



HAL
open science

Activité enzymatique sur lipides végétaux : couplage de mesures interfaciales à l'échelle moléculaire (nm) et de mesures cinétiques de dégradation à l'échelle de l'objet (μm)

Jeanne Kergomard

► To cite this version:

Jeanne Kergomard. Activité enzymatique sur lipides végétaux : couplage de mesures interfaciales à l'échelle moléculaire (nm) et de mesures cinétiques de dégradation à l'échelle de l'objet (μm). Alimentation et Nutrition. Université Rennes 1, 2022. Français. NNT : 2022REN1S075 . tel-04004119

HAL Id: tel-04004119

<https://theses.hal.science/tel-04004119>

Submitted on 24 Feb 2023

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.

Par

Jeanne KERGOMARD

Activité enzymatique sur lipides végétaux : couplage de mesures interfaciales à l'échelle moléculaire (nm) et de mesures cinétiques de dégradation à l'échelle de l'objet (μm).

Directrice de thèse : **Véronique VIÉ**¹

Co-directrice de thèse : **Claire BOURLIEU-LACANAL**²

¹Département Matière Molle – Institut de Physique de Rennes – UMR UR1 CNRS 5261

²INRAE/CIRAD/UM/Institut Agro Montpellier - UMR 1208 IATE

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 13/10/2022

Rapporteurs avant soutenance :

Marie-Caroline MICHALSKI	Directrice de Recherche, INRAE, laboratoire CarMeN, Lyon
Éric MARECHAL	Directeur de Recherche, CNRS, CEA Grenoble

Composition du Jury :

Isabelle CANTAT	Professeure de l'Université de Rennes 1	Examineur
Jacques FATTACCIOLI	Maître de conférences, Université Pierre et Marie Curie, Paris	Examineur
Véronique VIÉ	Maître de conférences, Université de Rennes 1	Dir. de thèse
Claire BOURLIEU	Chargée de recherche, INRAE Montpellier	Co-dir. de thèse

Invité(s)

Frédéric CARRIERE	Directeur de Recherche, CNRS, IMM Marseille	Membre invité
Tim WOOSTER	Group leader, Nestlé Research Center, Lausanne, Switzerland	Membre invité

À Catherine Kergomard, ma mère.

A Daddy, Mathieu et Louise.

« Personne n'est trop petit pour avoir un impact et changer le monde. »

Greta Thunberg

REMERCIEMENTS

*Pour commencer ces remerciements, je souhaiterais dédier ce travail à ma **Maman**, Catherine, sans qui je ne serais pas devenue celle que je suis aujourd'hui. Merci Maman de m'avoir permis de prendre confiance en moi. Merci de m'avoir transmis ta passion pour la lecture et l'écriture.*

Merci pour cette ouverture sur le monde. Je te dois ma ténacité, mon courage, et mon envie d'avancer. Et je sais que tu aurais été très fière de moi.

Je souhaiterais également remercier mon **Daddy** pour son soutien et sa fierté, pour avoir été là dans les moments de doute et de stress, et pour m'avoir laissé m'épanouir dans ma vie personnelle comme dans mon travail pendant ces 3 années. Merci également à mon frère **Mathieu**, et ma sœur **Louise**, pour avoir été là dans les moments compliqués, malgré le fait que mon travail soit resté assez flou pour vous jusqu'à ma soutenance (et même sans doute encore aujourd'hui).

*(Merci aussi à **Moutmoute** pour le réconfort)*

-

Je souhaite également profiter de ces quelques pages pour remercier toutes les personnes ayant contribué à la réussite de cette thèse, mais également à mon épanouissement personnel pendant ces trois dernières années.

-

Je remercie tout d'abord mes deux directrices de thèse, **Claire** et **Véronique**, pour m'avoir fait confiance du début à la fin sur ce projet, et pour m'avoir laissé l'espace et le temps nécessaire pour avancer sur le plan professionnel, mais également personnel. Ce projet de thèse a été particulièrement salvateur, et m'aura permis d'y voir plus clair sur ma volonté de poursuivre en Recherche. Merci infiniment pour votre présence, vos précieux conseils, nos discussions

scientifiques (parfois un peu moins), mais surtout pour votre patience et votre bienveillance à mon égard. Je vous suis particulièrement reconnaissante de m'avoir poussé à voir toujours plus loin et de m'avoir fait aimer mon sujet dans tous ses aspects. J'ai vécu des expériences formidables pendant ces 3 années, et je vous remercie pour ça.

Merci également à mon jury de thèse, **Marie-Caroline Michalski**, **Éric Maréchal**, **Isabelle Cantat**, **Jacques Fattaccioli**, **Frédéric Carrière**, et **Tim Wooster**, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux, ainsi que pour la discussion et les remarques constructives qui ont suivi ma soutenance de thèse. Merci également à **Didier Dupont** et **Caroline Nugier** pour avoir suivi mon évolution au cours de ces trois années, et pour leurs précieux conseils.

Merci à **Nathalie** pour toutes les heures passées sur mon projet malgré ton emploi du temps bien rempli. Merci d'avoir été d'un soutien sans failles du début à la fin de ma thèse, et d'avoir pris le temps de me rassurer pendant les périodes de stress intense... Merci aussi pour les occasions moins professionnelles, en particulier à Atlanta (et bientôt à Montpellier) !

Merci à **Gilles**, mon collègue de bureau, à qui je dois bien un paragraphe entier pour avoir réussi à me supporter pendant un peu plus de 3 ans. Merci pour avoir supporté mes « j'en ai marre », mes doutes, mes questions parfois (souvent) non-scientifiques, mes pauses clopes à heure fixe, et surtout, ma modestie. Pardon pour mes bêtises en manips, le temps perdu sur les réglages de l'ellipsomètre (merci aussi à **Éric**), mes clics trop rapides, et mes quelques crises de nerfs (qui, j'en suis certaine, vont beaucoup te manquer). Bref, merci pour ta patience avec moi, pour tes sauvetages d'expériences, pour ton partage de connaissances, et pour tes odeurs de repas le midi (au choix légumes farcis, chili, ou poisson).

REMERCIEMENTS

Merci à **Frédéric** pour ces passionnantes discussions, pour tes précieux conseils, et pour ton accompagnement au cours de ce projet. J'ai été ravie de travailler avec toi sur ce passionnant sujet qu'est la digestion des lipides végétaux, et en particulier d'avoir pu élargir mon spectre de compétences en enzymologie.

Merci à **Béné** pour avoir tenu à merveille ce rôle de « Maman » dans les moments où j'en ai eu le plus besoin. Merci pour ton écoute, ton réconfort, la justesse de tes propos dans les périodes difficiles. Merci aussi pour les moments beaucoup plus joyeux, pour ton incapacité à ouvrir une porte du premier coup ou encore à éteindre des interrupteurs, pour toutes les pauses-clopes, mais surtout pour m'avoir écouté raconter un grand nombre de bêtises en toute modestie (Docteur Melon). Une pensée particulière pour ce week-end à Lyon, ton cadeau au Balthazar, mais surtout pour cette fête chez toi cet été, qui m'aura fait me sentir un peu chez moi parmi ta famille. (J'espère que tu trouveras de nouvelles amies).

Merci à **Louis**, je ne pouvais pas écrire ces remerciements sans parler de toi. Merci de nous avoir supporté, moi et mes plantes, pendant ces presque trois années, d'avoir été présent sur tellement de plans, d'avoir encaissé sans broncher mes sautes d'humeur et mes angoisses. Merci d'avoir fait de moi une meilleure personne et d'avoir été là pour moi, tout simplement.

Merci également à **Mathilde**, alias Mathildi, le binôme de Janey (à prononcer JANEEYYY au Starbucks de l'autre côté de l'Atlantique), pour tes merveilleuses gaffes et ta maladresse. Merci pour ce super congrès (/vacances) aux US, pour ces moments inoubliables en Floride (arrestation par le shérif, alligators vivants et frits, requins, paysages incroyables, mauvais avion, mauvaise réservation, snorkeling en haute-mer, co-pilote de qualité, et j'en passe). Mais surtout merci pour ton aide dans la préparation de ma soutenance et pour ta casquette de cheffe-cuistot/pizzaïolo, ce jour n'aurait pas été le même sans toi !

Merci à **Marion** pour avoir été ma complice dans la végétalisation de l'IPR, mais également ma colocataire de chambre dans un Airbnb infesté de rats à Montpellier (big up pour les boules Quies).
Merci pour ton incroyable qualité d'écoute à toutes mes histoires aux pauses-café et au bar (coucou **Maxime** et **Julien**), j'ai été ravie de partager cette dernière année de thèse avec toi.

Merci à mes stagiaires **Lauriane**, **Clémentine**, **Jérémy**, et **Ami-Joy** pour votre aide, qui m'aura permis de gagner un temps précieux, et de faire avancer mon sujet au-delà de mes attentes.

Merci à toute l'équipe (passée ou présente) du CIRAD et de l'INRAE de Montpellier : **Pierre**, **Bruno**, **Jérôme**, **Erwann**, **Juliette**, **Maëva**, **Mélina**, **Milena**, **Thaïs**, **Jidapa**, **Ninon**

Merci aux non-permanents de l'IPR et de l'ISCR : **Marion**, **Julien**, **Théo**, **Maxime**, **Teïva**, **Ambroise**, **Corentin**, **Lauriane**, **Hyazann**, **Myriam**, **Romain**, **Solène**, **Amélie**, **Gaël**, **Guénoël**, **Adrien**, **Noémie**, **Yoann**, **Maryam**, **Donatien**, **Lucas**, **Alberto**, **Alexis**, **Alexis**, **JB**, **Charlène**, **William**, **Quentin**, **Marie**, **Louis**, **Claire**, **Déborah**, **Guillaume**, **Alex**, **Cécile** ... (pour les Afterworks, La Place, les brunchs, les pauses cafés, les chasses aux champignons, les sorties à la mer et le reste).

Une pensée également pour l'ensemble du personnel de l'IPR avec qui j'ai pu interagir : **Jean-Christophe**, **Valérie**, **Dominique**, **Nathalie M**, **Nathalie G**, **Amandine**, **Céline**, **Danièle**, **Odile**, **Jean-Charles**, **Éric**, **Arnaud**, **Laurent**, **Sophie**, **Thomas**, **Soraya**, **Anaïs**, **Isabelle**, **Olena**, **Lucile**, **Franck**, **Jeremy**, **Marie-Caroline**, **Axelle**, **Nicolas**, **Jeremy**, et bien d'autres... Merci à tous de m'avoir aussi bien accueillie, de m'avoir aidé sur les démarches administratives, de m'avoir formé sur autant de thématiques différentes, et d'avoir contribué au bon déroulement de mon projet de thèse. J'ai également été ravie de pouvoir contribuer à mon échelle à la vie du laboratoire et au bon déroulement des échanges à travers le conseil d'Unité.

REMERCIEMENTS

Je suis infiniment reconnaissante pour ces trois années passées avec vous tous.

Jeanne

DIFFUSION SCIENTIFIQUE

Articles de recherche (4)

2022 - J. Kergomard, F. Carrière, G. Paboeuf, N. Barouh, C. Bourlieu & V. Vié (2022), Interfacial adsorption and lipolysis behavior of gPLRP2 onto heterogenous vegetal lipid membrane. Biochimie – en préparation

2022 - J. Kergomard, F. Carrière, G. Paboeuf, N. Barouh, C. Bourlieu & V. Vié (2022), Modulation of gastric lipase adsorption onto mixed galactolipid-phospholipid films by addition of phytosterols. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112933
(<https://www.sciencedirect-com.passerelle.univ-rennes1.fr/science/article/pii/S0927776522006178>)

2022 - J. Kergomard, F. Carrière, G. Paboeuf, F. Artzner, N. Barouh, C. Bourlieu & V. Vié (2022), Interfacial organization and phase behavior of mixed galactolipid-DPPC-phytosterol assemblies at the air-water interface and in hydrated mesophases. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112646
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776522003290>)

2021 - J. Kergomard, G. Paboeuf, N. Barouh, P. Villeneuve, O. Schafer, T. J. Wooster, C. Bourlieu, V. Vié (2021), Stability to oxidation and interfacial behavior at the air/water interface of minimally-processed versus processed walnut oil-bodies, Food Chemistry, DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129880.
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621008864>)

Article de revue (1)

2021 - J. Kergomard, F. Carrière, N. Barouh, P. Villeneuve, V. Vié & C. Bourlieu (2021), Digestibility and oxidative stability of plant lipid assemblies: An underexplored source of potentially bioactive surfactants?, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, DOI: 10.1080/10408398.2021.2005532
(<https://www.tandfonline.com/doi/citedby/10.1080/10408398.2021.2005532?scroll=top&needAccess=true>)

Chapitre d'ouvrage (1)

2020 - Claire Bourlieu, Nathalie Barouh, **Jeanne Kergomard**, Olivia Ménard, Didier Dupont, et al., Polar Lipids. Handbook of Dairy Foods Analysis, CRC Press, 2020, 978-0367343132. DOI: 10.1201/9780429342967

(<https://www.taylorfrancis.com/books/edit/10.1201/9780429342967/handbook-dairy-foods-analysis-fidel-toldr%C3%A1-leo-nollet>)

Communications orales dans des congrès (4)

2022 – **J. Kergomard**, F. Carrière, G. Lambeau, G. Paboeuf, N. Barouh, P. Villeneuve, C. Bourlieu and V. Vié, Interfacial adsorption of gastrointestinal lipases onto heterogenous biomimetic vegetal membranes. AOCS Annual Meeting & Expo, Mai 2022, Atlanta, USA

2021 – **J. Kergomard**, F. Carrière, G. Paboeuf, Franck Artzner, N. Barouh, P. Villeneuve, V. Vié & C. Bourlieu, Modulation of gastric lipase adsorption onto mixed galactolipid-DPPC films by the addition of phytosterols. Euro Fed Lipid, Octobre 2021, Leipzig – Online. (hal-03384990)

2021 – **J. Kergomard**, F. Carrière, G. Paboeuf, Franck Artzner, N. Barouh, P. Villeneuve, V. Vié & C. Bourlieu, Modulation of gastric lipase adsorption onto mixed galactolipid-DPPC films by the addition of phytosterols. Gerli, Septembre 2021, Bordeaux, France. (hal-03359744)

2020 - **J. Kergomard**, V. Vié, G. Paboeuf, Nathalie Barouh, Bruno Barea, et al., Oxidative and interfacial behavior of oil bodies from walnut. Journées CHEVREUL 2020, Société Française pour l'étude des Lipides (SFEL), Dec 2020, Paris, France. (hal-03146890)

Posters dans des congrès (4)

2022 – **J. Kergomard**, F. Carrière, G. Lambeau, G. Paboeuf, N. Barouh, P. Villeneuve, C. Bourlieu and V. Vié, What are the mechanisms of gastrointestinal lipases adsorption onto heterogenous biomimetic vegetal membranes? 7th International Conference on Food Digestion ICFD 2022, May 2022, Cork, Ireland. pp.95 – **Annexe XI**

2021 – J. Kergomard, M. Robert, N. Barouh, G. Paboeuf, B. Barea, P. Villeneuve, O. Schafer, T. Wooster, V. Vié & C. Bourlieu-Lacanal, Effects of processing and concentration on the oxidative stability and interfacial behavior of tree nuts oil bodies (OB). Euro Fed Lipid 2021, Oct 2021, Leipzig - Online, Germany. ⟨hal-03384882⟩ - **Annexe XII**

2021 – J. Kergomard, N. Barouh, G. Paboeuf, P. Villeneuve, O. Schafer, T. Wooster, V. Vié & C. Bourlieu-Lacanal, Stability to oxidation and interfacial behavior at the air-water interface of minimally-processed versus processed walnut oil-bodies. Lipid droplets & Oleosomes - 2nd International Conference, Dec 2021, Strasbourg, France. ⟨hal-03384882⟩ - **Annexe XIII**

2019 - J. Kergomard, V. Vié, G. Paboeuf, N. Barouh, B. Barea, et al., Oxidative and interfacial behavior of native oil bodies from walnut. Euro Fed Lipid Seville 2019, Oct 2019, Séville, Spain. ⟨hal-02315046v2⟩ - **Annexe XIV**

Prix (1)

2022 – European Travel grant winner – AOCS Annual meeting and expo – 750€

FIGURES

La plupart des figures ont été créées ou adaptées à partir des logiciels BioRender et ChemDraw.

Introduction générale

Figure 1 - Structures et rôles biologiques des principaux lipides alimentaires.

Figure 2 - Voies de biosynthèse des principaux acides gras oméga-3 (ω 3) et oméga-6 (ω 6) chez l'Homme.

Figure 3 - Stratégie globale.

Chapitre 1

Figure 4 – Structure simplifiée de la membrane plasmique des cellules végétales. La membrane plasmique végétale est composée d'un assemblage de protéines et de lipides spécifiques et définit l'interface entre les cellules et leur environnement. Trois principales classes de lipides sont retrouvées dans cet assemblage : les phospholipides (28-50% wt.), les sphingolipides (23-52% wt.) et les stérols (23-62% wt.), responsables de la structuration de la membrane.

Figure 5 – Structure moléculaire des principaux phospholipides composant la membrane plasmique des cellules végétales. Les phospholipides principaux de la membrane plasmique sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG), le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (PS). Ces phospholipides sont composés d'un même squelette glycérol relié à deux chaînes d'acide gras et diffèrent par leur tête polaire, identifiée en jaune sur le schéma.

Figure 6 – Sources et structures moléculaires des principaux stérols végétaux. Le campestérol le plus représentatif dans l'amande, la noix, l'avocat, la pistache ou encore le colza. Le β -sitostérol est présent en quantité importante dans l'amande, la noix, le maïs, le blé, et le soja. Le stigmastérol est quant à lui particulièrement présent dans le chocolat noir, la mayonnaise, les frites, la pistache, l'amande et le soja.

Figure 7 – Structures simplifiées des chloroplastes et de la membrane de thylakoïde. Le chloroplaste possède trois systèmes membranaires : la membrane externe, la membrane interne, et les thylakoïdes (membrane photosynthétique). Les principaux lipides composant la membrane interne et les thylakoïdes sont le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG, 52% wt.), le digalactosyldiacylglycérol (DGDG, 27% wt.), le sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG, 15% wt.) et le phosphatidylglycérol (PG, 6% wt.). Ce quartet de lipides joue un rôle essentiel dans la photosynthèse et les mécanismes de signalisation et de régulation des chloroplastes. Pour des raisons de simplification, les composés phénoliques ne sont pas représentés.

Figure 8 – Formules moléculaires du monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et du digalactosyldiacylglycérol (DGDG), principaux galactolipides des membranes végétales photosynthétiques.

Figure 9 - Description schématique des oléosomes.

Figure 10 - Schéma simplifié de la structure des oléosines, adapté du modèle proposé par Huang et Huang (2015).

Figure 11 - Principaux facteurs impactant la stabilité oxydative des émulsions alimentaires.

Figure 12 - Peroxydation des lipides par les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Figure 13 – Schéma simplifié du tractus digestif humain et des processus d'absorption et de réestérification des acides gras dans les chylomicrons avant transport vers les tissus adipeux *via* la circulation sanguine.

Figure 14 - Principales enzymes impliquées dans la digestion des lipides chez l'Homme.

Figure 15- Représentation de la spécificité d'action des principales enzymes digestives humaines en fonction des données et hypothèses référencées dans la littérature.

Figure 16 – Schéma récapitulatif de la dégradation enzymatique des oléosomes et des fragments de thylakoïdes dans le compartiment gastrique et intestinal et de leurs effets biologiques subséquents.

Chapitre 2

Figure 17 - Principe de la cuve de Langmuir et organisation d'une monocouche de lipides à l'interface air/eau.

Figure 18 - Principe de mesure de la pression de surface par la lame de Wilhelmy.

Figure 19 - Isotherme de compression des monocouches de lipides - Adapté de Bottier (2006).

Figure 20 - Méthode de prélèvement de Langmuir-Blodgett sur plaque de mica.

Figure 21 - Montage expérimental de l'ellipsomètre à annulation couplé à la mesure de pression de surface.

Figure 22 - Principe de fonctionnement et éléments composant un microscope à force atomique. Adapté de CC BY-NC 2.0 FR.

Figure 23 - Traitement des hauteurs d'une image AFM.

Figure 24 - Structure d'un liposome.

Chapitre 3

Figure 25 - Stratégie du chapitre 3.

Figure 26 - Répartition des classes de lipides chez *Ch. sorokiniana reyto* (en g/100 g de biomasse sur milieu Bold's Basal Medium) à différentes concentrations de glucose.

FIGURES ET TABLES

Figure 27 - Caractérisation chimique des classes de lipides et de la composition en acides gras des lipides totaux extraits des *Ch.* A) *vulgaris* Purasana et, B) *sorokiniana* reyto.

Figure 28 - Evolution de la pression de surface du film de lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana i) formé sous atmosphère inerte (N_2 , trait noir continu) et ii) contrôle (trait gris pointillé) à une pression de surface initiale d'environ 20 mN/m.

Figure 29 – Images AFM (5×5 et $2,5 \times 2,5 \mu m^2$) de la monocouche interfaciale de lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana obtenue à pH 7 après prélèvement de Langmuir-Blodgett effectué à $\pi=19,7$ mN/m et $\Delta=8,1^\circ$. Le profil de 3 sections et le tableau relatif aux hauteurs des domaines ont été obtenus par analyse de l'image via le logiciel Gwyddion.

Figure 30 - Images AFM (5×5 et $2,5 \times 2,5 \mu m^2$) de la monocouche interfaciale de lipides totaux de chlorelle *sorokiniana* obtenue à pH 7 par prélèvement de Langmuir-Blodgett effectué à $\pi=21,0$ mN/m et $\Delta=8,4^\circ$. Le profil et le tableau relatif aux hauteurs des domaines ont été obtenus par analyse de 3 sections de l'image via le logiciel Gwyddion.

Figure 31 - Isothermes de compression des lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana (trait noir continu) et *sorokiniana* (trait gris foncé pointillé). Images AFM ($5 \times 5 \mu m^2$) obtenues à une pression d'environ 20 mN/m des lipides totaux de chlorelles A) *vulgaris* Purasana et B) *sorokiniana*.

Figure 32 - Composition en AG des lipides totaux extraits des oléosomes isolés de noix et d'amandes. La composition est donnée en % relatif des AG totaux.

Figure 33 - Images AFM (5×5 et $2,5 \times 2,5 \mu m^2$) des films interfaciaux de lipides membranaires d'oléosomes de A) Noix et, B) Amande, obtenues à une pression de surface $p=19,9 \pm 0,1$ mN/m. Les profils de hauteur ont été obtenues à partir des images à $2,5 \times 2,5 \mu m^2$ et sont les résultats de l'analyse de trois sections de l'image.

Figure 34 - Isothermes de compression des monocouches de lipides membranaires d'OB de noix (noir continu) et d'amandes (gris pointillé) et images AFM ($10 \times 10 \mu m^2$) des zones 1 et 2 correspondantes, des monocouches interfaciales des lipides membranaires d'OB de A) noix et B) d'amandes.

Figure 35 – Evolution des produits secondaires d'oxydation (mmol MDA/kg d'huile) dans les dispersions de liposomes de lipides totaux de *Chlorella vulgaris* Purasana sur une période de 19 jours ($1 \mu m$, 0,2% massique, $40^\circ C$, 110 rpm).

Figure 36 - Cinétique d'adsorption de la poudre de chlorelles diluée ($C=22,5$ mg/L) à l'interface air/solution tampon (Tris, pH 7). La courbe rouge correspond à la pression de surface et la courbe bleue à l'angle ellipsométrique. La pression superficielle et l'angle ellipsométrique obtenus après 5h de cinétique sont de 17,2 mN/m et $8,7^\circ$, respectivement.

Figure 37 - Images AFM (5×5 et $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$) du film interfacial obtenu après 5h de cinétique d'adsorption des d'une solution de poudre de chlorelles à 22,5 mg/L à l'interface air/tampon (Tris, pH 7). Sur l'image de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, les hauteurs sont obtenues à partir de 3 sections (rouge, bleu, vert).

Figure 38 – Mécanisme d'organisation proposé à l'interface air/eau des constituants de la poudre de chlorelles Purasana diluée.

Articles de recherche

Kergomard et al., 2022, Colloids and surface B: biointerfaces

Figure 1 - Molecular structure and phase behavior of A) monogalactodiacylglycerol (MGDG) and B) digalactosyldiacylglycerol (DGDG). $L\alpha$ standing for lamellar phase and HII standing for hexagonal inverted phase.

Figure 2 - Compression isotherms of 1) GL (red), 2) GL_{95}/pS_5 (deep blue), 3) GL_{90}/pS_{10} (green), 4) GL_{70}/pS_{30} (black) monolayers at the air/water interface. A) The graph corresponds to the evolution of π (mN/m) as a function of the mean molecular area ($\text{\AA}^2/\text{molecules}$). B) The graph corresponds to the evolution of the surface compressibility moduli (C_s^{-1} , calculated following the equation (1)), as a function of π (mN/m) of 1), 2), 3) and 4). C) The graph corresponds to the evolution of π (mN/m) as a function of the mean molecular area ($\text{\AA}^2/\text{molecules}$) of the pure pS system. D) The graph corresponds to the mean molecular area ($\text{\AA}^2/\text{molecules}$) at 20 mN/m of each monolayer as a function of the percentage of pS in the systems (pure pS monolayer in light blue). The experiments were performed using Tris HCl buffer at pH 7 and were done in duplicate. Values of π were given with a standard deviation on duplicate measurements of ± 0.2 mN/m.

Figure 3 - $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ and $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ AFM topographic images of A) GL, B) $GL_{50}/DPPC_{50}$, and C) $GL_{45}/DPPC_{45}/pS_{10}$ model monolayers. The height profiles were performed on a cross-section of the $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ image. The Langmuir films were transfer at a surface pressure of 20 ± 0.5 mN/m on a mica plate using the Langmuir Blodgett method. Experiments were performed in a Tris HCl buffer at pH 7 and done in duplicate.

Figure 4 - $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ AFM topographic images of A) $MGDG_{50}/DPPC_{50}$, B) $DGDG_{50}/DPPC_{50}$, C) $MGDG_{30}/DPPC_{60}/pS_{10}$, and D) $DGDG_{30}/DPPC_{60}/pS_{10}$ monolayers. Zooms to $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ were performed on samples C) and D) to allow visualization of defects in condensed areas. The height profiles were performed on three different cross-sections of the $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ image. The Langmuir films were transfer at a surface pressure of 20 ± 0.5 mN/m on a mica plate using the Langmuir Blodgett method. The ellipsometric angle value at 20 mN/m was reported to compare the thickness between the four monolayers. Experiments were performed in a Tris HCl buffer at pH 7 and done in duplicate.

Figure 5 - SAXS patterns of the model systems recorded at $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$. A) GL/DPPC systems at different ratios: 33:67 mol/mol (black curve), 50:50 mol/mol (blue curve) and 67:33 mol/mol

FIGURES ET TABLES

(green curve). B) DGDG/DPPC/pS (45:45:10 mol/mol/mol, green curve), GL/DPPC/pS (45:45:10 mol/mol/mol, black curve), MGDG/DPPC/pS (45:45:10 mol/mol/mol, blue curve).

Kergomard et al., 2021, Food chemistry

Figure 1 - a) Optical microscopy, b) particle size distribution and c) confocal laser scanning microscopy (red dye: PL, blue dye: proteins, green dye: TAG) of isolated OB emulsions having undergone different treatment(s). (A) MP OB b) trimodal, modes: 7.64 μm , 0.675 μm , 2.13 μm ; (B) HHP OB b) bimodal, modes: 16.4 μm , 0.523 μm ; and (C) HHPT OB b) bimodal, modes: 31.1 μm , 0.523 μm .

Figure 2 - a) PV and b) TBARS values during 20 days at 40°C and 110 rpm of (A) processed isolated walnut OB (MP, HHP, HHPT); and (B) walnut complex matrixes with and without 3% wt. of sodium caseinates. Data shown are average of three replicates.

Figure 3 - a) Evolution of surface pressure (red circles; PI, mN/m) and ellipsometric angle (blue triangle; DELTA, °) during the 4.5 hours experiments of adsorption on air-water interface and b) monolayer AFM images (10×10 μm^2) and size profiles after 4.5 hours experiments of isolated solution of (A) Fresh MP OB (PI_f=20.3 mN/m; DELTA_f=9.2°) and (B) Oxidized MP OB (PI_f=14.7 mN/m; DELTA_f=5.1°) diluted in UP water at 22.5 mg/L.

Figure 4 - a) Confocal Laser Scanning Microscopy (448×448 μm^2 and 184×184 μm^2) and b) Atomic force microscopy images (25×25 μm^2 and 5×5 μm^2) of monolayer of MP OB isolated solution diluted at 22.5 mg/L in UP water dyed with Rhodamine PE.

Figure 5 - AFM images (5×5 μm^2 and 1×1 μm^2) of Langmuir-Blodgett films of 22.5 mg/L of a) oleo-TAG; b) Oleo-WOIL; c) WOIL; and d) EggPC-WOIL after 4.5 hours of acquisition. Final values of surface pressure (PI, mN/m) and ellipsometric angle (DELTA, °) were recorded at 4.5 hours of acquisition when the films were transferred on mica plate.

Figure 6 - Proposed mechanisms of OB organization at the air-water interface for (A) Fresh MP OB; and (B) Oxidized MP OB.

Chapitre 4

Figure 39 - Stratégie du chapitre 4.

Figure 40 - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rouge), et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, bleu) sur une cinétique de 10h après injection de la rDGL (1,92 mg/L, 40 nM) en sous-phase tampon acétate pH 5 (100 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, 10 mM acétate de sodium) sur une cinétique de 10h.

Figure 41 - Evolution de la pression de surface (courbe rouge) et de l'angle ellipsométrique (courbe bleue) sur une cinétique de 2h après injection de la rDGL (1,92 mg/L) en sous-phase de la monocouche de lipides totaux extraits de la *Chlorelle Purasana* (pH 5).

Figure 42 - Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) et variations des hauteurs à la surface du film après 2h de cinétique d'adsorption de la rDGL (1,92 mg/L) en sous-phase du film de lipides totaux de *chlorella vulgaris Purasana* (pH 5).

Figure 43 - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, courbe rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, courbe bleue) sur une cinétique de 2h après injection de la rDGL (1,92 mg/L) en sous-phase de la monocouche de lipides membranaires extraits d'oléosomes A) de noix et, B) d'amandes.

Figure 44 - Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de la surface du film de lipides membranaires d'oléosomes de A) noix et B) amandes, obtenues avant, et après 1h et 2h de cinétique en présence de rDGL (1,92 mg/L) injectée en sous-phase.

Figure 45 – Description du montage utilisé pour suivre la lipolyse des OB d'amande sur la ligne d'imagerie DISCO. Les puces microfluidiques en polydiméthylsiloxane (PDMS) ont été fixées par plasma sur des lamelles rondes en quartz (R525000, Esco Optics, $d=25 \text{ mm}$, $t=0,16 \text{ mm}$), puis montées sur une chambre Atto-Fluor, placées dans le support thermostaté sous le microscope (panneau A) et connectées à une vanne multicanaux et à deux pompes de micro-injection (panneau B). La première a été utilisée pour l'administration de fluide gastrique simulé contenant de la lipase gastrique (rDGL) et la seconde pour l'administration de fluide intestinal simulé (SIF) contenant la PPL et sa colipase. La conception microfluidique contenait quatre chambres parallèles ($200 \times \text{longueur} \times 13 \mu\text{m}$) toutes équipées de pièges conçus pour retenir les oléosomes d'amande. Le panneau C montre les pièges ($16 \times 16 \mu\text{m}$) dans l'une des chambres avant l'injection de l'échantillon. Le panneau D montre la même chambre après l'injection des oléosomes d'amande.

Figure 46 – Visualisation des OB d'amandes pendant la phase gastrique. A) Oléosomes d'amande au début de la digestion gastrique avant l'injection de la lipase gastrique (image visible T 0 min, 40X, image $283 \times 283 \mu\text{m}$, position 0), B) Evolution de la fluorescence au cours de la digestion gastrique des oléosomes sur trois positions (POS 0, 1 et 2) C) Evolution de la fluorescence après injection de la lipase gastrique dans la chambre microfluidique (1 image par minutes, entre 20 et 30 minutes de phase gastrique, image T+1-T fluorescence 327-335 nm, crop $117 \times 108 \mu\text{m}$ similaire à l'image).

Figure 47 - Visualisation de la digestion des OB d'amande pendant la phase intestinale. A) OB d'amande au début de la digestion intestinale avant l'injection de la PTL (image visible T₀, 40X, image $283 \times 283 \mu\text{m}$), B) Oléosomes d'amande au début de la digestion intestinale avant l'injection de la lipase PTL (image de fluorescence 327-335 nm T 0 min, 40X, image $283 \times 283 \mu\text{m}$) C) Evolution des oléosomes d'amande pendant la phase intestinale (1 image toutes les 5 minutes, image visible, recadrage de l'image $106 \times 67 \mu\text{m}$, emplacement du recadrage sur l'image A), D)

Évolution des oléosomes d'amande pendant la phase intestinale (1 image toutes les 5 minutes, fluorescence 327-335 nm, image $106 \times 67 \mu\text{m}$, emplacement de l'image B).

Article de recherche

Kergomard et al., 2022, Colloids and surface B: biointerfaces – under review

Figure 1 - 3D structure of recombinant dog gastric lipase. Panel A: ribbon model showing the secondary structure elements of rDGL with the lid in the open conformation and putative orientation at lipid-water interface based on the localization of the interfacial recognition site. Panel B: Top view and molecular surface representation (white=hydrophobic; yellow=polar) of rDGL showing the hydrophobic ring surrounding the active site entrance. Views were prepared using PyMol software (Schrodinger, L. (2010) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.) and the crystal structure of rDGL (PDB: 1K8Q).

Figure 2 - (A) Kinetic evolution of the surface pressure (circle, red) and ellipsometric angle (triangle, blue) upon rDGL adsorption at the air/water interface onto GL lipid film and, (B) Kinetic evolution of the surface pressure (circle, red) and ellipsometric angle (triangle, blue) upon rDGL adsorption onto GL₅₀/DPPC₅₀ monolayers performed at an initial surface pressure of 20 mN/m. The rDGL was injected in the subphase after 5 minutes stabilization of the monolayers at the air/water interface.

Figure 3 - AFM images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$ and $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$) at an initial surface pressure of 20 mN/m before (-rDGL, red) and after (+rDGL, green) rDGL injection (40 nM final concentration, 5h kinetics) of A) GL/DPPC monolayer (50:50 mol/mol) and B) GL/DPPC/pS monolayer (45:45:10 mol/mol/mol). Cross-sections of height profiles are representative for $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$ image after rDGL injection. (LE – Liquid Expanded, fluid phase; LC – Liquid Condensed, gel phase). The vertical color scale from dark brown to white corresponds to an overall height of 15 nm.

Figure 4 - AFM images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$ and $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$) at an initial surface pressure of 20 mN/m before (-rDGL, red) and after (+rDGL, green) rDGL injection (40 nM final concentration, 5h kinetics) of A) GL/DPPC monolayer (50:50 mol/mol) and B) GL/DPPC/pS monolayer (45:45:10 mol/mol/mol). Cross-sections of height profiles are representative for $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$ image after rDGL injection. (LE – Liquid Expanded, fluid phase; LC – Liquid Condensed, gel phase). The vertical color scale from dark brown to white corresponds to an overall height of 15 nm.

Figure 5 - Proposed model of rDGL distribution in homogenous galactolipid monolayer under gastric conditions.

Chapitre 5

Figure 48 - Stratégie du chapitre 5.

Figure 49 - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à **20 mN/m**, pH 7.

Figure 50 - Image AFM ($2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$) et histogramme de hauteurs du film interfacial obtenus à 2h de cinétique ($\pi=20,3$ mN/m, $\Delta=6,9^\circ$) après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à **20 mN/m**.

Figure 51 - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la PLA2-NMM-CM III (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à **20 mN/m**, pH 7.

Figure 52 - Images AFM ($2,5 \times 2,5$ et $1 \times 1 \mu\text{m}^2$) et hauteurs des domaines du film interfacial obtenu après 2h de cinétique ($\pi=20,3$ mN/m, $\Delta=6,9^\circ$) après injection de la PLA2-NMM-CM III (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à **20 mN/m**.

Figure 53 - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à **10 mN/m**, pH 7.

Figure 54 - Images AFM ($2,5 \times 2,5$ et $1 \times 1 \mu\text{m}^2$) et hauteurs des domaines du film interfacial obtenu à 2h de cinétique ($\pi=20,3$ mN/m, $\Delta=6,9^\circ$) après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à **10 mN/m**.

Figure 55 – A) Dépôts CCM (révélation primuline, visualisation à 365 nm) des substrats et des produits de digestion à T0 et après 5 minutes de digestion par la sPLA2-IB (3,3 mg/L), respectivement, des liposomes micrométriques GL/DPPC/pS.

Figure 56 – Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de l'interface des films des substrats et produits de lipolyse obtenus à A) T0 et B) T60 minutes à une pression d'environ 10 mN/m.

Figure 57 – A) Evolution et la pression de surface (π , mN/m, rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, bleu), et B) image AFM ($2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$) et hauteurs des domaines à l'interface du film obtenu après 2h de cinétique ($\pi=9,9$ mN/m, $\Delta=7,5^\circ$) ; après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche de lipides totaux extraits de fragments membranaires de *Chlorella vulgaris* Purasana.

Article de recherche

Kergomard et al., 2022, Biochimie – en préparation

Figure 1 - $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ AFM images of A) GL, B) GL/DPPC/pS, C) MGDG/DGDG/SQDG/PG, and D) total lipid extracted from *Chlorella vulgaris* Purasana monolayer at 20 mN/m.

Figure 2 - A) Kinetic evolution of surface pressure (π , mN/m, red circles) and ellipsometric angle (Δ , °, blue triangle) upon the adsorption and kinetic activity of gPLRP2 (0.128 mg/L) onto GL

FIGURES ET TABLES

monolayer. B) AFM images of Langmuir-Blodgett samples after 1) 35 minutes and 2) 1 hour kinetic of gPLRP2 adsorption onto GL monolayer, respectively.

Figure 3 - Kinetic evolution of the surface pressure (π , mN/m, red circle) and the ellipsometric angle (Δ , °, blue triangle) over one hour after the injection of the inactive variant of gPLRP2 in the subphase of the GL monolayer. B) $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ images of the Langmuir-Blodgett sample obtained after 1 hour kinetic.

Figure 4 - A) Kinetic evolution of surface pressure (π , mN/m, red circles) and ellipsometric angle (Δ , °, blue triangle) upon the adsorption and kinetic activity of gPLRP2 (0.128 mg/L) onto GL/DPPC/pS monolayer. B) AFM images of Langmuir-Blodgett samples after 1) 45 minutes and 2) 1h45 kinetic of gPLRP2 adsorption onto GL/DPPC/pS monolayer, respectively.

Figure 5 - Evolution of the surface pressure (π , red, mN/m) and the ellipsometric angle (Δ , blue, °) upon the adsorption of gPLRP2 onto A) MGDG/DGDG/SQDG/PG (1h kinetic), and B) total lipids extracted from *Chlorella vulgaris* Purasana monolayers (2h kinetic). AFM images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) of the interface of C) MGDG/DGDG/SQDG/PG (1h kinetic, $\pi=8.5$ mN/m, $\Delta=5.2^\circ$), and D) total lipids extracted from *Chlorella vulgaris* Purasana (2h kinetic, $\pi=9.4$ mN/m, $\Delta=6.9^\circ$) monolayers after the injection of gPLRP2 in the sub-phase.

Figure 6 - AFM images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) of substrates and lipolysis products obtained at T5min and deposited at 7.2 ± 0.1 mN/m at the air/water interface of A) GL, B) GL/DPPC/pS monolayers. For each identified domain, the mean height level was given in the table and was obtained as an average over three sections of the image. Lipophilic substrates and products were extracted using Folch method.

Chapitre 6

Figure 58 - Isothermes de compression des monocouches des lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana (trait rouge continu) et *sorokiniana* (trait rouge pointillé) et des lipides membranaires de noix (trait noir continu) et d'amandes (trait noir pointillé). **Figure 58** - Isothermes de compression des monocouches des lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana (trait rouge continu) et *sorokiniana* (trait rouge pointillé) et des lipides membranaires de noix (trait noir continu) et d'amandes (trait noir pointillé).

Figure 59 – Représentation du potentiel électrostatique de surface de la structure 3D ruban ouverte de la rDGL, calculé à pH 5. Les potentiels électrostatiques de surface sont représentés avec un code couleur sur une surface de van der Waals en utilisant le système graphique moléculaire PyMOL (version 1.3, Schrödinger, LLC). Les couleurs rouge et bleue représentent les charges nettes négatives et positives, tandis que la couleur blanche représente les positions globalement neutres, respectivement. A partir de Bourlieu et al. (2016).

Chapitre 7

Figure 60 - Images obtenues par AFM-cellule liquide ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$) de la dégradation cinétique par la gPLRP2 d'une bicouche lipidique obtenue par fusion de liposomes modèles GL/DPPC/pS.

Annexes

Annexe I – Distribution en AG des MGDG et DGDG achetés chez Avanti Polar Lipids.

Annexe II – Procédure d'isolation et de purification des OB, adapté de Kapchie et al. (2011).

Annexe III – Composition de la poudre de chlorelles entières *Ch. vulgaris* (Purasana, France).

Annexe IV – Images CLSM ($88 \times 88 \mu\text{m}^2$) de la poudre de chlorelles entières (Purasana, France) en présence de sondes Lipidtox et Rho-PE. De gauche à droite : transmission (nuance de gris), excitation et collecte aux trois longueurs d'onde 561 (rouge, amphiphiles marqués à la RhodaminePE), 633 (bleu, chlorophylle) et 488 nm (vert, lipides apolaires marqués au Lipitox).

Annexe V - Evolution de la pression de surface (π , mN/m) en fonction de la concentration de la rDGL en sous-phase (pH 5) après 15h de cinétique.

Annexe VI - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la gPLRP2 (0,128 mg/L) en sous-phase d'une monocouche de lipides membranaires d'OB de A) noix, et B) amande à 20 mN/m. Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de l'interface obtenues à 2h après injection de la gPLRP2 (0,128 mg/L) en sous-phase des monocouches de lipides membranaires d'OB de C) noix ($\pi=28,0$ mN/m, $\Delta=8,0^\circ$), D) amande ($\pi=36,2$ mN/m, $\Delta=8,0^\circ$).

Annexe VII - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase d'une monocouche de lipides membranaires d'OB de A) noix, et B) amandes à 20 mN/m. Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de l'interface obtenues à 2h après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase des monocouches de lipides membranaires d'OB de C) noix ($\pi=11,5$ mN/m, $\Delta=6,6^\circ$), D) amandes ($\pi=11,6$ mN/m, $\Delta=6,2^\circ$).

Annexe VIII - A) Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la PTL-coPTL (1-0,2 mg/L), et B) images AFM (20×20 et $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$) de l'interface obtenue 2h après l'injection de l'enzyme et de son cofacteur en sous-phase de la monocouche modèles de lipides GL/DPPC/pS.

Annexe IX - A) Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la PTL-coPTL (1-0,2 mg/L), et B) images AFM (20×20 et $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$) de l'interface obtenue à 1h et 2h après

FIGURES ET TABLES

injection de l'enzyme et de son cofacteur en sous-phase d'une monocouche de **lipide totaux de *chlorella vulgaris Purasana***.

Annexe X - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la PTL-coPTL (1-0,2 mg/L) en sous-phase d'une monocouche de lipides membranaires d'OB de A) noix, et B) amande à 20 mN/m. Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de l'interface obtenues à 2h après injection de la PTL-coPTL (1-0,2 mg/L) en sous-phase des monocouches de lipides membranaires d'OB de C) noix ($\pi=28,3$ mN/m, $\Delta=10,1^\circ$), D) amande ($\pi=34,6$ mN/m, $\Delta=9,4^\circ$).

Annexe XI - J. Kergomard, F. Carrière, G. Lambeau, G. Paboeuf, N. Barouh, P. Villeneuve, C. Bourliou and V. Vié, What are the mechanisms of gastrointestinal lipases adsorption onto heterogenous biomimetic vegetal membranes? 7th International Conference on Food Digestion ICFD 2022, May 2022, Cork, Ireland. pp.95. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03669301>

Annexe XII - J. Kergomard, M. Robert, N. Barouh, G. Paboeuf, B. Barea, P. Villeneuve, O. Schafer, T. Wooster, V. Vié & C. Bourliou-Lacanal, Effects of processing and concentration on the oxidative stability and interfacial behavior of tree nuts oil bodies (OB). Euro Fed Lipid 2021, Oct 2021, Leipzig - Online, Germany.

Annexe XIII - **J. Kergomard**, N. Barouh, G. Paboeuf, P. Villeneuve, O. Schafer, T. Wooster, V. Vié & C. Bourliou-Lacanal, Stability to oxidation and interfacial behavior at the air-water interface of minimally-processed versus processed walnut oil-bodies. Lipid droplets & Oleosomes - 2nd International Conference, Dec 2021, Strasbourg, France. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03466652>

Annexe XIV - **J. Kergomard**, V. Vié, G. Paboeuf, N. Barouh, B. Barea, et al., Oxidative and interfacial behavior of native oil bodies from walnut. Euro Fed Lipid Seville 2019, Oct 2019, Séville, Spain. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02315046v2>

TABLEAUX

Introduction générale

Tableau 1 – Références nutritionnelles en acides gras (AG) pour l'Homme adulte consommant 2000 kcal/jour selon l'ANSES (2011). Les valeurs sont exprimées, excepté pour l'EPA et le DHA, en **pourcentage de l'apport énergétique sans alcool**, que l'on appellera « apport énergétique » (AE), par souci de simplification. Dans le cas du DHA et de l'EPA, les valeurs sont exprimées en milligrammes dans la mesure où les études disponibles ont utilisé cette unité.

Tableau 2- Composition en acides gras des lipides de différentes matrices animales et végétales riches en ω_3 sous différentes formes (TAG *versus* phospholipides *versus* galactolipides).

Chapitre 1

Tableau 3 – Formes moléculaires et phases polymorphiques du quartet lipidique responsable du comportement général et de l’architecture des thylakoïdes. Le MGDG présente une forme conique et adopte une organisation hexagonale inverse (HII) en solution aqueuse. Les DGDG, SQDG, et PG ont une forme cylindrique et s’organisent en phases lamellaires ($L\alpha$) quel que soit le taux d’hydratation.

Tableau 4 - Composition en AG principaux des MGDG et DGDG issus de différentes sources photosynthétiques. La spiruline (ici *Arthrospira platensis*) est la cyanobactérie la plus connue (algues bleues-vertes) dans les applications d’ingrédients fonctionnels. Elle est particulièrement enrichie en C16:0 et en C18:3 ω 3. La *Subterraneus* provient de la biomasse microalgale et peut être utilisée pour la consommation humaine. Elle a la particularité d’être enrichie en EPA. Chez l’*Arabidopsis*, le MGDG est riche en ALA et en acide hexadécatriénoïque (HTA, C16:3 ω 3) tandis que le DGDG est principalement enrichi en ALA. Les feuilles d’épinard présentent quant à elles un profil particulièrement riche en ALA chez le MGDG et le DGDG. (Lyu et al., 2021).

Tableau 5 - Taille (μ m) et composition (pourcentage massique) d’OB isolés de différentes graines.

Tableau 6 - Composition en phospholipides (pourcentage massique) d’OB isolés de différentes graines.

Tableau 7 - Principales données et hypothèses déterminant la stabilité oxydative des lipides polaires et des assemblages végétaux : chloroplastes, oléosomes et lécithines.

Tableau 8 - Localisation et concentrations massique et molaire des principales enzymes gastro-intestinales humaines au cours d’un repas – adapté de Bakala N’Goma et al. (2012).

Chapitre 3

Tableau 9 - Composition en phospholipides d’huile de noix et d’amande. A partir de Zlatanov et al. 1999.

Tableau 10 - Valeurs de pressions de surface (π , mN/m) et de la surface spécifique (S , $\text{cm}^2/\mu\text{g}$) auxquelles a été observé une transition de phase lors de la compression des monocouches de lipides membranaires d’OB de noix et d’amandes.

Article de recherche

Kergomard et al., 2022, Colloids and surface B: biointerfaces

Table 1 - Molar composition of mixed Langmuir monolayers used as model membranes.

Table 2 - Values of π (mN/m), Δ ($^{\circ}$) and limiting molecular area ($\text{\AA}^2/\text{molecule}$) at the collapse of mixed GL, DPPC and pS monolayers.

Chapitre 4

Article de recherche

Kergomard et al., 2022, Colloids and surface B: biointerfaces – under review

Table 1 - Model system compositions.

Table 2 - Summary of height levels identified in AFM images and related to rDGL interactions with model membranes. Height values are given in nm. The percentages given are the percentage of pixels covered by the indicated height range (-). Values obtained were based on the analysis of five plot profiles taken randomly in the AFM image.

Chapitre 5

Article de recherche

Kergomard et al., 2022, Biochimie – en préparation

Table 1 – Quantitative determination of lipid classes composition obtained by TLC at T_0 and after 5 minutes ($T_{5\text{min}}$) digestion by gPLRP2 of $1\ \mu\text{m}$ GL, GL/DPPC/pS, MGDG/DGDG/SQDG/PG liposomes. The reaction was performed at pH 7 in Tris HCl buffer containing 4 mM of NaTDC. Data are given in relative percentages of the total lipids.

Chapitre 6

Tableau 11 – Valeurs de Δ ($^{\circ}$) des monocouches de lipides extraits des systèmes naturels à une pression de surface d'environ 20 mN/m.

Tableau 12 – Valeurs de coefficient de compressibilité (C^{-1} , mN/m) obtenues à 10, 15, et 20 mN/m pour chacune des monocouches modèles étudiées (GL, GL/DPPC, GL/DPPC/pS). La détermination du C^{-1} à partir des isothermes de compression est explicitée dans Kergomard et al. (2022).

Tableau 13 - Activités des principales enzymes digestives humaines et leurs proches analogues.

ABRÉVIATIONS

1-lysoPC: 1-lysophosphatidylcholine	HPLC: High performance liquid chromatography
AFM: microscopie à force atomique	HPTLC: high performance thin layer chromatography
AG: acides gras	HTA: acide hexadécatriénoïque
AGL: acides gras libres	LA: acide linoléique
AGPI: acides gras polyinsaturés	L_α: structure lamellaire
AGPI-LC: AGPI à longues chaînes	LC: liquide condensé
ALA: acide alpha-linolénique	LDL: low-density lipoprotein
AO: antioxydant	LE: liquide expansé
ARA: acide arachidonique	Lo: phase liquide-organisé
BAM: brewster angle microscopy	MAG: monoacylglycérol
BMM: bovine milk membranes	MDA: malondialdéhyde
BSSL: bile-salt stimulated lipase	MGDG: monogalactosyldiacylglycérol
CCK: cholécystokinine	MGG: monogalactosylglycerol
CEH: pancreatic carboxyl ester hydrolase	MGMG: monogalactosylmonoacylglycérol
CLSM: confocal laser scanning microscopy	MPL: milk polar lipids
CMC: concentration micellaire critique	NMM-CM III: sPLA2 de venin de cobra du Mozambique
CRF: chloroplast rich fraction	OB: oléosomes, oil bodies
DAG: diacylglycérol	PA: acide phosphatidique
DBE: énergie de liaison dissociante	PC: phosphatidylcholine
DGDG: digalactosyldiacylglycérol	PE: phosphatidyléthanamine
DGG: digalactosylglycérol	PG: phosphatidylglycérol
DGMG: digalactosylmonoacylglycérol	pI: Isoelectric point
DHA: acide docosahéxaénoïque	PI: phosphatidylinositol
DPPC: 1,2-dipalmytoylphosphatidylcholine	PLRP2: pancréatic lipase related-protein 2
Eau UP: eau ultrapure	PO: pro-oxydante
EPA: acide eicosapentaénoïque	PPL: porcine pancreatic lipase
FA: fatty acid	PS: phosphatidylsérine
FAME: fatty acid methyl ester	pS: phytosterol
FFA: free fatty acid	PTL: pancreatic triacylglycerol lipase
FTIR: fourier transform infrared spectroscopy	PUFA: polyunsaturated fatty acid
GIPC: glycosyl inositol phosphoryle céramides	PV: peroxyde value
GLP-1: glucagon peptide-1	PYY: peptide YY
gPLRP2: guinea pig pancréatic lipase related-protein 2	rDGL: recombinant dog gastric lipase
HDL: high-density lipoprotein	ROS: reactive oxygen species
He-Ne: Helium-neon	SAXS: small angle X-ray scattering
HGL: lipase gastrique humain	sPLA2: phospholipase pancréatique A2 sécrétée
HHP: High-pressure homogenization	SQDG: sulfoquinovosyldiacylglycérol
HHPT: High-pressure homogenization following by a heat treatment	TAG: triacylglycérols
H_{II}: structure hexagonale inverse	TBA: acide thiobarbiturique
HMM: human milk membranes	TBARS: substances réactives à l'acide thiobarbiturique
HPL: human colipase-dependent pancreatic lipase	TCA: acide trichloroacétique

Table de matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	28
Question de recherche et stratégie.....	35
CHAPITRE 1 - Synthèse bibliographique	43
I- Description des principaux assemblages membranaires végétaux	44
II- Susceptibilité à l'oxydation des lipides polaires végétaux et des assemblages membranaires naturels	59
III – Généralités sur la digestion des lipides chez l'Homme.....	66
IV - Digestibilité des assemblages végétaux.....	75
V - Impact de l'addition de constituants isolés des assemblages végétaux sur la digestion des TAG.....	80
CHAPITRE 2 – Techniques expérimentales.....	89
I – Matériel biologique	90
II – Caractérisation chimique	92
III – Mesures interfaciales à l'échelle moléculaire - caractérisation biophysique des monocouches de lipides à l'interface air/eau	95
IV – Mesures cinétiques de dégradation à l'échelle de l'objet - dégradation des liposomes de lipides végétaux en système statique par les enzymes gastro-intestinales	105
CHAPITRE 3 – Caractérisation initiale des assemblages et systèmes lipidiques modèles et naturels végétaux.....	112
I – Organisation interfaciale et comportement de phases des systèmes modèles de galactolipides à l'interface air/eau et en mésophases hydratées.....	113
II - Caractérisation du comportement interfacial des monocouches de lipides extraits de systèmes naturels	141
III – Caractérisation initiale du comportement oxydatif et interfacial des assemblages membranaires isolés	155
CHAPITRE 4 - Capacité d'adsorption et activité enzymatique de la lipase gastrique sur les systèmes végétaux modèles et naturels	194
I – Modulation du comportement d'adsorption de la lipase gastrique de chien (rDGL) par ajout de phytostérols dans les monocouches modèles hétérogènes de galactolipides/DPPC	195
II – Capacité d'adsorption de la lipase gastrique sur des monocouches de lipides extraits de matrices membranaires naturelles	222

III – Digestion gastro-intestinale des OB d’amande en système dynamique.....	232
CHAPITRE 5 - Comportement d’adsorption et dégradation enzymatique des lipases intestinales sur les systèmes végétaux.....	242
I – Dégradation enzymatique des substrats lipidiques modèles et extraits des matrices naturelles par la gPLRP2	243
II – Dégradation enzymatique des substrats lipidiques modèles et naturels par la sPLA2-IB.	272
CHAPITRE 6 – Discussion générale	287
I - Comportement interfacial d’extraits naturels de chlorelles ou d’OB de noix/amandes	288
II- Modèles de membranes végétales : modularité des états physiques, intérêts, et limites	293
III - Spécificité d’action des lipases digestives sur les molécules lipidiques du végétal	296
IV – Généricité des effets de l’état physique et de charges sur l’adsorption des lipases digestives au sein d’interfaces naturelles	307
V – Intérêt des extraits de lipides végétaux comme sources d’AO et vecteurs d’ $\omega 3$?.....	312
CHAPITRE 7 – Conclusion générale.....	317
Limites et perspectives	319
Références	324
Annexes	368

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Hippocrate l'affirmait déjà à l'Antiquité : « Si nous pouvions donner à chaque individu la bonne quantité de nourriture et d'exercice, pas trop peu et pas trop, nous aurions le plus sûr moyen pour la santé ». Cette citation est aujourd'hui plus que jamais d'actualité, dans un contexte mondial où les maladies chroniques liées à une alimentation déséquilibrée connaissent une recrudescence alarmante.

L'importance des lipides dans la nutrition humaine a été reconnue pour la première fois en 1827 par le chimiste et physicien anglais William Prout, qui a proposé une classification des nutriments selon trois catégories : protéines, glucides, et **lipides** (Wisniak, 2015). Au même titre que les protéines et les glucides, les lipides sont des nutriments essentiels pour la santé humaine, mais également, de façon plus globale, pour la croissance des organismes vivants. En effet, ces molécules jouent de nombreux rôles clés dans la régulation homéostatique du métabolisme chez les animaux et les végétaux, et en particulier à travers leurs trois fonctions principales : (i) les lipides peuvent être utilisés pour le stockage d'énergie sous leur forme neutre (triacylglycérols, TAG), (ii) les lipides polaires (phospholipides, galactolipides, sphingolipides...) jouent également un rôle crucial dans la structuration des membranes, (iii) de nombreux lipides sont des molécules de reconnaissance ou de médiation, dans la génération et la propagation de signaux physiologiques comme par exemples les eicosanoïdes ou encore les résolvines. La structure et le rôle biologique des différents types de lipides sont résumés en **Figure 1**.

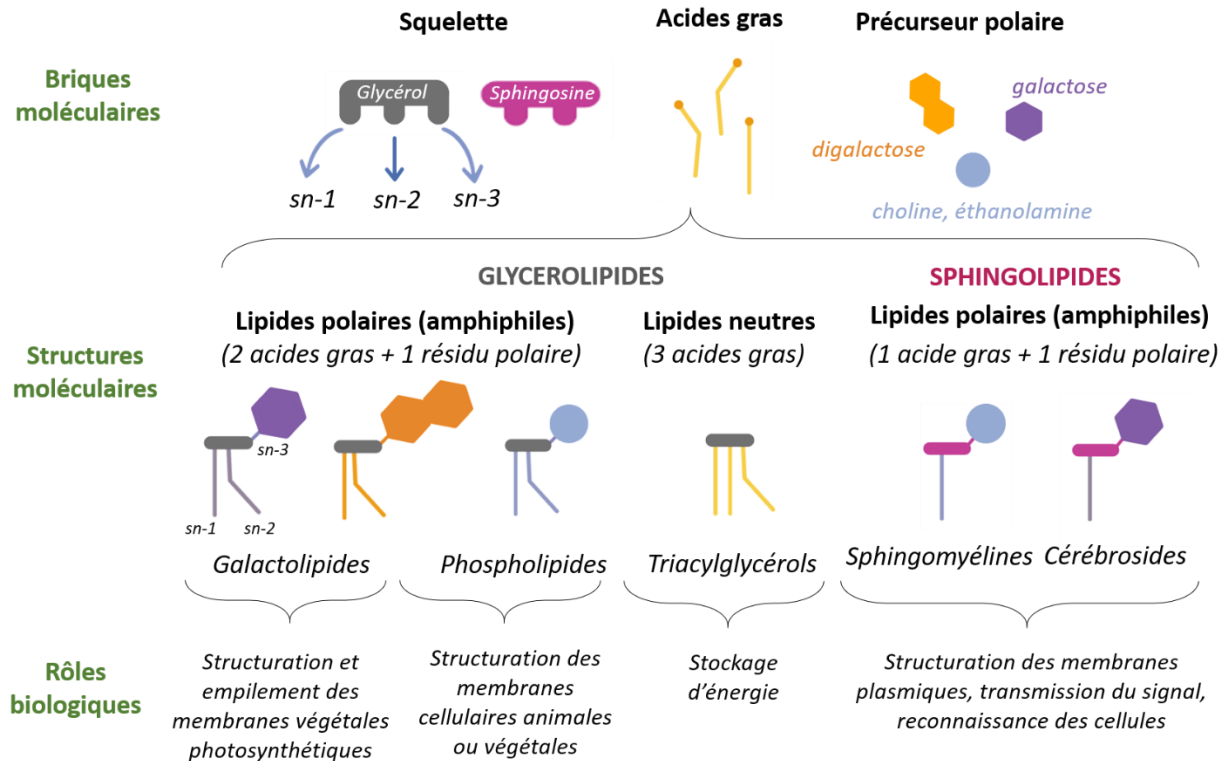


Figure 1 - Structures et rôles biologiques des principaux lipides alimentaires.

Chez l'Homme, la digestion des lipides provenant de son régime alimentaire conduit à la libération de deux acides gras polyinsaturés (AGPI) essentiels, car non-synthétisés par l'organisme humain du fait de l'absence de la $\Delta 12$ -désaturase : l'acide linoléique (LA, C18:2, $\omega 6$) et l'acide alpha-linolénique (ALA, C18:3, $\omega 3$). Ces deux acides gras essentiels peuvent être apportés par l'alimentation sous différentes formes lipidiques (*e.g.* TAG ou phospholipides), et sont à la base de deux voies d'élongations et désaturations, qui conduisent à des AGPI bioactifs à plus longues chaînes (AGPI-LC) (**Figure 2**). On peut notamment citer l'acide arachidonique (ARA, C20:4, $\omega 6$), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5, $\omega 3$) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, $\omega 3$). Il convient néanmoins de noter que la voie de synthèse de l'EPA et du DHA (voie des oméga-3) possède une faible efficacité de conversion, et c'est pour cette raison qu'il est aujourd'hui recommandé de consommer des produits riches en ces deux AGPI-LC plutôt que de compter

INTRODUCTION GENERALE

uniquement sur leur bioconversion à partir de l'ALA. L'EPA et le DHA jouent en effet un rôle crucial dans la régulation homéostatique du corps humain, en étant à la base de la production de lipides de signalisation que sont les eicosanoïdes et les médiateurs lipidiques tels que les résolvines, les protectines ou encore les marésines, impliqués dans les processus de résolution de l'inflammation dans notre organisme (Saini & Keum, 2018). Le DHA joue également un rôle clé dans le maintien de la fluidité des membranes de la rétine et du cerveau, ce qui est essentiel pour le bon déroulement des fonctions neurologiques et cognitives (Stillwell & Wassall, 2003).

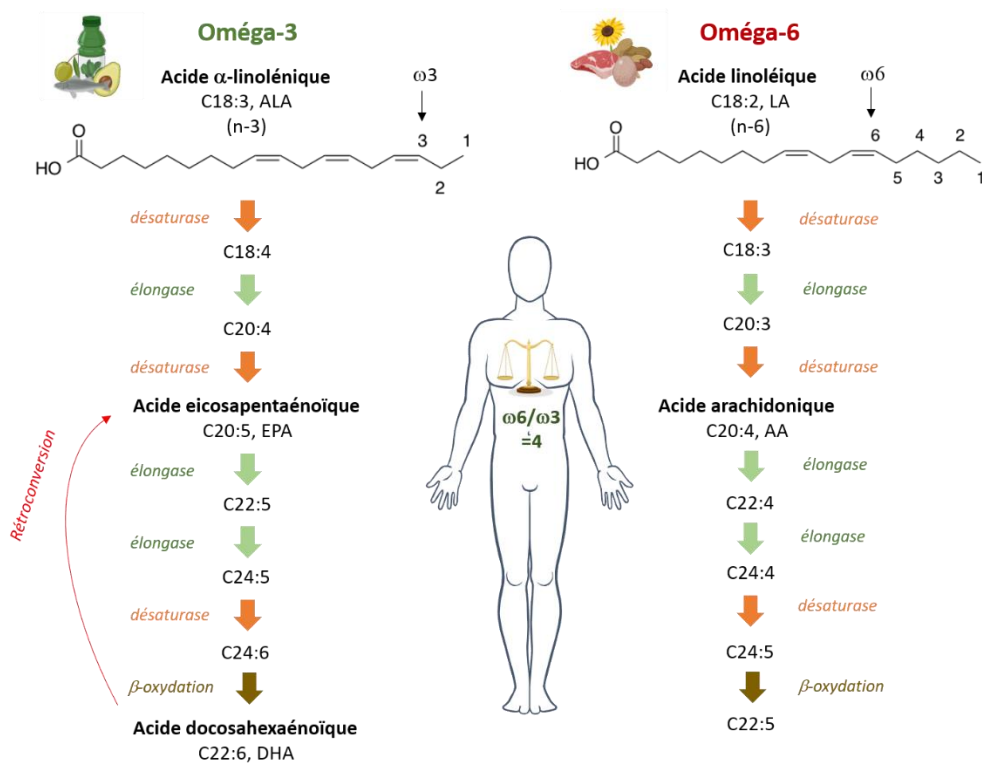


Figure 2 - Voies de biosynthèse des principaux acides gras oméga-3 ($\omega 3$) et oméga-6 ($\omega 6$) chez l'Homme.

Les AGPI $\omega 6$ et $\omega 3$ sont impliqués dans des mécanismes métaboliques opposés dans le corps humain et sont en compétition pour la synthèse des médiateurs lipidiques à travers leurs enzymes biosynthétiques respectives. Néanmoins, ces trois dernières décennies, le ratio $\omega 6 / \omega 3$ a

considérablement augmenté dans les régimes occidentaux, passant de 1:1 à plus de 20:1 pour les régimes les plus extrêmes, et ce, en raison de l'augmentation significative des apports en $\omega 6$ et de la diminution concomitante des apports en $\omega 3$ (El Hadi et al., 2019). Dans un même temps, une augmentation des cas de surpoids et d'obésité a été observée dans les pays occidentaux. Bien que cette augmentation soit multifactorielle, elle est très probablement liée à des déséquilibres métaboliques, ainsi qu'aux changements dans la composition des acides gras, provenant par exemple des régimes alimentaires excédentaires en viandes de mauvaises qualités, et donc sources d'acides gras saturés et d' $\omega 6$ en excès, ainsi qu'à des diètes riches en « calories vides ».

Tableau 1 – Références nutritionnelles en acides gras (AG) pour l'Homme adulte consommant 2000 kcal/jour selon l'ANSES (2011). Les valeurs sont exprimées, excepté pour l'EPA et le DHA, en **pourcentage de l'apport énergétique sans alcool**, que l'on appellera « apport énergétique » (AE), par souci de simplification. Dans le cas du DHA et de l'EPA, les valeurs sont exprimées en milligrammes dans la mesure où les études disponibles ont utilisé cette unité.

	Acide gras (AG)	Référence nutritionnelle
AG indispensables	Acide linoléique (LA, C18:2, $\omega 6$)	4%
	Acide α -linoléique (ALA, C18:3, $\omega 3$)	1%
	Acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6, $\omega 3$)	250 mg
AG non indispensables	Acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5, $\omega 3$)	250 mg
	Acide oléique (OA, C18:1, $\omega 9$)	15-20%
	Acides gras saturés totaux	$\leq 12\%$

Les références nutritionnelles préconisées par l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation (ANSES) pour l'Homme adulte sont résumées **Tableau 1**. L'ANSES recommande aujourd'hui une consommation en lipides représentant 35 à 40% de l'apport énergétique total, afin

INTRODUCTION GENERALE

d'assurer la couverture des besoins en acides gras essentiels et de prévenir l'apparition de troubles métaboliques liés à une alimentation déséquilibrée. En France, cette fourchette est dépassée par environ 43% des adultes et 34% des enfants, soulignant le manque de diversité dans les régimes alimentaires et le déséquilibre des apports (INCA III). C'est pourquoi il est aujourd'hui nécessaire de mettre en place des stratégies nutritionnelles permettant de diminuer le ratio $\omega 6/\omega 3$ dans notre alimentation et de retrouver un équilibre, en augmentant nos apports en AGPI-LC $\omega 3$, comme l'EPA et le DHA, tout en limitant nos apports en lipides totaux (Enos et al., 2014). Une consommation équilibrée en $\omega 3$ et $\omega 6$, avec un ratio $\omega 6/\omega 3$ optimal de 5, et un apport adéquat de chaque type d'acide gras sont notamment recommandés par l'ANSES (*Saisine n° 2006-SA-0359, ANC AG, ANSES, 2011*). Une telle stratégie peut être atteinte en favorisant le poisson vis-à-vis de la viande, mais également en augmentant les apports en huiles végétales riches en $\omega 3$. Plus récemment, il a également été proposé d'utiliser des sources alternatives d'AGPI essentiels, en enrichissant par exemple notre régime alimentaire avec des lipides provenant de sources végétales photosynthétiques (Lane et al., 2014). Pour illustrer ces propos, le **Tableau 2** regroupe des sources animales et végétales riches en $\omega 3$ présents sous différentes formes moléculaires (TAG *versus* phospholipides *versus* galactolipides), qui peuvent influencer sur la biodisponibilité des AG chez l'Homme.

