrichissement des régimes en AGPI-LC n-3 améliore le statut des GR en EPA et en DHA ($p < 0,01$). Plus précisément, le taux en EPA est augmenté d'un facteur proche de 5 et celui en DHA d'un facteur 2 ($p < 0,01$). En outre, l'incorporation de l'EPA dans les GR semble être très légèrement favorisée ($p < 0,03$) dès lors que les huiles marines sont supplémentées en lécithine de soja (**TG_{n-3}+PL_{veg}** vs **TG_{n-3}**), en comparaison des deux autres groupes expérimentaux (**TG_{n-3}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**).

Tableau 36 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux des globules rouges, chez le rat soumis à 8 semaines de régime¹

	TG_{veg}	TG_{n-3}	TG_{n-3}+PL_{veg}	TG_{veg}+PL_{n-3}
<i>Acides gras (moles%)</i>				
Σ AGS	44,0 ± 0,7^{2a}	45,1 ± 0,9^a	44,7 ± 0,7^a	45,2 ± 2,2^a
16:0	26,0 ± 0,7 ^a	27,0 ± 0,6 ^{ab}	26,8 ± 0,9 ^{ab}	27,1 ± 1,1 ^b
18:0	11,0 ± 0,8 ^a	10,7 ± 0,9 ^a	10,5 ± 1,0 ^a	10,9 ± 0,9 ^a
Σ AGMI	21,8 ± 0,9^a	21,3 ± 0,9^a	21,7 ± 1,3^a	20,1 ± 2,6^a
18:1 n-9	10,4 ± 0,7 ^a	10,6 ± 0,9 ^a	10,6 ± 0,9 ^a	9,4 ± 3,3 ^a
18:1 n-7	4,4 ± 0,3 ^a	4,2 ± 0,4 ^a	4,3 ± 0,2 ^a	4,3 ± 0,5 ^a
Σ AGPI	34,0 ± 0,5^a	33,5 ± 0,7^a	33,5 ± 1,0^a	34,6 ± 1,4^a
Σ AGPI n-6	30,5 ± 0,5^a	26,2 ± 0,6^{bc}	25,9 ± 1,0^b	27,0 ± 0,9^c
18:2 n-6	5,9 ± 0,3 ^a	6,9 ± 0,3 ^b	6,9 ± 0,6 ^b	7,5 ± 0,5 ^c
20:4 n-6	21,4 ± 0,7 ^a	17,4 ± 0,6 ^b	17,1 ± 1,0 ^b	17,6 ± 0,6 ^b
Σ AGPI n-3	3,1 ± 0,2^a	7,0 ± 0,6^b	7,3 ± 0,5^b	7,2 ± 0,6^b
18:3 n-3	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,1 ^a
20:5 n-3	0,3 ± 0,0 ^a	1,4 ± 0,1 ^b	1,6 ± 0,2 ^c	1,4 ± 0,1 ^b
22:6 n-3	1,9 ± 0,2 ^a	3,9 ± 0,4 ^b	4,0 ± 0,4 ^b	4,2 ± 0,4 ^b
n-6/n-3	9,8 ± 0,8 ^a	3,8 ± 0,3 ^b	3,6 ± 0,3 ^b	3,8 ± 0,2 ^b

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : **TG_{veg}** : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; **TG_{n-3}** : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; **TG_{n-3}+PL_{veg}** : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; **TG_{veg}+PL_{n-3}** : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; VLDL : lipoprotéines de très faible densité.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type, n=10 rats/groupe.

Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes ($p < 0,05$), ANOVA à 1 facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Comme précédemment observé au niveau hépatique et plasmatique, en parallèle de l'enrichissement en AGPI-LC n-3, une réduction de 12 à 15% est mesurée au niveau des taux en AGPI n-6 ($p < 0,01$). La diminution du taux d'ARA dans les GR (environ -19% ; $p < 0,01$) pourrait être intéressante dans le cadre de la prévention des processus d'inflammation et de l'amélioration des fonctions endothéliales et plaquettaires. De façon concomitante, la proportion du LA augmente de 17 à 27% dans les groupes **TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**.

Alors que les données de la littérature rapportent que l'enrichissement des GR en AGPI-LC n-3 est plus efficace lorsqu'ils sont vectorisés par des PL plutôt que par des TG (Valenzuela et al., 2005 ; Liu et al., 2014 ; Destailats et al., 2018), nos données ne montrent aucun effet sur l'accrétion de ces acides gras, en fonction de la forme moléculaire de vectorisation (**TG_{n-3}+PL_{veg}** vs **TG_{veg}+PL_{n-3}**), ou de la présence de lécithine de soja (**TG_{n-3}** vs **TG_{n-3}+PL_{veg}**) à la ration alimentaire. Ainsi, dans nos conditions expérimentales la composition membranaire des GR reflète uniquement la composition en acides gras des régimes.

3.2.3. Le cerveau et la rétine : des tissus cibles pour les AGPI-LC n-3

Le DHA représente près de 40% et 60% des AGPI du cerveau et de la rétine, respectivement, alors que l'EPA s'y trouve en proportion très faible (<1 moles% des AG totaux) (Reichlmayr-Lais et al., 1994 ; Acar et al., 2006 ; Bretillon et al., 2008b ; Schnebelen et al., 2009). Incorporé dans les PL membranaires, le DHA modifie les propriétés structurales des membranes cellulaires et serait impliqué dans le développement des fonctions cérébrales et de l'acuité visuelle (Querques et al., 2011 ; Uauy et al., 2001 ; Lauritzen et al., 2016). De plus, le cerveau et la rétine sont des organes particulièrement riches en PL, caractérisés par un profil en PL spécifique. Les lipides totaux du cerveau et de la rétine sont donc analysés non seulement en termes de profil en AG mais aussi d'espèces moléculaires de PL.

3.2.3.1. Le cerveau

L'enrichissement des régimes en AGPI-LC n-3 (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**) augmente d'environ 7% la teneur en AG totaux du cerveau (**Tableau 37**). Cet effet est significatif en présence de PL ($p < 0,03$; +8%), qu'ils vectorisent ou non les AGPI-LC n-3 (**TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**). Les AGPI représentent un quart des AG totaux, avec une répartition équivalente entre les AG de la série n-6 et de la série n-3 (dont 97% de DHA). L'apport d'huiles de poisson, supplémentées ou non par de la lécithine de soja (**TG_{n-3}** et **TG_{n-3}+PL_{veg}**), est sans

effet sur les taux en AGPI n-3. Seul l'apport de PL marins ($TG_{veg}+PL_{n-3}$), améliore de 8% ($p=0,02$) la proportion relative en AGPI n-3 en augmentant celle du DHA ($p=0,06$). Nos résultats sont en accord avec d'autres études ne montrant pas d'influence significative de la forme moléculaire de vectorisation du DHA vis-à-vis de son accréation cérébrale, lorsque les animaux sont soumis à un régime supplémenté en AGPI-LC n-3 (Aïd et al., 2005 ; Hiratsuka et al., 2008 ; Ding et al., 2013 ; Kitson et al., 2016 ; Destailats et al., 2018). Ainsi, les taux d'AGPI n-3 semblent bien régulés dans cet organe.

En revanche, les taux d'AGPI n-6 semblent plus sensibles à la nature du régime alimentaire (riche en AGPI-LC n-3 ou non), indépendamment de la forme moléculaire de vectorisation. Pour les groupes TG_{n-3} , $TG_{n-3}+PL_{veg}$ et $TG_{veg}+PL_{n-3}$ on observe une diminution d'environ 12% ($p<0,01$) des taux en AGPI n-6 et, plus précisément, des niveaux d'ARA (-9%), de l'acide docosatétranoïque n-6 (22:4 n-6 ; -15%) et de l'acide docosapentaénoïque n-6 (22:5 n-6 ; -66%).

Les faibles variations observées sur les proportions d'AGPI n-6 et n-3 ne diminuent que très légèrement le ratio n-6/n-3 dans les groupes enrichis en lipides marins (TG_{n-3} , $TG_{n-3}+PL_{veg}$ et $TG_{veg}+PL_{n-3}$), qui reste proche de 1 quel que soit le groupe considéré.

Tableau 37 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux du cerveau, chez le rat soumis à 8 semaines de régime¹

	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3+PLveg}	TG _{veg+PLn-3}
Acides gras (moles%)				
Σ AGS	44,9 ± 1,1^{2a}	44,8 ± 0,4^a	45,0 ± 0,3^a	44,9 ± 0,8^a
16:0	16,8 ± 0,7 ^a	16,7 ± 0,4 ^a	16,7 ± 0,3 ^a	16,8 ± 0,9 ^a
18:0	19,3 ± 0,5 ^a	18,7 ± 0,2 ^b	18,9 ± 0,2 ^{ab}	18,7 ± 0,5 ^b
Σ AGMI	30,6 ± 2,0^a	31,5 ± 0,8^a	31,4 ± 0,8^a	31,0 ± 2,3^a
18:1 n-9	17,4 ± 0,8 ^a	17,7 ± 0,4 ^a	17,9 ± 0,3 ^a	17,8 ± 0,5 ^a
18:1 n-7	3,9 ± 0,2 ^a	3,9 ± 0,1 ^a	3,8 ± 0,1 ^a	3,8 ± 0,2 ^a
Σ AGPI	24,5 ± 1,3^a	23,7 ± 0,5^a	23,6 ± 0,5^a	24,1 ± 1,5^a
Σ AGPI n-6	12,9 ± 0,7^a	11,5 ± 0,2^b	11,5 ± 0,2^b	11,6 ± 0,6^b
18:2 n-6	0,4 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a
20:4 n-6	8,7 ± 0,5 ^a	7,9 ± 0,1 ^b	7,9 ± 0,2 ^b	8,0 ± 0,5 ^b
22:4 n-6	2,7 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,1 ^b	2,3 ± 0,1 ^b	2,4 ± 0,1 ^b
22:5 n-6	0,6 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,0 ^b	0,3 ± 0,0 ^b	0,2 ± 0,0 ^b
Σ AGPI n-3	11,4 ± 0,7^a	12,0 ± 0,3^{ab}	12,0 ± 0,3^{ab}	12,3 ± 0,9^b
20:5 n-3	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
22:6 n-3	11,2 ± 0,7 ^a	11,6 ± 0,3 ^a	11,6 ± 0,3 ^a	11,9 ± 1,0 ^a
n-6/n-3	1,1 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,1 ^b	1,0 ± 0,0 ^b	1,0 ± 0,1 ^b
Teneur en AG (mg/g de cerveau)	27,5 ± 2,1^a	29,2 ± 1,5^{ab}	29,8 ± 2,0^b	29,8 ± 1,4^b

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3+PLveg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg+PLn-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; VLDL : lipoprotéines de très faible densité.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type, n=10 rats/groupe.

Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA à 1 facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Dans tous les groupes, les PL du cerveau sont majoritairement représentés par la PC (environ 71%) puis la PE (environ 18%) (**Figure 24A à E**). Alors que l'apport d'huiles de poisson, supplémentées ou non en lécithine de soja (TG_{n-3} et TG_{n-3+PLveg}), ne modifie pas le profil en PL cérébraux, seul l'apport de PL marins (TG_{veg+PLn-3}) diminue de 21% (p=0,03) la proportion de PE. Même s'il est connu que la composition en PL du cerveau est bien régulée, on remarque que la diminution de PE dans le cerveau est observée avec la lécithine marine qui en contient le moins (5%).

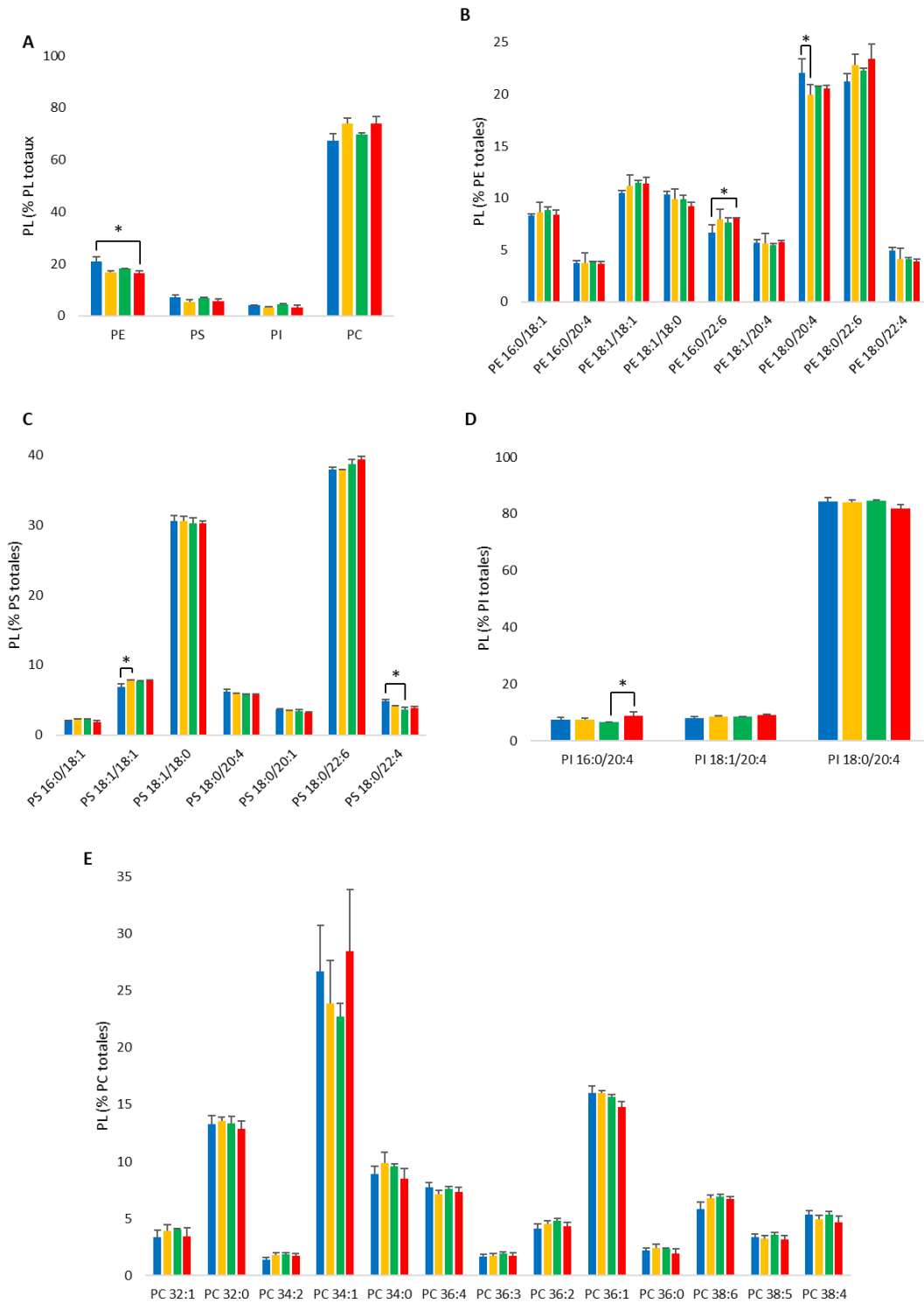


Figure 24 : Profil en espèces moléculaires des phospholipides du cerveau, chez le rat soumis à 8 semaines de régime¹

A/ phospholipides totaux ; B/ phosphatidyléthanolamine ; C/ phosphatidylsérine ; D/ phosphatidylinositol ; E/ phosphatidylcholine

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : ■ TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; ■ TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; ■ $TG_{n-3}+PL_{veg}$: formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; ■ $TG_{veg}+PL_{n-3}$: formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL)

PE : phosphatidyléthanolamine ; PS : phosphatidylsérine ; PI : phosphatidylinositol ; PC : phosphatidylcholine.

Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne \pm écart-type, n=3 échantillons poolés/ groupe ; *<0,05 ; test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunns.

Chaque type de PL est caractérisé par une ou deux espèce(s) moléculaire(s) prépondérante(s) : 18:0/20:4 et 18:0/22:6 pour la PE (**Figure 24B**), 18:1/18:0 et 18:0/22:6 pour la PS (**Figure 24C**) et 18:0/20:4 pour la PI (**Figure 24D**). En mode négatif, il n'est pas possible de déterminer les AG estérifiés sur la PC. Néanmoins, on trouve trois espèces majoritaires 32:0, 34:1 et 36:1 qui pourraient correspondre aux 16:0-16:0, 16:0-18:1 et 18:0-18:1, respectivement (**Figure 24E**). Le profil en espèces moléculaires des PL est peu influencé par la nature du régime utilisé. Néanmoins, on note des variations significatives de la proportion de PE 16:0/22:6 (+21%, $p=0,02$) dans le groupe $TG_{veg}+PL_{n-3}$ et de la PE 18:0/20:4 (-10%, $p=0,01$) dans le groupe TG_{n-3} (**Figure 24B**). Ces résultats sont cohérents avec le fait que le régime supplémenté en PL marins ($TG_{veg}+PL_{n-3}$) tend à augmenter la proportion relative du DHA dans le cerveau et que les régimes à base de lipides marins diminuent la proportion d'ARA (**Tableau 37**). L'apport d'huiles de poisson (TG_{n-3}) augmente ($p=0,03$) la proportion de PS 18:1/18:1 (**Figure 24C**) et la supplémentation en lécithine de soja ($TG_{veg}+PL_{n-3}$) tend à diminuer le taux en PS 18:0/22:4 ($p=0,07$). L'apport d'un régime supplémenté en PL marins ($TG_{veg}+PL_{n-3}$) augmente ($p=0,04$) la proportion de PI 16:0/20:4 et tend à réduire le taux en PI 18:0/20:4 ($p=0,07$), comparativement au groupe $TG_{n-3}+PL_{veg}$ (**Figure 24D**). La PC est un PL bien conservé puisque les proportions de chaque espèce moléculaire ne sont modulées ni par l'enrichissement des régimes en AGPI-LC n-3, ni par leur forme moléculaire de vectorisation (TG vs PL), ni par la supplémentation de la ration alimentaire en PL (**Figure 24E**).

Ces données ayant été obtenues sur des pools d'extraits lipidiques ($n=3$ /groupe), elles demandent à être confirmées par un nombre plus important d'échantillons. Néanmoins, elles sont cohérentes avec les variations des profils en AG des lipides totaux du cerveau en fonction des régimes utilisés.

3.2.3.2. La rétine

Dans la rétine, près de 40% des AG sont des AGPI (**Tableau 38**). Les AGPI n-3 représentent près des trois quarts des AGPI, parmi lesquels le DHA est l'AG largement majoritaire (près de 97% des AGPI n-3). L'apport d'huiles de poisson (**TG_{n-3}**) est sans effet sur les taux en AGPI n-3 de la rétine. Néanmoins, la supplémentation de ce même régime en lécithine de soja (**TG_{n-3}+PL_{veg}**) semble promouvoir l'accrétion du DHA dans la rétine, en comparaison du groupe **TG_{n-3}**. Comme observé au niveau du cerveau, seul l'apport d'AGPI-LC n-3 sous forme de PL (**TG_{veg}+PL_{n-3}**) parvient à accroître d'au moins 15% les niveaux en AGPI n-3 ($p<0,01$) et plus particulièrement en DHA ($p<0,05$) par rapport aux groupes **TG_{veg}** et **TG_{n-3}**.

Les variations observées au niveau des AGPI n-3 se répercutent à la fois sur les AGMI et sur les AGPI n-6. Le taux d'AGPI-LC n-6 est réduit de près de 25% dans le groupe **TG_{n-3}**, et de 14% en présence de PL, vecteurs ou non d'AGPI-LC n-3 (**TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**), principalement dû à la diminution des taux de 22:4 n-6 et 22:5 n-6 ($p<0,01$ pour chacun de ces AG). Seul le régime **TG_{n-3}** impacte à la baisse le taux d'ARA. Pour les autres groupes, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**, sa proportion ne varie pas de manière significative.

Il résulte de ces variations que le ratio n-6/n-3 dans les lipides totaux de la rétine est légèrement diminué ($p<0,01$) et ce quelle que soit la forme moléculaire de vectorisation des AGPI n-3.

Tableau 38 : Profil en acides gras (moles%) des lipides totaux de la rétine, chez le rat soumis à 8 semaines de régime¹

	TG _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
<i>Acides gras (moles%)</i>				
Σ AGS	46,8 ± 2,2^{2a}	47,9 ± 2,4^a	45,6 ± 1,3^a	45,5 ± 1,9^a
16:0	14,8 ± 1,3 ^a	17,6 ± 2,0 ^b	15,9 ± 1,1 ^{ab}	14,3 ± 1,4 ^a
18:0	21,9 ± 0,9 ^a	19,7 ± 1,3 ^b	21,3 ± 0,7 ^a	21,5 ± 0,4 ^a
Σ AGMI	12,7 ± 1,4^a	16,4 ± 3,8^b	13,6 ± 1,1^a	12,8 ± 1,2^a
18:1 n-9	7,9 ± 0,8 ^a	11,7 ± 3,5 ^b	8,7 ± 0,8 ^a	8,0 ± 0,8 ^a
18:1 n-7	2,0 ± 0,2 ^{ab}	1,9 ± 0,2 ^a	2,1 ± 0,1 ^b	2,0 ± 0,1 ^{ab}
Σ AGPI	40,5 ± 2,8^a	35,6 ± 5,1^b	40,7 ± 1,8^a	41,7 ± 2,5^a
Σ AGPI n-6	13,6 ± 0,9^a	10,1 ± 1,1^b	11,7 ± 0,3^c	11,2 ± 1,0^c
18:2 n-6	0,9 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,3 ^a	1,0 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,9 ^a
20:4 n-6	9,0 ± 0,6 ^a	7,1 ± 1,2 ^b	8,7 ± 0,3 ^a	8,6 ± 0,3 ^a
22:4 n-6	1,7 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,2 ^b	1,2 ± 0,1 ^b	1,2 ± 0,2 ^b
22:5 n-6	1,5 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,0 ^b	0,3 ± 0,1 ^b
Σ AGPI n-3	26,6 ± 2,7^{ab}	25,4 ± 4,1^a	28,9 ± 1,8^{bc}	30,7 ± 1,5^c
18:3 n-3	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,1 ^a
20:5 n-3	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
22:6 n-3	26,0 ± 2,7 ^{ab}	24,5 ± 4,1 ^a	28,0 ± 1,8 ^{bc}	29,8 ± 1,5 ^c
n-6/n-3	0,5 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,0 ^b	0,4 ± 0,0 ^b	0,4 ± 0,1 ^b

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; VLDL : lipoprotéines de très faible densité.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne ± écart-type, n=10 rats/groupe.

Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes (p<0,05), ANOVA à 1 facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey.

La rétine est majoritairement constituée de PC (près de 75% des PL totaux) et de PE (22% des PL totaux) (**Figure 25A à E**). Les proportions relatives en PE, PS, PI et PC ne sont pas influencées par les régimes utilisés ($p>0,05$).

Chaque type de PL est caractérisé par une espèce moléculaire prépondérante : 18:0/22:6 pour la PE (**Figure 25B**) et la PS (**Figure 25C**) et 18:0/20:4 pour la PI (**Figure 25D**). Les espèces moléculaires de ces PL sont conservées suite aux régimes appliqués. En ce qui concerne la PC, on trouve cinq espèces majoritaires 32:0, 34:1, 36:1, 38:6 et 38:4 qui pourraient correspondre aux 16:0-16:0, 16:0-18:1, 18:0-18:1, 16:0-22:6 et 18:0-20:4, respectivement (**Figure 25E**). Les seules variations significatives trouvées sur les espèces moléculaires concernent le taux de PC 38:6 qui augmente de 13% dans le groupe $TG_{veg}+PL_{n-3}$ ($p=0,04$) et le taux de PC 38:4 qui diminue dans le groupe $TG_{n-3}+PL_{veg}$ ($p=0,02$). Ces résultats sont en accord avec (1) les faibles variations observées sur le profil en AG des lipides totaux de la rétine, consécutives aux régimes et (2) l'augmentation du taux en DHA dans le groupe $TG_{veg}+PL_{n-3}$ (**Tableau 38**). Cet enrichissement semble s'effectuer préférentiellement au niveau de la fraction PC des PL de la rétine.

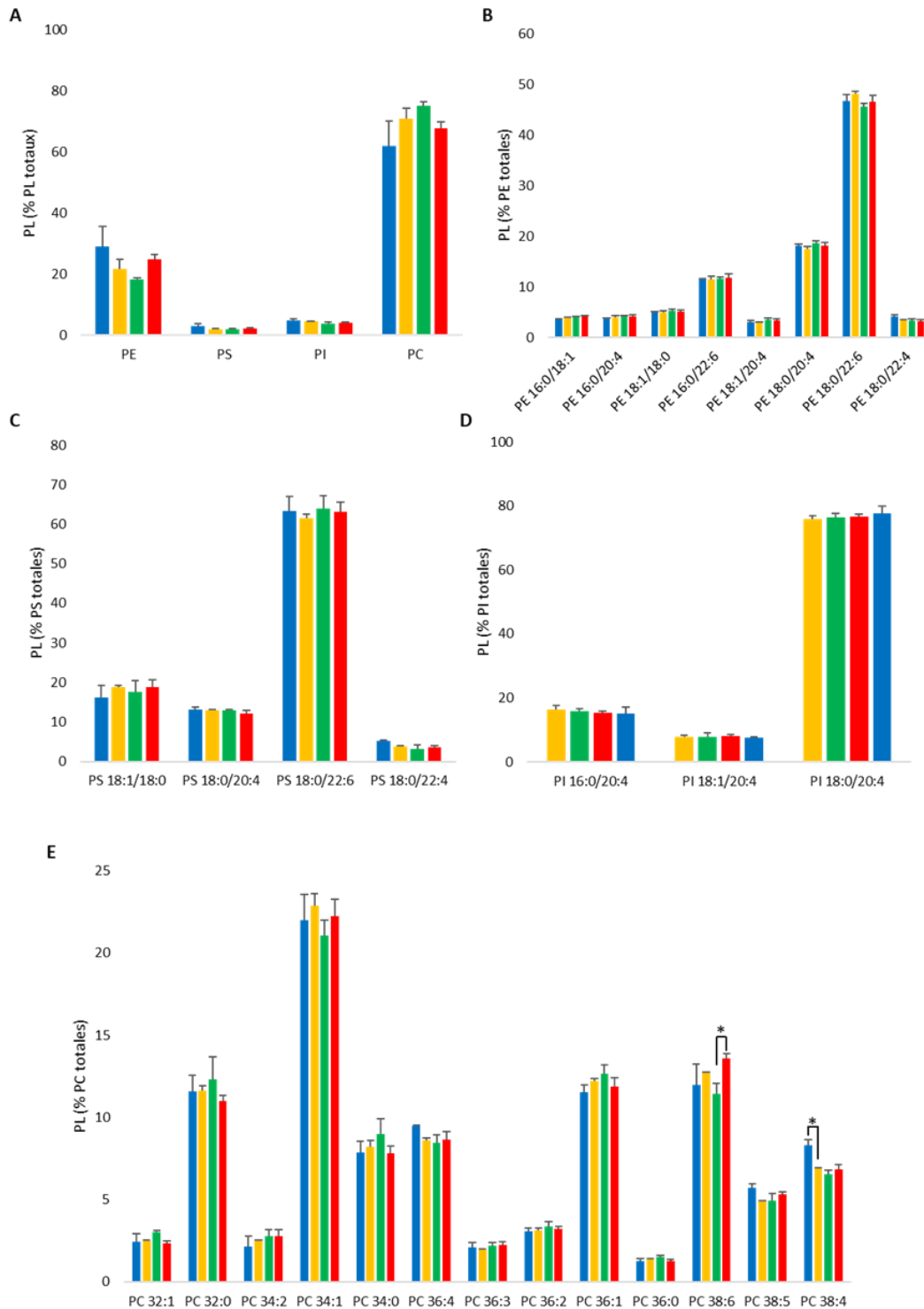


Figure 25 : Profil en espèces moléculaires des phospholipides de la rétine, chez le rat soumis à 8 semaines de régimes¹
 A/ phospholipides totaux ; B/ phosphatidyléthanoline ; C/ phosphatidylsérine ; D phosphatidylinositol ;
 E/phosphatidylcholine

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : ■ TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; ■ TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; ■ $TG_{n-3}+PL_{veg}$: formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; ■ $TG_{veg}+PL_{n-3}$: formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL)

PE : phosphatidyléthanoline ; PS : phosphatidylsérine ; PI : phosphatidylinositol ; PC : phosphatidylcholine.

Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne \pm écart-type, n=3 échantillons poolés/ groupe ; *<0,05 ; test de Kruskal-Wallis suivi d'un test post-hoc de Dunns.

3.2.3.3. Discussion

Des études ont montré que le profil en AG des lipides cérébraux est intimement lié à la composition en AG du régime alimentaire (Eddy and Harman, 1975 ; Connor et al., 1990 ; Lai and Bruce German, 1993 ; Carrié et al., 2000). Les quelques études ayant trait à l'effet de la forme moléculaire de vectorisation du DHA sur son accrétion cérébrale rapportent des résultats qui semblent dépendants du mode d'administration. Ainsi, dans les études où le DHA est injecté en bolus, son incorporation dans le cerveau semble être favorisée lorsqu'il est vectorisé par des PL comparativement à la forme TG (Graf et al., 2010 ; Liu et al., 2014 ; Kitson et al., 2016). En revanche, dans le cas où les animaux sont soumis à un régime, la forme moléculaire de vectorisation n'influence pas l'accrétion cérébrale du DHA (Aïd et al., 2005 ; Hiratsuka et al., 2008 ; Tang et al., 2012 ; Ding et al., 2013 ; Che et al., 2018 ; Destailats et al., 2018). Après un régime de 8 semaines, nous n'avons pas non plus observé d'effet de la forme moléculaire de vectorisation du DHA sur son accrétion cérébrale. Néanmoins, en comparaison d'un groupe d'animaux soumis à un régime exempt d'AGPI-LC n-3, seul l'apport de PL marins tend à augmenter le taux en DHA dans les lipides cérébraux, et plus particulièrement dans la PE.

A notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à l'effet de la forme moléculaire de vectorisation du DHA sur son accrétion dans la rétine. Les données sont discordantes puisque deux d'entre elles rapportent que l'administration en bolus de PL-DHA marqué (^{14}C ou ^{13}C) chez le rat favorise son incorporation dans les lipides totaux de la rétine comparativement à la forme TG (Graf et al., 2010 ; Kitson et al., 2016). En revanche, chez le nouveau-né de porc, aucune différence de composition des lipides de la rétine n'est observée, que ce soit avec une formule infantile enrichie en PL d'œuf ou en huiles de poisson (Alessandri et al., 1998). Dans ces études, la présence d'AGPI-LC n-3 sous forme de TG, bien que minoritaire, ainsi que la durée de supplémentation (2 semaines), ne permettent probablement pas d'observer d'éventuels effets de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur ces paramètres. De plus, l'âge des animaux (nouveau-nés) peut représenter un facteur limitant sur l'accrétion des AGPI-LC n-3 dans la rétine. De façon intéressante, nous avons observé, au niveau de la rétine, que seul l'apport de PL marins permet d'améliorer le taux en DHA, notamment dans la PC, comparativement au groupe contrôle. De plus, la supplémentation des huiles de poisson en lécithine de soja semble promouvoir l'incorporation

des AGPI-LC n-3 fournis sous forme de TG. Comme mentionné au préalable, l'addition de PL à la ration alimentaire pourrait moduler l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines, et ainsi influencer le devenir des AG véhiculés vers un tissu cible. Cet effet serait dépendant du type de PL utilisés.

Dans le foie, le plasma et les globules rouges, un régime enrichi en AGPI-LC n-3 réduit drastiquement les taux en AGPI-LC n-6 et notamment en ARA, 22:4 n-6 et 22:5 n-6. Leur diminution proviendrait (1) d'un défaut d'ARA dans les régimes et (2) de la rétroinhibition sur la voie de bioconversion des AGPI-LC, exercée par les AGPI-LC n-3, limitant la synthèse puis l'incorporation des AGPI-LC n-6 (Igarashi et al., 2007 ; Rapoport, 2008 ; Chang et al., 2009).

En conclusion, même si les compositions en acides gras des lipides totaux et des espèces moléculaires des PL du cerveau et de la rétine restent relativement stables dans nos conditions expérimentales, seul l'apport de PL marins parvient à augmenter les taux en DHA dans les deux tissus nerveux, suggérant une meilleure accréation de cet acide gras lorsqu'il est vectorisé par des PL.

3.3. Etude du stress oxydant

Le stress oxydant peut être défini comme un état de déséquilibre entre la production d'agents pro-oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme, parmi lesquelles les enzymes catalase (CAT), superoxyde dismutase (SOD), et glutathion peroxydase (GPx) ainsi que les molécules antioxydantes telles que la vitamine E. Ce processus est largement incriminé dans de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, le diabète ou encore certains cancers (Del Rio et al., 2005 ; Long and Picklo, 2010 ; Negre-Salvayre et al., 2010 ; Albert et al., 2013 ; Csala et al., 2015). *In vivo*, le stress oxydant est induit par (1) la surproduction d'agents radicalaires issus de l'oxygène ou du monoxyde d'azote (NO) et (2) la synthèse de dérivés pro-oxydants issus des AGPI. En effet, les AGPI sont sensibles à l'oxydation et ce d'autant plus que le nombre de doubles liaisons augmente (Holman and Elmer, 1947 ; Cosgrove et al., 1987). Un enrichissement tissulaire en AGPI-LC n-3 augmente la sensibilité des membranes cellulaires à la peroxydation lipidique et pourrait ainsi altérer les fonctionnalités membranaires (Catalá, 2009). *In vivo*, la peroxydation lipidique est classiquement évaluée par la mesure de biomarqueurs dont les principaux sont les hydroperoxydes et les produits secondaires terminaux tels que le dialdéhyde malonique

(MDA), 4-hydroxynonanal (4-HNE), 4-hydroxyhexenal (4-HHE) ou encore les isoprostanes (Michel et al., 2008).

Nous avons montré qu'un régime enrichi en AGPI-LC n-3 améliore le statut en EPA et en DHA de divers tissus chez le rat. Dans ce contexte, il convient (1) de s'assurer que, sur le long terme, de tels régimes n'induisent pas de peroxydation lipidique et (2) d'évaluer les capacités antioxydantes de l'organisme suite à un régime enrichi en lipides marins de 8 semaines. Nous avons choisi de porter notre attention sur le foie car c'est le tissu présentant le plus fort enrichissement en AGPI-LC n-3.

3.3.1. Le MDA, marqueur de la peroxydation lipidique

La **Figure 26** présente la concentration en MDA dans le foie des rats après 8 semaines de régime. L'enrichissement hépatique en AGPI-LC n-3 consécutif aux régimes alimentaires utilisés, ne semble pas induire de peroxydation lipidique puisque les valeurs de MDA sont du même ordre de grandeur.

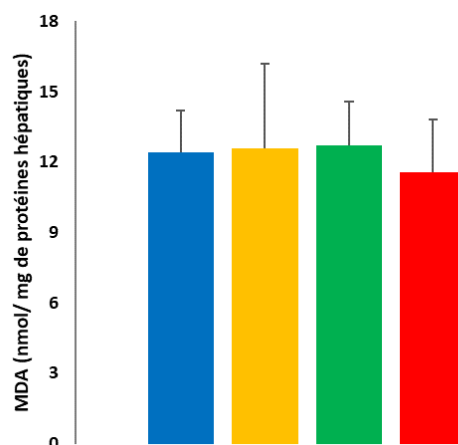


Figure 26 : Concentration hépatique en dialdéhyde malonique (nmol/mg de protéines hépatiques), comme marqueur de la peroxydation lipidique, chez le rat soumis à 8 semaines de régime¹

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : ■ TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; ■ TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; ■ TG_{n-3}+PL_{veg} : formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; ■ TG_{veg}+PL_{n-3} : formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

MDA : dialdéhyde malonique.

Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne \pm écart-type, n=10 rats/groupe ; p>0,05 ; ANOVA à 1 facteur suivi d'un test post-hoc de Tuckey.

Nos résultats sont en accord avec les études qui utilisent des quantités d'AGPI-LC n-3 modérées et qui ne relèvent aucune peroxydation lipidique *in vivo* (Ando et al., 2000 ; Kikugawa, 2001 ; Kikugawa et al., 2003 ; Hiratsuka et al., 2008 ; Jones et al., 2013). Lorsque

une peroxydation tissulaire est mise en évidence suite à une supplémentation en EPA et en DHA, les quantités administrées sont non physiologiques (supérieures à 11,2 moles% d'AGPI n-3 pour des régimes à 15% de lipides) (Kubo et al., 1997, 1998 ; Song et al., 2000 ; Song and Miyazawa, 2001 ; Saito and Kubo, 2003 ; Ramaiyan et al., 2016).

Pour interpréter de manière pertinente l'oxydabilité d'un système, il est important :

- De tenir compte de la **teneur en antioxydants** des corps gras utilisés. Or, les taux en vitamine E dans les régimes ne sont pas toujours mentionnés (Wang and Saito, 2001 ; Ramaprasad et al., 2005 ; Jones et al., 2013 ; Ramaiyan et al., 2016) ou varient de façon importante entre les études (jusqu'à 402 mg/kg de régime dans le cas de régimes enrichis en vitamine E (Kubo et al., 1997, 1998, 2000 ; Venkatraman et al., 1998 ; Kikugawa et al., 2003 ; Hiratsuka et al., 2008)). Dans notre étude, nous nous sommes assurés que les formules lipidiques présentent des teneurs en vitamine E similaires (**Tableau 17**).
- De vérifier la **stabilité oxydative** des régimes, notamment lorsque les aliments sont laissés à l'air libre, à disposition des rats. Cette caractérisation est rarement réalisée. Or, il est connu que les hydroperoxydes sont absorbés au niveau intestinal, incorporés dans les CM puis dans le foie et altèrent le statut oxydatif de l'organisme (Staprāns et al., 1994 ; Staprāns et al., 1996 ; Awada et al., 2012 ; Larsson et al., 2012). Nous avons vérifié que les régimes enrichis en AGPI-LC n-3 restent stables 24h dans les conditions d'exposition de l'étude nutritionnelle (**Annexe 6**).

3.3.2. Etude du système antioxydant

La nature du régime (*i.e.* enrichi ou non en lipides marins et la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3) n'impacte pas les niveaux circulants de NO (**Tableau 39**). En revanche, l'activité hépatique de la SOD tend à diminuer de 18% ($p=0,08$) lorsque les AGPI-LC n-3 sont estérifiés sur des TG (**TG_{n-3}**). La différence devient significative ($p<0,02$) dès lors que des PL sont présents dans les régimes qu'ils vectorisent les AGPI-LC n-3 ou non (-22% et -27% pour les groupes **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**, respectivement) (**Tableau 39**). L'enrichissement des régimes en AGPI-LC n-3 (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**) augmente d'au moins 69% ($p<0,01$) l'activité hépatique de la CAT, comparativement au groupe contrôle (TG_{veg}) (**Tableau 39**). En outre, la présence de PL dans les groupes **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}** limite l'induction

de l'activité de cette enzyme de 25% ($p < 0,01$) par rapport au groupe sans lécithine de soja (TG_{n-3}). Enfin, la présence d'AGPI-LC n-3 dans les régimes n'impacte pas l'activité hépatique de la GPx mais l'addition de PL ($TG_{n-3}+PL_{veg}$ et $TG_{veg}+PL_{n-3}$) permet de diminuer son activité d'environ 18% par rapport au groupe TG_{n-3} ($p < 0,03$) (**Tableau 39**).