En effet, outre des variations dans la teneur en ALA, la forme moléculaire (par exemple TAG *versus* phospholipides) influence l'assimilation d'AGPI $\omega 3$ spécifiques. Ainsi, pour les AGPI-LC $\omega 3$, il a été montré une biodisponibilité plus forte sous la forme de phospholipides que sous la forme de TAG. Cette plus grande biodisponibilité n'a pas été démontrée en revanche pour les chaînes plus courtes comme l'ALA (Robert et al., 2020). En plus des phospholipides, les végétaux photosynthétiques contiennent également des galactolipides, associés à des

micronutriments, et dont la consommation peut conduire à la libération d' ω 3 essentiels (Sahaka et al., 2020). L'abondance des plantes et des algues sur Terre explique que ces galactolipides représentent la classe majoritaire de lipides acylglycérols dans la nature, et ainsi la source principale d'acides gras (80% *versus* 20% massique pour les phospholipides et TAG végétaux), dont certains AGPI essentiels (Gounaris & Barber, 1983).

Tableau 2- Composition en acides gras des lipides de différentes matrices animales et végétales riches en ω 3 sous différentes formes (TAG *versus* phospholipides *versus* galactolipides).

Acides gras (% massique)	Huile de lin ^a (TAG)	Huile de saumon ^b (Phospholipides)	Epinards ^b (Galactolipides)
C16:3 (ω 3)	<i>ND</i>	1.3	18.2
C18:3 (ω 3)	43.0-61.1	<i>ND</i>	74.0
C18:4 (ω 3)	<i>ND</i>	0.1	<i>ND</i>
C20:5 (ω 3)	<i>ND</i>	10.3	<i>ND</i>
C22:5 (ω 3)	<i>ND</i>	4.7	<i>ND</i>
C22:6 (ω 3)	<i>ND</i>	29.4	<i>ND</i>

^aYang et al. (2021)

^bYamaguchi et al. (2012)

Au-delà de leur forme moléculaire, les ω 3 sont présents sous la forme de molécules amphiphiles (phospholipides, galactolipides), qui s'autoassemblent pour former des membranes biologiques, par l'établissement de liaisons faibles (van der Waals, électrostatiques). Ces membranes sont constituées d'un mélange complexe de lipides mais également de protéines, de terpènes et de stérols, qui contribuent entre autres aux propriétés physiques de l'ensemble. En particulier, la richesse en AGPI organisés en phases fluides, mais également la présence de zones comprenant des molécules rigidifiantes ou fluidifiantes, comme les phytostérols ou encore les sphingolipides,

INTRODUCTION GENERALE

induisent des coexistences de phase et ainsi une hétérogénéité, pouvant influencer sur leur digestibilité. En plus de l'hétérogénéité latérale, la structure supramoléculaire des émulsions lipidiques joue également un rôle sur la digestibilité et la lipémie postprandiale (concentration des lipides dans le plasma après un repas) (Michalski et al., 2013).

Les membranes biologiques stabilisent et préservent l'intégrité des assemblages de plus grande taille, de l'ordre du micron. On peut par exemple citer les oléosomes, des réserves de lipides neutres délimitées par une monocouche lipoprotéique, ou encore les thylakoïdes, des bicouches empilées formant les membranes photosynthétiques des chloroplastes. Si plusieurs travaux ont porté sur la digestibilité des oléosomes, peu concernent celle des sources photosynthétiques, et en particulier des chloroplastes. Ce questionnement est à la base de mon travail de thèse, d'autant que la demande du consommateur pour des aliments issus du végétal et moins intensivement transformés et purifiés a multiplié les matrices dans lesquelles on retrouve ces assemblages. Outre les végétaux à feuilles, c'est le cas par exemple des boissons végétales riches en AGPI, dont la consommation a peu à peu augmenté ces dernières années (Sethi et al., 2016). Cette tendance est boostée par les recommandations nutritionnelles et par une prise de conscience générale des effets bénéfiques sur la santé, la nécessité de diminuer l'impact de production sur l'environnement, et le développement par les industriels de produits à base de protéines et de lipides végétaux. Si des boissons à base de diverses noix ou céréales sont proposées sur le marché, il y a encore peu de diversité concernant les sources végétales photosynthétiques, et les parties feuillues, en dehors de certains usages traditionnels dans des sauces (oseilles, sauge, etc.), demeurent encore sous-exploitées dans le domaine de la nutrition humaine.

Les lipides végétaux, du fait de leurs caractéristiques (richesse en ALA, diversité de formes moléculaires et d'assemblages naturels microniques stables physico-chimiquement), sont

remarquables et constituent un gisement nutritionnel d'intérêt pour l'Homme. Cependant, la digestibilité de ces lipides végétaux spécifiques reste assez méconnue, en particulier en ce qui concerne les galactolipides, et ce malgré une consommation chez l'Homme qui peut atteindre jusqu'à 200 mg par jour (De Caro et al., 2008). Ainsi, une meilleure connaissance de leur digestibilité permettrait la valorisation de ces sources de lipides encore peu exploitées, et le développement de nouvelles applications alimentaires, accessibles à tous, et à moindre coût.

Question de recherche et stratégie

Les membranes végétales représentent des ensembles de lipides complexes avec des compositions variées. En particulier, les membranes végétales sont riches en AGPI organisés en phases fluides, mais la présence de molécules rigidifiantes, comme les phytostérols ou encore les sphingolipides, induit des zones plus denses. Ainsi, ces systèmes présentent des coexistences de phases et donc une hétérogénéité latérale influant sur leur digestibilité. A ma connaissance, les études scientifiques portant sur le comportement d'adsorption et l'activité enzymatique des lipases digestives humaines se sont principalement intéressées à des systèmes modèles homogènes, et/ou riches en acides gras saturés, et/ou présentant une composition se rapprochant des assemblages membranaires animaux. Or, afin d'exploiter de façon optimale les sources lipidiques végétales, il est nécessaire de comprendre leur devenir dans le tractus gastro-intestinal humain. Même si des études ont montré la digestibilité des galactolipides et des phospholipides par certaines enzymes, les mécanismes restent encore mal connus, notamment au niveau moléculaire. Dans ce contexte, j'ai cherché à répondre à la question suivante durant mon projet de recherche :

Quels paramètres conditionnent l'action des lipases/phospholipases digestives sur les lipides polaires issus du végétal sous forme d'assemblages ?

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La stratégie globale mise en place pour répondre à cette problématique est présentée **Figure 3**.

J'ai choisi de m'intéresser au comportement des deux assemblages lipidiques les plus fréquemment trouvés dans le règne végétal : les oléosomes, principalement rencontrés chez les oléagineux, et les chloroplastes, trouvés chez les végétaux photosynthétiques. Plus particulièrement, j'ai choisi d'étudier deux sources végétales riches en acide α -linoléinique essentiel pour notre organisme (AGPI, ω 3) que sont : i) les noix, riches en oléosomes (*versus* amandes, riches en ω 6), et ii) les microalgues Chlorelles, riches en chloroplastes. Ces deux sources contiennent différents types de lipides (phospholipides/TAG *versus* galactolipides) dans des proportions variées et présentent un réel intérêt nutritionnel. En particulier, la microalgue constitue une source encore peu exploitée dans l'alimentation malgré sa diversité de composition. Plusieurs rapports référencés dans la littérature soulignent en effet le potentiel nutritif des lipides de microalgues, alors que peu d'études sont disponibles concernant leur digestibilité (Demarco et al., 2022).

Dans ce contexte, j'ai choisi dans un premier temps de caractériser ces deux assemblages du végétal sous leur forme d'assemblage micronique natif, en étudiant le comportement interfacial ainsi que la stabilité à l'oxydation des oléosomes de noix et des chloroplastes de chlorelle. L'oxydation des lipides est en effet responsable de la modulation de l'état physique, et donc du comportement interfacial des assemblages, impactant ainsi les capacités d'adsorption des enzymes gastro-intestinales et la bioaccessibilité subséquente des acides gras végétaux. Je me suis ensuite intéressée au comportement individuel des lipides polaires membranaires extraits de ces matrices dans des systèmes reconstitués, afin de comprendre l'impact de leur structure et de leur composition sur leur organisation. Pour compléter ces résultats et mieux comprendre l'organisation des constituants lipidiques dans les assemblages natifs, j'ai également fait le choix d'étudier trois systèmes modèles : i) l'un composé uniquement d'un mélange des deux principaux galactolipides

trouvés dans le règne végétal ; ii) le second composé d'un mélange de galactolipides dans lequel j'ai ajouté de la 1,2-dipalmytoylphosphatidylcholine (DPPC) dans des concentrations bien supérieures à celles trouvées dans les membranes naturelles (50 mol% *versus* <10 mol%) dans le but d'induire une hétérogénéité de phase prononcée, et enfin iii) un dernier modèle dit « biomimétique » dans lequel j'ai rajouté un mélange de phytostérols d'intérêt à hauteur de 10 mol%.

Je me suis intéressée à l'action des principales enzymes digestives humaines en utilisant de proches analogues sur les différents systèmes lipidiques naturels et modèles précédemment décrits. Chez l'Homme, la digestion des lipides se produit principalement dans le tractus gastro-intestinal et débute dans le compartiment gastrique avec l'hydrolyse des TAG. Bien qu'il n'y ait pas d'hydrolyse des lipides polaires dans cette première phase de la digestion, celle-ci représente une étape clé, puisque la stabilité des émulsions de lipides résultant de la digestion gastrique influence grandement l'étendue de la cinétique de digestion intestinale (Infantes-Garcia et al., 2022). J'ai donc choisi de comparer les mécanismes d'action de la lipase gastrique (HGL), une enzyme particulièrement tensioactive, mais n'ayant pas d'activité sur les lipides polaires, avec ceux de trois enzymes intestinales : i) la phospholipase pancréatique A2 sécrétée (sPLA2), responsable de la dégradation des phospholipides, ii) la lipase pancréatique triacylglycérase (HPL ou PTL), responsable de la dégradation efficace des triacylglycérols chez l'Homme, et enfin iii) la lipase pancréatique dites PLRP2 (pancreatic lipase related-protein 2). Une attention particulière a été donnée à la compréhension du mode d'action de cette dernière, en effet la PLRP2 est responsable de la digestion des galactolipides, lipides majoritaires des thylakoïdes, conduisant à la production d'acides gras ω 3 essentiels (Wattanakul et al., 2019). Mes travaux de recherche se sont concentrés sur une caractérisation à deux échelles de la dégradation de ces assemblages naturels ou modèles,

INTRODUCTION GÉNÉRALE

comprenant des microdomaines de types « rafts » potentiellement fonctionnels, par les enzymes digestives humaines ou de proches analogues animaux.

J'ai d'abord réalisé l'étude interfaciale de ces systèmes sous la forme de films lipidiques. Les monocouches de lipides constituent en effet un modèle pertinent pour reproduire l'interface des gouttelettes d'émulsions alimentaires, lieu de la dégradation enzymatique des lipides dans le système digestif. Afin d'accéder à une compréhension moléculaire des interactions entre les lipides végétaux et les enzymes digestives, j'ai travaillé à des concentrations enzymatiques bien inférieures à celles des conditions physiologiques. J'ai cherché en particulier à comprendre l'impact des paramètres physico-chimiques (pression latérale, nature des lipides, pH, composition des monocouches lipidiques...) sur les mécanismes de digestion de ces lipides spécifiques en utilisant des techniques de caractérisation biophysique (ellipsométrie/tensiométrie/microscopie à force atomique).

Je me suis ensuite intéressée à la dégradation enzymatique d'objets dispersés (émulsions d'huile de colza à 4% massique et liposomes de 1 μm), formés par les mélanges lipidiques précédemment décrits, dans des conditions dynamiques ou statiques se rapprochant des conditions physiologiques du tractus gastro-intestinal humain. Cette étude a impliqué l'utilisation de cellules microfluidiques qui, couplées à de la microscopie optique et de fluorescence, ont permis de visualiser les substrats végétaux dispersés et de suivre quantitativement et qualitativement la cinétique dynamique de dégradation enzymatique au cours du temps (Marze et al., 2014). Ces systèmes miniaturisés ont permis de se rapprocher *in vitro* des conditions physiologiques du système gastro-intestinal humain (concentration en enzymes, présence de sels biliaires, pH) tout en limitant les quantités d'enzymes et de substrats utilisés. Nous avons également mis en place la digestion des systèmes dispersés en « bulk » statique dans des quantités plus importantes (centaines de μL) afin de caractériser et de

quantifier les produits de digestion générés. Ces études en conditions proches des conditions physiologiques ont ensuite été corrélées avec les données en monocouche, afin de vérifier la cohérence des résultats obtenus aux deux échelles.

Dans ce contexte, ce manuscrit a été organisé autour de sept chapitres. Le **premier** chapitre de synthèse bibliographique est dédié à la description des principaux assemblages issus du végétal (membranaires et microniques), leur stabilité physicochimique, et leur digestibilité par les enzymes gastro-intestinales humaines. Le **second** chapitre présente les grands principes des techniques expérimentales utilisées dans cette étude, afin d'accéder à une compréhension mécanistique à différentes échelles de la dégradation de ces assemblages par les principales enzymes digestives humaines. Le **troisième** chapitre décrit les résultats de la caractérisation initiale des deux systèmes choisis à différents niveaux structuraux : systèmes lipidiques modèles, systèmes lipidiques naturels reconstitués, et assemblages. Le **quatrième** chapitre présente les résultats obtenus sur l'action mécanistique de la lipase gastrique sur les différents systèmes étudiés, tant sur ces capacités d'adsorption à l'interface, que sur la désorganisation induite par son activité dans des conditions de bulk. Le **cinquième** chapitre est dédié aux résultats obtenus avec les trois enzymes intestinales majeures à différentes échelles. Un **sixième** chapitre est organisé autour d'une discussion générale, regroupant les résultats majeurs de l'étude. Finalement, un **septième** chapitre vient conclure ce manuscrit, et apporte des perspectives à envisager pour compléter ce travail sur la compréhension des mécanismes de digestion des assemblages membranaires végétaux chez l'Homme.

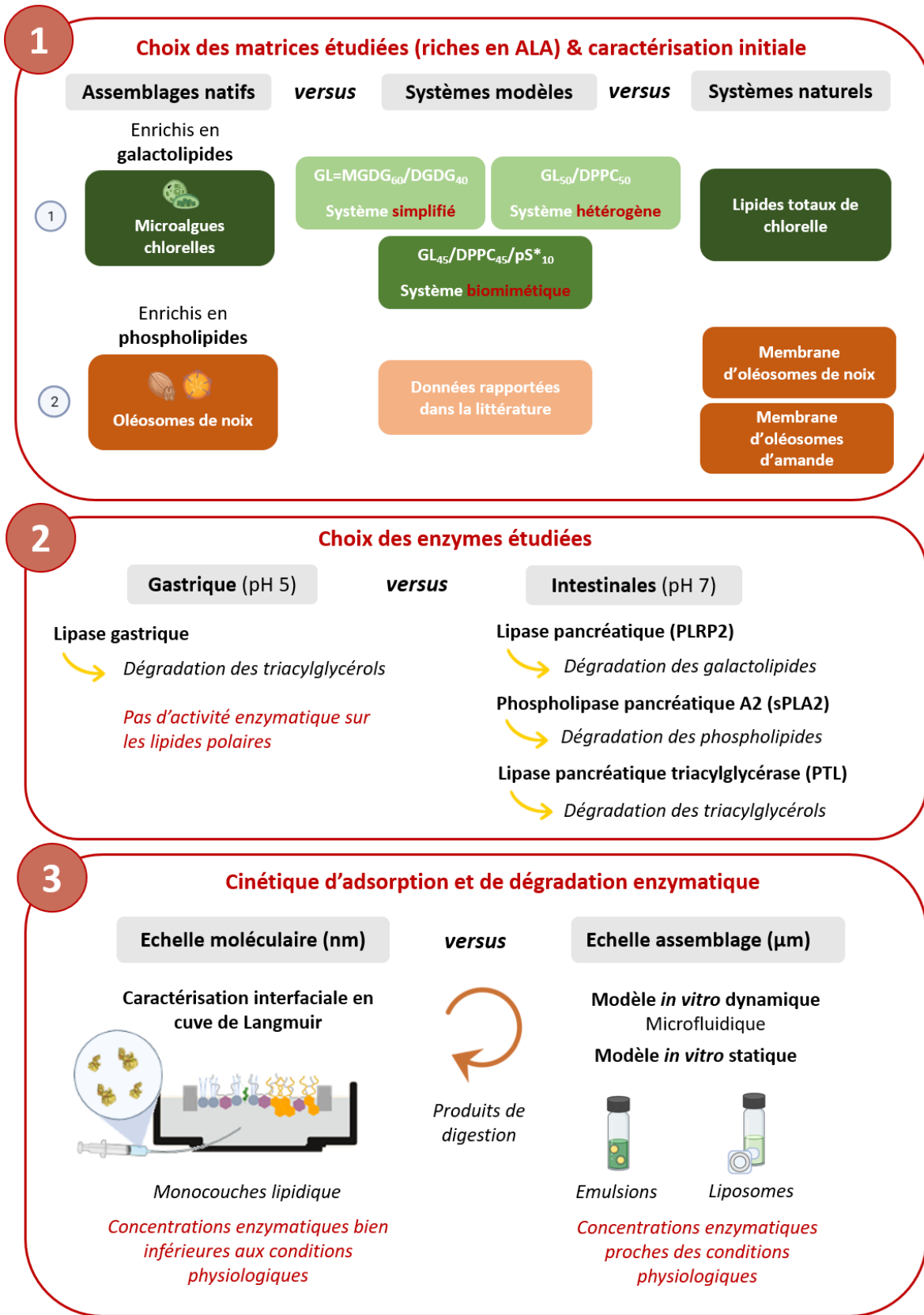


Figure 3 - Stratégie globale.

CHAPITRE 1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Table des matières du chapitre 1

I- Description des principaux assemblages membranaires végétaux	44
I.1. Les membranes plasmiques des cellules végétales	44
I.2. Les membranes de chloroplaste	48
I.3. Oléosomes : assemblage natif et membrane	54
II- Susceptibilité à l'oxydation des lipides polaires végétaux et des assemblages membranaires naturels	59
II.1- Oxydation des lipides polaires végétaux	59
II.1.1- Généralités sur l'oxydation des lipides alimentaires	59
II.1.2- Les facteurs structuraux influant sur la sensibilité à l'oxydation des lipides	62
II.2- Susceptibilité à l'oxydation des assemblages membranaires naturels <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	63
II.2.1- Susceptibilité à l'oxydation des chloroplastes	63
II.2.2- Susceptibilité à l'oxydation des oléosomes	64
II.2.3- Susceptibilité à l'oxydation des lécithines	65
III – Généralités sur la digestion des lipides chez l'Homme	66
III.1 – Physiologie de l'appareil digestif humain	66
III.2 – Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des lipides chez l'Homme	68
III.3 – Influence de l'organisation structurale des substrats et spécificité d'action des enzymes	71
III.3.1 – Importance de la structure supramoléculaire : l'émulsification des lipides	71
III.3.2 – Activation interfaciale des enzymes lipolytiques	72
III.3.3 – Spécificité d'action des enzymes	74
IV - Digestibilité des assemblages végétaux	75
IV.1. Dégradation des thylakoïdes de chloroplastes par les enzymes digestives	75
IV.2. Dégradation des OB par les enzymes digestives	78
V - Impact de l'addition de constituants isolés des assemblages végétaux sur la digestion des TAG	80
V.1. Impact de l'addition de GL isolés sur la digestion des émulsions de TAG	80
V.2. Impact de l'addition de phospholipides sous la forme de lécithines végétales sur la digestion des émulsions de TAG	81
V.3. Impact de l'addition d'oléosines sur la digestion des émulsions de TAG	83

CHAPITRE 1 - Synthèse bibliographique

Ce chapitre est consacré à la description des principaux assemblages membranaires trouvés chez les végétaux, ainsi qu'à leur digestibilité par l'Homme. Cette introduction au comportement des lipides végétaux s'appuie largement sur la revue « Digestibility and oxidative stability of plant lipid assemblies: An underexplored source of potentially bioactive surfactants? », publiée dans le journal **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** en 2021. Afin de faciliter la lecture et la compréhension, certaines parties ont été allégées et/ou complétées.

Ce premier chapitre articulé autour de 5 parties s'intéresse au lien structure-propriétés des membranes végétales, ainsi qu'à leur réactivité chimique, et à leur dégradation par les enzymes digestives humaines. Une première partie sera dédiée à la description structurale et compositionnelle des principaux assemblages membranaires végétaux, que sont la membrane plasmique, les chloroplastes, et les oléosomes. Une deuxième partie sera ensuite consacrée au phénomène d'oxydation des lipides, et s'intéressera en particulier à la susceptibilité à l'oxydation des lipides polaires végétaux et des assemblages membranaires naturels précédemment décrits. Les trois chapitres suivants seront dédiés au comportement gastro-intestinal des molécules, fragments de membranes et assemblages extraits du végétal, ainsi qu'aux effets modulateurs de la digestion chez l'Homme. Plus particulièrement, nous nous intéresserons à la digestibilité des lipides polaires et des assemblages naturels végétaux par les enzymes du tractus gastro-intestinal humain, ainsi qu'à l'impact de l'ajout de molécules lipidiques tensioactives isolées sur la digestion des émulsions de TAG.

I- Description des principaux assemblages membranaires végétaux

I.1. Les membranes plasmiques des cellules végétales

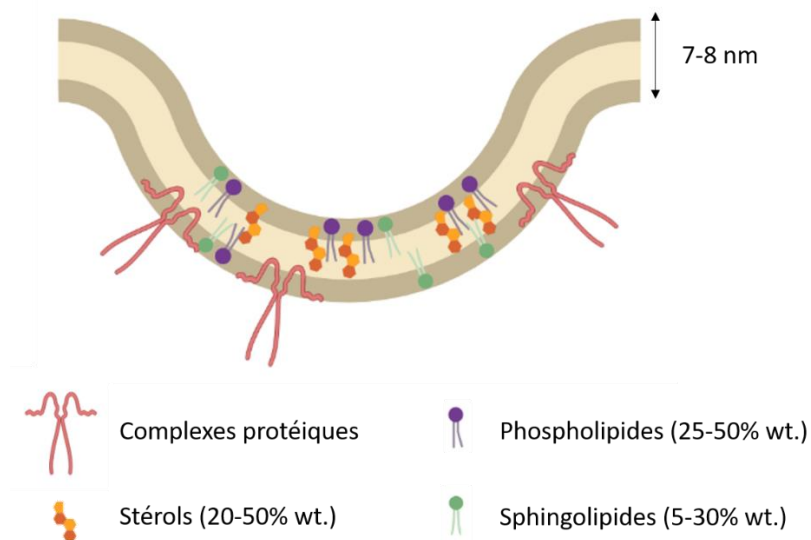


Figure 4 – Structure simplifiée de la membrane plasmique des cellules végétales. La membrane plasmique végétale est composée d'un assemblage de protéines et de lipides spécifiques et définit l'interface entre les cellules et leur environnement. Trois principales classes de lipides sont retrouvées dans cet assemblage : les phospholipides (28-50% wt.), les sphingolipides (23-52% wt.) et les stérols (23-62% wt.), responsables de la structuration de la membrane.

La membrane plasmique est l'une des membranes végétales les plus variées en termes de composition, bien qu'elle ne représente qu'une faible proportion des membranes cellulaires chez les organismes végétaux. Sa structure simplifiée est proposée **Figure 4**. Elle contient des lipides et des protéines dans des proportions qui diffèrent en fonction du type de cellule et de l'espèce végétale considérée (Sandstrom & Cleland, 1989; Uemura et al., 1995; Uemura & Steponkus, 1994). La membrane plasmique définit l'interface entre les cellules et leur environnement. Bien que de nombreuses fonctions cellulaires soient assurées par les protéines, les lipides jouent également un rôle crucial dans la structuration des membranes et la transduction des signaux cellulaires. Trois principales classes de lipides sont retrouvées dans la membrane plasmique des cellules végétales : les phospholipides (28-50% wt.), les sphingolipides (23-52% wt.), et les stérols

(23-62% wt.). La proportion et la longueur des chaînes acyles de ces lipides influencent l'état physique et les propriétés des bicouches lipidiques membranaires (Furt et al., 2011).

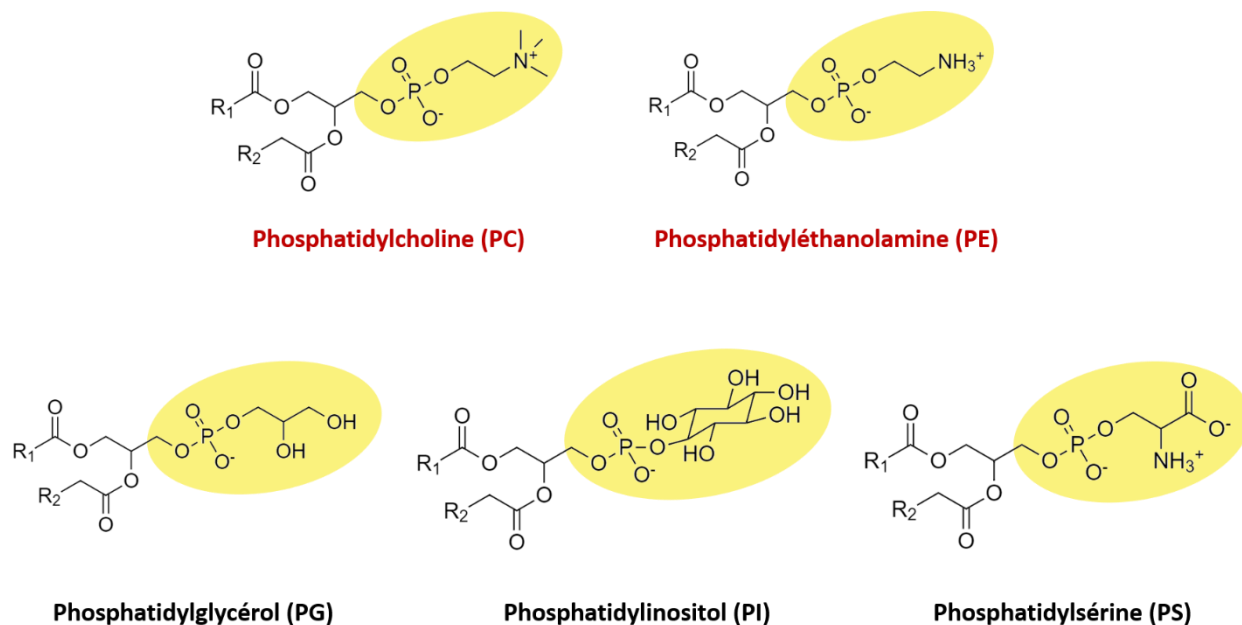


Figure 5 – Structure moléculaire des principaux phospholipides composant la membrane plasmique des cellules végétales. Les phospholipides principaux de la membrane plasmique sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylglycérol (PG), le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (PS). Ces phospholipides sont composés d'un même squelette glycérol relié à deux chaînes d'acide gras et diffèrent par leur tête polaire, identifiée en jaune sur le schéma.

Les phospholipides sont les constituants majeurs des membranes cellulaires, dont l'importance biologique est directement reliée à leurs propriétés amphiphiles. Celles-ci leur permettent de former des barrières perméables et dynamiques de lipides entre les cellules/organelles, et leur environnement. Les phospholipides structuraux qui composent les membranes plasmiques végétales sont principalement la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE), qui représentent 68 à 80% en masse des phospholipides totaux. On trouve également le phosphatidylglycérol (PG), le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (PS), mais dans des proportions moins importantes. Les structures moléculaires des principaux phospholipides

CHAPITRE 1

composant la membrane plasmique des cellules végétales sont présentées **Figure 5**. Ces phospholipides contiennent principalement de l'acide palmitique (C16:0, 18-70% wt.), du LA (C18:2, ω 6, 20-60% wt.), et de l'ALA (C18:3, ω 3, 7-26%) dont les quantités dépendent de la tête polaire considérée (Furt et al., 2011).

La bicouche membranaire des cellules végétales ne présente pas une distribution homogène de lipides et de protéines. Cette hétérogénéité chimique induit une hétérogénéité physique : les membranes plasmiques végétales contiennent en effet une majorité de portions fluides, mais également des « plateformes » lipidiques, appelées rafts membranaires. La structure, la composition, et les fonctions possibles de ces rafts végétaux ont été décrites dans la littérature, mais leur existence est encore discutée, notamment du fait de leur taille nanométrique, qui les rend difficilement observables (Mongrand et al., 2004, 2010; Peskan et al., 2000). Ces « plateformes » sont décrites comme des petits domaines membranaires hétérogènes et dynamiques, de 10 à 100 nm, et insolubles dans les détergents. Elles sont associées avec une proportion élevée de protéines membranaires (5-10% wt.) impliquées dans la signalétique des cellules, similairement aux rafts des membranes cellulaires des mammifères, dont le rôle et l'existence sont aujourd'hui bien établis (Pike, 2006). La formation de domaines membranaires organisés comme les rafts pourrait être induite en partie par les propriétés d'auto-association entre deux types de molécules : les stérols et les sphingolipides, qui induiraient une ségrégation latérale *in vivo* dans les membranes plasmiques et conduiraient à la formation de domaines en phase liquide-organisé (Lo) (Silvius, 2005).

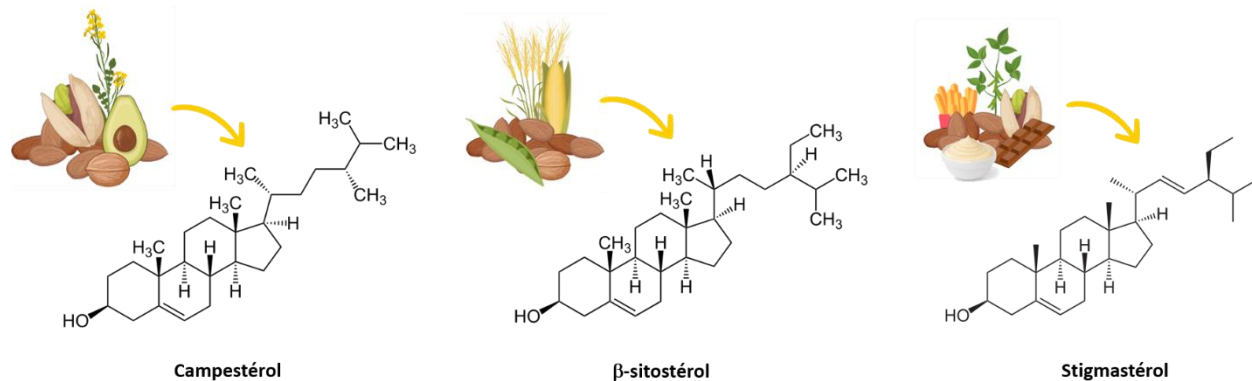


Figure 6 – Sources et structures moléculaires des principaux stérols végétaux. Le campesterol le plus représentatif dans l’amande, la noix, l’avocat, la pistache ou encore le colza. Le β -sitostérol est présent en quantité importante dans l’amande, la noix, le maïs, le blé, et le soja. Le stigmasterol est quant à lui particulièrement présent dans le chocolat noir, la mayonnaise, les frites, la pistache, l’amande et le soja.

Comparées aux membranes cellulaires du royaume animal, les membranes plasmiques végétales présentent une plus grande diversité de sphingolipides et de stérols. Ces derniers sont des composés structuraux essentiels aux membranes, puisqu’ils régulent l’ordre des chaînes acyles des lipides, ainsi que les transitions de phase de la bicouche membranaires en fonction de leur environnement extérieur (Piironen et al., 2000). Les principaux phytostérols des membranes plasmiques végétales, dont les structures moléculaires sont présentées **Figure 6**, sont le campesterol, le β -sitostérol, et le stigmasterol, qui peuvent se trouver sous une forme libre ou conjuguée (Grosjean et al., 2015; Kumar et al., 2017). Plusieurs études sur des systèmes membranaires végétaux modèles ont montré que les stérols conjugués sont présents en quantités importantes dans les rafts végétaux, et seraient des composés clés de leur formation (Borner et al., 2005; Furt et al., 2007). En comparaison avec les rafts animaux, les rafts membranaires végétaux ont été montrés comme plus résistants aux chocs thermiques, suggérant que la structure modifiée des phytostérols par rapport au cholestérol pourrait expliquer l’adaptation des cellules végétales sur de vastes gammes de températures (Beck et al., 2007). Les phytosphingolipides jouent

également un rôle important dans la structuration des membranes plasmiques et sont particulièrement enrichis dans les rafts membranaires. Les principaux sphingolipides végétaux sont les glycosyl inositol phosphoryle céramides (GIPC). Ces phytosphingolipides possèdent un squelette céramide différent de celui de leurs homologues animaux, ainsi qu'une tête polaire complexe pouvant contenir jusqu'à 13 résidus sucres (Pata et al., 2010).

I.2. Les membranes de chloroplaste

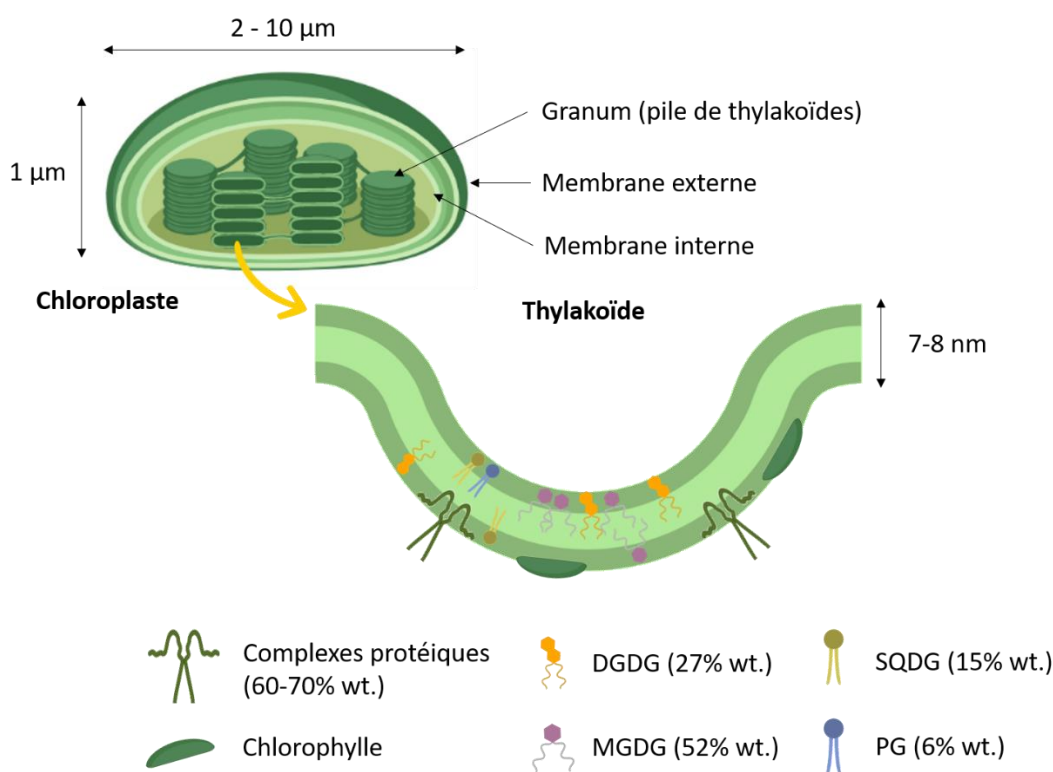


Figure 7 – Structures simplifiées des chloroplastes et de la membrane de thylakoïde. Le chloroplaste possède trois systèmes membranaires : la membrane externe, la membrane interne, et les thylakoïdes (membrane photosynthétique). Les principaux lipides composant la membrane interne et les thylakoïdes sont le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG, 52% wt.), le digalactosyldiacylglycérol (DGDG, 27% wt.), le sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG, 15% wt.) et le phosphatidylglycérol (PG, 6% wt.). Ce quartet de lipides joue un rôle essentiel dans la photosynthèse et les mécanismes de signalisation et de régulation des chloroplastes. Pour des raisons de simplification, les composés phénoliques ne sont pas représentés.

Les chloroplastes sont des organelles aplaties en forme de disque qui mesurent entre 2 et 10 μm de diamètre, et qui sont présentes dans le cytoplasme des cellules photosynthétiques chez les plantes, les microalgues, mais également chez les cyanobactéries (Lyu et al., 2021). Les chloroplastes contiennent des grana, de petites piles cylindriques caractéristiques composées de disques membranaires de 400 nm de diamètre, comprenant entre 5 et 20 couches d'un ensemble membranaire, appelé « thylakoïde » (Pribil et al., 2014). Les structures simplifiées des chloroplastes et des thylakoïdes sont présentées **Figure 7**. Contrairement à l'enveloppe externe des chloroplastes, qui possède une composition typique des « cellules eucaryotes », l'enveloppe interne des chloroplastes et la membrane de thylakoïde ont une composition lipidique similaire. Les thylakoïdes représentent la membrane photosynthétique des chloroplastes et possèdent une architecture fluide, constituée de plus d'une centaine de protéines globulaires (60-70% wt.) dispersées dans une matrice lipidique. Cette matrice lipidique est autoorganisée sous la forme d'une pile de bicouches, composées principalement de phospholipides et de pigments (30-40% wt.). Les principaux pigments sont la chlorophylle, un élément clé de la photosynthèse, ainsi que les caroténoïdes, qui possèdent une action antioxydante (AO), protégeant la chlorophylle et la membrane des chloroplastes contre l'oxydation (Hassan et al., 2017). Divers composés phénoliques sont également présents dans les chloroplastes et les membranes végétales, et contribuent à la défense des plantes contre le stress de l'environnement extérieur. La spécificité des thylakoïdes est leur composition lipidique unique, qui est particulièrement bien préservée chez les plantes supérieures et les cyanobactéries.

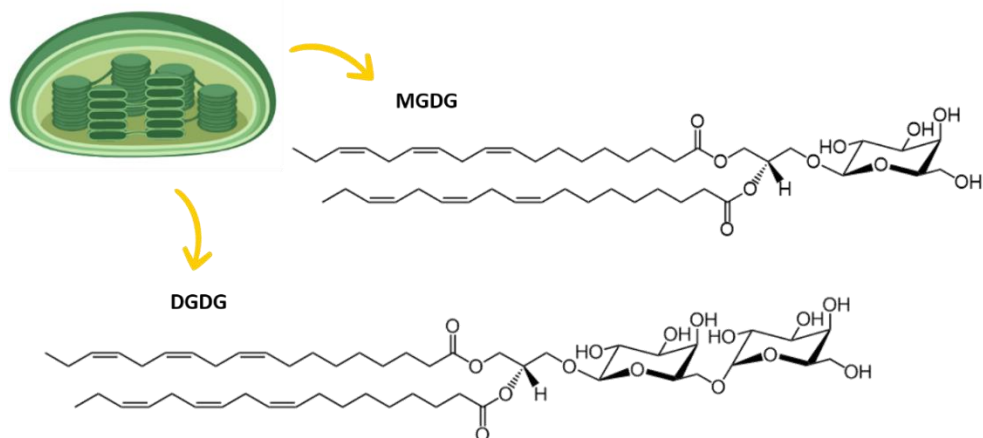
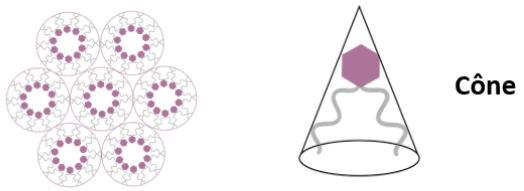
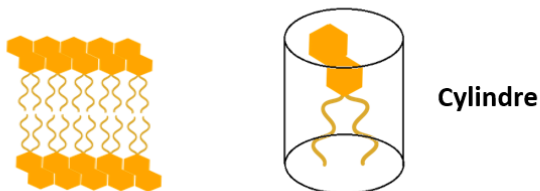
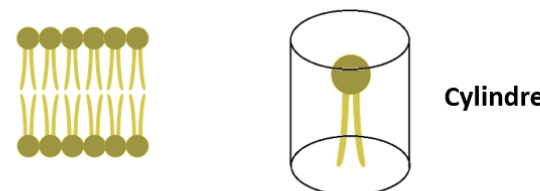
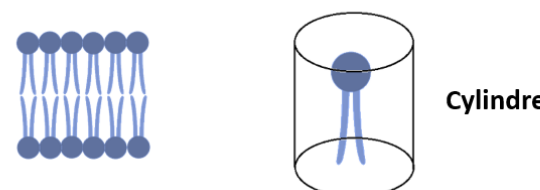


Figure 8 – Formules moléculaires du monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et du digalactosyldiacylglycérol (DGDG), principaux galactolipides des membranes végétales photosynthétiques.

Les thylakoïdes sont en effet composés de lipides spécifiques, les galactolipides, ce qui les différencie des autres membranes biologiques trouvées dans la nature. Le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) (53% wt.) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG) (27% wt.) (**Figure 8**), sont les galactolipides majoritaires des membranes végétales photosynthétiques, et correspondent à 80% wt. des lipides totaux (hors pigments) des thylakoïdes des plantes supérieures et des algues (Gurevich et al., 1997). La fonction et la localisation des MGDG et DGDG sont déterminées par leur structure moléculaire. Le MGDG présente une petite tête polaire 1- β -galactose liée à un diacylglycérol, ce qui lui confère une forme plutôt conique. Le DGDG quant à lui possède une tête polaire plus large, car il présente un résidu α -galactose supplémentaire lié au groupement β -galactose, ce qui lui permet d'adopter une forme cylindrique en solution. En plus de ces deux glycolipides, les thylakoïdes contiennent dans des quantités moindres du sulfoquinovosyldiacylglycérol (SQDG), et du PG, dont les proportions varient en fonction des espèces végétales photosynthétiques.

Tableau 3 – Formes moléculaires et phases polymorphiques du quartet lipidique responsable du comportement général et de l’architecture des thylakoïdes. Le MGDG présente une forme conique et adopte une organisation hexagonale inverse (HII) en solution aqueuse. Les DGDG, SQDG, et PG ont une forme cylindrique et s’organisent en phases lamellaires ($L\alpha$) quel que soit le taux d’hydratation.

Lipide	Phase	Forme moléculaire
MGDG	Hexagonale inverse (HII)	
DGDG	Lamellaire ($L\alpha$)	
SQDG	Lamellaire ($L\alpha$)	
PG	Lamellaire ($L\alpha$)	

Ce quartet de lipides est caractérisé par différents comportements de phase (**Tableau 3**), qui gouvernent le comportement général de la membrane et donc l’architecture des thylakoïdes. En effet, les DGDG, PG et SQDG forment des phases lamellaires ($L\alpha$) quel que soit le taux d’hydratation, ce qui permet la formation de bicouches. Le MGDG, en raison de sa tête polaire relativement petite et de sa forme conique, tend quant à lui à former une structure hexagonale inverse (HII) en solution aqueuse (Jouhet, 2013). Le ratio MGDG/DGDG, le taux d’hydratation et

CHAPITRE 1

le profil lipidique, modulent l'auto-organisation de la bicouche, et en particulier les transitions et les coexistences de phases $L\alpha$ et HII. En particulier, la présence de DGDG a été identifiée comme l'un des principaux facteurs dans l'empilement des membranes par l'établissement de liaisons hydrogènes entre les têtes polaires des bicouches adjacentes, conduisant à un packing dense des bicouches de galactolipides dans les membranes de thylakoïdes. De plus, la régularité entre les couches induites par le DGDG et les forces électrostatiques répulsives induites par la présence des lipides chargés PG et SQDG permettent une répulsion des molécules d'eau (Demé et al., 2014). Les lipides (*e.g.* le SQDG anionique), mais également les protéines photosynthétiques présentes dans la membrane, peuvent fortement moduler le point isoélectrique des thylakoïdes.

Les glycolipides des membranes végétales photosynthétiques sont particulièrement riches en acides gras à 16 ou 18 carbones, et en particulier en AGPI, comme l'acide hexadécatriénoïque (HTA, C16:3, ω 3), ou l'ALA (C18:3, ω 3). Une différence de composition en acides gras (AG) des galactolipides existe entre les voies biosynthétiques dites « eucaryotique » et « procaryotique ». En effet, la distribution des AG C18 et C16 sur le squelette glycérol dépend du site de synthèse (*i.e.* chloroplaste ou réticulum endoplasmique) des précurseurs diacyles des galactolipides. Les MGDG et DGDG synthétisés *via* la voie procaryote (*i.e.* synthèse dans les chloroplastes) ont principalement une composition C18:3/16:3 et C18:3/C16:0, respectivement (une composition retrouvée abondamment dans les épinards par exemple). Les MGDG et DGDG synthétisés par la voie eucaryote (*i.e.* synthèse dans le réticulum endoplasmique) sont quant à eux principalement trouvés avec une composition C18:3/C18:3 (Browse & Somerville, 1991; Frentzen et al., 1983). Les voies de synthèse des galactolipides, en particulier des MGDG et DGDG, sont décrites plus en détails dans une revue récente de Sahaka et al. (2020).

Tableau 4 - Composition en AG principaux des MGDG et DGDG issus de différentes sources photosynthétiques. La spiruline (ici *Arthrospira platensis*) est la cyanobactérie la plus connue (algues bleues-vertes) dans les applications d'ingrédients fonctionnels. Elle est particulièrement enrichie en C16:0 et en C18:3 ω3. La *Subterraneus* provient de la biomasse microalgale et peut être utilisée pour la consommation humaine. Elle a la particularité d'être enrichie en EPA. Chez l'*Arabidopsis*, le MGDG est riche en ALA et en acide hexadécatriénoïque (HTA, C16:3 ω3) tandis que le DGDG est principalement enrichi en ALA. Les feuilles d'épinard présentent quant à elles un profil particulièrement riche en ALA chez le MGDG et le DGDG. (Lyu et al., 2021)

		Proportion des principaux AG (%)						
		C16:0 (PA)	C16:3 (HTA, w3)	C18:1 (OA, w9)	C18:2 (LA, w6)	C18:3 (ALA, w3)	C20:4 (ARA, w3)	C20:5 (EPA, w3)
<i>Spiruline</i>	MGDG	42.0	5.3	1.7	9.3	30.9	ND	ND
<i>Arthrospira platensis</i>	DGDG	40.4	5.9	1.0	11.0	29.7	ND	ND
<i>Microalgae</i>	MGDG	12.2	22.2	2.5	1.1	0.5	4.0	49
<i>Subterraneus</i>	DGDG	24.5	51.4	5.7	1.0	0.7	0.5	11.3
<i>Arabidopsis</i>	MGDG	1.0	33.5	0.5	2.5	60.3	ND	ND
	DGDG	10.0	2.5	1.0	4.6	80.3	ND	ND
<i>Epinards</i>	MGDG	5.3	11.6	1.5	3.6	49.0	ND	ND
	DGDG	11.4	2.9	0.9	3.6	77.5	ND	ND

Les propriétés physicochimiques, mais également les fonctions biologiques des galactolipides, sont étroitement liées à leur composition en AG et leurs positions sur le squelette glycérol. Certains extraits comestibles d'algues, de mousses, et de plantes, ont montré des propriétés biologiques intéressantes et encourageantes pour le développement d'ingrédients fonctionnels, comme une activité antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire, antioxydante, anticancéreuse, et antivirale (de Souza et al., 2012; Ibrahim, 2019; Maeda et al., 2011; J. Zhang et al., 2013). Dans le **Tableau 4** sont résumées les compositions en AG de MGDG et DGDG issus de différentes matrices photosynthétiques.

La membrane externe des chloroplastes, contrairement à la membrane interne et aux thylakoïdes, est appauvrie en MGDG, mais contient d'autres phospholipides (PC, PE, PS, PI...) en plus du PG. Elle est ainsi bien plus proche des membranes plasmiques ou des organelles non-photosynthétiques en termes de fonctions et de composition.

I.3. Oléosomes : assemblage natif et membrane

Dans les graines, les noix, et certains autres tissus végétaux, les lipides peuvent être trouvés sous la forme d'assemblages lipoprotéiques appelés oléosomes ou « corps huileux » (en anglais, « oil bodies », OB). Ces assemblages mesurent entre 500 nm et 2,5 µm de diamètre (Frandsen et al., 2001), selon les conditions de croissance des végétaux, mais également les facteurs environnementaux. La structure simplifiée des OB est proposée **Figure 9**.

Ces OB sont considérés comme des ingrédients prometteurs pour la formulation d'aliments fonctionnels, comme cela a récemment été souligné par Abdullah et al. (2020). Dans la nature, la principale fonction physiologique de ces entités est le stockage d'énergie sous la forme de TAG, mais elles sont également impliquées dans de nombreux processus cellulaires, comme le transport lipidique, la synthèse de membrane, ou encore le stockage et la dégradation des protéines (Khor et al., 2013; Walther & Farese, 2012).

Représentant jusqu'à 75% du volume des graines, en particulier chez les oléagineux et protéagineux, les OB sont composés d'un cœur de TAG (94-98% wt.), recouvert par une monocouche membranaire de protéines (0,6-3% wt.) et de phospholipides (0,6-2% wt.) (Nikiforidis et al., 2014). Cette membrane permet de protéger les OB du stress chimique ou mécanique. Elle est composée de protéines particulièrement amphiphiles, principalement des oléosines, qui confèrent

des propriétés émulsifiantes aux OB et leur permettent d'être localisés spontanément aux interfaces air/eau ou huile/eau (A. H. C. Huang, 1992).

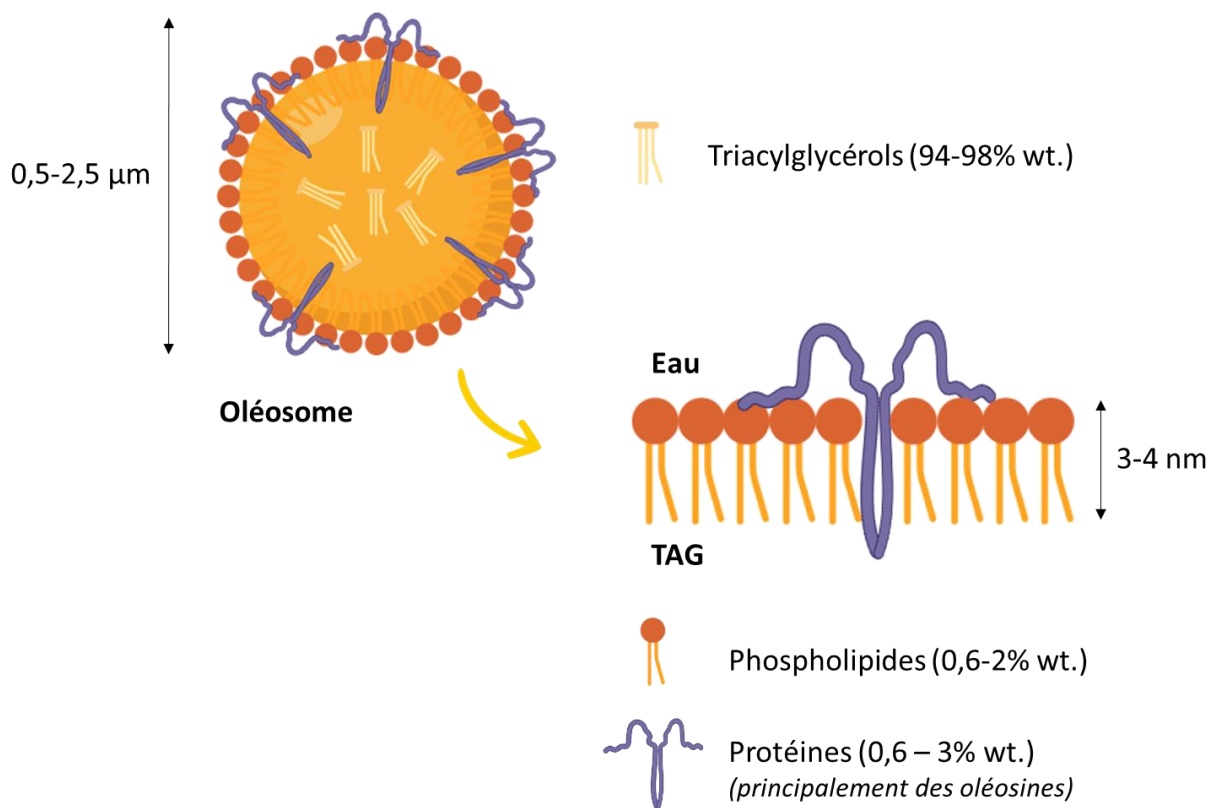


Figure 9 - Description schématique des oléosomes.

Les oléosines sont des protéines alcalines de taille variant entre 15 et 26 kDa en fonction du types de graine et d'isoforme (Tzen et al., 1990). Les oléosines possèdent des domaines N- et C-terminaux hydrophiles, qui recouvrent la surface des OB grâce à leur orientation présumée horizontale. Ces domaines terminaux encadrent un domaine central fortement hydrophobe, composé de 72 résidus ininterrompus non-chargés. Ce domaine adopte une configuration secondaire en « épingle à cheveux », composée de deux branches de 30 résidus, chacune pénétrant dans le cœur de TAG hydrophobe des OB (Huang, 1992). Un schéma représentatif de la structure et de l'organisation des oléosines à la surface des OB est présenté en **Figure 10**. Les structures

tertiaire et quaternaire du domaine central hydrophobe demeurent néanmoins inconnues, la configuration native des oléosines n'étant pas conservée lors de leur extraction/purification (C.-Y. Huang & Huang, 2017; M. Li et al., 2002; Vindigni et al., 2013).

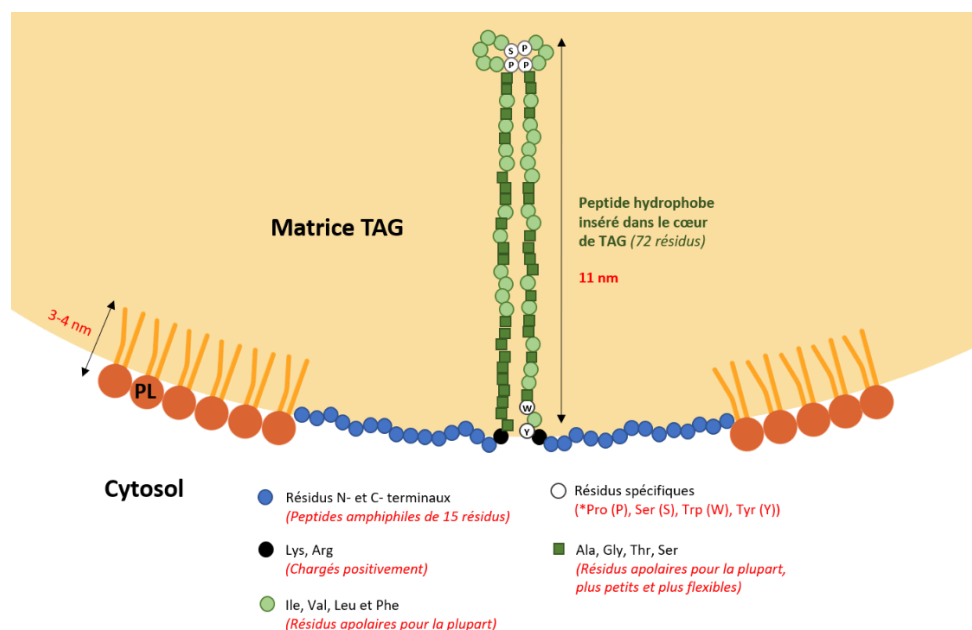


Figure 10 - Schéma simplifié de la structure des oléosines, adapté du modèle proposé par Huang et Huang (2015).

La structure présumée en « épingle à cheveux » s'étendrait sur une longueur de 5 à 6 nm. Les analyses réalisées sur 1000 formes d'oléosines extraites de diverses plantes et algues vertes n'ont pas révélé d'exceptions à cette séquence correspondante $X_{30}PX_5SPX_3PX_{30}$ (avec X représentant un large résidu non-polaire dans les séquences X_5 et X_3 et un résidu hydrophobe dans la séquence X_{30}) (Huang & Huang, 2015). Un gène transcrit codant pour une protéine de type oléosine a été observé chez deux espèces d'algues vertes modernes primitives, la *Chlamydomonas* et la *Volvox*. Cette protéine pourrait être le précurseur de l'oléosine, qui aurait évolué chez l'algue verte pour donner naissance aux oléosines universelles, dont les gènes sont présents dans toutes les espèces végétales évoluées aujourd'hui. Malgré les évolutions et diversifications à travers le temps,

les oléosines spécialisées actuelles conservent le domaine hydrophobe central en « épingle à cheveux ».

Le point isoélectrique des oléosines d'OB déterminé sur sept espèces par focalisation isoélectrique a indiqué une plage de valeurs comprises entre 5,7 et 6,6 (colza 6,5, moutarde 5,7, coton 6,3, lin 6,0, maïs 6,3, arachides 6,6, sésame 6,4) (Tzen et al., 1993). Ce pI acide contribue à la stabilité des OB en apportant des charges négatives à la membrane à pH physiologique, ce qui conduit à une répulsion électrostatique et à une gêne stérique entre les objets, prévenant ainsi des phénomènes d'agrégation et de coalescence. En fonction de la composition en protéines et en phospholipides, qui varie selon le type de graine, on observe une augmentation de la taille globale des OB lorsque ces ratios diminuent. La taille et la composition massique d'OB isolés de différentes graines sont renseignés **Tableau 5**.

Tableau 5 - Taille (μm) et composition (pourcentage massique) d'OB isolés de différentes graines.

Graine	Colza	Lin	Moutarde	Maïs	Arachide	Sésame	Soja	Tournesol
Diamètre (μm)	0.6 ^a	1.3 ^a	0.7 ^a	1.4 ^a	2.0 ^a	2.0 ^a	0.4 ^b	1.0-2.0 ^d
Lipides neutres [% wt.]	94.2 ^a	97.6 ^a	94.6 ^a	97.6 ^a	98.2 ^a	97.4 ^a	85.9 ^c	96.0 ^d
Protéines [% wt.]	3.5 ^a	1.3 ^a	3.2 ^a	1.4 ^a	0.9 ^a	0.6 ^a	8.2 ^c	(/)
PL [% wt.]	2.0 ^a	0.9 ^a	1.6 ^a	0.9 ^a	0.8 ^a	0.6 ^a	5.8 ^c	2.5 ^d
AGL [% wt.]	0.4 ^a	0.1 ^a	0.2 ^a	0.1 ^a	0.1 ^a	0.1 ^a	(/)	(/)

^aJTC. Tzen et al. (1993)

^bY. Chen & Ono (2010)

^cY. Chen et al. (2014)

^dMillichip et al. (1996)

De nombreuses études se sont intéressées à la composition lipidique de différents oléagineux, mais peu de données sont disponibles concernant la caractérisation chimique des OB

CHAPITRE 1

de ces graines, leur composition étant légèrement différente. Le profil en acide gras des lipides polaires des OB est généralement enrichi en acides gras insaturés, en comparaison avec le profil des TAG, mais garde le même modèle en termes d'AGPI prédominants. Les classes de phospholipides présentes chez les OB incluent cinq types : PC, PE, PI, PG et PS. La PC est le PL majoritaire, représentant entre 40 et 65% wt. des PL totaux. Les PE et PI sont ensuite trouvés à 5-15% wt. des PL totaux. La PE est un élément fonctionnel important en raison de sa petite tête polaire qui favorise la courbure des membranes (Millichip et al., 1996). La distribution des phospholipides dans différentes espèces d'oléagineux est renseignée **Tableau 6**.

Tableau 6 - Composition en phospholipides (pourcentage massique) d'OB isolés de différentes graines.

Phospholipides	Colza	Lin	Moutarde	Maïs	Arachide	Sésame	Tournesol	Soja
PC	59.9 ^a	57.2 ^a	53.1 ^a	64.1 ^a	61.6 ^a 60.8 ^b	41.2 ^a	81.0 ^c	58.0 ^d
PE	5.9 ^a	2.8 ^a	15.5 ^a	8.1 ^a	5.0 ^a 5.1 ^b	15.8 ^a	13.0 ^c	15.0 ^d
PI	14.0 ^a	6.9 ^a	13.1 ^a	7.6 ^a	8.4 ^a 8.6 ^b	20.9 ^a	5.0 ^c	14.0 ^d
PG	(/)	(/)	(/)	(/)	(/)	(/)	(/)	(/)
PS	20.2 ^a	33.1 ^a	18.3 ^a	20.2 ^a	25.0 ^a 25.5 ^b	22.1 ^a	(/)	(/)

^aJTC. Tzen et al. (1993)

^bZhou et al. (2019)

^cMillichip et al. (1996)

^dSimpson & Nakamura (1989)

L'extraction des OB à partir des graines par voie aqueuse résulte en un produit naturellement émulsifié, avec une stabilité supérieure à celle des émulsions préparées avec des surfactants comme le Tween 20, ou des protéines comme les caséinates ou le lactosérum (WPI) (Ding et al., 2020). Le protocole d'extraction des OB à partir des graines est proposé en **Annexe II** du manuscrit. La stabilité naturelle des OB (Kergomard et al., 2021) a soulevé l'intérêt de leur utilisation dans des

domaines variés, allant de l'industrie alimentaire à la cosmétique, ou encore à l'industrie pharmaceutique (Deckers, 2002; Moloney et al., 2012), ce qui explique leur utilisation répandue dans la préparation d'émulsions alimentaires comme la crème, la vinaigrette ou les liqueurs (Nikiforidis, 2019).

II- Susceptibilité à l'oxydation des lipides polaires végétaux et des assemblages membranaires naturels

II.1- Oxydation des lipides polaires végétaux

De par leur profil nutritionnel, les lipides végétaux représentent des candidats d'intérêt dans le développement de nouveaux ingrédients permettant la diversification des régimes. Néanmoins, leur forte teneur en AGPI les rend particulièrement sensibles à l'oxydation, un phénomène responsable de la dégradation organoleptique et nutritionnelle des aliments. Afin de protéger la stabilité des matrices alimentaires végétales et de conserver leurs propriétés de vectorisation d'AGPI ω 3, il est donc capital de comprendre les facteurs de risques responsables de l'oxydation lipidique.

II.1.1- Généralités sur l'oxydation des lipides alimentaires

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Species) sont générées dans les membranes cellulaires *in vivo* et sont responsables de la dégradation de nombreux composés cellulaires, dont les lipides, les protéines et les espèces pro-oxydantes ou antioxydantes (comme la chlorophylle, les caroténoïdes et les composés phénoliques). Le traitement thermique, l'exposition à la lumière ou encore la présence de métaux sont autant de facteurs qui peuvent jouer un rôle catalytique dans le déclenchement de l'oxydation lipidique *in vivo*, mais également dans les matrices alimentaires au cours de leur stockage (Waraho et al., 2011). Un schéma exhaustif est

CHAPITRE 1

proposé **Figure 11** pour illustrer les principaux facteurs influant sur la stabilité chimique des émulsions alimentaires.

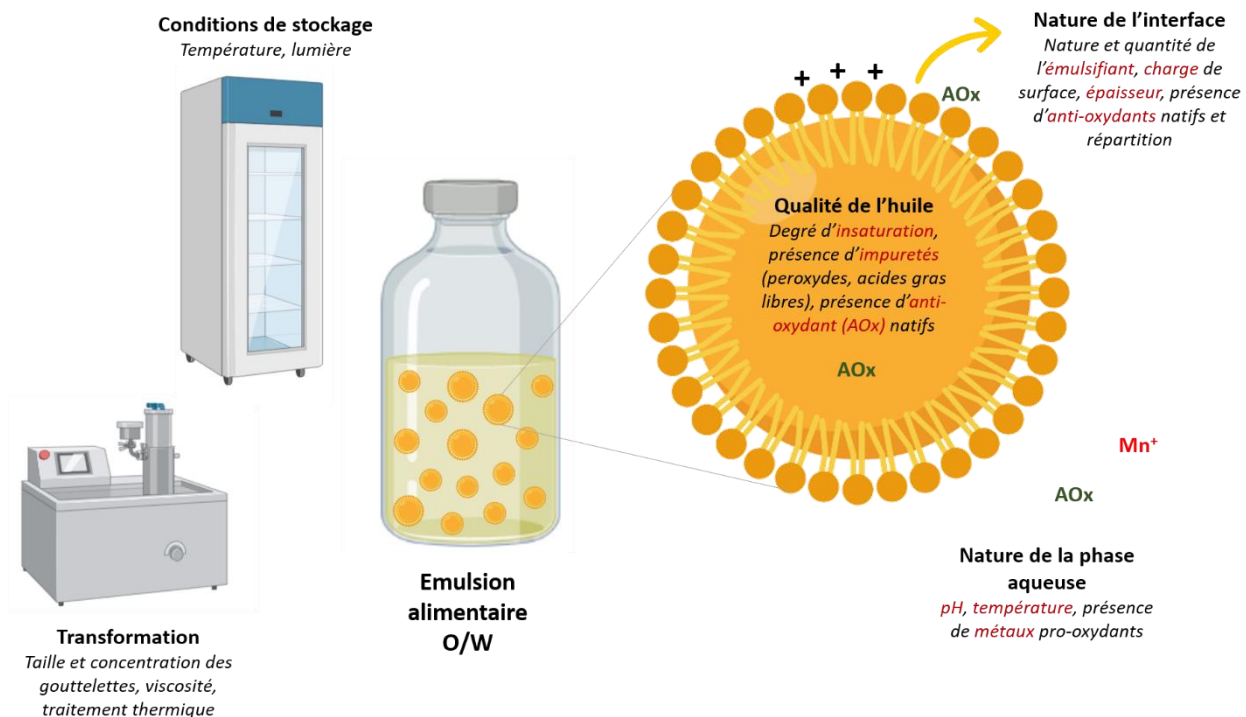


Figure 11 - Principaux facteurs impactant la stabilité oxydative des émulsions alimentaires.

L'oxydation des lipides est un phénomène dont les principaux mécanismes, cinétiques et facteurs de variation sont aujourd'hui bien connus. Cette réaction radicalaire en chaîne affecte les acides gras insaturés présents dans l'huile, la matière grasse ou au niveau des lipides structuraux *in vivo* ou *in vitro*, et est généralement schématisée sous la forme des trois principales étapes décrites **Figure 12**. (i) La première étape d'initiation conduit à la formation d'un premier radical alkyle, par l'abstraction d'un atome d'hydrogène par le ROS sur un groupe méthylène positionné entre deux insaturations (position dite bis-allylique) ou adjacent à une insaturation (atome d'hydrogène allylique). Cette abstraction de l'atome d'hydrogène constitue donc l'étape limitante de la réaction, étant donné que cette dernière nécessite la disponibilité d'un hydrogène, ce qui est uniquement le

cas en présence d'un lipide présentant une ou plusieurs chaînes insaturées. Cela explique la susceptibilité des AGPI à l'oxydation, dont la stabilité est inversement proportionnelle au nombre d'insaturation(s) présente(s) sur les chaînes acyles. (ii) Au cours de la deuxième étape de propagation, le radical alkyle formé au cours de l'étape d'initiation réagit avec un l'oxygène moléculaire, conduisant à la formation d'un radical peroxyde, qui va à son tour réagir avec un autre acide gras insaturé pour former un hydroxyperoxyde. Ce dernier, composé primaire d'oxydation, est particulièrement instable et peut être converti en composé secondaire d'oxydation. (iii) Enfin, l'étape finale de terminaison stoppe la chaîne réactionnelle lorsque deux produits radicaux réagissent entre eux pour former un produit non-radicalaire.

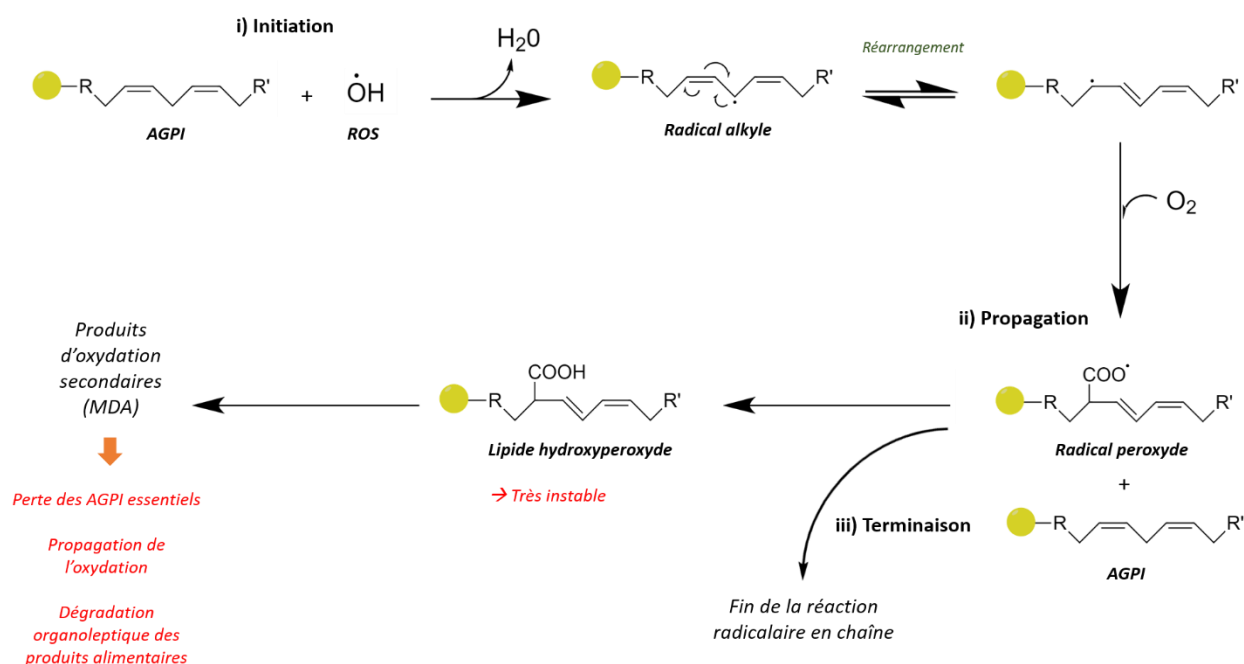


Figure 12 - Peroxydation des lipides par les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

L'oxydation des lipides est un phénomène que l'on cherche à éviter étant donné qu'il est responsable (1) de la perte irréversible des AGPI essentiels, (2) de réactions prématurées qui favorisent la propagation accélérée de l'oxydation, et (3) de la dégradation organoleptique des

produits alimentaires, à travers la formation de produits d'oxydation secondaire. Ces produits parfois toxiques peuvent entrer dans la circulation sanguine par l'alimentation et être absorbés dans les tissus corporels, conduisant au développement de cancers, d'athérosclérose et de maladies inflammatoires (Berton-Carabin et al., 2014; Decker et al., 2017).

II.1.2- Les facteurs structuraux influant sur la sensibilité à l'oxydation des lipides

La sensibilité des lipides à l'oxydation augmente avec le niveau d'insaturation, qu'ils se présentent sous la forme d'un milieu lipidique homogène (huile), d'un système biphasique (émulsion o/w), ou d'une dispersion (liposomes en phase aqueuse). Néanmoins, de nombreuses exceptions à cette simple règle peuvent être observées en fonction de la structure chimique du lipide contenant l'insaturation (acide gras, TAG, phospholipides), son état physique et son environnement (présence d'ions métalliques pro-oxydants, état initial d'oxydation, degré initial d'hydrolyse, présence d'autres anti-oxydants, coefficient de répartition dans les émulsions o/w et proximité de l'interface, etc.) (Berton-Carabin et al., 2014; Decker et al., 2017). A un niveau d'insaturation et dans un environnement donnés, la susceptibilité à l'oxydation d'une molécule de lipide dépend principalement de l'énergie de liaison dissociante (DBE) nécessaire pour rompre la liaison carbone-hydrogène d'un atome d'hydrogène bis-allylique ou allylique. En effet, plus la DBE est faible, plus l'oxydation de la molécule est rapide. Néanmoins, l'accès à cette donnée pour les galactolipides n'est pas simple, en comparaison avec les phospholipides ou les TAG, mais peut être déduite de données bibliographiques obtenues sur des molécules ayant des chaînes acyles similaires.

Au sein des phospholipides, la PE, qui est souvent la plus insaturée, est la plus rapidement dégradée. A l'inverse, la PC est la plus résistante. La stabilité oxydative des galactolipides est moins documentée, bien que leur composition en AGPI les rend potentiellement très sensibles à l'oxydation (Hazahari et al., 2018; Yamauchi et al., 1983). La réactivité des galactolipides, des

phospholipides et des TAG a été comparée en utilisant des sources de différents degrés d'insaturations et elle tend à indiquer une stabilité plus importante des galactolipides comparé aux phospholipides, qui sont eux-mêmes plus stables que les TAG. Dans ces expériences, l'impact des espèces pro-oxydantes (PO) ou AO est limité par le fait que les extraits ont été purifiés, mais les différences d'état physique des molécules peuvent également moduler la réactivité à l'oxydation. L'état physique (solide/liquide) des TAG, des phospholipides ou des galactolipides (packing hexagonal dans les micelles/liquide condensé, liquide expansé ou gel dans les bicouches) détermine les distributions de phase et les concentrations locales en substrats.

II.2- Susceptibilité à l'oxydation des assemblages membranaires naturels *in vitro* et *in vivo*

Dans le règne végétal, des systèmes de défense des membranes sont mis en place pour contrôler la concentration en ROS et ainsi protéger les cellules. Les plantes possèdent différents types d'AO, mais également des enzymes innées qui sont capables de neutraliser les ROS ou de régénérer les formes actives des espèces AO. Ceci explique pourquoi une stabilité chimique à l'oxydation relative est observée dans les différentes formes natives des assemblages membranaires végétaux.

II.2.1-Susceptibilité à l'oxydation des chloroplastes

Les galactolipides de thylakoïdes sont continuellement exposés au stress oxydatif en raison de leur niveau élevé en AGPI ainsi que leur exposition prolongée à la lumière pendant la photosynthèse (Yamaguchi et al., 2012). Les galactolipides pourraient donc présenter des mécanismes de réponse au stress oxydatif différents par rapports aux autres classes de lipides comme les phospholipides ou les TAG.

CHAPITRE 1

La composition en molécules AO variées dans différents extraits d'épinard a récemment été montrée (St-Pierre et al., 2019). Les extraits de thylakoïdes contiennent en effet des composés phénoliques (flavonoïdes, tannin) ainsi que des pigments (chlorophylle et caroténoïdes), qui confèrent des capacités AO durables aux chloroplastes. En plus de ces nombreuses molécules AO, les thylakoïdes d'épinard contiennent également des enzymes AO, qui régulent le niveau des radicaux en éliminant les anions superoxydes, et dont l'activité n'est pas affectée par le stockage. L'activité enzymatique et les composés structuraux des thylakoïdes semblent être responsables de l'activité AO des chloroplastes dans leur forme native *in-situ*.

Les MGDG et DGDG contiennent tous les deux une tête polaire sucre hydrophile et des queues hydrophobes, de telle façon qu'ils peuvent rester à l'interface entre les phases huile et aqueuse. Avec leur activité AO, les MGDG et DGDG seraient des candidats parfaits comme émulsifiants, qui pourraient être utilisés dans des applications alimentaires mais également médicales. Le DGDG a montré une meilleure activité AO comparé au MGDG, de par leur propension à former de structures lamellaires $L\alpha$ (Hazahari et al., 2018).

II.2.2- Susceptibilité à l'oxydation des oléosomes

En plus de leur stabilité physique significative, les OB montrent une stabilité chimique à l'oxydation relativement importante au cours de leur stockage, malgré la présence d'une quantité significative d'acides gras insaturés dans la majorité des oléagineux (B. Chen et al., 2012; Gray et al., 2010; Kapchie et al., 2013; Nikiforidis et al., 2013). La présence de protéines endogènes (oléosines, caléosines, stéréosines, ...) dans la membrane mixtes phospholipides/protéines entourant le cœur de TAG, mais également de protéines de stockage exogènes dans la phase continue des jus dérivés de noix par exemple, explique partiellement cette stabilité (Nikiforidis et al., 2014). En plus des protéines et des lipides, les OB constituent également une source riche de




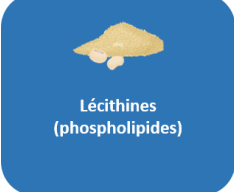
composés AO bioactifs, comme les tocophérols et les phytostérols, qui ont été montrés comme étant associés à la surface des objets. En effet, la présence d'une quantité importante de tocophérols et de composés phénoliques AO a été trouvée dans plusieurs types d'oléagineux, permettant une protection efficace des AGPI contre l'oxydation et contribuant ainsi à la stabilité oxydative in vivo des graines (Fisk et al., 2006).

II.2.3- Susceptibilité à l'oxydation des lécithines

En plus de leurs propriétés biologiques et biochimiques multiples mentionnées plus haut, les lécithines végétales ont montré des propriétés AO quelle que soit la source, leur activité étant partiellement attribuée à leur concentration importante en phospholipides. En effet, les phospholipides possèdent des propriétés AO variées, dont les mécanismes ont été clairement détaillés dans la littérature (Cui & Decker, 2016; Reis & Spickett, 2012). En particulier, les phospholipides ont un rôle AO de chélation des espèces métalliques PO, et sont capables de régénérer les espèces d'AO primaires. De plus, des études scientifiques ont montré que la présence de phénols dans les lécithines végétales, en synergie avec les phospholipides, augmentait les capacités AO des lécithines (Judde et al., 2003; J. Li & Guo, 2016). L'hypothèse avancée pour expliquer cette synergie est que les phospholipides pourraient faciliter le transfert d'un hydrogène ou d'un électron vers les tocophérols et donc faciliter leur régénération. Néanmoins, comme pour les OB, les capacités AO des lécithines dépendent fortement de la qualité et de la structure des matrices alimentaires, et peuvent donc être altérées par les processus de transformation.

Les principales données et hypothèses déterminant la stabilité des lipides polaires à l'oxydation dans les assemblages végétaux précédemment décrits sont résumées **Tableau 7**.

Tableau 7 - Principales données et hypothèses déterminant la stabilité oxydative des lipides polaires et des assemblages végétaux : chloroplastes, oléosomes et lécithines.

	Stress oxydant	Stabilité moléculaire à l'oxydation	Répartition dans les systèmes o/w	Composés et effets AO	Références
 <p>Chloroplastes (galactolipides)</p>	Concentration importante en AGPI Exposition prolongée à la lumière (photosynthèse) 	Galactolipides > phospholipides > TAG DGDG > MGDG	Interface	Galactolipides → Effet AO potentiel des DGDG en phase L α Composés phénoliques, pigments, enzymes AO → Elimination des anions superoxydes	Hazahari et al. (2018); Yamaguchi et al. (2012)
 <p>Oléosomes (phospholipides et oléosines)</p>	Concentration importante en AGPI Procédés de transformation des matrices alimentaires, stockage (altération de la membrane)	Phospholipides >TAG OB natifs > émulsions artificielles reconstituée avec le même cœur de TAG	Interface	Protéines endogènes et exogènes → Stabilisation physique Tocophérols, phytostérols → Stabilisation oxydative <i>in vivo</i>	Gray et al. (2010); Fisk et al. (2008)
 <p>Lécithines (phospholipides)</p>	Concentration importante en AGPI Qualité et structure des matrices alimentaires	Phospholipides >TAG PC>PE	Interface	Phospholipides → Chélation des métaux Tocophérols → Régénération des phospholipides (transfert d'hydrogène ou e- vers les tocophérols)	Hildebrand et al. (1984) ; Judde et al. (2003) ; Cui & Decker (2016)

III – Généralités sur la digestion des lipides chez l'Homme

III.1 – Physiologie de l'appareil digestif humain

Le corps humain est capable de digérer et d'adsorber plus de 95% de l'apport lipidique provenant de l'alimentation. Le système digestif humain se présente sous la forme d'un ensemble complexe d'organes et de glandes, qui agissent en synergie pour permettre la digestion et l'absorption subséquentes des macro- et micro-nutriments par l'organisme (**Figure 13**).

La digestion des lipides débute dès l'ingestion dans la cavité orale, avec la mastication et la présence des sécrétions salivaires, qui permettent une première déstructuration du bol alimentaire. Ce dernier va ensuite transiter par les nombreux organes composant le tube digestif, que sont l'estomac, le pancréas, le foie, la vésicule biliaire, l'intestin grêle et enfin le côlon. L'intestin grêle est l'organe qui relie l'estomac au côlon. Il s'étend sur plus de deux mètres et est divisé en trois parties successives : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. C'est au niveau du

duodénum que se déroule l'essentiel de l'hydrolyse des lipides par les enzymes digestives, conduisant à la production de micelles mixtes hydrosolubles composées de produits de digestion et de sels biliaires. Le duodénum est ensuite suivi du jéjunum, site préférentiel de l'absorption des lipides, dans lequel les produits de digestion (acides gras, les monoglycérides, ou encore lysolécithines) rentrent dans les entérocytes avant d'être réestérifiés sous la forme de chylomicrons, transportés ensuite de l'intestin grêle vers les tissus adipeux via la circulation sanguine. Le foie est quant à lui responsable de la production des sels biliaires composant la bile, qui sont ensuite stockés dans la vésicule biliaire et jouent un rôle clé dans l'action des enzymes responsables de la digestion des lipides.

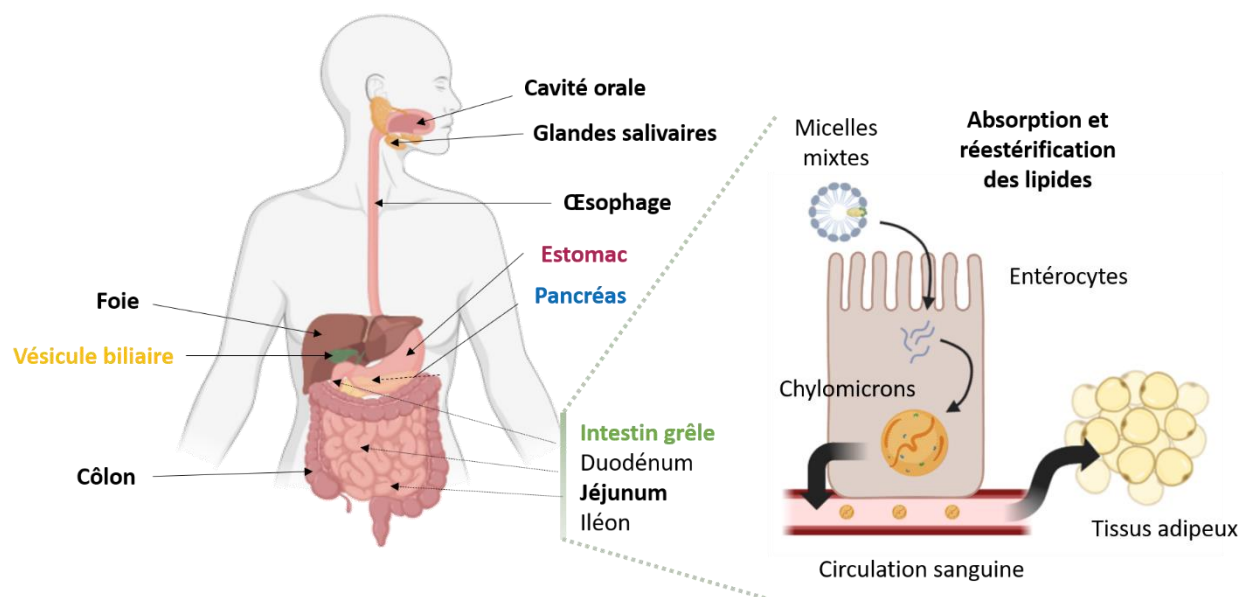


Figure 13 – Schéma simplifié du tractus digestif humain et des processus d'absorption et de réestérification des acides gras dans les chylomicrons avant transport vers les tissus adipeux *via* la circulation sanguine.

Les lipides digérés puis absorbés dans l'intestin grêle et le côlon sont ensuite en partie transformés en énergie afin de répondre aux besoins énergétiques de l'organisme (β -oxydation mitochondriale), tandis que le surplus sera stocké dans le tissu adipeux. La plus importante partie de la digestion des

lipides se déroulant dans la lumière du tractus gastro-intestinal, nous nous sommes particulièrement focalisés sur l'activité enzymatique présente au sein de cette partie du tube digestif durant notre étude.

III.2 – Les enzymes impliquées dans l'hydrolyse des lipides chez l'Homme

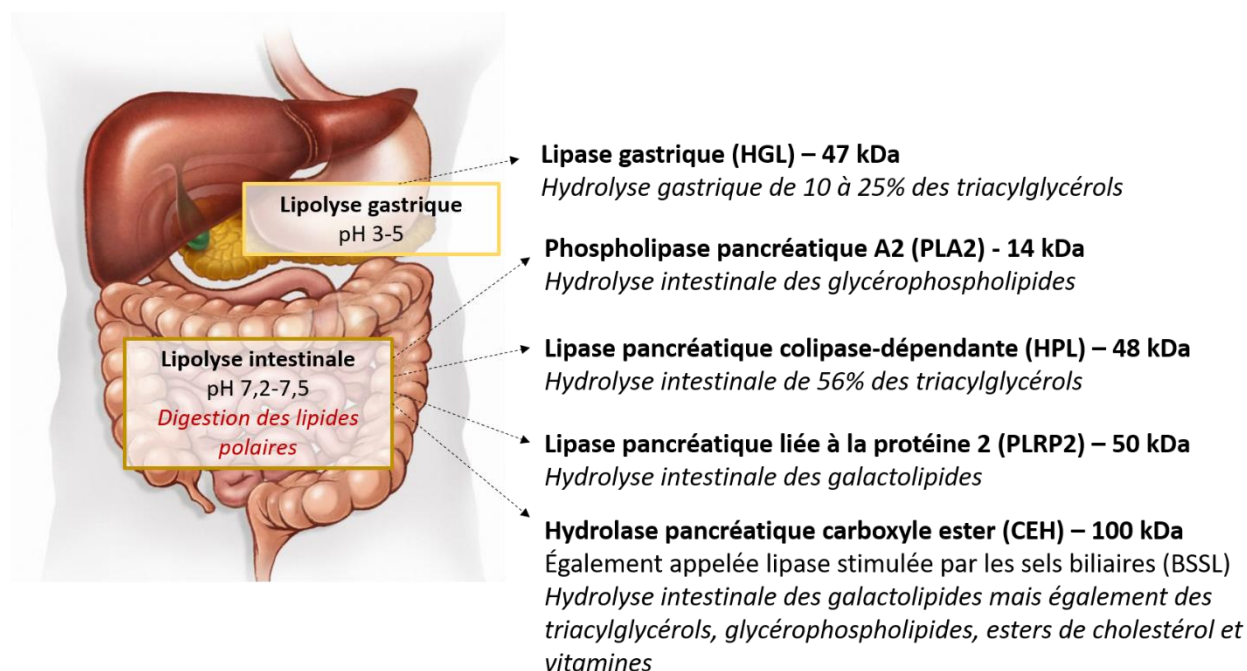


Figure 14 - Principales enzymes impliquées dans la digestion des lipides chez l'Homme.

Chez l'Homme, la lipolyse des lipides polaires débute dans l'intestin grêle, les enzymes responsables de leur digestion n'étant pas produites dans l'estomac. La plupart des enzymes lipolytiques sont produites dans le duodénum par le tissu exocrine du pancréas et travaillent de concert pour digérer les lipides alimentaires (**Figure 14**). Les principales enzymes digestives impliquées dans la lipolyse sont la lipase pancréatique colipase-dépendante (colipase-dependent pancreatic lipase, HPL), la phospholipase pancréatique A2 sécrétée (pancreatic phospholipase A2, sPLA2), l'hydrolase pancréatique carboxyle ester (pancreatic carboxyl ester hydrolase, CEH) – également appelée la lipase stimulée par les sels biliaires (bile-salt stimulated lipase, BSSL) – et la

lipase pancréatique de type 2 (pancreatic lipase related protein 2, PLRP2) (Bakala N’Goma et al., 2012).

Tableau 8 - Localisation et concentrations massique et molaire des principales enzymes gastro-intestinales humaines au cours d’un repas – adapté de Bakala N’Goma et al. (2012).

Enzyme	Masse molaire (kDa)	Localisation	Concentration massique moyenne ($\mu\text{g/mL}$) (pendant un repas) \pm SD	Concentration molaire moyenne (μM)
HGL	47	Jus gastrique	108 \pm 52	2.4
		Contenu gastrique	29 \pm 34	0.6
		Contenu duodénal	20 \pm 21	0.4
HPL	48	Jus pancréatique	769 \pm 137	15.2
		Contenu duodénal	328 \pm 260	6.5
Colipase	10	Contenu duodénal	156 \pm 117	15.6
CEH	100	Contenu duodénal	793 \pm 499	7.9
sPLA2-IB	14	Contenu duodénal	131 \pm 58	9.4
HPLRP2	51	Jus pancréatique	218 \pm 39	4.3
		Contenu duodénal	93	1.8

HGL – human gastric lipase, HPL – human pancreatic lipase, CEH – carboxyl ester hydrolase, PLA2 – pancreatic phospholipase A2, HPLRP2 – human pancreatic lipase related-protein 2

Les enzymes lipolytiques possèdent une spécificité plus ou moins stricte pour leur substrat. La sPLA2 pancréatique humaine (14 kDa) est responsable de l’hydrolyse intestinale des phospholipides, et notamment de la conversion de la PC en 1-lysophosphatidylcholine (1-lysoPC). Néanmoins, la sPLA2 ne représente chez l’adulte humain qu’une portion minoritaire des enzymes digestives, contrairement à la HPL et à la CEH qui sont présentes dans des quantités beaucoup plus importantes (Sternby et al., 1991). A titre d’information, le **Tableau 8** adapté de Bakala N’Goma et al. (2012) donne une liste exhaustive de la localisation et des concentrations massiques et molaires moyennes des principales enzymes digestives du tractus gastro-intestinal humain au cours d’un repas.

CHAPITRE 1

La HPL (48 kDa), dont l'activité dépend de son cofacteur spécifique, la colipase (10 kDa), est la principale enzyme impliquée dans la digestion intestinale des TAG alimentaires chez l'Homme. En effet, la HPL a été estimée comme responsable de l'hydrolyse de 56% des chaînes acyles de TAG dans le lumen, alors que la lipase gastrique (HGL, 47 kDa) ne réalise que 10 à 25% de cette tâche dans l'estomac, en fonction du bol alimentaire ingéré (Bakala N'Goma et al., 2012).

Une activité galactolipase a également été montrée dans le jus pancréatique et dans le contenu duodéal du système digestif humain (Andersson et al., 1995; De Caro et al., 2004; Wattanakul et al., 2019). Contrairement à la HPL, la PLRP2 (50 kDa) présente dans le jus pancréatique humain hydrolyse de manière efficace les galactolipides. En effet, cette enzyme pancréatique n'hydrolyse pas efficacement les TAG et les phospholipides, mais est responsable de la lipolyse significative des films monomoléculaires de MGDG (De Caro et al., 2004). Des espèces de PLRP2 possédant des structures similaires sont également présentes dans le système digestif d'autres espèces, et en particulier chez les herbivores monogastriques comme le cochon d'Inde (gPLRP2), dont le régime alimentaire contient des quantités importantes de galactolipides. Les propriétés structurales des enzymes possédant une activité galactolipase chez l'Homme, les herbivores monogastriques, mais également certains poissons, insectes folivores et microorganismes ont été détaillées dans une revue récente de (Sahaka et al., 2020). L'absence de galactolipides dans les régimes carnivores peut notamment expliquer l'absence de PLRP2 dans le tractus gastrointestinal de certaines espèces (De Caro et al., 2008).

La CEH – ou BSSL – (100 kDa), possède également une activité galactolipase chez l'Homme, mais beaucoup moins importante que la PLRP2. La CEH est une enzyme non-spécifique capable d'hydrolyser les galactolipides, mais également d'autres substrats lipidiques variés comme les TAG, les phospholipides, ou le cholestérol. Présente dans des proportions plus importantes que la

PLRP2 dans le système digestif humain, elle contribue significativement à la digestion des galactolipides, mais son activation nécessite la présence de sels biliaires (Bakala N’Goma et al., 2012; Salhi et al., 2020). La CEH peut également hydrolyser sans distinction les trois positions des TAG, en synergie avec d’autres lipases. Cette spécificité la distingue des autres estérases digestives, et lui permet d’hydrolyser partiellement les acylglycérols en produits finaux de réaction (acides gras libres et glycérols) chez les nouveau-nés (Bourlieu et al., 2014).

III.3 – Influence de l’organisation structurale des substrats et spécificité d’action des enzymes

La biodisponibilité des acides gras désigne leur capacité à être absorbés et utilisés par les différents tissus cibles de l’organisme. Celle-ci découle de plusieurs paramètres, en particulier de la structure et de la composition de la matrice alimentaire, de l’état physique des lipides et de la spécificité des enzymes pour leurs substrats. En effet, la lipolyse est un phénomène interfacial complexe, durant lequel l’action des lipases dans le duodénum dépend de la structure de leurs substrats mais également des changements structuraux qu’ils subissent au fil de la digestion.

III.3.1 – Importance de la structure supramoléculaire : l’émulsification des lipides

Les lipides étant insolubles dans le système digestif aqueux, ils doivent se trouver sous une forme émulsifiée, c’est-à-dire sous la forme de gouttelettes dispersées, afin d’être digérés. Le processus d’émulsification constitue donc une étape clé de la digestion des lipides alimentaires, et doit se dérouler majoritairement avant absorption, la phase gastrique impliquant une agitation, mais le plus souvent une émulsification faible, voire nulle (déstabilisation acide) du bol alimentaire (Golding & Wooster, 2010). Les lipides polaires alimentaires, en particulier certains phospholipides de par leur propension à former des phases lamellaires, jouent en effet un rôle important dans la stabilité

des émulsions alimentaires. Grâce à leurs propriétés amphiphiles naturelles, ceux-ci viennent former une monocouche à la surface des gouttelettes de TAG, permettant ainsi de limiter les phénomènes d'agrégations et de coalescence responsables de la déstabilisation des émulsions. Dans les aliments, les lipides peuvent également être trouvés sous une forme émulsifiée, proche de leur structure naturelle, ce qui module la digestion et la biodisponibilité des acides gras (Bourlieu et al., 2015; Michalski et al., 2013). La taille des gouttelettes d'une émulsion est un facteur clé jouant sur l'étendue de leur hydrolyse par les enzymes gastrointestinales. En effet, une émulsion fine (0,7 μm) offrira une interface lipidique plus importante qu'une émulsion de taille plus importante (10 μm), ce qui multipliera le nombre de molécules de lipases pouvant s'y fixer (Armand et al., 1999; Borel et al., 1994).

III.3.2 – Activation interfaciale des enzymes lipolytiques

L'activation interfaciale est un paramètre crucial pour les enzymes impliquées dans la digestion des gouttelettes de lipides émulsifiés (Golding & Wooster, 2010; Sintra et al., 2014). Certaines lipases sont en effet inactives lorsqu'elles se trouvent en phase homogène (bulk), le site actif étant rendu inaccessible par la présence d'un « couvercle » en position fermée. Lorsque l'enzyme lipolytique rentre en contact avec une interface, ce couvercle subit des changements conformationnels permettant la rencontre entre le substrat et la cavité hydrophobe entourant le site actif, un espace également appelé « surface interfaciale de reconnaissance » pour les enzymes lipolytiques. Néanmoins, l'activation interfaciale des lipases ne nécessite pas forcément la présence d'un « couvercle » contrôlant l'accès au site actif. Par exemple, le site actif de la sPLA2 pancréatique ne présente pas de couvercle, alors même que cette lipase montre une activation interfaciale au contact des micelles des PL. Plus généralement, l'activation interfaciale des enzymes se décrit comme l'augmentation de leur activité hydrolytique lorsque leurs substrats

lipidiques sont organisés sous la forme d'un assemblage supramoléculaire, i.e. sous la forme d'émulsions pour les lipases et de micelles ou de liposomes pour les phospholipases. Par exemple, la sPLA2 possède une faible activité au niveau des monomères de PL à chaînes moyennes, mais son activité augmente drastiquement lorsque la concentration en substrat dépasse la concentration micellaire critique (CMC) et que les micelles commencent à se former (Bakala N'Goma et al., 2012). L'activité hydrolytique de la sPLA2 requière également la présence d'ions calcium qui interagissent avec le substrat et activent l'effet catalytique du site actif de l'enzyme. Ce processus d'activation interfaciale est différent pour la lipase pancréatique humaine (HPL), qui elle ne requiert pas la présence d'ions calcium pour être active à l'interface huile/eau. Néanmoins, la HPL nécessite la présence d'une colipase pour se lier aux gouttelettes lipidiques et hydrolyser les TAG en présence de sels biliaries. En effet, il a été établi *in vitro* que l'action de la HPL au niveau des émulsions de TAG était inhibée par les sels biliaries, qui gênent l'adsorption de la lipase à l'interface lipide/eau par des phénomènes de compétition. En présence de sels biliaries, l'ancrage spécifique de la lipase à son substrat est alors permis par la formation d'un complexe à un ratio molaire 1:1 avec la colipase, une protéine de 10 kDa produite par le pancréas. La HGL est quant à elle, comme toutes les enzymes, inhibée par la présence des produits de digestion qu'elle génère, mais les acides gras protonés à pH acide encombrant davantage la surface des gouttelettes que pour les autres lipases agissant à pH neutre et empêchent son adsorption. Au niveau intestinal, la présence de sels biliaries permet la micellisation des produits de digestion et une hydrolyse poussée des substrats (Carey et al., 1983; Pafumi et al., 2002).

III.3.3 – Spécificité d'action des enzymes

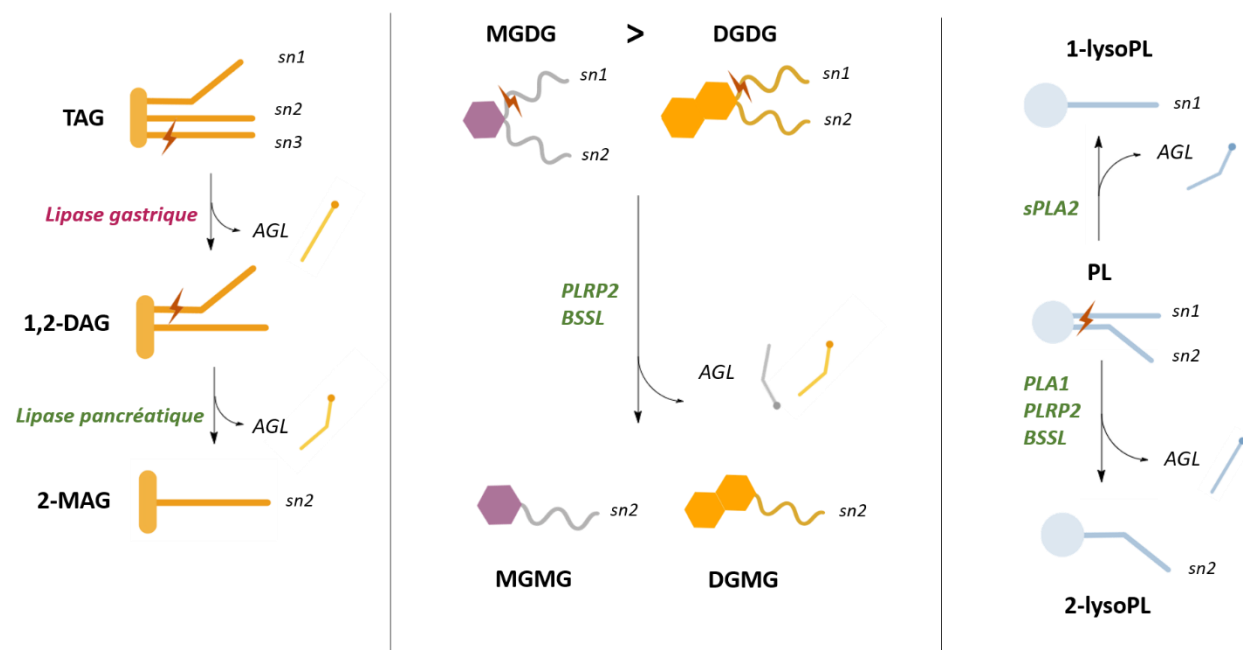


Figure 15- Représentation de la spécificité d'action des principales enzymes digestives humaines en fonction des données et hypothèses référencées dans la littérature.

La spécificité des enzymes envers leurs substrats se décline en différentes modalités. Pour les lipases, notamment, on distingue : spécificité de substrat, typospécificité pour un groupement acyle donné, régiosélectivité, stéréosélectivité (Bourlieu et al., 2009). Pour un même type de substrat, l'affinité et l'activité d'une enzyme peuvent donc varier. Ainsi, la tête polaire, mais également l'emplacement des chaînes d'acides gras sur les molécules de lipides, sont par exemple des facteurs déterminant l'affinité de l'enzyme pour son substrat et donc leur bioaccessibilité. Par exemple, plusieurs types de PLA2 ont une préférence plus marquée pour les substrats anioniques tels que le PG ou la PE davantage que pour les phospholipides zwitterioniques comme la PC (Han et al., 1997). La spécificité de substrat est en revanche plus restreinte en ce qui concerne la sPLA2 pancréatique, dont les substrats physiologiques intestinaux sont les dispersions de PL à longues chaînes dans les sels biliaires. Il a notamment été montré que la sPLA2 pancréatique porcine (EC

3.1.1.4), dont la structure est proche de la sPLA2 pancréatique humaine, pouvait hydrolyser tous les types de phospholipides, mais possède une régiospécificité d'hydrolyse au niveau de la liaison ester en position *sn*-2, quels que soient la longueur ou le degré d'insaturation des chaînes d'acides gras (De Haas et al., 1968).

Concernant la PLRP2 humaine, Amara et al. (2010) ont mis en évidence que son activité galactolipase n'était pas fortement impactée, ni par la longueur des chaînes acyles, ni par la taille de la tête polaire, mais dépendait fortement du ratio sels biliaire/substrats, qui gouverne la solubilisation micellaire des DGDG et MGDG. Ce ratio est donc un paramètre important pour déterminer les conditions optimales pour mesurer l'activité de la PLRP2. Les analyses des produits de lipolyse des MGDG et DGDG ont également permis de mettre en évidence la spécificité d'action de la hPLRP2 au niveau de leur fonction ester en position *sn*-1. Ainsi, l'ALA, l'acide gras majoritaire (>60% wt.) en position *sn*-1 dans les MGDG et DGDG issus de chloroplastes, est l'acide gras majoritairement libéré lors de l'hydrolyse des galactolipides par la PLRP2. Concernant la lipase gastrique recombinante de chien (rDGL) et la HPL, elles sont respectivement stéréosélective de la position *sn*-3, et régiospécifique en position *sn*-1 et *sn*-3 des TAG. Les données et hypothèses relatives aux spécificités d'action des principales enzymes digestives sont résumées **Figure 15**.

IV - Digestibilité des assemblages végétaux

IV.1. Dégradation des thylakoïdes de chloroplastes par les enzymes digestives

De nombreuses études se sont intéressées à l'hydrolyse enzymatique des galactolipides issus des membranes de thylakoïdes et sur leurs effets sur le système digestif. Comme précédemment mentionné, les assemblages de galactolipides, dont font partie les membranes de thylakoïdes et les

CHAPITRE 1

fractions de chloroplastes enrichies (CRF), sont digérés dans le compartiment pancréatique par la PLRP2, ainsi que par la CEH dans une moindre mesure (Bakala N’Goma et al., 2012). Wattanakul et al. (2019) ont notamment étudié la digestion *in vitro* de CRF extraits de résidus de pois de vigne et de feuilles d’épinard par le jus pancréatique humain et ont montré l’hydrolyse rapide des MGDG et DGDG en monogalactosylmonoacylglycérols (MGMG) et digalactosylmonoacylglycérols (DGMG).

L’impact de la supplémentation en thylakoïdes sur la digestion sur des modèles humains et animaux a également fait l’objet d’une revue récente de Pourteymour Fard Tabrizi & Abbasalizad Farhangi (2021). Les résultats des études citées indiquent tout d’abord que la supplémentation en membranes de thylakoïdes permet de ralentir l’initiation de la lipolyse et de réduire l’absorption des TAG *in vivo* en interagissant physiquement avec le complexe lipase-colipase, gênant ainsi son accès à la surface des gouttelettes d’émulsions (Erlanson-Albertsson & Albertsson, 2015). L’effet d’inhibition des membranes de thylakoïdes a en effet été montré sur le complexe HPL *in vitro*, même en présence de sels biliaires (Albertsson et al., 2007). Cette inhibition du complexe lipase pancréatique-colipase pourrait être apportée par les complexes protéiques transmembranaires intrinsèques des thylakoïdes, et en particulier par la présence de leurs nombreux groupements hydrophobes. Pour expliquer cette inhibition, l’un des mécanismes avancé par Albertsson repose sur des effets de compétition dans l’adsorption à l’interface lipide/eau. En effet, les membranes de thylakoïdes étant tensioactives, elles ont tendance à se placer à l’interface lipide/eau, réduisant ainsi l’accès du complexe lipase-colipase par gêne stérique, et diminuant l’hydrolyse des TAG. Il convient cependant d’être prudent quant aux hypothèses envisagées pour expliquer l’inhibition du complexe HPL par les membranes de thylakoïdes, car celles-ci se basent sur des études de digestion

in vitro réalisées uniquement en présence de lipase pancréatique classique, où l'hydrolyse possible des galactolipides des membranes de thylakoïdes par la PLRP2 et la CEH n'a pas été considérée.

La supplémentation en thylakoïdes a également été proposée comme un moyen de contrôle de l'appétit, en prolongeant la lipolyse intestinale. Il a notamment été montré que l'administration de thylakoïdes induisait l'augmentation de la sécrétion de deux hormones de satiété : la cholécystokinine (CCK) et le glucagon peptide-1 (GLP-1), mais également la suppression de la sécrétion de la ghréline, l'hormone de l'appétit. Cette régulation a notamment pour conséquences un meilleur contrôle de la concentration en glucose dans le plasma grâce à l'augmentation de la sécrétion d'insuline et la diminution de l'appétit. L'appétit réduit par l'augmentation de la concentration des hormones de satiété suggère un retard d'adsorption des nutriments dans l'intestin, ce qui provoque la prolongation de la digestion des lipides, comme démontré dans des études *in vivo* sur des cohortes animale (Köhnke, Lindqvist, et al., 2009) et humaine (Köhnke, Lindbo, et al., 2009). Les effets observés sur le métabolisme hépatique ont pour conséquence une diminution des LDL (low-density lipoprotein) circulants, du cholestérol total, ainsi que du glucose et des lipides plasmatiques. Les études ont également rapporté une diminution de la sécrétion de leptine, une hormone de satiété produite par le tissu adipeux qui régule les réserves de graisses et de glucose dans l'organisme, interrogeant ainsi sur les potentiels effets anti-diabète des thylakoïdes sur l'organisme. Ainsi, les thylakoïdes pourraient être envisagés comme candidats potentiels dans la lutte contre la suralimentation.

A ce jour, la plupart des réponses concernant la digestion des GL ont été obtenues sur des MGDG, DGDG et SQDG purifiés à partir d'extraits lipidiques de feuilles, telles que les épinards. Néanmoins, davantage d'études sont encore nécessaire concernant les mécanismes de digestion des galactolipides par l'action directe des enzymes pancréatiques sur des sources plus variées et

plus complexes, comme le matériel végétal non purifié, dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'inhibition et les effets synergiques observés sur l'action des enzymes digestives. L'utilisation des CRF représente notamment un pas dans cette direction.

IV.2. Dégradation des OB par les enzymes digestives

Contrairement aux membranes de thylakoïdes de chloroplastes, les OB ne contiennent pas des quantités très élevées de lipides polaires (0,6 à 2,0% wt. de phospholipides). Néanmoins, les OB possèdent une faculté remarquable à former des émulsions quasi-naturelles, ou du moins peu transformées, par extraction directe des matrices végétales et redispersion dans une phase aqueuse. Ce potentiel émulsifiant naturel a soulevé l'intérêt de leur utilisation dans des applications alimentaires, dont le développement implique une compréhension approfondie des mécanismes de dégradation des OB par les enzymes digestives.

Plusieurs études se sont ainsi concentrées sur la stabilité physico-chimique et le comportement des OB au cours de la digestion (Nikiforidis, 2019). Une étude de Gallier & Singh (2012) a notamment fait état de la déstabilisation physique des OB d'amande dans des conditions gastriques *in vitro*, induite par une agrégation des objets à pH acide, mais également par une possible protéolyse partielle des oléosines composant la membrane protectrice des OB. La transition vers un pH neutre et l'ajout de sels biliaires a ensuite conduit à la rupture de ces agrégats lors du passage dans le tractus intestinal. Malgré la déstabilisation physique constatée des OB, la structure membranaire de l'assemblage a globalement été préservée et une phase de latence a été observée avant le début de la lipolyse intestinale. Cette phase a été induite par l'adsorption retardée de la HPL, suggérant ainsi que la préservation de la structure membranaire des OB pourrait entraver l'accès de la lipase pancréatique à l'interface lipide/eau. Des résultats similaires avaient été obtenus par Beisson et al. (2001), qui avaient étudiés les OB d'amande comme substrats de différentes

lipases purifiées, dont la HPL et la gPLRP2. Les deux lipases avaient été trouvées actives sur les OB, mais avec une activité plus faible (18 à 38%) que celle observée sur des émulsions artificielles d'huile d'amande. Les résultats, en accord avec ceux de Gallier et al., avaient montré que la couche membranaire protéines/phospholipides couvrant les OB diminuait l'activité spécifique des lipases, et une phase de latence plus ou moins longue avait également été observée avant l'initiation de l'hydrolyse. Cette phase de latence est assez caractéristique des systèmes lipidiques possédant une densité de packing élevée, comme les chylomicrons ou les globules gras laitiers, qui possèdent une structure relativement proche de celle des OB (Walther & Farese, 2012). L'activité phospholipase de la gPLRP2 et du complexe HPL/colipase sur les phospholipides de la couche protectrice pourrait également être l'un des mécanismes expliquant l'action des lipases sur le cœur TAG des OB. L'introduction de défauts au niveau de la couche protectrice de phospholipides/protéines permettrait en effet à la lipase pancréatique de pénétrer à travers la membrane et d'hydrolyser le cœur de TAG. Cette hypothèse avait été avancée par Noll et al. (2000), qui avait montré qu'une activité phospholipase était nécessaire avant l'action de la lipase pour accéder au cœur de TAG au cours de la croissance des graines de concombre. Un autre mécanisme possible serait lié au placement des TAG au niveau de l'interface lipide/eau des OB, permettant leur hydrolyse par les lipases liées à l'interface sans pénétrer la membrane.

L'impact de la présence de protéines exogènes sur le devenir des OB d'oléagineux dans le tractus gastro-intestinal a également été étudié. Une étude de Makhun et al. (2015) sur les OB de tournesol non lavés a notamment mis en avant le rôle sacrificiel des protéines exogènes des graines en présence de pepsine, permettant de protéger les oléosines endogènes des OB d'un clivage total, les données ayant indiqué la présence d'oléosines « intactes » malgré l'étape de digestion gastrique. Les OB de tournesol ayant la capacité de s'associer avec les protéines exogènes de la graine, ces

dernières pourraient avoir formé une couche protectrice supplémentaire autour des OB, protégeant ainsi partiellement les oléosines exposées à la digestion. Une nette réduction de la bande protéique en électrophorèse avait cependant été observée après l'étape de digestion intestinale *in vitro*, indiquant le déplacement des oléosines restantes à la surface des OB par les sels biliaires. La formation d'une couche de protéines exogènes à la surface d'OB non lavés avait également été observée dans le cas de la digestion gastro-intestinale *in vitro* d'OB d'amande par Gallier & Singh (2012). Les résultats avaient en effet indiqué la présence de peptides d'amandine, une protéine résistante au clivage par la pepsine même après 15 minutes de digestion gastrique. Les observations en microscopie confocale avaient en effet mis en évidence la couverture totale des OB par une couche de protéines et de résidus peptidiques en conditions gastriques. Une phase de latence de deux minutes avait ensuite été observée avant l'initiation de l'hydrolyse intestinale. Cette phase suggérait une pénétration plus lente de la lipase pancréatique à l'interface des gouttelettes, probablement inhibée par la couche de protéines exogènes protégeant la membrane des OB avant l'action des sels biliaires.

V - Impact de l'addition de constituants isolés des assemblages végétaux sur la digestion des TAG

V.1. Impact de l'addition de GL isolés sur la digestion des émulsions de TAG

Chu et al. (2009) se sont intéressés au comportement digestif de gouttelettes d'huile d'olive stabilisées par des lécithines et recouvertes par différentes quantités de GL d'épinards. L'objectif de leur étude était de quantifier les effets des MGDG et DGDG sur l'activité *in vitro* de la lipase pancréatique porcine dans des conditions duodénales. Les résultats obtenus ont indiqué que la présence de molécules de DGDG adsorbées à l'interface des gouttelettes d'huile interférait avec l'adsorption et donc avec la pénétration du complexe lipase-colipase, empêchant le contact

rapproché avec le substrat et inhibant ainsi la lipolyse intestinale. Les mesures à l'interface ont permis d'identifier des interactions moléculaires fortes entre les têtes polaires sucre des DGDG, engendrant un arrangement moléculaire relativement dense, et ralentissant la pénétration interfaciale de la lipase pancréatique et de sa colipase. Cet effet d'inhibition a persisté dans des conditions physiologiques, la présence des sels biliaires n'ayant pas permis le déplacement des molécules de DGDG fortement tensioactives. Par conséquent, un ralentissement de l'hydrolyse enzymatique des TAG par la lipase pancréatique a été constaté. Cette capacité à retarder et à ralentir la lipolyse des gouttelettes lipidiques des molécules de DGDG pourrait être un outil efficace pour développer de nouvelles émulsions alimentaires fonctionnelles, dans le but de mieux réguler la prise de graisse chez les patients atteints de troubles métaboliques tels que l'obésité.

Bien que de tels effets d'inhibition des galactolipides sur l'activité de la lipase pancréatique soient intéressants, des études complémentaires restent nécessaires pour valider cette approche, de tels systèmes nécessitant d'être testés en présence de cocktails enzymatiques pancréatiques plus complets, incluant par exemple la PLRP2 et/ou la CEH.

V.2. Impact de l'addition de phospholipides sous la forme de lécithines végétales sur la digestion des émulsions de TAG

L'émulsification d'une huile végétale en présence de lécithine augmente la biodisponibilité des acides gras au cours de l'absorption intestinale, soulevant le potentiel de modulation de la digestion lipidique par les lécithines végétales (Robert, Couëdelo, Vaysse, et al., 2020). En effet, comme précédemment mentionné, la nature amphiphile des phospholipides leur confère des propriétés émulsifiantes naturelles, qui induisent leur arrangement spatial à la surface des gouttelettes lipidiques, que ce soit dans le cas de la préparation d'une émulsion ou bien dans le tractus

CHAPITRE 1

gastrointestinal lors du mélange des lipides du bol alimentaire avec les PC endogènes. En favorisant ainsi l'émulsification des lipides alimentaires, les phospholipides permettent d'augmenter la surface spécifique disponible pour l'adsorption des enzymes digestives, augmentant ainsi le taux de lipolyse et l'adsorption intestinale subséquente. L'impact dose-dépendant direct du mélange lécithine-huile de colza (sans émulsifiants) sur l'augmentation des niveaux de lipides lymphatiques a récemment été mis en évidence chez le rat par Robert, Couëdelo, Knibbe, et al. (2020). La lipolyse gastrique *in vitro* d'une émulsion d'huile de lin a également été montrée comme étant 30% plus étendue lorsque les gouttelettes lipidiques étaient recouvertes par des lécithines de soja, en comparaison avec des émulsifiants commerciaux largement utilisés comme les caséinates ou le Tween 80 (Couëdelo et al., 2015). Ces résultats ont par ailleurs été confirmés *in vivo*, accompagnés d'une absorption intestinale plus rapide et d'une meilleure biodisponibilité de l'ALA observées avec les lécithines de soja, comparé avec les autres émulsifiants.

Plus généralement, l'impact bénéfique des lécithines végétales sur l'absorption des lipides a été mis en avant, et s'accompagne d'une amélioration subséquente du profil lipidique dans le plasma, le foie, et les tissus adipeux (Robert, Couëdelo, Vaysse, et al., 2020). En effet, Lee et al. (2014) ont montré que la supplémentation en PC dérivé de soja permettait de prévenir l'accumulation des lipides chez la souris en situation d'hyperlipidémie, en diminuant les quantités de TAG, de cholestérol et de leptine dans le plasma, réduisant ainsi le ratio LDL/HDL (high-density lipoprotein), et allégeant les complications liées à l'obésité. Au global, ces résultats suggèrent le potentiel des lécithines de soja dans la délivrance de certains acides gras spécifiques vers des tissus cibles, et dans la prévention des maladies cardiométaboliques liées à l'obésité.

Néanmoins, des recherches complémentaires sont encore nécessaires pour déterminer si ces effets se retrouvent chez l'humain en bonne santé, mais également pour étudier les effets des lécithines

présentant des compositions lipidiques et des structures plus variées. Pour nuancer ces effets bénéfiques potentiels, il est néanmoins important de rappeler que l'utilisation des lécithines comme émulsifiants peut contourner les mécanismes de satiété déclenchés dans la partie distale de l'intestin grêle en accélérant la lipolyse gastrointestinale et donc l'absorption subséquente des graisses (Couédelo et al., 2015). En effet, il a été démontré *in vitro* que les émulsions stabilisées par la lécithine de soja engendraient une lipolyse plus rapide et plus importante que celles stabilisées par des émulsifiants synthétiques (Vors et al., 2012). Cette absorption plus rapide des lipides conduit à des concentrations moins élevées d'acides gras libres dans la partie inférieure de l'intestin grêle, altérant ainsi la libération normale des hormones de satiétés telles que le GLP-1 et le peptide YY (PYY). C'est pourquoi, une évaluation risque/bénéfice doit être réalisée avant de développer des produits alimentaires contenant des lécithines végétales. L'amélioration de la digestion et de l'absorption des graisses pourrait être intéressante pour éviter par exemple la malnutrition chez les prématurés et les personnes âgées, alors qu'elle pourrait contribuer à des facteurs aggravants de l'obésité chez d'autres sujets.

V.3. Impact de l'addition d'oléosines sur la digestion des émulsions de TAG

A notre connaissance, les effets de l'addition d'oléosines sur la digestion des gouttelettes d'émulsions lipidiques ne sont pas documentés à ce jour. Néanmoins, des études réalisées sur la dégradation des OB entiers par différentes lipases purifiées comparée à leur comportement sur des émulsions stabilisées par des phospholipides ont permis de déduire certains effets des oléosines sur la lipolyse. Par exemple, en fonction des lipases, l'activité spécifique mesurée sur les OB d'amande représentait seulement 18 à 38% de celle mesurée sur de l'huile d'amande émulsifiée avec de la gomme arabique, indiquant l'effet général négatif de la combinaison oléosines-phospholipides sur la lipolyse. Également, alors que les phospholipides favorisent l'activité de la HGL sur l'huile de

CHAPITRE 1

soja, leur combinaison avec les oléosines sur les OB d'amande résulte en une activité 8 fois plus faible (Gargouri, Pieroni, Riviere, et al., 1986). Ces effets des oléosines sur la HGL peuvent être comparés avec ceux de la caséine, qui a également été montrée comme réduisant l'activité de la lipase gastrique sur l'huile de colza (Vors et al., 2012) et de lin (Couédelo et al., 2015) par rapport à la lécithine de soja. Dans le cas de la HPL, la colipase est nécessaire pour mesurer une activité sur les OB d'amande en présence de sels biliaires, alors que la HPL seule est active sur l'huile d'amande émulsifiée avec de la gomme arabique. Comme dans le cas de la HGL, l'activité de la HPL sur les OB était plus faible par rapport à celle observée sur l'huile d'amande émulsifiée avec la gomme Arabique (23 fois moins active).

Comme énoncé dans la description des OB, les oléosines sont connues pour avoir un rôle de stabilisation des OB, dont la monocouche membranaire module très probablement leur digestion. En effet, en tant que composés émulsifiants naturels des OB, les oléosines apportent une stabilisation électrostatique et stérique à ces assemblages lipoprotéiques à pH physiologique. Leur dégradation a notamment été montrée comme induisant la déstabilisation des émulsions d'OB par Maurer et al. (2013), conduisant à la polydispersité de leur taille, à la diminution de l'élasticité de la couche interfaciale, et à l'altération des interactions entre les gouttelettes.

Le comportement à l'interface air/eau d'oléosines purifiées à partir de germes de maïs a été étudié par Nikiforidis et al. (2012). Les auteurs ont mis en évidence que leur comportement à l'interface air/eau était comparable à ceux des protéines de lait et des apolipoprotéines de jaune d'œuf, ces dernières étant utilisées dans de nombreuses préparations alimentaires. La capacité tensioactive élevée des oléosines est une propriété d'intérêt pour leur utilisation en tant qu'émulsifiants pour stabiliser les aliments. Néanmoins, Barre et al. (2018) ont rapporté l'allergénicité des oléosines de cacahuètes, noisettes et sésame, qui ont été identifiées et caractérisées comme étant des allergènes

lipophiles majeurs chez les individus sensibles. Leur utilisation comme émulsifiants ou agents encapsulant de substances protéiques ou lipidiques soulève ainsi certaines questions de santé, en particulier dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et alimentaire. Selon l'application, les brevets déposés soulèvent notamment l'importance de l'élimination des contaminants tels que d'autres protéines de l'OB pendant la purification, dans le but de réduire l'allergénicité, la couleur et l'odeur, mais surtout d'augmenter la stabilité.

Un schéma illustré est proposé **Figure 16** pour résumer les principaux résultats et hypothèses renseignés dans la littérature concernant la digestion gastro-intestinale des OB et des fragments de thylakoïdes et les effets biologiques subséquents.

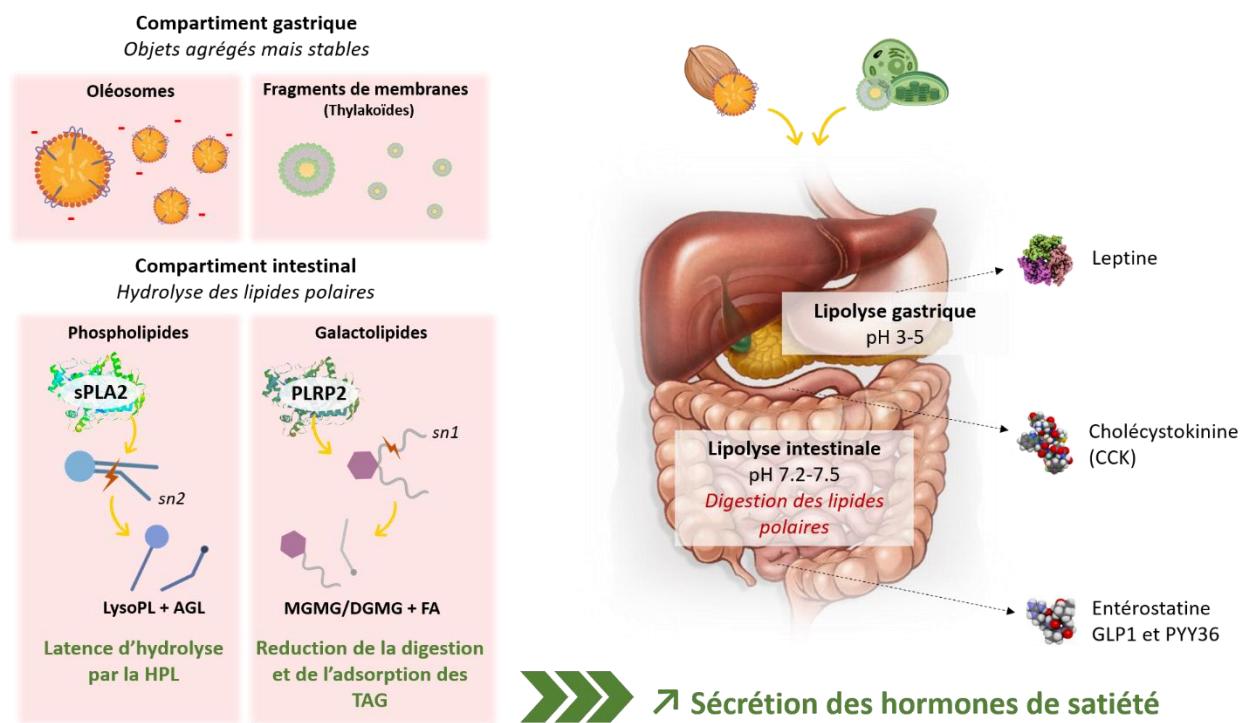


Figure 16 – Schéma récapitulatif de la dégradation enzymatique des oléosomes et des fragments de thylakoïdes dans le compartiment gastrique et intestinal et de leurs effets biologiques subséquents.



CHAPITRE 2

TECHNIQUES EXPERIMENTALES

Table des matières du chapitre 2

I – Matériel biologique	90
II – Caractérisation chimique	92
II.1. Extraction des lipides à partir des matrices naturelles.....	92
II.1.1. Extraction des lipides totaux de microalgues chlorelles.....	92
II.1.2. Extraction des lipides membranaires d'oléosomes.....	92
II.2 – Analyse des lipides totaux (nature des molécules).....	93
II.3 – Analyse des acides gras des lipides	93
II.4 – Suivi de l'oxydation.....	94
II.4.1. Valeur de peroxyde.....	94
II.4.2. Substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS).....	95
III – Mesures interfaciales à l'échelle moléculaire - caractérisation biophysique des monocouches de lipides à l'interface air/eau	95
III.1 – Tensiométrie.....	97
III.1.1 – Principe de mesure de la pression de surface	97
III.1.2 – Etude de la compressibilité des monocouches de lipides.....	99
III.1.3 – Technique de Langmuir-Blodgett	100
III.2 – Ellipsométrie	101
III.2.1 – Principe.....	101
III.2.2 – Dispositif expérimental	101
III.3 – Microscopie à force atomique	102
III.3.1 – Principe.....	103
III.3.2 – Mode de fonctionnement.....	104
III.3.3 – Traitement des images.....	104
IV – Mesures cinétiques de dégradation à l'échelle de l'objet - dégradation des liposomes de lipides végétaux en système statique par les enzymes gastro-intestinales	105
IV.1. Les liposomes.....	105
IV.1.1. Généralités sur les liposomes	105
IV.1.2. Préparation des liposomes de 1 µm.....	107
IV.2. Dégradation enzymatique intestinale des liposomes modèles et extraits des membranes de microalgues chlorelle – système statique	107

CHAPITRE 2 – Techniques expérimentales

Ce chapitre est consacré à la description des techniques expérimentales générales utilisées pour la caractérisation à différentes échelles de la digestion d'assemblages membranaires modèles ou extraits du végétal par les enzymes digestives humaines ou proches analogues. Les techniques et méthodes expérimentales non-décrites dans ce chapitre sont spécifiques de certaines études, et peuvent être retrouvées dans les chapitres dédiés.

Dans un premier temps, un intercalaire détachable est consacré à la description du matériel biologique utilisé. Les méthodes générales de caractérisation chimique des systèmes étudiés, réalisées dans leur intégralité au CIRAD de Montpellier, ont ensuite été décrites. La troisième section de ce chapitre est dédiée à la description des outils biophysiques de l'Institut de Physique de Rennes (ellipsométrie, tensiométrie, microscopie à force atomique). Utilisées à des fins de caractérisation des films lipidiques à une interface air-eau, ces méthodes ont été utilisées afin d'obtenir une compréhension des mécanismes mis en jeu dans la digestion des lipides à l'échelle mésoscopique et moléculaire. Le quatrième chapitre décrit les méthodes utilisées afin d'étudier la dégradation des assemblages dispersés de lipides (liposomes) par les enzymes digestives dans des conditions statiques plus proches des conditions physiologiques de la digestion chez l'Homme.

I – Matériel biologique

Substrats lipidiques

Systèmes modèles

Système lipidique	Composition (mol%)	Caractéristiques
(1) GL	MGDG/DGDG 60:40	Système simplifié
(2) GL/DPPC	MGDG/DGDG/DPPC 30:20:50	Système hétérogène
(3) GL/DPPC/pS	MGDG/DGDG/DPPC/pS 27:18:45:10	Système biomimétique

Les lipides proviennent de chez Avanti Polar Lipids (Alabama, USA) – composition en AG en annexe 1

Systèmes naturels

Matrice initiale	Système lipidique	Caractéristiques
(1) <i>Chlorelle Purasana</i>	Lipides totaux	Riches en galactolipides et en AGPI ω 6 et ω 3
(2) <i>Chlorelle Sorokiniana</i>	Lipides totaux	
(3) Oléosomes de noix	Lipides membranaires	Riches en phospholipides et en AGPI ω 6 et ω 3
(4) Oléosomes d'amande	Lipides membranaires	

Assemblages natifs

Matrice initiale	Structure supramoléculaire	Caractéristiques
(1) <i>Chlorelle Purasana</i>	Fragments de membrane	Riches en galactolipides, phospholipides et protéines photosynthétiques
(2) Oléosomes de noix	OB isolés peu transformés	Riches en phospholipides et en oléosines

Enzymes gastro-intestinales

Enzyme	Modèle	[Interface] (mg/L)	[bulk] (mg/L)
--------	--------	--------------------	---------------

Enzyme gastrique

HGL



rDGL

(recombinant Dog Gastric Lipase)

1,92

17,0

Enzymes intestinales

PLRP2



gPLRP2

(Guinea pig PLRP2)

0,128

3,3

S125G PLRP2 (Deactivated variant)

0,128

-

sPLA2



sPLA2-IB

NMM-CM III
(sPLA2 de venin de cobra du Mozambique)

0,128

3,3

-

PTL-coPTL



PPL

(Porcine pancreatic lipase)

1-0,2

250,0-50,0

II – Caractérisation chimique

II.1. Extraction des lipides à partir des matrices naturelles

II.1.1. Extraction des lipides totaux de microalgues chlorelles

Les lipides totaux des microalgues de *Chlorella vulgaris* Purasana et de *Chlorella Sorokiniana reyto* ont été extraits par la méthode Folch (Folch, 1957). 5 mL d'eau ultrapure (UP), 40 mL de solution Folch (CHCl₃/MeOH, 2/1 v/v) ont été ajoutés aux matrices algales en poudre. La solution a été mélangée grâce à un ultra-turrax (IKA, T18 digital) pendant 1 minute entre 9500 et 13500 rpm. Dans une ampoule à décanter, la solution a été lavée une fois avec une solution de NaCl à 0,73%, puis deux fois avec une solution contenant 40 mL de solution Folch et 10 mL d'une solution de NaCl à 0,58%. La phase inférieure a été récoltée entre chaque lavage, et les solvants ont été évaporés sous atmosphère réduite.

II.1.2. Extraction des lipides membranaires d'oléosomes

Les OB des noix et des amandes ont été isolés et purifiés par la méthode de Kapchie et al. (2011). Les oléagineux ont été trempés puis rincés deux fois avec de l'eau (UP) puis broyés manuellement à l'aide d'un pilon et d'un mortier. Les échantillons réduits en poudre ont été mélangés avec de l'eau UP (1/6 p/v) et dispersés à l'Ultraturax à 10 000 rpm pendant 5 min. Le mélange a été filtré sur un tamis à 315 µm puis centrifugé (Beckman Coulter, Avanti JE) à 4000 g à 4°C. La crème surnageante a été récoltée, lavée trois fois dans une solution tampon (0,1 M Tris-HCl, 4 M saccharose, 0,5 M NaCl, pH 8,6, ratio 1:6 g/mL) et centrifugée à 4000 g à 4°C pendant 30 min. La crème surnageante a été récoltée à chaque lavage, lavée deux fois dans l'eau UP (1/6, p/v), et centrifugée à 4000 g à 4°C pendant 30 min. Les lipides polaires membranaires des OB ont ensuite été obtenus par triple extraction acétonique.

II.2 – Analyse des lipides totaux (nature des molécules)

Les lipides ont été séparés après dépôt par migration unidimensionnelle sur des plaques de gel de silice HPTLC (Merck, Saint-Quentin Fallavier, France) en utilisant un échantillonneur ATS4 (Camag, Muttenz, Suisse) contrôlé par un logiciel Wincats (2008). L'élution a été réalisée en deux temps : CHCl₃/MeOH/eau UP (95/20/2.5 v/v/v) jusqu'à 40 mm, puis Hx/EE/AA (70/30/1 v/v/v) jusqu'à 80 mm, en utilisant une chambre de développement automatique ADC 2 (Camag, Muttenz, Suisse). Après migration, les plaques ont été trempées dans une solution de sulfate de cuivre à 15,9 % dans un mélange acide orthophosphorique/eau (92/8, v/v), puis scannées à 500 nm à l'aide d'un scanner TLC 3 (Camag, Muttenz, Suisse). La détermination des classes de lipides a été réalisée en utilisant des standards de TAG, DAG, MAG, MGDG, DGDG, MGMG, DGMG, DPPC, lysoPC, AGL, phytostérols.

II.3 – Analyse des acides gras des lipides

Les esters méthyliques d'acides gras (FAME) ont été obtenus par transestérification des lipides extraits par la méthode Folch (Piombo et al., 2006). Les aliquots (5 µL) des extraits Folch méthylés ont été analysés par chromatographie phase gazeuse (Focus GC, Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA) équipée d'un split injecteur (ratio 1/20), d'une colonne capillaire CPCil 88 Varian (50 m × 0.25 mm avec un film de 0.2 µm d'épaisseur ; Chrompack, Middelburg, Pays-Bas), et de l'hélium à 1 mL/min comme gaz porteur. Les FAME ont été analysés à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme et du système de données ChromCard (version 2005 ; Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA). La température initiale de la colonne était de 150°C et a augmenté de 150°C à 225°C à une vitesse de 5°C/min puis maintenue à 225°C pendant 10 min. Les FAME ont été identifiés en utilisant un mélange d'esters méthyliques comme standard externe

CHAPITRE 2

(Mix 37, Sigma-aldrich, Saint Quentin en Yveline, France). Les températures de l'injecteur et du détecteur étaient respectivement de 250°C et 270°C. Les teneurs en AG étaient exprimées en g pour 100 g de produit.

II.4 – Suivi de l'oxydation

L'évaluation de la stabilité oxydative des assemblages naturels a été effectuée en mesurant la formation des produits primaires (hydroperoxydes) et secondaires (malondialdéhyde) d'oxydation sur une période de 20 jours. Les matrices étudiées ont été placées en triplicat dans un incubateur (KS4000i control, IKA), et un test de stockage a été mis en place dans des conditions d'oxydation accélérée à 40°C et sous agitation à 110 rpm. Des prélèvements ont été effectués à J0, J1, J3, J6, J9, J12, J15 et J20 afin de réaliser les analyses nécessaires au suivi de l'oxydation des lipides contenus dans les matrices considérées.

II.4.1. Valeur de peroxyde

L'indice de peroxyde (PV) est utilisé pour décrire l'état d'oxydation des graisses végétales ou animales, exprimé en milliéquivalents d'oxygène réactif par kilogramme de matière grasse. Le test utilisé pour déterminer la valeur de PV est basé sur la mesure de la concentration en oxygène lié par kilogramme de matière grasse, et conduisant à la formation de produits primaires d'oxydation comme les hydroperoxydes, des espèces chimiques particulièrement instables (Shantha & Decker, 1994). Pour chacun des prélèvements, 250 µL d'échantillon ont été dilués dans 500 µL d'un mélange MeOH/BuOH (3/1, v/v), puis mélangés au vortex pendant 10s. 30 µL ont ensuite été placés dans une microplaque (UV-Star 96 puits, greinier bio-one) avec 230 µL de MeOH/BuOH (3/1 v/v), 2,5 µL de solution de chlorure de fer, et 2,5 µL de thiocyanate d'ammonium (30%). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance a été mesurée à 532 nm par un lecteur de microplaque (Nanoquant Infinite 200 Pro, TECAN, Gröedig, Autriche).

II.4.2. Substances réactives de l'acide thiobarbiturique (TBARS)

La méthode TBARS permet de mesurer la concentration en malondialdéhyde (MDA), un produit secondaire de réaction de la peroxydation des AGPI, exprimé en mmol d'équivalent de MDA par kg d'huile. Le MDA est produit par la dégradation d'un lipide peroxyde instable, dont la formation a été décrite dans la partie II.1.1 du Chapitre 1 de ce manuscrit. En présence de deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), le MDA va réagir et conduire à la formation d'un complexe coloré qui peut alors être quantifié (Dasgupta & Klein, 2014). Pour chacun des prélèvements, 50 μ L d'aliquot ont été mélangés à 50 μ L d'eau UP et 200 μ L d'une solution contenant 15% massique d'acide trichloroacétique (TCA), 0,375% (p/v) de TBA, et 0,25 M d'acide hydrochlorique. Le mélange a ensuite été placé dans de l'eau à 90°C pendant 15 minutes puis dans de la glace pendant 5 minutes, et centrifugé pendant 10 minutes à 7700 g (centrifugeuse 5427, Eppendorf). 200 μ L du mélange ont ensuite été introduits dans une microplaque et l'absorbance a été mesurée à 532 nm avec un lecteur de microplaque.