Tableau 39 : Taux plasmatique en monoxyde d'azote et activité des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase) dans le foie de rat après 8 semaines de régime¹

	TG_{veg}	TG_{n-3}	$TG_{n-3}+PL_{veg}$	$TG_{veg}+PL_{n-3}$
NO (μM)	$67,7 \pm 11,1^{2a}$	$61,2 \pm 27,5^a$	$66,1 \pm 14,4^a$	$58,7 \pm 19,3^a$
SOD (U/mg de protéine)	$12,7 \pm 2,7^a$	$10,4 \pm 1,7^{ab}$	$9,9 \pm 1,7^b$	$9,2 \pm 1,5^b$
CAT (U/mg de protéine)	$519,7 \pm 53,5^a$	$1186,5 \pm 172,7^b$	$897,2 \pm 228,3^c$	$878,1 \pm 165,9^c$
GPx (U/mg de protéine)	$43,8 \pm 6,6^{ab}$	$48,2 \pm 5,8^a$	$38,4 \pm 5,4^b$	$39,9 \pm 6,2^b$

¹ : Les rats sont soumis pendant 8 semaines à l'un des 4 régimes normolipidiques (5% lipides) suivants : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; $TG_{n-3}+PL_{veg}$: formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; $TG_{veg}+PL_{n-3}$: formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; HDL : lipoprotéines de haute densité ; LDL : lipoprotéines de faible densité ; VLDL : lipoprotéines de très faible densité.

² : Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne \pm écart-type, $n=10$ rats/groupe.

Les valeurs moyennes d'une même ligne présentant des lettres distinctes sont significativement différentes ($p < 0,05$), ANOVA à 1 facteur suivi d'un test post-hoc de Tukey.

Ces résultats concordent avec d'autres études démontrant que l'apport d'AGPI-LC n-3 active le système antioxydant de l'organisme (Demoz et al., 1992 ; Venkatraman et al., 1998 ; Avula and Fernandes, 1999 ; Ramaprasad et al., 2005 ; Garrel et al., 2012 ; Brahmabhatt et al., 2013). La **Figure 27** présente les hypothèses d'induction du système antioxydant hépatique par les AGPI-LC n-3. Selon certains auteurs, l'augmentation des activités antioxydantes serait une réponse directe à l'oxydation des AGPI (Avula and Fernandes, 1999 ; Ramaiyan et al., 2016). Dans notre étude, cette hypothèse n'est pas privilégiée puisqu'aucune augmentation du MDA n'a pas été observée. D'autres voies métaboliques impliquant les AGPI comme inducteurs de certains récepteurs nucléaires et, plus particulièrement des PPARs (α , β/δ et γ) pourraient intervenir (Bordoni et al., 2006). Ainsi, les AGPI-LC n-3 pourraient indirectement stimuler l'expression des gènes codant pour les enzymes du système antioxydant. Cette hypothèse est corroborée par les travaux menés chez des souris auto-immunes, où l'apport d'huile de poisson et d'huile de krill améliore les activités SOD, CAT et GPx liées à une augmentation de leurs niveaux d'expression protéique et génique (Venkatraman et al., 1994).

Une autre hypothèse suggère que les AGPI-LC n-3 stimuleraient indirectement le système antioxydant *via* leur effet inducteur sur la β -oxydation peroxysomale (Willumsen et al., 1993 ; Vamecq et al., 1993 ; Venkatraman et al., 1998 ; Ramaprasad et al., 2005). A la différence de la mitochondrie, la β -oxydation peroxysomale génère du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Camões et al., 2015 ; Schrader et al., 2015), composé pro-oxydant instable (Chen et al., 1993 ; Schrader and Fahimi, 2006) qui doit être rapidement éliminé du compartiment cellulaire, en majorité par la CAT dont l'activité est principalement localisée dans le peroxysome (De Duve et al., 1960 ; Yokota and Fahimi, 1981). Ainsi, l'activation de la CAT serait une réponse adaptative face aux effets hypolipidémiants des AGPI-LC n-3 dans le foie.

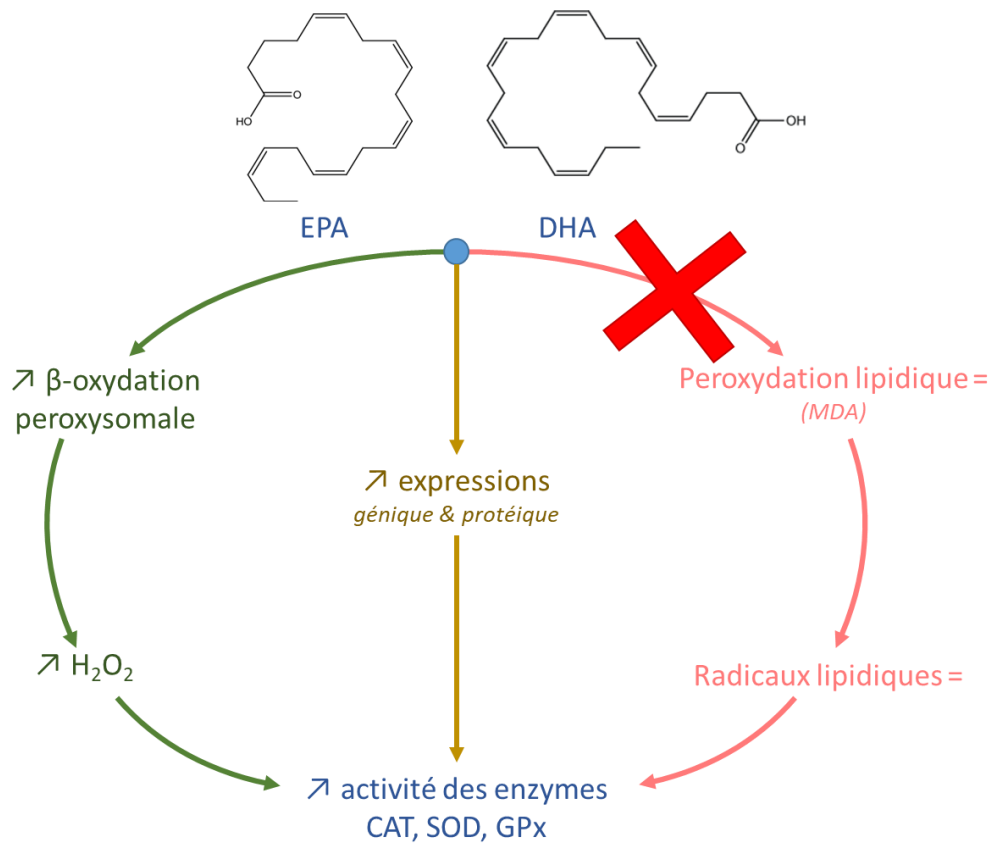


Figure 27 : Schéma récapitulatif des différentes hypothèses de l'effet inducteur des AGPI-LC n-3 vis-à-vis de l'activité des enzymes antioxydantes

CAT : catalase ; DHA : acide docosahexaénoïque ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; GPx : glutathion peroxydase ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; MDA : dialdéhyde malonique ; SOD : superoxyde dismutase.

Enfin, nous avons montré que la supplémentation des régimes en PL (**TG_{n-3}**+**PL_{veg}** et **TG_{veg}**+**PL_{n-3}**) réduit l'activité des enzymes antioxydantes. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact de PL alimentaires sur l'activité du système antioxydant. Malgré la légère diminution de l'activité hépatique de la SOD, la concentration en NO, agent radicalaire, n'est pas modifiée. De ce fait l'activité de la SOD reste suffisante pour assurer une protection optimale vis-à-vis des agents pro-oxydants. Ces données sont en accord avec l'étude de Firat et al., 2017, dans laquelle l'apport d'AGPI n-3 inhibe chez le rat l'augmentation de la concentration plasmatique en NO, générée par la ligature de la veine portale, concluant ainsi à un effet positif des AGPI n-3 vis-à-vis du stress oxydant. Si les AGPI-LC n-3 favorisent l'activité de la CAT *via* leurs effets stimulants sur la β -oxydation peroxysomale, nous pouvons supposer que la présence de PL à la ration alimentaire pourrait limiter l'induction de cette voie métabolique, ralentissant par conséquent l'augmentation de l'activité CAT.

3.4. Discussion sur l'influence de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 : TG vs PL

L'objectif de cette étude consistait à quantifier l'incorporation des AGPI-LC n-3 en fonction de leur forme moléculaire de vectorisation, dans différents tissus (foie, plasma et GR, cerveau et rétine) et différentes fractions lipidiques (TG, PL, EC) chez le rat soumis à un régime de 8 semaines. Les conséquences physiologiques de cette incorporation en termes de lipoprotéines du plasma et du stress oxydant du foie ont aussi été analysées. Le **Tableau 40** résume les principaux résultats obtenus.

Tableau 40 : Résumé des effets de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur leur accrétion tissulaire chez le rat soumis à un régime de 8 semaines

	Apport d'huiles de poisson TG _{n-3} et TG _{n-3} +PL _{veg}	Apport de PL marins TG _{veg} +PL _{n-3}
Foie		
Lipides totaux mg/g	Sans effet	↗
PL mg/g	Sans effet	Sans effet
TG mg/g	↗	↗
EC mg/g	Sans effet	↗
EPA moles%	↗ dans toutes les fractions PL, TG et EC + PL _{veg} : ↗ dans la fraction PL	↗ dans toutes les fractions PL, TG et EC Forme TG > Forme PL
DHA moles%	↗ dans toutes les fractions PL, TG et EC + PL _{veg} : ↗ dans la fraction TG	↗ dans toutes les fractions PL, TG et EC Forme TG > Forme PL
Plasma		
Lipides totaux mg/g	Sans effet	Sans effet
PL mg/g	Sans effet	Sans effet
TG mg/g	Sans effet	Sans effet
EC mg/g	↘	Sans effet
EPA moles%	↗ dans toutes les fractions PL, TG et EC + PL _{veg} : ↗ dans la fraction PL	↗ dans toutes les fractions PL, TG et EC Forme TG = Forme PL
DHA moles%	↗ dans toutes les fractions PL, TG et EC	↗ dans toutes les fractions PL, TG et EC Forme TG = Forme PL
Globules rouges		
EPA moles%	↗	↗ Forme TG = Forme PL
DHA moles%	↗	↗ Forme TG = Forme PL
Cerveau		
Lipides totaux mg/g	Tend à ↗ + PL _{veg} : ↗	↗
DHA moles%	Sans effet	Tend à ↗ (notamment dans la PE (PE 16:0/22:6))
Rétine		
DHA moles%	Sans effet + PL _{veg} : ↗	↗ (notamment dans la PC (PC 38:6))

EC : esters de cholestérol ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; DHA : acide docosahexaénoïque ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PL : phospholipides ; TG : triglycérides.

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont mis en évidence que :

- La supplémentation des huiles de poisson en lécithine de soja favorise l'accrétion tissulaire en AGPI-LC n-3 fournis sous forme TG. L'apport alimentaire de PL semble influencer le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, permettant un ciblage du DHA, fournit sous forme de TG, vers un tissu particulier (rétine) ou une fraction lipidique spécifique d'un tissu (TG du foie).
- La forme TG favorise l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans le foie, alors que la forme PL semble représenter une forme préférentielle pour l'accrétion du DHA au niveau du cerveau et de la rétine.

En faisant l'hypothèse que les résultats obtenus au niveau lymphatique se retrouvent dans les lipides circulants après 8 semaines de régime, le devenir métabolique spécifique observé pourrait être expliqué par une distribution moléculaire des AGPI-LC n-3 différente dans les lipides issus de la digestion intestinale. En effet, l'apport de DHA sous forme de PL marins induit son externalisation (*i.e.* positions *sn-1/3*) dans les TG lymphatiques et augmente son incorporation dans les PL lymphatiques, comparativement à un apport sous forme de TG marins (Cf. Chapitre 3, 2.1.). Par conséquent, après digestion, suivant leur nouvelle forme de vectorisation, les AGPI-LC n-3 seraient véhiculés dans des espèces lipidiques différentes dans la circulation sanguine et/ou plus ou moins disponibles pour les tissus cibles :

- **L'externalisation du DHA dans les TG lymphatiques** pourrait favoriser sa libération sous forme libre, dû à la régiospécificité de la LPL pour les positions *sn-1/3* des TG des CM. Le DHA libre serait plus enclin à rejoindre les tissus périphériques (Ackman, 1988), par rapport à ceux sous forme de DG ou de 2-MG, plus disposés à rejoindre le foie.
- **L'incorporation du DHA dans les PL lymphatiques** pourrait enrichir les PL des HDL (Amate et al., 2001b), après épuration des CM (Cf. Chapitre 1, 2.2.), substrats préférentiels de la lipase endothéliale. Une plus forte incorporation du DHA en position *sn-2* des PL des CM et des HDL permettrait sa libération sous forme de 2-lysoPL dans le compartiment sanguin. Cette forme serait favorable au ciblage d'organes comme le cerveau ou la rétine.

Pour l'heure, il n'a pas encore été clairement établi sous quelle forme le cerveau absorbe le DHA (Lacombe et al., 2018). Les données actuelles donnent lieu à un débat entre la forme libre (AGL) qui diffuserait de façon passive au travers des membranes cellulaires (Domenichiello et al., 2014 ; Chen et al., 2015 ; Lacombe et al., 2018) et la forme 2-lysoPL qui traverserait la barrière hémato-encéphalique par un mode de transport facilité *via* des protéines membranaires, notamment la protéine *major facilitator superfamily domain-containing protein 2* (Mfsd2a) (Thies et al., 1992, 1994 ; Nguyen et al., 2014 ; Lacombe et al., 2018 ; Bazinet et al., 2019). Les données obtenues vis-à-vis de l'incorporation des AGPI-LC n-3 dans les lipides lymphatiques supposent que l'apport de PL marins permettrait le relargage du DHA sous ces deux formes, présumées préférentielles pour une accréation au niveau cérébral.

Peu d'études se sont intéressées à la forme moléculaire sous laquelle le DHA intègre la rétine. Le DHA serait disponible au niveau de ce tissu sous forme d'EC dans les lipoprotéines plasmatiques LDL/VLDL (Bretillon et al., 2008a). Néanmoins, nos données semblent indiquer que l'apport de PL marins n'induit pas un enrichissement plus élevé des EC plasmatiques et hépatiques en DHA et réduit la concentration en LDL/VLDL plasmatiques, suggérant la mise en jeu d'autres voies d'accréation complémentaires. Notamment, de récentes études font état de protéines membranaires facilitant le passage du DHA dans les cellules rétinienne (Nguyen et al., 2014 ; Rice et al., 2015 ; Wong et al., 2016). La protéine Mfsd2a, qui facilite le passage dans le cerveau de DHA-2-lysoPL, a récemment été identifiée dans la rétine. Ces données supposent que la forme 2-lysoPL pourrait également représenter une voie alternative pour l'accréation du DHA dans la rétine.

Les AGPI-LC n-3 étant hautement sensibles à l'oxydation, il convenait de s'assurer qu'un enrichissement en EPA et en DHA, notamment au niveau du foie, n'induit pas de peroxydation lipidique *in vivo*. En accord avec la littérature, nos données ont démontré que l'apport d'un régime enrichi avec des quantités modérées d'AGPI-LC n-3 favorise leur incorporation au niveau hépatique sans pour autant augmenter la synthèse de produits secondaires d'oxydation. En parallèle, l'apport d'EPA et de DHA semble jouer un rôle favorable vis-à-vis du métabolisme antioxydant hépatique par une augmentation de l'activité basale de la CAT chez le rat sain. En revanche, les AGPI-LC n-3 ne semblent pas avoir d'effets sur les activités SOD et GPx ; seule la présence de PL diminue leurs activités respectives. Comme nous

l'avons mentionné au préalable, les AGPI-LC n-3 pourraient stimuler l'activité CAT *via* leur effet inducteur sur la β -oxydation peroxysomale. L'augmentation de l'activité basale de la CAT suppose que, dans des conditions pathologiques, lorsque le système antioxydant hépatique est engagé, l'organisme serait plus enclin à éliminer les agents pro-oxydants, présumant un effet préventif des AGPI-LC n-3 vis-à-vis du stress oxydant. En revanche, l'induction de l'activité CAT semble être plus limitée dès lors que des PL sont présents dans la ration alimentaire. Ainsi, les PL limiteraient l'activation de la β -oxydation peroxysomale modérant l'activité CAT. En conséquence, les AGPI-LC n-3 seraient moins sujets à la dégradation enzymatique, favorisant leur incorporation au niveau hépatique. Cette hypothèse est en accord avec l'accrétion des AGPI-LC n-3 observée au niveau du foie où la supplémentation des huiles de poisson en lécithine de soja stimule l'incorporation de l'EPA et du DHA dans les lipides hépatiques.

Chapitre 4

Conclusion et perspectives

Les dernières données de consommation alimentaire en France démontrent que les apports en AGPI-LC n-3 sont très en-deçà des seuils fixés par l'ANSES. Compte tenu de leurs effets dans la prévention de nombreuses pathologies, un apport nutritionnel en AGPI-LC n-3 conforme aux recommandations, sans augmenter l'apport en lipides totaux, est donc une problématique santé d'actualité. Une des pistes de recherche consiste à maîtriser la **biodisponibilité** de ces acides gras, en tenant compte non plus uniquement de la part consommée, mais aussi de la part qui sera digérée et assimilée au niveau intestinal (**bioaccessibilité**) ainsi que du transport des acides gras dans le compartiment sanguin et de leur métabolisme dans les tissus cibles (**bioactivité**). C'est dans ce contexte que s'est inscrit ce travail de thèse, visant à étudier l'influence de la forme moléculaire (*phospholipides vs triglycérides*) et/ou supramoléculaire (*phase continue, émulsion, liposomes*) de vectorisation des AGPI-LC n-3 sur leur biodisponibilité.

A l'heure actuelle, les AGPI-LC n-3 sont majoritairement consommés sous forme de triglycérides à travers les produits d'origine marine ou les compléments alimentaires. Mais on assiste depuis plusieurs années à l'apparition de nouvelles formes de vectorisation sur le marché qui ne sont pas toujours associées à des études de biodisponibilité approfondies et qui laissent interrogateur quant à leur impact nutritionnel. Parmi les formes lipidiques proposées, les phospholipides pourraient représenter une source intéressante pour leurs propriétés nutritionnelles (vecteurs d'acides gras d'intérêt, digestibilité), physico-chimiques (antioxydants naturels) et fonctionnelles (molécules tensioactives et propriété d'auto-assemblage). Sur le plan écologique, leur présence en tant que constituants membranaires en fait une biomasse théoriquement importante et accessible. Néanmoins, les ressources naturelles de ce type de molécules restent limitées lorsqu'on cible des compositions en acides gras ou des espèces moléculaires spécifiques, et l'extraction des PL est onéreuse car ils ne constituent pas une classe de lipides prépondérante. Pour autant, cela ne doit pas limiter les études nutritionnelles sur cette classe de lipides car, si leurs propriétés nutritionnelles s'avéraient plus intéressantes que celles des triglycérides, le marché des lécithines pourrait se développer grâce à la mise en œuvre de nouveaux procédés d'extraction et de purification.

L'originalité de ce travail de thèse repose sur l'élaboration de formules : (1) de profils lipidiques (TG, PL), de teneurs en AGPI-LC n-3 et en antioxydants comparables, (2) présentant deux types de molécules vectrices d'EPA et de DHA (TG ou PL) et (3) des formes moléculaires

et/ou supramoléculaires différentes (*phase continue/émulsion/liposomes*). De plus, nous avons choisi d'explorer le métabolisme lipidique en utilisant des approches expérimentales complémentaires (*in vitro*, pour l'étude de lipolyse des systèmes colloïdaux, *in vivo*, au niveau lymphatique avec une administration des lipides en une dose et, *in vivo*, au niveau tissulaire avec un régime de plusieurs semaines). Une telle méthodologie nous a permis de différencier l'effet individuel des facteurs étudiés (forme de vectorisation des AGPI-LC n-3 et/ou forme de dispersion des lipides).

Préalablement aux études sur le métabolisme lipidique, nous nous sommes attachés à valider le protocole d'analyse des acides gras car ce dosage constitue la base des résultats de biodisponibilité. Une étude comparative des méthodes de (trans)méthylation a donc été menée afin de déterminer la méthode optimale applicable à un mélange complexe de fractions lipidiques. Le protocole utilisé dans ce travail de thèse permet donc d'assurer une quantification précise des teneurs en APGI dans les différentes formules lipidiques et ainsi que dans les tissus analysés.

La première partie du travail de thèse a consisté en une **approche physico-chimique** du comportement des lipides en formulation et vis-à-vis de la lipolyse. Les différents lipides ont été formulés que ce soit en phase continue ou en milieu dispersé (émulsion, liposomes) et les systèmes obtenus ont été caractérisés. Une attention particulière a été portée sur la stabilité oxydative des AGPI-LC n-3, qui est une question majeure à adresser en vue d'un développement industriel d'une formule. Nous avons confirmé les propriétés antioxydantes des PL en phase continue, qu'ils vectorisent ou non les AGPI-LC n-3. Néanmoins, en émulsion, seul l'apport d'AGPI-LC n-3 sous forme de PL permet de prévenir la peroxydation induite par la dispersion des lipides ; les PL végétaux utilisés n'étant pas suffisamment efficaces pour limiter l'oxydation des AGPI-LC n-3. Ainsi, les AGPI-LC n-3 apparaissent plus stables lorsqu'ils sont vectorisés sous forme de PL que de TG, réduisant ainsi « l'odeur de poisson », souvent citée comme facteur limitant la consommation de produits d'origine marine. En revanche, la structuration des PL marins en liposomes semble promouvoir l'oxydation des AGPI-LC n-3, suggérant la nécessité de compléter la lécithine marine en antioxydant, tel que le tocophérol. L'étude de la lipolyse gastro-intestinale des formules lipidiques visait à prédire leur bioaccessibilité en utilisant un modèle *in vitro*. Si les AGPI-LC n-3 semblent être plus facilement libérés lorsqu'ils sont vectorisés par des PL que par des TG, l'administration de ces

formules chez le rat a montré que les AGPI-LC n-3 sont absorbés de façon similaire quelle que soit la forme moléculaire de vectorisation. Ainsi, dans notre étude, la corrélation stricte entre l'étude *in vitro* de la lipolyse et les résultats *in vivo* de bioaccessibilité n'est pas démontrée. L'analyse de la digestion *in vitro* sur des temps plus longs ainsi que l'étude de la solubilisation micellaire des produits d'hydrolyse pourraient fournir des informations complémentaires permettant l'interprétation des résultats *in vivo*.

La deuxième partie du travail de thèse s'est focalisée sur l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3 *in vivo* et le métabolisme entérocytaire des lipides néo-synthétisés. L'objectif d'une telle étude est de comprendre si la forme de vectorisation des AGPI-LC n-3, à l'échelle moléculaire ou supramoléculaire, module de manière différente la **bioaccessibilité** de ces AG par rapport aux AG totaux. La **forme moléculaire de vectorisation** (TG ou PL) n'influence pas l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3. En revanche, l'ingestion de PL marins favorise l'incorporation du DHA dans les PL lymphatiques et induit son externalisation dans les TG lymphatiques. L'apport de TG marins conduit, quant à lui, à une répartition équimolaire du DHA dans les TG lymphatiques. Ces données indiquent que la synthèse entérocytaire des lipides (PL ou TG) et la structure glycéridique des TG lymphatiques dépendent de la forme moléculaire de vectorisation des AG, *i.e.* type de lipides et position sur le squelette glycérol. C'est pourquoi il conviendrait d'analyser l'activité des enzymes impliquées dans les voies de synthèse (MGAT, DGAT, GPAT, LPAAT, PAP, LPCAT) au niveau des entérocytes, afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des différences d'incorporation des AG dans les lipides lymphatiques. En outre, l'apport de lipides marins structurés en milieu dispersé chez le rat permet d'augmenter la bioaccessibilité des AG alimentaires, mais de façon dépendante de la **forme supramoléculaire** utilisée. L'émulsification des lipides améliore l'absorption des AG alimentaires indépendamment de leur nature. Néanmoins, dans nos conditions expérimentales, ni la nature de l'interface huile/eau (*i.e.* lécithine de soja ou PL marins), ni la taille des globules gras (*i.e.* supérieure à 10 μm) n'influencent l'efficacité de l'assimilation intestinale. En revanche, la formulation des PL marins en liposomes accroît spécifiquement l'absorption intestinale des AGPI-LC n-3, sans augmenter celle des autres acides gras. Des objets constitués uniquement de PL et de petite taille (<10 μm) pourraient expliquer ce résultat. Ainsi, l'utilisation de liposomes marins semble répondre aux objectifs de l'ANSES dans le cadre du PNNS visant à améliorer l'apport en EPA et en DHA sans augmenter celui en lipides

totaux. Pour s'en assurer, il conviendrait d'utiliser les liposomes supplémentés en antioxydants dans le cadre d'un régime à long terme et d'étudier le devenir métabolique des AG vectorisés.

La troisième partie du travail de thèse a permis de montrer l'impact de la forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 (TG vs PL en phase continue) sur leur accrétion dans certains tissus, suite à un régime de 8 semaines. L'étude de bioaccessibilité suggère que les AGPI-LC n-3 pourraient être véhiculés de façon différente au-delà de la barrière intestinale, ce qui modulerait leur libération au cours de l'épuration des lipoprotéines et leur internalisation par les organes. **L'étude nutritionnelle** conduite chez le rat a permis de confirmer en partie cette hypothèse. Ainsi, les TG marins, supplémentés en lécithine de soja, favorisent l'enrichissement hépatique en AGPI-LC n-3 alors que les PL marins semblent être une forme préférentielle pour une accrétion au niveau des tissus neveux (*i.e.* cerveau et rétine). Les variations, même faibles, en termes de quantité d'acides gras ou de structure glycéridique, mises en évidence par l'étude de bioaccessibilité lymphatique semblent impacter l'accrétion tissulaire par un effet cumulatif dans le cadre d'un régime. Néanmoins, les tissus ne s'enrichissant pas tous avec la même cinétique, il conviendrait dès lors d'étudier l'accrétion des AGPI-LC n-3 au cours du temps (par exemple, sur 1 semaine, 2 semaines, 1 mois et 3 mois). Cette approche permettrait de mettre en lumière les spécificités des différents tissus et donc de préconiser une forme moléculaire de vectorisation des AGPI-LC n-3 en fonction des objectifs d'accrétion tissulaire ciblés. Il est intéressant de noter que l'enrichissement hépatique en AGPI-LC n-3 s'effectue sans stimulation de la peroxydation lipidique et augmente significativement l'activité de la catalase chez l'animal sain. En revanche, la présence de PL dans la ration alimentaire semble limiter l'induction de l'activité de cette enzyme. Ces données associées aux fonctions physiologiques des AGPI-LC n-3 nous ont permis de proposer une hypothèse selon laquelle les AGPI-LC n-3 favoriseraient l'activité basale de la catalase *via* la stimulation de la β -oxydation peroxysomale. L'effet « réducteur » des PL sur l'activité de la CAT pourrait passer par une inhibition de l'induction de cette voie catabolique. Etudier l'activité d'enzymes clés de cette voie, comme l'acylCoA oxydase, permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

L'ensemble des résultats obtenus montre que le choix de la **forme moléculaire de vectorisation** des AGPI-LC n-3 (*PL vs TG*) peut être un moyen d'orienter leur incorporation

tissulaire, alors que leur **structuration supramoléculaire** (*émulsion ou liposomes*), serait une stratégie pour moduler leur absorption intestinale. Il n’y a donc pas une forme de vectorisation meilleure qu’une autre. Tout dépend des objectifs de la supplémentation, c’est à dire soit de la cinétique d’enrichissement, soit du tissu ciblé. Ainsi, l’utilisation de TG marins pourrait être préconisée pour un enrichissement hépatique et prendrait tout son sens dans le cadre de la gestion de la lipémie et des facteurs cardio-vasculaires. L’utilisation de PL marins, favorisant un enrichissement du cerveau et de la rétine en DHA, serait recommandée pour la supplémentation d’aliments de populations spécifiques (nouveau-nés et séniors) puisque cet acide gras est impliqué dans des processus clés du développement pré- et post-natal ainsi que du vieillissement, qu’il soit normal ou pathologique. La structuration des lipides pourrait, quant à elle, permettre de répondre à une demande physiologique « rapide » d’enrichissement en AGPI-LC n-3, dans le cas de carence ou en nutrition entérale, par exemple.

Références bibliographiques

- Acar, N., Bonhomme, B., Joffre, C., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C., Bretillon, L., Doly, M., Chardigny, J.-M., 2006. The retina is more susceptible than the brain and the liver to the incorporation of trans isomers of DHA in rats consuming trans isomers of alpha-linolenic acid. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 515–525.
- Ackman, R.G., 1988. Some possible effects on lipid biochemistry of differences in the distribution on glycerol of long-chain n-3 fatty acids in the fats of marine fish and marine mammals. *Atherosclerosis* 70, 171–173.
- Adarme-Vega, T.C., Lim, D.K.Y., Timmins, M., Vernen, F., Li, Y., Schenk, P.M., 2012. Microalgal biofactories: a promising approach towards sustainable omega-3 fatty acid production. *Microb. Cell Fact.* 11, 96.
- Aguilar, F., Crebelli, R., Di Domenico, A., Dusemund, B., Frutos, M.J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Lambré, C., Leblanc, J.C., Lindtner, O., Moldeus, P., Mortensen, A., Mosesso, P., Oskarsson, A., Parent-Massin, D., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woultersen, R.A., Wright, M., Younes, M., 2017. Scientific opinion on the re-evaluation of lecithins (E 322) as a food additive. *EFSA Journal* 15, 4742.
- Aïd, S., Vancassel, S., Linard, A., Lavielle, M., Guesnet, P., 2005. Dietary docosahexaenoic acid [22:6(n-3)] as a phospholipid or a triglyceride enhances the potassium chloride-evoked release of acetylcholine in rat hippocampus. *J. Nutr.* 135, 1008–1013.
- Akanbi, T.O., Sinclair, A.J., Barrow, C.J., 2014. Pancreatic lipase selectively hydrolyses DPA over EPA and DHA due to location of double bonds in the fatty acid rather than regioselectivity. *Food Chem* 160, 61–66.
- Albers, J.J., Vuletic, S., Cheung, M.C., 2012. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1821, 345–357.
- Albert, B.B., Cameron-Smith, D., Hofman, P.L., Cutfield, W.S., 2013. Oxidation of marine omega-3 supplements and human health. *Biomed Res Int* 2013.
- Albert, C.M., Campos, H., Stampfer, M.J., Ridker, P.M., Manson, J.E., Willett, W.C., Ma, J., 2002. Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death. *N. Engl. J. Med.* 346, 1113–1118.
- Alessandri, J.M., Goustard, B., Guesnet, P., Durand, G., 1998. Docosahexaenoic acid concentrations in retinal phospholipids of piglets fed an infant formula enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids: effects of egg phospholipids and fish oils with different ratios of eicosapentaenoic acid to docosahexaenoic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 377–385.
- Alessandri, J.-M., Guesnet, P., Vancassel, S., Astorg, P., Denis, I., Langelier, B., Aïd, S., Poumès-Ballihaut, C., Champeil-Potokar, G., Lavielle, M., 2004. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 509–538.
- Alpers, D.H., Lock, D.R., Lancaster, N., Poksay, K., Schonfeld, G., 1985. Distribution of apolipoproteins A-I and B among intestinal lipoproteins. *J. Lipid Res.* 26, 1–10.
- Amate, L., Gil, A., Ramírez, M., 2001a. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids from different sources affect fat and fatty acid excretions in rats. *J. Nutr.* 131, 3216–3221.

- Amate, L., Gil, A., Ramírez, M., 2001b. Feeding infant piglets formula with long-chain polyunsaturated fatty acids as triacylglycerols or phospholipids influences the distribution of these fatty acids in plasma lipoprotein fractions. *J. Nutr.* 131, 1250–1255.
- Ando, K., Nagata, K., Yoshida, R., Kikugawa, K., Suzuki, M., 2000. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs. *Lipids* 35, 401–407.
- Aoyama, T., Peters, J.M., Iritani, N., Nakajima, T., Furihata, K., Hashimoto, T., Gonzalez, F.J., 1998. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J. Biol. Chem.* 273, 5678–5684.
- Araseki, M., Yamamoto, K., Miyashita, K., 2002. Oxidative stability of polyunsaturated fatty acid in phosphatidylcholine liposomes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2573–2577.
- Armand, M., 2008. Digestibilité des matières grasses chez l'homme. *Science des aliments* 28, 84–88.
- Armand, M., 2007. Lipases and lipolysis in the human digestive tract: where do we stand? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10, 156–164.
- Armand, M., Borel, P., Pasquier, B., Dubois, C., Senft, M., Andre, M., Peyrot, J., Salducci, J., Lairon, D., 1996. Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum. *Am. J. Physiol.* 271, G172-183.
- Armand, M., Borel, P., Ythier, P., Dutot, G., Melin, C., Senft, M., Lafont, H., Lairon, D., 1992. Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase: an in vitro study. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 3, 333–341.
- 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.
- 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.
- Aslan, A., Triadafilopoulos, G., 1992. Fish oil fatty acid supplementation in active ulcerative colitis: a double-blind, placebo-controlled, crossover study. *Am. J. Gastroenterol.* 87, 432–437.
- Astorg, P.-O., Bougnoux, P., Calvarin, J., Chalon, S., Dallongeville, J., Dumas, C., Friocourt, P., Gerber, M., Guesnet, P., Kalonji, E., Lapillonne, A., Morise, A., Lecerf, J.-M., Margaritis, I., Moulin, P., Pieroni, G., Legrand, P., 2011. Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras - Version intégrant les modifications apportés par l'erratum du 28 juillet 2011.
- Aursand, M., Jørgensen, L., Grasdalen, H., 1995. Positional distribution of ω 3 Fatty acids in marine lipid triacylglycerols by high-resolution ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc* 72, 293–297.
- Avis et rapport de l'Anses sur la troisième étude individuelle nationale des consommations alimentaires - INCA 3 (Rapport d'expertise collective No. Saisine 2014-SA-0234), 2017. . ANSES, Paris.
- Avula, C.P., Fernandes, G., 1999. Modulation of antioxidant enzymes and apoptosis in mice by dietary lipids and treadmill exercise. *J. Clin. Immunol.* 19, 35–44.
- Awada, M., Meynier, A., Soulage, C.O., Hadji, L., Géoën, A., Viau, M., Ribourg, L., Benoit, B., Debard, C., Guichardant, M., Lagarde, M., Genot, C., Michalski, M.-C., 2013. n-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or triacylglycerols in mice. *Nutr Metab (Lond)* 10, 23.

- Awada, M., Soulage, C.O., Meynier, A., Debard, C., Plaisancié, P., Benoit, B., Picard, G., Loizon, E., Chauvin, M.-A., Estienne, M., Peretti, N., Guichardant, M., Lagarde, M., Genot, C., Michalski, M.-C., 2012. Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. *J. Lipid Res.* 53, 2069–2080.
- Bahnson, B.J., 2005. Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A2: insight from the anion-assisted dimer. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 96–106.
- Bakala N’Goma, J.-C., Amara, S., Dridi, K., Jannin, V., Carrière, F., 2012. Understanding the lipid-digestion processes in the GI tract before designing lipid-based drug-delivery systems. *Ther Deliv* 3, 105–124.
- Bandarra, N.M., Campos, R.M., Batista, I., Nunes, M.L., Empis, J.M., 1999. Antioxidant synergy of α -tocopherol and phospholipids. *J Amer Oil Chem Soc* 76, 905–913.
- Bang, H.O., Dyerberg, J., 1972. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic west coast Eskimos. *Acta Med Scand* 192, 85–94.
- Bang, H.O., Dyerberg, J., Sinclair, H.M., 1980. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am. J. Clin. Nutr.* 33, 2657–2661.
- Barish, G.D., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptors in atherosclerosis and immunity. *J. Nutr.* 136, 690–694.
- Bazinet, R.P., Bernoud-Hubac, N., Lagarde, M., 2019. How the plasma lysophospholipid and unesterified fatty acid pools supply the brain with docosahexaenoic acid. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 142, 1–3.
- Beaslas, O., Cueille, C., Delers, F., Chateau, D., Chambaz, J., Rousset, M., Carrière, V., 2012. Détection lumineuse des micelles lipidiques. *OCL* 19, 196–199.
- Belhaj, N., Arab-Tehrany, E., Linder, M., 2010. Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochemistry* 45, 187–195.
- Bernbäck, S., Bläckberg, L., Hernell, O., 1989. Fatty acids generated by gastric lipase promote human milk triacylglycerol digestion by pancreatic colipase-dependent lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 1001, 286–293.
- Berton-Carabin, C.C., Ropers, M.-H., Genot, C., 2014. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: involvement of the interfacial layer. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13, 945–977.
- Blanchard, H., Pédrone, F., Boulier-Monthéan, N., Catheline, D., Rioux, V., Legrand, P., 2013. Comparative effects of well-balanced diets enriched in α -linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 88, 383–389.
- Bollman, J.L., 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, 1349–1352.
- Bordoni, A., Di Nunzio, M., Danesi, F., Biagi, P.L., 2006. Polyunsaturated fatty acids: From diet to binding to ppars and other nuclear receptors. *Genes Nutr* 1, 95–106.
- Borel, P., Armand, M., Pasquier, B., Senft, M., Dutot, G., Melin, C., Lafont, H., Lairon, D., 1994. Digestion and absorption of tube-feeding emulsions with different droplet sizes and compositions in the rat. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 18, 534–543.
- Borel, Patrick, 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. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 5, 124–133.