III – Mesures interfaciales à l'échelle moléculaire - caractérisation biophysique des monocouches de lipides à l'interface air/eau

Les monocouches lipidiques et leurs interactions avec les enzymes digestives ont été étudiées à l'interface air/eau. Depuis le milieu du 20^{ème} siècle, les monocouches lipidiques sont utilisées pour mimer un des feuilletts de la membrane lipidique, organisée en bicouche, des cellules biologiques. Elles constituent un système plan très bien défini, parfaitement adapté à l'étude des interactions intermoléculaires au sein des membranes lipidiques, ainsi que des interactions lipides-protéines (Botet-Carreras et al., 2019; Sarkis & Vié, 2020). Expérimentalement, la formation de ces films monomoléculaires à l'interface air/eau est réalisée grâce à l'utilisation d'une cuve dite de Langmuir. Ce système est équipé de barrières coulissantes, permettant de travailler dans des

CHAPITRE 2

conditions de température et de pression de surface contrôlées. Une pression de surface située entre 30 et 40 mN/m a notamment été proposée dans la littérature comme la pression latérale d'équivalence entre les monocouches interfaciales et les membranes cellulaires naturelles dans le cas des globules rouges (Marsh, 1996, 2007).

Irving Langmuir est un chimiste et physicien américain dont les recherches sur les films moléculaires lui ont permis d'obtenir un prix Nobel de Chimie en 1932 (Blodgett, 1935; Blodgett & Langmuir, 1937). Pour former un film de Langmuir, la première étape consiste à déposer des lipides à la surface de la cuve grâce à une seringue de haute précision Hamilton (**Figure 17**).

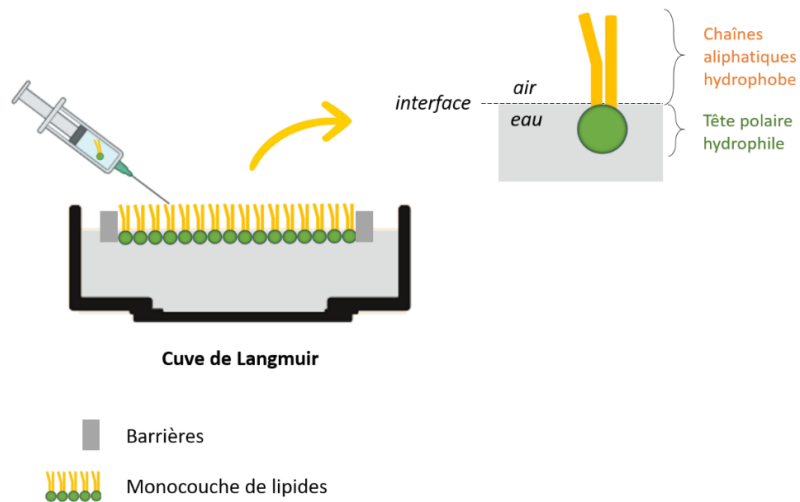


Figure 17 - Principe de la cuve de Langmuir et organisation d'une monocouche de lipides à l'interface air/eau.

De par leur nature amphiphile, ces molécules s'organisent spontanément à la surface du liquide, laissant le solvant s'évaporer. Les têtes polaires hydrophiles développent des interactions favorables avec la sous-phase, tandis que les chaînes aliphatiques s'orientent vers l'air, formant ainsi une couche monomoléculaire à l'interface air/liquide. Les barrières mobiles vont permettre la maîtrise de l'aire disponible aux molécules interfaciales. La cuve est également équipée d'un système de transfert du film interfacial sur support solide appelé transfert de Langmuir-Blodgett,

et développé par M. Blodgett lors de ces travaux avec I. Langmuir. Plusieurs techniques biophysiques permettent de caractériser les films de Langmuir, soit directement à l'interface liquide : la tensiométrie, l'ellipsométrie, soit après transfert : la microscopie à force atomique.

III.1 – Tensiométrie

Le phénomène de tension de surface a été décrit pour la première fois en 1916 par I. Langmuir au congrès de l'American Physical Society à Cleveland. Les résultats de ses travaux sur des films d'huile à la surface de l'eau lui ont permis de proposer une théorie selon laquelle « la structure de la couche superficielle des atomes est considérée comme le facteur principal déterminant la tension de surface d'un liquide » (Langmuir, 1917). Cette théorie stipule que les molécules présentes dans un liquide organique s'autoorganisent de telle façon que la partie de leur structure de plus forte énergie s'oriente vers la solution aqueuse, tandis que la partie possédant une charge énergétique plus faible vient former une couche superficielle à l'interface air/eau. Ainsi, les molécules formant la couche interfaciale s'organisent de manière à ce que l'énergie de surface impliquée soit minimale.

III.1.1 – Principe de mesure de la pression de surface

La méthode de Wilhelmy (Wu et al., 1999) est utilisée dans nos expériences pour suivre en temps réel, et donc tout au long des cinétiques, le paramètre que l'on appelle la pression interfaciale. Cette pression correspond à la différence entre la tension de surface de l'eau pure ($\gamma_0 = 72,8$ mN/m à 20°C), et celle du film interfacial (1). Notée π (ou PI, en mN/m), elle est obtenue grâce à une balance de Wilhelmy, qui mesure l'évolution de la force résultante dirigée perpendiculairement à l'interface air/eau, exercée sur une lame rectangulaire en papier filtre en contact avec l'interface (**Figure 18**). L'évolution de la force ne dépend que du changement de tension superficielle.

$$(1) \pi = \gamma_0 - \gamma$$

Les molécules tensioactives déposées à l'interface interagissent et s'organisent de telle façon à abaisser au maximum l'énergie de surface. Si le nombre de molécules augmente, ou si l'aire par molécule diminue, la différence entre la tension de surface de l'eau pure et la tension de surface couverte par le film de molécules devient alors de plus en plus importante. Cela se traduit par une augmentation de la pression de surface. Ainsi, l'évolution de la pression de surface est directement reliée aux interactions entre les molécules présentes à l'interface : plus les molécules interagissent, et plus la pression augmente. Au contraire, si la pression diminue, cela traduit une baisse d'interactions entre les molécules à l'interface air/eau, qui peut être induite par une perte de matière à l'interface, une distance trop importante, ou encore des interactions non-favorables entre les molécules.

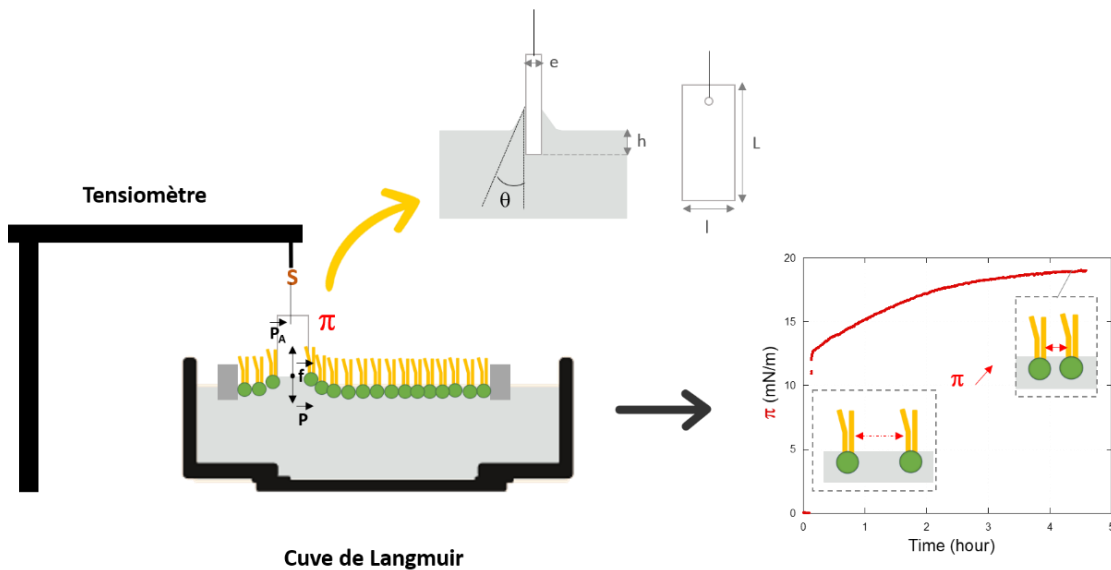


Figure 18 - Principe de mesure de la pression de surface par la lame de Wilhelmy.

III.1.2 – Etude de la compressibilité des monocouches de lipides

L'isotherme de compression est le suivi de la pression de surface du film lors de la diminution de l'aire interfaciale (déplacement des barrières). Le film monomoléculaire peut transiter par plusieurs phases physiques. A une faible pression de surface, l'aire moléculaire occupée par les lipides est grande, et la monocouche se trouve dans un état gazeux (G). En diminuant l'aire disponible, les interactions entre les lipides se font plus importantes, la pression augmente, et la monocouche transite alors vers un état liquide expansé (LE), puis vers une phase appelée liquide condensé (LC) plus ordonnée si la composition lipidique de la monocouche le permet (Dervichian, 1939). Les changements de pentes, ou plateaux, sur l'isotherme témoignent de la présence de transitions de phases.

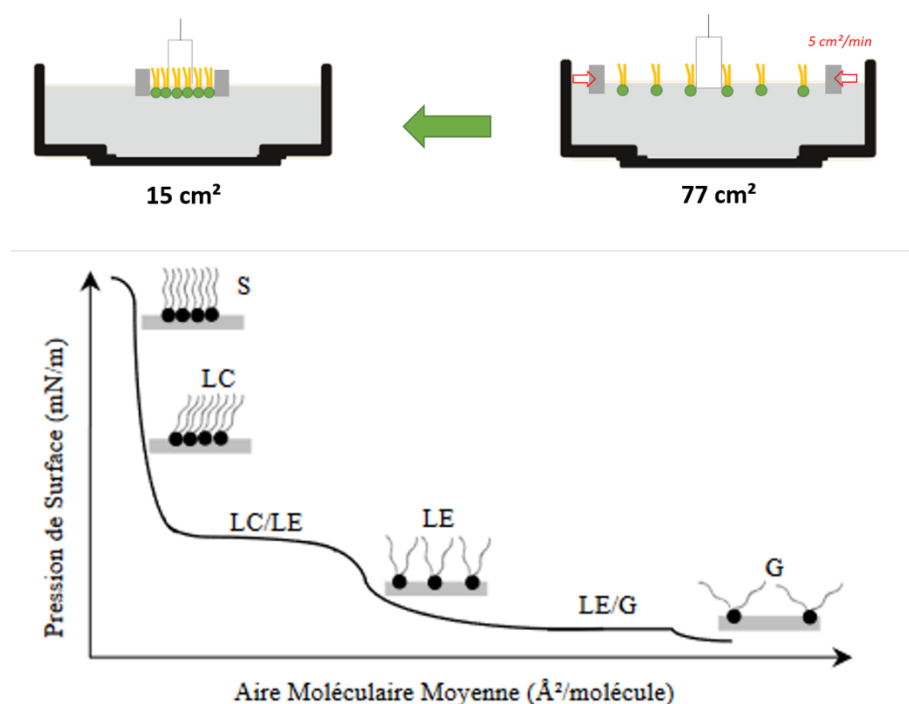


Figure 19 - Isotherme de compression des monocouches de lipides - Adapté de Bottier (2006).

La Figure 19 présente l'isotherme associée à la compression d'une monocouche de lipides purs ayant des propriétés d'organisation importantes à des valeurs élevées de pression de surface. A

CHAPITRE 2

partir d'une certaine pression de surface, la monocouche ne peut plus être comprimée, ce qui signifie qu'elle a atteint sa limite de compressibilité. Si cette pression de surface limite est dépassée, le film se rompt, un phénomène également appelé « collapse ». La pression de collapse d'une monocouche peut varier selon le type de film monomoléculaire considéré, et dépend de la composition en têtes polaires et en chaînes acyles des lipides.

III.1.3 – Technique de Langmuir-Blodgett

Contrairement à l'ellipsométrie et la tensiométrie, la microscopie à force atomique (AFM) ne peut pas être mise en œuvre *in situ*, et nécessite de prélever l'interface. A cet effet, la technique de Langmuir-Blodgett permet de transférer à pression constante le film de Langmuir sur un substrat solide plongé perpendiculairement au niveau de l'interface air/eau (**Figure 20**). Le dispositif de prélèvement se présente sous la forme d'une pince permettant la fixation du substrat, et dont le déplacement est piloté à distance *via* le logiciel dédié sur le poste fixe.

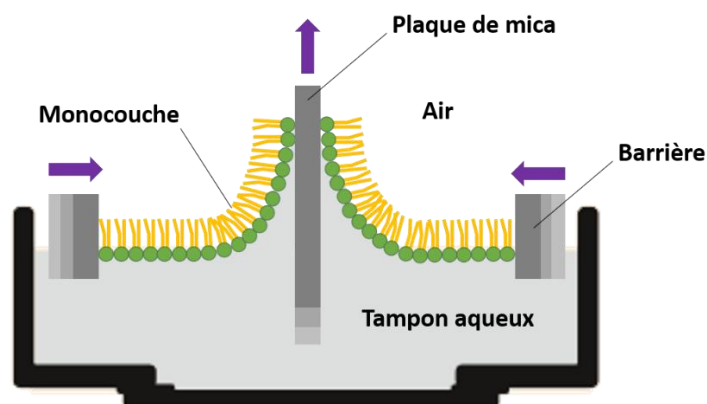


Figure 20 - Méthode de prélèvement de Langmuir-Blodgett sur plaque de mica.

La nature du substrat solide dépend du type de molécule ainsi que des techniques de caractérisation nécessitant son utilisation. Dans nos travaux, un substrat hydrophile a été utilisé : le mica. Ce minéral est caractérisé par sa structure en feuillets (phyllosilicates), faciles à séparer les uns des autres par simple clivage de sa surface. Le mica clivé possède la plus faible rugosité de surface

(surface atomiquement plane), adaptée à l'étude de la topographie de films monomoléculaires dont les variations de hauteurs sont inférieures au nm.

III.2 – Ellipsométrie

III.2.1 – Principe

L'ellipsométrie est une méthode d'analyse non-destructive qui se base sur la mesure des changements de polarisation d'un faisceau lumineux lorsque celui est réfléchi sur une interface solide ou liquide. Dans nos expériences, l'ellipsométrie est utilisée dans une configuration « à annulation », ce qui permet de caractériser des monocouches plus fines qu'une longueur d'onde visible. L'angle ellipsométrique (Δ , °) correspond à l'extinction de la lumière réfléchie par l'interface par un analyseur, et représente le déphasage entre la lumière polarisée perpendiculairement (p) et parallèlement (s) au plan d'incidence avant et après réflexion (Azzam et al., 1978). L'angle ellipsométrique dépend des propriétés optiques de l'interface à travers son indice de réfraction et son épaisseur. Dans le cas d'une interface liquide, et dans le but de suivre les changements interfaciaux induits par la présence de lipides et/ou de protéines, la référence est l'eau (ou le tampon) contenu(e) dans la cuve, et le montage est calibré pour obtenir une valeur de 0 à l'interface air/eau pure (Bénarouche et al., 2017; Berge & Renault, 1993).

III.2.2 – Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est décrit **Figure 21**. Un faisceau laser He-Ne ($\lambda=632,8$ nm) polarisé linéairement (polariseur Glan-Thompson, **P**, Melles Griot) est envoyé sur la surface de la cuve de Langmuir avec un angle d'incidence de $52,12^\circ$, correspondant à l'angle de Brewster moins 1° . Après réflexion sur la surface liquide, le rayon lumineux a une polarisation elliptique, avant de passer par une lame quart d'onde ($\lambda/4$), permettant ainsi d'obtenir une polarisation à nouveau

linéaire. Le rayon traverse ensuite un analyseur (**A**), et est détecté par un photomultiplicateur (**PM**). La valeur de l'angle ellipsométrique (Δ) est obtenue comme le double de la valeur de l'angle de l'analyseur, et correspond à la différence de phases entre la polarisation parallèle et perpendiculaire de la lumière réfléchie. Elle est particulièrement sensible à toute variation de l'indice de réfraction et de l'épaisseur de la couche interfaciale, et permet d'obtenir des valeurs avec une incertitude de $\pm 0.5^\circ$. Le faisceau laser éclaire une surface de 1 mm^2 et est impacté par les modifications moléculaires sur une profondeur de l'ordre de $1 \mu\text{m}$.

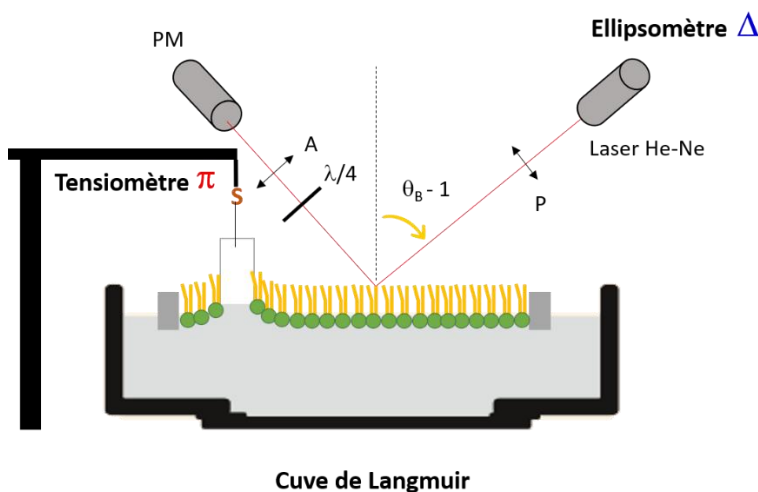


Figure 21 - Montage expérimental de l'ellipsomètre à annulation couplé à la mesure de pression de surface.

III.3 – Microscopie à force atomique

Le microscope à force atomique a été inventé en 1985 par Gerd Binnig, Christoph Gerber et Calvin F. Quate (Binnig et al., 1986). Cet outil permet d'obtenir la topographie à haute résolution de surfaces planes sur lesquelles sont absorbés des substrats d'intérêt, et peut notamment être appliqué à l'étude *in situ* des membranes biologiques (Balashev et al., 2001, 2007). Ici, l'AFM a été utilisée pour visualiser la surface des échantillons prélevés sur plaque de mica grâce à la méthode de Langmuir-Blodgett à l'interface fluide décrite ci-dessus.

III.3.1 – Principe

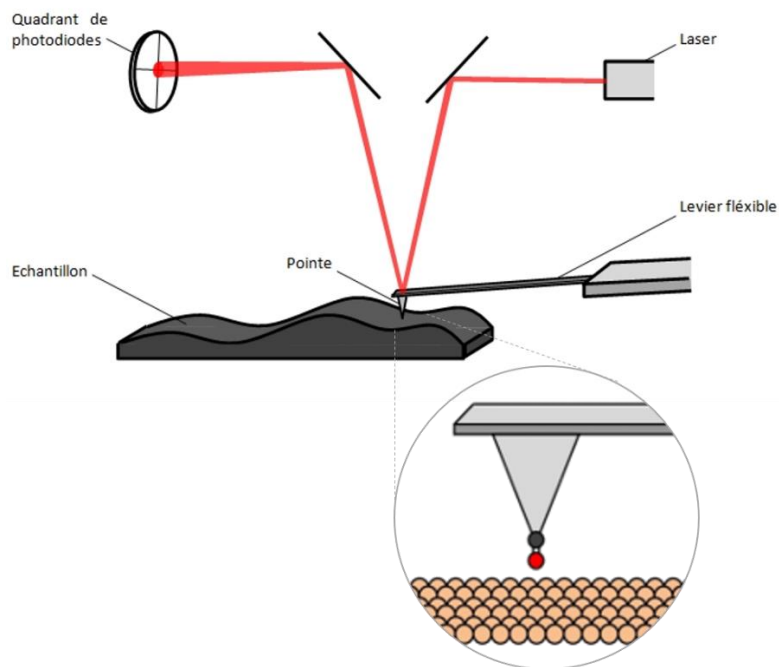


Figure 22 - Principe de fonctionnement et éléments composant un microscope à force atomique. Adapté de CC BY-NC 2.0 FR.

Le microscope à force atomique permet d'analyser une surface pour en donner sa topographie. Un levier flexible équipé d'une pointe nanométrique scanne la surface point par point, grâce à un assemblage de tubes piézoélectriques permettant de déplacer l'échantillon dans les trois directions de l'espace (**Figure 22**). Le principe de l'AFM est basé sur la mesure des interactions attractives et répulsives entre les atomes de la pointe et ceux composant la surface de l'échantillon, ce qui va induire une déflexion du levier. Les flexions du levier sont suivies par l'intermédiaire d'un faisceau laser qui se réfléchit sur la surface du levier vers un détecteur (4 quadrants). Sa position sur le détecteur permettra d'obtenir des informations sur les variations de topographie de l'échantillon, puisque l'imagerie se fait suite à la minimisation de la force d'interaction pointe/échantillon.

III.3.2 – Mode de fonctionnement

L'AFM (Multimode Nanoscope 8, Bruker, France) a été utilisé en mode QNM (*Quantitative Nanomechanical Mapping*) in air. Dans ce mode, l'échantillon vibre à une certaine amplitude, qui est réajustée en temps réel par le suivi des courbes d'approche-retrait. Ainsi, la pointe n'est en contact avec l'échantillon que par intermittence. Par un contrôle des forces point par point, ce mode diminue les risques d'altération de la pointe, et l'endommagement de l'échantillon. Les images AFM obtenues à haute résolution permettent de visualiser la surface topographique des échantillons à l'échelle nanométrique. Pour toutes les expériences, une pointe standard en silicone a été utilisée (0,06 N/m, SNL-10, Bruker, France), à une vitesse de balayage de 1 Hz.

III.3.3 – Traitement des images

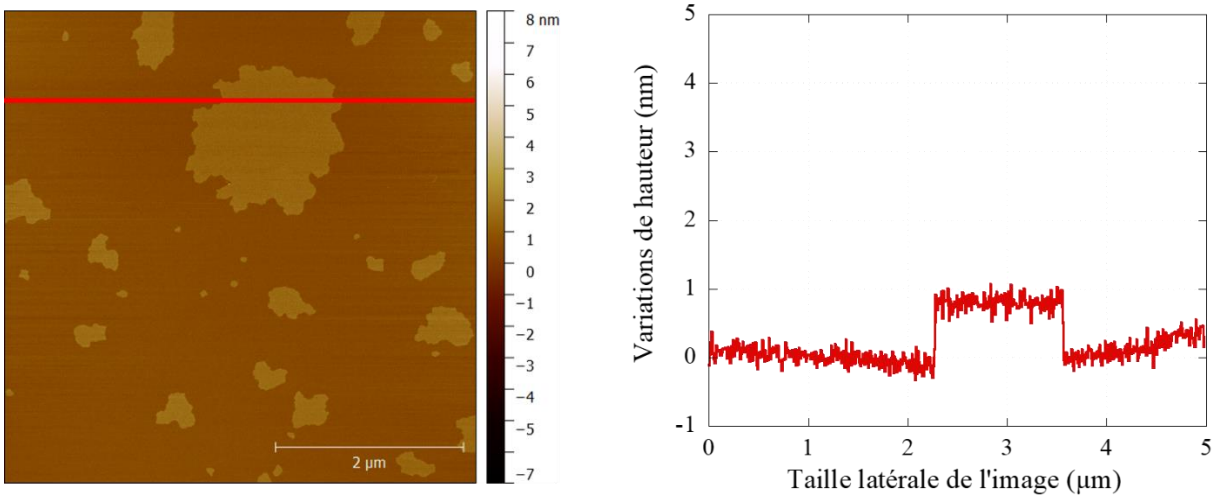


Figure 23 - Traitement des hauteurs d'une image AFM.

Les images enregistrées ont une taille de 512 pixels par 512 pixels. Sur l'image « hauteur », l'échelle de couleur correspond à la variation de hauteur de la surface de l'échantillon. Le logiciel Gwyddion a été utilisé pour traiter l'intégralité des images « hauteur » obtenues dans cette étude (flatten, étalement de l'échelle de couleur). L'échelle de couleur a notamment été utilisée pour permettre de visualiser la topographie de surface des échantillons. Ainsi, pour chaque image AFM

présentée dans ce manuscrit, la couleur la plus foncée correspond au niveau le plus bas de la surface, tandis que, réciproquement, la couleur la plus claire correspond au niveau le plus élevé (Figure 23).

IV – Mesures cinétiques de dégradation à l'échelle de l'objet - dégradation des liposomes de lipides végétaux en système statique par les enzymes gastro-intestinales

IV.1. Les liposomes

IV.1.1. Généralités sur les liposomes

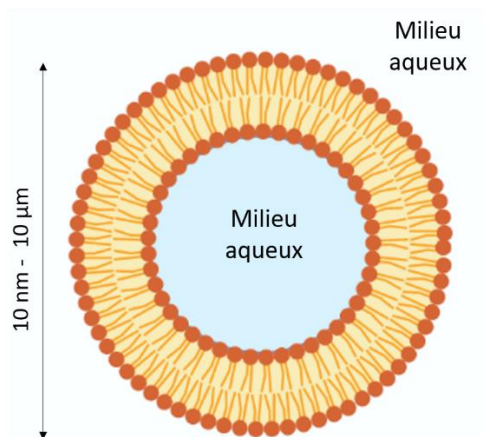


Figure 24 - Structure d'un liposome.

Les liposomes, dont la structure est décrite **Figure 24**, sont des vésicules sphériques artificielles formées par une bicouche lipidique concentrique hydrophobe enfermant un compartiment aqueux en son centre (Deshpande et al., 2016). Leur taille peut varier de 10 nm à plusieurs micromètres (Akhavan et al., 2018). Leur première découverte remonte à l'année 1965, lors de l'observation au microscope électronique d'une dispersion de phospholipides dans l'eau par l'hématologue britannique Alec D. Bangham. Les liposomes ont dès lors été utilisés en tant que modèles membranaires en raison de leurs propriétés proches des bicouches composant les membranes

CHAPITRE 2

cellulaires. A partir de 1971, la capacité des liposomes à encapsuler des médicaments a également été soulignée (Liu et al., 2020). Aujourd'hui, les liposomes ont trouvé des applications dans de nombreux secteurs, et représentent des candidats prometteurs au développement d'ingrédients fonctionnels pour la vectorisation d'une vaste gamme de molécules alimentaires, hydrophiles ou hydrophobes (Mohammadi et al., 2015).

La méthode conventionnelle de préparation des liposomes s'effectue en dispersant des lipides amphiphiles (par exemple des phospholipides, galactolipides, etc..) dans un milieu aqueux après formation d'un film lipidique mince. Cette méthode de dispersion est l'une des plus utilisées, et consiste à dissoudre le matériel lipidique dans un solvant organique. Après évaporation du solvant organique sous atmosphère inerte, un film mince de lipides se forme, puis, lors de l'ajout d'une solution aqueuse, les lipides se dispersent après auto-assemblage, conduisant à des structures liposomales thermodynamiquement métastables. Plus précisément, l'effet hydrophobe va induire une organisation des chaînes acyles des lipides de telle façon à former un compartiment hydrophobe, tandis que les résidus polaires vont s'orienter vers le milieu aqueux, formant ainsi une bicouche concentrique. Des interactions de van der Waals et des liaisons hydrogènes entre les lipides et les molécules d'eau vont également participer à l'organisation en bicouche des molécules amphiphiles (Islam Shishir et al., 2019). Ces structures sont alors extrudées pour obtenir des liposomes de tailles bien déterminées.

Dans notre étude, je me suis intéressée à la dégradation de liposomes riches en galactolipides, extrudés à 1 μm (ou GUV – Giant Unilamellar Vesicles), par les enzymes digestives humaines, afin de déterminer leur potentiel en tant qu'ingrédients vecteurs d'AGPI $\omega 3$.

IV.1.2. Préparation des liposomes de 1 μm

Les liposomes ont été préparés à partir des mélanges lipidiques modèles, ainsi qu'à partir des lipides totaux extraits des fragments membranaires de *Ch. vulgaris* Purasana.

Pour chaque système étudié, 400 μL de mélange lipidique ont été préparés à 5 mg/mL, puis évaporés à 45°C dans un petit ballon. Après évaporation, 2 mL de tampon Tris-HCl et 2 billes de verre ont été ajoutés pour faciliter la dispersion. Les solutions ont ensuite été mélangées pendant 2 min au vortex, puis chauffées à 55°C pendant 1 min, refroidies dans la glace pendant 1 min puis mélangées à nouveau pendant 30 s. Ces étapes ont été répétées 10 fois pour obtenir des vésicules multilamellaires. Les vésicules ont ensuite été extrudées 10 fois (extrudeur Avanti Polar Lipids, Alabama, USA) sur une membrane de 1 μm en utilisant des seringues de 500 μL afin d'obtenir les vésicules unilamellaires.

IV.2. Dégradation enzymatique intestinale des liposomes modèles et extraits des membranes de microalgues chlorelle – système statique

La dégradation intestinale des liposomes des systèmes lipidiques modèles et des extraits de microalgues chlorelle a été étudiée dans des conditions homogènes en présence de sels biliaries.

Protocole de suivi cinétique de dégradation

Les liposomes ont été incubés dans un tampon Tris HCl (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7) contenant la gPLRP2 ou la sPLA-IB (3,2 $\mu\text{g/mL}$), en présence de NaTDC (4 mM, valeur de CMC). Dans le cas de la gPLRP2, des aliquots de 100 μL ont été prélevés après 5 minutes ($T_{5\text{min}}$) d'incubation, tandis qu'avec la sPLA-IB, les prélèvements ont été réalisés après 60 minutes ($T_{60\text{min}}$). A partir de ces prélèvements, les substrats lipidiques initiaux (témoin, T_0) et les produits de lipolyses (après incubation avec les enzymes), ont été extraits par méthode Folch et analysés en

CHAPITRE 2

CCM (cf. chp II.2 mais un solvant de migration différent : CHCl₃/MeOH/H₂O, 95/20/2,5 v/v/v) pour déterminer leur concentration. Il a ainsi été possible de suivre l'activité enzymatique respectivement, de la gPLRP2 et de la sPLA2-IB, en présence de sels biliaries, sur les liposomes unilamellaires des systèmes lipidiques modèles et extraits de microalgues Purasana.

CHAPITRE 3

**CARACTÉRISATION INITIALE DES
ASSEMBLAGES ET SYSTÈMES
LIPIDIQUES MODÈLES ET NATURELS
VÉGÉTAUX**

Table des matières du chapitre 3

I – Organisation interfaciale et comportement de phases des systèmes modèles de galactolipides à l’interface air/eau et en mésophases hydratées.....	113
Article de recherche - Kergomard et al., Colloids and Surface B : Biointerfaces, 2022	113
Principaux résultats de l’étude	140
II - Caractérisation du comportement interfacial des monocouches de lipides extraits de systèmes naturels	141
II.1 – Caractérisation du comportement interfacial des lipides totaux extraits de <i>Chlorella vulgaris</i> versus <i>Chlorella sorokiniana reyto</i>	141
II.1.1 - Caractérisation chimique.....	142
II.1.2 – Comportement interfacial des monocouches de lipides de chlorelles à 20 mN/m	144
II.2 – Caractérisation du comportement interfacial des lipides membranaires d’oléosomes : noix versus amandes.....	149
II.2.1 - Caractérisation chimique des oléosomes extraits des noix et des amandes	149
II.2.1 – Comportement interfacial des monocouches de lipides extraits des membranes d’oléosomes de noix et d’amandes.....	151
Principaux résultats de l’étude	154
III – Caractérisation initiale du comportement oxydatif et interfacial des assemblages membranaires isolés	155
III.1 - Caractérisation de la stabilité oxydative des liposomes de lipides totaux extraits de <i>Ch. vulgaris</i> et du comportement interfacial de la poudre de chlorelle déshydratée (Purasana)	155
III.1.1 - Stabilité oxydative des liposomes de lipides totaux extraits des chlorelles <i>Ch. vulgaris</i> commerciales Purasana	156
III.1.2 – Capacité tensioactive et comportement interfacial de la poudre de chlorelles déshydratées Purasana à l’interface air/eau.....	157
III.2 – Stabilité à l’oxydation et comportement interfacial des oléosomes de noix	161
Article de recherche- Kergomard et al., Food Chem, 2021	161
Principaux résultats de l’étude	189

CHAPITRE 3 - RÉSULTATS

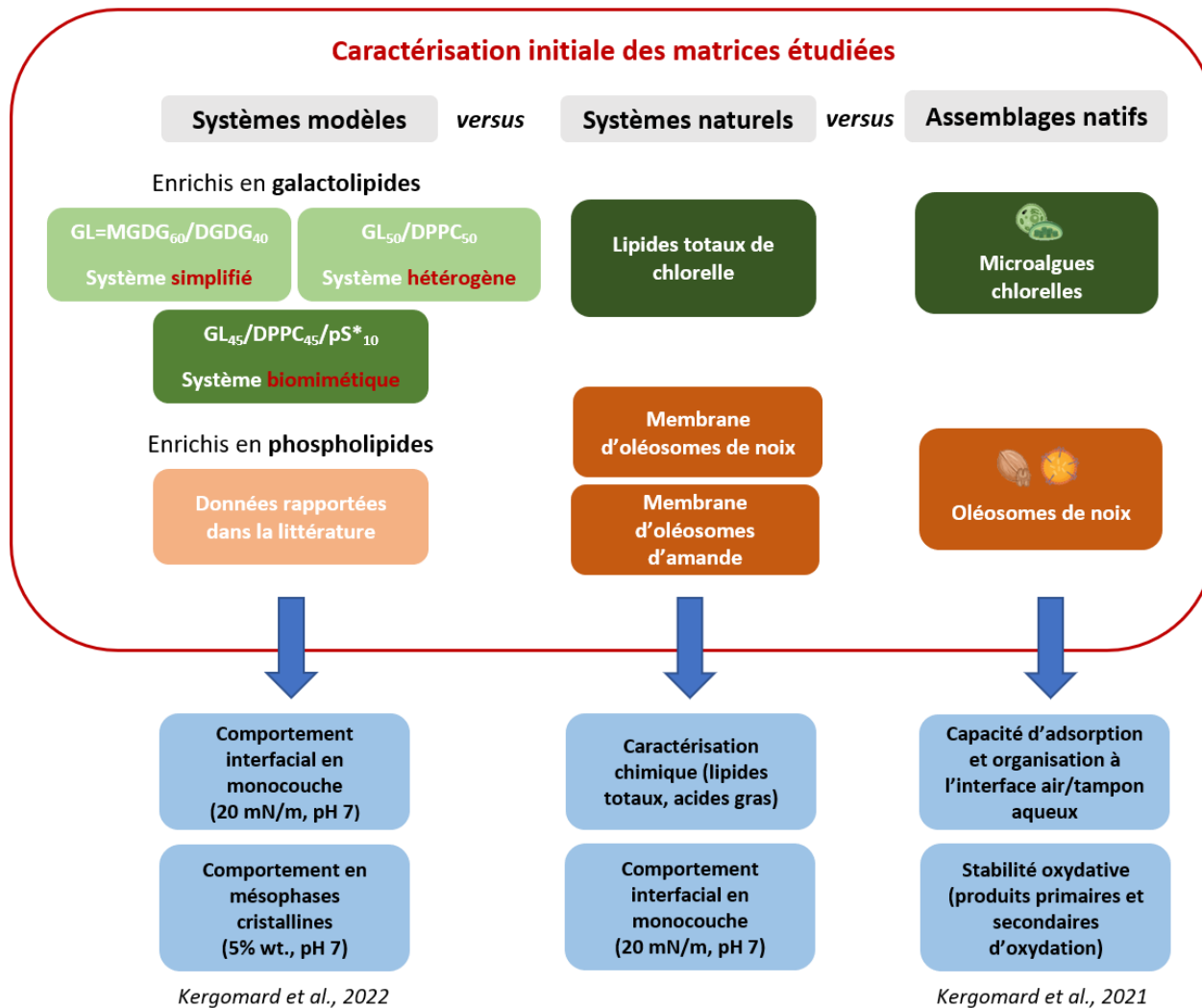


Figure 25 - Stratégie du chapitre 3.

CHAPITRE 3 – Caractérisation initiale des assemblages et systèmes lipidiques modèles et naturels végétaux

Ce chapitre est dédié à la présentation des résultats de caractérisation initiale des mélanges lipidiques modèles et extraits des matrices naturelles, ainsi que des assemblages naturels isolés.

Trois systèmes modèles ont tout d'abord été étudiés, afin de caractériser leur comportement de phase en monocouche et en mésophase aqueuse. La contribution des concentrations des constituants sur la structure globale des mélanges et sur leur miscibilité a notamment été déterminée, et a fait l'objet d'un article dans le journal *Colloids and Surface B : Biointerfaces*, publié en 2022.

Les lipides extraits des matrices naturelles (microalgues chlorelles versus membranes d'OB de noix et d'amandes) ont ensuite été caractérisés en termes de comportement interfacial et de compressibilité des monocouches.

Enfin, les deux objets microniques du végétal (chloroplastes versus OB) ont été caractérisés sous leur forme d'assemblage natif, afin de déterminer leur stabilité à l'oxydation et leurs propriétés tensioactives. Une attention particulière a été donnée au comportement interfacial et à la stabilité des OB de noix en fonction de leur ultrastructure (peu transformé versus en appliquant des procédés de transformation couramment utilisés en agroalimentaire).

Ces résultats ont été déterminés afin de servir de base à la compréhension des interactions lipides-enzymes impliquées dans la digestion des lipides chez l'Homme.

I – Organisation interfaciale et comportement de phases des systèmes modèles de galactolipides à l’interface air/eau et en mésophases hydratées

Article de recherche - Kergomard et al., Colloids and Surface B : Biointerfaces, 2022

Interfacial organization and phase behavior of mixed galactolipid-DPPC-phytosterol assemblies at the air-water interface and in hydrated mesophases

Name(s) of Author(s) Jeanne Kergomard^{1,2}, Frédéric Carrière³, Gilles Paboeuf¹, Franck Artzner¹, Nathalie Barouh^{4,5}, Claire Bourlieu² & Véronique Vié^{1,6*}

ABSTRACT

The structural behavior of model assemblies composed of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG), the two main galactolipids found in plants, was investigated at the air/water interface and in aqueous dispersion. To approach the composition of the natural photosynthetic membranes, tunable Langmuir model membrane of galactolipids were used, and were complexified to form either heterogenous binary or ternary assemblies of galactolipids, phospholipids, and phytosterols.

The impact of pS, 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) or both on the structural properties of galactolipid membrane was studied. The nature of the interactions between the different molecules was investigated using biophysical characterizations (ellipsometry, tensiometry, atomic force microscopy). In addition, the phase behavior was determined by SAXS analysis on the model assemblies in aqueous dispersions.

Results revealed the good interfacial stability of these specific plant membrane lipids. The morphology of the galactolipid film was characteristic of a fluid phase, with an interfacial roughness induced by the intercalation of monogalactosyl and digalactosyl polar heads of MGDG

and DGDG, respectively. A phase heterogeneity in the monolayer was induced by the addition of DPPC and/or pS, which resulted in the modification of galactolipid organization and headgroup interactions. These structural changes were confirmed by SAXS analysis, showing more favorable interactions between MGDG and DPPC than between DGDG and DPPC in aqueous dispersion. This phenomenon was exacerbated in the presence of phytosterols.

KEYWORDS: galactolipid, phytosterols, natural surfactant, vegetal photosynthetic assemblies

1 INTRODUCTION

Galactolipids are the most abundant polar lipids found in higher plants. These glycolipids are actively involved in the structuration of the plant membranes and are particularly concentrated in the photosynthetic chloroplast membranes (80% wt. of total non-pigmented lipids), which contain large amounts of monogalactosyldiacylglycerol (MGDG, 53% wt.) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG, 27% wt.) (Gurevich et al., 1997). MGDG possess a small 1- β -galactose polar head bound to a diacylglycerol, giving it a conical shape, which can induce curvatures in lamellar phases (Lee, 2000). On the other hand, DGDG has a larger polar head with an additional α -galactose, linked to β -galactose (Mizusawa & Wada, 2012) and adopts a cylindrical shape in solution. Both galactolipids possess two esterified acyl chains at the *sn*-1 and *sn*-2 position of the glycerol backbone, whose molecular motion depends on the number of unsaturation.

Due to their different structure, MGDG and DGDG exhibit distinct phase behaviors, which govern the overall membrane architecture (Fig. 1). Indeed, studies on the phase behavior of galactolipids have shown that DGDG forms lamellar phases (L_{α}) and induces bilayer formation, whereas unsaturated MGDG tends to form inverted hexagonal structures (H_{II}) in aqueous solution (Brentel et al., 1985). In addition to their biological functions in photosynthetic membranes,

galactolipids are of nutritional interest since they are rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA), and their consumption provides essential ω 3 fatty acids (Sahaka et al., 2020).

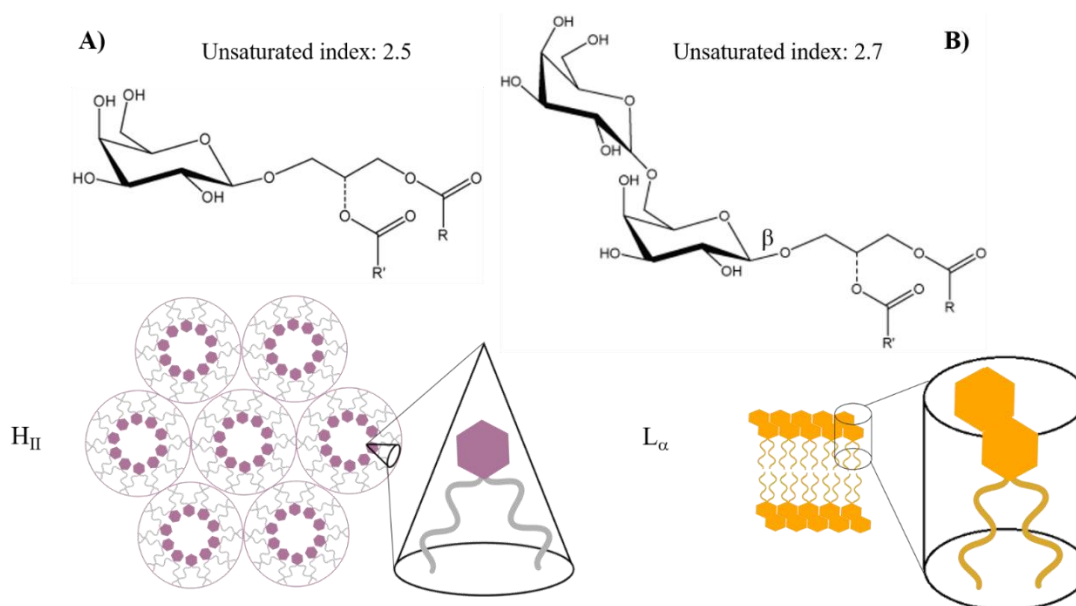


Figure 1 Molecular structure and phase behavior of A) monogalactodiacylglycerol (MGDG) and B) digalactosyldiacylglycerol (DGDG). L_α standing for lamellar phase and H_{II} standing for hexagonal inverted phase.

Phytosterols are also among the major compounds of photosynthetic plant membranes where they play crucial roles in regulating the physical properties of membranes (Evans, 1991; Ostlund, 2002). More than 250 species of phytosterols have been reported, the most abundant being β -sitosterol (70% wt.), stigmasterol (20% wt.) and campesterol (5% wt.) (Evans, 1991). These phytosterols in their free form participate in the structuration of membranes by stabilizing polar lipid bilayers, although to a lesser extent than their cholesterol counterpart in animal cell membranes (Moreau et al., 2002). Beyond their structural properties, phytosterols are also compounds of nutritional and medical importance. Their consumption from fruits and vegetables has been shown to lower the total cholesterol and LDL levels in plasma in humans (St-Onge & Jones, 2003). The interesting structural and nutritional properties of galactolipids and phytosterols

have raised interest in their use in various applications, which requires a deep understanding of the organization and interactions of these plant polar lipids.

The monolayer behavior of saturated galactolipids has already been extensively studied at the air/water interface (Hoyo et al., 2016; Tomoiaia-Cotișel et al., 1989). Nevertheless, it should be noted that galactolipid acyl chains in higher plants are mostly polyunsaturated, and thus less stable since they are more susceptible to oxidation (Tomoala-Cotișel et al., 1983). Monolayer studies have also been performed on galactolipid mixtures with unsaturation indices greater than 1, highlighting the differences in interfacial behavior between saturated and unsaturated galactolipids. Using Langmuir films, Bottier et al. (2007) studied the interfacial behavior of galactolipids from different wheat tissues and highlighted the miscibility of MGDG and DGDG in water but also their tendency to phase separation in mixture. Overall, interface organization and packing were governed by interactions between the sugar polar heads of galactolipids (Bishop et al., 1980), but also depended on their fatty acid composition and the number of unsaturations.

The impact of plant sterols in polar lipid bilayers has already been studied extensively, showing that they alter phase transitions and membrane fluidity (Itzhaki et al., 1990; McKersie & Thompson, 1979), depending on their chemical structure and concentration (Kamal & Raghunathan, 2012). The interactions between phytosterols and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) have also been studied in model Langmuir films at the air/water interface, and the incorporation of β -sitosterol and stigmasterol into phospholipid monolayers has been shown to increase their packing (Su et al., 2007). Nevertheless, to the best of our knowledge, few results are available today concerning the impact of phytosterols and phospholipids on galactolipid interactions and packing in monolayers.

The interfacial properties of MGDG and DGDG, as well as their modulation by DPPC and/or phytosterols in mixed Langmuir monolayers at the air/water interface were studied by ellipsometry, tensiometry and atomic force microscopy (AFM). The phase behavior and physical properties of these mixtures in hydrated mesophases were also studied by small angle X-ray scattering (SAXS).

2 EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Lipids

1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) were purchased from Avanti Polar Lipids (see Table S1 in the supplementary material for the fatty acid repartition). Canola phytosterols were a gift from Cognis France (Estarac, France) obtained from desodorization distillates of canola oil. Typical molar composition (calculated from usual normalized GC procedures) was: β -sitosterol (50 mol%), campesterol (40 mol%) and brassicasterol (10 mol%).

2.2. Preparation of multicomponent lipid blends

Table 1 - Molar composition of mixed Langmuir monolayers used as model membranes

Monolayer composition	
GL	MGDG/DGDG 60:40 mol/mol
GL ₅₀ /DPPC ₅₀	MGDG/DGDG/DPPC 30:20:50 mol/mol/mol
GL ₄₅ /DPPC ₄₅ /pS ₁₀	MGDG/DGDG/DPPC/pS 27:18:45:10 mol/mol/mol/mol

pS: β -sitosterol, campesterol, brassicasterol 50:40:10 mol/mol/mol

Simple binary mixture of MGDG and DGDG (60:40, mol/mol) was prepared, namely GL. Ternary and quaternary mixtures of glycerophospholipids, galactolipids and phytosterols (see Table 1 for

relative molar composition) were prepared to add some phase heterogeneity and to mimic the composition of natural plant photosynthetic membranes.

2.3 Ellipsometry and surface pressure measurements at the air/water interface

All reported experiments were performed at least in duplicate, using a computer controlled and user-programmable LB Teflon Langmuir trough (KSV Nima, Helsinki, Finland) of 77 cm², equipped with two mobile barriers, allowing to vary the surface. Before each experiment, the trough was carefully cleaned with ultrapure water and ethanol to get rid of the surface-active residual impurities. The surface pressure was measured using a Wilhelmy balance connected to a microelectronic feedback system (Nima Technology, Cambridge, UK). The values of surface pressure (π) were recorded every 15 s with a precision of 0.2 mN/m. A home-made automated ellipsometer in a “null ellipsometer” configuration was used to carry out the ellipsometric angle (Δ) measurement (Berge & Renault, 1993). The laser beam probed a surface of 1 mm² and a depth of 1 μ m and allowed the qualitative monitoring of the thickness of the lipid monolayer formed at the air/water interface. Values of Δ were recorded every 15 s with a precision of $\pm 0.5^\circ$.

2.3.1 Formation of the lipid monolayers and Langmuir Blodgett transfer

For all the characterizations, the aqueous phase was composed of a 10 mM Tris HCl buffer solution (100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM Tris) at pH 7. The monolayers were formed by spreading a few microliters of 1 mM solution of lipids in CHCl₃/MeOH (2:1, v/v) at the air/water interface using a Hamilton microliter syringe. The surface area of the Langmuir trough was set at 35 cm² and the lipids were deposited up to a surface pressure of 20 mN/m. The film was then equilibrated for 10 minutes before each measurement, allowing the evaporation of solvent and lipid organization at the air/water interface. After 10 minutes equilibrium, the interfacial film was transferred onto a

freshly cleaved mica plate, using the Langmuir Blodgett method (lipid-transfer ratio ~ 1.0). All lipid layers were sampled at a very low speed ($0.5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$) by raising vertically the mica plate through the air/water interface. The surface pressure was kept constant during the sampling to maintain the lateral organization of lipids and thus avoid desorption phenomena and interfacial disorganization.

2.3.2 Compression isotherms and compressibility modulus C^{-1}

The surface area of the Langmuir trough was set at 77 cm^2 before compression. Few microliters of 1 mM solution of lipids in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1, v/v) were spread at the interface until the pressure reaches 0.1 mN/m . The surface pressure as a function the surface area of the trough (π -A isotherm) was then recorded upon a symmetrical compression of the lipid monolayer using the two barriers, from 77 cm^2 to 21 cm^2 , until the collapse of the film. The barrier speed was set at $5 \text{ mm}^2/\text{min}$.

Compression isotherms allow to obtain several parameters on the behavior of monolayers under compression. The minimum molecular area corresponds to the mean molecular area occupied by the molecules at the collapse of the film and was calculated as the intercept value between the pressure plateau at collapse and the tangent at the end of the π -A isotherm. The lift-off area was determined as the mean molecular area occupied by the molecules when the pressure begins to increase under compression. Finally, the monolayer compressibility was obtained from the first derivate of π -A isotherm and the mean molecular area of lipids deposited at the interface (Gaines & Prigogine, 1966; Smaby et al., 1997). The equation (1) was used to determine the compressibility coefficient (C_s) of the monolayer.

$$(1) C_s = -\frac{1}{A} \times \frac{dA}{d\pi}$$

where π is the surface pressure and A is the mean molecular area of the lipids forming the monolayer, estimated from the surface of the trough and the amounts of lipids deposited. The reciprocal of compressibility coefficient, the compressibility modulus, i.e., C_s^{-1} was represented as a function of the mean molecular area ($\text{\AA}^2/\text{molecules}$). C_s^{-1} values were obtained at equally spaced surface pressures (0.2 mN/m intervals).

2.4. Topographic visualization of the monolayer interface using atomic force microscopy

Imaging of the films transferred to mica plates was carried out using an AFM (Multimode Nanoscope 8, Bruker, France). The PeakForce Quantitative Nanomechanical Mapping (QNM in air, 20°C) was used in all the experiments. This mode provides high-resolution AFM images of the sample nanoscale surface topography, as well as the modulus and adhesion, at an acquisition speed comparable to the tapping mode. A standard silicon cantilever was used (0.06 N/m, SNL-10, Bruker, France), and the scan rate was set at 1 Hz. The force was minimized during all scans and the scanner size was $100 \times 100 \mu\text{m}^2$. The processed images analyzed by the open-source platform Gwyddion are representative of at least duplicated experiments. The differences of height of the LC and LE domains were assessed by the plot of height profile based on three cross-sections of the image using the software Gwyddion (2.55). For all AFM images, the color scale covers a height range of 15 nm, with the darkest color corresponding to the lowest domains and the lightest color to the highest domains, the fluid background corresponding to zero. A color scale is provided in Figure 3 to facilitate interpretation of the images.

2.5. Determination of the phase behavior of the model lipid mixture in aqueous dispersions by SAXS

The phase behavior of the model lipid mixture was investigated in aqueous dispersions using X-ray scattering with a homemade set-up at the Rennes Physique Institute. The X-ray scattering results were collected with a Pilatus 300 K (Dectris, Switzerland), mounted on a microsource X-ray generator GeniX 3D (Xenocs, France) operating at 30 W. The monochromatic CuK α radiation was of $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$. The X-ray diffraction patterns were recorded in a reciprocal space $q = (4\pi \cdot \sin\theta)/\lambda$ from repetitive distances $q=0.012$ to 1.742 \AA^{-1} . Small Angle X-ray Scattering (SAXS) and Wide-Angle X-ray Scattering (WAXS) regions were used to determine the supramolecular organization (long range order) of the lipid/water systems and the packing of acyl chains (short range order), respectively. The samples were prepared by evaporation of the solvent containing the solubilized lipids and then hydration at 5% wt of the lipid films in a Tris buffer solution pH 7 (0.5 mg of lipids hydrated in 10 μL of Tris buffer). The samples were then introduced in thin calibrated quartz capillaries (\varnothing 1.5 mm, GLAS W. Muller, Berlin, Germany) before being centrifuged and sealed with candle wax. For the analysis, they have been introduced in a capillary holder accommodating 19 capillaries at controlled temperature. The homogeneity of the sample was checked at two y-positions. The analyses were carried out following a heating and cooling temperature ramp from 12 $^{\circ}\text{C}$ to 42 $^{\circ}\text{C}$ and 42 $^{\circ}\text{C}$ to 12 $^{\circ}\text{C}$, respectively, every 8 $^{\circ}\text{C}$ with an exposure time per point of 10 minutes. The results were collected by a homemade program and the positions of Bragg reflections were determined by the Igor Pro 7.0 software (Wavemetrics, US).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Study of the compression isotherms π -A of the GL_x/pS_y systems – influence of the pS concentration

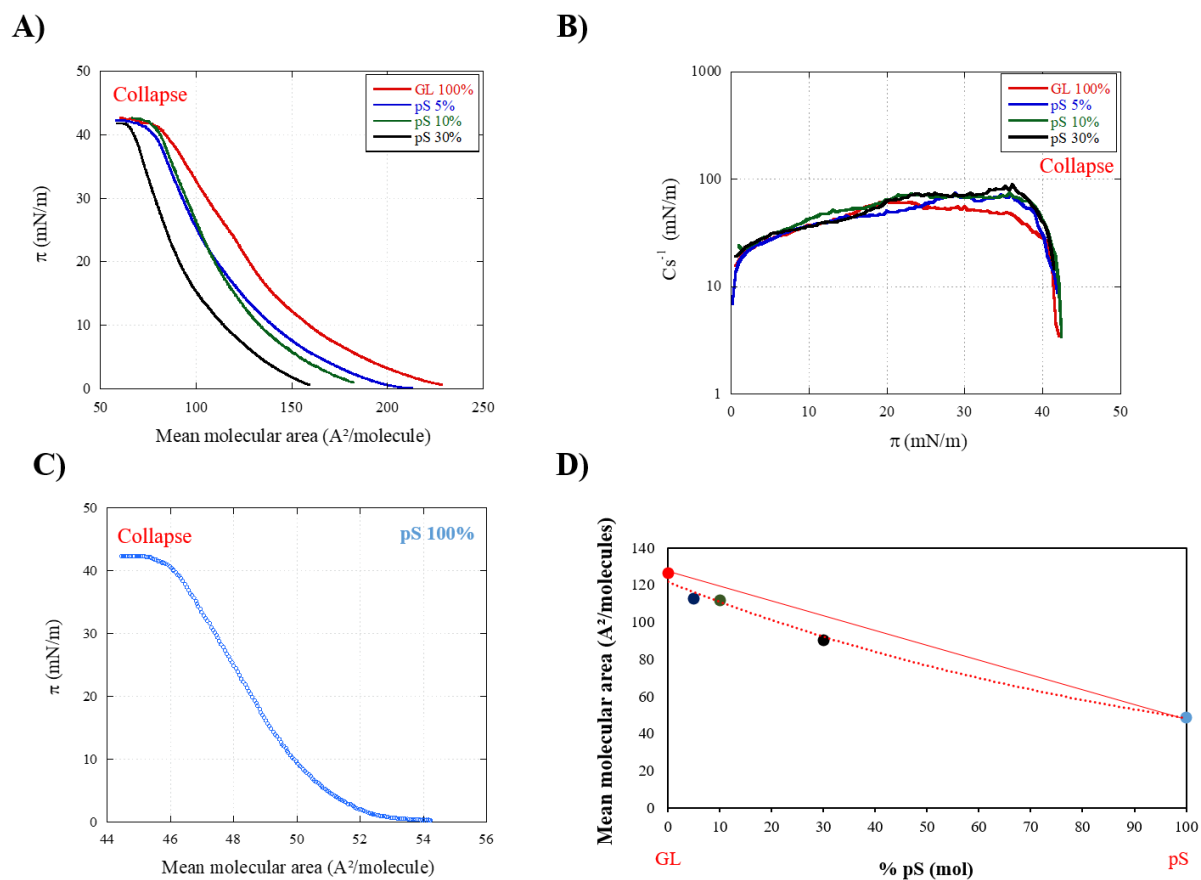


Figure 2 Compression isotherms of 1) GL (red), 2) GL_{95}/pS_5 (deep blue), 3) GL_{90}/pS_{10} (green), 4) GL_{70}/pS_{30} (black) monolayers at the air/water interface. A) The graph corresponds to the evolution of π (mN/m) as a function of the mean molecular area ($\text{\AA}^2/\text{molecules}$). B) The graph corresponds to the evolution of the surface compressibility moduli (C_s^{-1} , calculated following the equation (1)), as a function of π (mN/m) of 1), 2), 3) and 4). C) The graph corresponds to the evolution of π (mN/m) as a function of the mean molecular area ($\text{\AA}^2/\text{molecules}$) of the pure pS system. D) The graph corresponds to the mean molecular area ($\text{\AA}^2/\text{molecules}$) at 20 mN/m of each monolayer as a function of the percentage of pS in the systems (pure pS monolayer in light blue). The experiments were performed using Tris HCl buffer at pH 7 and were done in duplicate. Values of π were given with a standard deviation on duplicate measurements of ± 0.2 mN/m.

The absence of shoulder and/or inflection point on the compression isotherm of the GL mixture (Fig. 2.A) was characteristic of a homogeneous liquid-expanded (LE) single phase, which could be explained by the high unsaturation content of the mixture. Indeed, the unsaturations decreased the intensity of van der Waals interactions between the acyl chains, and could hinder the establishment of a tight packing between galactolipid molecules in the monolayer. The isotherm of the GL film indicated a lift-off area at around $230.8 \pm 1.8 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ ($2.3 \text{ nm}^2/\text{molecule}$) and showed a regular increase of the surface pressure until the collapse of the film at $\pi=39.9 \pm 0.2 \text{ mN/m}$ and at a limiting area of $81.0 \pm 0.6 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ ($0.8 \text{ nm}^2/\text{molecule}$). The evolution of the π -A isotherm of the GL film was consistent with the study of Bottier et al. (2007) on purified wheat MGDG and DGDG monolayers, pure or in mixture. Nevertheless, a higher collapse pressure of 47 mN/m had been obtained for the less unsaturated wheat MGDG/DGDG equimolar mixture, at a lower mean molecular area of $70 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ ($0.7 \text{ nm}^2/\text{molecule}$). This result was not surprising, as unsaturated acyl chains cannot adopt a very tight packing, which explains a larger average molecular area and a lower surface pressure at collapse as the number of unsaturation increases. The presence of unsaturations in the alkyl chains could also explain the significantly lower Cs_{max}^{-1} which was obtained for the GL monolayer in our study (Fig. 2.B) compared to the Cs_{max}^{-1} reported by Hoyo et al. (2016) on the 2:1 mixture of saturated galactolipids (48 versus 247 mN/m respectively). These values were determined for pressure values of interest, between 30 and 40 mN/m , $\pi=35 \text{ mN/m}$ having been proposed as the equivalence surface pressure between lipid monolayers and cellular bilayers (Marsh, 1996, 2007). This decrease in Cs_{max}^{-1} with increasing unsaturation number had also been reported by Gzyl-Malcher, Filek, Makyła, et al. (2008), reflecting the higher lateral elasticity of unsaturated monolayers compared to the saturated ones.

The addition of pS in the GL mixture did not significantly impact the surface pressure at the collapse of the film (Fig. 2.A). The addition of 5 and 10 mol% pS to the GL mixture did not significantly impact the limiting area. In contrast, the limiting area was affected by the addition of 30 mol% of pS and shifted from 81.0 ± 0.6 to 66.1 ± 0.5 Å²/molecule (0.8 to 0.7 nm²/molecule). The inclusion of pS has also significantly altered the Cs^{-1}_{\max} of the monolayers (Fig. 2.B., logarithmic scale), and this effect was particularly marked in the presence of 30 mol% of pS in the GL mixture. Indeed, a Cs^{-1}_{\max} of 85.7 mN/m was reached for the GL₇₀/pS₃₀ blend, compared to 72.8 mN/m for the GL₉₀/pS₁₀ and GL₉₅/pS₅ blends and 48.0 mN/m for the pure GL system. The greater impact of phytosterols for a content of 0.3 mol% on the compressibility of the monolayer was consistent with the results presented in Figure 2.D. Indeed, the phase diagram showed a non-ideal behavior of the GL and pS blends, and this effect was even more noticeable for a molar concentration of pS of 30% in the system. The reduction of the mean molecular area at collapse and the increase of Cs^{-1}_{\max} with the increase of pS concentration could be attributed either to the condensation of the unsaturated acyl chains or to the reorientation of the sugar polar heads, induced by the presence of the pS molecules, thus decreasing the lateral elasticity of the monolayers (X.-M. Li et al., 2001). Indeed, the presence of a largely hydrophobic small molecule such as pS will also impact the tilt of the polar heads, which will increase the possibility of packing of the molecules, explaining the non-ideal behavior observed in the case of unsaturated GL monolayers. Nevertheless, the animal counterpart of pS, the cholesterol, was shown to establish weaker interactions with unsaturated lipids, in comparison with saturated lipids (Silvius, 2003), so the addition of DPPC in the mixtures could drastically alter the phenomena observed in GL-pS monolayers (Jurak, 2013).

3.2 Influence of GL, DPPC, and pS interfacial composition on collapse pressure and ellipsometric angle values

Ellipsometry combined with tensiometry were used on Langmuir trough to determine the values of surface pressure (π , mN/m), ellipsometric angle (Δ , °) and limiting molecular area ($\text{\AA}^2/\text{molecule}$) at the collapse of mixed heterogenous films with various compositions in GL, DPPC and pS. The values of π and Δ at the collapse of the films are presented in Table 2.

Table 2 - Values of π (mN/m), Δ (°) and limiting molecular area ($\text{\AA}^2/\text{molecule}$) at the collapse of mixed GL, DPPC and pS monolayers

Monolayer composition	π (mN/m)	Δ (°)	Limiting area ($\text{\AA}^2/\text{molecule}$)
(1) GL	39.9 ± 0.2	7.3 ± 0.5	81.0 ± 0.6
(2) DPPC	55.3 ± 0.2	10.8 ± 0.5	44.1 ± 0.7
(3) GL ₅₀ /DPPC ₅₀	44.1 ± 0.2	8.9 ± 0.5	60.4 ± 1.0
(4) GL ₉₀ /pS ₁₀	41.1 ± 0.1	8.2 ± 0.5	79.5 ± 0.9
(5) GL ₄₅ /DPPC ₄₅ /pS ₁₀	44.4 ± 0.2	8.6 ± 0.5	55.0 ± 1.7

\pm stands for calculated standard deviation on duplicated measurement; for Δ , since the system/instrumentation error is $\pm 0.5^\circ$, calculated $SD \leq 0.5$ were minored by this instrumentation error.

The addition of 10 mol% of pS in the GL mixture has induced a clear increase in the film thickness at collapse (8.2 versus $7.3 \pm 0.5^\circ$ for the GL₉₀/pS₁₀ versus GL mixture, respectively), while there was no significant change in collapse pressure, neither in the limiting area. These results tend to indicate that the inclusion of the pS only impacted the orientation of the GL sugar polar heads, and not the acyl chain organization.

CHAPITRE 3

The addition of 50 mol% DPPC in the GL mixture led to an increase of the collapse surface pressure to $\pi=44.1 \pm 0.2$ mN/m (versus 39.9 ± 0.2 mN/m for the GL monolayer) as well as a shift in the mean molecular area at collapse to 60.4 ± 1.0 Å²/molecules (0.6 nm²/molecule), versus 81.0 ± 0.6 Å²/molecule (0.8 nm²/molecule) for the GL monolayer. These results indicated a strong condensing effect of DPPC, which could be explained by the presence of saturated acyl chains and smaller polar head of DPPC, which decreased the steric hindrance. An increase in the film thickness at collapse induced by the presence of DPPC was also observed ($\Delta=8.9^\circ$ vs 7.30° for the GL film), suggesting a reorientation of the sugar polar heads of GL, as well as the formation of condensed domains upon compression (Vié et al., 1998).

The addition of phytosterols at 10 mol% in the GL/DPPC film did not induce a significant variation of the collapse pressure (44.4 ± 0.2 mN/m versus 44.1 mN/m for the GL/DPPC) but triggered a shift of the limiting molecular area from 60.4 ± 1.0 to 55.0 ± 1.7 Å²/molecule (0.6 to 0.5 nm²/molecule), indicating an increase of the packing in the mixture in presence of pS. This decrease in the limiting area was not expected, given that pS probably interacts preferentially with DPPC than with PUFA-containing GL. Indeed, Botet-Carreras et al. (2019) have studied the impact of cholesterol on homo- and hetero-acids phospholipid monolayers by AFM and AFM-FS, confirming that the effect of cholesterol on unsaturated PL was weaker than the one exerted on saturated PL. Additionally, a variety of biophysical measurements have revealed that sterols have an aversion to PUFA (Huster et al., 1998; Niu & Litman, 2002; Pitman et al., 2004; Wassall et al., 2004), explaining the lower impact of pS in the presence of GL in the GL₉₀/pS₁₀ mixture, which contain a significant amount of PUFA. One possible explanation for such aversion of sterols for PUFA is the high disorder of PUFA acyl chains, which is incompatible with the usual orientation of cholesterol vertically with respect to interface plane. Thus, one can expect a change in the

orientation of the sterol backbone (Harroun et al., 2006). Additionally, cholesterol has already been shown to induce order in lipids in fluid phase, whereas it has the opposite effect on lipids present in gel phase (Garcia-Manyes et al., 2010). Given these general effects of sterols and their aversion to PUFA, we were expected a more pronounced disorganization of DPPC molecules than a condensation effect of GL polyunsaturated lipid chains, and thus a larger limiting area for the GL₄₅/DPPC₄₅/pS₁₀ mixture compared to the GL₅₀/DPPC₅₀ mixture. Nevertheless, given the decrease in the limiting area of the mixture in the presence of pS, it is likely that the addition of pS induced GL organization in the presence of DPPC, raising the question of a potential miscibility between DPPC and MGDG and/or DGDG in the presence of pS, reflecting a more complex mixture.

3.3. Characterization by ellipsometry of interfacial films at 20 mN/m

The thickness of the three model systems was determined by ellipsometry at a surface pressure of 20 mN/m. The detailed molar compositions are given in Table 1. The values of ellipsometric angles obtained at 20 mN/m are presented in Table 3. Eight sub-model systems were also prepared to give a better understanding of the organization and interactions between polar lipids at the air/water interface (see supplementary data S1 for the detailed molar compositions and S2 for the ellipsometric angle values at 20 mN/m).

An ellipsometric angle of 7.5° was obtained for the mixed GL monolayer at 20 mN/m., which was identical to the value obtained with DGDG alone and higher than the value for MGDG (7.5 and 6.3 ± 0.5° respectively). This result was expected as the DGDG lipid film has already been shown to be thicker than the MGDG monolayer (Bottier, 2006).

CHAPITRE 3

The addition of DPPC to GL at a molar fraction of 0.5 did not induce a significant variation in the thickness at 20 mN/m. This result was consistent with the data obtained with the sub-model systems MGDG₅₀/DPPC₅₀ and DGDG₅₀/DPPC₅₀ (6.3 and $7.4 \pm 0.5^\circ$, respectively), in which the addition of DPPC did not induce a significant variation of the ellipsometric angle at 20 mN/m.

Table 3 - Ellipsometric angle values of the lipid films at a surface pressure of 20 mN/m at the air/water interface

Monolayer composition	Δ ($^\circ$)
MGDG	6.3 ± 0.5
DGDG	7.5 ± 0.5
(1) GL	7.5 ± 0.5
(2) GL₅₀/DPPC₅₀	7.1 ± 0.5
(3) GL₄₅/DPPC₄₅/pS₁₀	7.0 ± 0.5

\pm stands for calculated standard deviation on duplicated measurement; the system/instrumentation error is $\pm 0.5^\circ$. Calculated SD ≤ 0.5 were minored by this instrumentation error.