- Borgström, B., 1980. Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A2, and fatty acid for the digestion of dietary fat: in vitro experiments with the porcine enzymes. *Gastroenterology* 78, 954–962.
- Bottino, N.R., Vandenburg, G.A., Reiser, R., 1967. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. *Lipids* 2, 489–493.
- Boucrot, P., 1983. Digestion et absorption intestinale des phosphatidylcholines. *Reproduction Nutrition Développement* 23, 943–958.
- Bourre, J.M., 2006. Effects of nutrients (in food) on the structure and function of the nervous system: update on dietary requirements for brain. Part 2 : macronutrients. *J Nutr Health Aging* 10, 386–399.
- Boyd, L.C., King, M.F., Sheldon, B., 1992. A rapid method for determining the oxidation of n-3 fatty acids. *J Am Oil Chem Soc* 69, 325–330.
- Bradberry, J.C., Hilleman, D.E., 2013. Overview of Omega-3 Fatty Acid Therapies. *P T* 38, 681–691.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Brahmbhatt, V., Oliveira, M., Briand, M., Perrisseau, G., Bastic Schmid, V., Destailats, F., Pace-Asciak, C., Benyacoub, J., Bosco, N., 2013. Protective effects of dietary EPA and DHA on ischemia-reperfusion-induced intestinal stress. *J. Nutr. Biochem.* 24, 104–111.
- Bretillon, L., Acar, N., Seeliger, M.W., Santos, M., Maire, M.A., Juanéda, P., Martine, L., Grégoire, S., Joffre, C., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C., 2008a. ApoB100,LDLR-/- mice exhibit reduced electroretinographic response and cholesteryl esters deposits in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1307–1314.
- Bretillon, L., Thuret, G., Grégoire, S., Acar, N., Joffre, C., Bron, A.M., Gain, P., Creuzot-Garcher, C.P., 2008b. Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp. Eye Res.* 87, 521–528.
- Brilla, L.R., Landerholm, T.E., 1990. Effect of fish oil supplementation and exercise on serum lipids and aerobic fitness. *J Sports Med Phys Fitness* 30, 173–180.
- Brockerhoff, H., Hoyle, R.J., Hwang, P.C., Litchfield, C., 1968. Positional distribution of fatty acids in depot triglycerides of aquatic animals. *Lipids* 3, 24–29.
- Browning, L.M., Walker, C.G., Mander, A.P., West, A.L., Madden, J., Gambell, J.M., Young, S., Wang, L., Jebb, S.A., Calder, P.C., 2012. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish. *Am. J. Clin. Nutr.* 96, 748–758.
- Bucher, H.C., Hengstler, P., Schindler, C., Meier, G., 2002. N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Med.* 112, 298–304.
- Budilarto, E.S., Kamal-Eldin, A., 2015. The supramolecular chemistry of lipid oxidation and antioxidation in bulk oils. *Eur J Lipid Sci Technol* 117, 1095–1137.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. [30] Microsomal lipid peroxidation, in: Fleischer, S., Packer, L. (Eds.), *Methods in Enzymology, Biomembranes - Part C: Biological Oxidations*. Academic Press, pp. 302–310.
- Burdge, G., 2004. Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7, 137–144.

- Burdge, G.C., 2006. Metabolism of alpha-linolenic acid in humans. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75, 161–168.
- Burdge, G.C., Wootton, S.A., 2002. Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. *Br. J. Nutr.* 88, 411–420.
- Buré, C., Ayciriex, S., Testet, E., Schmitter, J.-M., 2013. A single run LC-MS/MS method for phospholipidomics. *Anal Bioanal Chem* 405, 203–213.
- Burke, J.E., Dennis, E.A., 2009. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 50, S237–S242.
- Burr, M.L., Fehily, A.M., Gilbert, J.F., Rogers, S., Holliday, R.M., Sweetnam, P.M., Elwood, P.C., Deadman, N.M., 1989. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 2, 757–761.
- Burri, L., Johnsen, L., 2015. Krill Products: An Overview of Animal Studies. *Nutrients* 7, 3300–3321.
- Cabezas, D.M., Madoery, R., Diehl, B.W.K., Tomás, M.C., 2012. Emulsifying properties of different modified sunflower lecithins. *J Am Oil Chem Soc* 89, 355–361.
- Calder, P.C., 2016. Docosahexaenoic acid. *ANM* 69, 8–21.
- Calder, P.C., 2015. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim. Biophys. Acta* 1851, 469–484.
- Calder, P.C., 2012. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J Nutr* 142, 592S-599S.
- Calder, P.C., 2010. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients* 2, 355–374.
- Calder, P.C., 2009. Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. *Int. Rev. Immunol.* 28, 506–534.
- Calò, L., Bianconi, L., Colivicchi, F., Lamberti, F., Loricchio, M.L., de Ruvo, E., Meo, A., Pandozi, C., Staibano, M., Santini, M., 2005. N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 1723–1728.
- Camões, F., Islinger, M., Guimarães, S.C., Kilaru, S., Schuster, M., Godinho, L.F., Steinberg, G., Schrader, M., 2015. New insights into the peroxisomal protein inventory: Acyl-CoA oxidases and -dehydrogenases are an ancient feature of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1853, 111–125.
- Cansell, M., Bardeau, T., Morvan, E., Grélard, A., Buré, C., Subra-Paternault, P., 2017. Phospholipid profiles of oleaginous pressed cakes using NMR and gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc* 94, 1219–1223.
- Cansell, M., Moussaoui, N., Petit, A.P., Denizot, A., Combe, N., 2006. Feeding rats with liposomes or fish oil differently affects their lipid metabolism. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 459–467.
- Cansell, M., Nacka, F., Combe, N., 2003. Marine lipid-based liposomes increase in vivo FA bioavailability. *Lipids* 38, 551–559.
- Cao, J., Schwichtenberg, K.A., Hanson, N.Q., Tsai, M.Y., 2006. Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. *Clin. Chem.* 52, 2265–2272.
- Carrié, I., Clément, M., de Javel, D., Francès, H., Bourre, J.M., 2000. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J. Lipid Res.* 41, 465–472.

- Carriere, F., Barrowman, J.A., Verger, R., Laugier, R., 1993. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* 105, 876–888.
- Carrière, F., Moreau, H., Raphel, V., Laugier, R., Benicourt, C., Junien, J.L., Verger, R., 1991. Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase. *Eur. J. Biochem.* 202, 75–83.
- Carrière, F., Renou, C., Lopez, V., De Caro, J., Ferrato, F., Lengsfeld, H., De Caro, A., Laugier, R., Verger, R., 2000. The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals. *Gastroenterology* 119, 949–960.
- Carrière, F., Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., Laugier, R., Verger, R., 1997. In vivo and in vitro studies on the stereoselective hydrolysis of tri- and diglycerides by gastric and pancreatic lipases. *Bioorg. Med. Chem.* 5, 429–435.
- Castro-Gómez, M.P., Holgado, F., Rodríguez-Alcalá, L.M., Montero, O., Fontecha, J., 2015. Comprehensive study of the lipid classes of krill oil by fractionation and identification of triacylglycerols, diacylglycerols, and phospholipid molecular species by using UPLC/QToF-MS. *Food Anal. Methods* 8, 2568–2580.
- Castro-Gómez, P., Fontecha, J., Rodríguez-Alcalá, L.M., 2014. A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta* 128, 518–523.
- Catalá, A., 2009. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem. Phys. Lipids* 157, 1–11.
- Chang, C.-Y., Ke, D.-S., Chen, J.-Y., 2009. Essential fatty acids and human brain. *Acta Neurol Taiwan* 18, 231–241.
- Che, H., Cui, J., Wen, M., Xu, J., Yanagita, T., Wang, Q., Xue, C., Wang, Y., 2018. Long-Term Effects of Docosahexaenoic acid-bound phospholipids and the combination of docosahexaenoic acid-bound triglyceride and egg yolk phospholipid on lipid metabolism in mice. *J. Ocean Univ. China* 17, 392–398.
- Chen, C., Yu, X., Shao, S., 2015. Effects of omega-3 fatty acid supplementation on glucose control and lipid levels in type 2 diabetes: A Meta-Analysis. *PLoS One* 10.
- Chen, C.T., Kitson, A.P., Hopperton, K.E., Domenichiello, A.F., Trépanier, M.-O., Lin, L.E., Ermini, L., Post, M., Thies, F., Bazinet, R.P., 2015. Plasma non-esterified docosahexaenoic acid is the major pool supplying the brain. *Scientific Reports* 5, 15791.
- Chen, L.C., Boissonneault, G., Hayek, M.G., Chow, C.K., 1993. Dietary fat effects on hepatic lipid peroxidation and enzymes of H₂O₂ metabolism and NADPH generation. *Lipids* 28, 657–662.
- Chernenko, G.A., Barrowman, J.A., Kean, K.T., Herzberg, G.R., Keough, K.M., 1989. Intestinal absorption and lymphatic transport of fish oil (MaxEPA) in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* 1004, 95–102.
- Chew, E.Y., Clemons, T.E., SanGiovanni, J.P., Danis, R., Ferris, F.L., Elman, M., Antoszyk, A., Ruby, A., Orth, D., Bressler, S., Fish, G., Hubbard, B., Klein, M., Chandra, S., Blodi, B., Domalpally, A., Friberg, T., Wong, W., Rosenfeld, P., Agron, E., Toth, C., Bernstein, P., Sperduto, R., 2013. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA* 309, 2005–2015.
- Choi, S.J., Decker, E.A., Henson, L., Popplewell, L.M., McClements, D.J., 2010. Influence of droplet charge on the chemical stability of citral in oil-in-water emulsions. *J. Food Sci.* 75, C536-540.

- Choi, Y.-S., Goto, S., Ikeda, I., Sugano, M., 1989. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on cholesterol synthesis and degradation in rats of different ages. *Lipids* 24, 45.
- Chon, S.-H., Zhou, Y.X., Dixon, J.L., Storch, J., 2007. Intestinal monoacylglycerol metabolism: developmental and nutritional regulation of monoacylglycerol lipase and monoacylglycerol acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 282, 33346–33357.
- Chong, E.W.-T., Kreis, A.J., Wong, T.Y., Simpson, J.A., Guymer, R.H., 2008. Dietary omega-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Ophthalmol.* 126, 826–833.
- Chong, E.W.-T., Robman, L.D., Simpson, J.A., Hodge, A.M., Aung, K.Z., Dolphin, T.K., English, D.R., Giles, G.G., Guymer, R.H., 2009. Fat consumption and its association with age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 127, 674–680.
- Christen, W.G., Schaumberg, D.A., Glynn, R.J., Buring, J.E., 2011. Dietary ω -3 fatty acid and fish intake and incident age-related macular degeneration in women. *Arch. Ophthalmol.* 129, 921–929.
- Christensen, M.S., Høy, C.E., 1996. Effects of dietary triacylglycerol structure on triacylglycerols of resultant chylomicrons from fish oil- and seal oil-fed rats. *Lipids* 31, 341–344.
- Christensen, M.S., Høy, C.-E., 1992. Time related incorporation of (N-3) polyunsaturated fatty acids from seal oil or fish oil into rat tissue phospholipids. *Nutrition Research* 12, 1141–1154.
- Christensen, M.S., Høy, C.E., Redgrave, T.G., 1994. Lymphatic absorption of n - 3 polyunsaturated fatty acids from marine oils with different intramolecular fatty acid distributions. *Biochim. Biophys. Acta* 1215, 198–204.
- Christensen, M.S., Mortimer, B.-C., Høy, C.-E., G. Redgrave, T., 1995. Clearance of chylomicrons following fish oil and seal oil feeding. *Nutrition Research* 15, 359–368.
- Christie, W.W., Sébédio, J.L., Juanéda, P., 2001. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA) - AOCS Lipid Library [WWW Document].
- Clarke, S.D., 2000. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br. J. Nutr.* 83 Suppl 1, S59-66.
- Cleland, L.G., Caughey, G.E., James, M.J., Proudman, S.M., 2006. Reduction of cardiovascular risk factors with longterm fish oil treatment in early rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 33, 1973–1979.
- Cleland, L.G., James, M.J., Proudman, S.M., 2003. The role of fish oils in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drugs* 63, 845–853.
- Clouet, P., Niot, I., Bézard, J., 1989. Pathway of alpha-linolenic acid through the mitochondrial outer membrane in the rat liver and influence on the rate of oxidation. Comparison with linoleic and oleic acids. *Biochem. J.* 263, 867–873.
- Cohn, J.S., Kamili, A., Wat, E., Chung, R.W.S., Tandy, S., 2010. Dietary phospholipids and intestinal cholesterol absorption. *Nutrients* 2, 116–127.
- Cohn, J.S., Wat, E., Kamili, A., Tandy, S., 2008. Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 257–262.
- Connor, W.E., Neuringer, M., Lin, D.S., 1990. Dietary effects on brain fatty acid composition: the reversibility of n-3 fatty acid deficiency and turnover of docosahexaenoic acid in the brain, erythrocytes, and plasma of rhesus monkeys. *J. Lipid Res.* 31, 237–247.
- Cosgrove, J.P., Church, D.F., Pryor, W.A., 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* 22, 299–304.

- Couëdelo, L., Amara, S., Lecomte, M., Meugnier, E., Monteil, J., Fonseca, L., Pineau, G., Cansell, M., Carrière, 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.
- Couëdelo, L., Boué-Vaysse, C., Fonseca, L., Montesinos, E., Djoukitch, S., Combe, N., Cansell, M., 2011. Lymphatic absorption of α -linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion. *Br. J. Nutr.* 105, 1026–1035.
- Couëdelo, L., Termon, A., Vaysse, C., 2017. Matrice lipidique et biodisponibilité de l'acide alpha-linolénique. *OCL* 24, D204.
- Couëdelo, L., Vaysse, C., Vaïque, E., Guy, A., Gosse, I., Durand, T., Pinet, S., Cansell, M., Combe, N., 2012. The fraction of α -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.
- Couet, C., Delarue, J., Ritz, P., Antoine, J.M., Lamisse, F., 1997. Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 21, 637–643.
- Crenon, I., Foglizzo, E., Kerfelec, B., Vérine, A., Pignol, D., Hermoso, J., Bonicel, J., Chapus, C., 1998a. Pancreatic lipase-related protein type I: a specialized lipase or an inactive enzyme. *Protein Eng.* 11, 135–142.
- Crenon, I., Jayne, S., Kerfelec, B., Hermoso, J., Pignol, D., Chapus, C., 1998b. Pancreatic lipase-related protein type I: A double mutation restores a significant lipase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246, 513–517.
- Csala, M., Kardon, T., Legeza, B., Lizák, B., Mandl, J., Margittai, É., Puskás, F., Száraz, P., Szelényi, P., Bánhegyi, G., 2015. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 826–838.
- Cui, L., Decker, E.A., 2016. Phospholipids in foods: prooxidants or antioxidants? *J. Sci. Food Agric.* 96, 18–31.
- Cuvelier, M.-E., Maillard, M.-N., 2012. Stabilité des huiles alimentaires au cours de leur stockage. *OCL* 19, 125–132.
- Dallongeville, J., Marecaux, N., Amouyel, P., 2010. Acides gras oméga-3 et risque cardiovasculaire. *OCL* 17, 232–235.
- Dang, T.S., Walker, M., Ford, D., Valentine, R.A., 2014. Nutrigenomics: the role of nutrients in gene expression. *Periodontol.* 2000 64, 154–160.
- Dasilva, G., Boller, M., Medina, I., Storch, J., 2018. Relative levels of dietary EPA and DHA impact gastric oxidation and essential fatty acid uptake. *J. Nutr. Biochem.* 55, 68–75.
- Davidson, N.O., Magun, A.M., Glickman, R.M., 1991. Enterocyte lipid absorption and secretion, in: supplement 19: Handbook of Physiology, The Gastrointestinal System, Intestinal Absorption and Secretion. pp. 505–526.
- de Antueno, R.J., Elliot, M., Horrobin, D.F., 1994. Liver delta 5 and delta 6 desaturase activity differs among laboratory rat strains. *Lipids* 29, 327–331.
- De Duve, C., Beaufay, H., Jacques, P., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., De Coninck, S., 1960. Intracellular localization of catalase and of some oxidases in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* 40, 186–187.

- de Haas, G.H., Postema, M.M., Nieuwenhuizen, W., van Deenen, L.L., 1968. Purification and properties of phospholipase A and its zymogen from porcine pancreas. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 159, 118–129.
- Decker, E.A., McClements, D.J., 2001. Transition metal and hydroperoxide interactions: An important determinant in the oxidative stability of lipid dispersions. *Inform* 12, 215–255.
- Del Rio, D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 15, 316–328.
- Demoz, A., Willumsen, N., Berge, R.K., 1992. Eicosapentaenoic acid at hypotriglyceridemic dose enhances the hepatic antioxidant defense in mice. *Lipids* 27, 968–971.
- DeNigris, S.J., Hamosh, M., Kasbekar, D.K., Lee, T.C., Hamosh, P., 1988. Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 959, 38–45.
- Destailats, F., Oliveira, M., Bastic Schmid, V., Masserey-Elmelegy, I., Giuffrida, F., Thakkar, S.K., Dupuis, L., Gosoni, M.L., Cruz-Hernandez, C., 2018. Comparison of the incorporation of DHA in circulatory and neural tissue when provided as triacylglycerol (TAG), monoacylglycerol (MAG) or phospholipids (PL) provides new insight into fatty acid bioavailability. *Nutrients* 10.
- Ding, N., Xue, Y., Tang, X., Sun, Z.-M., Yanagita, T., Xue, C.-H., Wang, Y.-M., 2013. Short-term effects of different fish oil formulations on tissue absorption of docosahexaenoic acid in mice fed high- and low-fat diets. *J Oleo Sci* 62, 883–891.
- Doert, M., Jaworska, K., Moersel, J.-Th., Kroh, L.W., 2012. Synergistic effect of lecithins for tocopherols: lecithin-based regeneration of α -tocopherol. *Eur Food Res Technol* 235, 915–928.
- Domenichiello, A.F., Chen, C.T., Trepanier, M.-O., Stavro, P.M., Bazinet, R.P., 2014. Whole body synthesis rates of DHA from α -linolenic acid are greater than brain DHA accretion and uptake rates in adult rats. *J Lipid Res* 55, 62–74.
- Dubey, P., Jayasooriya, A.P., Cheema, S.K., 2011. Diets enriched in fish-oil or seal-oil have distinct effects on lipid levels and peroxidation in BioF1B Hamsters. *Nutr Metab Insights* 4, 7–17.
- Dyall, S.C., 2015. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci* 7.
- Dyerberg, J., Bang, H.O., Hjorne, N., 1975. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.* 28, 958–966.
- Echeverría, F., Valenzuela, R., Catalina Hernandez-Rodas, M., Valenzuela, A., 2017. Docosahexaenoic acid (DHA), a fundamental fatty acid for the brain: New dietary sources. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 124, 1–10.
- Eddy, D.E., Harman, D., 1975. Rat brain fatty acid composition: effect of dietary fat and age. *J Gerontol* 30, 647–654.
- Eggerman, T.L., Hoeg, J.M., Meng, M.S., Tombragel, A., Bojanovski, D., Brewer, H.B., 1991. Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II. *J. Lipid Res.* 32, 821–828.
- Embleton, J.K., Pouton, C.W., 1997. Structure and function of gastro-intestinal lipases. *Advanced Drug Delivery Reviews, The Potential of Oily Formulations for Drug Delivery to the Gastro-intestinal Tract* 25, 15–32.
- Erlanson-Albertsson, C., 1983. The interaction between pancreatic lipase and colipase: a protein-protein interaction regulated by a lipid. *FEBS Lett.* 162, 225–229.

- 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.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2009. Safety of ‘lipid extract from *Euphausia superba*’ as a novel food ingredient. *EFSA Journal* 7, 938.
- Fasina, O.O., Hallman, H., Craig-Schmidt, M., Clements, C., 2006. Predicting temperature-dependence viscosity of vegetable oils from fatty acid composition. *J Amer Oil Chem Soc* 83, 899.
- Favé, G., Coste, T.C., Armand, M., 2004. Physicochemical properties of lipids: new strategies to manage fatty acid bioavailability. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 50, 815–831.
- Favé, G., Lévêque, C., Peyrot, J., Pieroni, G., Coste, T.C., Armand, M., 2007. Modulation of gastric lipolysis by the phospholipid specie: link to specific lipase-phospholipid interaction at the lipid/water interface? *The FASEB Journal* 21, A1010–A1010.
- Feingold, K.R., Grunfeld, C., 2000. Introduction to lipids and lipoproteins, in: De Groot, L.J., Chrousos, G., Dungan, K., Feingold, K.R., Grossman, A., Hershman, J.M., Koch, C., Korbonits, M., McLachlan, R., New, M., Purnell, J., Rebar, R., Singer, F., Vinik, A. (Eds.), *Endotext*. MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA).
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Pérez-Gálvez, A., 2009. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutr Res* 29, 751–760.
- Field, F.J., Albright, E.J., Mathur, S.N., 1987. Effect of dietary n-3 fatty acids on HMG-CoA reductase and ACAT activities in liver and intestine of the rabbit. *J. Lipid Res.* 28, 50–58.
- Firat, O., Makay, O., Yeniay, L., Gokce, G., Yenisey, C., Coker, A., 2017. Omega-3 fatty acids inhibit oxidative stress in a rat model of liver regeneration. *Ann Surg Treat Res* 93, 1–10.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fortin, P.R., Lew, R.A., Liang, M.H., Wright, E.A., Beckett, L.A., Chalmers, T.C., Sperling, R.I., 1995. Validation of a meta-analysis: the effects of fish oil in rheumatoid arthritis. *J Clin Epidemiol* 48, 1379–1390.
- Frankel, E.N., 1993. Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs. oxidized vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* 70, 767–772.
- Freund-Levi, Y., Basun, H., Cederholm, T., Faxén-Irving, G., Garlind, A., Grut, M., Vedin, I., Palmblad, J., Wahlund, L.-O., Eriksdotter-Jönköping, M., 2008. Omega-3 supplementation in mild to moderate Alzheimer’s disease: effects on neuropsychiatric symptoms. *Int J Geriatr Psychiatry* 23, 161–169.
- Gabbs, M., Leng, S., Devassy, J.G., Monirujjaman, M., Aukema, H.M., 2015. Advances in our understanding of oxylipins derived from dietary PUFAs. *Adv Nutr* 6, 513–540.
- Gao, H., Geng, T., Huang, T., Zhao, Q., 2017. Fish oil supplementation and insulin sensitivity: a systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Dis* 16.
- 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, 4–13.
- Gargouri, Y., Pieroni, G., Riviere, C., Sauniere, J.F., Lowe, P.A., Sarda, L., Verger, R., 1986. Kinetic assay of human gastric lipase on short- and long-chain triacylglycerol emulsions. *Gastroenterology* 91, 919–925.

- Garrel, C., Alessandri, J.-M., Guesnet, P., Al-Gubory, K.H., 2012. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 123–131.
- Gautier, T., Masson, D., Lagrost, L., 2011. Métabolisme des lipoprotéines de haute densité (HDL). *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, Risque cardiovasculaire : au-delà du LDL 3, 267–272.
- Gázquez, A., Hernández-Albaladejo, I., Larqué, E., 2017a. Docosahexaenoic acid supplementation during pregnancy as phospholipids did not improve the incorporation of this fatty acid into rat fetal brain compared with the triglyceride form. *Nutr Res* 37, 78–86.
- Gázquez, A., Ruíz-Palacios, M., Larqué, E., 2017b. DHA supplementation during pregnancy as phospholipids or TAG produces different placental uptake but similar fetal brain accretion in neonatal piglets. *Br. J. Nutr.* 118, 981–988.
- Georgiadi, A., Kersten, S., 2012. Mechanisms of gene regulation by fatty acids. *Adv Nutr* 3, 127–134. <https://doi.org/10.3945/an.111.001602>
- Gerbi, A., Debray, M., Maixent, J.M., Chanez, C., Bourre, J.M., 1993. Heterogeneous Na⁺ sensitivity of Na⁺,K⁺-ATPase isoenzymes in whole brain membranes. *J. Neurochem.* 60, 246–252.
- Gerbi, A., Zérouga, M., Debray, M., Durand, G., Chanez, C., Bourre, J.M., 1994. Effect of fish oil diet on fatty acid composition of phospholipids of brain membranes and on kinetic properties of Na⁺,K⁺-ATPase isoenzymes of weaned and adult rats. *J. Neurochem.* 62, 1560–1569.
- Gerbi, A., Zérouga, M., Maixent, J.M., Debray, M., Durand, G., Bourre, J.M., 1999. Diet deficient in alpha-linolenic acid alters fatty acid composition and enzymatic properties of Na⁺, K⁺-ATPase isoenzymes of brain membranes in the adult rat. *J. Nutr. Biochem.* 10, 230–236.
- Ghomashchi, F., Yu, B.Z., Berg, O., Jain, M.K., Gelb, M.H., 1991. Interfacial catalysis by phospholipase A2: substrate specificity in vesicles. *Biochemistry* 30, 7318–7329.
- Ghosh, S., Karin, M., 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96.
- Goetze, O., Steingoetter, A., Menne, D., van der Voort, I.R., Kwiatek, M.A., Boesiger, P., Weishaupt, D., Thumshirn, M., Fried, M., Schwizer, W., 2007. The effect of macronutrients on gastric volume responses and gastric emptying in humans: A magnetic resonance imaging study. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G11-17.
- Gohtani, S., Sirendi, M., Yamamoto, N., Kajikawa, K., Yamano, Y., 1999. Effect of droplet size on oxidation of docosahexaenoic acid in emulsion system. *Journal of Dispersion Science and Technology* 20, 1319–1325.
- Goldberg, R.J., Katz, J., 2007. A meta-analysis of the analgesic effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for inflammatory joint pain. *Pain* 129, 210–223.
- Golding, M., Wooster, T.J., 2010. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 15, 90–101.
- Golding, M., Wooster, T.J., Day, L., Xu, M., Lundin, L., Keogh, J., Clifton, P., 2011. Impact of gastric structuring on the lipolysis of emulsified lipids. *Soft Matter* 7, 3513–3523.
- Graf, B.A., Duchateau, G.S.M.J.E., Patterson, A.B., Mitchell, E.S., van Bruggen, P., Koek, J.H., Melville, S., Verkade, H.J., 2010. Age dependent incorporation of 14C-DHA into rat brain and body tissues after dosing various 14C-DHA-esters. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 83, 89–96.

- Groh-Wargo, S., Jacobs, J., Auestad, N., O'Connor, D.L., Moore, J.J., Lerner, E., 2005. Body composition in preterm infants who are fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective, randomized, controlled trial. *Pediatr. Res.* 57, 712–718.
- Grossfield, A., Feller, S.E., Pitman, M.C., 2006. A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by omega-3 polyunsaturated lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4888–4893.
- Guedes, A.C., Amaro, H.M., Barbosa, C.R., Pereira, R.D., Malcata, F.X., 2011. Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International* 44, 2721–2729.
- Guesnet, P., Alessandri, J.-M., Astorg, P., Pifferi, F., Lavalie, M., 2005. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL* 12, 333–343.
- Guillén, M.D., Goicoechea, E., 2008. Toxic oxygenated alpha,beta-unsaturated aldehydes and their study in foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 48, 119–136.
- Guimbaud, R., Moreau, J.A., Bouisson, M., Durand, S., Escourrou, J., Vaysse, N., Frexinos, J., 1997. Intraduodenal free fatty acids rather than triglycerides are responsible for the release of CCK in humans. *Pancreas* 14, 76–82.
- Guiotto, E.N., Cabezas, D.M., Diehl, B.W.K., Tomás, M.C., 2013. Characterization and emulsifying properties of different sunflower phosphatidylcholine enriched fractions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 115, 865–873.
- Haa, Y.C., Barter, P.J., 1982. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 71, 265–269.
- Hammer, M., Schieberle, P., 2013. Model studies on the key aroma compounds formed by an oxidative degradation of ω -3 fatty acids initiated by either copper(II) ions or lipoxygenase. *J. Agric. Food Chem.* 61, 10891–10900.
- Hamosh, M., 1990. Lingual and gastric lipases. *Nutrition* 6, 421–428.
- Hamosh, M., Bitman, J., Wood, L., Hamosh, P., Mehta, N.R., 1985. Lipids in milk and the first steps in their digestion. *Pediatrics* 75, 146–150.
- Hanahan, D.J., 1954. The site of action of lecithinase A of lecithin. *J. Biol. Chem.* 207, 879–884.
- Haramizu, S., Nagasawa, A., Ota, N., Hase, T., Tokimitsu, I., Murase, T., 2009. Different contribution of muscle and liver lipid metabolism to endurance capacity and obesity susceptibility of mice. *J. Appl. Physiol.* 106, 871–879.
- 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 (Lond)* 6, 8.
- Harris, W.S., 1997. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 1645S-1654S.
- Harris, W.S., Bulchandani, D., 2006. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Curr. Opin. Lipidol.* 17, 387–393.
- Hashimoto, M., Hossain, S., Yamasaki, H., Yazawa, K., Masumura, S., 1999. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on plasma membrane fluidity of aortic endothelial cells. *Lipids* 34, 1297–1304.

- He, K., Song, Y., Daviglius, M.L., Liu, K., Van Horn, L., Dyer, A.R., Goldbourt, U., Greenland, P., 2004. Fish consumption and incidence of stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Stroke* 35, 1538–1542.
- Hildebrand, P., Beglinger, C., Gyr, K., Jansen, J.B., Rovati, L.C., Zuercher, M., Lamers, C.B., Setnikar, I., Stalder, G.A., 1990. Effects of a cholecystokinin receptor antagonist on intestinal phase of pancreatic and biliary responses in man. *J. Clin. Invest.* 85, 640–646.
- Hill, A.M., Buckley, J.D., Murphy, K.J., Howe, P.R.C., 2007. Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors. *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1267–1274.
- Hiratsuka, S., Ishihara, K., Kitagawa, T., Wada, S., Yokogoshi, H., 2008. Effect of dietary docosahexaenoic acid connecting phospholipids on the lipid peroxidation of the brain in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 54, 501–506.
- Hishikawa, D., Shindou, H., Kobayashi, S., Nakanishi, H., Taguchi, R., Shimizu, T., 2008. Discovery of a lysophospholipid acyltransferase family essential for membrane asymmetry and diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2830–2835.
- Hishikawa, D., Valentine, W.J., Iizuka-Hishikawa, Y., Shindou, H., Shimizu, T., 2017. Metabolism and functions of docosahexaenoic acid-containing membrane glycerophospholipids. *FEBS Lett.* 591, 2730–2744.
- Hogarth, C.A., Roy, A., Ebert, D.L., 2003. Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 135, 219–229.
- Holman, R.T., Elmer, O.C., 1947. The rates of oxidation of unsaturated fatty acids and esters. *J Am Oil Chem Soc* 24, 127–129.
- Horrocks, L.A., Farooqui, A.A., 2004. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 70, 361–372.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131.
- Hou, T.Y., McMurray, D.N., Chapkin, R.S., 2016. Omega-3 fatty acids, lipid rafts, and T cell signaling. *Eur J Pharmacol* 785, 2–9.
- Howe, P., Buckley, J., 2014. Metabolic health benefits of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Mil Med* 179, 138–143.
- Hu, F.B., Bronner, L., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rexrode, K.M., Albert, C.M., Hunter, D., Manson, J.E., 2002. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *JAMA* 287, 1815–1821.
- Hudert, C.A., Weylandt, K.H., Lu, Y., Wang, J., Hong, S., Dignass, A., Serhan, C.N., Kang, J.X., 2006. Transgenic mice rich in endogenous omega-3 fatty acids are protected from colitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11276–11281.
- Hui, D.Y., Howles, P.N., 2002. Carboxyl ester lipase: structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 43, 2017–2030.
- Hussain, M.M., 2014. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr. Opin. Lipidol.* 25, 200–206.
- Hussain, M.M., 2000. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* 148, 1–15.

- Hussain, M.M., Strickland, D.K., Bakillah, A., 1999. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu. Rev. Nutr.* 19, 141–172.
- Hussein, N., Ah-Sing, E., Wilkinson, P., Leach, C., Griffin, B.A., Millward, D.J., 2005. Long-chain conversion of [¹³C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *J. Lipid Res.* 46, 269–280.
- Igarashi, M., DeMar, J.C., Ma, K., Chang, L., Bell, J.M., Rapoport, S.I., 2007. Upregulated liver conversion of alpha-linolenic acid to docosahexaenoic acid in rats on a 15 week n-3 PUFA-deficient diet. *J. Lipid Res.* 48, 152–164.
- Ikeda, I., Yoshida, H., Tomooka, M., Yosef, A., Imaizumi, K., Tsuji, H., Seto, A., 1998. Effects of long-term feeding of marine oils with different positional distribution of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on lipid metabolism, eicosanoid production, and platelet aggregation in hypercholesterolemic rats. *Lipids* 33, 897–904.
- Innis, S.M., 1993. The colostrum-deprived piglet as a model for study of infant lipid nutrition. *J Nutr* 123, 386–390.
- Isaacs, P.E., Ladas, S., Forgacs, I.C., Dowling, R.H., Ellam, S.V., Adrian, T.E., Bloom, S.R., 1987. Comparison of effects of ingested medium- and long-chain triglyceride on gallbladder volume and release of cholecystokinin and other gut peptides. *Dig. Dis. Sci.* 32, 481–486.
- Ishii, F., Nii, T., 2005. Properties of various phospholipid mixtures as emulsifiers or dispersing agents in nanoparticle drug carrier preparations. *Colloids Surf B Biointerfaces* 41, 257–262.
- ISO 9936, 2016. Animal and vegetable fats and oils -- Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography.
- Jacobsen, C., 2015. Some strategies for the stabilization of long chain n-3 PUFA-enriched foods: A review. *European Journal of Lipid Science and Technology* 117, 1853–1866.
- Jacobson, T.A., Glickstein, S.B., Rowe, J.D., Soni, P.N., 2012. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on low-density lipoprotein cholesterol and other lipids: a review. *J Clin Lipidol* 6, 5–18.
- Jain, M.K., Rogers, J., 1989. Substrate specificity for interfacial catalysis by phospholipase A2 in the scooting mode. *Biochim. Biophys. Acta* 1003, 91–97.
- Jean Dallongeville, 2006. Le métabolisme des lipoprotéines. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 41, 55–60.
- Jensen, C.L., Prager, T.C., Fraley, J.K., Chen, H., Anderson, R.E., Heird, W.C., 1997. Effect of dietary linoleic/alpha-linolenic acid ratio on growth and visual function of term infants. *J. Pediatr.* 131, 200–209.
- Jensen, M.M., Sørensen, H., Høy, C.E., 1996. Influence of triacylglycerol structure and fatty acid profile of dietary fats on milk triacylglycerols in the rat. A two-generation study. *Lipids* 31, 187–192.
- Jiang, X.C., Bruce, C., Mar, J., Lin, M., Ji, Y., Francone, O.L., Tall, A.R., 1999. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J. Clin. Invest.* 103, 907–914.
- Jiang, Y., Noh, S.K., Koo, S.I., 2001. Egg phosphatidylcholine decreases the lymphatic absorption of cholesterol in rats. *J. Nutr.* 131, 2358–2363.
- Jonas, A., 2000. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 245–256.

- Jones, M.L., Mark, P.J., Mori, T.A., Keelan, J.A., Waddell, B.J., 2013. Maternal dietary omega-3 fatty acid supplementation reduces placental oxidative stress and increases fetal and placental growth in the rat. *Biol. Reprod.* 88, 37.
- Jump, D.B., 2008. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 242–247.
- Kabir, M., Skurnik, G., Naour, N., Pechtner, V., Meugnier, E., Rome, S., Quignard-Boulangé, A., Vidal, H., Slama, G., Clément, K., Guerre-Millo, M., Rizkalla, S.W., 2007. Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. *Am. J. Clin. Nutr.* 86, 1670–1679.
- Kaffarnik, S., Ehlers, I., Gröbner, G., Schleucher, J., Vetter, W., 2013. Two-Dimensional ³¹P,¹H NMR Spectroscopic Profiling of Phospholipids in Cheese and Fish. *J. Agric. Food Chem.* 61, 7061–7069.
- Kalmijn, S., Feskens, E.J., Launer, L.J., Kromhout, D., 1997a. Polyunsaturated fatty acids, antioxidants, and cognitive function in very old men. *Am. J. Epidemiol.* 145, 33–41.
- Kalmijn, S., Launer, L.J., Ott, A., Witteman, J.C., Hofman, A., Breteler, M.M., 1997b. Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.* 42, 776–782.
- Katan, M.B., Deslypere, J.P., van Birgelen, A.P., Penders, M., Zegwaard, M., 1997. Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. *J. Lipid Res.* 38, 2012–2022.
- Kaur, N., Chugh, V., Gupta, A.K., 2014. Essential fatty acids as functional components of foods- a review. *J Food Sci Technol* 51, 2289–2303.
- Kazachkov, M., Chen, Q., Wang, L., Zou, J., 2008. Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids* 43, 895–902.
- Ke, P.J., Ackman, R.G., 1973. Bunsen coefficient for oxygen in marine oils at various temperatures determined by an exponential dilution method with a polarographic oxygen electrode. *J Am Oil Chem Soc* 50, 429–435.
- Khan, M.A., Shahidi, F., 2000. Tocopherols and phospholipids enhance the oxidative stability of borage and evening primrose triacylglycerols. *Journal of Food Lipids* 7, 143–150.
- Kheiriloom, A., Yoshida, K.-I., Katoh, S., Sada, E., 1992. Substrate specificity and positional preference of a lipoprotein lipase. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73, 403–404.
- Kikugawa, K., 2001. Effect of omega 6 and omega 3 fatty acid supplementation on rat tissue lipid peroxidation. *World Rev Nutr Diet* 88, 28–34.
- Kikugawa, K., Yasuhara, Y., Ando, K., Koyama, K., Hiramoto, K., Suzuki, M., 2003. Effect of supplementation of n-3 polyunsaturated fatty acids on oxidative stress-induced DNA damage of rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 26, 1239–1244.
- King, M.F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W., 1992a. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system. *J Am Oil Chem Soc* 69, 545–551.
- King, M.F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W., 1992b. Effects of phospholipids on lipid oxidation of a salmon oil model system. *J Am Oil Chem Soc* 69, 237–242.
- Kitajka, K., Sinclair, A.J., Weisinger, R.S., Weisinger, H.S., Mathai, M., Jayasooriya, A.P., Halver, J.E., Puskás, L.G., 2004. Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10931–10936.

- Kitson, A.P., Metherel, A.H., Chen, C.T., Domenichiello, A.F., Trépanier, M.-O., Berger, A., Bazinet, R.P., 2016. Effect of dietary docosahexaenoic acid (DHA) in phospholipids or triglycerides on brain DHA uptake and accretion. *J. Nutr. Biochem.* 33, 91–102.
- Kliwer, S.A., Sundseth, S.S., Jones, S.A., Brown, P.J., Wisely, G.B., Koble, C.S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T.M., Lenhard, J.M., Lehmann, J.M., 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4318–4323.
- Kolanowski, W., Laufenberg, G., 2006. Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *Eur Food Res Technol* 222, 472–477.
- Komaiko, J., Sastrosubroto, A., McClements, D.J., 2015. Formation of oil-in-water emulsions from natural emulsifiers using spontaneous emulsification: sunflower phospholipids. *J. Agric. Food Chem.* 63, 10078–10088.
- Kremmyda, L.-S., Vlachava, M., Noakes, P.S., Diaper, N.D., Miles, E.A., Calder, P.C., 2011. Atopy risk in infants and children in relation to early exposure to fish, oily fish, or long-chain omega-3 fatty acids: a systematic review. *Clin Rev Allergy Immunol* 41, 36–66.
- Kubo, K., Saito, M., Tadokoro, T., Maekawa, A., 2000. Preferential incorporation of docosahexaenoic acid into nonphosphorus lipids and phosphatidylethanolamine protects rats from dietary DHA-stimulated lipid peroxidation. *J Nutr* 130, 1749–1759.
- Kubo, K., Saito, M., Tadokoro, T., Maekawa, A., 1998. Dietary docosahexaenoic acid dose not promote lipid peroxidation in rat tissue to the extent expected from peroxidizability index of the lipids. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62, 1698–1706.
- Kubo, K., Saito, M., Tadokoro, T., Maekawa, A., 1997. Changes in susceptibility of tissues to lipid peroxidation after ingestion of various levels of docosahexaenoic acid and vitamin E. *Br. J. Nutr.* 78, 655–669.
- Küllenberg, D., Taylor, L.A., Schneider, M., Massing, U., 2012. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis* 11, 3.
- Kuratko, C.N., Salem, N., 2009. Biomarkers of DHA status. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 111–118.
- Labuza, T.P., Jr, L.R.D., 1971. Kinetics of lipid oxidation in foods. *C R C Critical Reviews in Food Technology* 2, 355–405.
- Lacombe, R.J.S., Chouinard-Watkins, R., Bazinet, R.P., 2018. Brain docosahexaenoic acid uptake and metabolism. *Mol. Aspects Med.* 64, 109–134.
- Lai, L.T.Y., Bruce German, J., 1993. Modulation of fatty acid composition in murine brain by dietary unsaturated fats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 4, 463–471.
- Larsson, A., Erlanson-Albertsson, C., 1986. Effect of phosphatidylcholine and free fatty acids on the activity of pancreatic lipase-colipase. *Biochim. Biophys. Acta* 876, 543–550.
- Larsson, K., Cavonius, L., Alminger, M., Undeland, I., 2012. Oxidation of cod liver oil during gastrointestinal in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem.* 60, 7556–7564.
- Larsson, K., Harrysson, H., Havenaar, R., Alminger, M., Undeland, I., 2016a. Formation of malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) in fish and fish oil during dynamic gastrointestinal in vitro digestion. *Food Funct* 7, 1176–1187.
- Larsson, K., Tullberg, C., Alminger, M., Havenaar, R., Undeland, I., 2016b. Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-hexenal are formed during dynamic gastrointestinal in vitro digestion of cod liver oils. *Food Funct* 7, 3458–3467.

- Lasic, D.D., 1993. *Liposomes : from physics to applications*. Elsevier, Amsteram.
- Lauritzen, L., Brambilla, P., Mazzocchi, A., Harsløf, L.B.S., Ciappolino, V., Agostoni, C., 2016. DHA Effects in brain development and function. *Nutrients* 8.
- Le Kim, D., Betzing, H., 1976. Intestinal absorption of polyunsaturated phosphatidylcholine in the rat. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1321–1331.
- Leaf, A., Xiao, Y.-F., Kang, J.X., 2002. Interactions of n-3 fatty acids with ion channels in excitable tissues. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 67, 113–120.
- Leal-Calderon, F., Cansell, M., 2012. The design of emulsions and their fate in the body following enteral and parenteral routes. *Soft Matter* 8, 10213–10225.
- LeBlanc, M.J., Brunet, S., Bouchard, G., Lamireau, T., Yousef, I.M., Gavino, V., Lévy, E., Tuchweber, B., 2003. Effects of dietary soybean lecithin on plasma lipid transport and hepatic cholesterol metabolism in rats. *J. Nutr. Biochem.* 14, 40–48.
- Lecomte, M., Bourlieu, C., Meugnier, E., Penhoat, A., Cheillan, D., Pineau, G., Loizon, E., Trauchessec, M., Claude, M., Ménard, O., Géloën, A., Laugerette, F., Michalski, M.-C., 2015. Milk polar lipids affect in vitro digestive lipolysis and postprandial lipid metabolism in mice. *J. Nutr.* 145, 1770–1777.
- Lee, J., Choe, E., 2009. Effects of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine on the photooxidation of canola oil. *J. Food Sci.* 74, C481-486.
- Lee, L.K., Shahar, S., Chin, A.-V., Yusoff, N.A.M., 2013. Docosahexaenoic acid-concentrated fish oil supplementation in subjects with mild cognitive impairment (MCI): a 12-month randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology (Berl.)* 225, 605–612.
- Létondor, A., Buaud, B., Vaysse, C., Fonseca, L., Herrouin, C., Servat, B., Layé, S., Pallet, V., Alfos, S., 2014. Erythrocyte DHA level as a biomarker of DHA status in specific brain regions of n-3 long-chain PUFA-supplemented aged rats. *British Journal of Nutrition* 112, 1805–1818.
- Li, D., Hu, X., 2009. Fish and its multiple human health effects in times of threat to sustainability and affordability: are there alternatives? *Asia Pac J Clin Nutr* 18, 553–563.
- Litman, B.J., Mitchell, D.C., 1996. A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function. *Lipids* 31 Suppl, S193-197.
- Liu, L., Bartke, N., Van Daele, H., Lawrence, P., Qin, X., Park, H.G., Kothapalli, K., Windust, A., Bindels, J., Wang, Z., Brenna, J.T., 2014. Higher efficacy of dietary DHA provided as a phospholipid than as a triglyceride for brain DHA accretion in neonatal piglets. *J. Lipid Res.* 55, 531–539.
- Liu, L., Hu, Q., Wu, H., Xue, Y., Cai, L., Fang, M., Liu, Z., Yao, P., Wu, Y., Gong, Z., 2016. Protective role of n6/n3 PUFA supplementation with varying DHA/EPA ratios against atherosclerosis in mice. *J. Nutr. Biochem.* 32, 171–180.
- Long, E.K., Picklo, M.J., 2010. Trans-4-hydroxy-2-hexenal, a product of n-3 fatty acid peroxidation: make some room HNE. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1–8.
- Lorente-Cebrián, S., Costa, A.G.V., Navas-Carretero, S., Zabala, M., Martínez, J.A., Moreno-Aliaga, M.J., 2013. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *J. Physiol. Biochem.* 69, 633–651.
- Lowe, M.E., 2000. Properties and function of pancreatic lipase related protein 2. *Biochimie* 82, 997–1004.
- Lu, F.S.H., Nielsen, N.S., Baron, C.P., Diehl, B.W.K., Jacobsen, C., 2013. Impact of primary amine group from aminophospholipids and amino acids on marine phospholipids stability: non-enzymatic browning and lipid oxidation. *Food Chem* 141, 879–888.

- Lu, F.S.H., Nielsen, N.S., Baron, C.P., Jacobsen, C., 2017. Marine phospholipids: The current understanding of their oxidation mechanisms and potential uses for food fortification. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57, 2057–2070.
- Lu, F.S.H., Nielsen, N.S., Baron, C.P., Jacobsen, C., 2012a. Oxidative degradation and non-enzymatic browning due to the interaction between oxidised lipids and primary amine groups in different marine PL emulsions. *Food Chem* 135, 2887–2896.
- Lu, F.S.H., Nielsen, N.S., Baron, C.P., Jensen, L.H.S., Jacobsen, C., 2012b. Physico-chemical properties of marine phospholipid emulsions. *J Am Oil Chem Soc* 89, 2011–2024.
- Lu, F.S.H., Nielsen, N.S., Timm-Heinrich, M., Jacobsen, C., 2011. Oxidative stability of marine phospholipids in the liposomal form and their applications. *Lipids* 46, 3–23.
- Majou, D., 2015. Alzheimer's disease : origins, mechanisms, people at risk and prevention by DHA (omega-3 fatty acid). Actia, Paris.
- Maki, K.C., Reeves, M.S., Farmer, M., Griinari, M., Berge, K., Vik, H., Hubacher, R., Rains, T.M., 2009. Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women. *Nutr Res* 29, 609–615.
- Malasanos, T.H., Stacpoole, P.W., 1991. Biological effects of omega-3 fatty acids in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 14, 1160–1179.
- Mancuso, J.R., McClements, D.J., Decker, E.A., 1999. The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4112–4116.
- Mansbach, C.M., 1977. The origin of chylomicron phosphatidylcholine in the rat. *J Clin Invest* 60, 411–420.
- Mansbach, C.M., 1975. Effect of fat feeding on complex lipid synthesis in hamster intestine. *Gastroenterology* 68, 708–714.
- Mansbach, C.M., Gorelick, F., 2007. Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 293, G645-650.
- Mao, L., Xu, D., Yang, J., Yuan, F., Zhao, J., Gao, Y., 2009. Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of β -Carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. *Food Technology and Biotechnology* 47, 336–342.
- Marchioli, R., Barzi, F., Bomba, E., Chieffo, C., Di Gregorio, D., Di Mascio, R., Franzosi, M.G., Geraci, E., Levantesi, G., Maggioni, A.P., Mantini, L., Marfisi, R.M., Mastrogiuseppe, G., Mininni, N., Nicolosi, G.L., Santini, M., Schweiger, C., Tavazzi, L., Tognoni, G., Tucci, C., Valagussa, F., GISSI-Prevenzione Investigators, 2002. Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation* 105, 1897–1903.
- 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. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G1607-1613.
- 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.

- Martins, I.J., Mortimer, B.C., Miller, J., Redgrave, T.G., 1996. Effects of particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants. *J. Lipid Res.* 37, 2696–2705.
- Massiot, D., Fayon, F., Capron, M., King, I., Calvé, S.L., Alonso, B., Durand, J.-O., Bujoli, B., Gan, Z., Hoatson, G., 2002. Modelling one- and two-dimensional solid-state NMR spectra. *Magnetic Resonance in Chemistry* 40, 70–76.
- Mathews, S.A., Oliver, W.T., Phillips, O.T., Odle, J., Diersen-Schade, D.A., Harrell, R.J., 2002. Comparison of triglycerides and phospholipids as supplemental sources of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids in piglets. *J. Nutr.* 132, 3081–3089.
- Mattson, F.H., Volpenhein, R.A., 1964. The digestion and absorption of triglycerides. *J. Biol. Chem.* 239, 2772–2777.
- McClements, D., Decker, E.A., 2000. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science* 65, 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., Li, Y., 2010. Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Adv Colloid Interface Sci* 159, 213–228.
- McCoy, M.G., Sun, G.-S., Marchadier, D., Maugeais, C., Glick, J.M., Rader, D.J., 2002. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J. Lipid Res.* 43, 921–929.
- McMullen, P.D., Bhattacharya, S., Woods, C.G., Sun, B., Yarborough, K., Ross, S.M., Miller, M.E., McBride, M.T., LeCluyse, E.L., Clewell, R.A., Andersen, M.E., 2014. A map of the PPAR α transcription regulatory network for primary human hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 209, 14–24.
- Mei, L., Decker, E.A., McClements, D.J., 1998. Evidence of iron association with emulsion D droplets and its impact on lipid oxidation. *J. Agric. Food Chem.* 46, 5072–5077.
- Méndez, L., Pazos, M., Gallardo, J.M., Torres, J.L., Pérez-Jiménez, J., Nogués, R., Romeu, M., Medina, I., 2013. Reduced protein oxidation in Wistar rats supplemented with marine ω 3 PUFAs. *Free Radic. Biol. Med.* 55, 8–20.
- Michalski, M.C., Genot, C., Gayet, C., Lopez, C., Fine, F., Joffre, F., Vendeuvre, J.L., Bouvier, J., Chardigny, J.M., Raynal-Ljutovac, K., Steering Committee of RMT LISTRAL, 2013. Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 52, 354–373.
- Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Drai, J., Thérond, P., 2008. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique : aspects analytiques. *Annales de Biologie Clinique* 66, 605–620.
- Middleton, S.J., Naylor, S., Woolner, J., Hunter, J.O., 2002. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of essential fatty acid supplementation in the maintenance of remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 16, 1131–1135.
- Miles, E.A., Calder, P.C., 2012. Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *Br. J. Nutr.* 107 Suppl 2, S171-184.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W.,

- Brodkorb, A., 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct* 5, 1113–1124.
- Miranda, J., Eseberri, I., Lasa, A., Portillo, M.P., 2018. Lipid metabolism in adipose tissue and liver from diet-induced obese rats: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley strains. *J. Physiol. Biochem.* 74, 655–666.
- Molinar-Toribio, E., Pérez-Jiménez, J., Ramos-Romero, S., Romeu, M., Giralt, M., Taltavull, N., Muñoz-Cortés, M., Jáuregui, O., Méndez, L., Medina, I., Torres, J.L., 2015. Effect of n-3 PUFA supplementation at different EPA:DHA ratios on the spontaneously hypertensive obese rat model of the metabolic syndrome. *Br. J. Nutr.* 113, 878–887.
- Mori, T.A., Burke, V., Puddey, I.B., Watts, G.F., O’Neal, D.N., Best, J.D., Beilin, L.J., 2000. Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects on serum lipids and lipoproteins, LDL particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 1085–1094.
- 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.
- Moussa, M., Garcia, J., Ghisolfi, J., Périquet, B., Thouvenot, J.P., 1996. Dietary essential fatty acid deficiency differentially affects tissues of rats. *J. Nutr.* 126, 3040–3045.
- Moussaoui, N., Cansell, M., Denizot, A., 2002. Marinosomes, marine lipid-based liposomes: physical characterization and potential application in cosmetics. *Int J Pharm* 242, 361–365.
- Mozaffarian, D., Geelen, A., Brouwer, I.A., Geleijnse, J.M., Zock, P.L., Katan, M.B., 2005. Effect of fish oil on heart rate in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Circulation* 112, 1945–1952.
- Mun, S., Decker, E.A., McClements, D.J., 2007. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. *Food Research International* 40, 770–781.
- Murota, K., Takagi, M., Watanabe, Y., Tokumura, A., Ohkubo, T., 2018. Roe-derived phospholipid administration enhances lymphatic docosahexaenoic acid-containing phospholipid absorption in unanesthetized rats. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 139, 40–48.
- Nacka, F., Cansell, M., Entressangles, B., 2001. In vitro behavior of marine lipid-based liposomes. Influence of pH, temperature, bile salts, and phospholipase A2. *Lipids* 36, 35–42.
- Nakamura, M.T., Nara, T.Y., 2004. Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 345–376.
- Nara, E., Miyashita, K., Ota, T., 1997. Oxidative stability of liposomes prepared from soybean PC, chicken egg PC, and salmon egg PC. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1736–1738.
- Negre-Salvayre, A., Auge, N., Ayala, V., Basaga, H., Boada, J., Brenke, R., Chapple, S., Cohen, G., Feher, J., Grune, T., Lengyel, G., Mann, G.E., Pamplona, R., Poli, G., Portero-Otin, M., Riahi, Y., Salvayre, R., Sasson, S., Serrano, J., Shamni, O., Siems, W., Siow, R.C.M., Wiswedel, I., Zarkovic, K., Zarkovic, N., 2010. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* 44, 1125–1171.
- Nguyen, H.T., Marquis, M., Anton, M., Marze, S., 2019a. Studying the real-time interplay between triglyceride digestion and lipophilic micronutrient bioaccessibility using droplet microfluidics. 1 lab on a chip method. *Food Chemistry* 275, 523–529.
- Nguyen, H.T., Marquis, M., Anton, M., Marze, S., 2019b. Studying the real-time interplay between triglyceride digestion and lipophilic micronutrient bioaccessibility using droplet microfluidics. 2 application to various oils and (pro)vitamins. *Food Chemistry* 275, 661–667.

- Nguyen, L.N., Ma, D., Shui, G., Wong, P., Cazenave-Gassiot, A., Zhang, X., Wenk, M.R., Goh, E.L.K., Silver, D.L., 2014. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* 509, 503–506.
- Nilsson, A., 1968. Intestinal absorption of lecithin and lysolecithin by lymph fistula rats. *Biochim. Biophys. Acta* 152, 379–390.
- Nishimukai, M., Hara, H., Aoyama, Y., 2003. Enteral administration of soyabean lecithin enhanced lymphatic absorption of triacylglycerol in rats. *British Journal of Nutrition* 90, 565–571.
- Noh, S.K., Koo, S.I., 2003. Egg sphingomyelin lowers the lymphatic absorption of cholesterol and alpha-tocopherol in rats. *J. Nutr.* 133, 3571–3576.
- Novak, T.E., Babcock, T.A., Jho, D.H., Helton, W.S., Espat, N.J., 2003. NF-kappa B inhibition by omega - 3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 284, L84-89.
- O'Brien, B.C., Corrigan, S.M., 1988. Influence of dietary soybean and egg lecithins on lipid responses in cholesterol-fed guinea pigs. *Lipids* 23, 647–650.
- Oh, Y., Jin, Y., Park, Y., 2015. Synergic hypocholesterolaemic effect of n-3 PUFA and oestrogen by modulation of hepatic cholesterol metabolism in female rats. *Br. J. Nutr.* 114, 1766–1773.
- Osborne, T.F., 2000. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.* 275, 32379–32382.
- Oscarsson, J., Hurt-Camejo, E., 2017. Omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid and their mechanisms of action on apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans: a review. *Lipids Health Dis* 16.
- Ottestad, I., Nordvi, B., Vogt, G., Holck, M., Halvorsen, B., Brønner, K.W., Retterstøl, K., Holven, K.B., Nilsson, A., Ulven, S.M., 2016. Bioavailability of n-3 fatty acids from n-3-enriched foods and fish oil with different oxidative quality in healthy human subjects: a randomised single-meal cross-over study. *J Nutr Sci* 5.
- Pandolfe, W.D., 1981. Effect of dispersed and continuous phase viscosity on droplet size of emulsions generated by homogenization. *Journal of Dispersion Science and Technology* 2, 459–474.
- Parthasarathi, S., Muthukumar, S.P., Anandharamakrishnan, C., 2016. The influence of droplet size on the stability, in vivo digestion, and oral bioavailability of vitamin E emulsions. *Food Funct* 7, 2294–2302.
- Patton, J.S., Carey, M.C., 1981. Inhibition of human pancreatic lipase-colipase activity by mixed bile salt-phospholipid micelles. *Am. J. Physiol.* 241, G328-336.
- Pawar, A., Jump, D.B., 2003. Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 278, 35931–35939.
- Peinado, I., Miles, W., Koutsidis, G., 2016. Odour characteristics of seafood flavour formulations produced with fish by-products incorporating EPA, DHA and fish oil. *Food Chemistry* 212, 612–619.
- Phan, C.T., Tso, P., 2001. Intestinal lipid absorption and transport. *Front. Biosci.* 6, D299-319.
- Pimentel, L., Fontes, A.L., Salsinha, S., Machado, M., Correia, I., Gomes, A.M., Pintado, M., Rodríguez-Alcalá, L.M., 2018. Suitable simple and fast methods for selective isolation of phospholipids as a tool for their analysis. *Electrophoresis*.
- Polheim, D., David, J.S.K., Schultz, F.M., Wylie, M.B., Johnston, J.M., 1973. Regulation of triglyceride biosynthesis in adipose and intestinal tissue. *J. Lipid Res.* 14, 415–421.

- Porsgaard, T., Høy, C.-E., 2000. Lymphatic transport in rats of several dietary fats differing in fatty acid profile and triacylglycerol structure. *J Nutr* 130, 1619–1624.
- Poynter, M.E., Daynes, R.A., 1998. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J. Biol. Chem.* 273, 32833–32841.
- Querques, G., Forte, R., Souied, E.H., 2011. Retina and omega-3. *J Nutr Metab* 2011.
- Quinn, J.F., Raman, R., Thomas, R.G., Yurko-Mauro, K., Nelson, E.B., Van Dyck, C., Galvin, J.E., Emond, J., Jack, C.R., Weiner, M., Shinto, L., Aisen, P.S., 2010. Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease: a randomized trial. *JAMA* 304, 1903–1911.
- Raatz, S.K., Redmon, J.B., Wimmergren, N., Donadio, J.V., Bibus, D.M., 2009. Enhanced absorption of omega-3 fatty acids from emulsified compared with encapsulated fish oil. *Journal of the American Dietetic Association* 109, 1076.
- Ramaiyan, B., Bettadahalli, S., Talahalli, R.R., 2016. Dietary omega-3 but not omega-6 fatty acids down-regulate maternal dyslipidemia induced oxidative stress: A three generation study in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 477, 887–894.
- Ramaprasad, T.R., Baskaran, V., Krishnakantha, T.P., Lokesh, B.R., 2005. Modulation of antioxidant enzyme activities, platelet aggregation and serum prostaglandins in rats fed spray-dried milk containing n-3 fatty acid. *Mol. Cell. Biochem.* 280, 9–16.
- Ramasamy, I., 2014. Recent advances in physiological lipoprotein metabolism. *Clin. Chem. Lab. Med.* 52, 1695–1727.
- Ramprasath, V.R., Eyal, I., Zchut, S., Jones, P.J.H., 2013. Enhanced increase of omega-3 index in healthy individuals with response to 4-week n-3 fatty acid supplementation from krill oil versus fish oil. *Lipids Health Dis* 12, 178–199.
- Ramprasath, V.R., Eyal, I., Zchut, S., Shafat, I., Jones, P.J.H., 2015. Supplementation of krill oil with high phospholipid content increases sum of EPA and DHA in erythrocytes compared with low phospholipid krill oil. *Lipids Health Dis* 14, 142.
- Rapoport, S.I., 2008. Arachidonic acid and the brain. *J. Nutr.* 138, 2515–2520.
- Raz, A., Kamin-Belsky, N., Przeddecki, F., Obukowicz, M., 1998. Dietary fish oil inhibits $\Delta 6$ -desaturase activity in vivo. *J Amer Oil Chem Soc* 75, 241–245.
- Redgrave, T.G., 2004. Chylomicron metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 79–82.
- Reichlmayr-Lais, A.M., Stangl, G.I., Kirchgessner, M., Eder, K., 1994. Fatty acid composition of brain and heart of rats fed various dietary oils. *Nutrition Research* 14, 829–840.
- Rice, D.S., Calandria, J.M., Gordon, W.C., Jun, B., Zhou, Y., Gelfman, C.M., Li, S., Jin, M., Knott, E.J., Chang, B., Abuin, A., Issa, T., Potter, D., Platt, K.A., Bazan, N.G., 2015. Adiponectin receptor 1 conserves docosahexaenoic acid and promotes photoreceptor cell survival. *Nat Commun* 6, 6228.
- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K., 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391, 79–82.
- Rode, H.N., Szamel, M., Schneider, S., Resch, K., 1982. Phospholipid metabolism of stimulated lymphocytes. Preferential incorporation of polyunsaturated fatty acids into plasma membrane phospholipid upon stimulation with concanavalin A. *Biochim. Biophys. Acta* 688, 66–74.
- Rogalska, E., Ransac, S., Verger, R., 1990. Stereoselectivity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglycerides by gastric and pancreatic lipases. *J. Biol. Chem.* 265, 20271–20276.

- Rossmesl, M., Jilkova, Z.M., Kuda, O., Jelenik, T., Medrikova, D., Stankova, B., Kristinsson, B., Haraldsson, G.G., Svensen, H., Stoknes, I., Sjövall, P., Magnusson, Y., Balvers, M.G.J., Verhoeckx, K.C.M., Tvrzicka, E., Bryhn, M., Kopecky, J., 2012. Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS ONE* 7, e38834.
- Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, M.J.A., Millington, K.J., 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet* 17, 449–459.
- Sae-leaw, T., Benjakul, S., 2014. Fatty acid composition, lipid oxidation, and fishy odour development in seabass (*Lates calcarifer*) skin during iced storage. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116, 885–894.
- Saito, M., Kubo, K., 2003. Relationship between tissue lipid peroxidation and peroxidizability index after alpha-linolenic, eicosapentaenoic, or docosahexaenoic acid intake in rats. *Br. J. Nutr.* 89, 19–28.
- Salem, N., Litman, B., Kim, H.Y., Gawrisch, K., 2001. Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids* 36, 945–959.
- Samdani, G.K., McClements, D.J., Decker, E.A., 2018. Impact of phospholipids and tocopherols on the oxidative stability of soybean oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 66, 3939–3948.
- Sato, Y., 1970. The metabolic fate of lysolecithin administered into rat duodenal lumen. *Tohoku J. Exp. Med.* 100, 277–287.
- Schaich, K.M., 2012. Thinking outside the classical chain reaction box of lipid oxidation. *Lipid Technology* 24, 55–58.
- Schmitz, G., Ecker, J., 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 47, 147–155.
- Schnebelen, C., Grégoire, S., Pasquis, B., Joffre, C., Creuzot-Garcher, C.P., Bron, A.M., Bretillon, L., Acar, N., 2009. Dietary n-3 and n-6 PUFA enhance DHA incorporation in retinal phospholipids without affecting PGE(1) and PGE (2) levels. *Lipids* 44, 465–470.
- Schrader, M., Costello, J., Godinho, L.F., Islinger, M., 2015. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 38, 681–702.
- Schrader, M., Fahimi, H.D., 2006. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 1755–1766.
- Schram, L.B., Nielsen, C.J., Porsgaard, T., Nielsen, N.S., Holm, R., Mu, H., 2007. Food matrices affect the bioavailability of (n-3) polyunsaturated fatty acids in a single meal study in humans. *Food Research International* 40, 1062–1068.
- Schuchardt, J.P., Schneider, I., Meyer, H., Neubronner, J., von Schacky, C., Hahn, A., 2011. Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations--a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil. *Lipids Health Dis* 10, 145.
- Scow, R.O., Stein, Y., Stein, O., 1967. Incorporation of dietary lecithin and lysolecithin into lymph chylomicrons in the rat. *J. Biol. Chem.* 242, 4919–4924.
- Sehl, A., Couëdelo, L., Fonseca, L., Vaysse, C., Cansell, M., 2018. A critical assessment of transmethylation procedures for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid quantification of lipid classes. *Food Chemistry* 251, 1–8.
- Serhan, C.N., Chiang, N., Van Dyke, T.E., 2008. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 349–361.

- Serra-Majem, L., Nissensohn, M., Øverby, N.C., Fekete, K., 2012. Dietary methods and biomarkers of omega 3 fatty acids: a systematic review. *Br. J. Nutr.* 107 Suppl 2, S64-76.
- Shafi, S., Brady, S.E., Bensadoun, A., Havel, R.J., 1994. Role of hepatic lipase in the uptake and processing of chylomicron remnants in rat liver. *J. Lipid Res.* 35, 709–720.
- 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 Research International* 27, 555–562.
- Shaikh, S.R., Edidin, M., 2006. Polyunsaturated fatty acids, membrane organization, T cells, and antigen presentation. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 1277–1289.
- Shang, T., Liu, L., Zhou, J., Zhang, M., Hu, Q., Fang, M., Wu, Y., Yao, P., Gong, Z., 2017. Protective effects of various ratios of DHA/EPA supplementation on high-fat diet-induced liver damage in mice. *Lipids Health Dis* 16.
- Shelness, G.S., Sellers, J.A., 2001. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 151–157.
- Shimada, Y., Ogawa, J., Watanabe, Y., Nagao, T., Kawashima, A., Kobayashi, T., Shimizu, S., 2003. Regiospecific analysis by ethanolysis of oil with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Lipids* 38, 1281–1286.
- Simopoulos, A.P., 2010. The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications. *OCL* 17, 267–275.
- Simopoulos, A.P., 2002. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: The epidemiological evidence. *Environ Health Prev Med* 6, 203–209.
- Singer, A.G., Ghomashchi, F., Le Calvez, C., Bollinger, J., Bezzine, S., Rouault, M., Sadilek, M., Nguyen, E., Lazdunski, M., Lambeau, G., Gelb, M.H., 2002. Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* 277, 48535–48549.
- Singh, H., Sarkar, A., 2011. Behaviour of protein-stabilised emulsions under various physiological conditions. *Adv Colloid Interface Sci* 165, 47–57.
- Singh, H., Ye, A., Horne, D., 2009. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. *Prog. Lipid Res.* 48, 92–100.
- Sinn, N., Milte, C.M., Street, S.J., Buckley, J.D., Coates, A.M., Petkov, J., Howe, P.R.C., 2012. Effects of n-3 fatty acids, EPA v. DHA, on depressive symptoms, quality of life, memory and executive function in older adults with mild cognitive impairment: a 6-month randomised controlled trial. *Br. J. Nutr.* 107, 1682–1693.
- Siriwardhana, N., Kalupahana, N.S., Moustaid-Moussa, N., 2012. Chapter 13 - Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, in: Kim, S.-K. (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research, Marine Medicinal Foods*. Academic Press, pp. 211–222.
- Sommer Hartvigsen, M., Mu, H., Sørig Hougaard, K., Lund, S.P., Xu, X., Høy, C.-E., 2004. Influence of dietary triacylglycerol structure and level of n-3 fatty acids administered during development on brain phospholipids and memory and learning ability of rats. *Ann. Nutr. Metab.* 48, 16–27.
- Song, J.H., Fujimoto, K., Miyazawa, T., 2000. Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *J. Nutr.* 130, 3028–3033.
- Song, J.H., Miyazawa, T., 2001. Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil. *Atherosclerosis* 155, 9–18.

- Souied, E.H., Delcourt, C., Querques, G., Bassols, A., Merle, B., Zourdani, A., Smith, T., Benlian, P., Nutritional AMD Treatment 2 Study Group, 2013. Oral docosahexaenoic acid in the prevention of exudative age-related macular degeneration: the Nutritional AMD Treatment 2 study. *Ophthalmology* 120, 1619–1631.
- Staprans, I., Rapp, J.H., Pan, X.M., Feingold, K.R., 1996. Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. *J. Lipid Res.* 37, 420–430.
- Staprāns, I., Rapp, J.H., Pan, X.M., Kim, K.Y., Feingold, K.R., 1994. Oxidized lipids in the diet are a source of oxidized lipid in chylomicrons of human serum. *Arterioscler. Thromb.* 14, 1900–1905.
- Stillwell, W., 2006. The role of polyunsaturated lipids in membrane raft function. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition* 50, 107–113.
- Stillwell, W., Wassall, S.R., 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids* 126, 1–27.
- Subbaiah, P.V., Sastry, P.S., Ganguly, J., 1970. Acylation of lysolecithin in the intestinal mucosa of rats. *Biochem. J.* 118, 241–246.
- Suckling, K.E., Jackson, B., 1993. Animal models of human lipid metabolism. *Prog. Lipid Res.* 32, 1–24.
- Table de composition nutritionnelle des aliments, Ciqual, 2017. . Ciqual, table de composition nutritionnelle des aliments.
- Tang, X., Li, Z.-J., Xu, J., Xue, Y., Li, J.-Z., Wang, J.-F., Yanagita, T., Xue, C.-H., Wang, Y.-M., 2012. Short term effects of different omega-3 fatty acid formulation on lipid metabolism in mice fed high or low fat diet. *Lipids Health Dis* 11, 70.
- Thies, F., Delachambre, M.C., Bentejac, M., Lagarde, M., Lecerf, J., 1992. Unsaturated fatty acids esterified in 2-acyl-l-lysophosphatidylcholine bound to albumin are more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form. *J. Neurochem.* 59, 1110–1116.
- Thies, F., Pillon, C., Moliere, P., Lagarde, M., Lecerf, J., 1994. Preferential incorporation of sn-2 lysoPC DHA over unesterified DHA in the young rat brain. *Am. J. Physiol.* 267, R1273-1279.
- Tran, T.T.T., Buttet, M., Traynard, V., Besnard, P., Poirier, H., Niot, I., 2012. Mécanisme d'absorption intestinale des acides gras à longue chaîne : rôle émergent du CD36. *OCL* 19, 200–208.
- Tserentsoodol, N., Sztain, J., Campos, M., Gordiyenko, N.V., Fariss, R.N., Lee, J.W., Fliesler, S.J., Rodriguez, I.R., 2006. Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. *Mol. Vis.* 12, 1306–1318.
- Tsujita, M., Wu, C.-A., Abe-Dohmae, S., Usui, S., Okazaki, M., Yokoyama, S., 2005. On the hepatic mechanism of HDL assembly by the ABCA1/apoA-I pathway. *J. Lipid Res.* 46, 154–162.
- Turk, H.F., Chapkin, R.S., 2013. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 88, 43–47.
- Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A.S., Kaushal, C., Sharma, S., 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res* 2, 236–240.
- Uauy, R., Hoffman, D.R., Peirano, P., Birch, D.G., Birch, E.E., 2001. Essential fatty acids in visual and brain development. *Lipids* 36, 885–895.
- Ulven, S.M., Holven, K.B., 2015. Comparison of bioavailability of krill oil versus fish oil and health effect. *Vasc Health Risk Manag* 11, 511–524.
- Ursoniu, S., Sahebkar, A., Serban, M.-C., Antal, D., Mikhailidis, D.P., Cicero, A., Athyros, V., Rizzo, M., Rysz, J., Banach, M., Lipid and Blood Pressure Meta-analysis Collaboration, Group, 2017.

Lipid-modifying effects of krill oil in humans: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr. Rev.* 75, 361–373.

- Valagussa, F., Grazia Franzosi, M., Geraci, E., Mininni, N., Nicolosi, G.L., Santini, M., Tavzzi, L., Lo Vecchio, C., Chieffo, C., Maggioni, A.P., Schweiger, C., Tognoni, G., Barzi, F., Flamminio, A.V., Maria Marfisi, R., Olivieri, M., Pera, C., Polidoro, A., Santoro, E., Zama, R., Pagliaro, L., Correale, E., Del Favero, A., Loi, U., Marubini, E., Campolo, L., Casari, A., Di Minno, G., Benedetta Donati, M., Galli, M., Gattone, M., Garattini, S., Mancini, M., Marino, P., Santoro, G.M., Scardulla, C., Specchia, G., Cericola, A., Di Gregorio, D., Di Mascio, R., Levantesi, G., Mantini, L., Mastrogiuseppe, G., Tucci, C., Mocarrelli, P., Baldinelli, R., Ceriotti, F., Colonna, A., Cortese, C., Fortunato, G., Franzini, C., Gonano, F., Graziani, M.S., 1999. Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* 354, 447–455.
- Valenzuela, A., Valenzuela, V., Sanhueza, J., Nieto, S., 2005. Effect of supplementation with docosahexaenoic acid ethyl ester and sn-2 docosahexaenyl monoacylglyceride on plasma and erythrocyte fatty acids in rats. *Ann. Nutr. Metab.* 49, 49–53.
- Vamecq, J., Vallee, L., de la Porte, P.L., Fontaine, M., de Craemer, D., van den Branden, C., Lafont, H., Grataroli, R., Nalbone, G., 1993. Effect of various n – 3/n – 6 fatty acid ratio contents of high fat diets on rat liver and heart peroxisomal and mitochondrial β -oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1170, 151–156.
- van Wijk, N., Balvers, M., Cansev, M., Maher, T.J., Sijben, J.W.C., Broersen, L.M., 2016. Dietary crude lecithin increases systemic availability of dietary docosahexaenoic acid with combined intake in rats. *Lipids* 51, 833–846.
- Venkatraman, J.T., Angkeow, P., Satsangi, N., Fernandes, G., 1998. Effects of dietary n-6 and n-3 lipids on antioxidant defense system in livers of exercised rats. *J Am Coll Nutr* 17, 586–594.
- Venkatraman, J.T., Chandrasekar, B., Kim, J.D., Fernandes, G., 1994. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the activities and expression of hepatic antioxidant enzymes in autoimmune-prone NZBxNZW F1 mice. *Lipids* 29, 561–568.
- Vermunt, S.H., Mensink, R.P., Simonis, M.M., Hornstra, G., 2000. Effects of dietary alpha-linolenic acid on the conversion and oxidation of 13C-alpha-linolenic acid. *Lipids* 35, 137–142.
- Vidgren, H.M., Agren, J.J., Schwab, U., Rissanen, T., Hänninen, O., Uusitupa, M.I., 1997. Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men. *Lipids* 32, 697–705.
- Virtanen, J.A., Cheng, K.H., Somerharju, P., 1998. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4964–4969.
- Vors, C., Capolino, P., Guérin, C., Meugnier, E., Pesenti, S., Chauvin, M.-A., Monteil, J., Peretti, N., Cansell, M., Carrière, F., Michalski, M.-C., 2012. Coupling in vitro gastrointestinal lipolysis and Caco-2 cell cultures for testing the absorption of different food emulsions. *Food & Function* 3, 537–546.
- Vors, C., Lecomte, M., Michalski, M.-C., 2016. Impact de la structure émulsionnée des lipides sur le devenir métabolique des acides gras alimentaires. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 51, 238–247.
- Wang, J.-Y., Saito, M., 2001. Dietary supplementation of N-3 fatty acids and hydroperoxide levels in rat retinas. *Free Radical Research* 35, 367–375.

- Wang, T.Y., Liu, M., Portincasa, P., Wang, D.Q.-H., 2013. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur. J. Clin. Invest.* 43, 1203–1223.
- Warner, J.G., Ullrich, I.H., Albrink, M.J., Yeater, R.A., 1989. Combined effects of aerobic exercise and omega-3 fatty acids in hyperlipidemic persons. *Med Sci Sports Exerc* 21, 498–505.
- Watanabe, Y., Sato, S., Asada, M., Arishima, T., Iida, Y., Imagi, J., Saito, K., Sano, T., Sasaki, A., Sasaki, R., Sato, C., Shibuya, T., Tsukahara, Y., Nagai, T., Fukazawa, T., Hori, R., Homma, R., Miyazaki, Y., Yamashita, A., Yoshinaga, K., Watanabe, S., 2015. Enzymatic analysis of positional fatty acid distributions in triacylglycerols by 1(3)-selective transesterification with *Candida antarctica* Lipase B: a Collaborative Study. *J Oleo Sci* 64, 1193–1205.
- Weiss, J., Muschiolik, G., 2007. Factors affecting the droplet size of water-in-oil emulsions (W/O) and the oil globule size in water-in-oil-in-water emulsions (W/O/W). *Journal of Dispersion Science and Technology* 28, 703–716.
- West, C.E., Castenmiller, J.J., 1998. Quantification of the “SLAMENGI” factors for carotenoid bioavailability and bioconversion. *Int J Vitam Nutr Res* 68, 371–377.
- Willnow, T.E., 1997. Mechanisms of hepatic chylomicron remnant clearance. *Diabet. Med.* 14 Suppl 3, S75-80.
- Willumsen, N., Hexeberg, S., Skorve, J., Lundquist, M., Berge, R.K., 1993. Docosahexaenoic acid shows no triglyceride-lowering effects but increases the peroxisomal fatty acid oxidation in liver of rats. *J. Lipid Res.* 34, 13–22.
- Wilson, T.A., Meservey, C.M., Nicolosi, R.J., 1998. Soy lecithin reduces plasma lipoprotein cholesterol and early atherogenesis in hypercholesterolemic monkeys and hamsters: beyond linoleate. *Atherosclerosis* 140, 147–153.
- Wolff, R., Combe, N., Entressangles, B., 1985. Positional distribution of fatty acids in cardiolipin of mitochondria from 21-day-old rats. *Lipids* 20, 908–914.
- Wong, B.H., Chan, J.P., Cazenave-Gassiot, A., Poh, R.W., Foo, J.C., Galam, D.L.A., Ghosh, S., Nguyen, L.N., Barathi, V.A., Yeo, S.W., Luu, C.D., Wenk, M.R., Silver, D.L., 2016. Mfsd2a is a transporter for the essential ω -3 fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) in eye and is important for photoreceptor cell development. *J Biol Chem* 291, 10501–10514.
- Woods, R.K., Thien, F.C., Abramson, M.J., 2002. Dietary marine fatty acids (fish oil) for asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* CD001283.
- Wu, F., Wang, D.-D., Wen, M., Che, H.-X., Xue, C.-H., Yanagita, T., Zhang, T.-T., Wang, Y.-M., 2017. Comparative analyses of DHA-Phosphatidylcholine and recombination of DHA-Triglyceride with Egg-Phosphatidylcholine or Glycerylphosphorylcholine on DHA repletion in n-3 deficient mice. *Lipids Health Dis* 16, 234.
- Xiao, Y.-F., Sigg, D.C., Leaf, A., 2005. The antiarrhythmic effect of n-3 polyunsaturated fatty acids: modulation of cardiac ion channels as a potential mechanism. *J. Membr. Biol.* 206, 141–154.
- Xu, J., Nakamura, M.T., Cho, H.P., Clarke, S.D., 1999. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J. Biol. Chem.* 274, 23577–23583.
- Yalcin, H., Toker, O.S., Dogan, M., 2012. Effect of oil type and fatty acid composition on dynamic and steady shear rheology of vegetable oils. *J Oleo Sci* 61, 181–187.
- Yang, K.-M., Chiang, P.-Y., 2017. Variation quality and kinetic parameter of commercial n-3 PUFA-Rich oil during oxidation via rancimat. *Mar Drugs* 15.