The addition of pS to the mixed model system of GL and DPPC, at a molar content of 10%, led to a slight decrease of the ellipsometric angle at 20 mN/m, but it was not significant. By comparison, pS induced a clear decrease in the thickness of the MGDG₄₅/DPPC₄₅/pS₁₀ and DGDG₄₅/DPPC₄₅/pS₁₀ sub-model systems (5.5 and $6.0 \pm 0.5^\circ$, respectively), compared to the MGDG₅₀/DPPC₅₀ and DGDG₅₀/DPPC₅₀ systems (6.3 and $7.4 \pm 0.5^\circ$, respectively). However, no significant variation in thickness was obtained for the sub-models MGDG₉₀/pS₁₀ and

DGDG₉₀/pS₁₀, in comparison with the pure MGDG and DGDG systems. These results tend to indicate different interactions of pS with GL-DPPC mixed films and pure MGDG and DGDG.

In order to better understand the differences in the organization of the different models and sub-models, atomic force microscopy was used to visualize the interface of the films obtained by Langmuir Blodgett sampling.

3.4 Nanoscale topographic visualization of interfacial films at 20 mN/m using atomic force microscopy

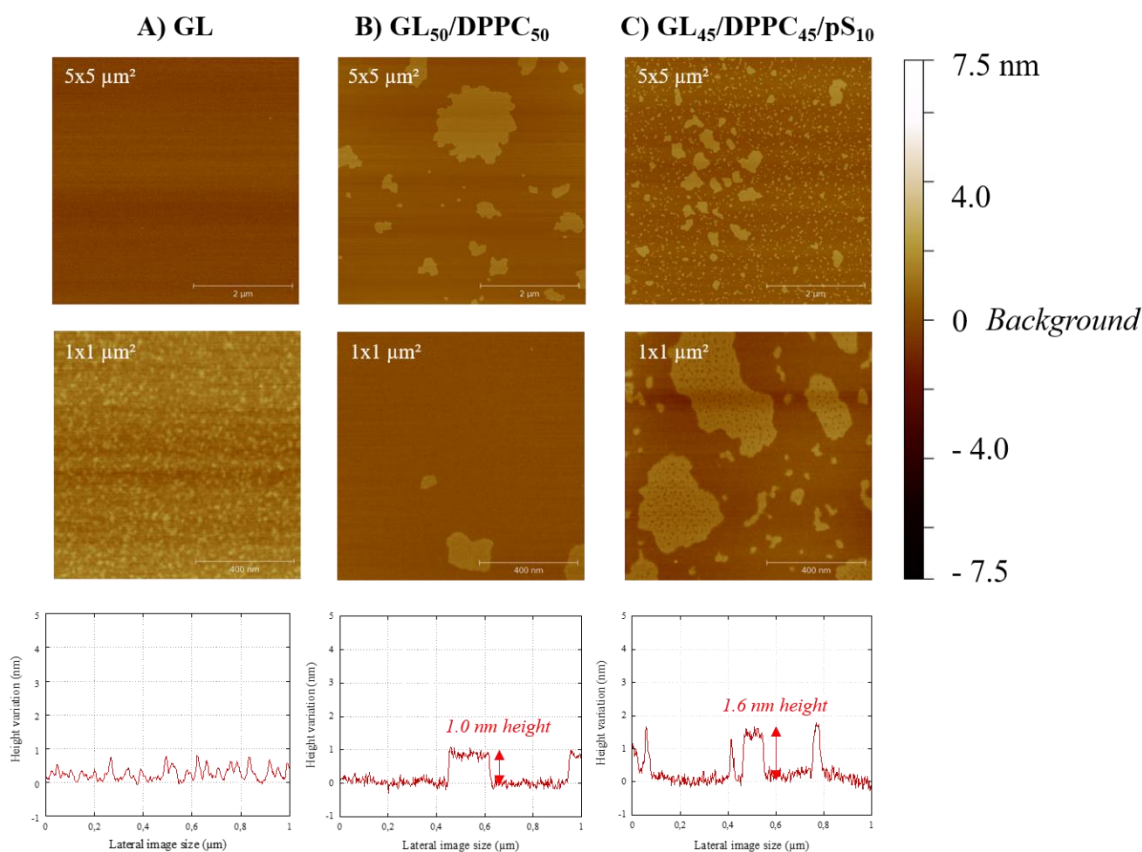


Figure 3 5×5 μm² and 1×1 μm² AFM topographic images of A) GL, B) GL₅₀/DPPC₅₀, and C) GL₄₅/DPPC₄₅/pS₁₀ model monolayers. The height profiles were performed on a cross-section of the 1×1 μm² image. The Langmuir films were transferred at a surface pressure of 20 ± 0.5 mN/m on a mica plate using the Langmuir Blodgett method. Experiments were performed in a Tris HCl buffer at pH 7 and done in duplicate.

CHAPITRE 3

Figure 3 shows AFM images of the interfacial organization of the three main model monolayers GL, GL₅₀/DPPC₅₀, and GL₄₅/DPPC₄₅/pS₁₀ after their transfer by the Langmuir-Blodgett technique onto a mica plate and at a surface pressure of 20 ± 0.5 mN/m. The scale used was composed of different shades of brown, related to the differences in height in the monolayers. These color variations were correlated with the different tilt values of the lipid molecules and thus provide information on the orientation of the molecules and their physical state.

The $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ AFM image of the GL system (Fig. 3.A), was characteristic of a homogeneous liquid-expanded (LE) phase without phase separation, consistent with the presence of unsaturated acyl chains in the fluid phase. However, the $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ image highlights the presence of surface roughness, with height differences between 2 to 8 Å (0.2 to 0.8 nm) with respect to the baseline. A similar segregation was previously observed by AFM on mixed films of MGDG:DGDG (68:32 mol/mol) by Sarkis et al. (2014). Additionally, Bottier et al. (2007) had observed the presence of irregular protrusions of 7 Å (0.7 nm) and 4 Å (0.4 nm) at surface pressures above 25 mN/m on monolayers of pure MGDG or in equimolar mixture with DGDG, respectively. The presence of these protrusions had been attributed to a specific organization of the MGDG polar heads between them or with those of DGDG, this roughness being absent on the AFM images of the DGDG monolayer. Indeed, a particular orientation of DGDG polar heads induced by the interactions between galactolipids had been highlighted by PM-IRRAS data. The assumption was that the monogalactosyl polar head of MGDG could be responsible for the orientation of the digalactosyl group of DGDG parallel to the interface, with the formation of a network of hydrogen bridges between the polar heads and the water molecules at the interface (Kanduc et al., 2017).

The addition of DPPC to the system (2) (Fig. 3.B) resulted in the appearance of 1 nm high condensed domains of varying shapes and sizes at the interface ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$ image), likely to be

enriched in DPPC, given their degree of saturation. Additionally, a loss of the granularity on $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ images suggests changes in the orientation of the galactosyl polar heads of GL, that could result from a modification by DPPC of the interactions between MGDG and DGDG. This would fit with the previous results obtained on the compressibility of the film.

The addition of pS to the $\text{GL}_{50}/\text{DPPC}_{50}$ mixture (Fig. 3.C) resulted in a subsequent dilution of the domains in the LC condensed phase, as well as a significant increase in the thickness of the domains ($h=1.6 \text{ nm}$ versus $h=1.0 \text{ nm}$, with and without pS, respectively), in contrast to the unchanged value of the ellipsometric angle. The irregular domain boundaries also indicated a change in line tension induced upon addition of pS in the GL/DPPC system, and suggests a change in interactions between the different classes of lipids, with miscibility regions between the different components. Defects were also visible at the condensed phase domains, probably induced by the inclusion of pS and the local subsequent disorganization of the saturated acyl chains of DPPC.

In order to investigate the composition of the condensed phase domains and to better understand the interactions involved between the different classes of lipids, four sub-model systems were prepared, namely $\text{MGDG}_{50}/\text{DPPC}_{50}$, $\text{DGDG}_{50}/\text{DPPC}_{50}$, $\text{MGDG}_{30}/\text{DPPC}_{60}/\text{pS}_{10}$ and $\text{DGDG}_{30}/\text{DPPC}_{60}/\text{pS}_{10}$ (mol%) mixtures. AFM images and height profiles of these sub-models are presented Figure 4.

In the absence of pS, the $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ AFM image of the $\text{MGDG}_{50}/\text{DPPC}_{50}$ mixture (Fig. 4.A) showed the presence of LC phase domains (average domain area= $0.1 \mu\text{m}^2$), of irregular shape and 1.7 nm height, as well as a background characteristic of a homogeneous fluid phase. The $\text{DGDG}_{50}/\text{DPPC}_{50}$ film (Fig. 4.B) presented a similar fluid background. However, the LC phase domains are more abundant but smaller (average domain area= $0.0002 \mu\text{m}^2$), and present a greater height of 1.9 nm , in accordance with the higher ellipsometric angle for this mixture (6.3° versus

CHAPITRE 3

7.4° for the MGDG₅₀/DPPC₅₀ and DGDG₅₀/DPPC₅₀ mixtures, respectively). These observations confirm the different nature of MGDG and DGDG interactions with DPPC and question a possible segregation of MGDG-DGDG interactions in the presence of DPPC.

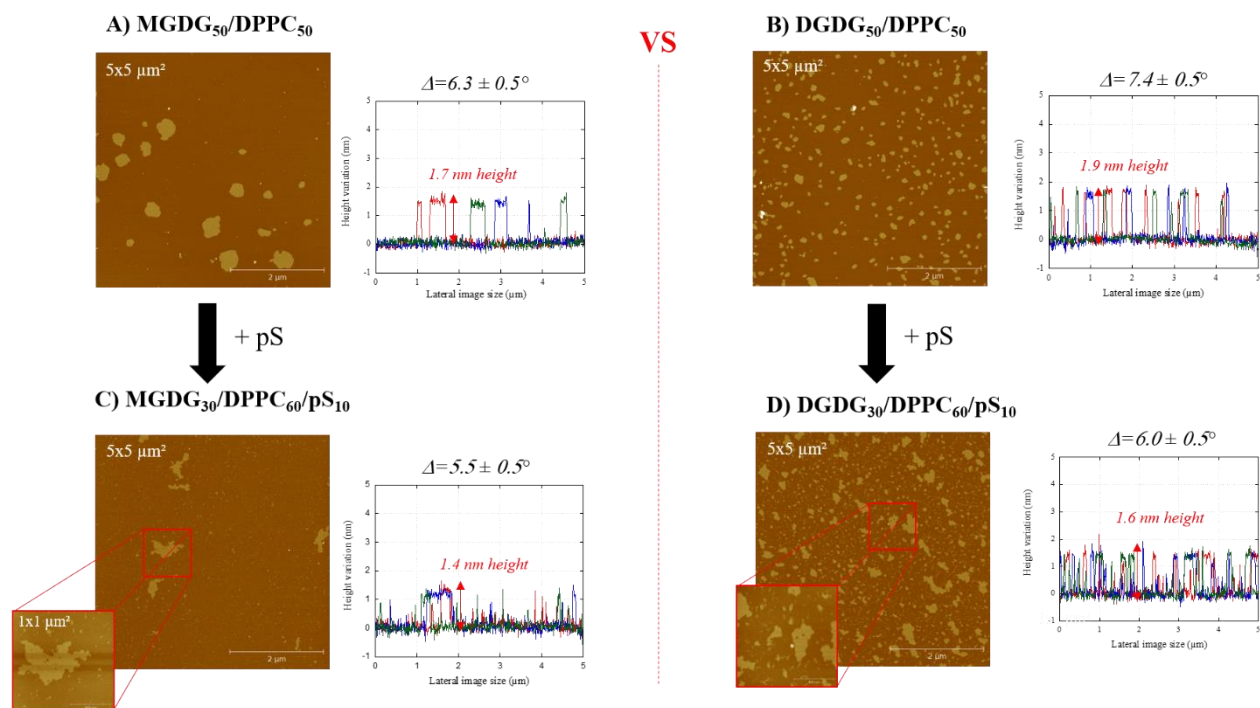


Figure 4 $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ AFM topographic images of A) MGDG₅₀/DPPC₅₀, B) DGDG₅₀/DPPC₅₀, C) MGDG₃₀/DPPC₆₀/pS₁₀, and D) DGDG₃₀/DPPC₆₀/pS₁₀ monolayers. Zooms to $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ were performed on samples C) and D) to allow visualization of defects in condensed areas. The height profiles were performed on three different cross-sections of the $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ image. The Langmuir films were transfer at a surface pressure of $20 \pm 0.5 \text{ mN/m}$ on a mica plate using the Langmuir Blodgett method. The ellipsometric angle value at 20 mN/m was reported to compare the thickness between the four monolayers. Experiments were performed in a Tris HCl buffer at pH 7 and done in duplicate.

The addition of pS up to 10 mol% in these two previous sub-model systems changed the appearance of the interfacial films. First, the addition of pS in the MGDG/DPPC system (Fig. 4.C) induced a change in the line tension of the condensed phase domains, which showed irregular edges as well as the presence of defects at the larger domains, probably induced by the presence of pS,

similar to the previous observations on the model systems. Nevertheless, a significant decrease of 18% in the height of these domains (1.7 nm vs. 1.4 nm in height, without and with pS, respectively) was observed, consistent with the evolution of the ellipsometric angle (6.3° vs. 5.5° , without and with pS, respectively). The addition of pS in the DGDG/DPPC mixture induced a similar evolution of the interface (Fig. 4.D): the line tension and the thickness of the condensed domains were also modified according to the same trend (16% decrease in thickness), and the presence of defects at the larger domains with irregular edges was still visible. This change in thickness did not showed the same trend as that observed in the $GL_{45}/DPPC_{45}/pS_{10}$ model, for which a 45% increase in domain thickness was observed.

Overall, the results confirm the hypotheses of a different miscibility between DPPC and MGDG and between DPPC and DGDG. Moreover, it seems that the inclusion of pS in the systems induced, on the one hand, a transition from the DPPC-enriched gel phase to a less ordered phase, with the apparition of defects, and on the other hand, a transition from a fluid phase to a less ordered zone, with reduced height mismatch and a decrease of the line tension in the ternary systems. To validate these hypotheses and determine the miscibility of DPPC in mixture with MGDG or DGDG, as well as the impact of pS in GL/DPPC lipid systems, SAXS experiments were performed, in the presence of water in excess.

3.5. Phase behavior of mixed galactolipid mixtures in hydrated mesophase (SAXS)

The three-dimensional structures of unsaturated MGDG and DGDG, alone or in their equimolar mixture, have already been studied by analysis of the X-ray diffraction patterns and electron density profile at 20°C in excess of water (Bottier et al., 2007; Hoyo et al., 2016). On one hand, the lamellar structure L_α of DGDG was evidenced by the presence of single peaks regularly spaced, with a lamellar periodicity of 54.9 Å. On the other hand, the X-ray diffraction profile

CHAPITRE 3

obtained for MGDG showed six Bragg diffraction pics, with a hexagonal periodicity of 67.2 Å, that were attributed to an inverse hexagonal phase (H_{II}) distribution, which has been observed in other studies over a wide temperature range (-15 to 80°C) (Popova & Hinch, 2011). The ability of unsaturated MGDG to form non-lamellar structures can be neutralized by mixing it with at least 50% of lipids forming lamellar phases. However, unsaturated MGDG can induce defects in the lamellar structure of MGDG/lipid mixtures forming bilayers when its proportion is between 20 and 50% (Castro et al., 2007). Nevertheless, for the equimolar mixture of MGDG and DGDG in excess of water, the SAXS diffraction pattern obtained by Bottier et al. was the signature of a bicontinuous cubic phase ($Im3m$ space group) with a cubic lattice parameter of 202 Å, showing the specific behavior of MGDG and DGDG in the equimolar mixture compared to the pure lipids. Indeed, the formation of an $Im3m$ space group could result from specific interactions between the polar sugar heads of the MGDG and DGDG.

The three-dimensional organization of DPPC has also already been extensively studied by SAXS, showing a well-ordered multilayer structure in excess of water due to the so-called L_{β} gel phase at 20°C (Et-Thakafy et al., 2017; Varga et al., 2007). Nevertheless, the miscibility of the mixture of GL with DPPC forming lamellar phases has never been studied by SAXS.

First of all, the present study investigated the three-dimensional organization of heterogeneous $GL_x/DPPC_y$ mixtures in excess of water, and as a function of DPPC proportion. Figure 5.A presented the X-Ray diffraction patterns of three mixtures of $GL_x/DPPC_y$ in water, with DPPC at 66 (black curve), 50 (blue curve), and 33 mol% (green curve), respectively. The results showed that DPPC in large amount of 66 mol% induced a segregation between the components in water. Indeed, on the diffraction pattern (black line), the large diffraction peaks visible at 0.09 and 0.18 Å⁻¹ were identified as the ones related to the L_{β} phase formed by pure DPPC at 20°C.

Additionally, a peak and a shoulder were visible on the diffraction pattern at 0.06 and 0.11 \AA^{-1} , respectively, that could correspond to the diffraction pattern of the cubic phase of the MGDG-DGDG mixture in water, consistent with the results of Bottier et al. (2007). These results tend to indicate a segregation between DPPC and the MGDG-DGDG mixture in water, leading to the existence of two non-miscible phases. Nevertheless, DPPC may also have disrupted the cubic phase by diluting the MGDG-DGDG interactions, coinciding with the distorted pattern of the MGDG-DGDG cubic phase. When DPPC was added at 50 mol% in the GL mixture, the diffraction pattern (blue line) showed a better miscibility between the three components of the system. Indeed, the intensity of the peaks presumably related to the cubic phase of the GL mixture was decreased and the pic 0.06 \AA^{-1} was no longer visible, tending to show the existence of two miscible phases. These results were consistent with AFM images of the $\text{GL}_{50}\text{DPPC}_{50}$ mixture, where a fluid phase was visible, probably composed of a mixture of MGDG, DGDG and DPPC, as well as condensed domains, likely enriched in DPPC. At a ratio of 33 mol% DPPC, the diffraction pattern (green line) indicates that the concentration of DPPC was not sufficient enough to segregate the three components of the system, and the slightly weaker MGDG-DGDG interactions have probably prevailed, leading to the existence of a single organized phase composed by MGDG, DGDG and DPPC. Overall, the SAXS data confirm the presence of significant segregation in the systems, depending on the DPPC proportion and implying the existence of very selective interactions between the different types of lipids.

To our knowledge, this study is the first on the impact of pS on heterogenous model plant membranes, while the impact of cholesterol on model of animal membranes made of phospholipid bilayers has been extensively studied. To better understand the impact of pS and the interactions

between DPPC and MGDG/DGDG, the SAXS diffraction patterns of three other model systems were studied, *i.e.* MGDG₄₅DPPC₄₅pS₁₀, GL₄₅/DPPC₄₅/pS₁₀ and DGDG₄₅/DPPC₄₅/pS₁₀ (fig. 5.B).

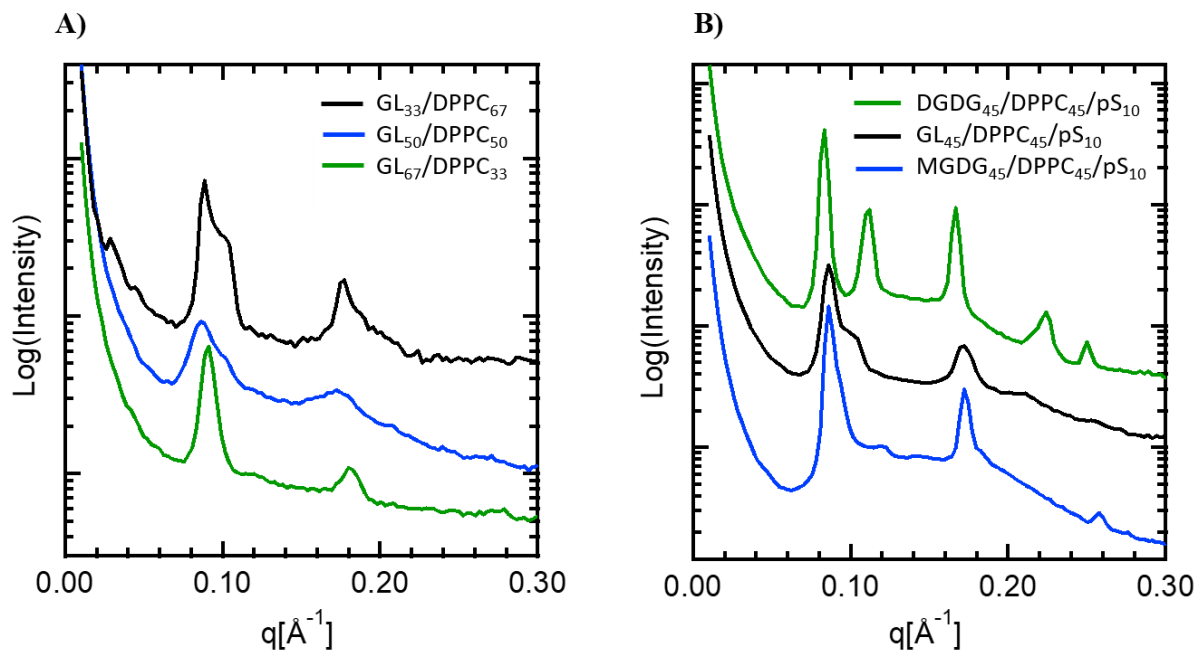


Figure 5 SAXS patterns of the model systems recorded at $20 \pm 0.5^\circ\text{C}$. A) GL/DPPC systems at different ratios: 33:67 mol/mol (black curve), 50:50 mol/mol (blue curve) and 67:33 mol/mol (green curve). B) DGDG/DPPC/pS (45:45:10 mol/mol/mol, green curve), GL/DPPC/pS (45:45:10 mol/mol/mol, black curve), MGDG/DPPC/pS (45:45:10 mol/mol/mol, blue curve)

On one hand, results tend to show that MGDG and DGDG did not interact equivalently with the DPPC-pS mixture. First of all, the mixture of DGDG with DPPC-pS did not promote the presence of a single organized phase in water (see green line). Indeed, the diffraction pattern of the pure DPPC was clearly visible, with the L_β lamellar phase peaks at 0.09, 0.18, and 0.27 \AA^{-1} . The diffraction pattern of the pure DGDG was also clearly evidenced, with the diffraction peaks reflecting the L_α phase at 0.11 and 0.22 \AA^{-1} . These results are consistent with those obtained by Bottier et al. (2007) on the wheat DGDG/water system and they highlight the poor miscibility of DGDG with DPPC-pS system. On the contrary, in the case of the MGDG₄₅/DPPC₄₅/pS₁₀ mixture

(blue pattern), only one phase was clearly visible, with two peaks reflecting a lamellar phase at 0.09 and 0.18 \AA^{-1} , but slightly shifted compared to pure DPPC in water. In the case of the $\text{GL}_{45}/\text{DPPC}_{45}/\text{pS}_{10}$ mixture in water (black pattern), a shoulder was also visible at 0.11 \AA^{-1} , compared to the diffraction pattern of the $\text{MGDG}_{45}/\text{DPPC}_{45}/\text{pS}_{10}$ mixture, highlighting the formation of two phases: one phase enriched in MGDG-DPPC-pS and one phase containing a mixture of MGDG-DGDG. These results showed drastically different interactions between MGDG and DGDG, respectively, and the DPPC-pS mixture, and highlight the preferential miscibility of MGDG with the DPPC-pS mixture.

On the other hand, the comparison between the $\text{GL}_{50}/\text{DPPC}_{50}$ (fig. 6. A, blue pattern) and the $\text{GL}_{45}/\text{DPPC}_{45}/\text{pS}_{10}$ (fig. 5. B, black pattern) mixtures in water allowed us to highlight the impact of 10 mol% of pS in the system. As expected, pS did not form a phase on its own but triggered a modification of the organization of the existing phases. Indeed, the inclusion of pS in the GL/DPPC system did not induce the appearance of new diffraction peaks, but has led to a contraction of the L_{β} diffraction peaks at 0.09 and 0.18 \AA^{-1} , indicating a homogenization in the miscibility of the two phases.

Overall, the results were consistent with the AFM images obtained on the $\text{GL}_{45}/\text{DPPC}_{45}/\text{pS}_{10}$ monolayer, with the visualization of a fluid phase composing the background, probably enriched in MGDG-DGDG, and the presence of a gel phase enriched in MGDG-DPPC, in which the inclusion of pS has induced the formation of defects, leading to a thickening of the gel phase by decreasing the packing. Additionally, the observation of smaller domains in presence of pS on the AFM images was consistent with a lowering of the line tension at the edges of the gel domains, resulting from a better miscibility between the two phases and thus a reduced height mismatch.

CONCLUSION

In this study, tunable Langmuir model membrane of heterogenous assemblies of GL, DPPC and pS were used to study the structural behavior of the main polar lipids of vegetal photosynthetic membrane (MGDG and DGDG) at the air/water interface. The impact of pS and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) or both on the structural properties of GL membrane was studied.

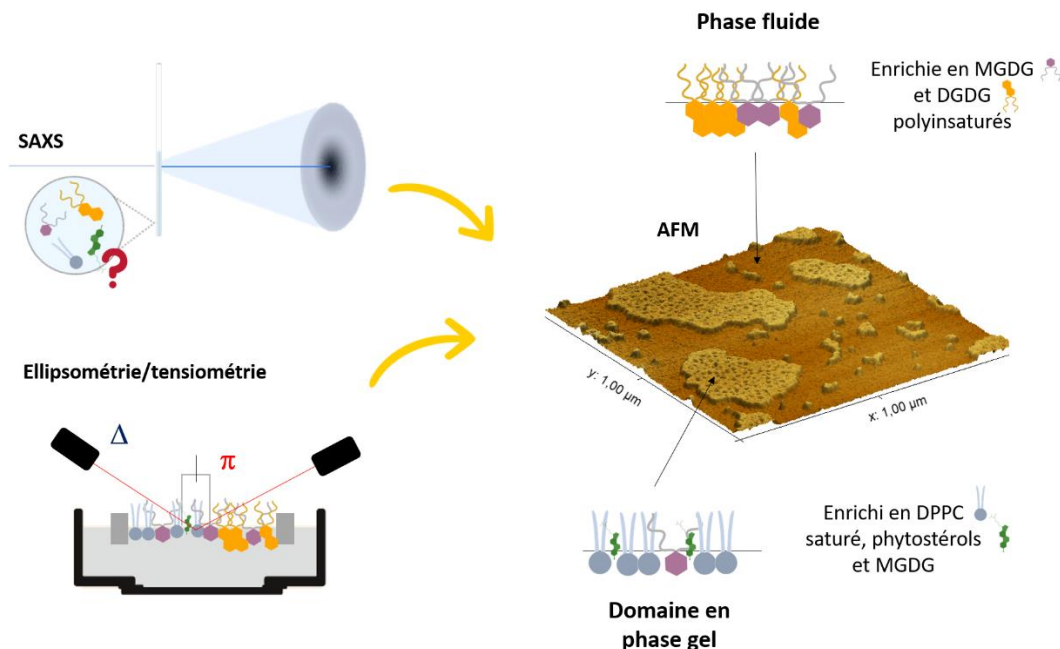
The biophysical results obtained confirmed the good surfactant properties of these polar lipids. The addition of pS in the mixed GL systems up to 30 mol% induced a reorientation of the sugar polar heads, leading to a more important packing and thus to a reduction of the lateral elasticity of the monolayer. The study of the compressibility isotherms of the different films also allowed to highlight the complex miscibility of the heterogeneous ternary mixtures, and their singular behavior compared to the pure systems. Indeed, the results obtained on the $GL_{45}/DPPC_{45}/pS_{10}$ mixture indicated preferential DPPC-pS interactions but a decrease in lateral elasticity despite the disorganization effect of pS on saturated lipids.

The inclusion of pS into the gel phase regions was visible on the AFM images, leading to a thickening of the domains and a local decrease of packing by the appearance of defects. This result highlighted phase miscibility between DPPC and GL, and in particular with MGDG, which was confirmed by AFM images and SAXS diffraction patterns. The favorable interaction between DPPC and pS may have caused the appearance of segregated zones, on one side, devoid of pS and enriched in MGDG-DGDG in the fluid phase, and on the other, enriched in pS and DPPC.

The pS-DPPC-rich areas could also have included the presence of MGDG, due to more favorable DPPC-MGDG interactions than DPPC-DGDG, raising the hypothesis of a heterogeneous MGDG-

DPPC-pS composition of the gel phase domains. The characterization of these kinds of plant lipid mixtures is useful for the understanding of mechanisms such as their digestion by specific digestive enzymes.

Principaux résultats de l'étude



- Les mélanges modèles de lipides polaires végétaux forment des monocouches stables à l'interface air/eau à 20 mN/m à pH 7. Les phytostérols réduisent l'élasticité latérale des monocouches de galactolipides (GL) et de galactolipides et phospholipides (GL/DPPC), respectivement. La monocouche de GL est caractérisée par une phase fluide, tandis que la monocouche GL/DPPC/pS montre une coexistence de phase LE/LC, avec la présence de domaines en phase LC présentant des défauts structuraux liés à l'inclusion de phytostérols.
- L'ajout de DPPC dans les mélanges lipidiques de galactolipides a modifié les interactions MGDG-DGDG. Les analyses SAXS ont permis de mettre en évidence une miscibilité de phase préférentielle entre le DPPC et le MGDG en mésophase hydratée. Ainsi, nous pouvons en déduire que les domaines en phase LC visibles à l'interface de la monocouche GL/DPPC/pS sont probablement enrichis en DPPC, MGDG, et pS, tandis que la phase LE est majoritairement composée d'un mélange de MGDG et de DGDG.

II - Caractérisation du comportement interfacial des monocouches de lipides extraits de systèmes naturels

II.1 – Caractérisation du comportement interfacial des lipides totaux extraits de *Chlorella vulgaris* versus *Chlorella sorokiniana reyto*

Nous avons étudié la composition chimique et le comportement interfacial des lipides totaux issus de deux biomasses algales : la *Chlorella vulgaris* commerciale de la marque Purasana, et la *Chlorella sorokiniana reyto*, cultivée en laboratoire. La caractérisation du comportement interfacial et de l'organisation structurale des monocouches de lipides extraits de ces matrices végétales a également été effectuée sur cuve de Langmuir à 20 mN/m et à pH 7 (tampon Tris HCl :100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM Tris).

L'espèce *Ch. Sorokiniana* présente des propriétés physiques et biologiques proches de *Ch. vulgaris*, mais a montré des taux de croissance et de productivité supérieurs, ce qui explique son utilisation accrue dans le domaine des biocarburants. La souche *Ch. sorokiniana reyto* utilisée dans cette étude a été isolée et identifiée par le Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement de l'INRAE de Narbonne et a fait l'objet d'une étude de caractérisation en fonction de ses conditions de croissance par J. Wind, M. Subileau et C. Bourlieu en 2021, au sein de l'UMR IATE, à l'INRAE de Montpellier. La *Ch. sorokiniana reyto* utilisée dans notre étude a été fournie par M. Subileau de l'INRAE de Montpellier. Cette souche a été cultivée en photo-autotrophie et en absence de glucose dans le milieu de culture. Ces conditions permettent d'obtenir un profil lipidique plus riche en galactolipides et des concentrations très faibles en AGL et en TAG. A titre de comparaison, la répartition des classes de lipides de *Ch. sorokiniana reyto* en fonction de la concentration en glucose dans le milieu de culture est donnée **Figure 26**.

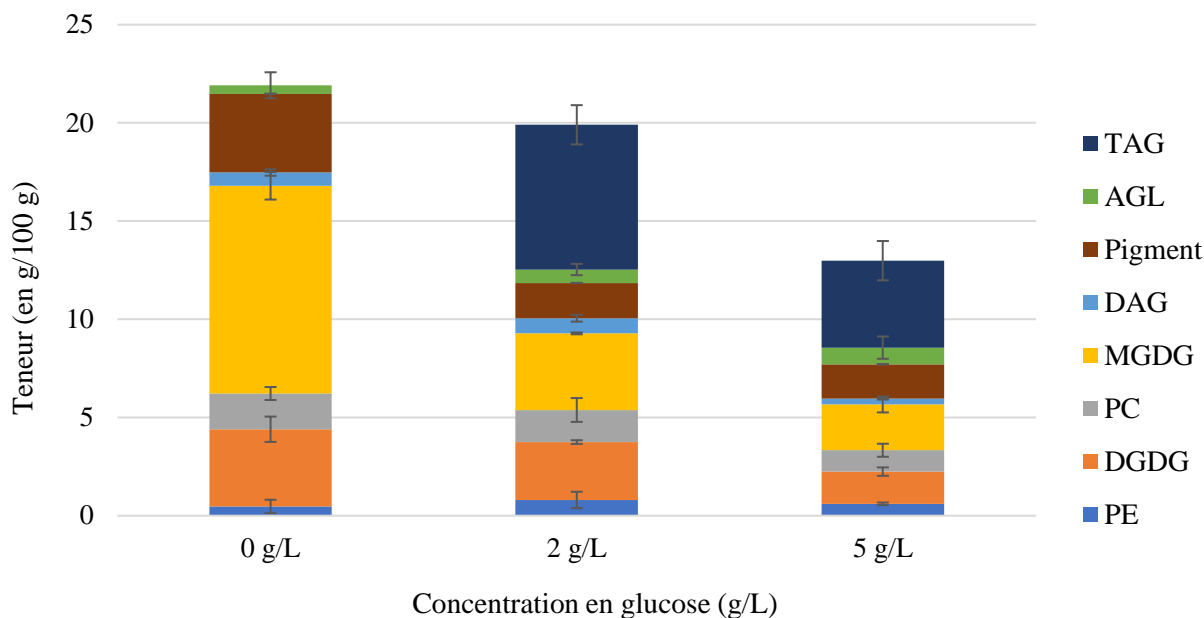


Figure 26 - Répartition des classes de lipides chez *Ch. sorokiniana reyto* (en g/100 g de biomasse sur milieu Bold's Basal Medium) à différentes concentrations de glucose.

II.1.1 - Caractérisation chimique

Les lipides totaux ont été extraits des biomasses algales par la méthode Folch. La caractérisation des classes de lipides et de la composition en acides gras a été effectuée sur les lipides totaux extraits de la biomasse algale *Ch. vulgaris* (Purasana) et *sorokiniana*. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 27**.

Les lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana représentent 14% massique de la matrice initiale et étaient enrichies en galactolipides (MGDG, DGDG – 27% et 23% % massique, respectivement), en phospholipides (PC, PE – 40% et 4% massique, respectivement), et présentent des teneurs plus faibles en AGL (5% massique) et en TAG (2% massique). La composition en acides gras a montré un profil riche en LA (C18:2, ω 6, 43% massique), en acide palmitique (C16:0, 21% massique), en acide hexadécadiénoïque (C16:2, 12% massique), en acide oléique (C18:1, ω 9, 8% massique), en

ALA (C18:3, ω 3, 8% massique), et enfin en HTA (C16:3, ω 3, 4% massique). Le ratio ω 6/ ω 3 a été déterminé comme étant de 3, confirmant l'excellent potentiel nutritionnel des microalgues *Ch. vulgaris* Purasana pour le développement d'ingrédients riches en AGPI ω 3.

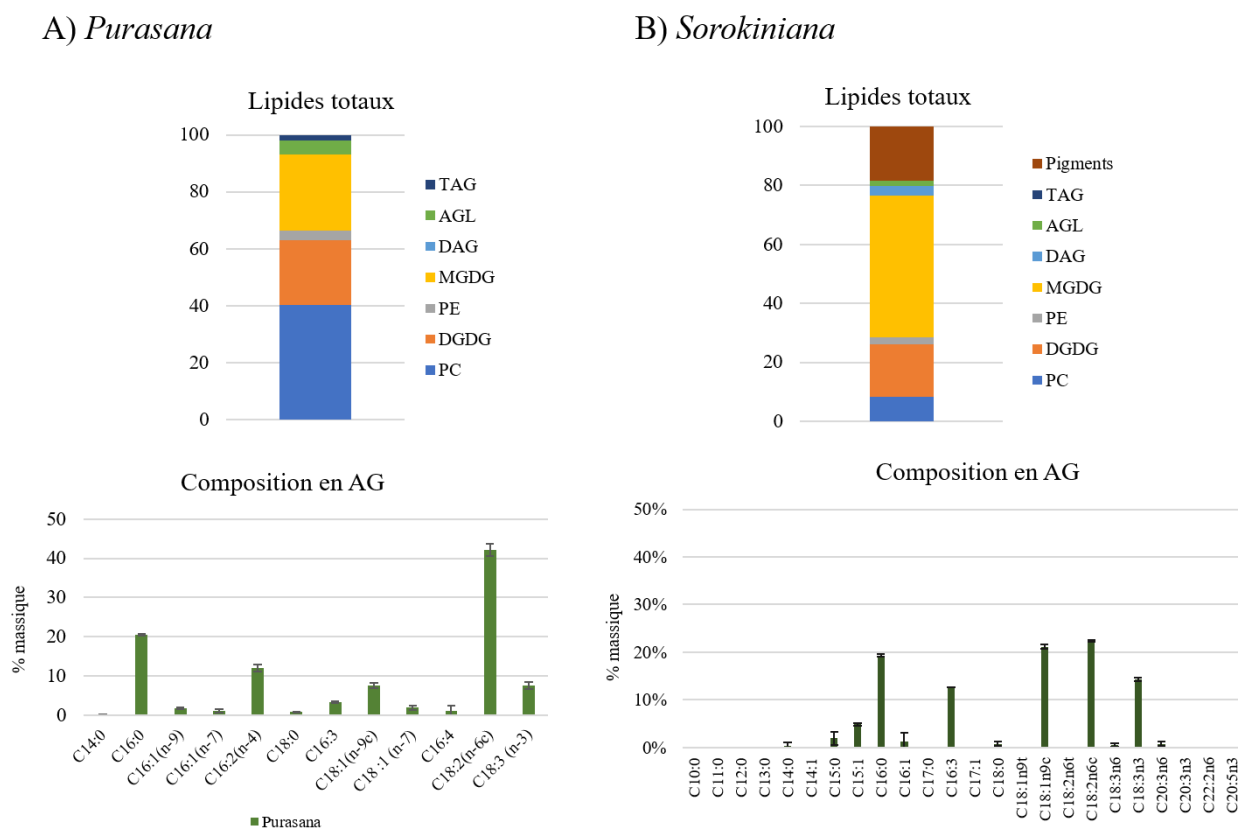


Figure 27 - Caractérisation chimique des classes de lipides et de la composition en acides gras des lipides totaux extraits des *Ch. A) vulgaris* Purasana et, B) *sorokiniana reyto*.

Les lipides totaux (23% massique) de *Ch. sorokiniana* cultivées en laboratoire dans des conditions d'autotrophie présentent également un excellent profil nutritionnel. Les classes de lipides les plus représentés sont les galactolipides (MGDG, DGDG – 48% et 18% massique, respectivement), viennent ensuite les phospholipides (PC, PE – 9% et 2% massique, respectivement), puis les AGL (2% massique). Contrairement aux microalgues *Ch. vulgaris* Purasana, les chlorelles *sorokiniana* cultivées en laboratoire contiennent de faibles quantités de DAG (3% massiques) mais pas de TAG.

CHAPITRE 3

L'analyse des AG montre un profil moins riche en LA (C18:2, ω 6, 23% massique) que la chlorelle commerciale, mais plus riche en acide oléique (C18:1, ω 9, 21% massique). La composition en acide palmitique est similaire entre les deux microalgues (21% versus 19% massique pour *Ch. vulgaris* versus *sorokiniana*, respectivement). La *Ch. sorokiniana* présente toutefois un profil plus riche en ω 3, avec des compositions respectives en ALA et HTA de 15 et 13% massique. Le ratio ω 6/ ω 3 est de 1 pour cette seconde espèce, confirmant l'excellent profil nutritionnel des microalgues.

Les différences de composition en lipides totaux et en AG des deux biomasses algales étudiées pourraient impacter l'organisation interfaciale en monocouche. Un profil plus riche en MGDG et pauvre en phospholipides, notamment en PC, pourrait induire des miscibilités de phase différentes, notamment de par la propension du MGDG à initier des courbures dans les membranes, contrairement à la PC, qui forme des phases lamellaires peu importe le taux d'hydratation.

II.1.2 – Comportement interfacial des monocouches de lipides de chlorelles à 20 mN/m

Les monocouches de lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana et *sorokiniana* ont été formées à 20 mN/m à la surface d'une solution tampon Tris pH 7. Pour ensuite pouvoir évaluer l'impact de l'activité enzymatique sur nos systèmes, les monocouches de lipides ont dans un premier temps été caractérisées à l'interface sur une cinétique de 1h, temps pendant lequel un effet de la digestion a été constaté. Les films interfaciaux ont cependant montré une instabilité relative suite au dépôt des lipides seuls à l'interface, mise en évidence par une baisse de la pression de surface de l'ordre de 4 mN/m sur un temps court de cinétique de 1h, qui pourrait être due à une réorganisation des molécules du film lipidique. Néanmoins, les lipides sont également largement exposés à l'atmosphère, et, de par leur contenu important en AGPI, sont particulièrement sensibles à l'oxydation. Cette baisse de pression pourrait donc également être attribuée à une instabilité

chimique des lipides. Ainsi, l'expérience de stabilité de la monocouche a été réalisée sous atmosphère inerte en mettant le système en surpression d'azote, afin de vérifier que cette instabilité n'était pas due à l'oxydation des AGPI, mais bien à une réorganisation des molécules à l'interface du film. Les variations de pression de surface obtenues sur une cinétique de 1h sont présentées **Figure 28**. Les courbes de pression de surface du film témoin (trait gris pointillé) et du film formé sous atmosphère inerte (trait noir continu) ont montré une évolution similaire. L'oxydation sur un temps court au niveau des monocouches de lipides totaux de chlorelles riches en AGPI semble donc être un phénomène négligeable devant la réorganisation des molécules à l'interface air/eau.

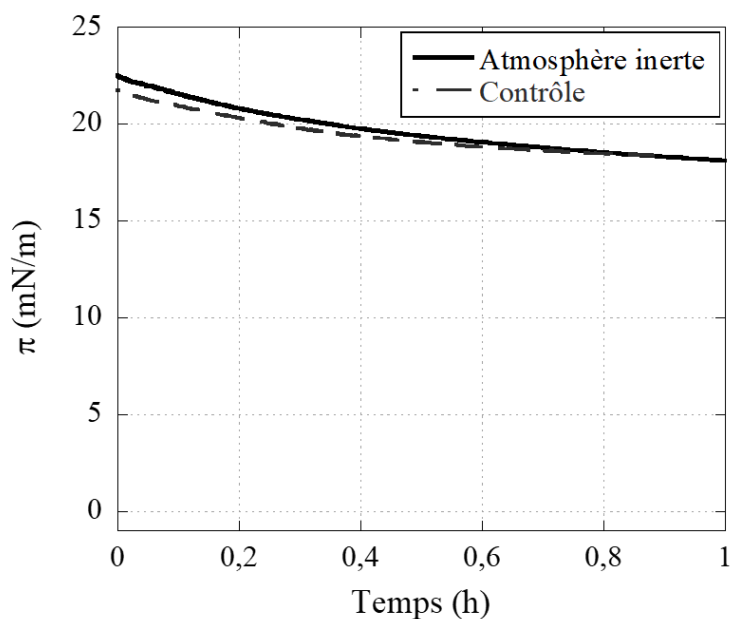


Figure 28 - Evolution de la pression de surface du film de lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana i) formé sous atmosphère inerte (N_2 , trait noir continu) et ii) contrôle (trait gris pointillé) à une pression de surface initiale d'environ 20 mN/m.

Les prélèvements de Langmuir-Blodgett des monocouches de lipides totaux de microalgues ont été réalisés après une période de stabilisation de 10 minutes et à une pression d'environ 20 mN/m. Les images AFM de la monocouche de lipides totaux de chlorelles Purasana obtenues après prélèvement de Langmuir-Blodgett à $\pi=19,7$ mN/m et $\Delta=8,1^\circ$ sont présentées **Figure 29**.

A) Purasana

$$\pi=19,7 \text{ mN/m}, \Delta=8,1^\circ$$

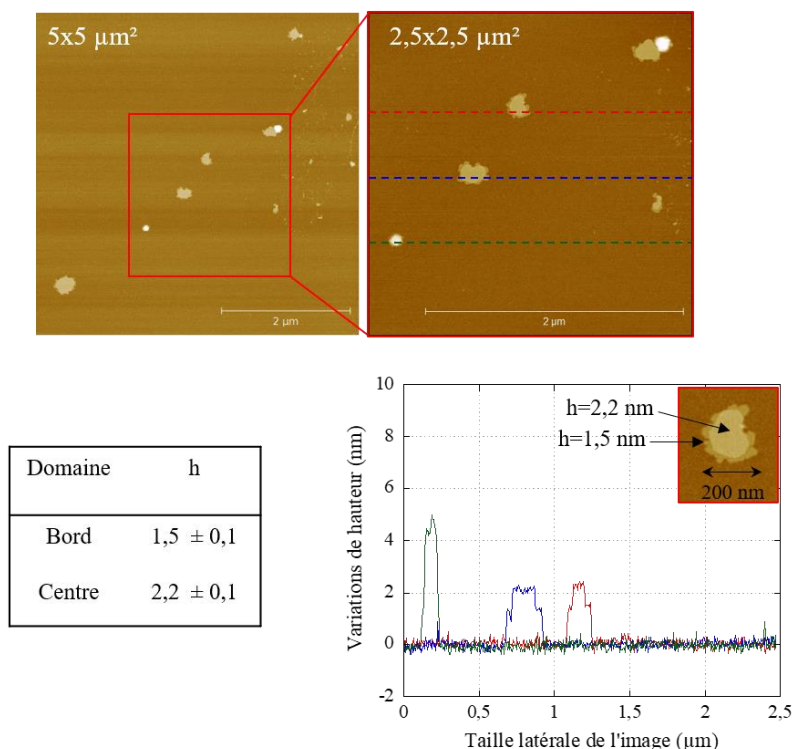


Figure 29 – Images AFM (5×5 et 2,5×2,5 μm²) de la monocouche interfaciale de lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana obtenue à pH 7 après prélèvement de Langmuir-Blodgett effectué à $\pi=19,7$ mN/m et $\Delta=8,1^\circ$. Le profil de 3 sections et le tableau relatif aux hauteurs des domaines ont été obtenus par analyse de l’image via le logiciel Gwyddion.

En accord avec la composition riche en AGPI du système, les images montrent que la phase majoritaire se trouve dans un état fluide, dans laquelle des domaines ovoïdes en phase LC coexistent. Ces domaines ont une taille d’environ 200 nm de largeur, et présentent des bords irréguliers. Ils sont composés d’un domaine central de hauteur $h=2,2 \pm 0,1$ nm, entouré d’une couronne moins haute aux bords irréguliers de $1,5 \pm 0,1$ nm de hauteur (variations de hauteur mesurées par rapport au fond homogène). Par endroits, de plus petits domaines apparaissent, présentant des hauteurs comprises entre 5 et 6 nm, et sont attribués à la présence de TAG. Au-delà de 15 mN/m, le collapse des TAG est dépassé, ils forment alors des structures tridimensionnelles donnant des hauteurs de cette amplitude. La présence de deux hauteurs différentes sur les domaines

en phase LC témoigne d'une coexistence de phases et est attribuée à au moins deux espèces moléculaires non miscibles. Cette immiscibilité résulte de la présence de chaînes saturées s'organisant en phase LC (phase plus dense) à une pression de surface de 20 mN/m. Etant donné la composition chimique du système, la présence d'acide palmitique (C16:0, 20% massique) en quantité non-négligeable chez la chlorelle *Purasana*, serait à l'origine de la formation de ces domaines.

B) *Sorokiniana*

$\pi=21,0$ mN/m, $\Delta=8,4^\circ$

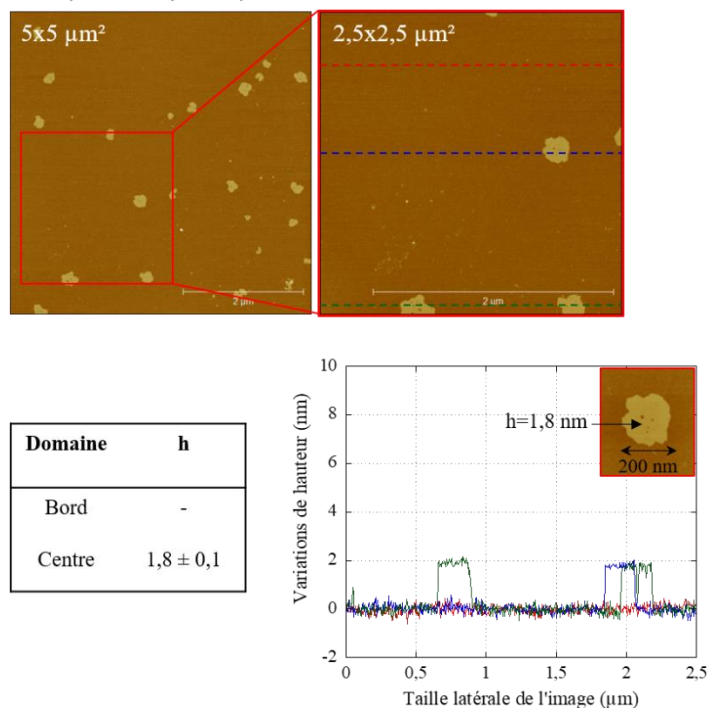


Figure 30 - Images AFM (5×5 et 2,5×2,5 μm²) de la monocouche interfaciale de lipides totaux de chlorelle *sorokiniana* obtenue à pH 7 par prélèvement de Langmuir-Blodgett effectué à $\pi=21,0$ mN/m et $\Delta=8,4^\circ$. Le profil et le tableau relatif aux hauteurs des domaines ont été obtenus par analyse de 3 sections de l'image *via* le logiciel Gwyddion.

La **Figure 30** présente les images AFM de la monocouche de lipides totaux de chlorelle *sorokiniana* *reyto*, obtenues après prélèvement à $\pi=21,0$ mN/m et $\Delta=8,4^\circ$. L'interface du film est semblable à celle obtenue dans les cas des chlorelles commerciales, avec la présence de petits domaines en

CHAPITRE 3

phase condensée de 200 nm de large, coexistants avec une phase fluide. Contrairement au cas précédent, les domaines observés sont homogènes, avec une hauteur unique de $1,8 \pm 0,1$ nm. Cette hauteur est similaire à celle rencontrée précédemment pour les domaines denses (partie extérieur). De la même manière, les domaines sont attribués aux longueurs de chaînes acyles majoritairement palmitiques (C16:0).

La comparaison des résultats obtenus avec les études réalisées sur les systèmes modèles a permis d'émettre l'hypothèse d'une localisation préférentielle des galactolipides en phase fluide, étant donné leur composition largement polyinsaturée. Néanmoins, l'attribution des domaines à un type de molécule n'a pu être déterminée avec exactitude, étant donné la complexité des systèmes naturels étudiés, et les différences de miscibilité entre les molécules.

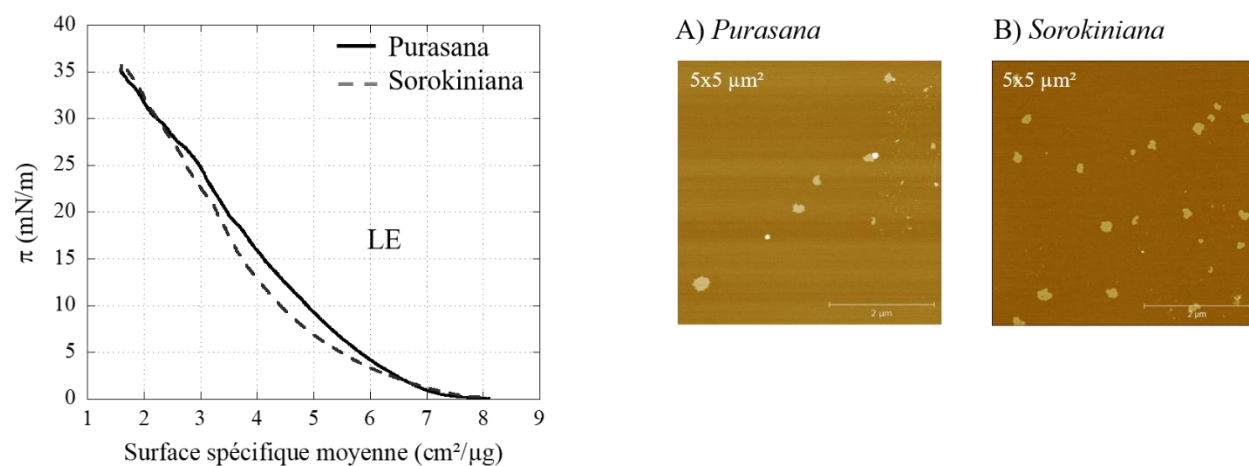


Figure 31 - Isothermes de compression des lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana (trait noir continu) et *sorokiniana* (trait gris foncé pointillé). Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) obtenues à une pression d'environ 20 mN/m des lipides totaux de chlorelles A) *vulgaris* Purasana et B) *sorokiniana*.

La compression des monocouches de lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana et *sorokiniana* a été réalisée afin de déterminer la présence d'une transition de phase. Les isothermes de compression obtenues sont présentées **Figure 31**. Les isothermes de compression respectives des lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana (trait noir continu) et *sorokiniana* (trait gris pointillé) n'ont pas permis de

mettre en évidence la présence de changement de pente significatif, signature de transition de phase, dans les systèmes lipidiques au cours de leur compression. Cette observation n'est pas surprenante, étant donné la composition majoritairement polyinsaturée des microalgues étudiées, et donc l'organisation en phase fluide (LE). Ces mesures ne sont pas contradictoires avec les observations par AFM, les phases LC étant peu présentes, et les transitions de phase des molécules saturées étant masquées lors de la compression.

II.2 – Caractérisation du comportement interfacial des lipides membranaires d'oléosomes : noix *versus* amandes

La caractérisation chimique et interfaciale des lipides membranaires d'OB de noix et d'amandes a été effectuée. Les lipides polaires des membranes d'OB ont été extraits par méthode Folch, puis séparés des lipides apolaires par extraction acétonique.

II.2.1 - Caractérisation chimique des oléosomes extraits des noix et des amandes

Tableau 9 - Composition en phospholipides d'huile de noix et d'amande. A partir de Zlatanov et al. 1999

Phospholipides	Composition (% phospholipides totaux)	
	Huile de noix	Huile d'amande
PC	38	18
PI	28	45
PA	8	15
PE	4	7
PS	2	5

La composition en classes de phospholipides d'huile de noix et d'amandes bulgares a été déterminée par Zlatanov et al. (1999). Les analyses ont montré des profils riches en PC, PI et PE,

CHAPITRE 3

et la présence de petites quantités d'acide phosphatidique (PA) et de PS pour les deux matrices (**Tableau 9**). Les phospholipides retrouvés dans les huiles d'oléagineux sont essentiellement ceux qui composent les membranes des OB. La caractérisation de la composition en AG des lipides totaux extraits des OB isolés des noix et d'amandes par méthode Folch a été réalisée au CIRAD de Montpellier (**Figure 32**).

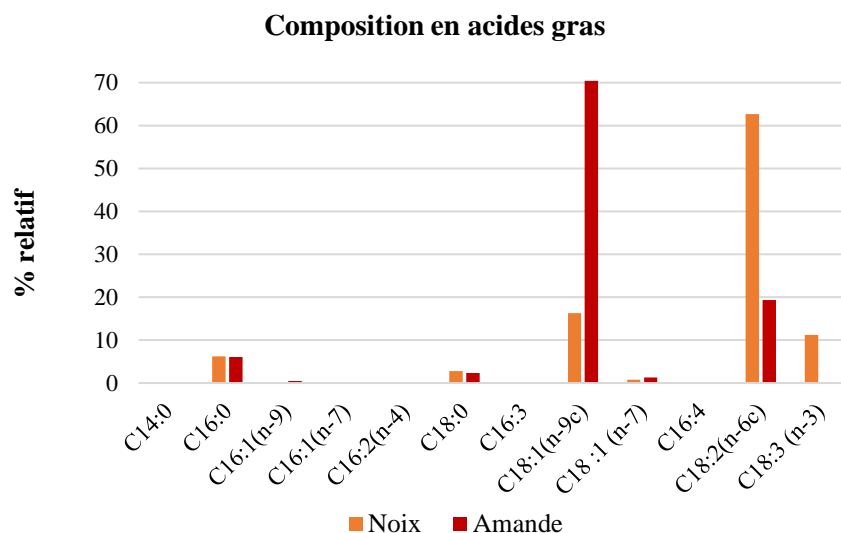


Figure 32 - Composition en AG des lipides totaux extraits des oléosomes isolés de noix et d'amandes. La composition est donnée en % relatif des AG totaux.

Les AG des lipides totaux extraits des OB de noix sont riches en LA (C18:2, $\omega 6$, 63% massique), en acide oléique (C18:1, $\omega 9$, 16% massique) et en ALA (C18:3, $\omega 3$, 11% massique). Des quantités moindres d'AG saturés (C16:0 et C18:0, 6% et 2% massique, respectivement) ont également été détectées. Le ratio $\omega 6/\omega 3$ est de 6, légèrement supérieur aux préconisations de l'ANSES. Dans le cas des lipides totaux d'OB d'amandes, le profil en AG est particulièrement riche en acide oléique (C18:1, $\omega 9$, 70% massique), et en LA (C18:2, $\omega 6$, 20% massique). De l'acide palmitique a également été trouvé en faible quantité (C16:0, 6% massique). Contrairement aux OB de noix, les

OB d'amandes ne contiennent pas d'ALA, et présentent donc un profil nutritionnel peu équilibré en matière d'AGPI essentiels.

II.2.1 – Comportement interfacial des monocouches de lipides extraits des membranes d'oléosomes de noix et d'amandes

Les images AFM des prélèvements de l'interface des lipides membranaires d'OB de noix et d'amande obtenus à une pression d'environ 20 mN/m sont présentés **Figure 33**. Sur les images AFM de l'interface des lipides membranaires d'OB de noix, de larges formes circulaires sont visibles, entourées par une bordure de $3,4 \pm 0,5$ nm de hauteur. Ces formes circulaires sont caractérisées par une phase probablement fluide et hétérogène, en séparation de phases avec le fond de l'image. Au centre, un domaine circulaire en phase plus dense et plus haute ($4,6 \pm 0,4$ nm) est visible, probablement composé de TAG non séparés au cours de l'extraction, ou d'AG à longues chaînes saturées.

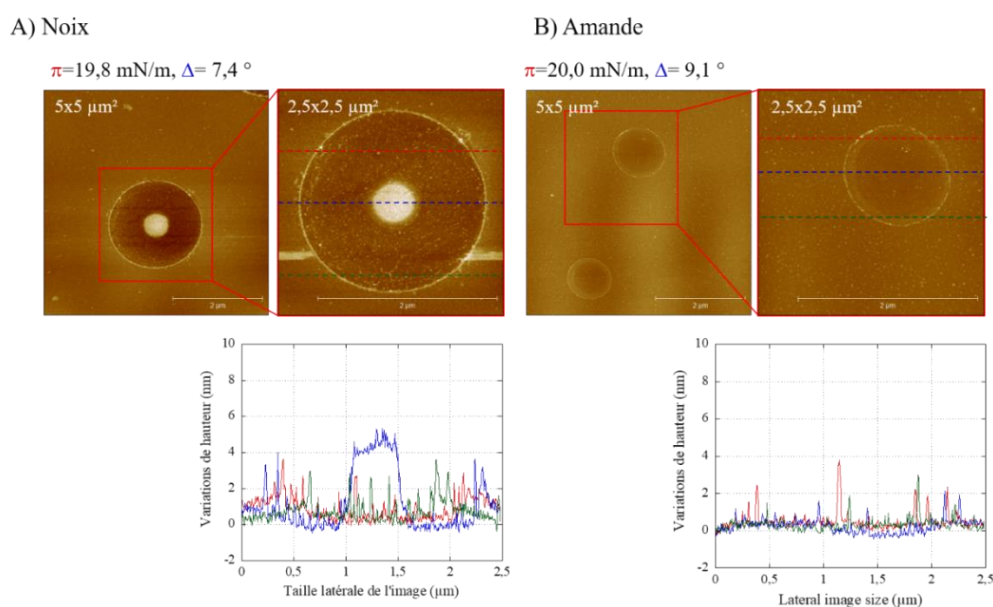


Figure 33 - Images AFM (5×5 et $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$) des films interfaciaux de lipides membranaires d'oléosomes de A) Noix et, B) Amande, obtenues à une pression de surface $p=19,9 \pm 0,1$ mN/m. Les profils de hauteur ont été obtenus à partir des images à $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$ et sont les résultats de l'analyse de trois sections de l'image.

CHAPITRE 3

L'organisation interfaciale des deux extraits présente globalement de fortes similitudes, avec l'apparition de formes circulaires attestant d'une hétérogénéité dans la répartition moléculaire, ou, autrement dit, d'une immiscibilité moléculaire. En effet, les molécules se regroupent par affinité pour maximiser les interactions latérales électrostatiques (têtes polaires) et hydrophobes (chaînes acyles). Les formes circulaires présentent des bordures de hauteurs qui diffèrent entre les deux extraits. Elle est plus faible pour l'amande, de $2,9 \pm 0,8$ nm. La principale différence se situe au cœur de ces formes circulaires, le domaine central plus haut présent dans les extraits de noix étant absent dans ceux d'amandes. Ces différences de comportement pourraient être dues à une séparation des lipides polaires et des TAG plus efficace dans le cas du système OB d'amandes, mais également à la différence de composition en AG existant entre les deux matrices.

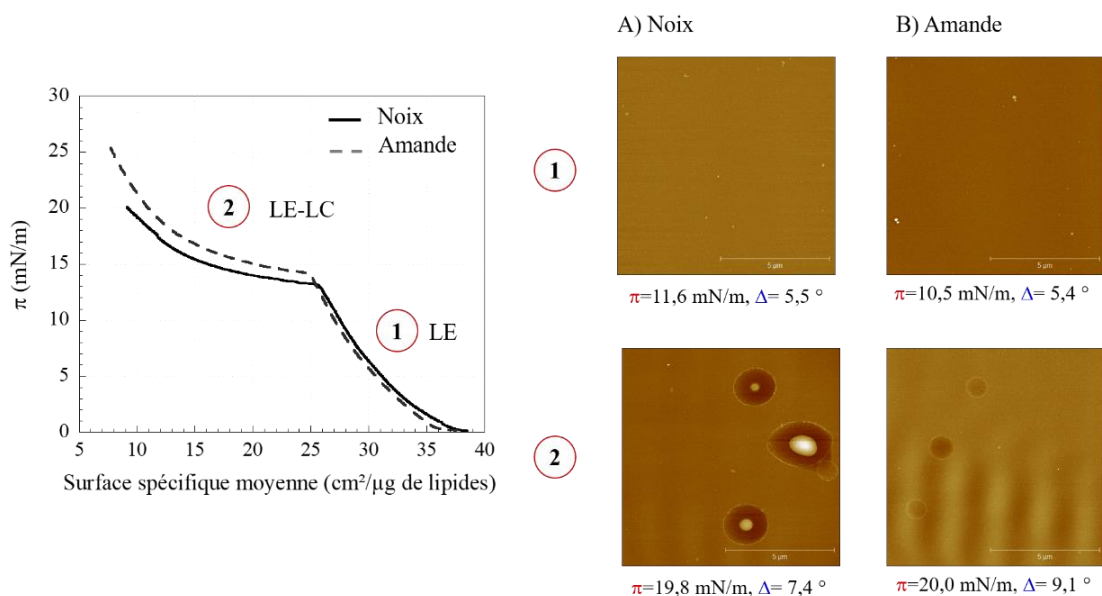


Figure 34 - Isothermes de compression des monocouches de lipides membranaires d'OB de noix (noir continu) et d'amandes (gris pointillé) et images AFM ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) des zones 1 et 2 correspondantes, des monocouches interfaciales des lipides membranaires d'OB de A) noix et B) d'amandes.

Le comportement sous compression des monocouches de lipides membranaires de noix et d'amandes, a été étudié en faisant varier l'aire de la cuve de Langmuir entre 77 et 21 cm² après le

dépôt d'une faible quantité de lipides à l'interface (π initiale de 20 mN/m) (**Figure 34**). Les isothermes de compression respectives des deux systèmes ont permis de mettre en évidence la présence d'une transition de phase LE (zone 1) vers LE-LC (zone 2).

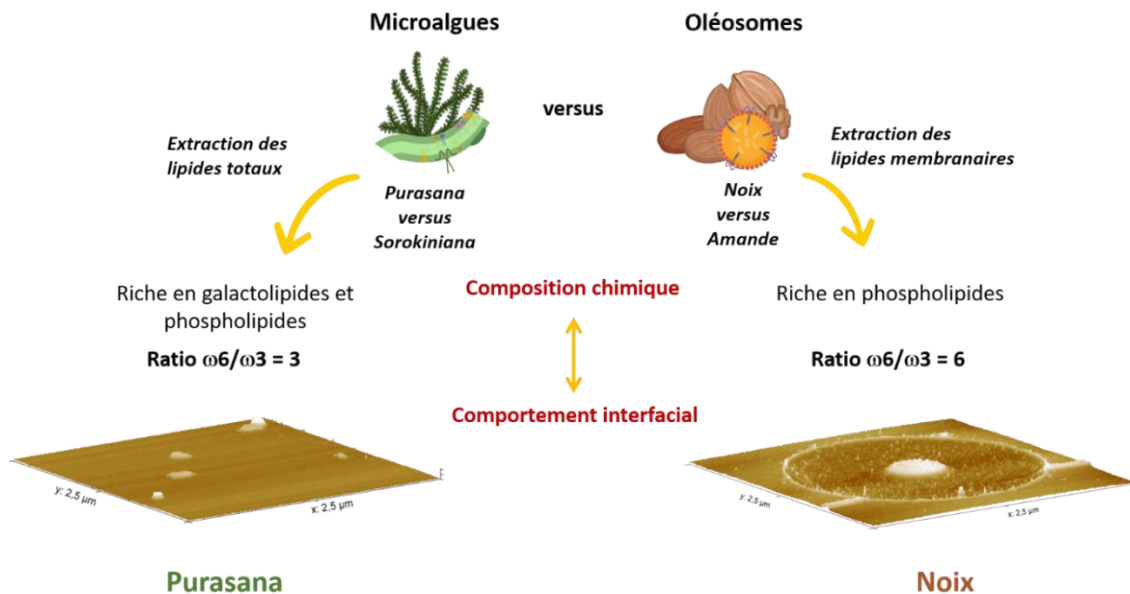
Les valeurs de pression de surface et de surface spécifique auxquelles ces transitions de phase ont été obtenues pour les deux monocouches sont renseignées dans le **Tableau 10**. Pour chacun des systèmes lipidiques étudiés, la zone 1 est caractérisée par une phase fluide continue, tandis que la zone 2 marque l'apparition des formes circulaires précédemment décrites à 20 mN/m.

Tableau 10 - Valeurs de pressions de surface (π , mN/m) et de la surface spécifique (S , cm²/μg) auxquelles a été observé une transition de phase lors de la compression des monocouches de lipides membranaires d'OB de noix et d'amandes.

Monocouche	π (mN/m)	Surface spécifique (cm ² /μg)
Lipides totaux OB noix	13,3 ± 0,1	26,7 ± 1,5
Lipides totaux OB amande	14,4 ± 0,3	25,5 ± 0,5

± désigne la déviation standard calculée sur les duplicatas de mesure.

Principaux résultats de l'étude



- Les lipides totaux de chlorelle sont riches en galactolipides, en phospholipides et en AGPI $\omega 3$. L'excellent profil nutritionnel de cette biomasse algale a été confirmé par le ratio $\omega 6/\omega 3 \leq 3$. Les lipides membranaires d'OB de noix sont composés de phospholipides riches en $\omega 6$ et présentent un ratio $\omega 6/\omega 3=6$. Les phospholipides d'OB d'amandes présentent une composition beaucoup plus déséquilibrée, particulièrement riche en $\omega 6$ et en $\omega 9$, et pauvre en $\omega 3$.
- Les monocouches de lipides totaux de chlorelles sont caractérisées par une phase fluide, dans laquelle coexistent des nanodomains en phase LC riches en AG saturés. Les monocouches de lipides extraits des membranes d'OB sont caractérisées par une hétérogénéité moléculaire à 20 mN/m, avec la présence de formes circulaires attestant de séparations de phases.

III – Caractérisation initiale du comportement oxydatif et interfacial des assemblages membranaires isolés

III.1 - Caractérisation de la stabilité oxydative des liposomes de lipides totaux extraits de *Ch. vulgaris* et du comportement interfacial de la poudre de chlorelle déshydratée (Purasana)

Les algues et les microalgues sont des organismes aquatiques riches en protéines photosynthétiques, en galactolipides, et en pigments (Demarco et al., 2022). Ces organismes photosynthétiques sont consommés dans certaines régions du monde depuis des siècles et leur potentiel nutritif a été souligné dans de nombreux rapports, expliquant un intérêt croissant vers leur utilisation dans de nouvelles applications alimentaires (Torres-Tiji et al., 2020).

La *Chlorella vulgaris* est une espèce de microalgue verte photosynthétique unicellulaire d'eau douce qui appartient au genre des *Chlorella*, dont le diamètre varie entre 2 et 8 μm en fonction des espèces. Cette microalgue contient une teneur particulièrement élevée en chlorophylle, qui lui confère une couleur verte, et lui permet de convertir la lumière absorbée en énergie par le processus de photosynthèse. Ce pigment est un puissant antioxydant du fait de son noyau porphyrinique pouvant chélater des métaux (Mg dans photosynthèse), mais comprenant aussi de nombreux électrons délocalisables pouvant favoriser les transferts d'électrons ou d'hydrogènes (Pérez-Gálvez et al., 2020). De plus les galactolipides présents en quantité abondante dans les chlorelles ont aussi été présentés dans la littérature comme plus stables à l'oxydation que les phospholipides. Sans entrer dans une caractérisation mécanistique approfondie, il nous a semblé intéressant d'étudier la stabilité au stockage des extraits de lipides totaux de chlorelles en faisant l'hypothèse que leur teneur élevée en galactolipides ainsi qu'en chlorophylle résiduelle les rendraient assez stables à l'oxydation, malgré une teneur en $\omega 3$ importante.

Nous avons donc déterminé la stabilité oxydative des liposomes de lipides totaux extraits des chlorelles commerciales Purasana sur une période de stockage de 19 jours dans des conditions d'oxydation accélérées (composition décrite chap. 3.II.1). Nous avons ensuite étudié les propriétés tensioactives à l'interface air/eau de la poudre de chlorelles déshydratée Purasana, telle que disponible dans le commerce, afin de déterminer son potentiel d'émulsifiant naturel.

III.1.1 - Stabilité oxydative des liposomes de lipides totaux extraits des chlorelles *Ch. vulgaris* commerciales Purasana

Un test de stockage dans des conditions d'oxydation accélérée (40°C, 20 jours, 110 rpm) des liposomes (1 µm) de lipides totaux extraits des chlorelles Purasana à 0,2% massique en solution Tampon pH 7 a été mis en place. La **Figure 35** présente l'évolution des concentrations des produits secondaires d'oxydation sur une période de 19 jours (test TBARS).

Les résultats témoignent de l'excellente stabilité chimique des liposomes de lipides totaux de chlorelle au cours de leur stockage dans des conditions d'oxydation accélérées. Une très faible augmentation des produits secondaires d'oxydation a en effet été observée sur une période de 19 jours ($\delta C = +0,18$ mmol MDA/kg d'huile), et une valeur finale de 0,35 mmol MDA/kg d'huile a été obtenue, bien inférieure à la limite de commercialisation tolérée pour les produits carnés (1 mmol MDA/kg d'huile). Ce résultat peut paraître surprenant, étant donné la teneur élevée en AGPI dans la matrice algale étudiée. En comparaison, la qualité nutritionnelle et la durée de vie des huiles de poissons, qui sont également très riches en AGPI et représentent une source majeure d' $\omega 3$, a été montrée comme fortement impactée par l'oxydation rapide de ces lipides (Arab-Tehrany et al., 2012). Les huiles de poissons sont en effet particulièrement riches en AGPI-LC EPA et DHA (Ackman, 1967), qui présentent une sensibilité accrue à l'oxydation lipidique, expliquant l'oxydation rapide et importante des huiles de poissons émulsifiées (Let et al., 2007).

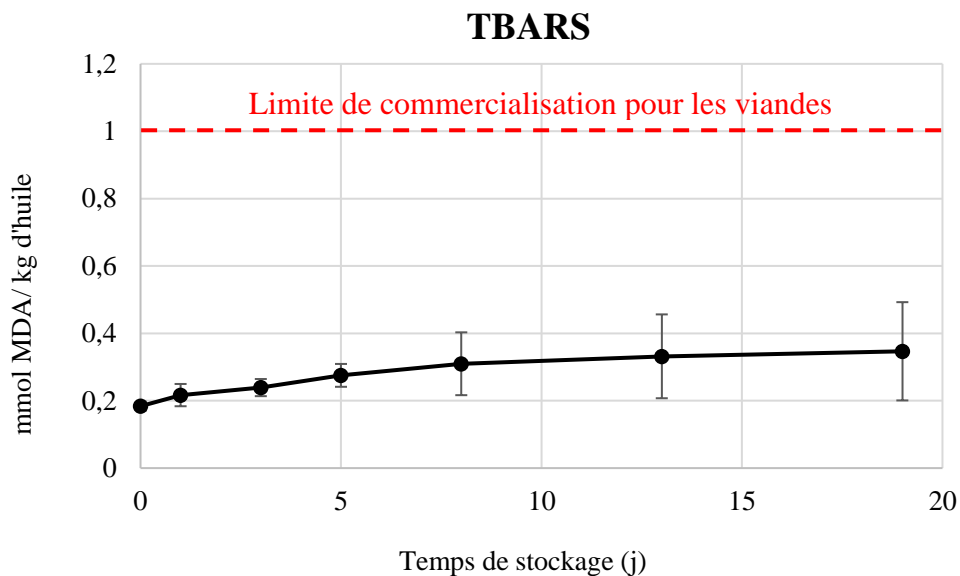


Figure 35 – Evolution des produits secondaires d’oxydation (mmol MDA/kg d’huile) dans les dispersions de liposomes de lipides totaux de *Chlorella vulgaris* Purasana sur une période de 19 jours (1 μm , 0,2% massique, 40°C, 110 rpm).

Dans le cas des liposomes de lipides totaux de chlorelle (1 μm), l’extrême stabilité oxydative observée peut être expliquée par l’absence d’AGPI-LC EPA et DHA, mais également par la présence de pigments, et en particulier de chlorophylle, dont les propriétés bioactives antioxydantes ont déjà été démontrées (Queiroz Zepka et al., 2019). De plus, l’oxydation rapide et conséquente des huiles de poissons a précédemment été observée dans le cas de systèmes émulsionnés, tandis que dans notre étude, la stabilité chimique des lipides totaux de chlorelle a été étudiée dans des systèmes dispersés dilués.

III.1.2 – Capacité tensioactive et comportement interfacial de la poudre de chlorelles déshydratées Purasana à l’interface air/eau

Les propriétés tensioactives d’une poudre de chlorelle (composition en **Annexe III**) contenant des fragments membranaires ont ensuite été étudiées à l’interface air/eau. La **Figure 36** présente l’évolution de la pression de surface (π , mN/m) et de l’angle ellipsométrique (Δ , °) sur une cinétique

CHAPITRE 3

de 5h après remplacement de la sous-phase (tampon pur, $\pi=0$ mN/m, et $\Delta=0^\circ$) par la solution de poudre de chlorelles diluée (22,5 mg/L). Dès le changement de la solution de sous-phase, une augmentation rapide de π a été observée, soulignant la présence de particules à l'interface, et l'établissement d'interactions entre elles à l'interface air/eau. Ce comportement s'explique par l'adsorption rapide des fragments membranaires de chlorelle à l'interface air/eau, et souligne leur potentiel tensioactif important.

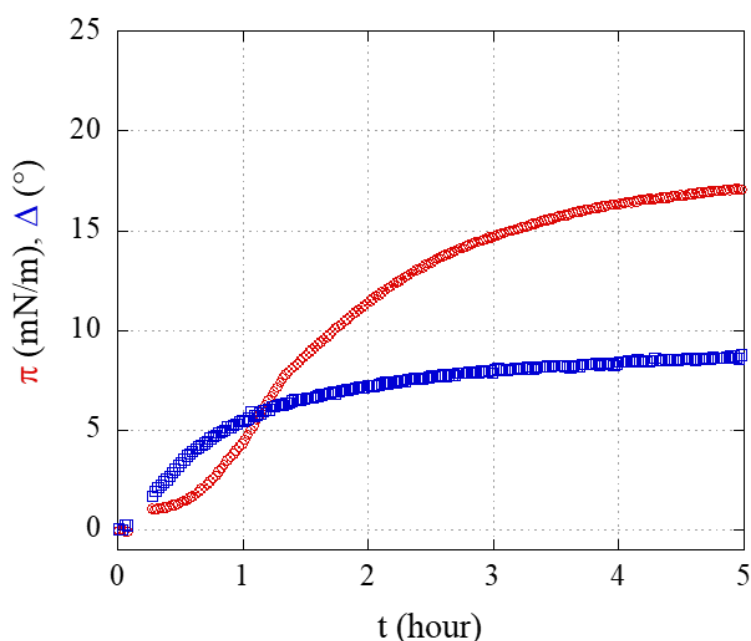


Figure 36 - Cinétique d'adsorption de la poudre de chlorelles diluée ($C=22,5$ mg/L) à l'interface air/solution tampon (Tris, pH 7). La courbe rouge correspond à la pression de surface et la courbe bleue à l'angle ellipsométrique. La pression superficielle et l'angle ellipsométrique obtenus après 5h de cinétique sont de 17,2 mN/m et 8,7°, respectivement.

Après 5h de cinétique, l'interface a été prélevée en utilisant la technique de Langmuir-Blodgett, et les images obtenues en AFM de la surface et de la topographie du film sont présentées **Figure 37**.

Les images AFM sont très hétérogènes. Elles présentent un fond continu en phase fluide, probablement composé d'un mélange de galactolipides et d'acides gras libres insaturés. Des protubérances de hauteurs variables, comprises entre 10 et 40 nm, sont également visibles, et

attribuées à l'adsorption d'agrégats ou de fragments riches en protéines photosynthétiques à l'interface, celles-ci représentant plus de 60% de la composition de la poudre de chlorelle étudiée.

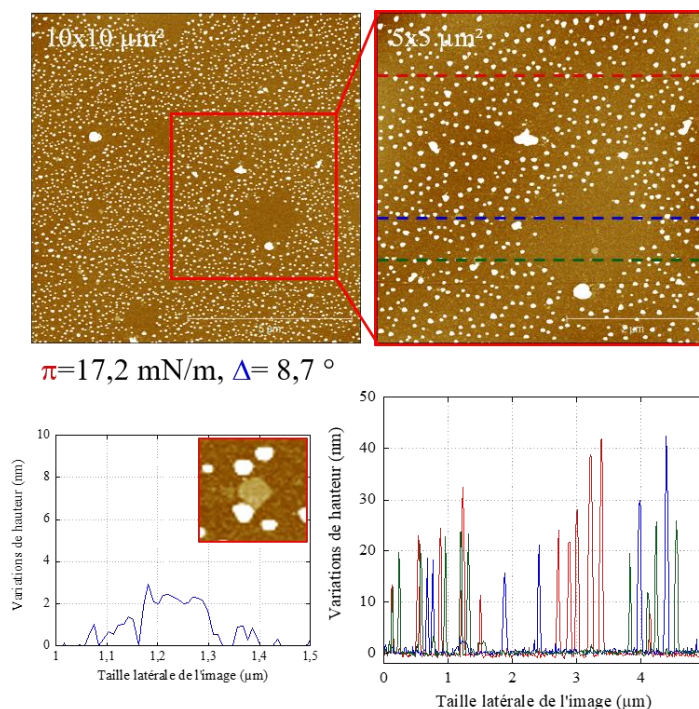


Figure 37 - Images AFM (5×5 et $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$) du film interfacial obtenu après 5h de cinétique d'adsorption des d'une solution de poudre de chlorelles à 22,5 mg/L à l'interface air/tampon (Tris, pH 7). Sur l'image de $5 \times 5 \mu\text{m}^2$, les hauteurs sont obtenues à partir de 3 sections (rouge, bleu, vert).

Des domaines plats en phase LC de $2,3 \pm 0,3 \text{ nm}$ de hauteur sont également visibles, en accord avec les domaines lipidiques observés dans le cas des monocouches de lipides totaux extraits des *Ch. vulgaris* Purasana. Ainsi, on peut supposer qu'une partie des fragments se déstructure à l'interface, tandis que d'autres restent intègres. Les produits commerciaux contenaient également des glucides (17 % massique) et des fibres (12%), qui sont très certainement demeurés en sous-phase étant donné leur structure hydrophile, d'autant que les fibres n'apparaissent pas sur les images AFM. Des chlorelles entières sont également visibles sur les images de la dispersion de la poudre de chlorelle en microscopie confocale (**Annexe IV**), celles-ci demeurant également en sous-

CHAPITRE 3

phase. La **Figure 38** résume le mécanisme proposé d'organisation des constituants de la poudre de chlorelles diluée à l'interface air/eau.

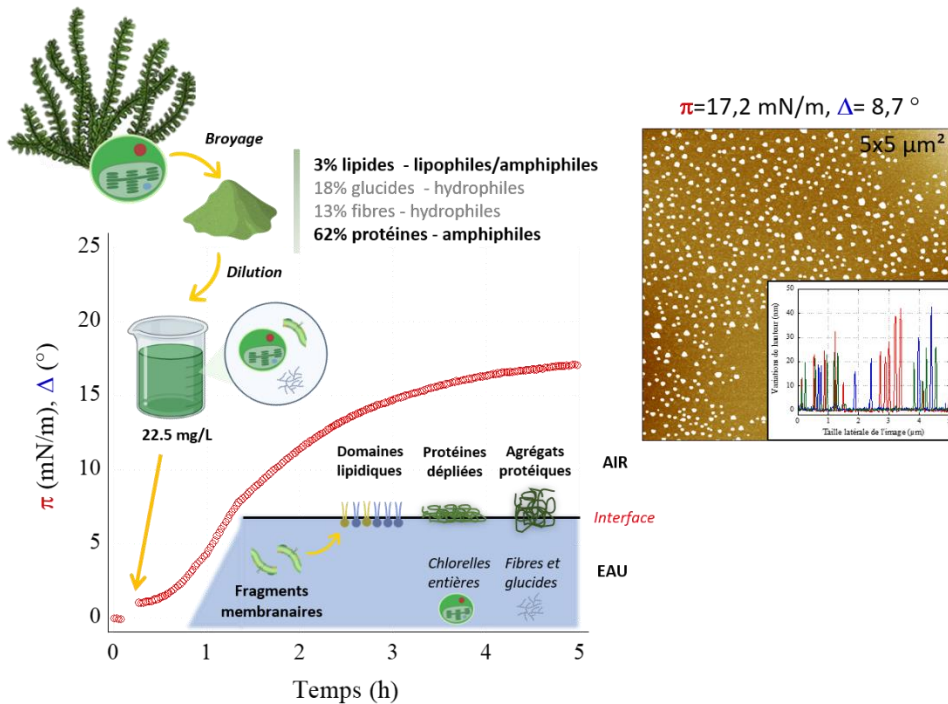


Figure 38 – Mécanisme d'organisation proposé à l'interface air/eau des constituants de la poudre de chlorelles Purasana diluée.

Globalement, l'évolution des courbes de tensiométrie/ellipsométrie et les images AFM confirment les capacités tensioactives des fragments membranaires de chlorelle à l'interface air/eau, grâce à l'organisation structurale naturelle des différents constituants, et en particulier à la présence de molécules amphiphiles (protéines, lipides).

III.2 – Stabilité à l’oxydation et comportement interfacial des oléosomes de noix

Article de recherche- Kergomard et al., Food Chem, 2021

Stability to oxidation and interfacial behavior at the air/water interface of minimally-processed versus processed walnut oil-bodies

Name(s) of Author(s) Jeanne Kergomard^{1,2,3}, Gilles Paboeuf^{1,4}, Nathalie Barouh³, Pierre Villeneuve³, Olivier Schafer⁵, Tim J. Wooster⁵, Claire Bourlieu², Véronique Vié^{1,4*}

Abbreviations

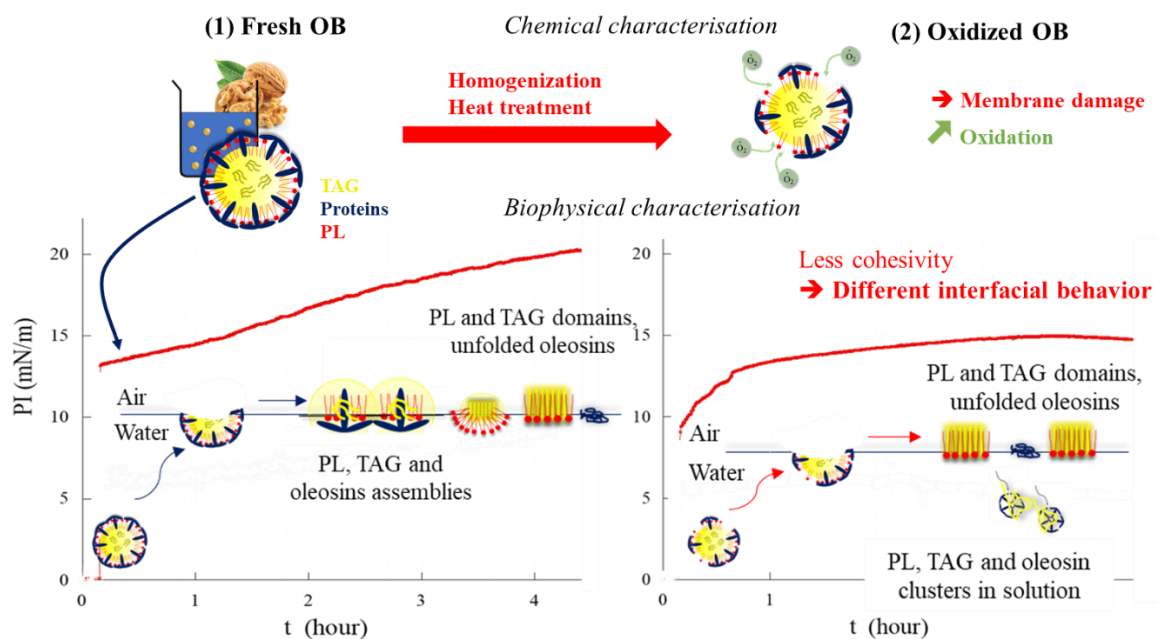
EggPC: Phosphatidylcholine from egg yolk

EggPC-WOIL: model solution containing EggPC (2% wt) and WOIL (95% wt) diluted at 4% wt

Oleo-TAG: model solution containing oleosins (3% wt) and TAG (95% wt) diluted at 4% wt

Oleo-WOIL: model solution containing oleosins (3% wt) and WOIL (95% wt) diluted at 4% wt

WOIL: Commercial walnut oil



CHAPITRE 3

ABSTRACT Oil bodies (OB), the form of triacylglycerol storage in seeds, are interesting natural assemblies for nutritional applications. In walnuts, OB contain an important amount of polyunsaturated fatty acids that could be interesting food ingredients but may be prone to oxidation. The oxidative and interfacial behavior of walnut OB, either minimally-processed or after processing, were compared with processed complex walnut juice. The good oxidative stability of minimally-processed OB over 10 days ($PV \leq 8.4$ meq O_2/kg , TBARS=1.4 mmol eq MDA/kg) and of processed walnut complex matrixes over 20 days ($PV \leq 4.8$ meq O_2/kg , TBARS=1.4 mmol eq MDA/kg) was evidenced. In comparison, processing of OB promoted their oxidation. The interfacial studies led to the proposition of a new model of adsorption for minimally-processed OB that will be useful to design functional emulsion or foam in which OB act as emulsifiers.

KEYWORDS: walnut beverage emulsion; oil bodies; oxidative stability; ellipsometry; minimalist processes

1 INTRODUCTION

Oleosomes or oil bodies (OB) are very specific lipoproteic entities that enable plants to store the energy they need for germination and growth (Khor et al., 2013; Walther & Farese, 2012). OB vary in size from nanoscopic (500 nm) to a few micrometers (2.5 μm) (Frandsen et al., 2001). The structure of an OB is based on a triacylglycerol (TAG) core droplet (94-98% wt.) surrounded by a monolayer of phospholipids (PL) (0.6-2% wt.) with embedded proteins (0.6-3% wt.) (A. H. C. Huang, 1994; Napier et al., 2001). Such lipoproteic monolayer protects the OB from chemical or mechanical stresses (Nikiforidis et al., 2014). Three types of proteins are present in the lipid monolayer, oleosins, caleosins and stereosins; oleosins being the most abundant (1-4% wt.) (Napier et al., 2001). Thanks to the presence of oleosins, OB are remarkably stable against aggregation and coalescence (Barre et al., 2018; Napier et al., 2001; Nikiforidis et al., 2014). This stability is attributed to steric hindrance and to the negatively charged surface of the monolayer at physiological pH, leading to electrostatic repulsion between OB and reducing aggregation (Shimada et al., 2018). The natural stability of these assemblies explains the considerable attention recently paid to OB (Nikiforidis, 2019). In addition, they can be considered as minimally processed entities that deliver TAG, liposoluble vitamins, and proteins for human nutrition. While a multitude of products is derived from nuts and seeds, few exist where the OB remains in its native or minimally-processed form.

Walnuts are among the most widely consumed commercially grown tree nuts in the world (Hayes et al., 2016). Their consumption is associated with many health benefits, including reducing the risk of cardiovascular disease, and neurological disorders (Simopoulos, 2002). These benefits are attributed to their fatty acid (FA) profile, which is rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Hayes et al., 2016). Walnut lipids contain 90% unsaturated FA, of which 12-16% is α -linolenic

CHAPITRE 3

acid (ALA, C18:3, ω 3) that very likely explain the cardioprotective effects of a diet rich in walnuts (Maguire et al., 2004). Walnut lipids are also considered to be a good source of vitamins and dietary fibers (Miraliakbari & Shahidi, 2008). To date, most research on walnut lipids has focused on their chemical composition (Venkatachalam & Sathe, 2006). In addition to TAG, tree nut lipids contain phytosterols, PL, and tocopherols, which are known to confer good oxidative stability to oil in water emulsion (Samdani et al., 2018).

Several studies have been dedicated to OB colloidal stability, with special emphasis on soybean source (Kapchie et al., 2013; Zhao et al., 2016). The chemical stability during the storage of emulsions prepared with OB from oilseeds has been investigated, including issues of endogenous hydrolytic activity (De Chirico et al., 2020) and oxidative sensitivity (B. Chen et al., 2012). Nevertheless, the use of oilseed OB with high PUFA content is limited because of their susceptibility to oxidation (Nuchi et al., 2002). Lipid oxidation is an undesirable reaction in food applications and the dispersion of lipids in emulsions further increases this phenomenon by increasing contact with oxygen and pro-oxidant species. This explains why lipid oxidation is a major cause of degradation during the manufacture and storage of food products (Villière, 2005), and also explains why the use of OB in beverages requires a good understanding of their physical and chemical stability to obtain a product that meets consumer expectations.

Despite the high number of publications on vegetal juices and OB chemical characterization (J. Tzen et al., 1993), questions remain open regarding the interfacial behavior of OB. Some insights have been gained into the physical stability of natural OB (White et al., 2008) and their organization at the interface (Bettini et al., 2014; Waschatko et al., 2012). However, the mechanism of interfacial organization of native OB has not yet been fully elucidated, especially when the objects have been

degraded by oxidation, even though such characterization could help understand plant-based beverage reactivity.

The aim of this study was thus to investigate the oxidative behavior of walnut OB using accelerated oxidative storage conditions, to determine the chemical stability of those lipoprotein assemblies when they are in a complex matrix (walnut beverage) or in isolated form at different levels of processing (minimum level, homogenized only, homogenized plus heat-treated). Biophysical tools were used to understand the organization of OB at the interface, and the behavior of their three different constituents, TAG, PL, and proteins (oleosins). Such investigations are required to better understand the reactivity of OB and are of interest for a large panel of food technological applications.

2 MATERIALS AND METHODS

All chemicals were purchased from Sigma Aldrich Ltd. (St. Louis, MO), except for ultrapure (UP) water, hexane, and acetic acid purchased from Honeywell Research Chemicals (Charlotte, NC, USA). If not stated otherwise, all biochemical characterizations were conducted at least in triplicate and biophysical characterization at least in duplicate.

2.1. Preparation of the complex matrixes and isolation and purification of OB

Walnut kernels (*Juglans regia L.*, *Chandler variety*, *origin Chile*) were supplied by Sun-Snack AG (St Margrethen, Switzerland). Walnut kernels were soaked in 2% wt. NaCl solution (ratio nuts/solution, 1:20 w/v) and stirred for 16 hours at 200 rpm (Legallais IKA, KS4000 i control) to remove tannins, astringency and soluble impurities in the skin (Ghaderi-Ghahfarrokhi et al., 2017). Sodium azide (0.02% wt.) was added to the final preparation to insure preservation.

2.1.1 Complex matrix preparations: walnut beverages with or without added sodium caseinates (3% wt.)

The procedure for complex matrix preparation was provided by the Institute of Materials Science (Nestlé Research). After soaking and rinsing twice with UP water, 38 g aliquots of walnut kernels were dried, redispersed in 500 mL of UP water and boiled at 90°C in the food processor (Vorwerk Thermomix TM31) for 10 min while blending at low-speed. For one modality of walnut complex matrix including additional emulsifiers, these emulsifiers, i.e. sodium caseinates (3% wt.) were added at this stage. Another modality was produced without sodium caseinates (called hereafter walnut complex matrix). Then, the mixture was blended at maximum power (stage 10). The coarse nut emulsions were pre-homogenized using a high shear laboratory mixer (Silverson, L5M-A) at a shearing speed of 8 000 rpm for 1 min with a square head. The emulsion was sieved through a 300 µm stainless steel sieve to get rid of large solid particles that could hinder high pressure homogenization. To obtain a fine emulsion with a relatively small particle size, the emulsion was passed through a two-stage laboratory homogenizer (Niro Soavi, Panda 2K) with heads set at 3.0×10^7 Pa and 8.0×10^6 Pa.

2.1.2 Isolation and purification of OB

OB were isolated from walnut kernels and purified using the method of Kapchie et al. (2011). After soaking and rinsing twice with UP water, the walnut kernels were manually ground with a pestle and mortar. Aliquots (50 g) of walnut kernels were mixed with UP water at ratio of 1:6 (g/mL) and stirred at 10 000 rpm for 5 min in a lab disperser (Ultra-turrax, IKA, T18 digital). The mixture was sieved in 315 µm stainless-steel sieve. The first wash consisted of centrifuging the filtered solution at 4 000 g at 4°C for 30 min (Beckman Coulter, Avanti J-E). The layer of cream at the top of the tube was collected and washed three times in buffer solution (0.1 M Tris-HCl, 4 M sucrose, 0.5 M

NaCl, pH 8.6, ratio 1:6 g/mL) by centrifugation at 4 000 g at 4°C for 30 min. The upper phase was collected each time. All the upper phases were pooled, then washed twice in UP water (ratio 1:6 g/mL) by centrifugation at 4 000 g at 4°C for 30 min. The resulting cream layer of isolated OB was dispersed (4% w/v) in a 0.1 M Tris-HCl solution at pH 7. A diagram for the procedure of OB isolation and purification is available in Figure S1 (supplementary material).

2.2 Processing of dispersed isolated OB

High-pressure homogenization (HHP) treatments were carried out in a two-stage high-pressure homogenizer (Niro Soavi, Panda 2K) by applying 3.0×10^7 Pa and 8.0×10^6 Pa, for first and second head respectively. One fraction of isolated HHP OB was subjected to an additional heat treatment (modality called hereafter HHPT) at 90°C for 10 min. The minimally processed (MP) sample underwent no processing. In total, three modalities were obtained based on the dispersed OB cream layer solution, named respectively, MP, HHP and HHPT, according to the operation units applied.

2.3 Oxidation test challenge to monitor the chemical stability of OB in isolated forms or in complex matrixes

2.3.1 Storage test set-up

The OB emulsions were divided into 8 mL triplicates in amber centrifuge tubes and stored in an incubator (Legallais IKA KS4000 i control) at 40°C for 20 days under constant agitation at 110 rpm (Genot & Michalski, 2010). Aliquots were taken at days 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15 and 20 for analysis of levels of oxidation in the samples (PV and TBARS assays).

2.3.2 Monitoring of lipid oxidation using PV and TBARS assays

Peroxide values (PV) were first determined, using the method of Mihaljević et al. (1996) and Shantha & Decker (1994). This PV index is indicative of the number of active oxygen atoms in the

CHAPITRE 3

organic chains, leading to the formation of unstable primary oxidation products such as hydroperoxide. 250 μL aliquot of the sample was added to 500 μL of a mixture of methanol and butanol MeOH/BuOH (3:1 v/v) and vortexed for 10 s, and 30 μL of the diluted sample were placed on a clear microplate (ANSI/SLAS (SBS) format) with 230 μL of MeOH/BuOH (3:1 v/v), 2.5 μL of iron chloride solution and 2.5 μL of ammonium thiocyanate. After 10 min of reaction, absorbance was measured at 532 nm using a microplate reader (Nanoquant Infinite 200 Pro, TECAN, Gröedig, Austria). Contribution of protein to PV was eliminated by comparison with the iodometric normalized method of determination of peroxide index (*Norme Française* NF T60-220, 1968). The results are expressed in meq O_2/kg of oil.

The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay, adapted from Ghani et al. (2017) and Ohkawa et al. (1979), was performed. The TBARS assay measures the equivalent concentration of reactive malondialdehyde (MDA), a secondary oxidation product produced by the degradation of unstable peroxide lipids. 50 μL aliquot of the sample was added to 50 μL of UP water, 200 μL of a solution containing 15% (w/w) of trichloroacetic acid (TCA), 0.375% (w/v) of thiobarbituric acid (TBA) and 0.25 mol/L of hydrochloric acid. The tubes were placed in warm water (90°C) for 15 min, then in ice for 5 min and centrifuged for 10 min at 7 700 g (centrifuge 5427, Eppendorf). Aliquots (200 μL) of the sample were placed on a clear microplate (ANSI/SLAS (SBS)) and absorbance was measured at 532 nm using a microplate reader (Nanoquant Infinite 200 Pro, TECAN, Gröedig, Austria). The results are expressed in mmol equivalent MDA/kg of oil.

2.4 Chemical characterization of walnut kernels

Walnut kernels (2 g) were ground and incorporated into 5 mL of UP water and 40 mL of Folch solution (chloroform/methanol 2:1 v/v) (Folch, 1957). The mixture was passed through a lab disperser (Ultra-turrax, IKA, T18 digital) for 1 min at between 9 500 and 13 500 rpm. In a 500 mL

168

separating funnel, the solution was washed once with 22.5 mL of NaCl solution at 0.73%, then twice with 50 mL of a solution containing 40 mL of Folch and 10 mL of NaCl solution at 0.58%. The lower phase was collected between each wash and solvents were evaporated under reduced pressure.

2.4.1 Lipid class composition of walnut Folch extracts by thin-layer chromatography (TLC)

Neutral lipids were separated by one-dimensional migration using hexane/diethylether/acetic acid (65:35:1 v/v/v) in an automatic TLC sampler (Camag, Muttenz, Switzerland) controlled by a Wincats software system (2008) (Bourlieu et al., 2012). After migration, the silica plates were dried at 70°C for 2 min and then revealed with a 15.9% solution of copper sulfate in an orthophosphoric acid/water (92:8 v/v) solution. For each sample, 0.5 mg/mL of lipid solution was used to automatically apply 4 and 8 µL on the thin layer. After revelation, the silica plates were subjected to laser UV detection (Camag TLC scanner 3, Muttenz, Switzerland). The wavelength of maximum absorption was 500 nm, the spots were quantified and spot intensities integrated with Wincats software (2008). Calibration curves were performed with standards of TAG, diacylglycerol (DAG), monoacylglycerol (MAG) and FFA (palmitic, oleic and linoleic acids).

2.4.2 Fatty acid composition of walnut Folch extracts by gas chromatography (GC)

Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared from the walnut Folch extracts (Piombo et al., 2006). Aliquots (5 µL) of methylated Folch extract were analyzed by GC (Focus GC, Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA) equipped with a split injector (ratio of 1/20), a CP-Cil 88 Varian capillary column (50 m × 0.25 mm with a 0.2 µm thick film; Chrompack, Middelburg, The Netherlands) and 1 mL/min of helium as carrier gas. FAME were analyzed using a flame

ionization detector and ChromCard Data System (version 2005; Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA).

The column temperature started at 150 °C, increased from 150 °C to 225 °C at a rate of 5°C/min and maintained at 225 °C for 10 min. These chromatographic conditions allowed the correct and rapid separation of all FAME from C10:0 to C24:1. FAME were identified using a mixture of methyl esters as external standard (Mixture ME 100, Larodan, Sweden). The injector and detector temperatures were 250 °C and 270 °C respectively. FA contents are expressed in g per 100 g of fresh product.

2.4.3 Tocopherol content of walnut Folch extracts by high performance liquid chromatography (HPLC)

HPLC analysis on Folch extracts was performed using the 1290 Agilent System (Massy, France) equipped with a C18 column (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm, HALO(R)-5 column, AMT, Wilmington, Delaware, USA) and a fluorescence detector, to detect and quantify four distinct tocopherols (α , β , δ and γ) (Moustiés et al., 2019). The mobile phase consisted of ethanol/methanol (40:60 v/v) in isocratic conditions. The temperature of the column was maintained at 25 °C and the flow rate was 0.8 mL/min. Fluorescence detection was set at 296 nm for excitation and 330 nm for emission. The injection volume was 20 μL and the calibration curves were performed with standard solutions from 0.1 to 1.5 mg/L. Each sample was analyzed with three repetitions.

2.5 Structural characterization of dispersed isolated OB as their native form or after different physico-chemical treatments during the oxidation challenge

2.5.1 Droplet size of isolated OB in MP, HHP, and HHPT matrixes

The size distributions of OB were measured by laser light scattering using a Mastersizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK), with two laser sources. The refractive indexes used were 1.333 for water and 1.460 for dispersed OB respectively. The samples were diluted directly in the measurement cell of the apparatus in order to reach 7% obscuration. Several parameters were calculated from the size distribution: the mode diameter, which corresponds to the population of the most frequent OB in the volume distribution, the surface-weighted average diameter of the OB d_{32} (μm), defined as $\sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$, and the specific surface area calculated according to the equation $S = 6 \cdot \phi / d_{32}$ (where ϕ is the volume fraction of lipid in the emulsion).

2.5.2 Study of MP, HHP and HHPT matrix microstructure using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

The matrix microstructure was observed using a CLSM system (Leica SP8, Heidelberg, Germany) on an inverted microscope operated with an argon laser (excitation at 488 nm) and two He-Ne lasers (excitation at 543 and 633 nm) that enabled multi-imaging of a sample by selecting the correct excitation wavelength and filters to collect the light emitted from a given stain. A 64x oil-immersion objective was used for all images. Three fluorescent dyes were used, as already detailed by Bourlieu et al. (2015) to locate i) proteins - Fast Green FCF (6:100 v/v, $\lambda_{\text{ex}}=633 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{em}}=655-755 \text{ nm}$, Invitrogen), ii) non-polar lipids - Lipidtox (0.2:100, v/v, $\lambda_{\text{ex}}=488 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ nm}$, Invitrogen) and iii) polar lipids - Rd-DOPE (1:100, v/v, 16:0 Liss Rhod PE 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamin-N-(lissamin rhodamin B sulfonyl), $\lambda_{\text{ex}}=543 \text{ nm}$ - $\lambda_{\text{em}}=590 \text{ nm}$, Avanti Polar Lipids). The three dyes were added in a 200 μL aliquots at least 10 min before observation. 10 μL samples were then placed on a glass slide just before observations. The software used for CSLM images was EZ-C1 version 3.40 (Nikon).

2.5.3 ζ -potential measurements of isolated OB in MP, HHP and HHPT matrixes

The apparent ζ -potential of OB in several emulsions diluted at 1:200 v/v in UP water was determined by measuring electrophoretic mobility (u) at 25°C using laser Doppler electrophoresis (Nano Z PSS Z300, Nicomp). Measurements were made at 3 mV for 7 min. Henry's law relates U to the particle ζ -potential.

2.6 Interfacial behavior of isolated MP OB at the air/water interface

2.6.1 Preparation of model solutions

To obtain an overview of the different interfacial behaviors of MP OB compounds (TAG, proteins, and PL) several model solutions were prepared based on the proportions of OB constituents in their native form. A solution containing oleosins and TAG (named oleo-TAG) extracted from walnut OB was prepared by introducing 3% wt. oleosins and 95% wt. TAG, diluted to 4% wt. in a solution of 1 M Tris-HCl pH 7. To promote solubilization of the oleosins, TAG were first emulsified in the Tris-HCl solution and then sonicated for 30 s at 1.5 W before the oleosins were incorporated. A second sample containing 3% wt. oleosins and 95% wt. commercial walnut oil (La Tourangelle, France) was also prepared using the same procedure. Another model solution containing L- α -phosphatidylcholine powder from eggPC and commercial walnut oil (named EggPC-WOIL) was prepared by adding 2% wt. of EggPC and 95% wt. of previously emulsified commercial walnut oil, diluted to 4% wt. in a 0.1 M Tris HCl solution at pH 7. Another solution containing 4% wt. of commercial walnut oil diluted in a 0.1 M Tris-HCl solution at pH 7 was also prepared. The model solutions were named respectively oleo-TAG, oleo-WOIL, EggPC-WOIL and WOIL, according to their composition.

2.6.1 Preparation of model solutions

Experiments were performed using a circular Teflon trough (volume 8 mL, surface area 27 cm²). After 5 min of acquisition in UP water to define the zero, the water was replaced by the 4% wt. OB or model sample diluted at a rate of 22.5 mg/L in UP water (1/1600) in the Langmuir trough. The surface pressure (PI, mN/m) and the ellipsometric angle (DELTA, °) were recorded simultaneously at 21.5 °C. The surface pressure was measured according to the Wilhelmy-plate method using a filter paper connected to a microelectronic feedback system to measure the surface pressure (Nima Technology, UK). Values of PI were recorded every 15 s with a precision of ± 0.2 mN/m. Ellipsometric measurements were carried out with a home-made automated ellipsometer in a “null ellipsometer” configuration (Berge & Renault, 1993; Bourlieu et al., 2020). The laser beam probed a surface of 1 mm² and a depth in the order of 1 μ m and provided insight into the number of molecules at the interface. Values of DELTA were recorded every 15 s with a precision of ± 0.5 °.

2.6.3 Study of interfacial film structures by atomic force microscopy (AFM)

For AFM imaging, interfacial films were transferred onto a freshly-cleaved mica plate using the Langmuir-Blodgett method. The transfer took place at the end of the kinetic adsorption in the Langmuir trough, after the surface pressure of the sample reached a plateau. Barriers were set at a low speed of 10 cm²/min and the surface pressure was held constant during the transfer. The mica plate was further observed with an AFM (Multimode Nanoscope 8, Bruker, France) in QNM mode in air (20°C) with standard silicon cantilevers (0.3 N/m), and at a scan rate of 1 Hz. The force was minimized during all scans. To check the integrity of the samples after the different scans and zooms, the same zone was imaged at the end of the analysis. The scanner size was 100 \times 100 μ m². The processed images were analyzed by the open-source platform Gwyddion.

2.7 Statistical analysis

All results are presented as mean \pm SD. Statistical significance between the OB dispersions was tested by one-way ANOVA. Statistical significance between the two complex matrixes was tested by t-test. Both tests were conducted using R software (R.2.13.0, <http://cran.r-project.org>). Statistical Differences between groups were declared significant at $p < 0.05$.

3 RESULTS

3.1 Chemical composition of walnut Folch extract

As expected, lipid class analyses confirmed the presence of TAG, DAG, phytosterols, MAG, PL, and FFA in the walnut kernels. The results identified high concentrations of unsaturated fatty acids (~93% w/w of oil), especially of linoleic acid (LA, C18:2, ω 6) (average= 69.8 ± 7.4 % w/w of oil), in a range similar to those found by other authors (Christopoulos & Tsantili, 2015; Maguire et al., 2004). Palmitic acid (C16:0, average= 6.8 ± 0.7 % w/w of oil) was the main saturated fatty acid. In terms of liposoluble vitamins, only vitamin E isomers were detected (average= 41.0 ± 20.7 mg/100g of oil), with a large majority of γ -tocopherols (average= 36.9 ± 15.6 mg/100 g of oil). The total concentrations of fatty acids and the tocopherol contents of OB extracted from walnut are shown Figure S1 (supplementary material).

3.2 Characterization of OB minimally-processed structure and impact on oxidative behavior

CLSM was performed to visualize the microstructure of isolated walnut OB. Selective fluorescent probes were used to locate TAG, PL and proteins. As expected, the structure of OB was in agreement with the model proposed by Huang (1994). Figure 1.A.a. shows OB as a green spherical droplet of TAG surrounded by a red layer of PL embedded in blue proteins. In agreement with the results reported by Gallier et al. (2013), OB ranged in size from 0.5 to 10 μ m (Fig. 1.A.b.). The ζ -

potential of the isolated solution was also measured to judge the general physical stability of the emulsion. A moderate absolute value of the ζ -potential was evidenced (-34.0 ± 0.6 mV), providing sufficient negative charge to prevent aggregation or flocculation phenomena.

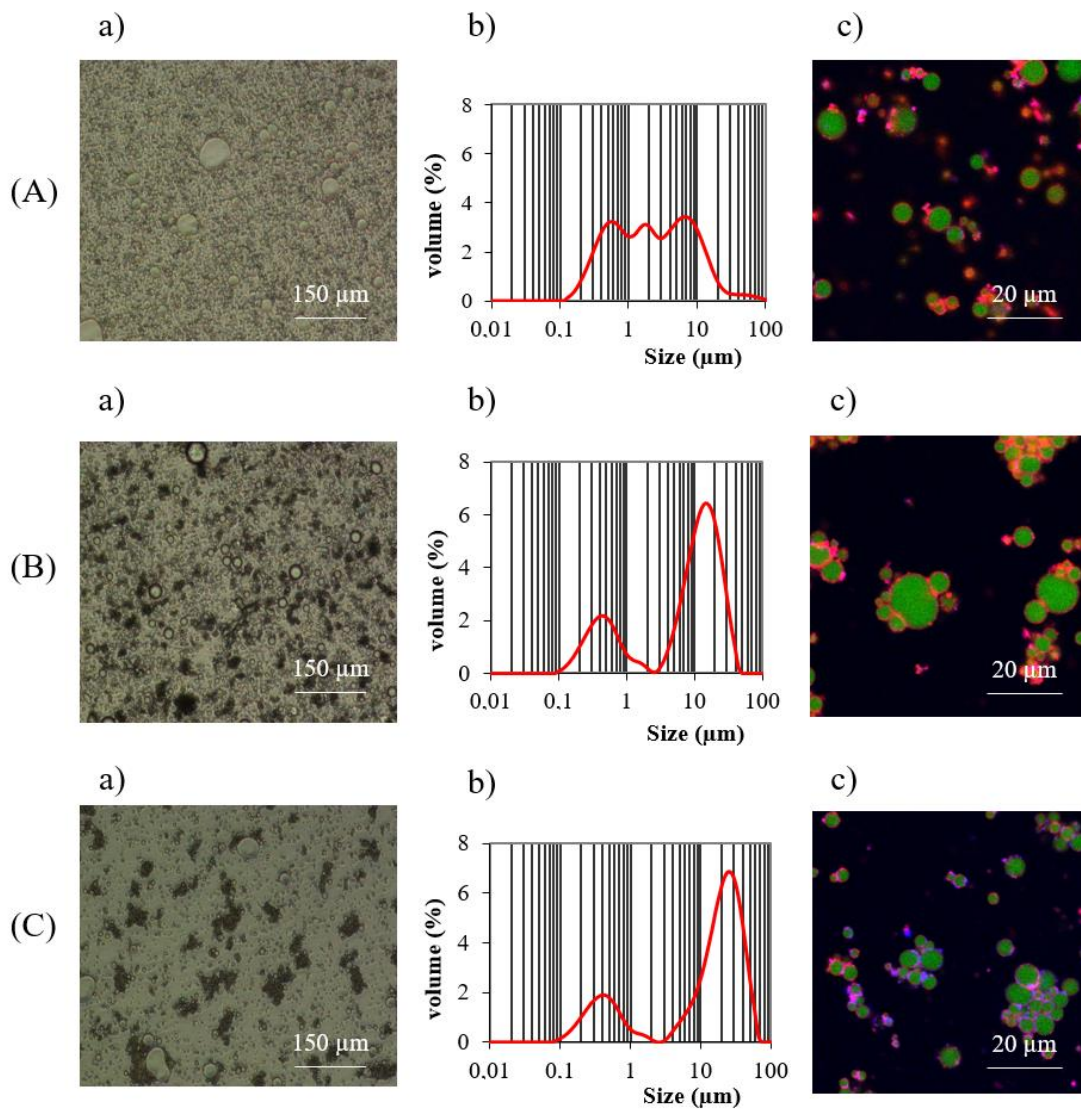


Figure 1 - a) Optical microscopy, b) particle size distribution and c) confocal laser scanning microscopy (red dye: PL, blue dye: proteins, green dye: TAG) of isolated OB emulsions having undergone different treatment(s). (A) MP OB b) trimodal, modes: 7.64 μm , 0.675 μm , 2.13 μm ; (B) HHP OB b) bimodal, modes: 16.4 μm , 0.523 μm ; and (C) HHPT OB b) bimodal, modes: 31.1 μm , 0.523 μm .

The oxidative behavior of the minimally processed (MP) isolated OB solution was monitored by measuring the formation of primary (PV) and secondary (TBARS) lipid oxidation products during storage. This test was conducted at neutral pH for a period of 20 days of storage at 40°C. The results are shown in Figure 2.A (MP OB). PV and TBARS did not change much during the first 10 days of storage, pointing a good stability to oxidation phenomenon. After 10 days, the PV concentration began to increase slightly, followed by TBARS after 12 days, due to the transformation of unstable primary products into secondary products. Nevertheless, the change was limited, indicating good stability of OB in their minimally-processed state.

3.3 Impact of processing on the structure and oxidative behavior of isolated OB

The effects of high-pressure homogenization and heat treatment on the structure and oxidative stability of isolated OB were studied (Fig. 2.A - HHP OB, HHPT OB). PV and TBARS of HHP and HHPT OB dispersions increased significantly from the 5th day of the test on, revealing lower chemical stability than for MP OB. The oxidation phenomenon was even faster when the OB had undergone an additional heat treatment (HHPT) downstream. In addition, a sensory test (sniffing, n=2) revealed the development of negative off-flavors in the products from the 6th day of accelerated storage in the HHPT samples, compared to from the 9th and 15th day for HHP and MP OB respectively. In terms of structure modification, the CLSM images revealed a reorganization of the membrane of the processed OB, and different impacts depending on the process applied (Fig 1). In the HHP OB sample, fragments of the red and blue layer were missing, indicating membrane damage. In the HHPT OB sample, the membrane was more deteriorated and a blue layer of protein formed, around which objects aggregated. These observations are consistent with the changes in the granulometric profile, in which the largest objects doubled in size (16.4 to 31.1 µm) in isolated HHP OB compared with HHPT OB (Fig 2). The phenomenon of increasing particle size after homogenization and even more after heat treatment has already been reported in research on walnut

OB by Chen et al. (2014). It had also been reported in OB from other sources, such as peanuts, on which Zaaboul et al. (2019) observed severe aggregation and coalescence between OB after HHP followed by sterilization at 95°C for 15 min.

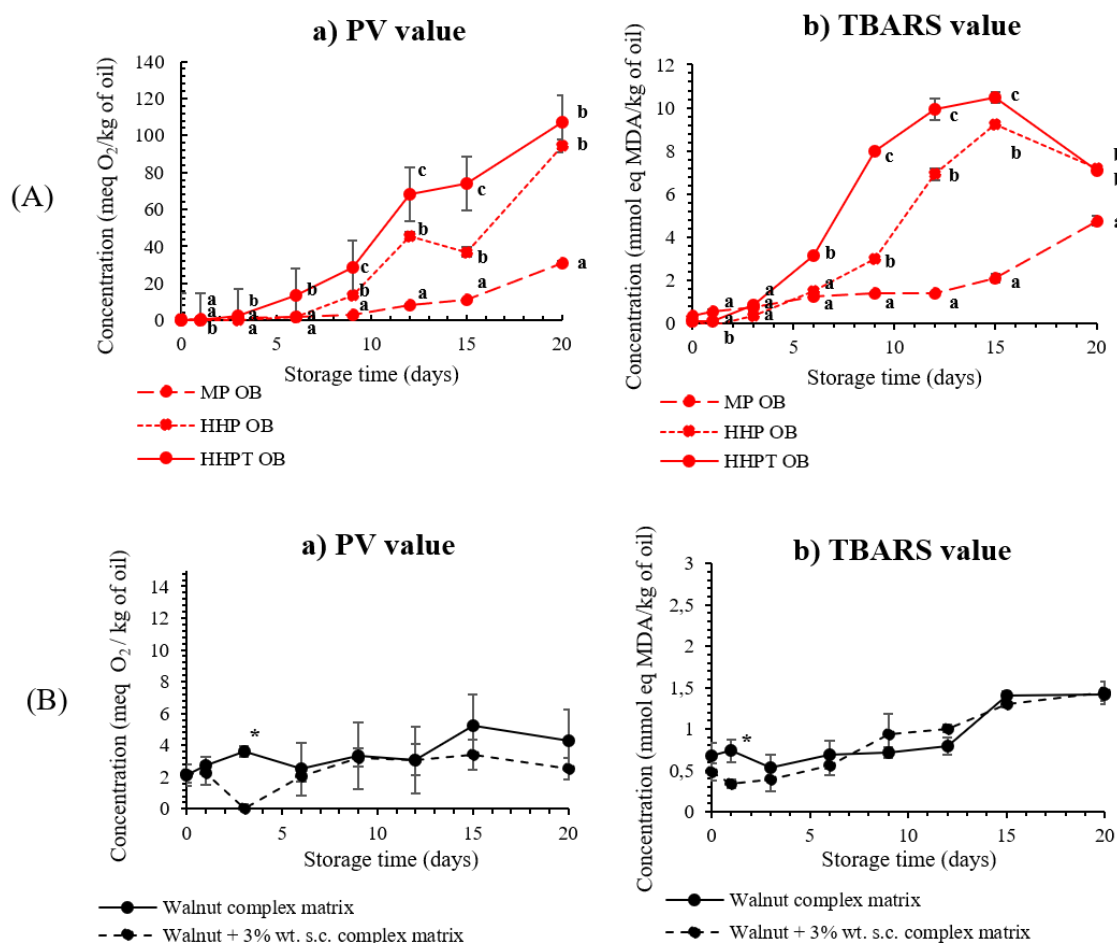


Figure 2 - a) PV and b) TBARS values during 20 days at 40°C and 110 rpm of (A) processed isolated walnut OB (MP, HHP, HHPT); and (B) walnut complex matrixes with and without 3% wt. of sodium caseinates. Data shown are average of three replicates.

3.4 Oxidative behavior of OB in complex matrixes (HHPT walnut beverages with or without added sodium caseinates)

Two complex HHPT walnut matrixes with or without 3% wt. of sodium caseinates, representative of commercial walnut-based beverages, were prepared to evaluate the impact of additional ingredients in the complex matrix (fibers, walnut proteins, added emulsifiers...) on the oxidative

stability of the system. Good chemical stability of complex matrixes was observed in the short term (10 days) Figure 2.B. Both complex matrixes, i.e., with and without sodium caseinates remained quite stable to oxidation even after 20 days, with low oxidation values. More precisely, after 20 days of storage at 40°C, the complex matrix with no sodium caseinates reached a PV value of 4.8 meq O₂/kg of oil compared to 2.5 meq O₂/kg of oil in the complex matrix containing sodium caseinates. The TBARS values for the complex matrixes, with and without sodium caseinate(s), were both at 1.4 mmol eq MDA/kg of oil.

Finally, MP OB and HHPT complex matrixes were quite stable to oxidation. Processing isolated OB with HHP or HHPT treatments decrease their stability to oxidation. In comparison, processing walnut complex matrixes (global walnut juice) with or without additional emulsifiers (sodium caseinate) did not induce such oxidative instability.

3.5 Behavior of minimally-processed (MP) fresh versus oxidized OB at the air/water interface

Since MP OB seem quite stable to oxidation and can be considered as interesting ingredients for human nutrition, we investigated further their behavior at the air/water interface to gather original data about their behavior when dispersed in an emulsion or foam. Comparison of fresh versus oxidized OB could be helpful to food engineers to detect MP OB degradation in a food system. The interfacial behaviors of fresh and oxidized MP OB solutions (PV=30.8 ± 1.2 meq O₂/kg of oil) were characterized using biophysical tools (tensiometry, ellipsometry, atomic force microscopy). Figure 3 summarizes the adsorption kinetics and the AFM images obtained for the two samples at 22.5 mg/L of MP OB. The surface pressure of the fresh MP OB increased from 0 mN/m to approximately 13 mN/m (Fig. 3.A.a.) in less than one minute. After this initial step, the surface pressure continued to increase more progressively for a period of 4.5 hours until it reached a plateau at 19.8 ± 0.7 mN/m. The ellipsometric angle followed a similar pattern until it reached a final value of 9 ± 0.5 °, illustrating the rise of matter at the interface due to the amphiphilic nature of OB. In

contrast, in the oxidized MP OB solution diluted at 22.5 mg/L, the final surface pressure and ellipsometric angle were respectively 15 ± 0.8 mN/m and 5.1 ± 0.5 °, lower than those in the fresh MP OB solution. This points to a different organization of the particles at the interface as well as the formation of a thinner monolayer in the case of oxidized OB.

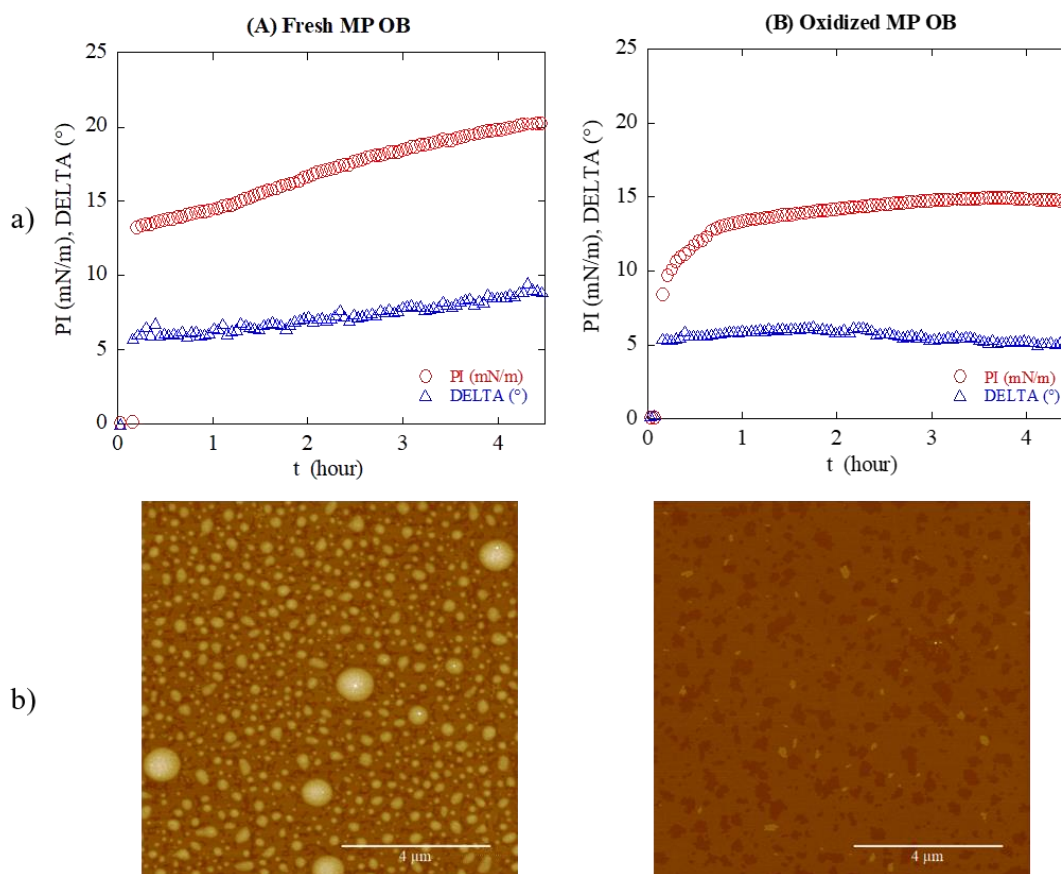


Figure 3 - a) Evolution of surface pressure (red circles; PI, mN/m) and ellipsometric angle (blue triangle; DELTA, °) during the 4.5 hours experiments of adsorption on air-water interface and b) monolayer AFM images ($10 \times 10 \mu\text{m}^2$) and size profiles after 4.5 hours experiments of isolated solution of (A) Fresh MP OB ($PI_f=20.3$ mN/m; $DELTA_f=9.2^\circ$) and (B) Oxidized MP OB ($PI_f=14.7$ mN/m; $DELTA_f=5.1^\circ$) diluted in UP water at 22.5 mg/L.

Figure 3 summarizes the adsorption kinetics and the AFM images obtained for the two samples at 22.5 mg/L of MP OB. The surface pressure of the fresh MP OB increased from 0 mN/m to approximately 13 mN/m (Fig. 3.A.a.) in less than one minute. After this initial step, the surface pressure continued to increase more progressively for a period of 4.5 hours until it reached a plateau

at 19.8 ± 0.7 mN/m. The ellipsometric angle followed a similar pattern until it reached a final value of 9 ± 0.5 °, illustrating the rise of matter at the interface due to the amphiphilic nature of OB. In contrast, in the oxidized MP OB solution diluted at 22.5 mg/L, the final surface pressure and ellipsometric angle were respectively 15 ± 0.8 mN/m and 5.1 ± 0.5 °, lower than those in the fresh MP OB solution. This points to a different organization of the particles at the interface as well as the formation of a thinner monolayer in the case of oxidized OB.

After 4.5 h of stabilization of tensiometry and ellipsometry signals, a Langmuir-Blodgett transfer of the interfacial film was performed and imaged using AFM. The resulting images Figure 3.b. provide information on the interfacial reorganization of OB objects in fresh and oxidized MP OB samples. A background with height variation of 0.6 nm was observed in the image of the fresh MP OB (Fig. 3.A.b.), with the presence of evenly spread generally large protuberances of different lateral sizes and 4 nm in height. Bright "peaks" of 6-8 nm were observed at the center of some protuberances. Smaller bright domains, around 1.5-2 nm in height, were also visible. These smaller domains were not spherical but mainly had edges. The AFM image of oxidized MP OB emulsion (Fig. 3.B.b) shows a different interfacial organization, with the same background as that of the fresh MP OB solution, but with no protuberances.

To better understand the interfacial structure of MP OB observed in AFM images, a RhoPE dye was incorporated in the MP OB sample to locate the PL in the interfacial film using fluorescence microscopy. The images of the fluorescent sample observed with CLSM (fig. 4.a) showed that the layer was heterogenous, with continuous fluorescence (RhoPE) in the background, indicating the presence of PL (in red). The AFM images were then recorded on the most homogenous parts (Fig. 4.b). The AFM images of MP OB with and without the RhoPE were similar, indicating that the fluorescent probes do not affect the interfacial organization of the sample. In addition, as described

in the followed section, model solutions were prepared to identify precisely the other components in the interfacial films.

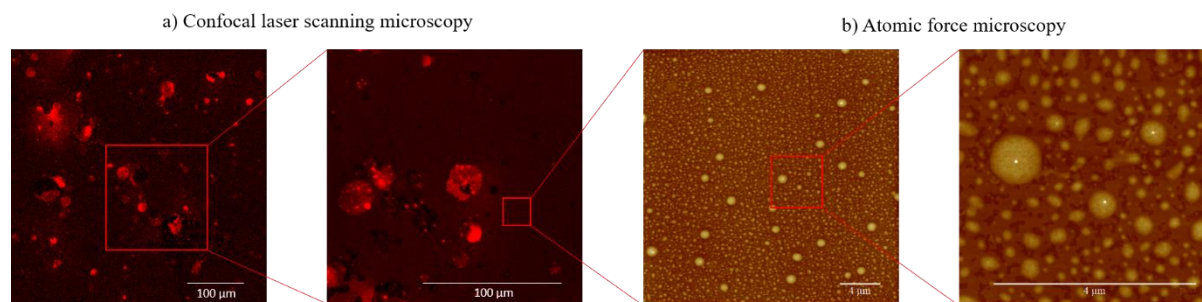


Figure 4 - a) Confocal Laser Scanning Microscopy ($448 \times 448 \mu\text{m}^2$ and $184 \times 184 \mu\text{m}^2$) and b) Atomic force microscopy images ($25 \times 25 \mu\text{m}^2$ and $5 \times 5 \mu\text{m}^2$) of monolayer of MP OB isolated solution diluted at 22.5 mg/L in UP water dyed with Rhodamine PE.

3.6 Behaviors of model solutions at the air/water interface

When OB rise to the air/water interface, they are likely to open and the competing interactions of their three different components will then determine the physical configuration of the interface: TAG, PL, oleosins but also, probably, some still intact OB. To elucidate the mechanism of organization at the air/water interface, model samples were prepared. These models were initially formulated at 4% wt. of lipid in Tris-HCl solution at pH 7, before being diluted at 22.5 mg/L in UP water. We first compared two model solutions. The first one was formulated with oleosins and TAG, prepared using the same ratio as that found in natural OB (3% wt. oleosins, 95% wt. TAG or commercial walnut oil). The second model solution was only composed by commercial walnut oil (95% wt). In the AFM images of oleo-TAG (Fig. 5.A) and oleo-WOIL (Fig. 5.B), bright “peaks” 4 to 8 nm in height and irregularly shaped domains 1.5-2 nm in height were visible, similar to those present in the AFM image of the MP OB sample. However, the “peaks” did not appear in the WOIL sample (Fig. 5.C), in which irregular protuberances between 2 and 6 nm in height were observed, in addition to domains 1 nm in height, which we assumed to be gel-phase TAG. To complete these observations, the EggPC-WOIL sample containing 2% wt. of EggPC and 95% wt.

CHAPITRE 3

of commercial walnut oil, was then compared to the WOIL sample. The ellipsometric angle of the EggPC-WOIL sample reached a higher value of 6.3° after 4.5 h, compared to 5.2° for the WOIL sample, reflecting the greater thickness of the interfacial film. The AFM image of the EggPC-WOIL sample (Fig. 5.D) showed a denser background material, with homogeneous protuberances 6 nm in height, compared to the AFM images of the WOIL sample (Fig. 5.C).

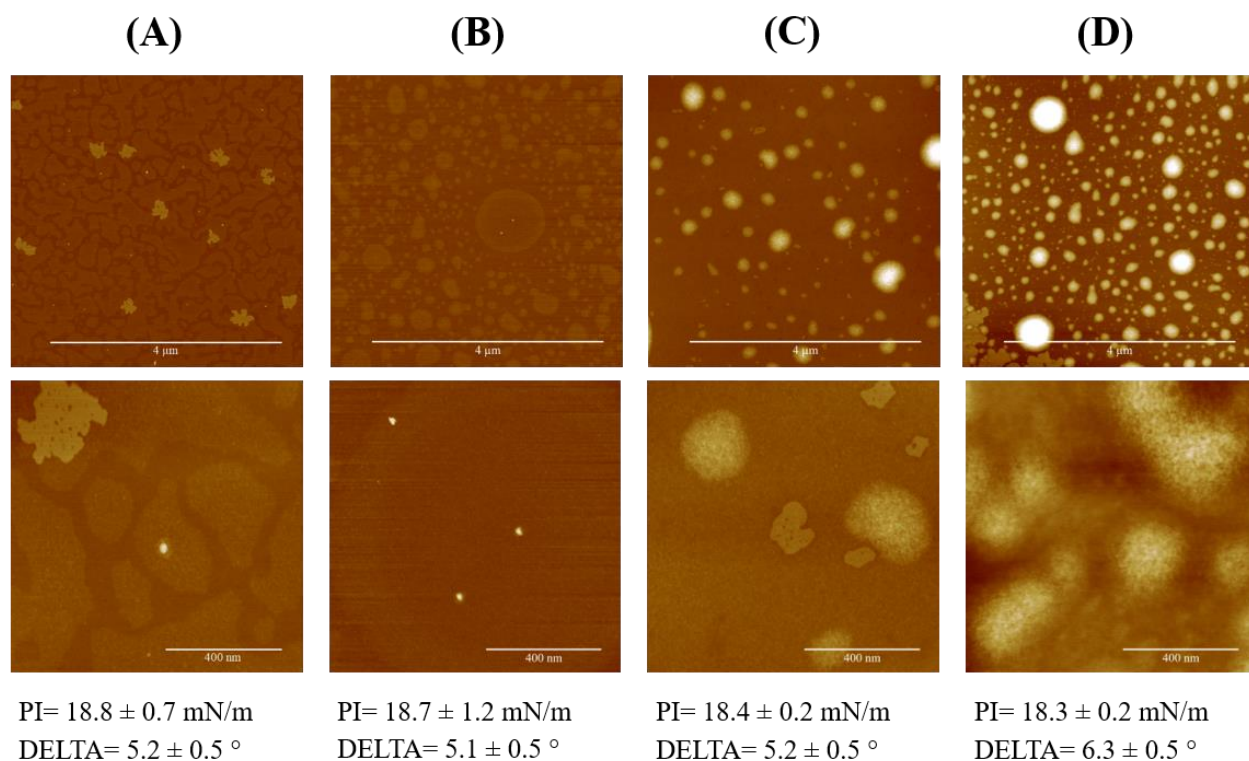


Figure 5 - AFM images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$ and $1 \times 1 \mu\text{m}^2$) of Langmuir-Blodgett films of 22.5 mg/L of a) oleo-TAG; b) Oleo-WOIL; c) WOIL; and d) EggPC-WOIL after 4.5 hours of acquisition. Final values of surface pressure (PI, mN/m) and ellipsometric angle (DELTA, °) were recorded at 4.5 hours of acquisition when the films were transferred on mica plate.

4 DISCUSSION

4.1 The good chemical stability of walnut OB is evidenced in both processed complex matrixes and in minimally-processed isolated form

Despite the limited physical stability of walnut beverages (Y. Chen, Lu, et al., 2014), the results of storage test under accelerated oxidation conditions highlighted the good chemical stability of these plant-based beverages, thus increasing their interest for food applications. The remarkable stability to oxidation of the processed complex matrixes can be explained by the presence of endogenous proteins that form a second protective layer around OB. Additionally, large quantities of AO compounds such as γ -tocopherols, but also various phenolic compounds (polyphenols, phenolic acids such as gallic, ellagic, and flavonoids) as described by Zhang et al. (2009), help delay the oxidation phenomenon.

In the complex matrix with added sodium caseinates, we could have expected an enhancement of stability linked to the addition of this emulsifier. Indeed, Haahr & Jacobsen (2008), who evaluated the effect of several types of emulsifiers - including sodium caseinates - on the oxidative stability of 10% wt. oil in water emulsions containing ω 3 rich fish oil, demonstrated an antioxidant (AO) effect of sodium caseinates. In their study, the emulsion stabilized by sodium caseinates was shown to oxidize more slowly than the emulsion stabilized with Tween 80, despite the much more negative ζ -potential of sodium caseinates at pH 7. The difference in oxidative stability was associated with the ability of sodium caseinates to chelate iron (Sugiarto et al., 2010) and to form a 10-nm-thick layer at the surface of dispersed oil droplet, thus protecting unsaturated FA from oxidation (Hu et al., 2003). In our study, sodium caseinates did not appear to provide significant additional oxidative stability to the walnut complex matrix, suggesting that the system is already relatively stable with respect to oxidation.

Similarly, to processed walnut complex matrixes, MP OB exhibited good chemical stability over the first 10 days of storage, thanks to their native structure and fat-soluble AO content. The limited difference in the concentration of oxidation products indicates that isolating OB did not affect their protection capacity against oxidation, underlining the interest of using these minimally-processed compounds in food applications. Similar results were obtained on soybean OB by Kapchie et al. (2013), who found low oxidation of isolated OB suspensions without the presence of prooxidant metal species at physiological pH and after 12 days of storage at 60°C, while the PV was 14 meq O₂/kg and TBARS was 0.4 mmol eq MDA/kg. Ding et al. (2018) also studied the chemical stability of isolated OB dispersions for 14 days in the dark at room temperature. Their results confirmed the good stability to oxidation of the emulsions, with low PV and TBARS of 7 meq O₂/kg and 0.003 mmol eq MDA/kg respectively after 14 days.