- Yehuda, S., Rabinovitz, S., Carasso, R.L., Mostofsky, D.I., 2002. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol. Aging* 23, 843–853.
- Yokota, S., Fahimi, H.D., 1981. Immunocytochemical localization of catalase in rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 805–812.
- Yokoyama, M., Origasa, H., Matsuzaki, M., Matsuzawa, Y., Saito, Y., Ishikawa, Y., Oikawa, S., Sasaki, J., Hishida, H., Itakura, H., Kita, T., Kitabatake, A., Nakaya, N., Sakata, T., Shimada, K., Shirato, K., Japan EPA lipid intervention study (JELIS) Investigators, 2007. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* 369, 1090–1098.
- Yoshida, H., Kumamaru, J., Mawatari, M., Ikeda, I., Imaizumi, K., Tsuji, H., Seto, A., 1996. Lymphatic absorption of seal and fish oils and their effect on lipid metabolism and eicosanoid production in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 1293–1298.
- Yurko-Mauro, K., Kralovec, J., Bailey-Hall, E., Smeberg, V., Stark, J.G., Salem, N., 2015. Similar eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid plasma levels achieved with fish oil or krill oil in a randomized double-blind four-week bioavailability study. *Lipids Health Dis* 14, 99–108.
- Yurko-Mauro, K., McCarthy, D., Rom, D., Nelson, E.B., Ryan, A.S., Blackwell, A., Salem, N., Stedman, M., MIDAS Investigators, 2010. Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline. *Alzheimers Dement* 6, 456–464.
- Zhao, Y., Chen, Y.-Q., Bonacci, T.M., Bredt, D.S., Li, S., Bensch, W.R., Moller, D.E., Kowala, M., Konrad, R.J., Cao, G., 2008. Identification and characterization of a major liver lysophosphatidylcholine acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 283, 8258–8265.
- Zierenberg, O., Grundy, S.M., 1982. Intestinal absorption of polyenephosphatidylcholine in man. *J. Lipid Res.* 23, 1136–1142.
- Ziouzenkova, O., Perrey, S., Asatryan, L., Hwang, J., MacNaul, K.L., Moller, D.E., Rader, D.J., Sevanian, A., Zechner, R., Hoefler, G., Plutzky, J., 2003. Lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins generates PPAR ligands: evidence for an antiinflammatory role for lipoprotein lipase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2730–2735.
- Zuijdgeest-van Leeuwen, S.D., Dagnelie, P.C., Rietveld, T., van den Berg, J.W., Wilson, J.H., 1999. Incorporation and washout of orally administered n-3 fatty acid ethyl esters in different plasma lipid fractions. *Br. J. Nutr.* 82, 481–488.

Annexes

Annexe 1 : Dosage des phospholipides par résonance magnétique nucléaire du phosphore (^{31}P RMN)

L'identification des classes de phospholipides est déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN) en utilisant le déplacement chimique spécifique du noyau phosphore entre -1 ppm et 2 ppm (Cansell et al., 2017). La quantification est réalisée sur un spectromètre RMN Bruker Avance 400 (Bruker biospin, France) équipé d'une sonde 5 mm QNP ^1H - $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}/^{19}\text{F}$. Les expériences sont faites avec une régulation en température à $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, dans des tubes de verre de 5 mm de diamètre, contenant l'échantillon. Après évaporation des solvants sous un flux d'azote, 20 mg de lécithine sont solubilisés dans une solution organique composée de 330 μL de chloroforme deutéré (pureté 99,8%), 130 μL de méthanol deutéré (pureté 99,8%), 30 μL d'une solution d'EDTA (2 mM dans l'eau deutéré (D_2O); pH 6) et 50 μL d'une solution de triphénylphosphate (TPP ; 2 mg/mL dans un mélange chloroforme deutéré/méthanol deutéré ; 7/1 ; v/v). La séquence d'impulsion appliquée est une impulsion simple de 90° avec un découplage des protons pendant l'acquisition et une fréquence de résonance de 162 MHz. La fenêtre spectrale utilisée est de 50 kHz, un nombre de scans variant de 10 à 40 k selon les échantillons, un nombre de points de données de 32 K, une largeur d'impulsion de $\pi/2$ et un temps de recyclage de 15 μs . Le traitement des données est réalisé à l'aide du logiciel Topspin 1.3. Un filtrage numérique 5 Hz est appliqué avant la transformée de Fourier.

Le TPP est utilisé en tant que standard interne pour la quantification des espèces de PL, ainsi que pour la calibration de l'axe des abscisses ($\delta = -17,95$ ppm) (Kaffarnik et al., 2013).

La quantité de phospholipides est calculée à partir du nombre de moles de TPP :

$$n_{\text{TPP}} = \frac{[\text{TPP}] \times V_{\text{TPP}}}{M_{\text{TPP}}}$$

Où n_{TPP} : nombre de moles de TPP ; V_{TPP} : volume de TPP (50 μL) ; $[\text{TPP}]$: concentration massique (g/L) de TPP ; M_{TPP} : 326,28 g/mol.

La molécule de TPP ne contenant qu'un atome de phosphore, ainsi $n_{\text{TPP}} = n_{\text{P}}$ (moles de phosphore). Le nombre de mole de phospholipides (n_{PL}) est donné par :

$$n_{\text{PL}} = I_{\text{PL}} \times n_{\text{P}}$$

Où n_{PL} : nombre de moles de PL ; I_{PL} : intégrale des pics de PL déterminée par RMN ^{31}P ; n_{P} : nombre de moles de phosphore.

La masse de phospholipides dans l'échantillon est donc donnée par :

$$m_{PL} = M_{PL} \times n_{PL}$$

Où m_{PL} : masse de PL ; M_{PL} : masse moléculaire moyenne des PL (775 g/mol) ; n_{PL} : nombre de moles de PL.

Pour l'identification et la quantification relative des classes de PL, une étape de déconvolution est effectuée à l'aide du logiciel DmFit (Massiot et al., 2002). L'attribution des pics se fait selon les données de la littérature (Estrada et al., 2008).

Annexe 2 : A critical assessment of transmethylation procedures for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid quantification of lipid classes. Sehl A., Couédelo L., Fonseca L., Vaysse C., Cansell M. (2018). *Food Chem* 251, 1-8.

Accepted Manuscript

A critical assessment of transmethylation procedures for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid quantification of lipid classes

Anthony Sehl, Leslie Couédelo, Laurence Fonseca, Carole Vaysse, Maud Cansell

PII: S0308-8146(18)30069-4

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.060>

Reference: FOCH 22249

To appear in: *Food Chemistry*

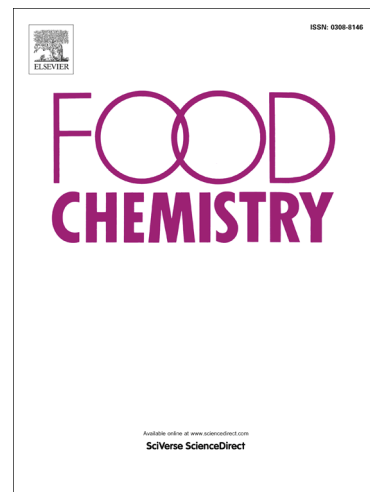
Received Date: 11 July 2017

Revised Date: 4 January 2018

Accepted Date: 6 January 2018

Please cite this article as: Sehl, A., Couédelo, L., Fonseca, L., Vaysse, C., Cansell, M., A critical assessment of transmethylation procedures for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid quantification of lipid classes, *Food Chemistry* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.060>

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



A critical assessment of transmethylation procedures for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid quantification of lipid classes

Anthony Sehl^{1, 2}, Leslie Couëdelo¹, Laurence Fonseca¹, Carole Vaysse¹, Maud Cansell²

¹*ITERG, Nutrition Metabolism & Health Department, University of Bordeaux, 33076 Bordeaux,*

France

* Corresponding author

Email address: mcansell@enscbp.fr (Maud Cansell)

Tel number: +335 40 00 66 95

Running title: Methylation methods for polyunsaturated fatty acid

Abbreviations: 2,7-dichlorofluorescein (2,7-DCF), boron trifluoride (BF₃), cholest-5- ω -3 β -yl-docosanoate (CE 22:0), conjugated linoleic acid (CLA), docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA), fatty acid (FA), fatty acid methyl esters (FAME), free fatty acids (FFA), heptadecanoic acid (FFA 17:0), gas chromatography (GC), high-performance thin layer chromatography (HP-TLC), long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), monounsaturated fatty acids (MUFA), 1,2-dipentadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (PC 15:0), polyunsaturated fatty acids (PUFA), sterol esters (SE), saturated fatty acids (SFA), triglycerides (TG), 1,2,3-triheptadecanoyl-sn-glycerol (TG 17:0), thin layer chromatography (TLC)

Abstract

Lipid transmethylation methods described in the literature are not always evaluated with care so to insure that the methods are effective, especially on food matrix or biological samples containing polyunsaturated fatty acid (PUFA). The aim of the present study was to select a method suitable for all lipid species rich in long chain n-3 PUFA. Three published methods were adapted and applied on individual lipid classes. Lipid (trans)methylation efficiency was characterized in terms of reaction yield and gas chromatography (GC) analysis. The acid-catalyzed method was unable to convert triglycerides and sterol esters, while the method using an incubation at a moderate temperature was ineffective on phospholipids and sterol esters. On the whole only the method using sodium methoxide and sulfuric acid was effective on lipid classes taken individually or in a complex medium. This study highlighted the use of an appropriate (trans)methylation method for insuring an accurate fatty acid composition.

Keywords: Methylation, fatty acid methyl esters, polyunsaturated fatty acids, gas chromatography, high-performance thin layer chromatography

1. Introduction

The technique of gas chromatography (GC) is the most commonly used to determine the fatty acid (FA) composition of lipids in food matrices and biological samples. FA are analyzed by GC as fatty acid methyl esters (FAME) in order to prevent potential hydrogen bonding between the FA carboxyl group and the fused silica of the GC column. Moreover, FAME are more volatile compounds than FA and more easily separated based on their boiling point, allowing the reliable identification according to their chemical structure. Esterification of free FA (FFA) and transesterification of esterified lipids generally occur in a one-step reaction, in presence of acid catalysts (for FFA and esterified lipids) or basic catalysts (for esterified lipids, only) and a methanolic phase in excess (Christie, 1993). The choice of the (trans)methylation method is highly dependent on the lipid classes present in the sample and on the FA nature, i.e. the chain length, the double bond configuration and the unsaturation degree. Base-catalyzed transesterification is rapid (1 to 10 minutes) (Marinetti, 1966; Christie, 1993; Santos Júnior et al., 2013) and operates at room or moderate temperatures (lower than 60 °C) (Christie, 1993; ISO 12966-2). However, using basic reagents such as potassium hydroxide (KOH) or sodium hydroxide (NaOH) increases the pH over the pKa of carboxyl group of FFA which generate sodium (or potassium) soaps rather than FAME (Christie, 1993). Moreover, sphingolipids are resistant to alkaline treatment due to the presence of an amide bond instead of an ester bond (MacGee & Williams, 1981). Thereby, basic catalysts also lead to an incomplete conversion of sphingolipid FA into FAME. In contrast, acid catalysts can be used to esterify FFA or to transesterify FA linked by ester bonds to glycerol (Christie, 1993). However, they are not suitable for cholesterol esters (Christie, 1993). Sphingolipids are transesterified by acid-catalyzed methanolysis but side-products may be formed as artefacts (Christie, 1993). Moreover, acid-catalyzed (trans)methylation often proceeds at high temperatures

(higher than 80 °C), associated with long incubation times (30 to 90 minutes) (Christie, 1993; Klopfenstein, 1971; Kramer et al., 1997; Lepage & Roy, 1988; Morrison & Smith, 1964). Concerning the quantification of the FA composition of the lipid sample, because internal standards are not systematically used, any FA loss during the experimental steps ((trans)methylation or FAME recovery) potentially results in an underestimation and, thereby, to an overestimation of the other FA species. Therefore, the presence of short-chain FA requires specific precautions due to their volatility for a quantitative recovery (Christie, 1993). High temperatures used in acid-catalyzed reactions may induce isomerization of thermolabile FA such as conjugated linoleic acid (CLA) and conjugated dienes (Castro-Gómez, Fontecha, & Rodríguez-Alcalá, 2014; Kramer et al., 1997; Murrieta, Hess, & Rule, 2003). Recently, a method combining the use of sodium methoxide and sulfuric acid was proposed (Castro-Gómez et al., 2014). It appeared to be an effective method for the derivatization of all lipid classes, in particular towards sterol esters (SE) and sensitive FA such as CLA. However, as other acid-catalyzed reactions, it has to be performed at high temperature (mostly 100 °C) (Christie, 1993; Kramer et al., 1997; Lepage & Roy, 1988; Morrison & Smith, 1964). Although, a good quantification of polyunsaturated FA (PUFA) up to 22:6 was observed, the amounts of eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 ω -3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 ω -3) present in the reference samples were far below the values that can be found in marine products or biological samples analyzed after fish oil diets.

Thus, although several (trans)methylation methods are commonly used, they either mainly focused on α -linolenic acid (18:3) containing lipids as polyunsaturated species or do not consider all the lipid classes that may be present in a true sample. The purpose of this work was to assess the efficiency of three (trans)methylation methods: (1) the acid-catalyzed method of Morrison & Smith (Morrison & Smith, 1964), and the two sequentially base- and acid-catalyzed methods of (2) Castro-Gomez et al. (Castro-Gómez et al., 2014) and (3) Christie et al. (Christie, Sébédio, &

Juanéda, 2001). These three methods were applied on various lipid classes, i.e. phospholipids (PL), triglycerides (TG), FFA, and SE, all coming from marine organisms and, thus, rich in ω -3 long-chain PUFA (ω -3 LC-PUFA). Because the analyzed samples were rich in EPA and DHA, it was necessary to increase the reaction times that may alter PUFA especially when high temperatures are applied. We showed that method 2, adapted with the correct reaction times to (trans)methylate all the lipid species, was the most efficient one. This method was then applied to total lipids extracted from Human serum and rat liver and plasma, these two last being obtained after diets enriched in ω -3 long-chain PUFA, as typical examples of complex lipid mixtures.

2. Materials and method

2.1. Materials

Lecithin from herring roe (Lecimarín F50) was kindly provided by Novastell (Etrépany, France). Fish oil was supplied by BIPEA (Paris, France). Dihydrate calcium chloride (CaCl_2 , PubChem CID: 5284359) was purchased from VWR (Radnor, Pennsylvania, USA). (Tris)-buffered saline, lipase from porcine pancreas (PubChem CID: 54603431), sodium déoxycholate (PubChem CID: 5283834), boron trifluoride-methanol solution (BF_3 , 14%, w/v, PubChem CID: 6356), sodium methoxide solution (0.5 N, PubChem CID: 10942334), serum from Human male AB plasma (USA origin; product number H4522), 2,7-dichlorofluorescein (2,7-DCF, PubChem CID: 64944), primuline (PubChem CID: 24852417) and FAME mix C4-C24 were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, Missouri, USA). Anhydrous sodium carbonate (PubChem CID: 10340) and orthophosphoric acid (PubChem CID: 1004) were supplied by Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Copper sulfate pentahydrate (PubChem CID: 24463) was purchased from Pancreatic (Barcelona, Spain). Acetic acid (PubChem CID: 176), sulfuric acid (PubChem CID: 1118), and potassium chloride (KCl, PubChem CID: 4873) were provided by Thermo Fisher Scientific (Strasbourg, France). They also supplied the organic solvents used (analytical or HPLC

grades). Internal standards for HP-TLC analysis were: 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (PE 17:0), 1-monooleyl-rac-glycerol (MG 18:1 n-9), Cholesterol (Chol), 1,3-di-11-eicosenoin (DG 20:1 n-11), α -linolenic acid (ALA), 1,2,3-triheptadecanoyl-sn-glycerol (TG 17:0), cis-8,11,14-eicosatrienoic acid methyl ester (FAME 20:3 n-6), cholest-5-en-3 β -yl-octadec-9-oate (cholesterol ester 18 :1 n-9; CE) all purchased from Avanti Polar Lipids INC (Alabaster, Alabama, USA). Internal standards for GC analysis were: 1,2-dipentadecanoyl- sn-glycero-3-phosphatidylcholine (PC 15:0, PubChem CID: 134308), 1,2,3-triheptadecanoyl-sn-glycerol (TG 17:0, PubChem CID: 3625612), heptadecanoic acid (FFA 17:0, PubChem CID: 10465) and cholest-5-e ω -3 β -yl-docosanoate (CE 22:0, PubChm CID: 53477887) all purchased from Avanti Polar Lipids INC (Alabaster, Alabama, USA). Rat liver and plasma samples were issued from a nutritional study in which rats were fed with diet enriched in n-3 LC-PUFA for 8 weeks kindly provided by ITERG (Institut des Corps Gras, Pessac, France).

2.2. Lipid class preparation and purification

Fish oil was used as the source of marine TG without further purification. In order to get purified PL and SE extracts, purification steps performed on the herring roe lecithin and the total lipids extracted from *Pecten maximus* gonads, respectively. FFA were prepared from fish oil enzymatic hydrolysis.

PL were isolated from herring roe lecithin by solvent fractionation using cold acetone. Briefly, 1 mL of a mixture composed of chloroform/methanol (2:1, v/v) was added to 1 g of marine lecithin and maintained at room temperature until complete dissolution of sample. After addition of 20 mL of cold acetone (- 20 °C), the sample was briefly homogenized by vortex (30 seconds) and centrifuged (1050 g, 5 min, 4 °C; Sorvall ST-40R, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts,

USA). The supernatant, containing the neutral lipids, was removed and the pellet, containing the polar lipids, was extracted twice and stored at - 20 °C.

Total lipids from *Pecten maximus* gonads were extracted with chloroform/methanol (2:1, v/v) according to the method of Folch et al. (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957). SE were purified from *Pecten maximus* lipids by liquid chromatography (Silica gel 63-200 μ m (Sigma-Aldrich), glass column 15x45 cm). Hydrocarbons were first eluted using a large volume of hexane. Then, SE were separated from the other lipids using a mixture of hexane/diethyl ether (99:1, v/v) (ISO 12873:2017). Purified SE were stored in chloroform/methanol (2:1, v/v) at - 20 °C until use.

FFA were obtained by lipase hydrolysis of fish oil according to Desnuelle et al. (Desnuelle, 1961) and Entressangle et al. (Entressangles, Sari, & Desnuelle, 1966) method. Succinctly, after homogenization of 15 mg of fish oil in 200 μ L of isooctane, the fish oil was added to 2 mL of pancreatic lipase solution (0.5 g/mL in 1 M of Tris HCL, pH 8), 0.5 mL of sodium deoxycholate (1 g/L in distilled water), and 0.2 mL of a calcium chloride solution (220 g/L in distilled water), maintained 5 min at 40 °C and 30 min at room temperature. Total lipids were extracted by addition of 1 mL of HCl 6N and 10 mL of diethyl ether followed by homogenization and centrifugation (1050 g, 5 min, 4°C; Sorvall ST-40R, Thermo Scientific). Lipids were dried under nitrogen and dissolved in an accurate volume of a mixture composed of chloroform/methanol (2:1, v/v). FFA were separated from non-hydrolyzed TG and reaction products, i.e. mono- and di- glycerides, by thin-layer chromatography (TLC) (glass plates 20x20 cm pre-coated with silica gel 60H (Merck KGaA)) using a solvent mixture composed of hexane, diethyl ether and acetic acid (70:30:1, v/v/v). Spots were visualized under UV-light after vaporization of 2,7-DCF in ethanol solution (0.2%, m/v). FFA were extracted from the silica gel by addition of 2.5 mL of chloroform/methanol (2:1, v/v). After homogenization and centrifugation of the scrapped sample (1050 g, 5 min, 20°C; Sorvall ST-40R, Thermo Scientific), the organic phase was collected. Distilled water (100 μ L) and 2 mL of

chloroform/methanol (2:1, v/v) were added to the silica gel phase. The extraction step was repeated once again and the organic phase was collected. Lipid extraction from silica gel ended by addition of 2 mL of methanol to the silica gel phase, homogenization and centrifugation. The organic phases were collected. Finally, 2,7-DCF was removed using 0.4 mL of a potassium chloride solution (0.8% in distilled water, w/v) and 2 mL of chloroform/methanol (2:1, v/v) to the lipid solution. The organic phase was washed twice by addition of 0.8 mL of a mixture composed of chloroform/methanol/potassium chloride 0.8% in distilled water (15:240:235, v/v/v). FFA were pooled, dissolved in chloroform/methanol (2:1, v/v) and stored at -20 °C.

Total lipids from Human serum (Sigma-Aldrich) and rat liver and plasma were extracted according to the method of Folch et al. (Folch, Lees, & Sloane Stanley, 1957). Lipid extracted were stored in chloroform/ methanol (2:1, v/v) at -20 °C until use.

2.3. Transmethylation procedures

FAME from individual lipid class (PL, TG, FFA and SE) were prepared according to three methods with modified incubation times. Indeed, the ISO 12966-2 standard (ISO 12966-2) recommends to increase the incubation time for oils rich in LC PUFA.

Method 1: FA were (trans)methylated according to the acid-catalyzed method adapted from Morrison & Smith (Morrison & Smith, 1964). 2 mg of lipids were mixed with 1 mL of BF₃ in methanol solution in a glass tube. Isooctane (0.5 mL) was added as co-solvent when (trans)methylation was performed on FFA, TG and SE classes. Samples were incubated at 100°C, under constant agitation, for times varying from 15 min for FFA, 60 min for TG and 90 min for PL and SE. After addition of 2 mL of isooctane followed by 1 mL of distilled water in the case of FFA, TG and SE classes, or 5 N sodium hydroxide for PL, samples were centrifuged (1050 g, 10 min, 4°C; Sorvall ST-40R, Thermo Scientific). The organic phase containing the FAME was

collected. The extraction step was repeated three times by addition of 2 mL of isooctane. FAME were pooled, concentrated by evaporation of the solvent under nitrogen, washed with 1 mL of distilled water and stored in isooctane at 4 °C until analysis.

Method 2: This method proposed by Castro-Gomez et al. (Castro-Gómez et al., 2014) used sodium methoxide followed by sulfuric acid, in combination. Sodium methoxide solution (2.5 mL, 0.5 N) was added to 2 mg of lipids, in a glass tube and maintained at 80 °C under constant agitation for 10 min. After cooling in the ice, 3 mL of a sulfuric acid-methanol solution (1 M, pH 1) was added to the samples. The reaction was performed at 100°C. Like in method 1, the incubation time varied with the type of lipids: 90 min for PL and 45 min for all the other lipid classes. FAME were extracted by addition of 2 mL of hexane and 7.5 mL of sodium carbonate (6% in distilled water, w/v) followed by a centrifugation step (1218 g, 10 min, 4°C; Sorvall ST- 40R, Thermo Scientific). FAME were dried under nitrogen, dissolved in isooctane and stored at 4 °C until analysis.

Method 3: The Christie's method (Christie et al., 2001) was initially developed to (trans)methylate FA sensitive to temperature like CLA using a short incubation time (10 minutes) at moderate temperature (50°C). Briefly, 0.5 mL of hexane and 0.2 mL of a sodium methoxide solution (2 N) was added to 2 mg of lipids in a glass tube. The sample was maintained 10 min, at room temperature, under constant agitation. 1 mL of a BF₃ solution in methanol was added. Irrespectively of the lipid class, the sample was incubated at 50 °C, under constant agitation, for 30 min. FAME were extracted three times by addition of 0.5 mL of distilled water followed by 2 mL of isooctane. After centrifugation (1050 g, 10 min, 4°C; Sorvall ST-40R, Thermo Scientific), the organic phases containing the FAME were collected, pooled, concentrated by evaporating solvent

under nitrogen, and washed with 1 mL of distilled water. FAME obtained were stored at - 20 °C until analysis.

Method 2 was then applied on biological lipid mixtures (i.e. total lipids from Human serum and from rat liver and plasma).

2.4. High-performance TLC (HP-TLC) analysis

High-performance TLC (HP-TLC) was used to assess lipid class purity (for SE and PL) and lipid (trans)esterification yields of the different lipid classes and of the lipid mixtures. Lipids were deposited by an automatic sampler (ATS4, Camag, Muttenz, Switzerland) on a HP-TLC plate (HP-TLC plate silica gel 60 F254 20x10 cm, Merck, Darmstadt, Germany) and separated in an automatic development chamber (ADC2, Camag, Muttenz, Switzerland). PL purity was assessed using a solvent mixture composed of diethyl ether/acetone (60:20, v/v). SE purity obtained from *Pecten maximus* gonads and FAME obtained after (trans)methylation of individual lipid classes and total lipids extracted from Human serum, rat liver and plasma were analyzed using an eluent composed of hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:1, v/v/v). After lipid separation, the plate was dried and quickly immersed in a dye solution. Two different dyes were used for species detection, i.e. a primuline solution (detecting double bonds) or a copper sulfate solution (non specific detection). When using the primuline solution (0.06% in acetone/water (80:20, v/v)), the plate was dried at 30°C for 5 min on a hotplate (TLC plate heater III, Camag, Muttenz, Switzerland). Lipid classes were visualized under UV light (366 nm) in fluorescence mode using an automatic scanner (Scanner 4, Camag, Muttenz, Switzerland). When using the copper sulfate solution (20% in methanol/ sulfuric acid/ orthophosphoric acid (200:7.8:6.8, v/v/v)), the plate was dried at 140°C for 15 min on a hotplate and the lipid classes were visualized at 720 nm using tungsten lamp in the automatic scanner. Primuline solution was used for PL purity assessment, analysis of total lipids

from human serum, rat liver and plasma, and the corresponding FAME. The copper sulfate solution was used for SE purity assessment and FAME obtained after (trans)methylation of individual lipid classes.

Lipid classes were identified by comparing their frontal report with those of standard solutions of PL, TG, FFA, SE and FAME (1 mg/ml in chloroform/ methanol (2:1, v/v)) chromatographed on the same plate and in the same conditions and visualized at 366 nm or at 720 nm, according to the dye used.

2.5. Gas-chromatography analysis

FAME were analyzed on a gas chromatograph (TRACE GC, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) equipped with a flame-ionization detector and a split injector. A fused- silica capillary column (BPX 70, 60 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film; SGE, France) was used with hydrogen as a carrier gas (inlet pressure: 120 kPa). The split ratio was 1:33. The column temperature program was as follow: from 160 °C, the temperature increased to 180 °C at 1.3°C/min, and was maintained for 65 minutes before increasing at 25 °C/ min until 230 °C for 15 minutes. The injection port and the detector were maintained at 250 °C and 280 °C, respectively. GC peaks were integrated using Chromquest software (Thermofinnigan, Courtaboeuf, France). The identification of individual FAME was performed by comparing their retention times with those of a FAME standard mixture (FAME mix C4-C24, Sigma-Aldrich) chromatographed in the same conditions and on the same chromatograph. In order to test both the recovery and efficiency of derivatization methods, an appropriate internal standard was added to the lipid samples at 10 wt.% of total lipids, before the (trans)esterification experiment. More precisely, 200 µL of internal standard solution (1 mg/ ml in chloroform/ methanol (2:1; v/v)) were added to 2 mg of lipids samples. The whole sample was dried under nitrogen in order to evaporate solvent traces

(chloroform and methanol) and the (trans)esterification experiment performed. The internal standard was chosen for its representativeness of the lipid class and for the absence of its specific FA in the analyzed lipid sample. Thus, PC 15:0, TG 17:0, FFA 17:0, and CE 22:0 (1 mg/ ml in chloroform/ methanol (2:1; v/v)) were used as internal standard for FAME quantification from PL, TG, FFA and SE classes, respectively. TG 17:0 was used as internal standard for FAME quantification of total lipids extracted from Human serum and rat liver and plasma.

2.6. Statistical analysis

Data were expressed as mean values with standard deviation (mean \pm SD). Methods 1, 2 and 3 were repeated six times (n=6) each on each individual lipid class (PL, TG, FFA, SE) and on the three lipid mixtures (Human serum, rat liver and plasma). Intergroup comparisons were made on the basis of their respective mean. Data were analyzed by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunns post-hoc test. P values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results and discussion

Acid-catalyzed reactions were mostly used to convert FA into FAME. However, basic-catalyzed reactions were reported to be more rapid and more suitable on some lipid classes like SE although they did not properly convert FFA and sphingolipids (Castro-Gómez et al., 2014; Christie, 1993; Liu, 1994). Moreover, numerous methods were performed at high temperatures (mostly 100°C) possibly resulting in a degradation of FA of interest (CLA, PUFA). Some authors have also speculated that BF₃ solution was unstable, leading to artifacts when high concentrations or aging reagents were used (Christie, 1993; Fulk & Shorb, 1970; Klopfenstein, 1971; Park, Albright, Cai, & Pariza, 2001). In order to overcome these problems, several (trans)methylation methods based on sequential basic-, acid-catalyzed reactions have been proposed.

The yield of (trans)esterification of individual lipid classes was qualitatively determined by HP-TLC with the presence of unreacted species. Figures 1A-D present the yield of the different lipid classes (trans)methylated by the three methods analyzed by HP-TLC. Figure 1A clearly pointed out that TG were not totally transesterified when method 1 was used unlike the two other methods since unreacted TG were recorded on the HP-TLC plate with these method. This was confirmed by the partial transmethylation of the TG 17:0 standard added to fish oil before the (trans)methylation procedure (9.3 ± 0.2 , 11.8 ± 0.1 and 11.5 ± 0.3 wt.% for methods 1, 2 and 3, respectively) observed by GC analysis. Because TG 17:0 could not be subjected to oxidative process, it could be assumed that about 21% of 17:0 from internal standard were not transmethylated using method 1. This result was in agreement with data obtained previously on pure TG 13:0 when acid-catalyzed methods were used (Castro-Gómez et al., 2014). Indeed, about 23% of TG remained unesterified when BF_3 or acetylchloride/ methanol were used, while a basic catalyst (KOH or sodium methoxide), followed or not by an acid catalysis, resulted in total TG transmethylation. Complete transmethylation of TG from Atlantic salmon using methanolic sulfuric acid solution (1%) has also been reported by Schlechtriem et al. (Schlechtriem, Henderson, & Tocher, 2008). Irrespectively of the method, PL and FFA rich in ω -3 LC-PUFA were totally (trans)methylated as shown by the absence of unreacted lipids on HP-TLC plates and the only presence of FAME (Fig. 1B and C, respectively). These results were confirmed by the GC quantification of the standards added to samples before the (trans)methylation procedure for the three methods (PC 15:0; 15.1 ± 0.7 , 15.4 ± 0.7 and 14.8 ± 0.8 wt % for methods 1, 2 and 3, respectively and FFA 17:0; 13.1 ± 0.1 , 13.0 ± 0.1 and 12.7 ± 0.1 wt % for methods 1, 2 and 3, respectively). Moreover, it appeared that the saponification step included in methods 2 and 3 was not necessary for total FFA esterification. With regard to SE, only method 2 led to the complete transmethylation (Fig. 1D) since no trace of unreacted SE and only the presence of FAME and free

sterols were recorded on the HP-TLC plate contrary to methods 1 and 3. Otherwise, transmethylation of SE at moderate temperature (method 3) seemed to be the less efficient since FAME quantity were too low to be detected after HP-TLC of transmethylated samples. This qualitative observation was confirmed by GC recovery of CE 22:0 standard (12.1 ± 0.7 , 18.8 ± 0.3 and 11.9 ± 0.4 wt % for methods 1, 2 and 3, respectively). It has been described that using basic catalysts or acid catalysts alone was inefficient for a complete SE transesterification (Castro-Gómez et al., 2014; Christie, 1993; Tuckey & Stevenson, 1979). For example, only 56% and 40% SE were transesterified when potassium hydroxide or BF_3 in anhydrous methanol were used, respectively (Castro-Gómez et al., 2014). In contrast, almost all SE were transesterified when saponification followed by an acid-catalyzed step were applied (Tuckey & Stevenson, 1979). Similar yield of transmethylation was obtained for cholesteryl ester (Castro-Gómez et al., 2014). Our results were in agreement with the finding that sequential basic and acid catalysis are required to transmethylate efficiently SE, but also an incubation at high temperature (100°C) was fundamental.

Table 1 presents total FA quantification for TG from fish oil, transmethylated using the three methods. Quantification of FA issued from method 1 led to a higher content FA by 27% compared with the two other methods. We conclude that this overestimated value might partly result from the partial transmethylation of the internal standard (20%) but also to a slight loss of FA, presumably PUFA prone to oxidation. This incomplete transmethylation observed with method 1 significantly modified the FA profile, with a lower monounsaturated FA (MUFA) proportion by 5% and a higher content of ω -3 PUFA by 6% when compared with methods 2 and 3.

In contrast, methods 2 and 3 led to similar results both in FAME quantification and proportions. Thus, the experimental conditions applied in method 2 (100°C for 45 min) were not deleterious for ω -3 PUFA quantification. These results were in agreement with that obtained on aquatic organisms showing that the BF_3 method induced a loss of PUFA presumably due to addition of methanol across the double bonds (Schlechtriem et al., 2008).

Results for FA quantification of the marine PL are presented in Table 2. Only method 3 seemed to alter evaluation of FA composition of marine PL, compared with the two others, with a lower content of MUFA, accompanied by a higher content of ω -3 PUFA, notably EPA (20:5 ω -3) and DHA (22:6 ω -3). These results could account by the absence of nervonic acid (24:1 n-9) in FA composition obtained with method 3. Because the marine lecithin used in this work contained sphingomyelin (SM) with about 42 % of 24:1 n-9, this suggested that method 3 was ineffective to transmethyrate this specific PL. Our results were in agreement with others showing that basic catalysis is not suitable for lipids such as sphingolipids in which FA are joined by an amide *N*-acyl bound to the base unless using very long incubation periods (up to 15 days for complete transesterification) which could create artefacts like *O*-methyl ethers or PUFA degradation (Christie, 1993; MacGee & Williams, 1981). In conclusion, it appeared that a method combining an acid catalysis and 90 min incubation time, at 100°C, as proposed in methods 1 and 2, could be considered as suitable methods for FA quantification of PL, even when sphingolipids are present. Results for FFA prepared from fish oil lipolysis are presented in Table 3. No significant difference was observed concerning FAME quantification, in agreement with HP-TLC observations and internal standard quantification. Thus, all the three (trans)methylation methods led to a complete derivatization of FFA. Concerning FA composition, no difference was pointed out between results issued from the three methods. Thereby, all the three tested methods led to a correct assessment of

FA quantification and composition of a FFA class composed of ω -3 PUFA. Moreover, ω -3 PUFA in their free form were not prone to oxidation during 45 min at 100 °C as applied in method 2.

Table 4 presents FA quantification for purified SE rich in ω -3 LC-PUFA, transmethylated using the three methods. Methods 1 and 3 led to a higher FA content by 57-59% compared with method 2. These overestimated values might partly result from the partial transmethylation of the internal standard (36-37%) but also to a loss of FA. No difference on FA composition was observed between methods 1 and 2, suggesting that the partial transmethylation of SE obtained with method 1 occurred independently of the FA nature esterified on the sterol. However, significant differences were observed between methods 1 and 3 on saturated FA (SFA), MUFA, and total ω -3 PUFA amounts. Notably, it appeared that 22:5 n-3 esterified on sterols was not transmethylated with method 3. Thus, the temperature and the incubation time had a greater impact on the SE derivatization efficiency than the nature of catalyst. The three tested methods had not the same transmethylation yield and seemed to altered FA composition, thus it was not possible to conclude about the impact of the incubation temperature on oxidation of PUFA.

Since method 2 appeared to be the most efficient (trans)methylation method on all lipid classes rich in LC n-3 PUFA, it was applied on three different samples, i.e. total lipids extracted from Human serum and rat liver and plasma. These samples were chosen because they are classically analyzed in nutritional Human and animal studies and they contain different lipid classes, i.e. PL, TG, CE and FFA, in different proportions (Morris et al., 1955; Yaqoob et al., 1995). (Trans)methylation efficiency was evaluated qualitatively by HP-TLC (Figure 2). FA composition obtained by GC is presented in Supplementary data. In agreement with the results obtained on individual lipid classes, HP-TLC analysis after (trans)methylation of the three total lipid extracts

confirmed that method 2 resulted in total (trans)methylation of all lipid classes present in the samples, with no unreacted species. Only free cholesterol and FAME were recorded. This suggested that (trans)methylation from the method 2 allowed correct FAME quantification irrespectively of the complexity of the lipid matrix rich in LC n-3 PUFA.

3. Conclusion

In order to ensure the reliability of the results concerning the FA composition and quantification, a (trans)methylation method adapted to all lipid classes analyzed in lipidomics, taken individually as well as in a mixture, should be selected. We demonstrated that the sequential basic/acid catalysis method with an incubation at 100°C, as described by Castro- Gomez et al. (Castro-Gómez et al., 2014) could also be applied to purified lipids rich in PUFA. Because no significant difference was observed between methods 2 and 3 on total, n-6 and n-3 PUFA in FFA and TG classes, this suggested that an incubation of 100°C did not induce a noticeable PUFA oxidation, at least in these two lipid classes. Our study also highlighted the importance of the choice of the lipid derivatization method. This may be of peculiar importance when an accurate fatty acid composition of a food matrix is required, in the case of n-3 PUFA supplementation for example. The incomplete (trans)methylation of some lipid classes can alter FA composition of total lipids. Unfortunately, this may not be overcome by the use of a single internal standard, because its proportion may also be under- or over-estimated depending on the method used. On the whole, FA compositions have to be interpreted with care within a study and, even more, when comparing studies using different (trans)methylation methods.

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was partially financially supported by the French National Association for the Research and the Technology (ANRT). Authors are grateful to Novastell and in particular Thierry Coste for providing Lecimarín F50, and also would like to thank Florent Joffre and Hugues Griffon from ITERG for their advices and technical support.