4.2. Processed OB (HHP and HHPT) were less stable to oxidation than MP OB

The processing operations, i.e. homogenization and heat-treatment, resulted in the reorganization of the OB membrane, increasing exchanges with reactive species. This change in the membrane led to a significant increase in oxidation compared to MP OB, despite the similar chemical composition of the systems. These results confirm the importance of the native assembly in the chemical stability of OB, underlining the need to rethink food processing to insure better preservation of natural assemblies and their properties when these assemblies are used in quite purified forms.

Overall, the oxidation of these MP OB reduced the internal cohesion of the OB and consequently also that of its components, leading to a different interfacial organization.

4.3. The adsorption mechanism of isolated MP OB was determined at the air/water interface and differ from the one proposed for soybean OB

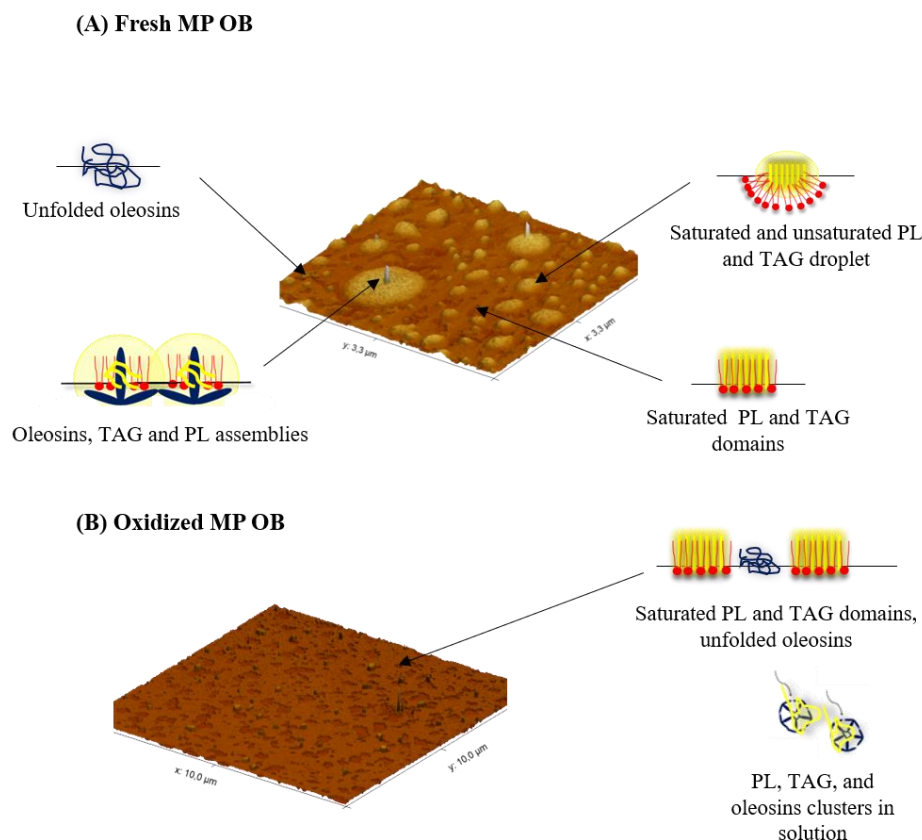


Figure 6 - Proposed mechanisms of OB organization at the air-water interface for (A) Fresh MP OB; and (B) Oxidized MP OB.

The combination of simultaneous ellipsometry, tensiometry and AFM results of MP OB and model solutions made it possible to examine the behavior of minimally-processed walnut OB at the air/water interface. Overall, biophysical results indicate that isolated fresh MP OB retained their native microstructure when adsorbed to the air/water interface. The model solutions containing oleosins (3% wt.) led us attribute the 6-12 nm height “peaks” on the fresh OB AFM images to the presence of oleosins. Indeed, a height of 12 nm was determined for soybean oleosins by Zielbauer et al. (2018) using small angle neutron scattering, which correspond to the height of the “peaks” obtained in AFM size profiles. Big bright protuberances 4 nm in height visible on the AFM images

CHAPITRE 3

of MP OB were identified as oleosins, PL and TAG assemblies, that remained very cohesive due to hydrophobic interactions.

In contrast, the structural modification of the membrane caused by oxidation reduce cohesion between the different components, as revealed by the results of the biophysical analysis. The final ellipsometric angle and surface pressure were indeed lower than in the fresh MP OB sample. The AFM images reinforced these results, showing a different interfacial organization when the objects were oxidized, in particular the absence of TAG, PL and oleosins assemblies. Smaller domains (1 nm in height) were probably lipid domains in crystalline phase, composed of palmitic and stearic saturated FA. This observation tends to confirm the thermotropic crystalline mesophase of OB membrane proposed by (Nikiforidis, 2019) and suggests that oxidation led to the solubilization of oxidized unsaturated TAG and PL.

Waschatko, Schiedt, et al., (2012) proposed different models for the structural organization of soybean OB interface. Figure 6.A presents a model for the organization of walnut OB at interfaces based on the models of Waschatko et al., emphasizing the new understanding enabled by the results we obtained in the present study. When the isolated fresh OB solution is deposited in the Langmuir trough, OB rise to the interface before opening. When the lateral surface pressure is sufficient to maintain cohesion of the components, they remain assembled and form protuberances, visible at the interface, with the central hydrophobic domain of oleosin oriented toward the surface. In addition, mixtures of unsaturated and saturated fats can form fat droplets, as confirmed by the presence of irregularly shaped globules in the AFM images of isolated fresh MP OB. Low height domains of saturated TAG and PL complete the interface background. When the membrane structure is altered by protein cleavage (Waschatko et al., 2012) or by oxidation, the lateral pressure is no longer sufficient to maintain the assemblies of oleosins, TAG and PL, as illustrated in the model proposed in Figure 6.B. The rigid native "T" conformation of oleosins is no longer

preserved, and some oleosins are presumed to unfold at the interface or are solubilized as protein-lipid clusters. Like in the fresh sample, saturated PL and TAG domains also form at the interface, but oxidation is responsible for the solubilization of unsaturated lipids, leading to the disappearance of fat globule in the AFM images of the oxidized sample.

This better understanding of the interfacial behavior of MP OB from different botanical sources will ease the development of innovative emulsions or foams in which MP OB can be used as functional ingredients. They will be specifically useful to design heterogeneous systems in which OB will be used as emulsifiers.

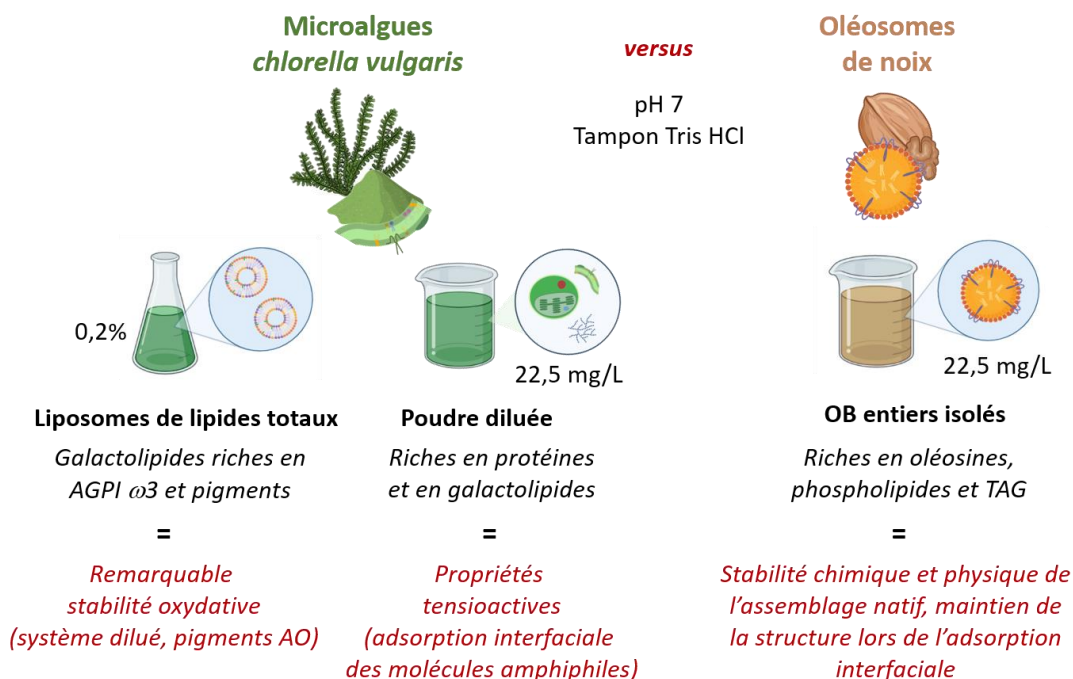
CONCLUSION

Oxidation tests and biophysical tools were used to study the oxidative and interfacial behavior of walnut OB in different matrixes. Strong chemical stability of the complex walnut matrixes was evidenced under accelerated oxidation conditions, thanks to the presence of many endogenous proteins and antioxidant compounds. Isolation of OB from the complex matrix did not alter their protection against oxidation, thanks to their native assembly as well their fat-soluble antioxidant content. Nevertheless, processing of OB accelerated their chemical oxidation.

The organizational mechanism at the air/water interface of walnut MP OB is demonstrated. When MP OB adsorb at an air/water interface, the good cohesive ability of their native assembly allows them to keep intact their microstructure. Oxidation was shown to alter this internal cohesion of OB by structural modification of the membrane.

Taken together, our results show that when OB are incorporated in the structure of new food products, their chemical and physical stability during the design process should be taken into consideration. Indeed, alteration of the physical structure of OB during processing may affect their chemical stability during storage and hence the quality of the final product expected by the consumer. This finding underlines the need to rethink food processing to preserve natural assemblies and their beneficial properties.

Principaux résultats de l'étude



- Les liposomes micrométriques de lipides totaux de *Chlorella vulgaris* Purasana possèdent une excellente stabilité à l'oxydation en système dilué (0,2%). La poudre de chlorelles entières déshydratées présente des propriétés tensioactives. Ces résultats, confirment le potentiel d'émulsifiant naturel des fragments membranaires de microalgues, et l'intérêt de leur utilisation pour le développement d'applications alimentaires riches en AGPI ω3.
- L'assemblage natif et la composition naturelle en composés AO liposolubles des OB de noix leur apporte une protection naturelle contre la déstabilisation physique et chimique, expliquant leur stabilité remarquable à l'oxydation. La bonne cohésivité entre les constituants de l'assemblage natif permet aux OB de garder leur microstructure intacte lors de leur adsorption à l'interface. L'application de procédés de transformation altère cette stabilité naturelle et accélère l'oxydation chimique, modifiant l'organisation interfaciale.

CHAPITRE 4

CAPACITÉ D'ADSORPTION ET

ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA

LIPASE GASTRIQUE SUR LES

SYSTÈMES VÉGÉTAUX MODÈLES ET

NATURELS

Table des matières du chapitre 4

I – Modulation du comportement d’adsorption de la lipase gastrique de chien (rDGL) par ajout de phytostérols dans les monocouches modèles hétérogènes de galactolipides/DPPC	195
Article de recherche - Kergomard et al., CSB, 2022.....	195
Principaux résultats de l’étude	221
II – Capacité d’adsorption de la lipase gastrique sur des monocouches de lipides extraits de matrices membranaires naturelles	222
II.1 – Adsorption de la rDGL à l’interface air/eau	222
II.2 – Adsorption de la rDGL au niveau d’une monocouche de lipides extraits de <i>Chlorella vulgaris</i> (Purasana).....	223
II.3 – Adsorption de la rDGL au niveau de monocouches de lipides membranaires d’OB : noix versus amandes.....	225
Principaux résultats de l’étude	231
III – Digestion gastro-intestinale des OB d’amande en système dynamique.....	232
III.1 – Matériel et méthodes	232
III.2 – Localisation et variation de l’intensité d’auto-fluorescence des lipases gastrique (rDGL) et intestinale (PPL/colipase) au cours de la dégradation dynamique des OB d’amandes par injections successives des enzymes	234
Principaux résultats de l’étude	237

CHAPITRE 4 - RÉSULTATS

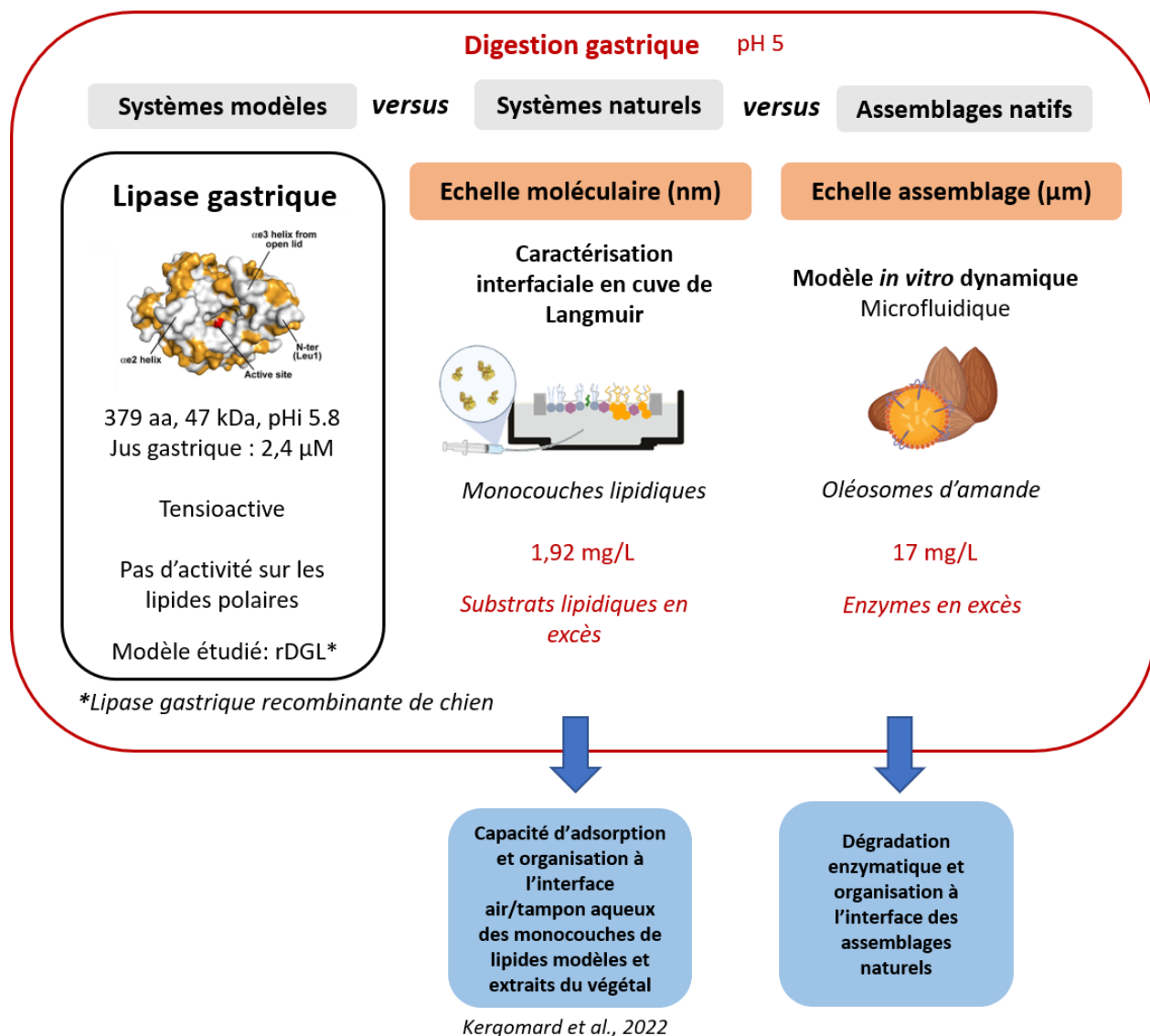


Figure 39 - Stratégie du chapitre 4.

CHAPITRE 4 - Capacité d'adsorption et activité enzymatique de la lipase gastrique sur les systèmes végétaux modèles et naturels

Ce chapitre est dédié à la compréhension des mécanismes d'adsorption de la lipase gastrique au niveau des monocouches hétérogènes de lipides végétaux. Pour rappel, la lipase gastrique est une enzyme particulièrement tensioactive, qui agit dans les premiers temps de la digestion gastro-intestinale des lipides. Elle ne possède pas d'activité enzymatique sur les lipides polaires, mais la stabilité des émulsions lipidiques après la phase gastrique influence grandement l'étendue de la lipolyse intestinale subséquente (Infantes-Garcia et al., 2021; Golding & Wooster, 2010).

Afin d'accéder à une compréhension approfondie des facteurs influençant les mécanismes d'adsorption et d'insertion de la lipase gastrique humaine, les propriétés tensioactives d'une enzyme analogue, la rDGL, ont été étudiés. Le comportement de la rDGL à l'interface air/eau a été déterminé au niveau des monocouches modèles de lipides GL, GL/DPPC, et GL/DPPC/pS, puis au niveau de membranes de lipides extraits des membranes végétales, présentant des hétérogénéités de phases naturelles de par leur complexité de composition en lipides totaux et en acides gras. Le comportement de la rDGL a également été étudié en cellule microfluidique dans des conditions plus proches de celles retrouvées lors de la digestion gastrique chez l'Homme, en prenant comme modèles les OB d'amandes.

L'objectif était ici de vérifier les mécanismes d'adsorption de la rDGL obtenus sur les membranes modèles hétérogènes en fonction de leur composition, afin d'étudier son adsorption au niveau des assemblages lipidiques membranaires végétaux naturels. Les paramètres de composition et de structure impactant sur le comportement général de l'enzyme en conditions gastrique ont ainsi pu être déterminés.

I – Modulation du comportement d’adsorption de la lipase gastrique de chien (rDGL) par ajout de phytostérols dans les monocouches modèles hétérogènes de galactolipides/DPPC

Article de recherche - Kergomard et al., CSB, 2022

Modulation of gastric lipase adsorption onto mixed galactolipid-phospholipid films by addition of phytosterols

Name(s) of Author(s) Jeanne Kergomard^{1,2}, Frédéric Carrière³, Gilles Paboeuf¹, Nathalie Barouh^{4,5}, Claire Bourlieu-Lacanal² & Véronique Vié^{1*}

ABSTRACT

The rapid and preferential adsorption of a gastric lipase recombinant dog gastric lipase (rDGL) in heterogeneous films of phospholipids and triacylglycerols has previously been unveiled using Langmuir films analyzed by tensiometry, ellipsometry and Langmuir-Blodgett transfer coupled to atomic force microscopy. Here we investigate the adsorption behavior of rDGL in heterogeneous galactolipid and mixed galactolipid-phospholipid or galactolipid-phospholipid-phytosterol films representative of plant membrane. Again rDGL, preferentially got adsorbed at the expanded lipid phases of the films underlining the genericity of such adsorption behavior. The addition of phytosterols to these mixtures resulted in the creation of defects, favoring the adsorption of rDGL at the fluid phases, but also improving the adsorption capacities of the lipase at the phase boundaries and towards the defects in the condensed phase. rDGL, like all gastric lipases, does not show any activity on galactolipids and phospholipids but its adsorption impacts their lateral organization and may change the adsorption and activity of other lipolytic enzymes in the course of digestion.

KEYWORDS: adsorption, gastric lipase, galactolipids, heterogeneous biomimetic membranes, plant lipids, ellipsometry/tensiometry, atomic force microscopy

1 INTRODUCTION

Lipases (EC 3.1.1.3, triacylglycerol hydrolase) play an important role in lipid metabolism, and have been found in most living organisms, from the plant kingdom to microorganisms and animals (A. H. C. Huang, 1987; Jaeger et al., 1994). Lipases are water-soluble enzymes that catalyze the hydrolysis of the ester bonds of insoluble triacylglycerols (TAG). Prior to the hydrolysis of their substrates, lipases must therefore get adsorbed onto the lipid-water interface (Aloulou et al., 2006). The digestion of lipids is a complex phenomenon, which depends on their chemical structure, their organization in water (monolayers, bilayers, micelles, oil/water emulsions...) and the ability of lipolytic enzymes to interact with these lipid assemblies. Indeed, the mechanisms involved in enzymatic lipolysis depends on the interfacial organization of the lipid substrates.

In humans, lipid digestion starts in the stomach where gastric lipase is responsible for 10% to 25% of the TAG total digestion (Carrière et al., 2001; Lengsfeld et al., 2004) and is very central during neonatal period as it is mature at birth (Bourlieu et al., 2015). It is worth nothing that gastric lipase is a true lipase, acting on TAG digestion but not on polar lipids, such as phospholipids or galactolipids. Human gastric lipase (HGL) is a globular enzyme of 50 kDa, belonging to the α/β hydrolase family, and possessing a classical Ser-His-Asp catalytic triad (Canaan et al., 1999). The active site is covered by a lid, which has to be displaced to permit the TAG substrates to have access to a large hydrophobic binding site, part of the interfacial recognition site.

Gastric lipase has been found to be highly active in the acidic environment of the stomach with an optimum at pH 4-5.4, thanks to a remarkable stability and adsorption capacity at the

lipid/water interface at low pH, in contrast to other lipases (Bénarouche et al., 2013; Chahinian et al., 2006). This interfacial adsorption is pH-dependent although it is mainly driven by hydrophobic interactions between the substrates and the large hydrophobic ring surrounding the active site cavity (Chahinian et al., 2006).

Prior to hydrolyzing TAG, lipases frequently have to get adsorbed onto interfacial films composed of polar lipids and/or amphiphilic proteins (Bénarouche et al., 2017), in which a small fraction of TAG playing various metabolic part can also be found (Lerique et al., 1994). This is typically the case of milk fat globules and phospholipid-stabilized emulsions. Polar lipids are not hydrolyzed in the upper gastrointestinal tract by gastric lipase, but this enzyme has a strong ability to get inserted into phospholipid (PL) monolayers thanks to its high surfactant capacity (Bénarouche et al., 2013; de La Fournière et al., 1994) and thus, has access to the TAG substrate. In addition, gastric lipolysis favors the activity of pancreatic lipase (Gargouri, Pieroni, Rivière, et al., 1986) and has been recently reported to significantly affect the production and the degradation of intermediate TAG digestion products during the intestinal phase (Infantes-Garcia et al., 2021). Given the synergy between the gastric and intestinal digestion phases, it is crucial to obtain knowledge on the protein-lipid interactions occurring during the gastric phase, including the impact of gastric lipase adsorption onto the interfacial organization of membrane lipids, even though gastric lipase is not active on phospholipids (Carrière et al., 1991) nor on galactolipids (Wattanakul et al., 2019).

Polar lipid films are useful tools to study the interfacial properties of lipases, irrespective of their lipolytic activity. Langmuir films used as model interfaces allows determining the impact of various physicochemical parameters, including the lipid packing and composition at the air/water interface, on the adsorption and insertion capacity of a lipase. The variations of surface pressure are related to interactions between molecules, which are directly connected to the

variations of molecular areas. The coupling of surface pressure measurements and ellipsometry provides insights on the thickness and refractive index of the surface layer formed, and thus on the phenomena occurring in one micrometer range below the interface.

Previous studies have been done on the adsorption behavior of gastric lipase onto model heterogenous films mimicking the outer layer of the membrane of human and bovine milk fat globule (Bourlieu et al., 2016, 2020). These studies have shown that the coexistence of expanded and condensed phases influenced sternly lipase adsorption: lipase got rapidly inserted onto the fluid phase and at the phase boundaries. In addition, different levels of insertion were observed suggesting a molecular cooperation and besides hydrophobic interactions local negative charges reinforced adsorption.

However, to the best of our knowledge, no study has yet tackled the question of adsorption and penetration mechanisms of gastric lipase onto plant cell membranes, especially the nature widespread photosynthetic membranes. On the contrary to animal cell membranes, plant photosynthetic membranes to save up phosphorus do not contain phospholipids but galactoglycerophospholipids (or galactolipids), which accounts for more than 70% of polar lipids (Dörmann & Benning, 2002). In addition to their biological and structural functions in membranes, galactolipids are of nutritional importance since they are rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA), essentials to cell functions in the human body, and especially in the α -linolenic acid (C18:3 n-3, ALA) (Sahaka et al., 2020). Phytosterols and carotenes are also major constituents of plant cell membranes (Grosjean et al., 2015; Silvius, 2005). They play a key role in maintaining biologic properties of membranes by controlling their structural properties such as their permeability, fluidity and rigidity (Dufourc, 2008; Silva et al., 2007). The chemical structures of phytosterols are similar to those of animal cholesterol, nevertheless the absorption of the majority

of phytosterols in the intestinal tract of mammals is up to ten times lower than that of cholesterol (von Bergmann et al., 2005). In humans, phytosterol consumption has been shown to induce a lowering of plasma cholesterol levels, thus preventing cardiovascular diseases and atherosclerosis (Moghadasian & Frohlich, 1999). Sterol molecules are known to promote hydrophobic interactions between membrane lipid acyl chains, which introduce a higher order and a subsequent rigidification of membranes (Silva et al., 2011). At the air/water interface, the incorporation of phytosterols molecules in a phospholipid film has been shown to reorganize the monolayer, by modifying the packing and orientation of the polar heads of phospholipids (Hąc-Wydro et al., 2007).

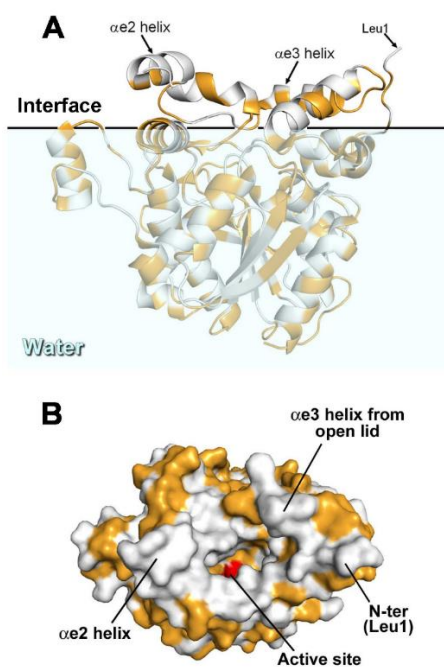


Figure 1 - 3D structure of recombinant dog gastric lipase. Panel A: ribbon model showing the secondary structure elements of rDGL with the lid in the open conformation and putative orientation at lipid-water interface based on the localization of the interfacial recognition site. Panel B: Top view and molecular surface representation (white=hydrophobic; yellow=polar) of rDGL showing the hydrophobic ring surrounding the active site entrance. Views were prepared using PyMol software (Schrodinger, L. (2010) The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.) and the crystal structure of rDGL (PDB: 1K8Q).

CHAPITRE 4

In this context, the present work aimed at determining the interaction of gastric lipase with mixed films of galactolipids, galactolipids/phospholipids, and galactolipids/phospholipids/phytosterols, mimicking plant photosynthetic membranes. Biophysical tools such as the combination of ellipsometry and tensiometry were used to monitor the lipid-protein interactions at the air/water interface. Atomic force microscopy was further used to study the distribution of the enzyme into the heterogeneous lipid systems. Recombinant dog gastric lipase (Figure 1) was used as a representative gastric lipase available in a purified and well characterized form (Roussel et al., 1999) and with close homology with human gastric lipase. Vegetal membrane composition was approached using mixed monolayers of purified phospholipids, galactolipids and phytosterols presenting liquid expanded/liquid condensed (LE/LC) phase coexistence at 20 mN/m and 20°C.

2 EXPERIMENTAL SECTION

Chloroform and methanol were purchased from Sigma Aldrich Ltd. (St. Quentin Fallavier, France). If not stated otherwise, all biophysical characterizations were conducted at least in triplicate.

2.1 Preparation of lipid mixtures

Table 3 - Model system compositions

	Monolayer composition
(1) GL	MGDG/DGDG 60:40 mol/mol
(2) GL/DPPC	GL/DPPC 50:50 mol/mol
(3) GL/DPPC/pS	GL/DPPC/pS* 45:45:10 mol/mol/mol

* *β -sitosterol, campesterol, brassicasterol 50:40:10 mol/mol/mol*

Glycerophospholipids (dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) and galactolipids (monogalactosyldiacylglycerol, MGDG, and digalactosyldiacylglycerol, DGDG) were purchased from Avanti Polar Lipids (see supplementary data for their fatty acid composition). Canola phytosterols (pS) from the deodorization distillates of canola oil were obtained as a gift from Cognis France (Estarac, France). The typical molar composition (estimated from usual normalized GC procedures) was: β -sitosterol (50.3 mol%), campesterol (38.9 mol%) and brassicasterol (10.5 mol%). β -sitosterol and campesterol are the most commonly found in the human diet due to their high composition in nuts and oilseed species (Cañabate-Díaz et al., 2007; Phillips et al., 2005). Brassicasterol is a phytosterol found in some unicellular algae and terrestrial plants such as rapeseed (Ikekawa et al., 1968; Itoh et al., 1973) .

Simple binary mixture of MGDG and DGDG (60:40, mol/mol) was prepared, namely GL. Ternary and quaternary mixtures of GL, DPPC and pS, namely GL/DPPC (50:50, mol/mol) and GL/DPPC/pS (45:45:10 mol/mol/mol), respectively, were also prepared to mimic the composition of natural vegetal membrane (see table 1 for relative molar composition). Lipid-lipid interactions and molecular organization at the air/water interface of the three monolayers studied are reported in [COLSUB_112646, accepted, CSB 2022]

2.2 Enzyme purifications and preparation of aliquots

Recombinant dog gastric lipase (rDGL) (86% amino acid sequence identity with HGL) was produced in transgenic maize by Meristem Therapeutics (Clermont-Ferrand, France) and purified as described previously (Roussel et al., 1999). rDGL stock solution was prepared at a concentration of 1.8 mg/mL in 10 mM sodium acetate buffer, 100 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, pH 5, and stored at -20°C. Diluted aliquots at a final concentration of 1.92 mg/mL (40 nM) were prepared in the same buffer before being used in monolayer experiments.

2.3 Ellipsometry and surface pressure measurements at the air/water interface

Kinetic measurements over 5 hours were performed using circular Teflon trough of 8 mL (surface area of 27 cm²). Kinetic measurements over 2 hours before Langmuir Blodgett transfer of the interfacial film were performed using Langmuir trough of 50 mL and a surface area of 35 cm².

Before each experiment, the Teflon trough have been carefully cleaned with UP water and ethanol to get rid of surface-active residual impurities. Control ellipsometric and tensiometric measurements were performed during half an hour on 10 mM acetate buffer, 100 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, pH 5 before experiments to check the cleaned surface before experiments. The surface pressure (π) and the ellipsometric angle (Δ) were recorded at the same time. π was measured according to the Wilhelmy-plate method using a filter paper connected to a microelectronic feedback system to measure the surface pressure (Nima Technology, UK). Values of π were recorded every 4 s with a precision of ± 0.2 mN/m. Ellipsometric measurements were carried out using a home-made automated ellipsometer in a “null ellipsometer” configuration (Berge & Renault, 1993; Bourlieu et al., 2020). The laser beam probed a surface of 1 mm² and a depth in the order of 1 μ m and provided insight on the thickness of the interfacial film formed at the interface. Values of the ellipsometric angle (Δ , °) were recorded every 4 s with a precision of ± 0.5 °.

2.4 Adsorption of rDGL onto multicomponent lipid monolayers and at the air/water interface

A homogenous monolayer was formed by spreading a few microliters of 1 mM solution of lipids in CHCl₃/MeOH (2:1, v/v) over the surface of the buffer solution until an initial pressure of 20 ± 1 mN/m was reached (Bénarouche et al., 2013). After stabilization of the film over 5 minutes, rDGL was further injected in the sub-phase at a final concentration of 40 nM. The increase of the surface

pressure and ellipsometric angle due to protein adsorption onto the lipid monolayer was continuously monitored until reaching the equilibrium.

2.5 Visualization of phase separations and lipase distribution in heterogeneous film by atomic force microscopy

For AFM imaging, interfacial films were transferred onto a freshly-cleaved mica plate using the Langmuir-Blodgett method. The transfer was processed after 2 hours kinetics at a constant surface pressure and at a very low speed ($0.5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$). Imaging was carried out with an AFM (Multimode Nanoscope 8, Bruker, France) in contact mode QNM in air (20°C), using a standard silicon cantilever (0.06 N/m , SNL-10, Bruker, France), and at a scan rate of 1 Hz. The force was minimized during all scans and the scanner size was $100\times 100 \mu\text{m}^2$. The processed images analyzed by the open-source platform Gwyddion are representative of at least duplicated experiments. ImageJ software was used to perform the analysis of AFM images. The functions *Plot Profile*, *Threshold*, *Particle Analysis*, *Make Binary* and *Dilate* were applied to study the different height levels as well as the shape of the protein networks. ImageJ software was used to perform different height analyses (based on the analyses of five plot profiles taken randomly in the AFM image) and thresholds on the raw AFM images (see supplementary data), in line with the study of Bourlieu et al. (2016)

3 RESULTS

3.1. Ellipsometric and tensiometric adsorption kinetics of rDGL onto galactolipids (homogenous phase) and mixed galactolipid-phospholipids (heterogenous phase) monolayers

The adsorption kinetics of rDGL onto the GL monolayer was studied by tensiometry and ellipsometry, at 20 mN/m . Under these conditions, the GL monolayer forms a liquid expanded (LE) phase. The results obtained on this homogenous system were then compared with the rDGL

CHAPITRE 4

adsorption kinetics onto heterogenous film based on mixture of galactolipids and phospholipids (GL/DPPC monolayer). Under these conditions, some phase separation occurs with the coexistence of liquid condensed (LC) and LE phases at 20 mN/m.

The gastric lipase was injected into the subphase after 5 minutes equilibrium of the GL and GL/DPPC lipid films, respectively. The adsorption kinetics were monitored over five hours. The variations with time in the ellipsometric angle and surface pressure are shown Figure 2.

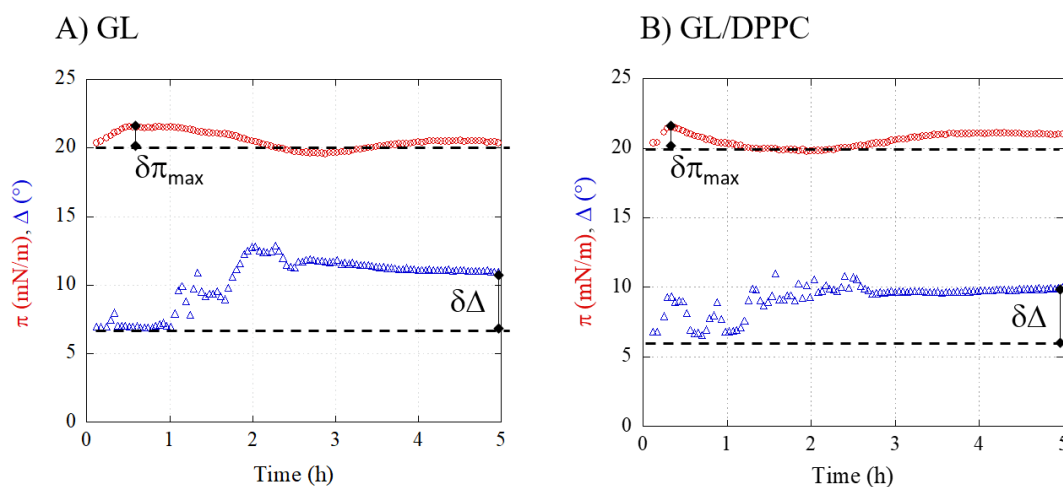


Figure 2 - (A) Kinetic evolution of the surface pressure (circle, red) and ellipsometric angle (triangle, blue) upon rDGL adsorption at the air/water interface onto GL lipid film and, (B) Kinetic evolution of the surface pressure (circle, red) and ellipsometric angle (triangle, blue) upon rDGL adsorption onto GL₅₀/DPPC₅₀ monolayers performed at an initial surface pressure of 20 mN/m. The rDGL was injected in the subphase after 5 minutes stabilization of the monolayers at the air/water interface.

In figure 2.A, the surface pressure increased quickly after the injection of the enzyme in the subphase below the GL monolayer, while the ellipsometric angle remained stable over the first few minutes of kinetics, reflecting the accumulation of the gastric lipase below the air/water interface. After one hour kinetic, the surface pressure started to slowly decrease, together with a drastic increase in the ellipsometric angle from 6.9° to a maximum value of 12.9°, reflecting a

reorganization at the interface and the subsequent adsorption of the enzyme onto the lipid monolayer. The evolution of the surface pressure and ellipsometric angle after injection of gastric lipase in the subphase of the GL/DPPC system (fig. 2.B) followed a similar evolution. The maximum increase in the surface pressure ($\Delta\tau_{\max}$) was similar for both systems ($\Delta\tau_{\max}=1.2$ mN/m vs 1.4 mN/m, for GL and GL/DPPC films, respectively). Nevertheless, for the GL₅₀/DPPC₅₀ monolayer, the ellipsometric angle started to increase right after the injection of the lipase into the subphase, reflecting a faster adsorption of the rDGL onto the heterogeneous film, probably due to the different orientation of the GL polar heads in the presence of DPPC. Indeed, the lag phase before the start of rDGL adsorption observed in the case of the GL monolayer could be due to the packing and orientation of the GL polar heads, which could hinder the access of the enzyme active site to the interface. In addition, it is important to point that addition of DPPC triggers phase separation which has been demonstrated as a structural feature favoring rDGL adsorption. For both systems, an equilibrium plateau was reached from 3h and until the end of the kinetics, with similar values for both GL and GL/DPPC systems ($\delta\Delta=10.5 \pm 0.5^\circ$).

The $\Delta\tau_{\max}$ values obtained upon rDGL adsorption on GL and GL/DPPC films are lower than those previously recorded upon rDGL adsorption onto pure phospholipid (PC) films (Bénarouche et al., 2017) or films mimicking bovine milk fat membranes and presenting phases coexistence (Bourlieu et al., 2016). This may result from weaker electrostatic interactions of rDGL with the neutral GL (compared to milk polar lipids (MPL)) which in general have charged polar heads. In addition to weaker electrostatic interactions, the galactose residues of GL polar heads may also generate some steric hindrance for lipase penetration into the film. Difference in fatty acyl moieties (chain length and unsaturation degree) may also influence lipid packing and rDGL adsorption.

3.2. Visualization of lipase organization into galactolipid monolayers by atomic force microscopy

AFM images of monomolecular films in the presence of rDGL were made after sampling the interface using the Langmuir Blodgett method after 2h of kinetics. The use of AFM allowed the topographic visualization of the interface at the nanoscopic scale. The AFM images of the interface were compared before and after the rDGL injection to highlight the distribution of the enzyme in the GL films and to determine the reorganization of the monolayers induced by the lipid-protein interactions. Details on AFM study on GL mixed films in the absence of rDGL are reported in [COLSUB_112646, accepted, CSB 2022].

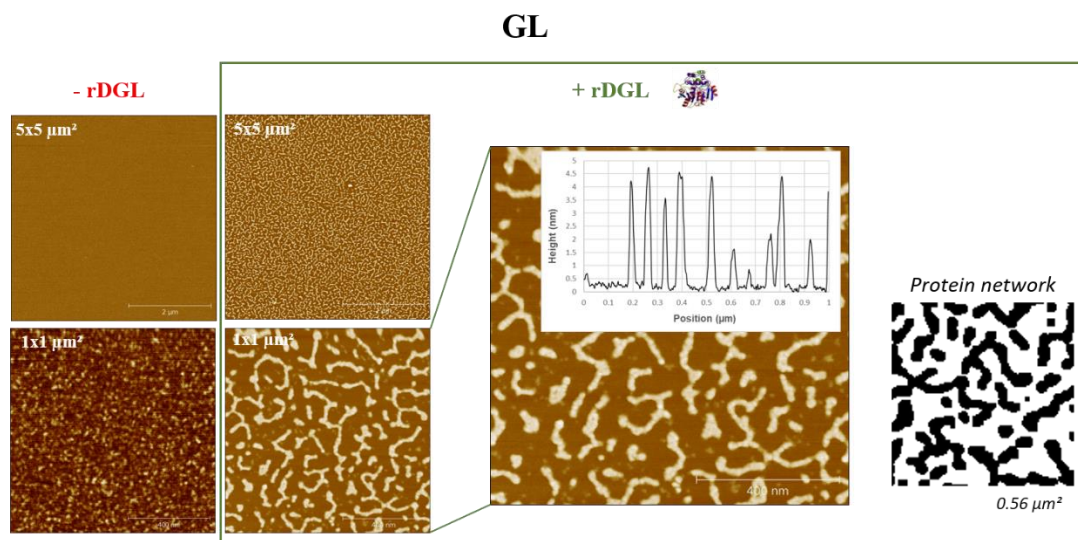


Figure 3 - AFM images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$ and $1 \times 1 \mu\text{m}^2$) of GL monolayers at an initial surface pressure of 20 mN/m before (-rDGL, red) and after (+rDGL, green) rDGL injection (40 nM final concentration, 5h kinetics). A cross-section of height profile is representative for $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ image after rDGL injection. ImageJ analysis was performed on a $0.56 \mu\text{m}^2$ crop to determine the shape of the protein network (see material and methods). The vertical color scale from dark brown to white corresponds to an overall height of 15 nm.

The injection of rDGL in the subphase (40 nM) clearly modified the morphology of the GL film (fig. 3) and triggered the formation of homogeneous patches onto the fluid phase after 2h of

kinetics. These patches, assumed to reflect protein adsorption, had a mean width of 300 nm, which could correspond to 60 rDGL molecules, taking a width of about 5 nm for a rDGL molecule (Bénarouche et al., 2013). The roughness of the GL film before the enzyme injection was no longer visible on the AFM images in the presence of rDGL, suggesting a modification of the galactolipid-galactolipid interactions as well as a reorganization of the galactolipid polar heads induced by the adsorption of the rDGL onto the lipid film. Based on the analysis of five sections of the AFM image, the height variations of the fluid lipid background ranged from 0 to 0.5 nm (average height= 0.24 ± 0.12 nm), representing about 57% of the interfacial film. After rDGL adsorption, the cross-section profiles of the AFM images displayed several peaks of varying heights and were divided into two categories depending on their height levels and occurrences. A first height level was identified, with peaks ranging from 0.5 to 2.0 nm (average height= 0.98 ± 0.4 nm), accounting for 17% of the interfacial film. A second level was also detected, with heights ranging from 2.0 nm to 5.5 nm (average height= 4.0 ± 0.8 nm), representing about 26% of the interface on the AFM image. On this second height population, 55% of the heights were included between 3.9 and 4.5 nm, which could correspond to the entire cross-section of rDGL molecules (Roussel et al., 2002) and thus of protein patches covering an average area of 336 nm^2 (15 pixels per AFM image), which would correspond to a consistent value of 47 rDGL molecules, taking a cross-sectional area of 7.2 nm^2 at 20 mN/m, as reported by (Bénarouche et al., 2013).

3.3. Visualization of lipase organization into galactolipid-phospholipids monolayers by atomic force microscopy

A saturated phospholipid (DPPC) was added at a molar ratio of 50% in the GL mixture, in order to induce phase heterogeneity and determine the impact of such heterogeneity on the rDGL adsorption by introduction of a liquid condensed phase (LC) in the monolayer. The AFM images

CHAPITRE 4

($5 \times 5 \mu\text{m}^2$ and $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$) of the interfacial film before and after the injection of the rDGL in the subphase of the GL/DPPC monolayer are presented figure 4.A.

After injection of the enzyme, the LC domains have merged, adopting a more circular shape, with heights of 1.7 to 2.3 nm (average height = 1.8 ± 0.1 nm), covering an average surface of 36% of the interfacial film. At the very center and on the sides of the LC domains, bright peaks of 2.0 to 8.0 nm in height were also visible, circularly distributed, pointing the heterogeneity of the gel phase domains. Onto the fluid phase (LE), an irregular protein network was formed, much denser than the one observed in the case of the GL film (fig. 3), and made of small grains forming interconnected units of 50.0 ± 20.0 nm width. A sharp demarcation was also visible between the protein network in the fluid phase and the condensed domains, indicating rDGL exclusion from the LC-LE phase boundary and LC domains.

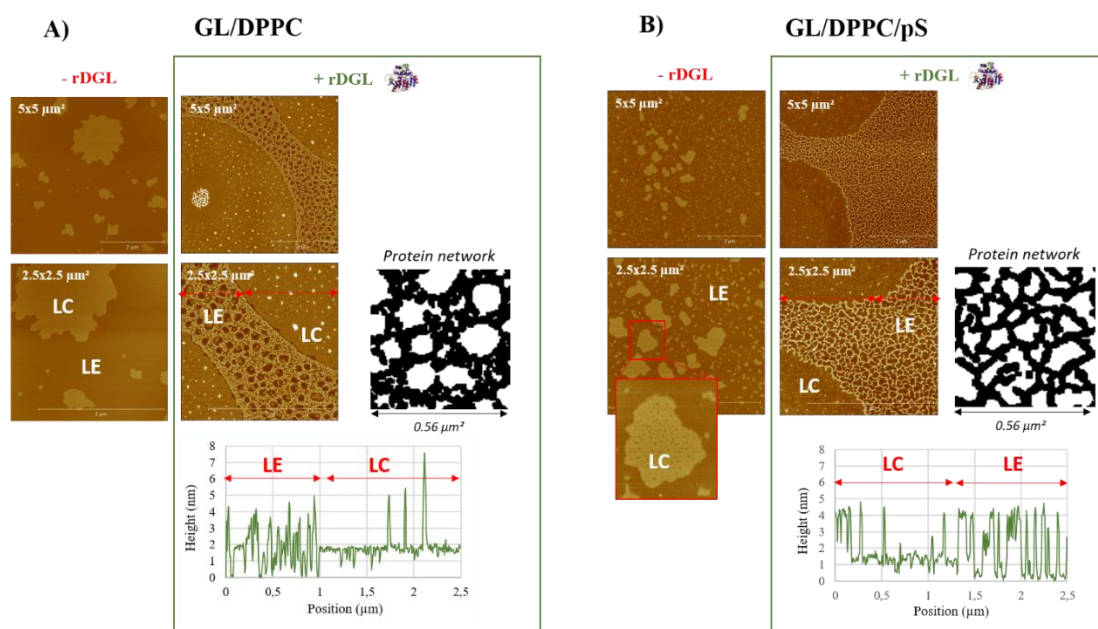


Figure 4 - AFM images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$ and $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$) at an initial surface pressure of 20 mN/m before (-rDGL, red) and after (+rDGL, green) rDGL injection (40 nM final concentration, 5h kinetics) of A) GL/DPPC monolayer (50:50 mol/mol) and B) GL/DPPC/pS monolayer (45:45:10 mol/mol/mol). Cross-sections of height profiles are representative

for $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}^2$ image after rDGL injection. (LE – Liquid Expanded, fluid phase; LC – Liquid Condensed, gel phase). The vertical color scale from dark brown to white corresponds to an overall height of 15 nm.

Size analyses and thresholds on AFM images led to the identification of height levels induced by the interactions of rDGL with the heterogeneous membrane, which are summarized table 2. As for the GL monolayer, two different height profiles were identified at the fluid phase level, with similar profiles, indicating the preferential adsorption of the enzyme at the level of the fluid phase. A new higher height profile was identified at the level of the condensed domains, where the lipase probably has more difficulty to adsorb due to the high packing.

Table 4 - Summary of height levels identified in AFM images and related to rDGL interactions with model membranes. Height values are given in nm. The percentages given are the percentage of pixels covered by the indicated height range (-). Values obtained were based on the analysis of five plot profiles taken randomly in the AFM image.

Monolayer	Protein adsorption (nm)		
GL	h1 = 0.98 ± 0.4 (0.5 – 2) 17%	h2 = 2.0 ± 5.5 (2.0 – 5.5) 26%	-
GL₅₀/DPPC₅₀	h1 = 0.4 ± 0.1 (0.2 – 1.7) 32%	h2 = 2.6 ± 0.2 (2.3 – 4.8) 26%	h3 = 5.5 ± 0.7 (>5.5) 2%
GL₄₅/DPPC₄₅/pS₁₀	h1 = 1.2 ± 0.2 0.6 – 1.5 34%	h2 = 3.6 ± 0.6 (2.3 – 5.0) 24%	-

3.4. Impact of phytosterol addition in galactolipid-phospholipids mixture on the adsorption behavior of the gastric lipase

The inclusion of phytosterols in the GL/DPPC mixture has been shown to generate defects at the level of the condensed phase, due to the preferential interactions between the phytosterols and the saturated fatty acids [COLSUB_112646, accepted, CSB 2022]. The AFM images figure 4.B revealed that 2h after the injection of rDGL into the subphase, a regular protein network has formed onto the fluid phase. This network is composed of interconnected units of the same width as the protein network formed at the interface of the GL film (30.0 ± 0.0 nm), suggesting a similar organization of the proteins. Additionally, the delineation between the fluid phase protein network and the condensed phase domains was no longer visible on the AFM images, in contrast to the GL₅₀/DPPC₅₀ film, indicating a modification of the protein-lipid interactions and probably a better miscibility of the components at the interface when pS were added in the system. As for the two previous samples, image and size analyses have revealed different levels of rDGL adsorption on the lipid film, which are reported table 2.

4 DISCUSSION

rDGL has been shown to exhibit a high affinity for the interface (air/water or lipid/water) covered by polar lipids and to form monolayers, which distinguishes it from other globular proteins that tend to form multilayers (Bolanos-Garcia et al., 2008; Bourlieu et al., 2016). The formation of a monolayer was also deduced from rDGL adsorption onto a siliconized hydrophobic surface, monitored using a quartz crystal microbalance (Chahinian et al., 2006). This is probably due to its structural adaptation that avoids interfacial denaturation and involves a localized conformation change (lid opening) with the formation of an interfacial recognition site (IRS) on one side of the molecule (Mateos-Diaz et al., 2017). The binding capacity of the rDGL at the air/water interface

was monitored as the increase in the surface pressure π_{\max} , correlated to the variations of the lipid packing and the adsorption of enzyme molecules onto the monolayer. Here, the combination of data obtained with ellipsometry, tensiometry, and atomic force microscopy analyses provided insights on the physicochemical behavior and the distribution of rDGL in mixed GL films at the air/water interface.

4.1. The particular orientation of the galactolipid polar heads could limit the enzyme adsorption at the interface of the monolayer despite the high surface activity of rDGL

The adsorption of rDGL onto mixed GL film (initial $\pi=20$ mN/m) triggered a slight increase in the surface pressure ($\Delta\pi_{\max}=1.2$ mN/m). Although this result reflects lipid-protein interactions at the air-water interface, this increase in the surface pressure was more discrete than those reported by Bottier (2006) upon the adsorption of pin-a isoform of puroindoline, a small globular protein (13 kDa), onto homogenous monolayers of pure MGDG or DGDG isolated from wheat. Indeed, a pressure increase of 4.4 and 2.5 mN/m at 20 mN/m was obtained upon adsorption of pin-a onto pure MGDG and DGDG films, respectively. The insertion of pin-a onto the GL films could be explained by the fluidity of GL as well as by the establishment of hydrophobic and Van der Waals interactions between the galactosyl head groups and the numerous tryptophan moieties of puroindolines, favoring their penetration into GL films. Furthermore, the overlap of the MGDG heads from 20 mN/m could have induced the formation of local instabilities, favoring the insertion of the protein in the film, explaining the greater increase of pressure. Conversely, the larger polar heads of DGDG could have limited the insertion of pin-a, thus explaining the lower pressure increase. Indeed, despite the larger polar head of DGDG than MGDG, digalactosyl residues possess the ability to adopt a tilted orientation, at 40° to the interface normal, in contrast to the polar head of pure MGDG, which was oriented parallel to the interface (Bottier, 2006). The particular

orientation of the digalactosyl residue of DGDG is consistent with the results obtained by Chu et al. (2010) on the digestibility of an olive oil stabilized by either DPPC or DGDG, showing that the air/water interface occupied by DGDG was more resistant to the adsorption of bile salts, pancreatic lipase and colipase compared to the interface occupied by DPPC.

The small increase in surface pressure and the latency phase observed before the increase of the ellipsometric angle in the case of rDGL is therefore more consistent with a discrete adsorption behavior onto the mixed GL monolayers at 20 mN/m. The more limited insertion of rDGL could have been due to the larger size of the protein (40 kDa versus 13 kDa for pin-a puroindoline), but also to the fact that the monolayer was composed of a mixture of GL, and not of pure MGDG or DGDG. Indeed, in the equimolar mixture, a reorientation of the DGDG polar heads was observed, with the digalactosyl moiety orienting parallel to the interface, suggesting strong interactions between MGDG and DGDG and allowing tighter packing of mixed galactolipid molecules at the interface that could inhibit the lipase adsorption (Bottier, 2006). Moreover, the adsorption kinetics properties of gastric lipase could also result from the interactions between the substrates and the active site of the enzyme. The active site of rDGL being composed of several basic residues, it is less likely to develop electrostatic interactions with an uncharged galactolipid monolayer, compared to a charged phospholipid monolayer, explaining the lower adsorption capacity of rDGL to the GL monolayer in our study. Indeed, electrostatic interactions allow the stabilization of the open conformation of the lid protecting the active site of the rDGL, ensuring a favorable orientation for its adsorption. The absence of charge at an interface decreases the establishment of electrostatic interactions with the enzyme, which could slow down or even hinder its adsorption.

Overall, the extend of rDGL adsorption onto the lipid monolayer seems to be highly dependent on the lipid packing and acyl chain composition. Indeed, a higher increase of π ($\Delta\pi_{\max}=8$ mN/m) was

reported for the rDGL adsorption onto 1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC) monolayer in the same conditions (Bénarouche et al., 2013). Moreover, rDGL shows a higher penetration capacity into medium chain DLPC than into long chain egg PC monolayers, with critical surface pressures of insertion (π_c) of 30.3 mN/m and 21.5 mN/m, respectively. The surface pressure chosen here with GL film ($\pi=20$ mN/m) therefore represents harsh conditions for rDGL adsorption and penetration. An higher increase of the surface pressure was also reported by Bourlieu et al. (2016) on milk polar lipids with or without residual triacylglycerols MPL and MPL_{TC} ($\Delta\pi_{\max}=2.4$ mN/m and $\Delta\pi_{\max}=6.1$ mN/m, respectively).

In our study, the ellipsometric data suggested that a significant amount of rDGL was adsorbed onto the GL monolayer after 1h latency phase, with a high ellipsometric angle variation of $\delta\Delta=4.2^\circ$ obtained after 2h of kinetics. This value was higher than that obtained on MPL ($\delta\Delta=3.1^\circ$) but much lower ($\delta\Delta=18.3^\circ$) than that obtained on MPL_{TC} after 5 hours of kinetics. Overall, the results of tensiometry and ellipsometry analysis confirmed the adsorption of rDGL onto the GL monolayer, although to a lesser extent than for bovine milk membranes (MPL and MPL_{TC}) due to the particular orientation of the polar head of galactolipids and the uncharged surface of the monolayer.

4.2. rDGL undergoes conformational changes upon adsorption, explaining the different level of adsorption/insertion onto the GL films

The AFM images of the GL film evidenced the formation of protein patches at two different height levels in the fluid phase 2h after the injection of rDGL in the subphase. Different levels of rDGL adsorption have already been reported (Bénarouche et al., 2013, 2017; Bourlieu et al., 2016, 2020) as being dependent on the monolayer composition but also on the conformation of the adsorbed enzyme, which reflect its level of interaction and activity with the substrate. This may result from

CHAPITRE 4

structural changes occurring upon protein adsorption at the air/water (or lipid/water) interface. The unfolding and denaturation of proteins at the interfaces are well-known behaviors, especially when interfacial tension is high. For example, lipases are rapidly inactivated at the oil-water interface when using pure triacylglycerols (Aloulou et al., 2006). Nevertheless, denaturation can be avoided using surfactants decreasing the interfacial tension or by the enzyme itself. Lipases like gastric lipase are also known to undergo a localized conformational change with a lid opening that controls the interfacial recognition site and activity (Mateos-Diaz et al., 2017). Coagulation/aggregation are additional phenomena that may also occur with proteins at interfaces (James & Augenstein, 1966).

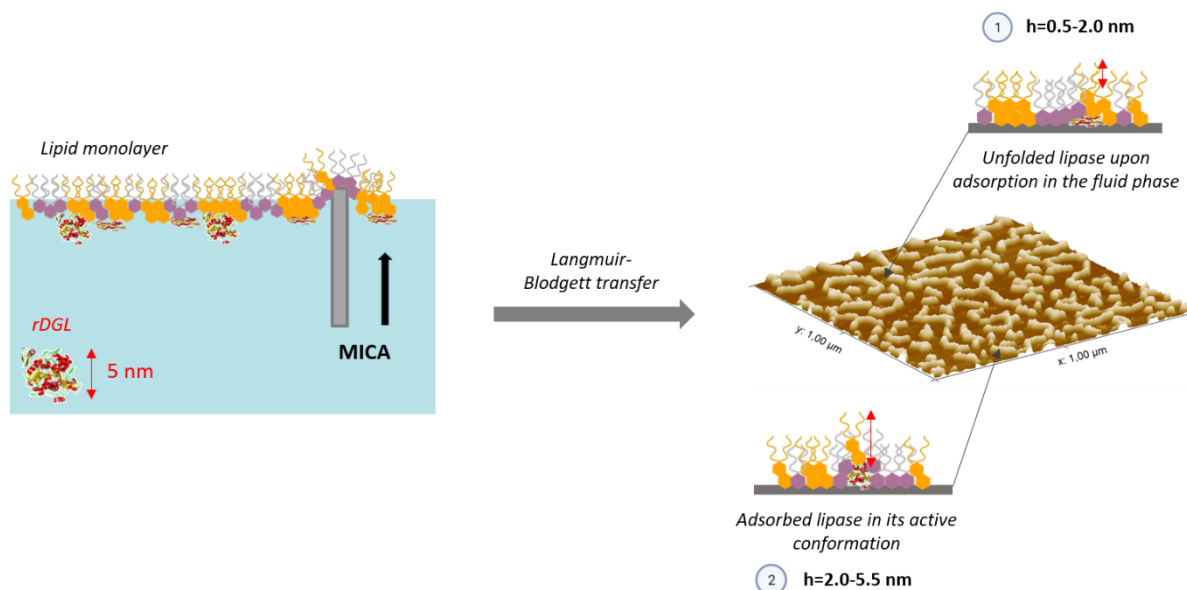


Figure 5 - Proposed model of rDGL distribution in homogenous galactolipid monolayer under gastric conditions

4.3. rDGL is excluded from condensed phase domains in mixed heterogeneous GL-DPPC systems and exhibits similar adsorption behavior to other small globular proteins

All these phenomena were likely to explain the different levels of insertion of the rDGL in the mixed GL film. Indeed, the lowest height level could correspond to some denatured rDGL, unfolded upon adsorption and resulting in an increase in the surface pressure, more favorable to the adsorption of the enzyme in its active conformation. The second height level corresponding to

homogeneous peak sizes between 2.0 and 5.5 nm is likely to correspond to the adsorption of rDGL in its active conformation, at a depth of 1 to 2 nm in the GL monolayer onto the GL monolayer at the air/water interface. This level of rDGL would fit with the adsorption model previously proposed for rDGL (Bénarouche et al., 2013). A model for the rDGL distribution in the GL monolayer under gastric conditions is proposed figure 5.

Numerous studies have been conducted in AFM to investigate the adsorption of various lipases and phospholipases onto heterogenous supported monolayers and bilayers at the air/water interface (Balashev et al., 2007; Rangl et al., 2017). Overall, results have indicated the preferential adsorption of these enzymes at the edges of low molecular packing domains, where the increase of the curvature favor the amphiphile adsorption (Nielsen et al., 1999; Prim et al., 2006).

The lateral distribution of the gastric lipase in monolayers of milk fat globules with phase heterogeneity has been studied in both human and bovine systems (Bourlieu et al., 2016, 2020). The coexistence of liquid condensed/liquid expanded (LC/LE) phases in milk fat globule monolayers has been shown to impact the adsorption of gastric lipase. Indeed, the rDGL gets really rapidly adsorbed in the LE phase or at the phase boundaries in the bovine milk membrane (BMM) and human milk membrane (HMM) extracts, showing that the coexistence of LC/LE phase was an important driver of the rDGL adsorption.

Here, we introduced some phase heterogeneity in the GL monolayer by adding DPPC. As expected, the AFM images (fig. 4.A) revealed that the rDGL was excluded from the LC phase, and preferentially adsorb onto the LE phase of GL-DPPC monolayer, which present a lower molecular packing, probably due to the high composition in PUFA of GL. Indeed, the condensed domains were likely to include DPPC, with tight packing of its saturated acyl chains preventing lipase penetration. Nevertheless, the bright peaks visible in the center of the condensed domains seemed

CHAPITRE 4

to indicate an adsorption of rDGL at this level, probably due to some compositional heterogeneity between the center and the edge of the LC domains, favoring a less dense packing or the appearance of defects at the central level. On the other hand, the adsorption of the rDGL onto the LE phase triggered the formation of a dense protein network, composed by small interconnected nanodomains of irregular shape and width, in contrast to the discontinuous homogeneous network previously formed in the GL film. Several levels of rDGL insertions were identified, in line with the results of Bourlieu et al. (2016) on bovine milk fat model membranes (MPL and MPL_{TC}), with slightly different height values in those different heterogenous systems, which could be explain by the differences of composition and lipid packing between the monolayers.

Additionally, the condensed domains composing the LC phase merged and their circularity was increased, indicating the existence of a line tension at the interface of the LC/LE phases. Indeed, García-Sáez et al. (2007) have shown that the size and the shape of LC domains composed by sphingomyelin and cholesterol depend on the balance between the line tension, which tends to increase the size of the domains in order to reduce the total length of the boundaries, and the entropic and electrostatic repulsions, which prevent the fusion of the LC domains. Thus, the increase of the LC domain size in our study is consistent with a higher line tension at their edges. This change in line tension could be triggered by the greater height difference between the two phases LC and LE, induced by the adsorption of rDGL onto the fluid phase. Indeed, this height difference has an unfavorable energy cut per unit length, and as a result, the domain boundary deforms to counteract this phenomenon, inducing line tension, which may be unfavorable for rDGL adsorption. Indeed, the sharp domain delineation visible on the AFM image between the fluid-phase protein network and the LC domains seems to indicate that the rDGL poorly adsorbs at the phase boundaries.

The adsorption behavior of rDGL on heterogeneous lipid films from animal or plant sources can be compared to other globular proteins. Weise et al. (2010) studied the adsorption behavior of several lipid membrane proteins, including N-Ras, a small globular protein (21 kDa), onto heterogeneous model membranes with coexisting fluid/gel phases. The results of this study provided direct evidence of the preferential distribution of the N-Ras protein in the fluid phase, but also at the edges of the LC phase domains, leading to a favorable decrease of the energy between the phases. This adsorption of proteins at boundary phases was characteristic of proteins inserted into multiphase lipid systems but which do not show specific preferences for a given phase, so that they are expelled toward the boundaries. This localization and accumulation of proteins at the phase interface to decrease the line tension could explain the adsorption behavior of rDGL in the presence of pS.

4.4. The addition of pS modulated the rDGL adsorption onto mixed GL-DPPC monolayers at the air/water interface

In our previous study, the inclusion of phytosterols (pS) in the GL/DPPC film induced a drastic modification of the interfacial organization, with a dilution of the domains as well as an increase in the thickness of the condensed phases. This was attributed to interactions between GL and PL and a condensation effect of pS (X.-M. Li et al., 2003; Su et al., 2007). Moreover, the addition of pS to mixed DPPC and GL monolayers was found to trigger the appearance of defects into the condensed phase domains. Previous studies on various other lipases found that defects in lipid packing could constitute preferential sites for the enzyme anchoring (Balashev et al., 2001, 2007; Brezesinski & Möhwald, 2003; Nielsen et al., 2002). The presence of local defects in the LC phase GL/DPPC/pS film reflects a less dense molecular packing, which could favor rDGL adsorption. Indeed, AFM images recorded after rDGL injection in the subphase of the films revealed

significant differences in the organization at the interface between GL/DPPC and GL/DPPC/pS films. In the presence of pS, a regular protein network was visible on the AFM images, not only at the fluid phase but also at the phase domain boundaries and at the defects present on the condensed phase domains. The absence of a marked delineation of the protein network level between the LE and LC phases contrasts with the system without pS. It points to an enhancement of the rDGL adsorption onto the LC domains and at the boundary phase, leading to a decrease of the height difference between the LC/LE phases and thus to a decrease of the line tension (fig. 4.B), favoring a more homogenous adsorption of rDGL at the interface. This modulation of rDGL adsorption in the presence of pS could also be explained by a modification of the lipid-lipid and protein-lipid interactions. Indeed, hydrogen bridges could be established with the hydroxyl groups of pS, as well as stacking between rDGL aromatic residues and the sterol backbone, leading to a different interfacial organization and favoring the rDGL adsorption.

Moreover, the two different levels of rDGL insertion with homogeneous peak sizes onto the GL-DPPC-pS film (h₂, h₃) were comparable to those identified in the case of rDGL adsorption onto models of HMM by (Bourlieu et al., 2020). In contrast, rDGL insertion onto BMM was less homogeneous, with 3 levels of heights described, similar to the ones evidenced for the GL-DPPC film. It was speculated by the authors that the particular composition of HMM (high PUFA content, presence of DHA, presence of anionic PL, coexistence of LC/LE phase) was more favorable to the action of rDGL than the composition of BMM. Indeed, HMM contained more anionic phospholipids, which have been shown to enhance the adsorption of rDGL at pH 5 thanks to a better reorientation of the charged active site.

Interest of the study for the adsorption of gastric lipase onto natural plant cell membranes

Plant cell membranes are complex systems containing a large variety of lipid and protein molecules. The high proportion of DPPC in our model systems (50%) was explained by the need to create a heterogeneous system, presenting a coexistence of LC/LE phase observable in AFM, but was actually far from the palmitic acid compositions (C16 :0) found in natural plant membrane systems (plasma membrane, chloroplast thylakoids, oleosomes) (Kergomard, Carrière, et al., 2021). Indeed, the proportion of palmitoyl chains in natural plant systems is on average between 5-20% wt. of total lipids (D.-S. Lee et al., 1998; Venkatachalam & Sathe, 2006). Nevertheless, the raft theory in plant membrane systems predicts the existence of lipid assemblies locally enriched in phytosterol and sphingolipid molecules (Mongrand et al., 2010), which are known to contain liquid-ordered domains in a fluid environment (Bhat & Panstruga, 2005). These plant membrane rafts are biochemical homologues of mammalian cell membrane rafts rich in sphingomyelin and cholesterol, known for their transient dynamic structure in the nanometer range and involved in signaling and protein transport processes and other cellular processes (Hancock, 2006; Jacobson et al., 2007; Munro, 2003).

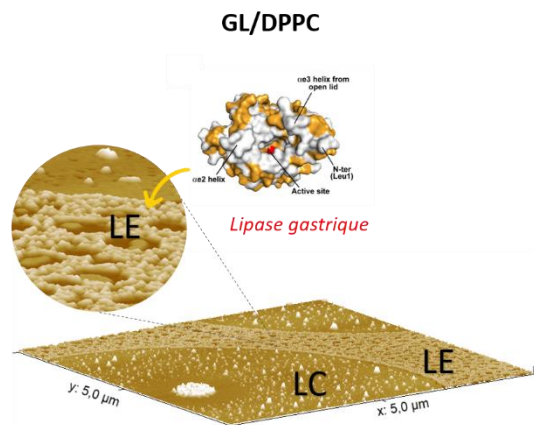
Thus, although our biomimetic membranes constituted a simplified model somewhat far from the natural plant membrane composition, the general physicochemical trends and adsorption behavior of gastric lipase at these heterogeneous model membrane systems remain extendable to the protein-lipid interactions occurring at the so-called raft zones in plant cells. In particular, it appeared that the presence of phytosterols in condensed domains and, by extension, in plant rafts, may enhance the rDGL adsorption at Lo or gel phase (LC) domains.

CONCLUSION

We have shown that Langmuir films and their analysis by tensiometry, ellipsometry and Langmuir-Blodgett transfer coupled to atomic force microscopy provide a suitable tool for studying the adsorption and interactions of gastric lipase with biomimetic vegetal membranes. Gastric lipase binds to these heterogenous membranes with a preference for phase boundaries and defects. It induces changes in the interfacial organization of lipids although it does not display any activity on polar acylglycerols from plant membranes (Wattanakul et al., 2019). Since gastric lipase is known to promote the action of pancreatic lipase through the release of fatty acids and changes in interfacial properties (Gargouri, Pieroni, Rivière, et al., 1986), the changes observed with plant polar lipids, without lipolysis, may also trigger the adsorption and activity of other pancreatic enzymes. This will be the objective of further studies, but the present one is a step forward in the comprehension of gastrointestinal lipase interactions with plant membranes, an overlooked aspect of lipid digestion (Sahaka et al., 2020).