REFERENCES

- Castro-Gómez, P., Fontecha, J., & Rodríguez-Alcalá, L. M. (2014). A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta*, *128*, 518–523.
- Christie, W. W. (1993). Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In W.W. Christie (Ed.), *Advances in Lipid Methodology – Two* (pp. 69-111). Oily Press, Dundee.
- Christie, W. W., Sébédio, J. L., & Juanéda, P. (2001). A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). *Inform*, *12*, 147–152.
- Desnuelle, P. (1961). Pancreatic lipase. *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, *23*, 129–161.
- Entressangles, B., Sari, H., & Desnuelle, P. (1966). On the positional specificity of pancreatic lipase. *Biochimica Biophysica Acta*, *125*(3), 597–600.
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497–509.

- Fulk, W. K., & Shorb, M. S. (1970). Production of an artifact during methanolysis of lipids by boron trifluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, *11*(3), 276–277.
- ISO 12873:2017 - Olive oils and olive-pomace oils - Determination of wax content by capillary gas chromatography. June 2017.
- ISO 12966-2:2011 - Animal and vegetable fats and oils -- Gas chromatography of fatty acid methyl esters -- Part 2: Preparation of methyl esters of fatty acids. Retrieved November 22, 2016.
- Klopfenstein, W. E. (1971). On methylation of unsaturated acids using boron trihalide-methanol reagents. *Journal of Lipid Research*, *12*(6), 773–776.
- Kramer, J. K. G., Fellner, V., Dugan, M. E. R., Sauer, F. D., Mossoba, M. M., & Yurawecz, M. P. (1997). Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*, *32*(11), 1219–1228.
- Lepage, G., & Roy, C. C. (1988). Specific methylation of plasma nonesterified fatty acids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, *29*(2), 227–235.
- Liu, K.-S. (1994). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *71*(11), 1179–1187.
- MacGee, J., & Williams, M. G. (1981). Preparation of sphingolipid fatty acid methyl esters for determination by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, *205*(2), 281–288.
- Marinetti, G. V. (1966). Low temperature partial alcoholysis of triglycerides. *Journal of Lipid Research*, *7*(6), 786–788.

- Morris, B., & Courtice, F. C. (1955). The protein and lipid composition of the plasma of different animal species determined by zone electrophoresis and chemical analysis. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences*, 40(2), 127-137.
- Morrison, W. R., & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5, 600–608.
- Murrieta, C. M., Hess, B. W., & Rule, D. C. (2003). Comparison of acidic and alkaline catalysts for preparation of fatty acid methyl esters from ovine muscle with emphasis on conjugated linoleic acid. *Meat Science*, 65(1), 523–529.
- Park, Y., Albright, K. J., Cai, Z. Y., & Pariza, M. W. (2001). Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (trimethylsilyl) diazomethane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1158– 1164.
- Santos Júnior, O. O., Montanher, P. F., Bonfaé, E. G., Maruyama, S. A., Carbonera, F., Alberici, R. M., Eberlin, M. N., & Visentainer, J. V. (2013). Efficiencies of acid and base-catalyzed methylation of vegetable oils by ambient mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(11), 1764–1771.
- Schlechtriem, C., Henderson, R. J., & Tocher, D. R. (2008). A critical assessment of different transmethylation procedures commonly employed in the fatty acid analysis of aquatic organisms: Fatty acid derivatization. *Limnology and Oceanography, Methods*, 6(10), 523–531.

LEGEND CAPTIONS

Figure 1: HP-TLC of individual lipid classes subjected to the three methylation methods. (A) TG from fish oil; (B) PL purified from a marine lecithin; (C) FFA obtained by enzymatic lipolysis of a fish oil; (D) SE purified from the gonads of *Pecten maximus*. Methods 1, 2 and 3 were adapted from Morrison & Smith (Morrison & Smith, 1964), Castro-Gomez et al. (Castro-Gómez et al., 2014) and Christie et al. (Christie, Sébédio, & Juanéda, 2001), respectively. Method 1 consisted in an acid catalysis with an incubation at 100°C. Methods 2 and 3 used a sequential basic and then acid catalysis with an incubation at 100 °C and 50 °C, respectively.

FAME: fatty acid methyl esters, FFA: free fatty acids, PL: phospholipids, Rf: frontal report; SE: sterol esters, TG: triglycerides

Figure 2: HP-TLC plate picture of total lipids extracted from human serum, rat liver and plasma, (traces a) and their corresponding FAME obtained after (trans)methylation procedure using method 2 (Castro-Gómez et al., 2014) (traces b).

Traces 1 to 8: lipid standards; 1: 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (PE 17:0); 2: 1-monooleyl-rac-glycerol (MG 18:1 n-9); 3: Cholesterol (Chol); 4: 1,3-di-11- eicosenoin (DG 20:1 n-11); 5: α -linolenic acid (ALA ; FFA); 6: 1,2,3-triheptadecanoyl-sn- glycerol (TG 17:0); 7: cis-8,11,14-eicosatrienoic acid methyl ester (FAME 20:3 n-6); 8: cholest- 5-en-3 β -yl-octadec-9-oate (cholesterol ester 18 :1 n-9 ; CE). Traces 9 and 10: total lipids extracted from human serum (9) and the corresponding FAME (10). Traces 11 and 12: total lipids extracted from rat liver (11) and the corresponding FAME (12). Traces 13 and 14: total lipids extracted from rat plasma (13) and the corresponding FAME (14).

Figure 1A

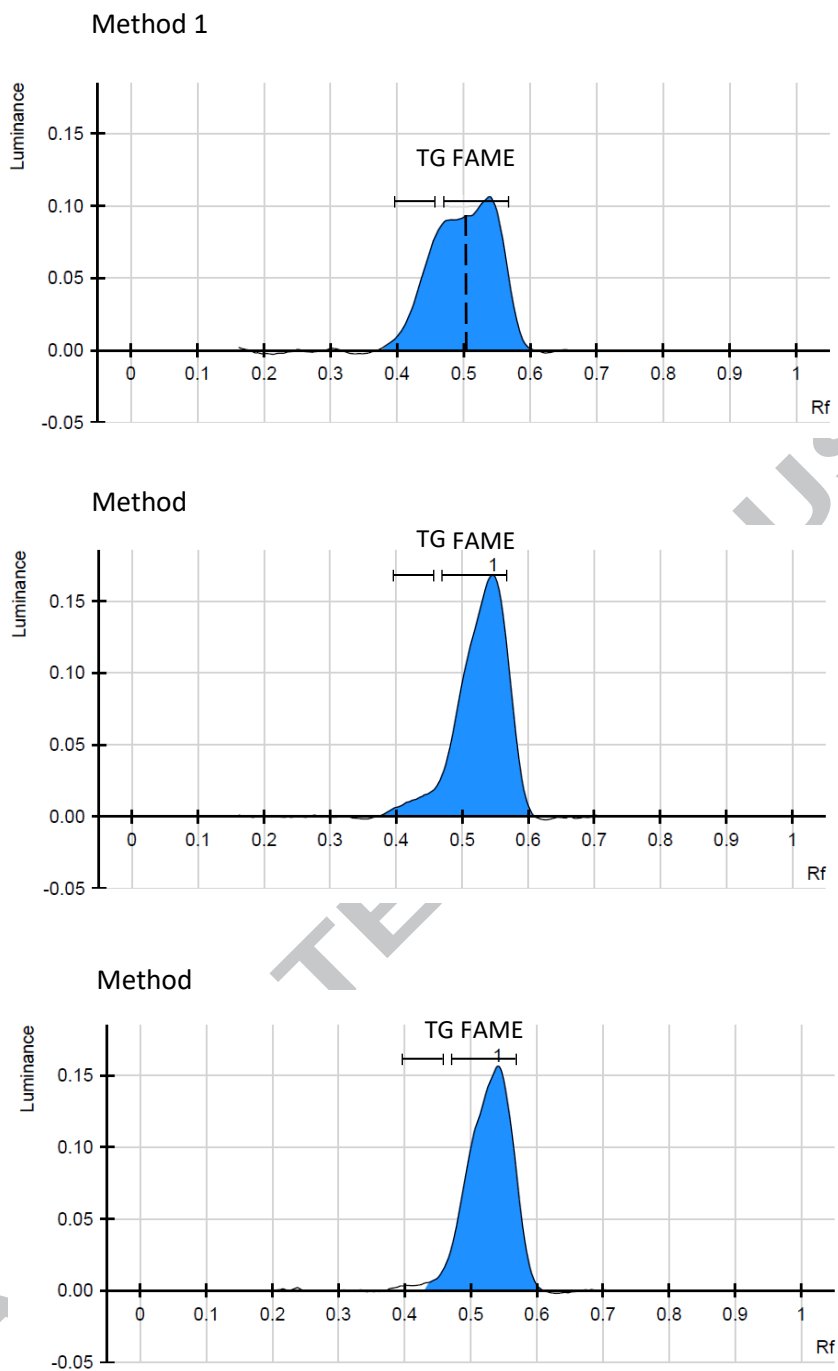


Figure 1B

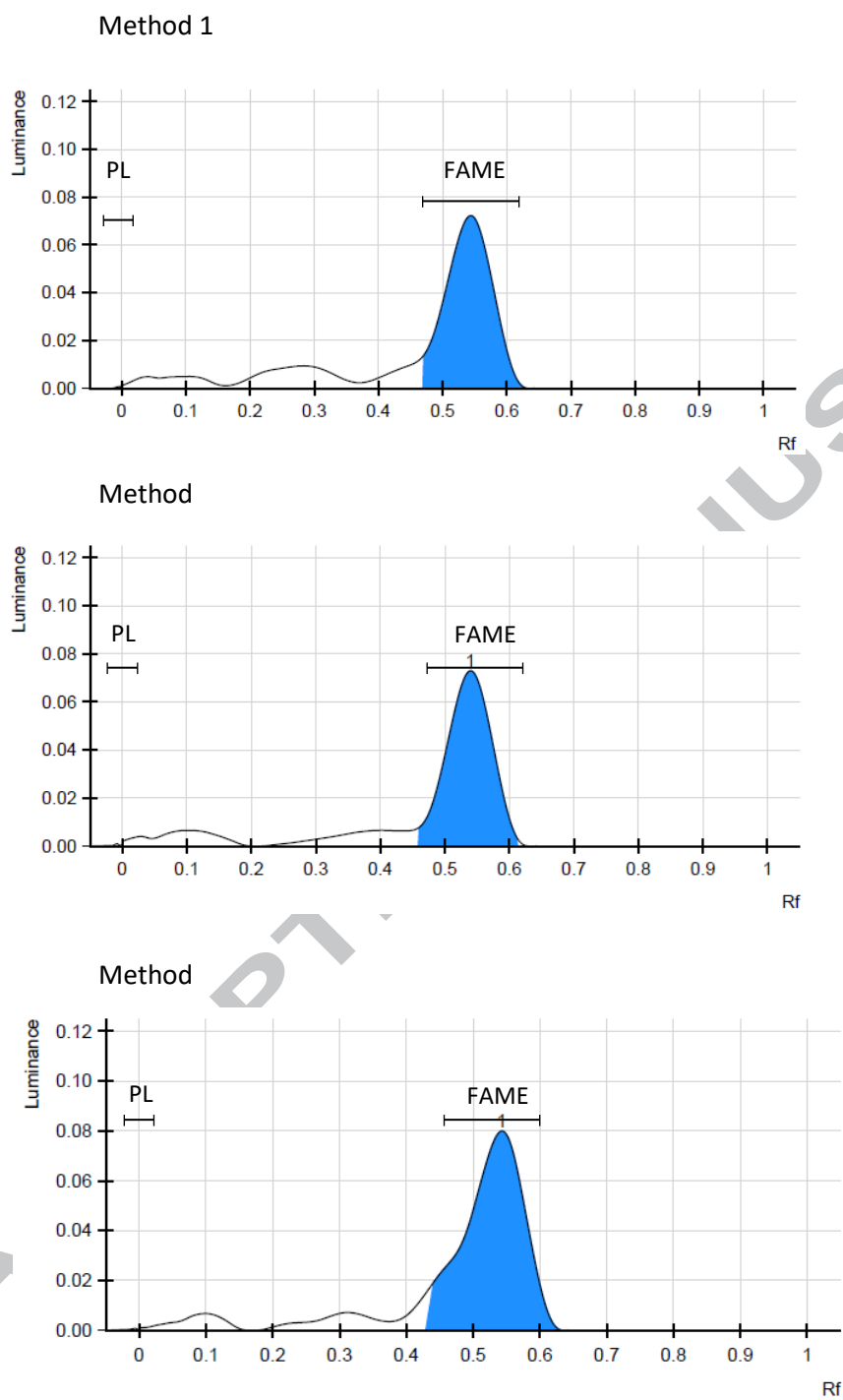


Figure 1C

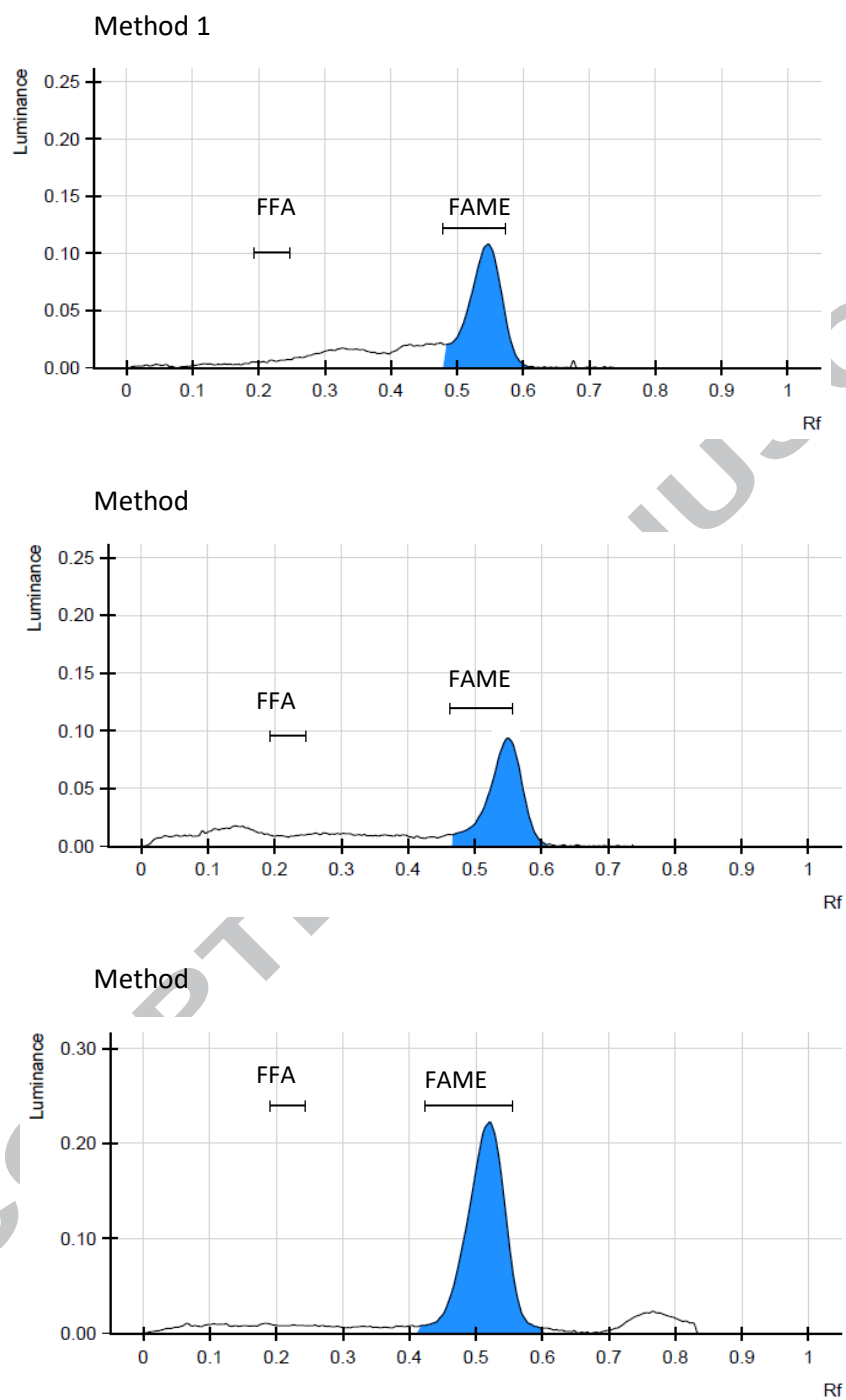


Figure 1D

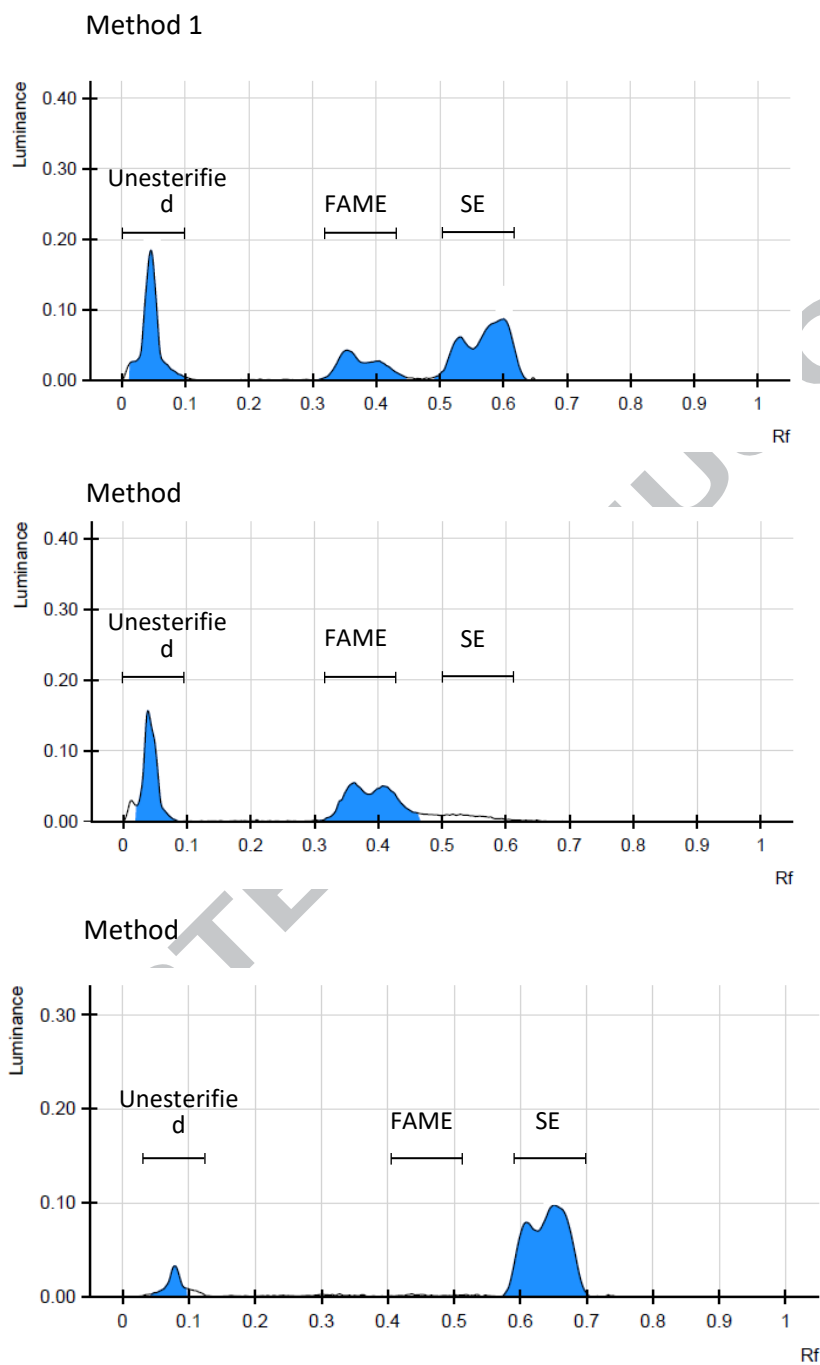


Figure 2

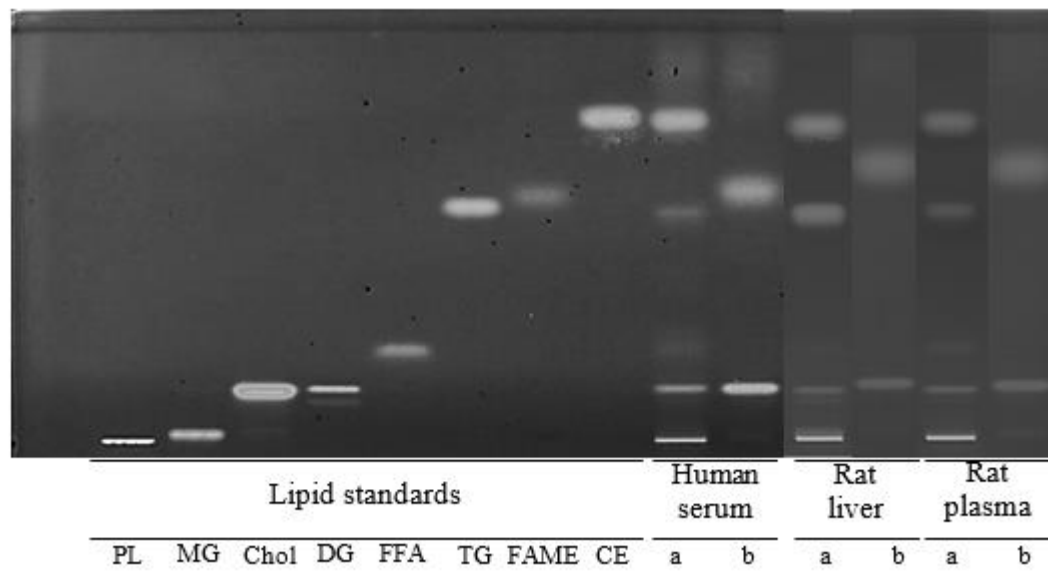


Table 1: FA amount and composition of TG from fish oil according to three transmethylation methods¹

FA (g/100g of total fatty acid)	Method 1 ²	Method 2 ²	Method 3 ²
Σ SFA	27.8 ± 1.0	27.1 ± 0.6	26.7 ± 0.7
14:0	7.2 ± 0.8	6.8 ± 0.5	6.5 ± 0.6
16:0	16.6 ± 0.2 ^a	16.1 ± 0.2 ^b	16.1 ± 0.1 ^b
18:0	3.0 ± 0.0 ^a	3.1 ± 0.0 ^b	3.1 ± 0.0 ^b
Σ MUFA	39.1 ± 0.5 ^a	41.4 ± 0.3 ^b	41.4 ± 0.3 ^b
16:1 n-7	7.9 ± 0.2 ^a	7.3 ± 0.1 ^b	7.3 ± 0.1 ^b
18:1 n-9	13.0 ± 0.3 ^a	13.4 ± 0.2 ^{ab}	13.5 ± 0.3 ^b
18:1 n-7	3.2 ± 0.0	3.2 ± 0.0	3.2 ± 0.0
20:1n-9	5.1 ± 0.2 ^a	6.0 ± 0.1 ^b	5.9 ± 0.1 ^{ab}
Σ PUFA	33.0 ± 0.6 ^a	31.3 ± 0.5 ^b	31.7 ± 0.9 ^{ab}
Σ ω-6 PUFA	4.4 ± 0.1	4.3 ± 0.0	4.4 ± 0.1
18:2 n-6	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.0	2.7 ± 0.0
20:4 n-6	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
Σ ω-3 PUFA	28.7 ± 0.5 ^a	27.2 ± 0.5 ^b	27.5 ± 0.9 ^b
18:3 n-3	1.1 ± 0.0 ^a	1.0 ± 0.0 ^b	1.0 ± 0.0 ^b
20:5 n-3	10.5 ± 0.1 ^a	9.5 ± 0.2 ^b	9.7 ± 0.3 ^b
22:5 n-3	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.0
22:6 n-3	9.1 ± 0.4	9.2 ± 0.2	9.4 ± 0.4
Total FA (µg/mg of TG)	1027.2 ± 51.6 ^a	806.0 ± 21.1 ^b	835.3 ± 52.0 ^b

¹ Values are mean \pm SD, n=6.

² Methods 1, 2 and 3 were adapted from Morrison & Smith (Morrison and Smith, 1964), Castro-Gomez (Castro-Gómez et al., 2014) and Christie (Christie et al., 2001), respectively. Method 1 consisted in an acid catalysis with an incubation at 100°C. Methods 2 and 3 used a sequential basic and then acid catalysis with an incubation at 100°C and 50°C, respectively.

Means in a line with superscripts without a common letter differ, $p < 0.05$.

Σ : sum of FA, SFA: saturated fatty acids, MUFA : monounsaturated fatty acids, PUFA : polyunsaturated fatty acids.

Table 2: FA amount and composition of PL purified from a marine lecithin according to three transmethylation methods¹

FA (g/ 100g of total fatty acid)	Method 1 ²	Method 2 ²	Method 3 ²
Σ SFA	30.3 ± 0.6	30.5 ± 0.4	29.8 ± 0.5
14:0	2.9 ± 0.1 ^{ab}	3.0 ± 0.1 ^a	2.6 ± 0.2 ^b
16:0	24.2 ± 0.5	24.2 ± 0.2	24.0 ± 0.3
18:0	2.4 ± 0.1 ^a	2.4 ± 0.1 ^a	2.3 ± 0.0 ^b
Σ MUFA	16.2 ± 0.5 ^a	16.0 ± 0.3 ^a	15.4 ± 0.1 ^b
16:1 n-7	2.6 ± 0.0	2.6 ± 0.0	2.6 ± 0.0
18:1 n-7	3.7 ± 0.0 ^a	3.7 ± 0.0 ^a	3.8 ± 0.0 ^b
18:1 n-9	4.5 ± 0.6	4.1 ± 0.0	4.1 ± 0.0
20:1 n-9	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0
24:1 n-9	0.6 ± 0.2 ^a	0.7 ± 0.3 ^a	0.0 ± 0.0 ^b
Σ PUFA	53.3 ± 0.6 ^a	53.3 ± 0.2 ^a	54.7 ± 0.5 ^b
Σ ω-6 PUFA	1.7 ± 0.0	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
18:2 n-6	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0
20:4 n-6	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0
Σ ω-3 PUFA	51.8 ± 0.6 ^a	51.8 ± 0.2 ^a	53.1 ± 0.4 ^b
18:3 n-3	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
20:5 n-3	13.6 ± 0.1 ^a	13.6 ± 0.0 ^a	14.0 ± 0.1 ^b
22:5 n-3	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.0 ± 0.0
22:6 n-3	35.5 ± 0.4 ^a	35.5 ± 0.2 ^a	36.5 ± 0.3 ^b
Total FA (µg/ mg of PL)	459.7 ± 49.0	452.0 ± 48.5	471.8 ± 60.2

¹ Values are mean \pm SD, n=6.

² Methods 1, 2 and 3 were adapted from Morrison & Smith (Morrison and Smith, 1964), Castro-Gomez (Castro-Gómez et al., 2014) and Christie (Christie et al., 2001), respectively. Method 1 consisted in an acid catalysis with an incubation at 100°C. Methods 2 and 3 used a sequential basic and then acid catalysis with an incubation at 100°C and 50°C, respectively.

Means in a line with superscripts without a common letter differ, $p < 0.05$.

Σ : sum of FA, SFA: saturated fatty acids, MUFA : monounsaturated fatty acids, PUFA : polyunsaturated fatty acids.

Table 3: FA amount and composition of purified FFA obtained by enzymatic lipolysis of a fish oil according to three transmethylation methods¹

FA (g/ 100g of total fatty acid)	Method 1 ²	Method 2 ²	Method 3 ²
Σ SFA	33.3 ± 0.1	33.3 ± 0.1	33.2 ± 0.0
14:0	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0
16:0	17.8 ± 0.1	17.7 ± 0.0	17.6 ± 0.0
18:0	12.8 ± 0.0 ^{ab}	12.9 ± 0.0 ^a	12.8 ± 0.0 ^b
Σ MUFA	45.8 ± 0.1	45.9 ± 0.1	45.9 ± 0.0
16:1 n-7	2.2 ± 0.0 ^a	2.1 ± 0.0 ^b	2.2 ± 0.0 ^{ab}
18:1 n-7	3.1 ± 0.0	3.1 ± 0.0	3.1 ± 0.0
18:1 n-9	30.9 ± 0.0	31.0 ± 0.0	30.9 ± 0.0
20:1 n-9	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
Σ PUFA	20.9 ± 0.0	20.9 ± 0.0	20.9 ± 0.0
Σ ω-6 PUFA	12.1 ± 0.0	12.0 ± 0.0	12.1 ± 0.0
18:2 n-6	10.5 ± 0.0	10.4 ± 0.0	10.4 ± 0.0
20:4 n-6	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Σ ω-3 PUFA	8.8 ± 0.0	8.8 ± 0.0	8.8 ± 0.0
18:3 n-3	3.1 ± 0.0	3.1 ± 0.0	3.1 ± 0.0
20:5 n-3	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0
22:5 n-3	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0
22:6 n-3	1.7 ± 0.0	1.8 ± 0.0	1.8 ± 0.0
Total FA (µg/ mg of FFA)	765.9 ± 17.3	767.3 ± 14.1	786.7 ± 8.4

¹ Values are mean \pm SD, n=6.

² Methods 1, 2 and 3 were adapted from Morrison & Smith (Morrison and Smith, 1964), Castro-Gomez (Castro-Gómez et al., 2014) and Christie (Christie et al., 2001), respectively. Method 1 consisted in an acid catalysis with an incubation at 100°C. Methods 2 and 3 used a sequential basic and then acid catalysis with an incubation at 100°C and 50°C, respectively.

Means in a line with superscripts without a common letter differ, $p < 0.05$.

Σ : sum of FA, SFA: saturated fatty acids, MUFA : monounsaturated fatty acids, PUFA : polyunsaturated fatty acids.

Table 4: FA amount and composition of sterol esters purified from the gonads of *Pecten maximus* according to three transmethylation methods

FA ¹ (g/ 100g of total fatty acid)	Method 1 ²	Method 2 ²	Method 3 ²
Σ SFA	16.8 ± 0.2 ^a	18.6 ± 1.7 ^a	22.7 ± 2.4 ^b
14:0	1.3 ± 0.1 ^{ab}	1.5 ± 0.1 ^a	0.8 ± 0.3 ^b
16:0	10.3 ± 0.2 ^a	10.5 ± 0.6 ^{ab}	12.4 ± 2.0 ^b
18:0	2.4 ± 0.1 ^a	3.7 ± 0.8 ^{ab}	5.5 ± 0.3 ^b
Σ MUFA	17.3 ± 0.7 ^a	18.2 ± 0.2 ^{ab}	20.2 ± 2.2 ^b
16:1 n-7	3.5 ± 0.2 ^a	3.3 ± 0.1 ^{ab}	2.2 ± 0.3 ^b
18:1 n-7	3.6 ± 0.1 ^{ab}	3.8 ± 0.1 ^a	2.5 ± 0.1 ^b
18:1 n-9	1.7 ± 0.2 ^a	2.0 ± 0.5 ^{ab}	4.5 ± 2.4 ^b
20:1 n-9	2.1 ± 0.1 ^{ab}	2.5 ± 0.1 ^a	1.5 ± 0.3 ^b
Σ PUFA	64.7 ± 0.7 ^a	61.9 ± 1.8 ^{ab}	57.2 ± 2.8 ^b
Σ ω-6 PUFA	7.5 ± 0.2 ^{ab}	8.0 ± 0.3 ^a	4.3 ± 0.8 ^b
18:2 n-6	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.3
20:4 n-6	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.4
Σ ω-3 PUFA	58.2 ± 0.7 ^a	55.2 ± 1.6 ^{ab}	52.8 ± 2.4 ^b
18:3 n-3	0.9 ± 0.1 ^a	0.8 ± 0.0 ^{ab}	0.6 ± 0.1 ^b
20:5 n-3	26.2 ± 0.5 ^a	24.4 ± 0.6 ^{ab}	22.7 ± 1.6 ^b
22:5 n-3	1.4 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	0.0 ± 0.0 ^b
22:6 n-3	22.9 ± 0.2	22.1 ± 0.7	23.6 ± 1.4
Total FA (µg/ mg of SE)	447.1 ± 62.1 ^a	285.3 ± 12.5 ^b	452.3 ± 35.7 ^a

¹ Values are mean \pm SD, n=6.

² Methods 1, 2 and 3 were adapted from Morrison & Smith (Morrison and Smith, 1964), Castro-Gomez (Castro-Gómez et al., 2014) and Christie (Christie et al., 2001), respectively. Method 1 consisted in an acid catalysis with an incubation at 100°C. Methods 2 and 3 used a sequential basic and then acid catalysis with an incubation at 100°C and 50°C, respectively.

Means in a line with superscripts without a common letter differ, $p < 0.05$.

Σ : sum of FA, SFA: saturated fatty acids, MUFA : monounsaturated fatty acids, PUFA : polyunsaturated fatty acids.

Highlights

- A (trans)methylation method was optimized for analysis of long-chain n-3 PUFA.
- Sequential use of basic and then acid catalysts is the most efficient method.
- The selected methylation method is efficient on all lipid classes alone or blended.
- The selected method allows quantitative fatty acid analysis of all lipid classes.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Annexe 3 : Composition complète en acides gras des formules lipidiques

Profil complet en acides gras (moles%) des formules lipidiques ¹					
	TG _{veg} ¹	TG _{veg} +PL _{veg}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
<i>Acides gras (moles%)</i>					
12:0	2,8	3,0	2,6	2,6	2,7
13:0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
14:0	1,6	1,4	1,7	1,7	1,5
14:1 n-5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
15:0	0,0	1,0	0,1	0,1	0,1
16:0 DMA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:0 iso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:0	17,4	16,1	17,0	16,7	16,5
16:1 t	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
16:1 n-9	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
16:1 n-7	0,1	0,1	0,6	0,6	0,3
17iso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
17:0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
18:0 DMA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:3 n-3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
17:1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
18:1 DMA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
16:4 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	3,9	3,4	3,6	3,1	3,3
18:1 t	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:1 n-11	0,0	0,5	0,4	0,5	0,4
18:1 n-9	62,2	59,3	61,3	61,0	64,6
18:1 n-7	0,9	0,5	0,9	0,5	0,3
18:2 tt + 9c13t	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:2 ct	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
18:2 tc	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
18:2 n-6	9,2	8,5	7,8	6,6	7,9
18:3 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:3 t	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
18:3 n-3	0,6	0,7	0,7	0,4	0,7
20:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
18:4 n-3	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0
20:1 n-11	0,0	0,1	0,2	0,1	0,0
20:1 n-9	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2
20:1 n-7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:2 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:3 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:3 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20:4 n-6	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1
22:0	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4
20:4 n-3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
22:1 n-11	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
22:1 n-9	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
20:5 n-3	0,0	0,0	0,9	1,0	0,8
22:4 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
22:5 n-6	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0
24:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
24:1 n-9	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
22:5 n-3	0,0	0,0	0,2	0,2	0,1

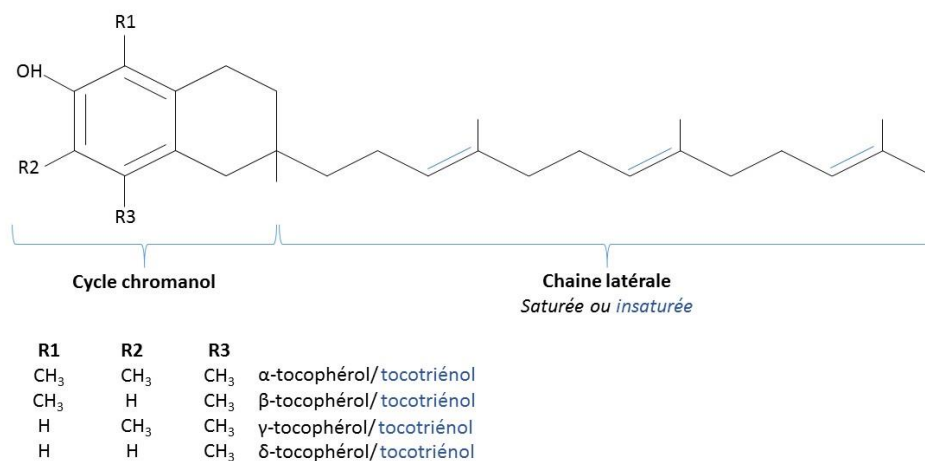
22:6 n-3	0,0	0,0	2,2	2,5	2,2
Σ AGS	26,7	25,8	25,7	25,2	24,9
Σ AGMI	63,5	65,7	61,6	63,4	63,0
Σ AGPI	9,9	9,4	12,6	11,5	12,0
Σ AGPI n-6	9,2	8,5	8,2	7,0	8,0
Σ AGPI n-3	0,7	0,7	4,3	4,4	3,9
n-6/n-3	14,0	11,6	1,9	1,6	2,1
DHA / EPA	-	-	2,4	2,5	2,6

¹ : TG_{veg} : phase huileuse dépourvue d'AGPI-LC n-3 ; $TG_{veg}+PL_{veg}$: formule dépourvue d'AGPI-LC n-3 à base d'huiles végétales supplémentées en lécithine de soja ; TG_{n-3} : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; $TG_{n-3}+PL_{veg}$: formule enrichie en huiles de poisson supplémentées en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; $TG_{veg}+PL_{n-3}$: formule à base d'huiles végétales supplémentées en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Σ : somme ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés ; ct : cis-trans ; DHA : acide docosahexaénoïque ; DMA : diméthylacétales ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; tc : trans-cis ; tt + 9c13t : tout trans + 9cis-13trans.

Annexe 4 : Dosage des tocophérols et tocotriénols des formules lipidiques par chromatographie liquide à haute performance

La vitamine E constitue un ensemble de 8 composés vitaminiques constitués d'une chaîne latérale, pouvant être saturée (tocophérols) ou insaturée (tocotriénols), et d'un cycle chromanol méthylé dont le nombre et la position du ou des groupement(s) méthyle(s) détermine l'isoforme α , β , γ et δ des tocophérols et tocotriénols.



Structure chimique des composés vitaminiques E

En conformité avec la norme **NF en ISO 9936** (ISO 9936, 2016), les différents composés vitaminiques E sont quantifiés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP ; série 1100, Agilent, Etats-Unis) équipée d'une colonne de silice greffée avec des groupements diols (Lichrosphère, 250 x 4 mm, diamètre : 5 μ m ; VWR, Etats-Unis) et d'un détecteur de fluorescence. Les formules lipidiques sont dissoutes à une concentration de 10 mg/mL dans de l'heptane. Un volume de 10 à 20 μ L est injecté en CLHP. L'analyse est réalisée en mode isocratique à un débit de 1 mL/min, avec une phase mobile composée d'heptane et de tétrahydrofurane (96/4 ; v/v) pour une durée de 35 min.

La quantification pondérale des composés vitaminiques E est obtenue à partir d'une solution étalon composée d'acétate d' α -tocophérol, d' α -, γ - et δ -tocophérol à des concentrations précisément mesurées et chromatographiée dans les mêmes conditions.

L'activité vitaminique (en mg d'équivalent α -tocophérol/kg de matière grasse) est calculée selon la formule :

$$\text{Act Vit E} : 1,00 W_{\alpha} + 0,67 W_{AC\alpha} + 0,50 W_{\beta} + 0,10 W_{\gamma} + 0,03 W_{\delta}$$

Où Act Vit E : activité vitaminique en mg d'équivalent α -tocophérol/kg ; W_{α} : teneur en α -tocophérol (mg/kg) ; $W_{AC\alpha}$: teneur en acétate de tocophérol (mg/kg) ; W_{β} : teneur en β -tocophérol (mg/kg) ; W_{γ} : teneur en γ -tocophérol (mg/kg) ; W_{δ} : teneur en δ -tocophérol (mg/kg).

Les coefficients utilisés dans cette formule ont été publiés et validés par la DGCCRF (direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes) auprès de la FNCG (Fédération Nationale des Corps Gras).

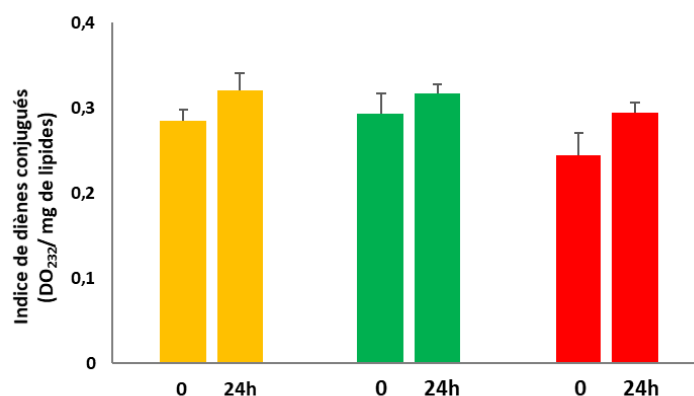
Annexe 5 : Composition nutritionnelle détaillée des régimes expérimentaux

Composition nutritionnelle des régimes expérimentaux utilisés lors de l'étude de supplémentation chez le rat

Éléments nutritionnels	Régimes expérimentaux
<i>g/100g de régime</i>	
Protéines	24,5
Glucides	1,0
Lipides	2,1
Minéraux	0,8
Arginine	1,0
Lysine	2,1
Méthionine	0,8
Tyrosine	1,1
Tryptophane	0,3
Méthionine + Cystéine	0,9
Amidon	42,2
Saccharose	6,5
Cellulose	4,8
Formules lipidiques	5
Cholestérol	1
<i>mg/g de régime</i>	
AGS	10,4
16:0	7,1
18:0	1,4
AGMI	26,9
18:1 n-9	26,0
AGPI	5,0
AGPI n-6	3,2
18:2 n-6	3,1
20:4 n-6	0,1
AGPI n-3	1,7
18:3 n-3	0,3
20:5 n-3	0,4
22:6 n-3	1,0
Sodium	3152,8
Potassium	3710,4
Magnésium	1222,3
Calcium	7750,8
Manganèse	531,1
Fer	107,9
Cuivre	86,2
Zinc	314,5
Phosphore	6225,4
Chlore	7872,7
<i>UI/ kg</i>	
Vitamines A	27170,0
Vitamine D3	3396,3
Vitamine E	289,9
<i>mg/ kg</i>	
Vitamine B1	27,2
Vitamine B4	1375,5
Vitamine K3	24,5

Annexe 6 : Evaluation de la stabilité oxydative des régimes expérimentaux

La stabilité oxydative des régimes enrichis en AGPI-LC n-3 (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**) est évaluée par la mesure l'indice des diènes conjugués des lipides préalablement extraits. Les mesures sont réalisées dès l'élaboration des régimes (T0) et 24h après exposition dans des conditions similaires à celles retrouvées dans l'étude nutritionnelle (*i.e.* gamelle en aluminium, température $22 \pm 1^\circ\text{C}$, hydrométrie 60% et cycle jour/nuit de 12h/12h).



Analyse de l'indice de diènes conjugués (DO₂₃₂/mg de lipides) des régimes enrichis en AGPI-LC n-3 sous différentes formes moléculaires de vectorisation, 24h après exposition dans les mêmes conditions que l'étude nutritionnelle¹

¹ : Les régimes sont composés de 5% de formules lipidiques correspondant à différentes formes moléculaires d'AGPI-LC n-3 :

■ **TG_{n-3}** : formule enrichie en huiles de poisson (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; ■ **TG_{n-3}+PL_{veg}** : formule enrichie en huiles de poisson supplémentée en lécithine de soja (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des TG) ; ■ **TG_{veg}+PL_{n-3}** : formule à base d'huiles végétales supplémentée en PL marins (AGPI-LC n-3 estérifiés sur des PL).

Les valeurs sont exprimées sous la forme moyenne \pm écart-type, n=3/ régime ; p>0,05 ; test de student.

Les données indiquent qu'à l'élaboration des formules (T0), les régimes enrichis en AGPI-LC n-3 (**TG_{n-3}**, **TG_{n-3}+PL_{veg}** et **TG_{veg}+PL_{n-3}**) présentent des indices de diènes conjugués identiques. Par ailleurs, aucun des régimes ne présente une élévation significative de l'indice de diènes conjugués, après 24h de stockage dans nos conditions expérimentales. Les régimes étant fournis quotidiennement, ils peuvent donc être considérés comme chimiquement stables au moment où les animaux les consomment.

Annexe 7 : Caractérisation des espèces moléculaire de PL du cerveau et de la rétine par spectrométrie de masse

Les extraits lipidiques du cerveau et de la rétine sont aléatoirement regroupés afin de générer 3 pools de lipides (1 mg/mL dans du chloroforme/ méthanol ; v/v) par groupe et par organe. Les analyses en spectrométrie de masse ont été effectuées sur ces 3 pools, en collaboration avec Corinne Buré (CBMN, CNRS).

Analyse en infusion

L'analyse en infusion est une méthode d'analyse dans laquelle l'échantillon (extrait lipidique) est directement injecté dans le spectromètre de masse (Qtrap 5500, AB Sciex, Canada) après ionisation par électrospray (Source TurboV). Cette technique consiste à identifier la nature des PL présents dans les échantillons avant les analyses en chromatographie liquide couplée à une analyse en spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Les pools de lipides issus de la rétine et du cerveau sont dilués à une concentration finale de 0,1 mg/mL dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) contenant 7,5 mM d'acétate d'ammonium. Les échantillons sont injectés dans la source du spectromètre de masse à un débit de 7 μ L/min. Les expériences sont réalisées en mode négatif pour visualiser les classes de PL (PE, PS, PA, PI et PG) (23 scans) afin d'identifier la longueur et le degré d'insaturation des chaînes d'acides gras et en mode positif pour visualiser l'ion issu de la fragmentation des PC (1 scan). Le gaz de collision utilisé est l'azote. L'énergie de collision est fixée à -50 ou +50 eV pour les modes négatif et positif, respectivement. Les espèces de phospholipides sont identifiées en utilisant le logiciel Lipid View (v1.0, AB Sciex, Canada) (Buré et al., 2013).

Analyse en chromatographie liquide en phase inverse couplée à la MS/MS

L'analyse en chromatographie liquide en phase inverse couplée à la MS/MS (LC-IP-MS/MS) est réalisée avec un spectromètre de masse Qtrap 5500 (AB Sciex) couplé avec un système de chromatographie liquide (Ultimate 3000, Dionex). Les extraits lipidiques (5 μ L) de cerveau et de rétine sont mélangés à 5 μ L de solution de standards internes à 10 μ M (PE 17:0/17:0, PS 17:0/17:0, PC 17:0/17:0, PA 17:0/17:0, PI 14 :1/14:1 et PG 17:0/17:0), puis dilués dans 40 μ L d'isopropanol/méthanol/eau (50/10/40 ; v/v/v). La chromatographie en phase inverse permet de séparer et de quantifier les classes de PL et leurs chaînes d'acides gras, exceptée la PC pour

laquelle on accède uniquement au nombre total de carbone. La séparation des PL est menée à 40°C sur une colonne Synergi Fusion-RP (150x1 mm, 80 Å, 4 µm ; Phenomenex). Le gradient d'éluion utilisé est une combinaison d'un éluant A (isopropanol/méthanol/eau (50/10/40 ; v/v/v) avec 0,2% d'acide formique et 0,028% d'hydroxyde d'ammonium) et d'un éluant B (isopropanol avec 0,2% d'acide formique et 0,028% d'hydroxyde d'ammonium) dont les proportions relatives varient au cours du temps d'éluion. Le flux de l'éluant est fixé à 40 µL/min et le volume d'échantillon injecté est de 3 µL. Le gaz de collision utilisé est l'azote. L'énergie de collision varie de -48 à -62 eV pour l'identification des PE, PS, PA, PI et PG et est fixée à 47 eV pour la PC. Les expériences en MS/MS sont réalisées avec 21 scans MRM (Multiple Reaction Monitoring) en mode positif et 127 scans MRM en mode négatif selon l'identification préétablie par la technique par infusion. Les phospholipides sont quantifiés grâce à l'utilisation du logiciel Multi Quant (v2.1, AB Sciex).

Gradient d'éluion appliqué pour la séparation des PL en chromatographie liquide

Temps d'éluion (min)	Eluant A (%) ¹	Eluant B (%) ²
0	70	30
5	50	50
30	20	80
31-41	5	95
42-47	95	5
52-62	70	30

¹ : Eluant A : isopropanol/ méthanol/eau (10/50/40 ; v/v/v) + 0,2 % d'acide formique + 0,028% d'hydroxyde d'ammonium.

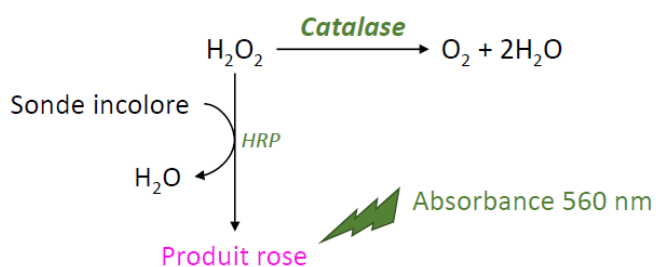
² : Eluant B : isopropanol + 0,2 % d'acide formique + 0,028% d'hydroxyde d'ammonium.

Annexe 8 : Dosage de l'activité des enzymes catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase par kit enzymatique

Catalase

L'activité hépatique de la CAT est dosée à l'aide d'un kit colorimétrique selon les conditions indiquées par le fournisseur (Arbor Assays, Etats-Unis). Cette méthode repose sur une compétition enzymatique entre la CAT présente dans l'échantillon et la peroxydase de raifort (HRP) vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Brièvement, 25 μ L d'un extrait enzymatique de foie dilué sont déposés dans une microplaque de titration auquel sont ajoutés 25 μ L d' H_2O_2 . Après 30 min d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, 25 μ L de substrat et 25 μ L d'HRP sont ajoutés dans les puits. Après 15 min d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue à 560 nm au lecteur de microplaque (Synergy HTX, Biotek). L'activité de la CAT (μ mol/mL/min) des échantillons est obtenue par comparaison de la densité optique avec une courbe standard réalisée avec des activités croissantes en CAT, analysées dans les mêmes conditions et sur la même microplaque. L'activité hépatique de la CAT est ramenée en fonction de la concentration en protéines totales de l'échantillon (U/ g de protéines totales de foie).



Dosage de l'activité de la CAT selon les recommandations du fournisseur du kit (Arbor Assays)

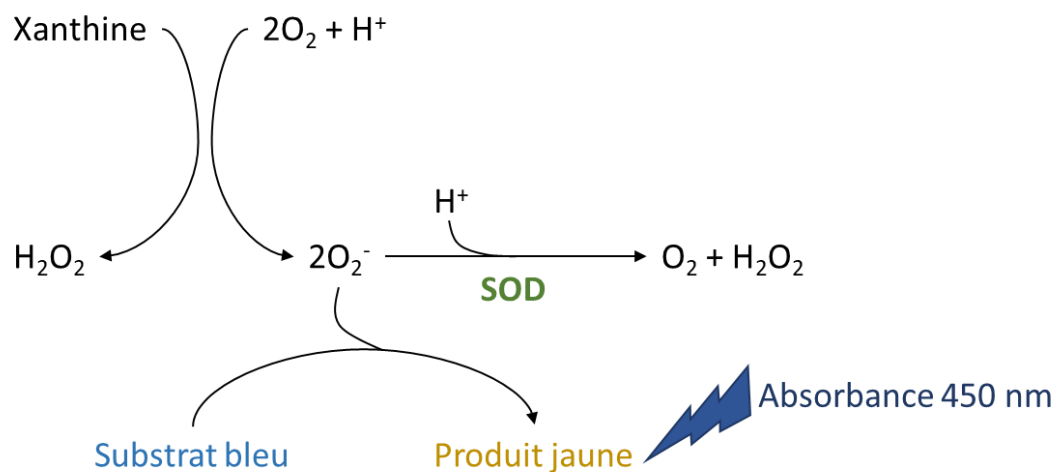
H_2O : eau ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; HRP : peroxydase de raifort ; O_2 : oxygène.

Superoxyde dismutase

L'activité hépatique de la SOD est dosée à l'aide d'un kit colorimétrique selon les conditions indiquées par le fournisseur (*Arbor Assays*, Etats-Unis).

Le principe de cette méthode repose sur la capacité de la SOD à inhiber le flux d'anions superoxydes (O_2^-) généré par le système xanthine/xanthine oxydase.

Brièvement, 10 μ L d'un extrait enzymatique de foie dilué sont déposés dans une microplaque de titration auquel sont ajoutés 50 μ L de substrat et 25 μ L de xanthine oxydase. Après 20 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance des échantillons est lue à 450 nm au lecteur de microplaque (Synergy HTX, Biotek). L'activité SOD (μ mol/ mL/ min) des échantillons est obtenue par comparaison de la densité optique avec une courbe standard réalisée avec des activités croissantes en SOD, analysées dans les mêmes conditions et sur la même microplaque. L'activité hépatique de la SOD est ramenée en fonction de la concentration en protéines totales de l'échantillon (U/ mg de protéines totales de foie).



Dosage de l'activité de la SOD selon les conditions indiquées par le fournisseur du kit enzymatique (*Arbor Assays*)

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; HRP : peroxydase de raifort ; O_2 : oxygène ; O_2^- : anion superoxyde ; SOD : superoxyde dismutase.

Glutathion peroxydase

L'activité hépatique de la GPx est dosée à l'aide d'un kit colorimétrique, selon les conditions indiquées par le fournisseur (Biovision, Etats-Unis). Le principe repose sur la capacité de la glutathion réductase à réduire le glutathion oxydé (GSSG) lors de l'élimination des peroxydes lipidiques par la GPx, en sa forme réduite (GSH) par oxydation du NADPH en NADP⁺.

Brièvement, 50 µL d'extrait enzymatique de foie dilué sont déposés dans une microplaque de titration auquel sont ajoutés 40 µL de mix réactionnel constitué de 40 mM de NADPH, de glutathion réductase et de GSH. Après 15 min d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière, l'absorbance est lue une première fois à 340 nm (Lecture 1) au lecteur de microplaque (Synergy HTX, Biotek) afin de déterminer l'absorbance initiale du NADPH. L'activité du système réactionnel GPx/ glutathion réductase est initiée par addition de 10 µL de cumène hydroperoxyde. Après 5 min d'incubation à température ambiante, à l'abri de la lumière, une deuxième lecture (Lecture 2) à 340 nm est effectuée afin de déterminer l'absorbance du NADPH restant.

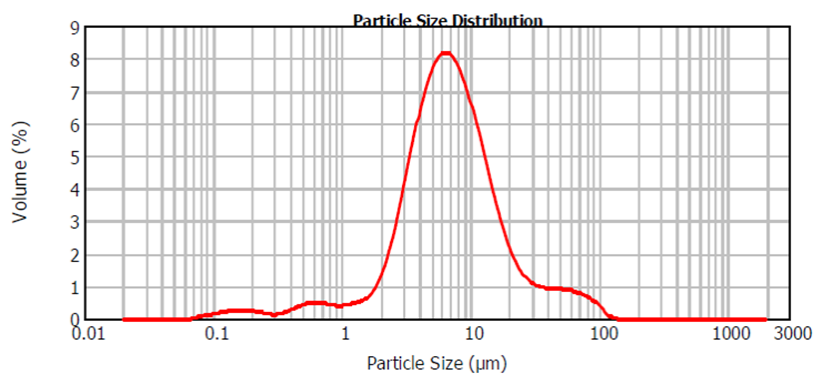
La quantité de NADPH au deux lectures est obtenue par comparaison à une courbe standard réalisée avec des quantités croissantes en NADPH, analysées dans les mêmes conditions et sur la même microplaque. La quantité de NADPH consommée est obtenue en calculant la différence entre la quantité de NADPH initiale et la quantité de NADPH restant après 5 min d'incubation. L'activité hépatique de la GPx est exprimée en U par mg de protéines totales sur 5 min de temps réactionnel, où 1 unité correspond à la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 µmol de NADPH en NADP⁺.



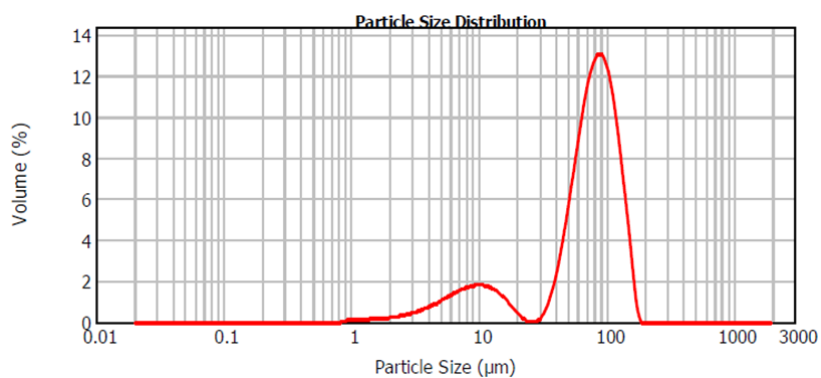
Dosage de l'activité de la GPx selon les recommandations du fournisseur du kit (Biovision)

GPx : glutathion peroxydase ; GSH : glutathion sous sa forme réduite ; GSSG glutathion sous sa forme oxydée ; H₂O : eau ; NADP : nicotinamide adénine diphosphate ; NADPH : nicotinamide adénine diphosphate hydrogénée.

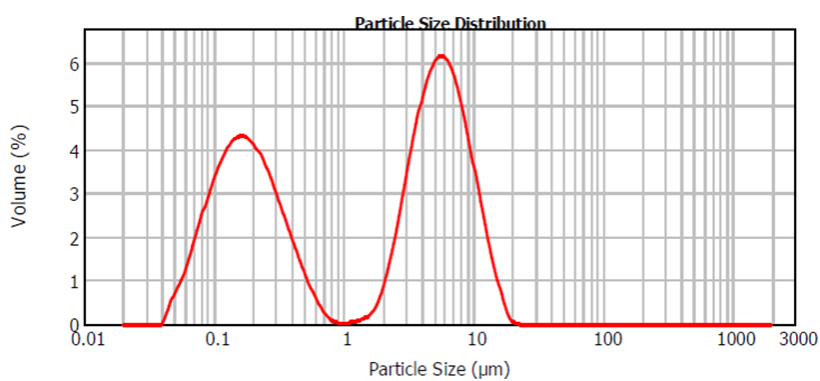
Annexe 9 : Profil granulométrique des émulsions $TG_{n-3}+PL_{veg}$ et $TG_{veg}+PL_{n-3}$ et des liposomes préparés à partir des PL_{n-3}



Profil granulométrique de l'émulsion $TG_{n-3}+PL_{veg}$



Profil granulométrique de l'émulsion $TG_{veg}+PL_{n-3}$



Profil granulométrique des liposomes préparés à partir des PL marins

Annexe 10 : *In vitro* lipolysis and *in vivo* absorption of omega-3 polyunsaturated fatty acids according to their chemical form. Sehl A., Couédelo L., Chamekh-Coelho L., Vaysse C., Cansell M. (2019). *British Journal of Nutrition*.

DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114519001491>

In vitro lipolysis and lymphatic absorption of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in the rat: influence of the molecular lipid species as carrier

Anthony Sehl^{1,2}, Leslie Couëdelo¹, Ikram Chamekh-Coelho¹, Carole Vaysse¹, Maud Cansell²

¹ITERG, Nutrition Health and Lipid Biochemistry Department, 33610 Canéjan, France

²University of Bordeaux, CBMN, UMR 5248, Bordeaux INP, 33607 Pessac, France

* Corresponding author

Email address: mcansell@enscbp.fr (Maud Cansell)

Tel number: +335 40 00 66 95

Fax number: +335 56 37 03 36

Running title: *Metabolic fate of n-3 fatty acids*

Keywords: n-3 polyunsaturated fatty acids, triglycerides, phospholipids, bioavailability, lymph

Abbreviations:

2,7-dichlorofluorescein (2,7-DCF), 2-monoglycerides (2-MG), alpha-linolenic acid (ALA), chylomicrons (CM), docosahexaenoic acid (DHA), ethyl esters (EE), eicosapentaenoic acid (EPA), fatty acids (FA), fatty acid methyl esters (FAME), free fatty acids (FFA), heptadecanoic acid (FFA 17:0), flame ionization detector (FID), glycerol-3-phosphate (G3P), gas chromatography (GC), lysophospholipids (lysoPL), monounsaturated fatty acids (MUFA), n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LC-PUFA), n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA), n-6 polyunsaturated fatty acids (n-6 PUFA), nuclear magnetic resonance (NMR), 1,2-diheptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (PC 17:0), phospholipase A2 (PLA₂), phospholipids (PL), polyunsaturated fatty acids (PUFA), red blood cells (RBS), saturated fatty acids (SFA), triglycerides (TG), 1,2,3-triheptadecanoyl-sn-glycerol (TG 17:0), thin layer chromatography (TLC).

ABSTRACT

The aim of this work was to study the bioavailability of fatty acids, focusing on n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids (n-3 LC-PUFA), carried by different molecular lipid species, *i.e.* phospholipids (PL) or triglycerides (TG), with three formulations based on fish oils or marine PL, providing a similar n-3 LC-PUFA amount. The digestive lipolysis was first assessed using an *in vitro* enzymatic model. Then, intestinal absorption and enterocyte metabolism were investigated *in vivo*, on male Wistar rats through lymph lipid analysis. The *in vitro* results showed that the release of n-3 LC-PUFA from lipolysis was increased by 48% when fatty acids were provided as PL rather than TG. The *in vivo* results demonstrated that eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) from both TG and PL were similarly absorbed and incorporated into lymph lipids. However, DHA was mainly distributed at the *sn*-1/3 positions of lymph TG when provided as marine PL, whereas it was equally distributed at the three positions with marine TG. On the whole, even if the molecular lipid species of n-3 LC-PUFA did not greatly modify the *in vivo* digestion and absorption steps, it modulated the rearrangement of DHA on the glyceride positions of the lymph TG, which may further impact the DHA metabolic fate and tissue accretion. Consequently, this study has provided data which may be used to formulate lipid diets rich in DHA in the context of an insufficient consumption of n-3 PUFA in Western countries.

INTRODUCTION

Numerous studies have demonstrated that n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), especially eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3), are associated with a reduced risk of developing several pathologies such as cardiovascular⁽¹⁾, neurodegenerative⁽²⁾, inflammatory⁽³⁾ diseases, and cancer⁽⁴⁾. Indeed, EPA and DHA are directly implicated in lipid metabolism by lowering triglyceridemia⁽⁵⁾ but they are also precursors of eicosanoids with strong anti-inflammatory properties^(3, 6). Results from the latest French epidemiological study⁽⁷⁾ have shown that, even if the consumption of total lipids was in line with the recommendations (34% of the total energy intake for 35-40% recommended), EPA and DHA consumption was at least 32% lower than the French guidelines (117 and 169 mg per day, respectively, for recommendations of 250 mg per day of each n-3 long-chain PUFA (n-3 LC-PUFA))^(8, 9). In order to cover the n-3 LC-PUFA physiological needs, increasing EPA and DHA intakes represents a major nutritional challenge. One of the strategies consists in improving their bioavailability, without changing the total lipid intake. Several studies have demonstrated that lipid bioavailability depends on physicochemical factors of the dietary intake⁽¹⁰⁻¹⁴⁾. Indeed, nowadays, EPA and DHA are essentially consumed as oily fish for food intake or as fish oil (mainly triglycerides (TG) or ethyl esters (EE)) in food supplements. In the case of food supplements, the interest for marine phospholipids (PL) has recently increased. However, the limited data concerning the impact of the molecular lipid species (TG vs PL) of lipid intake on the n-3 LC-PUFA fate, leads to conflicting results. On the one hand, n-3 LC-PUFA levels were increased in the liver and brain of rats fed EPA and DHA in the form of PL compared to TG^(15, 16). On the other hand, accretion of DHA in rat liver, plasma and kidney was significantly lower when it was provided as PL^(17, 18). Human studies were even less conclusive. In a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover study, a 4 week-consumption of 600 mg of n-3 LC-PUFA in PL increased the n-3 LC-PUFA levels in plasma and red blood cells (RBC) compared with the TG form⁽¹⁹⁾. In contrast, no effect of the molecular species of the dietary lipids (TG vs PL) was observed on n-3 LC-PUFA levels in plasma and RBC after 28 consecutive days of supplementation with 816 mg EPA per day and 522 mg DHA per day⁽²⁰⁾. These contradictory results may account for different experimental designs, especially different EPA/DHA ratios, and prevent accurate comparison. Moreover, the impact of the molecular lipid species form was often studied by using fish oil for TG and krill oil for PL. However, it is worth noting that krill oil only provides 40-60% of n-3 PUFA in the form of PL, while the remaining fraction originates

from TG and free fatty acids (FFA)^(21, 22). As a result, the role of PL as a lipid carrier on n-3 LC-PUFA metabolic fate is not clearly established. To our knowledge, only one study provided n-3 PUFA only as TG or as PL, and showed a better lymphatic absorption of n-3 LC-PUFA for rats fed PL vs TG⁽²³⁾. However, PL were structured in liposomes while TG were provided as fish oil in bulk phase, so that the physical state of the two formulations was not comparable.

Thereby, the objective of the present study is to provide data on the digestibility and the intestinal absorption of n-3 LC-PUFA according to their molecular lipid species, only in the bulk oily phase. Special attention was paid to ensure that the EPA/DHA ratio in the dietary lipid sources remained the same in order to ensure comparable results. n-3 LC-PUFA esterified in TG or PL were first subjected to an *in vitro* lipolysis in a titrimetric model. Intestinal absorption of n-3 LC-PUFA was studied *in vivo* in a rat lymph duct fistula model. The lipid and fatty acid compositions of the lymph were analyzed. It is worth noting that *in vivo* rodent models are considered as appropriate study models to assess oral compound bioavailability. They are often used in single dose protocols or supplementation studies^(11,12,14,23). Indeed, similar physiological and physicochemical events, in particular those implying lipolytic enzymes, are described in both rodents and humans. Moreover, lymph analysis gives direct information on intestinal bioavailability, in contrast to blood, where the lipid composition may be contaminated by lipoproteins from liver metabolism. Thus, rat studies provide useful data to better understand the early stages of lipid digestion and investigate the intestinal bioavailability of FA of interest.

METHODS

Animals

Male Wistar rats (8 weeks-old, body weight: 300-350 g) were obtained from Elevage Janvier (Saint Genest sur l'Isle). All experiments were carried out in compliance with the ethic committee in Bordeaux and accepted by The French Ministry under the number n° 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. Rats were housed 4 per cage (480 mm x 375 mm x 210 mm) for at least 7 days before the experiment in a controlled environment, at constant temperature (22 °C ± 1 °C) and humidity (60%) with free water and food access and a light/ dark cycle of 12 h/12 h.

Experimental design

Twenty-four hours before surgery, rats were fed a fat free diet (SAFE) with free access to water. Each rat was placed under anesthesia by an intra-peritoneal injection of a ketamine/xylazine mixture (100/10 mg/kg, respectively; Axience). A polyethylene catheter (0.95 mm x 15 cm; Biotrol) was inserted into the main mesenteric lymph duct as described by Bollman *et al.*⁽²⁶⁾ and Couëdelo *et al.*⁽¹²⁾. Immediately after surgery, rats were randomly assigned to one of the 3 experimental groups (6 rats/group), corresponding to one of the three n-3 LC-PUFA enriched formulations (TG_{n-3}, TG_{n-3}+PL_{veg}, and TG_{veg}+PL_{n-3}). A volume, equivalent to 1 g of formulation, was orally administrated by gavage, providing respectively 8.6 and 22.3 mg of EPA and DHA per rat. Each rat was then placed in an individual restraining cage (rat compartment 228 mm x 89 mm), in a warm environment with freely available water. After gavage, lymph was collected during 6 h in a collection tube stored in ice. To prevent pain, rats received an intra-peritoneal injection of buprenorphine (0.02 mg/kg; Axience) 1 h before and 2 h after surgery. At 6 h post-intubation, rats were euthanized by an intra-peritoneal injection of sodium pentobarbital (Axience) and lidocaine (Ceva).

Lipid formulations

The lipid formulations were prepared at room temperature under nitrogen in order to prevent PUFA oxidation. Three marine formulations were designed to provide a similar amount of FA, but differed by the chemical structure of lipids. More precisely, EPA and DHA were exclusively esterified either on TG or on PL molecules (Table 1).

Marine PL were extracted from Lecimarin F50 (Novastell) by solvent fractionation using cold acetone. Briefly, 1 mL of chloroform/methanol (2/1, v/v) was added to 1 g of marine lecithin and maintained at room temperature until complete solubilisation. After addition of 20 mL of cold acetone (-20 °C), the sample was homogenized and then centrifuged (1050 g, 5 min, 4 °C; Sorvall ST-40R, Thermo Fisher Scientific). The supernatant, containing the neutral lipids, was removed and the pellet, containing the polar lipids was extracted twice with cold acetone and stored at -20 °C.

The formulation providing EPA and DHA only esterified in PL (TG_{veg}+PL_{n-3}) was prepared by solubilizing marine PL (13 wt.%) to a mixture of vegetable oils (flaxseed/copra/grapeseed/palm/oleic sunflower oils; 1/6/6/30/57, w/w/w/w/w). The formulation including EPA and DHA only on TG (TG_{n-3}) was obtained by blending two fish oils

(Omegavie 1812 TG and Omegavie Tuna oil 25% DHA; 1/10, w/w; Polaris) to 11 wt.% of blended vegetable oils (flaxseed/copra/grapeseed/palm/oleic sunflower oils; 1/6/6/31/56, w/w/w/w/w). In order to distinguish the role of PL, acting either as emulsifier or as FA carrier, a third formulation (TG_{n-3}+PL_{veg}), was prepared including vegetable PL (without n-3 LC-PUFA contribution). More precisely, 11 wt.% of the marine oil and 10 wt.% of soya lecithin (Nat&Form) were added to a mixture of vegetable oils (copra, palm and oleic sunflower oils; 6/30/63, w/w/w).

Phospholipid classes of marine polar lipid extract and of soya lecithin were characterized by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) according to Cansell *et al.*⁽²⁴⁾ (Table 1). The glyceride structure of the marine oil mixture and of the marine PL was enzymatically determined according to methods described below. In the marine TG (oil mixture), EPA was mainly esterified in the *sn*-1/3 positions of marine TG (26% in the *sn*-2 position) whereas DHA was mainly located in the *sn*-2 position (50%). In marine PL, both EPA and DHA were essentially distributed in the *sn*-2 position (>74%) (see Supplementary data 1).

Lipid analysis

The total lipids were extracted from the lymph according to the procedure described by Folch *et al.*⁽²⁷⁾. PL and TG fractions from the lipid extract were separated by thin layer chromatography (TLC, glass plates 20x20 cm pre-coated with silica gel 60H) using a solvent mixture composed of hexane/diethyl ether/formic acid (75/35/1, v/v/v). After vaporization of 2,7-dichlorofluorescein (2,7-DCF; Sigma-Aldrich) and visualization under UV-light, the spots corresponding to PL and TG were extracted from the silica gel by the addition of 2.5 mL of chloroform/methanol (2/1, v/v). After homogenization and centrifugation of the scraped fractions (1050 g, 5 min, 20 °C), the organic phase containing lipids was collected. The extraction step was repeated by the addition of distilled water (100 µL) and chloroform/methanol (2/1, v/v, 2 mL) to the silica gel phase. Lipid extraction from the silica gel ended by the addition of 2 mL of methanol to the silica gel phase, homogenization and centrifugation. The overall organic phases were pooled and dried under nitrogen. Finally, 2,7-DCF was removed using 0.4 mL of a KCl solution (0.8% in distilled water w/v) and 2 mL of chloroform/methanol (2/1, v/v). The organic phase was washed twice by the addition of 0.8 mL of a mixture of chloroform/methanol/KCl 0.8% in distilled water (15/240/235, v/v/v). Samples were stored at -20 °C until analysis.

The FA composition of the lipid formulations, the samples from the *in vitro* lipolysis experiments and those collected from the lymph, i.e. total lipids, TG and PL fractions, were submitted to the (trans)methylation procedure adapted from Castro-Gomez^(28, 29). The resulting fatty acid methyl esters (FAME) were analyzed by gas chromatography (GC) analysis (TRACE GC, Thermo Fisher Scientific) equipped with a flame ionization detector (FID) and a split injector. A fused-silica capillary column (BPX 70, 60 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film; SGE) was used with hydrogen as a carrier gas (inlet pressure: 120 kPa). The split ratio was 1:33. The column temperature program was as follows: from 160 °C, the temperature increased to 180 °C at 1.3 °C/min, and was maintained for 65 minutes before increasing at 25 °C/min to 230 °C, temperature that was maintained for 15 minutes. The injector and detector were maintained at 250 °C and 280 °C, respectively. GC peaks were integrated using Chromquest software (ThermoFinnigan). FA were quantified using an internal standard (1 mg/mL in chloroform/methanol (2/1, v/v)) added at 10% of the lipid weight before the (trans)methylation procedure. FFA 17:0 (Nu-Chek Prep) was used as an internal standard for the *in vitro* lipolysis study. TG 17:0 (Nu-Chek Prep) and PC 17:0 (Avanti Polar Lipids) were used for TG and PL quantification of the lymph samples, respectively. The proportion of FA esterified in the *sn*-2 position of lymph TG was determined using the stereospecificity of lipase. Lymph TG (3 mg) were mixed with 1 mL of lipase B *Candida Antartica* (>2000 U/g; 1U = 1µEq FA/h; Sigma-Aldrich) in solution in ethanol (4 mg/mL, w/v) and placed under stirring, at 30 °C for 3 h. Lipids were extracted 6 times by 10 mL of diethyl ether. Hydrolysis products were separated by TLC using a solvent mixture composed of hexane/diethyl ether/acetic acid (70/30/1, v/v/v). After vaporization of 2,7-DCF and visualization under UV-light, the spots corresponding to the 2-monoglycerides (2-MG) were scraped off and transferred into a glass tube for their transmethylation. The proportion of FA esterified in the *sn*-2 position of TG was calculated by considering the proportions of each FA from 2-MG compared to those from the three positions of the TG, with the following equation:

$$\% \text{ FA in } sn\text{-2 TG} = (\% \text{ FA in 2-MG} \times 100) / (\% \text{ FA in TG} \times 3)$$

The glyceride structure of lymph PL was achieved by phospholipase A2 (PLA₂) hydrolysis according to the Wolff *et al*⁽³⁰⁾ method, using PLA₂ from bee venom (600 – 2400 U/g; 1U = 1 µEq FA/h; Sigma-Aldrich). Briefly, 150 µL of a PLA₂ solution (1 mg/mL; 3 mM CaCl₂) were added to 2 mg of extracted lymph PL and 1 mL of diethyl ether. Samples were incubated under stirring, at 30 °C for 1 h. The reaction was stopped by solvent evaporation under nitrogen. Hydrolysis products were separated by TLC using a solvent mixture of chloroform/methanol/distilled

water (65/25/4, v/v/v). FFA were scraped off and transferred into a glass tube for methylation. The proportion of FA esterified in the *sn*-2 position of PL was calculated by considering the proportions of each FA released as FFA compared to those from the two positions of the PL, with the following equation:

$$\% \text{ FA in } sn\text{-2 PL} = (\% \text{ FA in FFA} \times 100) / (\% \text{ FA in PL} \times 2)$$

***In vitro* intestinal lipolysis of lipid formulations**

The enzymatic lipolysis of the lipid formulations was assessed using an *in vitro* digestion model that mimics the physiological conditions of the intestinal lumen according to Carriere *et al.*⁽²⁵⁾ and Minekus *et al.*⁽³¹⁾ with slight modifications. The lipolysis was initiated by 5 mL of a 25% lipid emulsion stabilized by 1.4% (w/v) of methyl cellulose (Sigma-Aldrich) and dispersed in 15 mL of an assay solution containing 0.6% (w/v) of methyl cellulose, 150 mM NaCl (Thermo Fisher Scientific), 1.4 mM CaCl₂ (Sigma-Aldrich) and 20 mM sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich). This mixture was stirred in a temperature-controlled reaction vessel at 37 °C and the pH was adjusted to 7.5. The lipolysis was initiated by adding 1 mL of porcine pancreas extract solution (6.7 mg/mL in distilled water, pH 7.5; Sigma-Aldrich) to the reaction vessel. The pH was kept constant at 7.5 for 60 min with 0.1 M NaOH (Chem-Lab) automatically controlled by a pH-stat device (pHstat Titrand, Metler Toledo). Samples (0.5 mL) were collected at times ranging from 0 to 60 min for lipid extraction and analysis. Lipid extraction was immediately performed by mixing each sample vigorously (0.5 mL) with 200 µL HCl (0.1 N; Thermo Fisher Scientific) and 5 mL chloroform/methanol (2/1, v/v) in a glass tube. After phase separation, the upper aqueous phase was removed and the lower phase containing the total lipids was dried under nitrogen, dissolved in 3 mL chloroform/methanol (2/1, v/v), and stored at -20 °C until analysis. FFA, from TG and PL lipolysis, were isolated from other lipid fractions by TLC (glass plates 20x20 cm pre-coated with silica gel 60H (Merck KGaA)) using a solvent mixture composed of hexane/diethyl ether/acetic acid (80/20/1, v/v/v). Spots were visualized under UV-light after vaporization of 2,7-DCF in ethanol solution (0.2%, w/v). FFA were scraped off and transferred into a glass tube for methylation and GC analysis. At each time point of the kinetics (0, 5, 10, 15, 30 and 60 min), the hydrolysis level (% FFA/total FA) was calculated. A deprived n-3 LC-PUFA formulation composed of 10 wt.% of soya lecithin dissolved in a vegetable oil mixture (copra/palm/oleic sunflower oil; 6/30/63, w/w/w; TG_{veg}+PL_{veg}) was also assessed as a control (see Supplementary

data 2). Lipolysis experiments were performed in triplicate, for each formulation, *i.e.* TG_{n-3}, TG_{n-3}+PL_{veg}, and TG_{veg}+PL_{n-3}.

Characterization of lymph chylomicrons

The size of the lymph chylomicrons (CM) was measured for each rat group by dynamic light scattering using Vasco™ (Cordouan Technologies). Lymph samples were firstly diluted in a NaCl solution in water (0.9%, w/v). Experiments were performed considering a water refractive index of 1.331 and a viscosity of 0.888 cP. The real part and the imaginary part of particles were fixed at 1.47 and 0.01, respectively.

Statistical analysis

Data were expressed as mean values with standard deviation (mean ± SD). Intergroup comparisons were made on the basis of their respective mean. For the *in vitro* lipolysis experiment (n = 3), multiple comparisons were analyzed using a two-way ANOVA with two independent factors (lipid formulation and time of lipolysis) followed by a Bonferroni post-hoc test, using GraphPad Prism version 7. Data issued from the *in vivo* intestinal absorption experiment (n = 6) were compared by a one-way ANOVA test followed by a Tukey post-hoc test, using R version 3.5.1 (Rcommander package). P values lower than 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

In vitro digestion of n-3 LC-PUFA is modulated by their molecular lipid species of intake

Marine formulations (TG_{n-3}, TG_{n-3}+PL_{veg}, TG_{veg}+PL_{n-3}) were subjected to *in vitro* lipolysis in a one-step static digestion model, with a focus on the duodenal lipolysis (Figure 1). Results revealed that all lipid formulations were well hydrolyzed during the time course of the lipolysis but to a different extent according to the formulation used ($p_{\text{time}} < 0.001$; $p_{\text{lipids}} = 0.05$ and $p_{\text{interaction}} < 0.001$; two-way ANOVA test). At the end of the lipolysis kinetics (60 minutes), the presence of soya lecithin in the marine formulation (TG_{n-3}+PL_{veg}) tended to inhibit the total lipolysis compared with TG_{n-3} (lipolysis level of 21.3% ± 4.7 and 14.5 ± 1.5, for TG_{n-3} and TG_{n-3}+PL_{veg}, respectively). The lipolysis of TG_{n-3}+PL_{veg} formulation was decreased by 47% when compared with the formulation free of n-3 LC-PUFA (lipolysis level of 14.5% ± 1.5 and 27.3% ± 1.9 for TG_{n-3}+PL_{veg} and TG_{veg}+PL_{veg}, respectively; $p < 0.05$). When n-3 LC-PUFA were esterified in

marine PL (TG_{veg}+PL_{n-3}), the lipolysis seemed to be slower at the beginning of the kinetics compared with the control curve (TG_{veg}+PL_{veg}), however at 60 min, the lipolysis levels were not statistically different ($21.5\% \pm 4.3$ and $27.3\% \pm 1.9$ for TG_{veg}+PL_{n-3} and TG_{veg}+PL_{veg}, respectively).

Influence of the molecular lipid species of the dietary lipids on the intestinal absorption of n-3 LC-PUFA

Six hours after lipid ingestion, no adverse effect was observed consecutive to lipid formulation intubation. The total FA concentration in the rat lymph was similar for the three marine formulations (Table 2). The proportions of EPA and DHA in lymph total FA did not show statistical differences between all groups. Lymph TG and PL were separated and their FA compositions were analyzed separately (Table 3). The relative proportions of lymph TG and PL were similar regardless of the molecular n-3 LC-PUFA carrier ($p>0.05$). Thereby, TG was the major lipid fraction (71% of total FA) while PL only represented 7% of total FA. Lymph TG presented a similar FA profile between the 3 groups ($p>0.05$). Saturated FA (SFA) and monounsaturated FA (MUFA) were the two major FA classes and PUFA were mainly represented by n-6 PUFA. Considering n-3 PUFA, EPA and DHA levels in lymph TG were similar in the 3 groups. In lymph PL, the incorporation of n-3 LC-PUFA and specifically EPA was quite low. DHA levels tended to be higher in the TG_{veg}+PL_{n-3} than in TG_{n-3} and TG_{n-3}+PL_{veg} ($p=0.10$). The proportions of the main FA esterified in the *sn-2* position of lymph lipids were defined (Table 4). We noted that, SFA, MUFA and PUFA were equally distributed in the three positions of lymph TG for all groups. In lymph PL, SFA were mostly esterified in the *sn-1* position and PUFA in the *sn-2*, irrespective of the groups. Considering n-3 LC-PUFA, EPA and DHA were mainly located in the *sn-2* position of lymph PL regardless the molecular FA carrier (TG vs PL). DHA was equally esterified in the three positions of lymph TG when provided as marine TG (TG_{n-3} and TG_{n-3}+PL_{veg}) whereas it was mainly located in the *sn-1/3* positions when ingested as marine PL (TG_{veg}+PL_{n-3}; $p<0.001$). More precisely, the intake of marine PL decreased by 46% the proportion of DHA esterified in the *sn-2* position of lymph TG. However, EPA was mainly inserted in the *sn-1/3* positions of lymph TG in all groups.

Characterization of lymph chylomicrons

Lymph chylomicrons were analyzed in terms of particle size. Data revealed that the mean diameter of CM were comparable between the 3 groups (223 ± 28 , 248 ± 46 and 227 ± 47 nm for TG_{n-3}, TG_{n-3}+PL_{veg} and TG_{veg}+PL_{n-3}, respectively).

DISCUSSION

This study aims at evaluating the impact of the molecular lipid species of dietary n-3 LC-PUFA on (i) their *in vitro* digestibility and (ii) their intestinal bioavailability, in rats fed marine TG or PL. Only few studies tried to couple *in vitro* lipid hydrolysis with *in vivo* absorption and they dealt with plant lipids^(11, 12). A recent study used marine lipids⁽³²⁾. However, the formulations did not have a similar EPA/DHA ratio and did not allow comparison of PL as n-3 carrier or as emulsifier. In our work, lipid formulations were designed to provide a similar amount of EPA and DHA, esterified exclusively either in TG or in PL molecules. Because PL display surfactant properties that may influence lipid digestibility and absorption, a formulation containing soya lecithin instead of marine PL (TG_{n-3}+PL_{veg}) was also assessed. Results showed that even if the *in vitro* lipolysis level was dependent on the type of the formulation used, EPA and DHA were similarly absorbed, *in vivo*, regardless of the lipid carrier. However, they were differently distributed in lymph lipid fractions. Specifically, when provided as marine PL, n-3 LC-PUFA tended to be better incorporated in lymph PL and DHA was more externalized in the glycerol backbone of lymph TG. To our knowledge, this is the first study analyzing the molecular structure of lymph lipid fractions using marine TG and PL as dietary n-3 LC-PUFA carriers.

Gastro-intestinal digestion can be considered as a limiting step of bioavailability. This is because dietary lipids first have to be hydrolyzed in the gastro-intestinal tract, before being absorbed by the intestinal brush border. In our study, we did not perform a gastric phase before the duodenal phase, which could be a limitation. However, (1) duodenal lipolysis represents nearly 70% of total lipolysis⁽³³⁾ and (2) the efficiency of the intestinal lipolysis is not called into question by the gastric phase. Our data confirmed that lipolysis extent depended on the affinity of pancreatic lipase toward the lipid species. The presence of n-3 LC-PUFA esterified in marine TG (TG_{n-3}+PL_{veg} vs TG_{veg}+PL_{veg}) dramatically impaired the lipolysis rate, due to the molecular structure of EPA and DHA which led to a steric hindrance effect in *in vitro* studies^(34, 35). In agreement with other studies^(12, 36), we observed an inhibitory effect of soya PL (TG_{n-3} vs TG_{n-3}+PL_{veg}). This could be interpreted as an impediment of the binding of pancreatic lipase/colipase

at the oil-water interface, decreasing TG availability for hydrolysis^(37, 38). Moreover, the PL nature influenced the lipid hydrolysis level (TG_{veg}+PL_{veg} vs TG_{veg}+PL_{n-3}). In our experiment, the porcine pancreas extract contained PLA₂. It is well known that PLA₂ activity is modulated by the nature of the polar head group of PL and to a lesser extent by the FA nature, i.e. chain length or unsaturation degree^(39, 40). Several studies using liposomes^(41, 42) and emulsion droplets⁽⁴³⁾ showed that PLA₂ would preferentially bond to anionic PL rather than zwitterionic PL. Thus, in our study, a part of the decreased lipolysis observed with TG_{veg}+PL_{n-3} formulation could be attributed to the PL composition (5% of anionic PL in PL_{n-3} vs 39% in PL_{veg}).

The products generated by the lipid hydrolysis (FFA, 2-MG, and lysophospholipids (lysoPL)) are micellized by biliary salts before being absorbed through the intestinal brush border. In the enterocytes, the lipolysis products are re-synthesized in TG and PL, compacted into CM to be released into the lymph compartment before reaching the bloodstream. In our experiment, the CM diameter was similar, whatever the molecular carriers used, suggesting that the structural properties of CM were neither impacted by the presence of PL in the formulation, nor by the molecular n-3 LC-PUFA carrier used, nor by the variations of lipolysis rates observed *in vitro*. This finding is in accordance with a previous study demonstrating that the lipid composition of CM did not differ in rats fed fish oil or marine PL⁽²³⁾.

In all experimental groups, the FA quantification and FA profile of total lymph lipids were similar, suggesting that, under our test conditions, the digestion and the intestinal absorption of n-3 LC-PUFA were not modulated by the molecular n-3 LC-PUFA carrier (TG_{n-3} vs PL_{n-3}). Moreover, lymph lipids were mainly composed of PL and TG and the incorporation of EPA and DHA in lymph lipid fractions occurred independently of the molecular lipid species used (*i.e.* TG, PL, lysoPL, FFA)^(23, 42-44). Indeed, the FA profile of lymph TG revealed similar n-3 PUFA levels between the three groups, suggesting that EPA and DHA were incorporated in lymph TG regardless of the molecular FA carrier. However, in lymph PL, DHA levels tended to increase when provided as marine PL (TG_{veg}+PL_{n-3}) compared with the TG form of intake (TG_{n-3} and TG_{n-3}+PL_{veg}). This data agrees with a previous study where the proportions of n-3 LC-PUFA in CM-PL were increased with marine PL compared with fish oil^(23, 32). It has been suggested that FA absorption could be lower in anesthetized rats than in conscious animals. Nonetheless, the relative distribution of DHA in lymph lipid fractions is expected to be similar regardless of the consciousness state of the rats⁽⁴⁴⁾.

The analysis of the glyceride structure of TG clearly showed that the molecular n-3 LC-PUFA carrier influenced the mechanisms involved in the re-synthesis of lymph lipids. In the enterocyte, lymph TG are mainly synthesized by the 2-MG pathway. We found that marine TG intake (TG_{n-3} and TG_{n-3}+PL_{veg}) led to an equimolar distribution of DHA in the three positions (33% of each) of lymph TG whereas the DHA provided was 56% esterified in the *sn*-2 position in marine TG formulation. This showed that the *sn*-2 position of the dietary TG was not fully conserved in lymph TG. A similar conclusion was drawn when structured TG rich in alpha-linolenic acid (ALA; 18:3 n-3) were used, i.e. only 50% of ALA located in the *sn*-2 position of dietary TG were recovered at this position in rat lymph TG⁽⁴⁵⁾. This was interpreted as either (i) an isomerization of 2-MG into 1-MG prior to the lipolytic activity of pancreatic lipase⁽⁴⁶⁾ or (ii) a hydrolysis of the absorbed 2-MG by an intestinal lipase in the enterocyte⁽⁴⁷⁾. This suggested that new metabolic pathways could take place as soon as the concentration of a lipid species varied greatly, thus ensuring a “homeostatic” state. On the contrary, in marine PL, DHA was exclusively (>74%) esterified in the *sn*-2 position of the glycerol backbone. After PL digestion, DHA was mainly released as FFA, due to a predominant activity of PLA₂, specific of the *sn*-2 position of PL⁽⁴⁸⁾. Thus, the presence of DHA in the *sn*-2 position of lymph TG suggested that the glycerol-3-phosphate (G3P) pathway was involved for the *de novo* TG synthesis using un-esterified DHA. Indeed, the G3P pathway could account for at least 15% of lymph TG synthesis. Nevertheless, the major pathway for re-synthesis of lymph TG seemed to be the 2-MG pathway, leading to the incorporation of a large part of free DHA on the 2-MG backbone. In this way, TG_{veg}+PL_{n-3} ensured a DHA enrichment in the *sn*-1/3 positions of lymph TG compared with the marine TG groups (TG_{n-3} and TG_{n-3}+PL_{veg}). The analysis of the glyceride structure of PL showed the same n-3 LC-PUFA repartition in the three dietary groups. As lymph PL mainly originate from the re-acylation of 1-lysoPL, this suggested that, irrespective of the amount of free DHA in the enterocyte, the composition of lymph PL is highly regulated with an incorporation mainly in the *sn*-2 position.

These mechanisms are confirmed with the metabolic fate of EPA. Indeed, EPA was less esterified in the *sn*-2 position of lymph TG when provided as marine PL than as marine TG. Nevertheless, since EPA was mainly distributed in the *sn*-1/3 positions of marine TG and in *sn*-2 position of marine PL, it was essentially absorbed as FFA after gastro-intestinal hydrolysis. Free EPA was then incorporated either in the *sn*-1/3 positions of lymph TG or in the *sn*-2 position of lymph PL.

In conclusion, this study was undertaken to analyze the impact of different molecular carriers of n-3 LC-PUFA that could increase their bioavailability, based on *in vivo* data. Our results showed that dietary PL from vegetable or animal sources added to the oily formulations, at the ratio of 10%, did not increase lipid absorption. Although lipolysis differed according to the composition of the formulation, it seemed that the molecular carrier did not greatly modify the intestinal absorption of n-3 LC-PUFA. In contrast, the nature of the dietary lipids might modulate FA incorporation and distribution in lymph lipid fractions. However, it would be interesting to complete this study with the analysis of gene and protein expressions as well as with the activities of some enzymes implied in the intracellular lipid metabolism pathways to consolidate our data. The fact that, when provided as marine PL, DHA was better incorporated in lymph PL and was externalized in lymph TG, may further affect its metabolic fate and tissue accretion. Indeed, previous reports indicated that using PL as n-3 LC-PUFA carriers can be more efficient than TG regarding the metabolization and hypoadipogenic effect of EPA and DHA^(10, 15, 16, 49–51).

ACKNOWLEDGEMENTS

The study was partly financially supported by the French National Association for Research and Technology (ANRT, N° 2015/1182). Authors are grateful to Novastell and in particular Thierry Coste for providing Lecimarin F50, and also to Polaris for supplying fish oils. The authors also wish to thank Axelle Grélard from Bordeaux University, CNRS, CBMN-UMR 5248, for RMN analysis.

CONFLICT OF INTEREST

All authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Riediger ND, Othman RA, Suh M, Moghadasian MH (2009) A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc* 109:668–679
2. Dyall SC, Michael-Titus AT (2008) Neurological benefits of omega-3 fatty acids. *NeuroMolecular Med* 10:219–235
3. Calder PC (2017) Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans* 45:1105–1115
4. Saini RK, Keum Y-S (2018) Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sci* 203:255–267
5. Simopoulos AP (2016) An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients* 8:128–145
6. Zarate R, el Jaber-Vazdekis N, Tejera N, et al (2017) Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin Transl Med* 6:25–44
7. Dubuisson C, Carrillo S, Dufour A, et al (2017) The French dietary survey on the general population (INCA3) - French Agency on Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES). European Food Safety Authority
8. Astorg P-O, Bougnoux P, Calvarin J, et al (2011) Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras - Version intégrant les modifications apportés par l'erratum du 28 juillet 2011
9. (2017) Avis et rapport de l'Anses sur la troisième étude individuelle nationale des consommations alimentaires - INCA 3. ANSES, Paris
10. Cansell M (2010) Marine phospholipids as dietary carriers of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technol* 22:223–226
11. Couëdelo L, Amara S, Lecomte M, et al (2015) Impact of various emulsifiers on ALA bioavailability and chylomicron synthesis through changes in gastrointestinal lipolysis. *Food Funct* 6:1726–1735
12. Couëdelo L, Boué-Vaysse C, Fonseca L, et al (2011) Lymphatic absorption of α -linolenic acid in rats fed flaxseed oil-based emulsion. *Br J Nutr* 105:1026–1035
13. Garaiova I, Guschina IA, Plummer SF, et al (2007) A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification. *Nutr J* 6:4–13
14. Michalski MC, Genot C, Gayet C, et al (2013) Multiscale structures of lipids in foods as parameters affecting fatty acid bioavailability and lipid metabolism. *Prog Lipid Res* 52:354–373
15. Graf BA, Duchateau GSMJE, Patterson AB, et al (2010) Age dependent incorporation of 14C-DHA into rat brain and body tissues after dosing various 14C-DHA-esters. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 83:89–96
16. Rossmesl M, Jilkova ZM, Kuda O, et al (2012) Metabolic effects of n-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PLoS One* 7:e38834
17. Song JH, Fujimoto K, Miyazawa T (2000) Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *J Nutr* 130:3028–3033
18. Song JH, Miyazawa T (2001) Enhanced level of n-3 fatty acid in membrane phospholipids induces lipid peroxidation in rats fed dietary docosahexaenoic acid oil. *Atherosclerosis* 155:9–18
19. Ramprasath VR, Eyal I, Zchut S, Jones PJH (2013) Enhanced increase of omega-3 index in healthy individuals with response to 4-week n-3 fatty acid supplementation from krill oil versus fish oil. *Lipids Health Dis* 12:178–199
20. Yurko-Mauro K, Kralovec J, Bailey-Hall E, et al (2015) Similar eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid plasma levels achieved with fish oil or krill oil in a randomized double-blind four-week bioavailability study. *Lipids Health Dis* 14:99–108
21. Castro-Gómez MP, Holgado F, Rodríguez-Alcalá LM, et al (2015) Comprehensive study of the lipid classes of krill oil by fractionation and identification of triacylglycerols, diacylglycerols, and phospholipid molecular species by using UPLC/QToF-MS. *Food Anal Methods* 8:2568–2580

22. European Food Safety Authority (EFSA) (2009) Safety of 'lipid extract from *Euphausia superba*' as a novel food ingredient. *EFSA J* 7:938
23. Cansell M, Nacka F, Combe N (2003) Marine lipid-based liposomes increase in vivo FA bioavailability. *Lipids* 38:551–559
24. Bollman JL, Cain JC, Grindlay JH (1948) Techniques for the collection of lymph from the liver, small intestine, or thoracic duct of the rat. *J Lab Clin Med* 33:1349–1352
25. Cansell M, Bardeau T, Morvan E, et al (2017) Phospholipid profiles of oleaginous pressed cakes using NMR and gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc* 94:1219–1223
26. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
27. Castro-Gómez P, Fontecha J, Rodríguez-Alcalá LM (2014) A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta* 128:518–523
28. Sehl A, Couëdelo L, Fonseca L, et al (2018) A critical assessment of transmethylation procedures for n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid quantification of lipid classes. *Food Chem* 251:1–8
29. Wolff R, Combe N, Entressangles B (1985) Positional distribution of fatty acids in cardiolipin of mitochondria from 21-day-old rats. *Lipids* 20:908–914
30. Carrière F, Renou C, Lopez V, et al (2000) The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals. *Gastroenterology* 119:949–960
31. Minekus M, Alminger M, Alvito P, et al (2014) A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct* 5:1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
32. Murota K, Takagi M, Watanabe Y, et al (2018) Roe-derived phospholipid administration enhances lymphatic docosahexaenoic acid-containing phospholipid absorption in unanesthetized rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 139:40–48. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2017.06.011>
33. Carriere F, Barrowman JA, Verger R, Laugier R (1993) Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans. *Gastroenterology* 105:876–888
34. Akanbi TO, Sinclair AJ, Barrow CJ (2014) Pancreatic lipase selectively hydrolyses DPA over EPA and DHA due to location of double bonds in the fatty acid rather than regioselectivity. *Food Chem* 160:61–66
35. Bottino NR, Vandenburg GA, Reiser R (1967) Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. *Lipids* 2:489–493
36. Nishimukai M, Hara H, Aoyama Y (2003) Enteral administration of soyabean lecithin enhanced lymphatic absorption of triacylglycerol in rats. *Br J Nutr* 90:565–571
37. Borgström B (1980) Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A2, and fatty acid for the digestion of dietary fat: in vitro experiments with the porcine enzymes. *Gastroenterology* 78:954–962
38. Larsson A, Erlanson-Albertsson C (1986) Effect of phosphatidylcholine and free fatty acids on the activity of pancreatic lipase-colipase. *Biochim Biophys Acta* 876:543–550
39. de Haas GH, Postema MM, Nieuwenhuizen W, van Deenen LL (1968) Purification and properties of phospholipase A and its zymogen from porcine pancreas. *Bull Soc Chim Biol (Paris)* 159:118–129
40. Jain MK, Rogers J (1989) Substrate specificity for interfacial catalysis by phospholipase A2 in the scooting mode. *Biochim Biophys Acta* 1003:91–97
41. Ghomashchi F, Yu BZ, Berg O, et al (1991) Interfacial catalysis by phospholipase A2: substrate specificity in vesicles. *Biochemistry* 30:7318–7329
42. Singer AG, Ghomashchi F, Le Calvez C, et al (2002) Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. *J Biol Chem* 277:48535–48549
43. Bahnsen BJ (2005) Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A2: insight from the anion-assisted dimer. *Arch Biochem Biophys* 433:96–106
44. Subbaiah PV, Dammanahalli KJ, Yang P, et al (2016) Enhanced incorporation of dietary DHA into lymph phospholipids by altering its molecular carrier. *Biochim Biophys Acta* 1861:723–729

45. Couëdelo L, Vaysse C, Vaique E, et al (2012) The fraction of α -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
46. Mattson FH, Volpenhein RA (1964) The digestion and absorption of triglycerides. *J Biol Chem* 239:2772–2777
47. Chon S-H, Zhou YX, Dixon JL, Storch J (2007) Intestinal monoacylglycerol metabolism: developmental and nutritional regulation of monoacylglycerol lipase and monoacylglycerol acyltransferase. *J Biol Chem* 282:33346–33357
48. Cohn JS, Wat E, Kamili A, Tandy S (2008) Dietary phospholipids, hepatic lipid metabolism and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 19:257–262
49. Awada M, Meynier A, Soulage CO, et al (2013) n-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or triacylglycerols in mice. *Nutr Metab* 10:23
50. Valenzuela A, Valenzuela V, Sanhueza J, Nieto S (2005) Effect of supplementation with docosahexaenoic acid ethyl ester and sn-2 docosahexaenyl monoacylglyceride on plasma and erythrocyte fatty acids in rats. *Ann Nutr Metab* 49:49–53
51. Destailats F, Oliveira M, Bastic Schmid V, et al (2018) Comparison of the incorporation of DHA in circulatory and neural tissue when provided as triacylglycerol (TAG), monoacylglycerol (MAG) or phospholipids (PL) provides new insight into fatty acid bioavailability. *Nutrients* 10:

Legend captions

Figure 1: Effect of lipid formulation on lipolysis levels using an *in vitro* digestion model.

TG_{n-3} (●), TG_{n-3}+PL_{veg} (▲), TG_{veg}+PL_{n-3} (□) and TG_{veg}+PL_{veg} (◇). Lipolysis levels are expressed as % FFA versus total acyl chains in the residual triglycerides, diglycerides, monoglycerides and FFA. Values are means ± SD (n = 3).

Values with different superscript letters (a, b) for the same time are significantly different at $p < 0.05$, two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test.

Figure 1

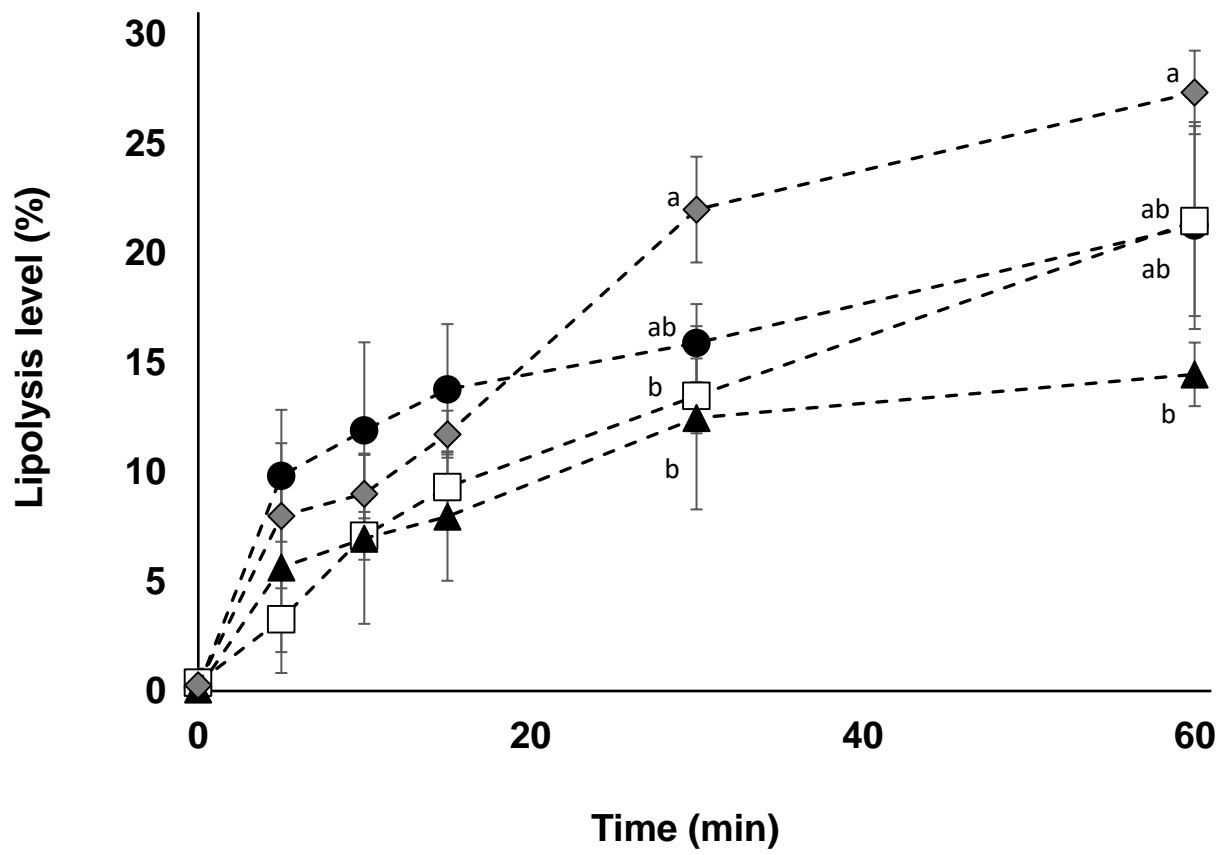


Table 41: Fatty acid and phospholipid compositions of the three experimental lipid formulations

	TG _{n-3} ¹	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
<i>g/100g of total fatty acids</i>			
Σ SFA	32.6	31.4	31.0
16:0	15.9	15.4	15.4
18:0	3.5	3.4	3.3
Σ MUFA	55.0	57.0	56.7
18:1 n-9	52.8	54.6	55.1
Σ PUFA	12.4	11.6	12.3
Σ n-6 PUFA	8.6	7.7	8.7
18:2 n-6	8.2	7.2	8.4
20:4 n-6	0.2	0.2	0.0
Σ n-3 PUFA	3.8	3.9	3.4
18:3 n-3	0.7	0.4	0.7
20:5 n-3	0.8	0.9	0.7
22:6 n-3	2.0	2.2	1.9
n-6/n-3	2.3	2.0	2.6
<i>g/100g of total phospholipids</i>			
Phosphatidylcholine		31.7	73.8
Phosphatidylinositol		29.3	3.5
Phosphatidylethanolamine		29.6	5.2
Phosphatidylserine		5.4	-
Phosphatidic acid		4.0	1.2
Sphingomyelin		-	2.9
Lysophosphatidylcholine		-	9.2

¹TG_{n-3}: oil phase with n-3 LC-PUFA esterified in triglycerides; TG_{n-3}+PL_{veg}: oil and soya lecithin mix with n-3 LC-PUFA esterified in triglycerides; TG_{veg}+PL_{n-3}: oil and marine PL mix with n-3 LC-PUFA esterified in phospholipids.

TG: triglycerides, PL: phospholipids, SFA: saturated fatty acids, MUFA: monounsaturated fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids.

Table 2: Effect of the molecular carrier form of n-3 LC-PUFA on fatty acid composition of total lipids of lymph rats, 6 h after intubation

	TG _{n-3} ¹	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
	<i>g/100g of total fatty acids</i>		
Σ SFA	27.4 ± 1.5 ^a	26.4 ± 1.0 ^a	26.3 ± 1.6 ^a
16:0	17.8 ± 1.0 ^a	18.5 ± 0.7 ^a	17.9 ± 1.0 ^a
18:0	4.8 ± 0.4 ^a	5.1 ± 0.8 ^a	5.0 ± 0.3 ^a
Σ MUFA	49.9 ± 3.5 ^a	52.4 ± 3.1 ^a	52.5 ± 3.8 ^a
18:1 n-9	45.5 ± 4.6 ^a	48.0 ± 3.5 ^a	48.8 ± 4.3 ^a
Σ PUFA	22.8 ± 2.8 ^a	21.2 ± 2.1 ^a	21.3 ± 3.0 ^a
Σ n-6 PUFA	18.8 ± 2.6 ^a	17.3 ± 2.0 ^a	17.5 ± 2.5 ^a
18:2 n-6	14.2 ± 2.0 ^a	12.7 ± 1.3 ^a	13.5 ± 2.0 ^a
20:4 n-6	3.8 ± 0.7 ^a	3.8 ± 0.9 ^a	3.5 ± 0.7 ^a
Σ n-3 PUFA	3.9 ± 0.2 ^a	3.8 ± 0.1 ^a	3.7 ± 0.9 ^a
18:3 n-3	1.1 ± 0.1 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	1.0 ± 0.2 ^a
20:5 n-3	0.5 ± 0.0 ^a	0.6 ± 0.0 ^a	0.5 ± 0.2 ^a
22:6 n-3	1.8 ± 0.1 ^a	2.0 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.7 ^a
n-6/n-3	4.8 ± 0.5 ^a	4.5 ± 0.5 ^a	5.0 ± 1.2 ^a
Total FA (mg/mL)	13.9 ± 4.0 ^a	15.5 ± 9.1 ^a	15.3 ± 5.6 ^a

¹TG_{n-3}: oil phase with n-3 LC-PUFA esterified in triglycerides; TG_{n-3}+PL_{veg}: oil and soya lecithin mix with n-3 LC-PUFA esterified in triglycerides; TG_{veg}+PL_{n-3}: oil and marine PL mix with n-3 LC-PUFA esterified in phospholipids.

²Values are expressed as mean ± SD, n=6.

Values with different superscript letters (a, b) in the same line are significantly different at p<0.05, ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

TG: triglycerides, PL: phospholipids, SFA: saturated fatty acids, MUFA: monounsaturated fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids.

Table 3: Effect of the molecular carrier form of n-3 LC-PUFA on fatty acid composition of triglycerides and phospholipids of lymph rats, 6 h after intubation

	Lymph triglycerides			Lymph phospholipids		
	TG _{n-3} ¹	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
	<i>g/100g of total fatty acids</i>					
Σ SFA	26.3 ± 2.1 ^{2a}	25.9 ± 1.9 ^a	25.7 ± 1.9 ^a	39.5 ± 1.1 ^a	38.4 ± 1.2 ^a	39.2 ± 1.3 ^a
16:0	17.8 ± 1.0 ^a	18.4 ± 0.9 ^a	17.7 ± 1.0 ^a	20.4 ± 1.2 ^a	18.8 ± 0.8 ^b	19.9 ± 1.2 ^{ab}
18:0	4.0 ± 0.4 ^a	4.1 ± 0.5 ^a	4.0 ± 0.3 ^a	17.6 ± 1.1 ^a	18.3 ± 1.3 ^a	17.8 ± 1.1 ^a
Σ MUFA	53.6 ± 2.9 ^a	55.7 ± 3.4 ^a	55.9 ± 3.8 ^a	13.7 ± 2.6 ^a	13.4 ± 1.9 ^a	14.5 ± 3.2 ^a
18:1 n-9	49.0 ± 4.1 ^a	51.3 ± 3.8 ^a	52.3 ± 4.0 ^a	9.1 ± 2.8 ^a	8.7 ± 2.0 ^a	8.7 ± 3.5 ^a
Σ PUFA	20.1 ± 2.8 ^a	18.4 ± 1.7 ^a	18.6 ± 2.1 ^a	46.9 ± 2.0 ^a	48.2 ± 2.5 ^a	46.3 ± 2.4 ^a
Σ n-6 PUFA	16.2 ± 2.4 ^a	14.6 ± 1.7 ^a	14.9 ± 1.6 ^a	43.7 ± 2.2 ^a	44.8 ± 2.4 ^a	42.3 ± 2.1 ^a
18:2 n-6	13.2 ± 2.1 ^a	11.7 ± 1.4 ^a	12.5 ± 1.5 ^a	23.9 ± 2.0 ^a	24.6 ± 1.7 ^a	24.2 ± 2.3 ^a
20:4 n-6	2.3 ± 0.4 ^a	2.3 ± 0.6 ^a	2.0 ± 0.4 ^a	18.2 ± 1.5 ^a	18.8 ± 2.3 ^a	16.9 ± 1.9 ^a
Σ n-3 PUFA	3.8 ± 0.4 ^a	3.7 ± 0.1 ^a	3.5 ± 0.9 ^a	3.1 ± 0.2 ^a	3.3 ± 0.2 ^a	3.9 ± 1.1 ^a
18:3 n-3	1.1 ± 0.2 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	1.0 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.0 ^a
20:5 n-3	0.5 ± 0.1 ^a	0.6 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.1 ^a	0.8 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.2 ^a	1.1 ± 0.4 ^a
22:6 n-3	1.7 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.2 ^a	1.8 ± 0.7 ^a	1.6 ± 0.2 ^a	1.7 ± 0.3 ^a	2.1 ± 0.6 ^a
n-6/n-3	4.2 ± 0.2 ^a	4.0 ± 0.5 ^a	4.5 ± 1.1 ^a	14.2 ± 1.7 ^a	13.5 ± 0.3 ^a	11.5 ± 3.4 ^a
Total FA (mg/mL)	9.1 ± 2.5 ^a	12.2 ± 7.7 ^a	10.4 ± 4.9 ^a	1.2 ± 0.4 ^a	1.1 ± 0.6 ^a	1.1 ± 0.5 ^a

¹TG_{n-3}: oil phase with n-3 LC-PUFA esterified in triglycerides; TG_{n-3}+PL_{veg}: oil and soya lecithin mix with n-3 LC-PUFA esterified in triglycerides; TG_{veg}+PL_{n-3}: oil and marine PL mix with n-3 LC-PUFA esterified in phospholipids.

²Values are expressed as mean ± SD, n=6.

Values with different superscript letters (a, b) in the same line are significantly different, p>0.05, ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

TG: triglycerides, PL: phospholipids, SFA: saturated fatty acids, MUFA: monounsaturated fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids.

Table 4: Effect of the molecular carrier form of n-3 LC-PUFA on fatty acid distribution in triglycerides and phospholipids of lymph rats, 6 h after intubation

	Lymph triglycerides			Lymph phospholipids		
	TG _{n-3} ¹	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}	TG _{n-3}	TG _{n-3} +PL _{veg}	TG _{veg} +PL _{n-3}
	<i>% esterified in the internal sn-2 position</i>					
Σ SFA	31.6 ± 9.6 ^{2a}	27.2 ± 1.4 ^a	28.8 ± 3.4 ^a	20.6 ± 8.3 ^a	17.6 ± 10.1 ^a	13.7 ± 3.6 ^a
16:0	29.2 ± 6.8 ^a	29.1 ± 1.0 ^a	29.5 ± 2.1 ^a	22.3 ± 8.6 ^a	20.0 ± 11.1 ^a	14.7 ± 3.8 ^a
18:0	28.6 ± 5.8 ^a	22.7 ± 1.3 ^a	23.2 ± 3.7 ^a	17.4 ± 8.4 ^a	14.7 ± 9.6 ^a	10.9 ± 3.4 ^a
Σ MUFA	32.2 ± 3.3 ^a	34.0 ± 0.9 ^a	33.5 ± 1.2 ^a	38.2 ± 9.7 ^a	39.0 ± 4.9 ^a	35.7 ± 8.3 ^a
18:1 n-9	33.2 ± 3.4 ^a	35.0 ± 0.6 ^a	34.1 ± 0.9 ^a	43.1 ± 7.6 ^a	46.4 ± 4.5 ^a	46.8 ± 8.4 ^a
Σ PUFA	39.0 ± 4.6 ^a	39.9 ± 1.6 ^a	39.2 ± 1.5 ^a	78.6 ± 8.5 ^a	79.1 ± 9.2 ^a	85.7 ± 5.7 ^a
Σ n-6 PUFA	41.0 ± 4.4 ^a	42.0 ± 1.7 ^a	43.1 ± 0.9 ^a	79.3 ± 9.3 ^a	79.6 ± 9.1 ^a	86.7 ± 6.4 ^a
18:2 n-6	44.3 ± 5.0 ^a	43.9 ± 2.0 ^a	44.9 ± 1.4 ^a	80.3 ± 5.5 ^a	79.3 ± 7.7 ^a	87.4 ± 7.4 ^a
20:4 n-6	28.6 ± 4.4 ^a	34.3 ± 2.3 ^b	32.1 ± 1.1 ^{ab}	79.8 ± 6.3 ^a	81.8 ± 11.6 ^a	87.6 ± 6.4 ^a
Σ n-3 PUFA	30.3 ± 6.0 ^a	32.3 ± 1.5 ^a	23.9 ± 2.4 ^b	73.1 ± 11.1 ^a	73.4 ± 12.0 ^a	77.0 ± 13.7 ^a
18:3 n-3	31.2 ± 4.0 ^a	27.9 ± 1.4 ^a	31.4 ± 1.1 ^a	59.9 ± 6.1 ^{ab}	53.1 ± 5.1 ^a	63.5 ± 7.2 ^b
20:5 n-3	18.2 ± 3.5 ^{ab}	19.4 ± 2.0 ^a	14.5 ± 3.6 ^b	75.1 ± 7.3 ^a	83.5 ± 19.1 ^a	85.6 ± 11.7 ^a
22:6 n-3	30.4 ± 8.5 ^a	33.7 ± 1.7 ^a	17.3 ± 1.5 ^b	72.1 ± 5.1 ^a	73.7 ± 10.6 ^a	78.4 ± 19.7 ^a

¹TG_{n-3}: oil phase with n-3 LC-PUFA esterified in triglycerides; TG_{n-3}+PL_{veg}: oil and soya lecithin mix with n-3 LC-PUFA esterified in triglycerides; TG_{veg}+PL_{n-3}: oil and marine PL mix with n-3 LC-PUFA esterified in phospholipids.

²Values are expressed as mean ± SD, n=6.

Values with different superscript letters (a, b,) in the same line are significantly different, p<0.05, ANOVA followed by Tukey post-hoc test.

TG: triglycerides, PL: phospholipids, SFA: saturated fatty acids, MUFA: monounsaturated fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids.