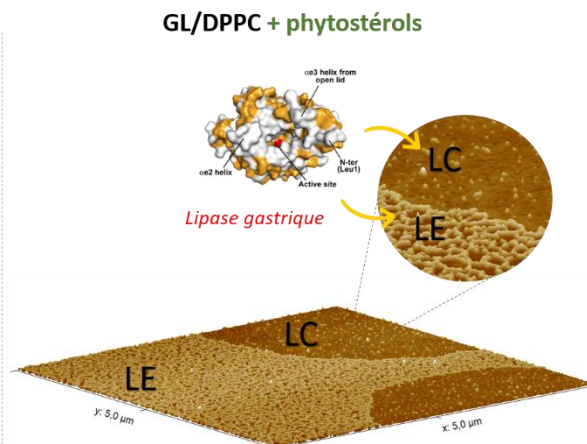
Principaux résultats de l'étude

Etudes interfaciales



**Adsorption de la lipase gastrique en phase fluide (LE)
Exclusion des domaines LC et des frontières de phases**

*LE = liquide expansé, LC=liquide condensé, pS=phytostérols



**Adsorption de la lipase en phase fluide (LE)
Mais également au niveau des défauts créés par
l'inclusion des pS dans les domaines LC et aux
frontières de phases.**

- La rDGL s'est adsorbée en phase fluide au niveau de la monocouche homogène de galactolipides (GL), grâce à sa composition riche en AGPI.
- L'orientation singulière des têtes polaires de galactolipides a limité les capacités d'adsorption de la rDGL et a entravé son insertion à l'interface air/eau.
- La rDGL a été exclue des domaines en phase LC au niveau des monocouches mixtes GL/DPPC. Ce comportement avait déjà été observé au niveau des membranes hétérogènes de lipides extraits des globules gras laitiers humains et bovins (phospholipides).
- Les défauts créés au niveau des domaines LC par l'inclusion des pS ont permis d'améliorer l'adsorption de la rDGL en phase LC et à la frontière entre les phases LC/LE.

II – Capacité d’adsorption de la lipase gastrique sur des monocouches de lipides extraits de matrices membranaires naturelles

Le comportement d’adsorption de la rDGL a dans un premier temps été étudié au niveau d’une monocouche de lipides extraits de *Chlorella vulgaris* Purasana, riche en galactolipides et en phospholipides polyinsaturés, et présentant des coexistences de phases LE/LC. Dans un second temps, l’adsorption de la rDGL a été étudiée au niveau des monocouches de lipides extraits des membranes d’OB de noix et d’amandes, afin de déterminer son comportement au niveau de ces monocouches hétérogènes végétales riches en phospholipides, mais présentant des différences notables de composition en AG (OB de noix riches en $\omega 3$ et $\omega 6$, OB d’amandes riches en $\omega 9$). L’objectif était ici de comparer l’adsorption de la rDGL au niveau de membranes naturelles de lipides hétérogènes, en confrontant les modèles végétaux avec les résultats précédemment obtenus sur des monocouches modèles animales (globules gras laitiers).

II.1 – Adsorption de la rDGL à l’interface air/eau

La rDGL a dans un premier temps été injectée en sous-phase d’une solution tampon acétate à pH 5 afin de vérifier son comportement et son activité à l’interface air/eau à une concentration de 1,92 mg/L (40 nM). Les résultats d’évolution de la pression de surface et de l’angle ellipsométrique sur une cinétique de 10h sont présentés **Figure 40**.

La pression de surface a commencé à augmenter progressivement après 3h de cinétique, jusqu’à atteindre une valeur proche de 15 mN/m après 10h de cinétique. Ces résultats confirment ceux obtenus en 2014 à l’IPR par C. Bourlieu et V. Vié (**Annexe V**). L’augmentation de l’angle ellipsométrique a été observée dès le début de la cinétique, et a atteint une valeur proche du plateau ($\Delta=11^\circ$). Ce résultat était plus faible que celui obtenu en 2014 ($\Delta=14^\circ$) avec une concentration

identique en rDGL. Cette différence pourrait s'expliquer par le changement de cuve (50 mL *versus* 8 mL en 2014) et du protocole d'injection à l'interface *versus* en sous-phase de la lipase. Finalement, ces résultats confirment la capacité d'adsorption de la rDGL à l'interface air/eau.

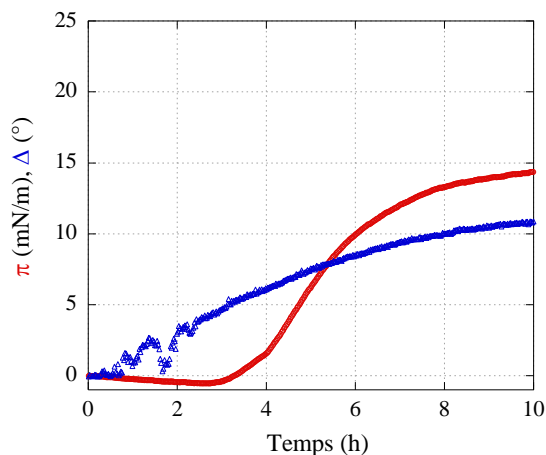


Figure 40 - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rouge), et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, bleu) sur une cinétique de 10h après injection de la rDGL (1,92 mg/L, 40 nM) en sous-phase tampon acétate pH 5 (100 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, 10 mM acétate de sodium) sur une cinétique de 10h.

II.2 – Adsorption de la rDGL au niveau d'une monocouche de lipides extraits de *Chlorella vulgaris* (Purasana)

La **Figure 41** présente l'évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique sur une cinétique de 2h suivant l'injection de la rDGL en sous-phase. La diminution de la pression de surface pendant les premières 30 minutes de cinétique s'explique par l'instabilité marquée de la monocouche à pH 5, provoquée par la désorption des molécules lipidiques en sous-phase. Cette hypothèse a été confirmée par la baisse de l'angle ellipsométrique, qui révèle une diminution de l'épaisseur du film sur cette période. A partir de 30 minutes de cinétique, un plateau a été obtenu à une pression d'environ $\pi=7$ mN/m. La pression de surface a ensuite augmenté drastiquement pendant 1h15, jusqu'à atteindre une valeur de $\pi=20$ mN/m. Cette évolution témoigne de l'insertion de la rDGL dans le film, facilitée par la faible compacité de la monocouche induite par la désorption

d'un nombre important de molécules en phase aqueuse. L'angle ellipsométrique a également légèrement augmenté jusqu'à 1h30 de cinétique, puis a atteint un plateau à $\Delta=9,4^\circ$ ($\delta\Delta=2,1 \pm 0,1^\circ$).

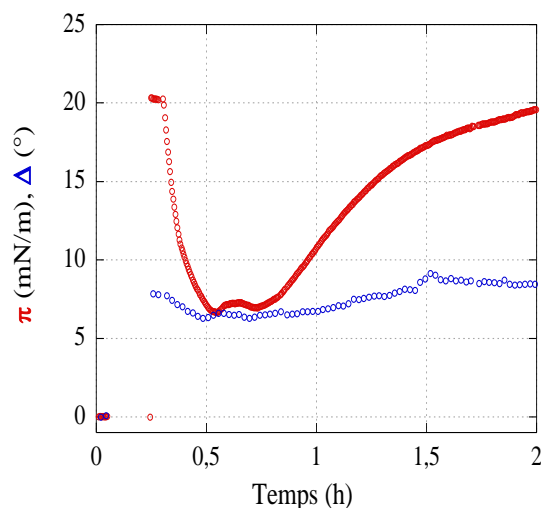


Figure 41 - Evolution de la pression de surface (courbe rouge) et de l'angle ellipsométrique (courbe bleue) sur une cinétique de 2h après injection de la rDGL (1,92 mg/L) en sous-phase de la monocouche de lipides totaux extraits de la Chlorelle Purasana (pH 5).

La **Figure 42** présente l'interface du film 2h après l'injection de la rDGL en sous-phase. L'image obtenue après injection à une pression $\pi=21,1$ mN/m et à un angle $\Delta=9,2^\circ$ montre la formation d'un réseau protéique, avec des hauteurs variant entre 4 et 5 nm, confirmant l'adsorption de la rDGL en phase fluide à l'interface. Ces résultats confirment les précédentes observations sur l'adsorption de la rDGL au niveau de monocouches modèles hétérogènes de galactolipides où l'adsorption préférentielle de la rDGL en phase fluide et à plusieurs niveaux de hauteurs avait déjà été soulignée (Kergomard et al., CSB, 2022, under review). Néanmoins, la désorption d'un nombre important de molécules en début de cinétique a probablement entraîné une désorganisation importante du film interfacial avant l'insertion de la rDGL, ce phénomène est donc à prendre en compte dans l'interprétation des résultats.

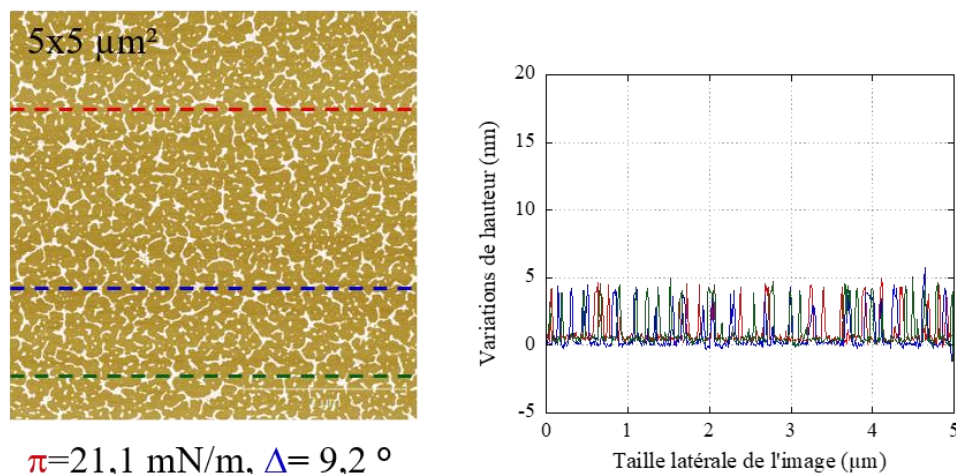


Figure 42 - Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) et variations des hauteurs à la surface du film après 2h de cinétique d'adsorption de la rDGL (1,92 mg/L) en sous-phase du film de lipides totaux de *chlorella vulgaris* Purasana (pH 5).

II.3 – Adsorption de la rDGL au niveau de monocouches de lipides membranaires d'OB : noix versus amandes

Les capacités d'adsorption de la rDGL ont été étudiées au niveau de monocouches de lipides extraits des membranes d'OB de noix et d'amandes. Comme précédemment décrit, ces assemblages membranaires sont composés de phospholipides, qui, avec les oléosines, forment une monocouche protectrice autour du cœur de TAG.

Les membranes d'OB de noix et d'amandes présentent des différences de composition notables en AG. En effet, comme précédemment décrit, les phospholipides membranaires d'OB de noix sont riches en LA (C18:2, ω 6, 63% massique des AG totaux), et contiennent de l'ALA dans des proportions significatives (C18:3, ω 3, 11% massique). A l'inverse, les phospholipides membranaires des OB d'amandes sont riches en acide oléique (C18:1, ω 9, 70% massique des AG totaux), acide gras monoinsaturé, et ne contiennent pas d'ALA. Ces différences majeures de composition en AG induisent des comportements de phases distincts à l'interface des

CHAPITRE 4

monocouches, qui peuvent avoir des conséquences notables sur l'adsorption des enzymes digestives, et notamment de la rDGL.

Au cours de cette étude, j'ai donc cherché à comprendre l'influence de la composition en phospholipides et en AG de ces monocouches hétérogènes sur les capacités d'adsorption de la rDGL à l'interface air/eau. Les phospholipides extraits respectivement des membranes d'OB de noix et d'amandes ont été étalés à l'interface air/eau jusqu'à atteindre une pression de surface initiale de 20 mN/m. Les monocouches formées étaient stables. La rDGL a ensuite été injectée en sous-phase à une concentration finale de 1,92 mg/L, puis un suivi cinétique de 2h a été réalisé.

Les résultats ont montré des tendances similaires pour les deux systèmes. Quelques minutes après l'injection de l'enzyme en sous-phase, la pression de surface a commencé à augmenter drastiquement, témoignant de l'insertion de l'enzyme dans la monocouche ($\delta\pi_{\max} = 17,6 \pm 0,2$ mN/m pour les deux systèmes) (**Figure 43**). Un plateau a ensuite été atteint après 1h de cinétique ($\pi = 38,5 \pm 0,3$ mN/m), témoignant de l'organisation et de la stabilisation de l'interface des deux systèmes. Contrairement au système noix, plusieurs plateaux ont été observés au cours de la phase d'augmentation de π pour le système amandes, soulignant plusieurs phases d'adsorption et d'insertion de l'enzyme. Cette différence dans l'évolution de π pourrait être liée à la différence de composition en AG entre les deux systèmes, celle-ci étant responsable d'une organisation interfaciale distincte, pouvant impacter l'adsorption subséquente de la rDGL. L'absence de décroissance de la pression de surface confirme l'absence d'activité de la rDGL sur les phospholipides.

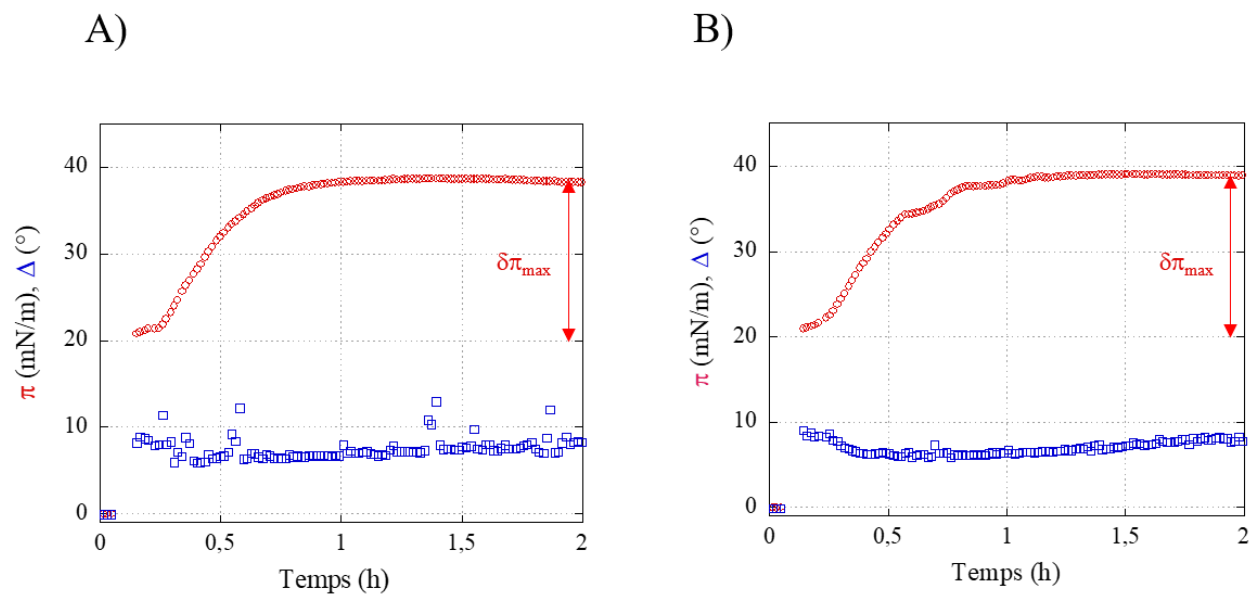


Figure 43 - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, courbe rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, courbe bleue) sur une cinétique de 2h après injection de la rDGL (1,92 mg/L) en sous-phase de la monocouche de lipides membranaires extraits d'oléosomes A) de noix et, B) d'amandes.

L'angle ellipsométrique a également montré une évolution similaire pour les deux systèmes. Une phase de décroissance (respectivement de $\delta\Delta = -3,4^\circ$ et $-2,5^\circ$ pour les systèmes noix et amandes) a d'abord été observée juste après l'injection de la rDGL en sous-phase, celle-ci étant probablement liée à la désorganisation de l'interface induite par l'adsorption des premières molécules de rDGL. L'angle ellipsométrique a ensuite montré une augmentation progressive sur le reste de la cinétique de $\delta\Delta = 2,0 \pm 0,1^\circ$ à 2h pour les deux systèmes. Cette augmentation de l'épaisseur de la monocouche était étonnamment peu marquée au regard de l'évolution de la pression de surface.

L'évolution globale de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique après l'injection de la rDGL en sous-phase des monocouches de phospholipides extraits des membranes d'OB de noix et d'amandes, respectivement, est très différente des résultats obtenues par Bourlieu et al. (2016) sur des monocouches complexes de phospholipides présentant des hétérogénéités de phase. En effet, l'adsorption de la rDGL au niveau d'une monocouche de phospholipides

CHAPITRE 4

DOPC/DPPC/DOPE/DOPS (35:35:20:10 mol/mol/mol/mol) sur une cinétique de 5h avait entraîné une faible augmentation de la pression de surface ($\delta\pi_{\max}=0,6 \pm 0,3$ mN/m), et au contraire, une augmentation significative de l'angle ellipsométrique ($\delta\Delta=5,2 \pm 0,30^\circ$). Au regard de la composition proche en classes de phospholipides des monocouches modèles comparée à celle des monocouches de phospholipides extraits des membranes d'OB de noix et d'amandes, la différence de comportement interfacial de la rDGL pourrait être liée à la différence de composition en AG. En effet, les systèmes modèles étudiés par Bourlieu et al. (2016) étaient composés majoritairement d'acide oléique monoinsaturé (C18:1, $\omega 9$, 65% massique) et d'acide palmitique saturé (C16:0, 35% massique), tandis que, dans notre étude, les phospholipides membranaires sont plus riches en AGPI (C18:2 et C18:3 pour la noix, et C18:2 pour l'amande). La fluidité plus marquée de ces derniers systèmes semble favoriser l'insertion de la rDGL, expliquant l'augmentation beaucoup plus marquée de la pression de surface, et une valeur d'angle ellipsométrique plus faible.

Par ailleurs, les expériences de Bourlieu et al. sur des monocouches d'extraits de lipides polaires purifiés de globules gras laitiers bovins (MPL) corrobore ce résultat. Ce mélange naturel de lipides contient des AGPI (respectivement de 7 et 2% de C18:2 et C20:3 des phospholipides totaux) (Bourlieu et al., 2020), et les expériences ont montré une augmentation plus importante de la pression de surface comparée aux monocouches de phospholipides modèles ($\delta\pi_{\max}=6,1 \pm 0,2$ mN/m) après l'injection de la rDGL en sous-phase.

La **Figure 44** présente les images AFM des films interfaciaux de phospholipides membranaires d'OB de noix et d'amande, obtenus avant et après 1h et 2h de cinétique en présence de rDGL. A 1h de cinétique, des molécules de rDGL insérées sont visibles à l'interface des deux systèmes. Dans le cas du système noix, les molécules de rDGL sont présentes sous la forme de traînées

discontinues de points de $4,4 \pm 0,2$ nm de hauteur, tandis que pour le système amandes, les protéines apparaissent sous la forme de patches de $4,3 \pm 0,3$ nm de hauteur.

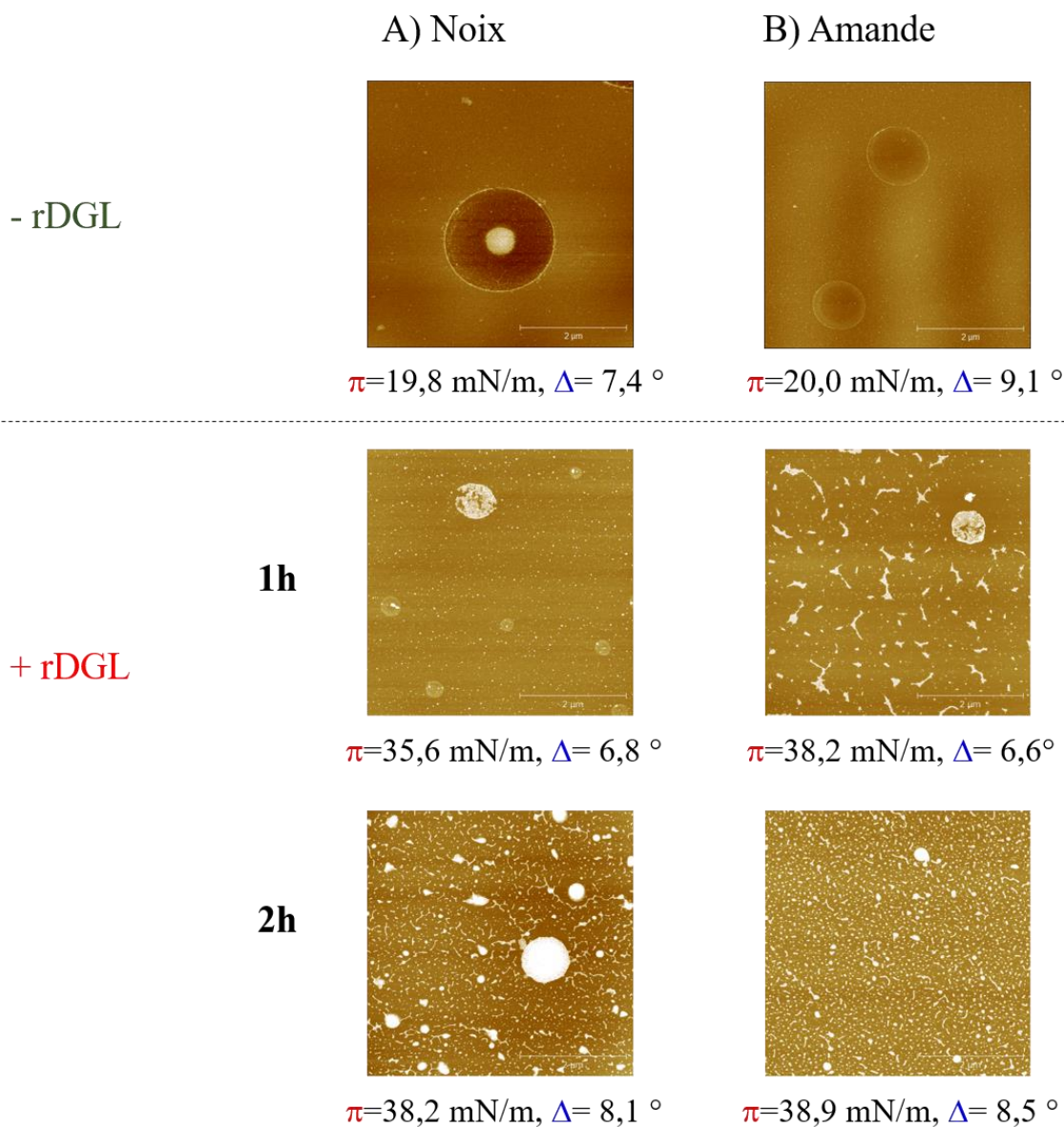


Figure 44 - Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de la surface du film de lipides membranaires d'oléosomes de A) noix et B) amandes, obtenues avant, et après 1h et 2h de cinétique en présence de rDGL (1,92 mg/L) injectée en sous-phase.

Pour les deux systèmes, les domaines circulaires en phase LC sont déstructurés, et il devient difficile de les attribuer à des caractéristiques topographiques de manière certaine. Par contre, il

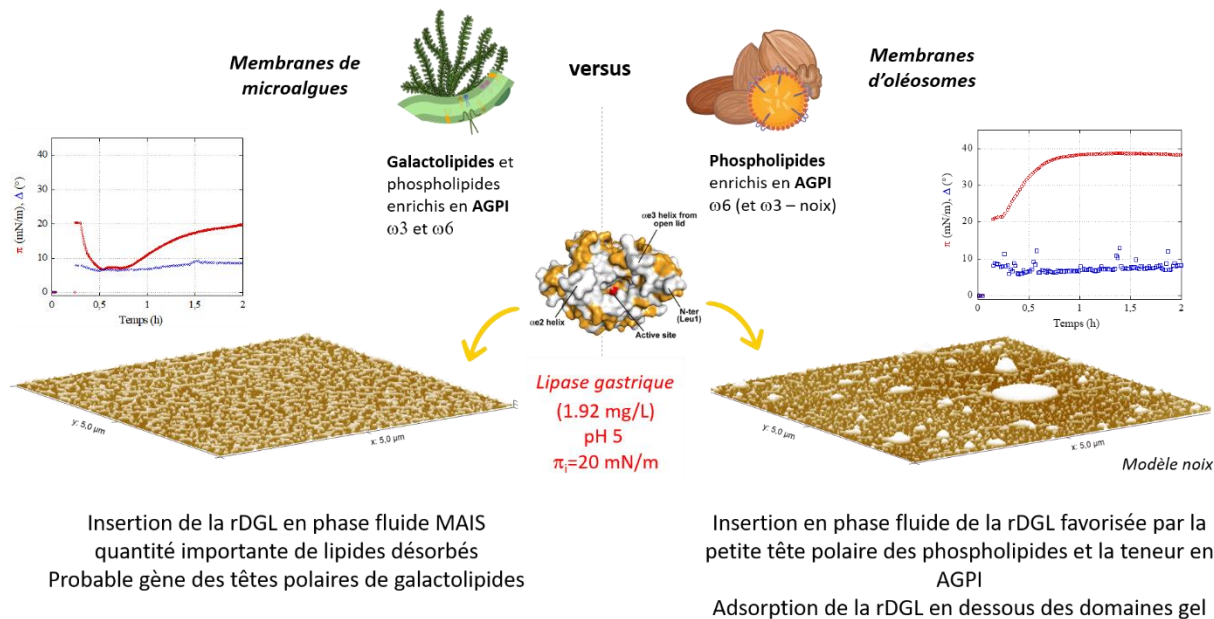
CHAPITRE 4

apparaît des domaines denses, de hauteurs plus importantes, attribuées à la présence de protéines insérées en bordures des domaines, et probablement adsorbées au centre, avec des hauteurs hétérogènes moins importantes. Notons que les pressions de surface avant, et après 1h de cinétique en présence de rDGL sont très différentes pour les deux systèmes, puisque l'insertion de la protéine provoque une augmentation drastique de la pression.

A 2h de cinétique, les molécules de rDGL sont plus nombreuses à l'interface des deux systèmes. Sur le système noix, les traînées de points se sont étendues et ont formé des lignes continues, avec plusieurs niveaux de hauteurs, comprises entre 2,1 et 5,0 nm. Les domaines en phase LC sont plus hauts que ceux observés à 1h de cinétique, avec des hauteurs comprises entre 8 et 10 nm. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'adsorption étendue de la rDGL à ce niveau, mais sans insertion. Un phénomène similaire a été observé dans le cas des phospholipides d'OB d'amandes. Un réseau protéique moins agrégé et plus étendu est visible sur les images, avec différents niveaux de hauteurs en phase fluide, comprises entre 1,9 et 4,8 nm, ces valeurs étant cohérentes avec les résultats précédemment obtenus sur les monocouches hétérogènes de phospholipides (Bénarouche et al., 2017).

Principaux résultats de l'étude

Monocouches hétérogènes de lipides extraits de membranes naturelles végétales



- Une quantité importante de lipides s'est désorbée en phase fluide à pH 5 dans le cas de la monocouche des lipides extraits des microalgues *Ch. vulgaris* Purasana, à cause d'une probable instabilité due à l'acidité du milieu sur les lipides chargés (SQDG, PE, PS). Cette désorption a permis à la rDGL de s'insérer en phase fluide, malgré la gêne provoquée par les têtes polaires de galactolipides observée sur les monocouches modèles.
- Au niveau des monocouches de phospholipides de membranes d'OB, un faible encombrement stérique des têtes polaires des phospholipides, associé à la présence d'AGPI, favorisent l'insertion de la rDGL en phase fluide, et son adsorption en dessous des domaines en phase LC.

III – Digestion gastro-intestinale des OB d’amande en système dynamique

L'objectif de cette étude était de cartographier l'adsorption, la pénétration et la diffusion de lipases gastrique et intestinale au niveau des OB d'amandes. Nous nous sommes intéressés à l'action successive de la lipase gastrique, puis de la lipase pancréatique et de sa colipase (complexe PTL-coPTL), en présence de sels biliaires. Les OB d'amandes ont été choisis pour leur teneur importante en TAG, et pour leur membrane en monocouche composée d'un mélange de phospholipides et de protéines endogènes (majoritairement des oléosines). La digestion de ces organelles microniques (2-10 μm) par l'action successive de la lipase gastrique (rDGL) et pancréatique (porcine, PPL-colipase) a été étudiée en cellules microfluidiques.

Des expériences ont été réalisées en utilisant la microscopie UV du synchrotron SOLEIL. A ces longueurs d'onde (295-305 nm), les acides aminés et notamment le tryptophane émettent de la fluorescence, ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation de sondes exogènes. Les OB ont été injectés dans des puces microfluidiques, afin de les bloquer dans des pièges lors des différentes injections des enzymes.

III.1 – Matériel et méthodes

La digestion *in vitro* des OB d'amandes a été testée en mini-digesteurs microfluidiques équipés d'une valve multi-canaux et de deux pompes d'injection (pousses-seringue) pour l'addition successive de la rDGL (phase gastrique) et de la lipase pancréatique porcine (PPL, phase intestinale) et de sa colipase. Le montage expérimental mis en place au synchrotron SOLEIL a permis de suivre la digestion des OB d'amandes *via* le microscope Télémós (**Figure 45**) en mesurant les variations de fluorescences naturelles des enzymes lors de leur adsorption, ainsi que l'évolution de taille des objets microniques.

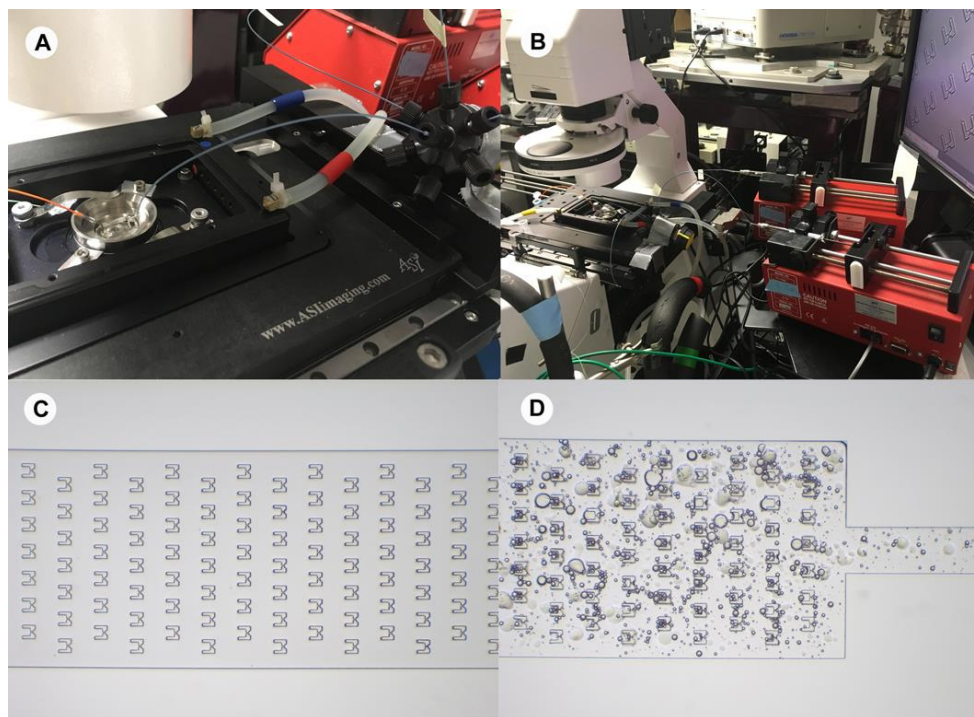


Figure 45 – Description du montage utilisé pour suivre la lipolyse des OB d’amande sur la ligne d’imagerie DISCO. Les puces microfluidiques en polydiméthylsiloxane (PDMS) ont été fixées par plasma sur des lamelles rondes en quartz (R525000, Esco Optics, $d=25$ mm, $t=0,16$ mm), puis montées sur une chambre Atto-Fluor, placées dans le support thermostaté sous le microscope (panneau A) et connectées à une vanne multicanaux et à deux pompes de micro-injection (panneau B). La première a été utilisée pour l’administration de fluide gastrique simulé contenant de la lipase gastrique (rDGL) et la seconde pour l’administration de fluide intestinal simulé (SIF) contenant la PPL et sa colipase. La conception microfluidique contenait quatre chambres parallèles ($200 \times \text{longueur} \times 13 \mu\text{m}$) toutes équipées de pièges conçus pour retenir les oléosomes d’amande. Le panneau C montre les pièges ($16 \times 16 \mu\text{m}$) dans l’une des chambres avant l’injection de l’échantillon. Le panneau D montre la même chambre après l’injection des oléosomes d’amande.

Les images ont été enregistrées avec deux objectifs $\times 40$ et $\times 100$ (Zeiss Ultrafluor 40x et 100x, Carl Zeiss GmbH, Allemagne), et 2 images ont été enregistrées successivement sur la même zone, une en lumière blanche et une en fluorescence. La longueur d’onde d’excitation était de 280 nm et les filtres passe-bande ont été sélectionnés à 327-353 nm pour la détection des résidus tryptophane (λ_{max} rDGL =336 nm, λ_{max} PPL=349 nm, le temps d’acquisition était de 20s à 40x et 10s à 100x).

Les images ont été enregistrées toutes les 30 s ou toutes les minutes pendant la phase gastrique de 40 min, suivie de la phase intestinale de 40 min.

Le fluide gastrique simulé était à base de NaCl (94 mM), KCl (13 mM) et ajusté à pH 5,5. Il contenait de la lipase gastrique (rDGL à 17 µg/mL). Le fluide gastrique simulé a été injecté 10 minutes après le début de la phase gastrique à raison de 5 µL/min et pendant 7 minutes. Le fluide intestinal simulé avait un pH fixé à 6,0 (NaCl, KCl, CaCl₂, NaHCO₃). Il a été utilisé pour tester l'action de la PPL à 250 µg/mL + colipase à 50 µg/mL, en absence ou en présence de sels biliaires (taurodésoxycholate de sodium 4 mM). Après une phase gastrique, les fluides intestinaux ont été injectés après 5 min d'observation du substrat à un taux de 5µL/min pendant 7 minutes. Une perfusion continue de ce fluide (2 µL/min) a été maintenue pendant la phase intestinale (40 min au total).

III.2 – Localisation et variation de l'intensité d'auto-fluorescence des lipases gastrique (rDGL) et intestinale (PPL/colipase) au cours de la dégradation dynamique des OB d'amandes par injections successives des enzymes

La dégradation enzymatique des OB d'amandes dans les mini-digesteurs a été testée par injections successives de la rDGL et de la PPL/colipase. Les résultats portant sur les variations de fluorescence sur les positions sélectionnées ont montré une bonne répétabilité. La taille des gouttelettes lipidiques n'a pas évolué de façon significative au cours de la phase gastrique, mais la variation d'intensité de fluorescence a témoigné de l'adsorption localisée et hétérogène de la rDGL à la surface des gouttelettes, en accord avec les observations rapportées à l'interface air/eau sur les monocouches de phospholipides extraits des membranes d'OB d'amandes (II.3) (**Figure 46**).

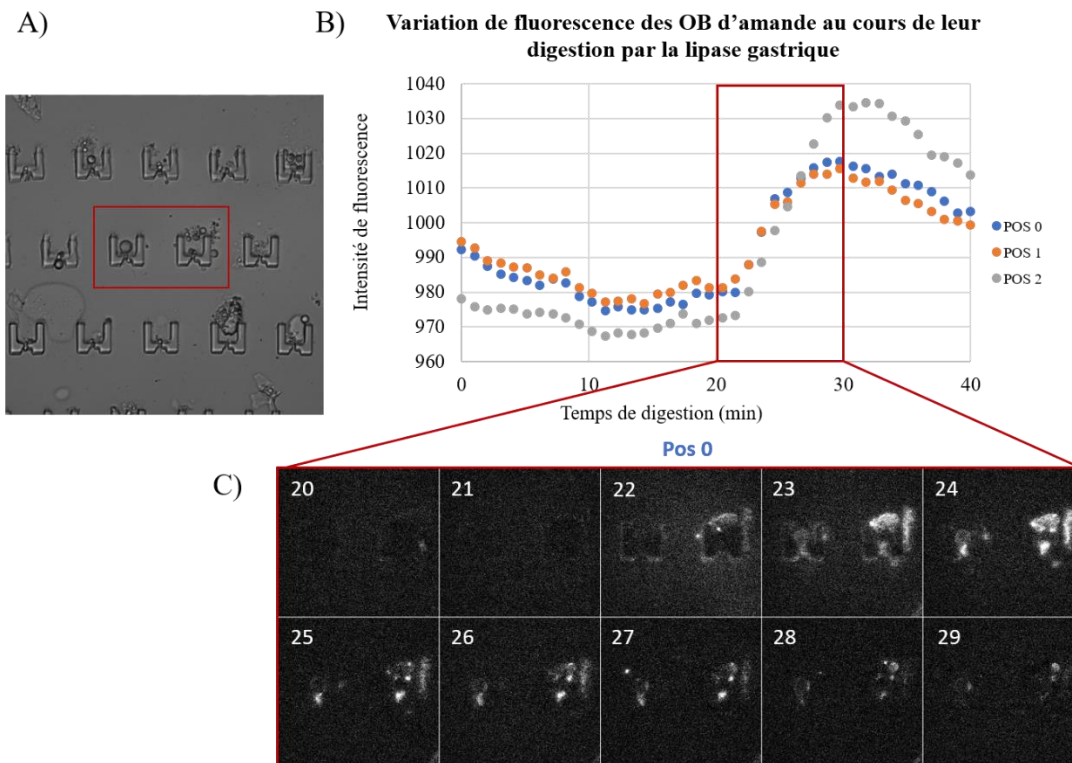


Figure 46 – Visualisation des OB d'amandes pendant la phase gastrique. A) Oléosomes d'amande au début de la digestion gastrique avant l'injection de la lipase gastrique (image visible T 0 min, 40X, image $283 \times 283 \mu\text{m}$, position 0), B) Evolution de la fluorescence au cours de la digestion gastrique des oléosomes sur trois positions (POS 0, 1 et 2) C) Evolution de la fluorescence après injection de la lipase gastrique dans la chambre microfluidique (1 image par minutes, entre 20 et 30 minutes de phase gastrique, image T+1-T fluorescence 327-335 nm, crop $117 \times 108 \mu\text{m}$ similaire à l'image).

Après l'addition de la PPL/colipase, une diminution importante de la taille des gouttelettes a été observée, jusqu'à ce que la plupart d'entre-elles disparaissent, témoignant de l'action lipolytique rapide de l'enzyme. L'augmentation de la fluorescence au niveau des objets microniques était néanmoins moins marquée qu'au cours de la phase gastrique.

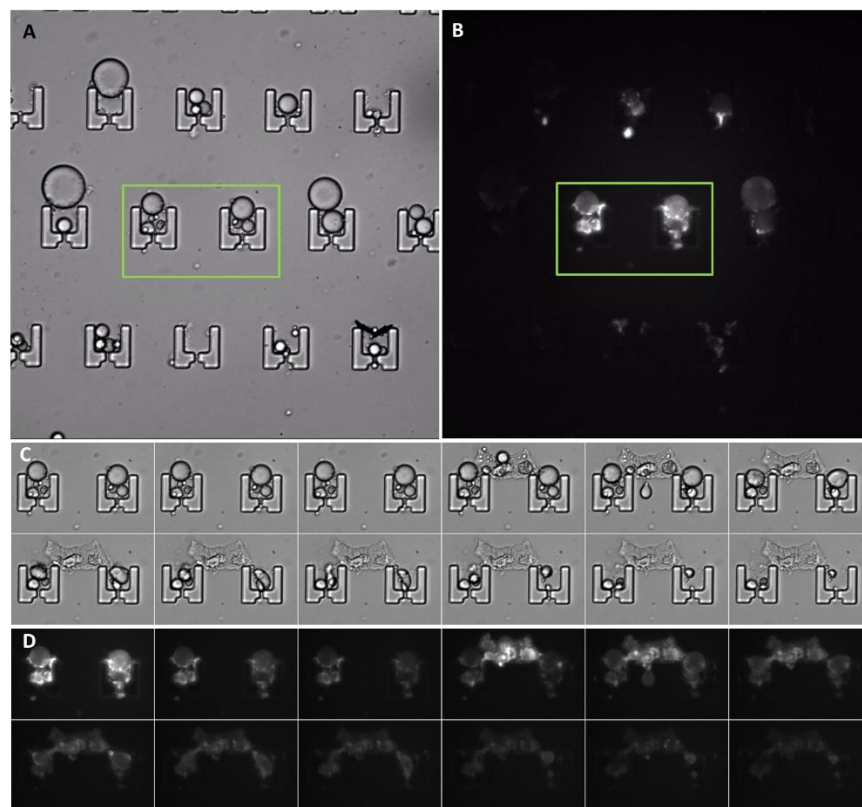
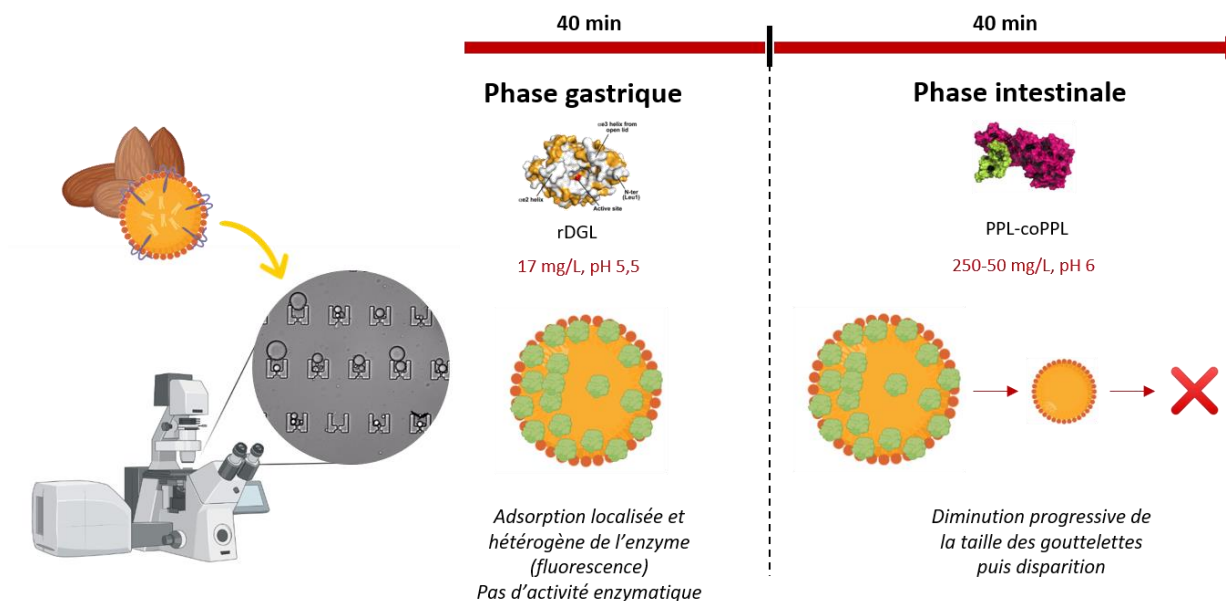


Figure 47 - Visualisation de la digestion des OB d'amande pendant la phase intestinale. A) OB d'amande au début de la digestion intestinale avant l'injection de la PTL (image visible T_0 , 40X, image $283 \times 283 \mu\text{m}$), B) Oléosomes d'amande au début de la digestion intestinale avant l'injection de la lipase PTL (image de fluorescence 327-335 nm T_0 min, 40X, image $283 \times 283 \mu\text{m}$) C) Evolution des oléosomes d'amande pendant la phase intestinale (1 image toutes les 5 minutes, image visible, recadrage de l'image $106 \times 67 \mu\text{m}$, emplacement du recadrage sur l'image A), D) Évolution des oléosomes d'amande pendant la phase intestinale (1 image toutes les 5 minutes, fluorescence 327-335 nm, image $106 \times 67 \mu\text{m}$, emplacement de l'image B).

Principaux résultats de l'étude



- Les mini-digesteurs microfluidiques et le montage DISCO permettent d'imager sans sondes externes l'action de différentes lipases sur les OB d'amandes. Les taux de lipolyse et les sites d'adsorption des enzymes ont été identifiés grâce à la visualisation de l'évolution de taille des particules et de la fluorescence intrinsèque des résidus tryptophanes.
- La rDGL s'adsorbe de façon localisée et hétérogène à la surface des objets microniques, et ne montre pas d'activité lipolytique.
- L'adsorption de la PPL est moins marquée, mais son action lipolytique rapide est clairement mise en évidence par une diminution de la taille de gouttelettes, jusqu'à leur disparition.

CHAPITRE 5

COMPORTEMENT D'ADSORPTION ET

DÉGRADATION ENZYMATIQUE DES

LIPASES INTESTINALES SUR LES

SYSTÈMES VÉGÉTAUX

Table des matières du chapitre 5

I – Dégradation enzymatique des substrats lipidiques modèles et extraits des matrices naturelles par la gPLRP2	243
Article de recherche – Kergomard et al., 2022, Biochimie, under review	243
Principaux résultats de l'étude	271
II – Dégradation enzymatique des substrats lipidiques modèles et naturels par la sPLA2-IB.	272
II.1 – Comportement d'adsorption et activité enzymatique de différentes PLA2 au niveau d'une monocouche modèle hétérogène GL/DPPC/pS en fonction de la pression de surface initiale du film interfacial	272
II.1.1 – Absence d'activité enzymatique de la sPLA2-IB à une pression de surface initiale de $\pi=20$ mN/m au niveau du film modèle hétérogène GL/DPPC/pS	274
II.1.2 – Pénétration de la PLA2 extraite de venin de cobra (PLA2-NMM-CM III) à une pression de surface initiale de $\pi=20$ mN/m au niveau de la monocouche hétérogène GL/DPPC/pS	275
II.1.3 – Adsorption et activité enzymatique de la sPLA2-IB à une pression de surface initiale de $\pi=10$ mN/m au niveau de la monocouche hétérogène GL/DPPC/pS	278
II.2 – Dégradation enzymatique des liposomes modèles de GL/DPPC/pS (1 μ m) par la sPLA2-IB en présence de sels biliaires	280
II.3 – Capacité d'adsorption et activité enzymatique de la sPLA2-IB au niveau des monocouches de lipides totaux extraits des fragments membranaires de <i>Chlorella vulgaris</i> Purasana	282
Principaux résultats de l'étude	284

CHAPITRE 5 - RÉSULTATS

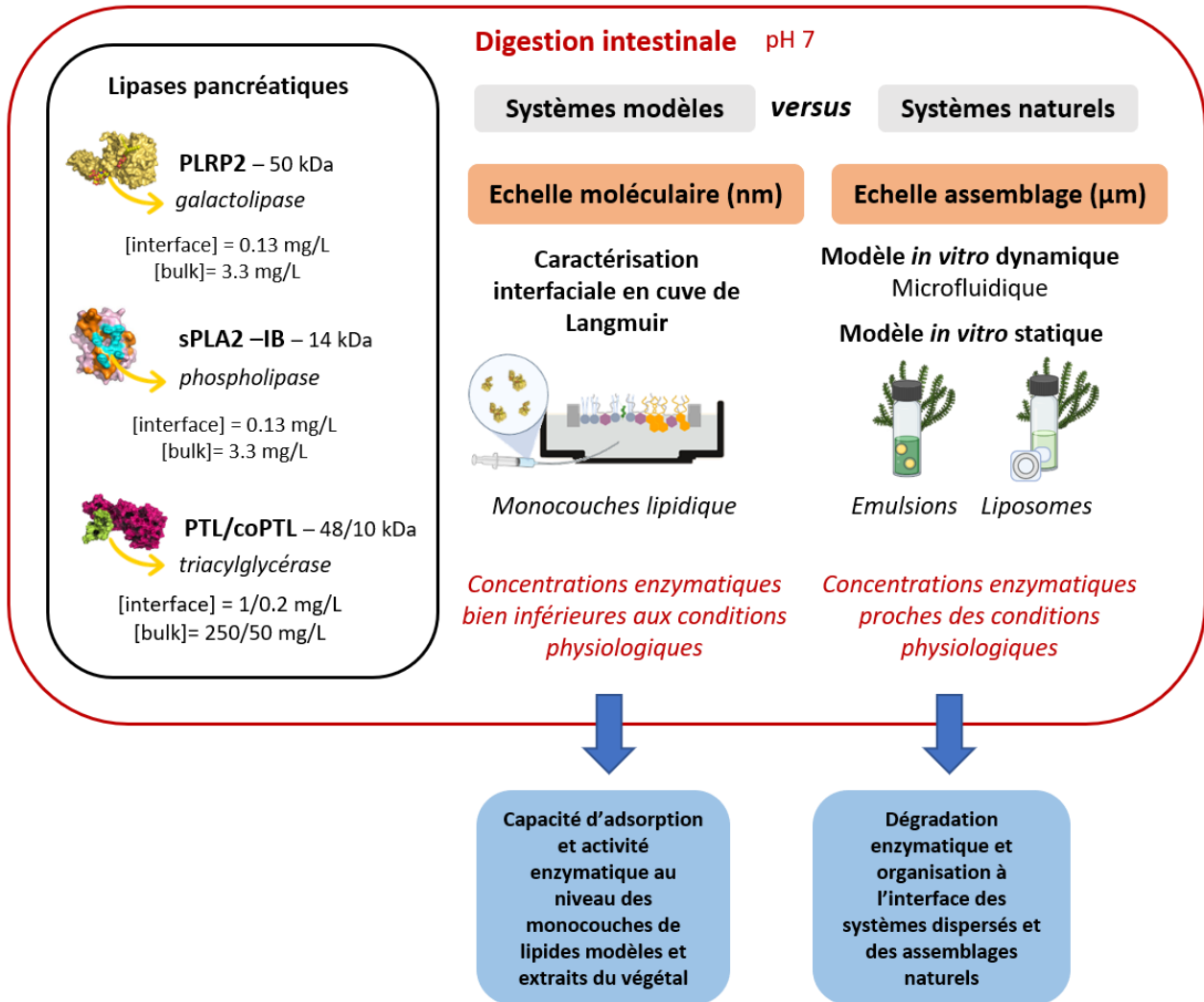


Figure 48 - Stratégie du chapitre 5.

CHAPITRE 5 - Comportement d'adsorption et dégradation enzymatique des lipases intestinales sur les systèmes végétaux

Ce chapitre est dédié à la compréhension des interactions entre les lipases pancréatiques humaines et les lipides végétaux, qu'ils soient organisés sous la forme de monocouches (échelle moléculaire), ou d'objets micrométriques dispersés en « bulk » (échelle assemblage). Une attention particulière a dans un premier temps été donnée à la compréhension des mécanismes d'action de la PLRP2 (modèle gPLRP2), responsable de la dégradation des galactolipides *in vivo* chez l'Homme. L'objectif de cette étude était de comprendre l'impact du packing local des systèmes lipidiques étudiés (état de condensation, présence de molécules chargées à l'interface), sur les capacités d'adsorption et de lipolyse de la PLRP2 au niveau de systèmes modèles biomimétiques et naturels, présentant des hétérogénéités chimiques conduisant à des hétérogénéités physiques. Ce travail a donné lieu à la rédaction d'un article de recherche, en cours de préparation.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à l'action de la sPLA2 (modèles sPLA2-IB), majoritairement responsable de la dégradation pancréatique des phospholipides *in vivo* chez l'Homme. Nous avons notamment étudié l'impact de la composition et de l'état de phase des systèmes lipidiques modèles et naturels, mais également de la pression de surface, sur les capacités d'insertion et l'activité phospholipase de l'enzyme. Comme pour la gPLRP2, ce travail doit être valorisé sous la forme d'un article de recherche.

Enfin, l'adsorption et l'activité enzymatique de la HPL et de son cofacteur (modèle PTL/coPTL) au niveau des monocouches de lipides modèles et extraits des matrices végétales ont également été étudiées mais n'ont pas été détaillées dans ce manuscrit. Les résultats obtenus pour cette enzyme pancréatique sont disponibles en **Annexes VIII-X**.

I – Dégradation enzymatique des substrats lipidiques modèles et extraits des matrices naturelles par la gPLRP2

Article de recherche – Kergomard et al., 2022, Biochimie, under review

Interfacial adsorption and lipolysis behavior of gPLRP2 onto heterogeneous model biomimetic and natural vegetal lipid membranes

Name(s) of Author(s) Jeanne Kergomard^{1,2}, Frédéric Carrière³, Lauriane Chonchon¹, Gilles Paboeuf¹, Nathalie Barouh^{4,5}, Claire Bourlieu² & Véronique Vié^{1*}

Author Affiliation(s) ¹IPR Institute of Physics, Rennes 1 University, France; ²INRAE/CIRAD/UM/Institut Agro Montpellier UMR 1208 IATE, France; ³Aix-Marseille Université, CNRS, UMR7281 Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Marseille, France ; ⁴CIRAD, UMR QUALISUD, F34398 Montpellier-France, ⁵Qualisud, Univ Montpellier, Avignon Université, CIRAD, Institut Agro, Université de La Réunion, Montpellier, France.

***Corresponding authors: Dr. Véronique Vié, Institut de Physique de Rennes, Campus de Beaulieu, UMR UR1 CNRS 6251, Université de Rennes 1, 35042 Rennes cedex, phone number: 33 (0)2 23 23 56 45 and E-mail address : veronique.vie@univ-rennes1.fr; Dr. C. Bourlieu-Lacanal, UMR 1208 IATE, 2 Place Pierre Viala, Bât. 31, INRAE/UM/Institut Agro Montpellier, F34060 MONTPELLIER CEDEX 1, France, phone number: 33 (0)4 99 61 22 03 and E-mail address : claire.bourlieu-lacanal@inrae.fr**

ABSTRACT

Pancreatic lipase related-protein 2 (PLRP2) has been shown to be responsible for the effective hydrolysis of galactolipids, the main lipids composing plant photosynthetic membranes. Guinea pig pancreatic lipase related-protein 2 (gPLRP2) is a model enzyme close to its human analogue, and that has been extensively studied for its ability to hydrolyze a wide range of acylglycerol substrates, exhibiting remarkable galactolipase and phospholipase A1 activity. However, the extent of its enzymatic activity of this lipase depends greatly on the supramolecular structure of the substrates and the presence of surfactant molecules such as bile salts, which can greatly modulate the interfacial quality of lipid assemblies.

In this study, Langmuir model monolayers were used to reproduce homogeneous and heterogeneous model galactolipid and/or phospholipid and/or phytosterol systems, presenting uncharged or charged interfaces, in order to understand the adsorption mechanisms and enzymatic activity of gPLRP2 on simplified vegetal model membrane. In parallel, digestion kinetics were performed on 1 μm liposomes of the model systems by gPLRP2, under conditions closer to the human physiological ones, and in presence of bile salts (bulk conditions). The interfacial behavior of gPLRP2 was then studied at the level of natural plant lipid monolayers (*Chlorella* microalgae extracts), in order to verify the data obtained on model systems, and to understand the impact of the chemical and physical heterogeneity of natural photosynthetic plant membranes on the enzymatic activity of gPLRP2.

The results have shown that the enzymatic activity of gPLRP2 onto mixed monolayer of galactolipids and/or phospholipids and/or phytosterols, with an optimum activity obtained at 15 mN/m. These results were confirmed in bulk conditions on 1 μm liposomes, where gPLRP2 showed galactolipase but also phospholipase activity in the presence of bile salts. Interfacial studies

showed enhanced adsorption of gPLRP2 onto model and natural monolayers containing negatively charged lipids, but the compositional complexity in these systems induced a lag phase before the initiation of lipolysis, and a slowdown in enzymatic activity.

KEYWORDS: pancreatic lipase related-protein 2, heterogeneous monolayers, galactolipids, monolayer, liposomes

1 INTRODUCTION

Galactolipids are the main lipids found in the photosynthetic membrane of plants and algae, accounting for more than 70% wt. of the total membrane lipids (Dörmann, 2013; Douce et al., 1973; Gurevich et al., 1997). Due to the natural abundance of plants and algae on Earth, galactolipids represent the most important class of lipids and therefore the main source of fatty acids (80% versus 20% wt. for plant phospholipids and TAG), including some essential polyunsaturated fatty acids (PUFA) (Gounaris & Barber, 1983). The two main galactolipids composing the photosynthetic membranes of plants are the neutral monogalactosyldiacylglycerol (MGDG, 53% wt.) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG, 27% wt.). MGDG possess a unique small 1- β -galactose polar head bound at the *sn*-3 position to a diacylglycerol (Lee, 2000), whereas DGDG has a larger polar head with an additional α -galactose, linked to β -galactose (Mizusawa & Wada, 2012). Both galactolipids possess two esterified acyl chains of fatty acids at the *sn*-1 and *sn*-2 position of the glycerol backbone, whose nature depends mainly on the synthesis pathway of galactolipids (Glöckner, 2013; Sahaka et al., 2020). In addition to these two glycolipids, photosynthetic plant membranes contain smaller amounts of charged lipids, sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) and phosphatidylglycerol (PG), the proportions of which vary between photosynthetic plant species. In particular, the microalgae *Chlorella vulgaris* represent a good model for the study of photosynthetic membranes and are rich in photosynthetic

proteins, galactolipids, and pigments (Demarco et al., 2022). These photosynthetic organisms have been consumed in some parts of the world for centuries and their nutritional potential has been highlighted in many reports, explaining a growing interest in their use in new food applications (Torres-Tiji et al., 2020). However, their digestibility by gastrointestinal enzymes has not been extensively studied.

Galactolipids are naturally rich in essential α -linolenic acid (ALA, C18:3 ω 3), which is the basis of elongation and desaturation pathway leading to the production of longer chain ω 3 fatty acids, the eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5, ω 3) and the docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 ω 3) (Kergomard et al., 2021). In particular, these two long-chain PUFA play a crucial role in the homeostatic regulation of the human body by being the basis for the production of signaling oxygenated lipids involved in inflammation resolution processes in our body (Saini & Keum, 2018). Galactolipids also contain a significant amount of hexadecatrienoic acid (HTA, C16:3 ω 3), an unusual fatty acid found mainly in green plants and algae, whose nutritional benefits are still poorly understood although it has been presented as potential precursor of ALA in rodents (Cunnane et al., 1995).

The interesting nutritional profile of galactolipids makes them compounds of interest for the development of food products rich in ω 3 PUFA. Nevertheless, in order to exploit the nutritional properties of GL in potential food applications, it is necessary to determine their digestibility by humans. Human pancreatic juice and duodenal contents have been shown to exhibit galactolipase activity (Andersson et al., 1995). This activity was associated to the pancreatic lipase related-protein 2 (PLRP2), as well as, to a lesser extent, to the bile salt-simulated lipase/carboxyl ester hydrolase (BSSL/CEH) (Amara et al., 2013; Bakala N’Goma et al., 2012). PLRP2 shows enzymatic activity on lipid substrates with larger heads than other classical pancreatic lipases such

as HPL. Indeed, in addition to limited lipase activity (1250 versus 8500 U/mg for HPL on tributyrin), PLRP2 exhibits limited phospholipase A1 (74 U/mg on purified L- α -PC) and high galactolipase (~2800 U/mg on MGDG for instance) activities (Amara et al., 2009; De Caro et al., 2004; Sahaka et al., 2020; Wattanakul et al., 2019). This enzymatic activity on a wider range of substrates than HPL is explained by the unusual conformation of the lid controlling the access to the active site of hPLRP2. PLRP2 is also present in the digestive system of other species, and in particular in monogastric herbivores such as the guinea pig (gPLRP2), whose diet contains significant amounts of galactolipids. Although PLRP2 has been the subject of numerous studies, these have mainly focused on the identification and quantification of its galactolipase activity on synthetic (medium chain acyl GL) or natural substrates, but without giving strong attention to local physical state, whether it is the level of condensation, or the presence of charged molecules. In our study, we propose to investigate the adsorption mechanisms of gPLRP2, whose structure is close to hPLRP2, on plant model monolayers presenting homogeneous or heterogeneous physical states at the air/water interface and on 1 μ m liposomes in “bulk” conditions close to the human physiological ones.

Even if PLRP2 is able to accommodate various substrates *in vitro*, its specificity is modulated by the microstructure of the substrates and the presence of surfactant molecules such as bile salts, that affect the conformation of the molecular lid controlling the access of its active site (Eydoux et al., 2008; Van Tilbeurgh et al., 1992). More precisely, galactolipid degradation by PLRP2, as for the other apolar lipid substrates, depends on their initial structure and assembly, as well as on the modifications that the interface undergoes in the different compartments of the gastrointestinal tract (Infantes-Garcia et al., 2022). Indeed, the hydrolysis of lipid substrates by lipolytic enzymes, including gPLRP2, generates digestion products, some of which are poorly

soluble in water and will therefore remain at the interface. The accumulation of these products can induce changes in the physico-chemical properties of the interfaces, which can lead to an inhibition of the enzymatic activity and cause a progressive decrease in the rate of hydrolysis by hindering the subsequent access to the substrate, characterized by a lag period (Callisen & Talmon, 1998; Wieloch et al., 1982).

The mechanisms involved in the digestion of galactolipid-based emulsified systems are therefore of critical importance for the subsequent intestinal absorption of polyunsaturated fatty acids. Here we studied the organizational properties and enzymatic activity of gPLRP2 on different galactolipid substrates, controlling finely the physical state, *i.e.* on systems with or without phase heterogeneities. The adsorption and enzymatic hydrolysis capacity of gPLRP2 were first tested on homogenous and heterogenous galactolipids (GL), phospholipids and phytosterols (GL/DPPC/pS), as well as on biomimetic systems (MGDG/DGDG/SQDG/PG), respectively, in interfacial conditions, in order to gain a mechanistic understanding of the digestion mechanisms at the molecular level (nm). These three lipid mixtures were then formulated into liposomes and incubated in the presence of gPLRP2 and bile salts to determine the degradation capacity of the enzyme at the level of dispersed object (μm) and verify its galactolipase and/or phospholipase A1 capacities. Eventually, these experiments were then reproduced using lipid systems extracted from natural photosynthetic membranes of microalgae *Chlorella vulgaris*, showing chemical and physical phase heterogeneities.

2 EXPERIMENTAL SECTION

Chloroform, methanol, sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG), and phosphatidylglycerol (PG) were purchased from Sigma Aldrich Ltd. (St. Louis, MO). 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) and digalactosyldiacylglycerol (DGDG) were

purchased from Avanti Polar Lipids. Canola phytosterols, composed of a mixture of β -sitosterol (50 mol%), campesterol (40 mol%) and brassicasterol (10 mol%), were kindly donated by Cognis France (Estarac, France). Phytosterols were collected from desodorization distillates of canola oil. If not stated otherwise, all biophysical characterizations were conducted at least in triplicate.

2.1 Preparation of lipid mixtures

Binary mixture of natural long chains MGDG and DGDG (60:40, mol/mol) was prepared, namely GL. Heterogeneous mixture of galactolipids, DPPC and phytosterols, namely GL/DPPC/pS (45:45:10, mol/mol/mol), respectively was also prepared to simplify the composition of natural vegetal membrane and provide a pronounced phase coexistence. A biomimetic model system was also prepared, reproducing more accurately the composition of plant photosynthetic membranes, by addition of charges polar lipids, sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG, predominant species C18:3/C16:0) and phosphatidylglycerol (PG), and hereafter called MGDG/DGDG/SQDG/PG (56:24:10:10, mol/mol/mol/mol). Relative compositions of the model systems and fatty acid repartitions of MGDG and DGDG used in this study are given in table S1 and figure S2, respectively. Finally, a last system was prepared by extraction of total lipids from a commercial preparation of dried *Chlorella vulgaris* (Purasana, France). Total lipids were extracted from the dehydrated algal biomass by the Folch method (Folch, 1957). 5 mL of ultrapure water (UP), 40 mL of Folch solution (CHCl₃/MeOH, 2/1 v/v) were added to the powdered algal matrix. The solution was mixed using an ultra-turrax (IKA, T18 digital) for 1 minute at 9500 to 13500 rpm. In a separating funnel, the solution was washed once with a 0.73% NaCl solution, then twice with a solution containing 40 mL of Folch solution and 10 mL of a 0.58% NaCl solution. The lower phase was collected between each wash and the solvents were evaporated under reduced atmosphere. The

total lipid and fatty acid compositions of the microalgae *Chlorella vulgaris* Purasana are available in figure S3.

2.2 Enzyme purification and preparation of aliquots

Recombinant guinea pig pancreatic lipase-related protein 2 (gPLRP2) was provided by F. Carrière from the department of Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, Aix-Marseille University, France. Lipase was produced in *Aspergillus oryzae* and purified as describe in Hjorth et al. (1993). For the interfacial measurements, a gPLRP2 stock solution (0.15 mg/mL) was prepared in a Tris HCl buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7) and aliquots were prepared in the same buffer before used in experiments at a final concentration of 0.128 mg/L (2.7 nM). This value is closed to the physiological one divided by 100, corresponding to the usual value used in interfacial studied to avoid saturating the interface with digestive proteins. Deactivated gPLRP2 variant S125G was used to control the enzymatic activity of the active variant and was produced as described by Mateos-Diaz et al. (2018). For digestion experiments in static conditions, 100 μ L aliquots were prepared at a final concentration of 3.3 mg/L.

2.3 Ellipsometry and surface pressure measurements at the air/water interface

Kinetic measurements were performed over 2 hours using a computer controlled and user-programmable LB Teflon Langmuir trough (KSV Nima, Helsinki, Finland) with a surface area of 35 cm² controlled by two mobile barriers. The Teflon trough have been carefully cleaned with UP water and ethanol before each experiment, and ellipsometric and tensiometric measurements were performed during half an hour on pH 7 buffer to check the cleaned surface.

The surface pressure (π) was measured every 4s with a precision of ± 0.2 mN/m using a filter paper connected to a microelectronic feedback system (Nima Technology, UK), according to the

Wilhelmy-plate method. The ellipsometric angle (Δ) was recorded simultaneously every 4 s with a precision of $\pm 0.5^\circ$, using a home-made automated ellipsometer in a “null ellipsometer” configuration (Berge & Renault, 1993; Bourlieu et al., 2020). The laser beam probed a surface of 1 mm^2 and a depth in the order of $1 \text{ }\mu\text{m}$ and provided insight on the thickness of the interfacial film formed at the interface.

2.4 Monitoring of the gPLRP2 adsorption onto mixed galactolipid monolayers at the air/water interface

The four monolayers studied were formed by spreading a few microliters of 1 mM solution of lipids in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1, v/v) over the surface of the buffer solution until an initial pressure of $20 \pm 1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (Bénarouche et al., 2013).

After stabilization of the film over 5 minutes, $14.6 \text{ }\mu\text{L}$ of gPLRP2 solution (0.15 mg/mL) diluted in $30 \text{ }\mu\text{L}$ Tris buffer were injected in the sub-phase to achieve a final concentration of 2.7 nM . The evolution of the surface pressure and ellipsometric angle due to the enzyme adsorption and lipolytic activity onto the lipid monolayer was continuously monitored over 45 minutes to 2 hours, depending on the lipolysis rate and before achieving the surface pressure of 6 mN/m , being the surface pressure of the gel-fluid phase transition of DPPC (Xu & Zuo, 2018).

2.5 Visualization of lipase distribution in heterogeneous film by atomic force microscopy

For AFM imaging, interfacial films were transferred onto a freshly-cleaved mica plate using the Langmuir-Blodgett method at the end of the kinetic, at a constant surface pressure and at a very low speed ($0.5 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$). For each monolayer, two samplings were performed at different times, in order to observe the organization of the interface at different stages of lipolysis. For the GL monolayer, sampling was performed at 35 minutes and 1 hour, respectively. For the GL/DPPC

monolayer, sampling was carried out at 45 minutes and 1 hour and 15 minutes of lipolysis, respectively. For the GL/DPPC/pS monolayer, sampling was done at 45 minutes and 1 hour 45 minutes of lipolysis, respectively. Imaging was carried out with an AFM (Multimode Nanoscope 8, Bruker, France) in contact mode QNM in air (20°C), using a standard silicon cantilevers (0.06 N/m, SNL-10, Bruker, France), and at a scan rate of 1 Hz. The force was minimized during all scans and the scanner size was 100×100 μm². The processed images analyzed by the open-source platform Gwyddion were representative of at least duplicated experiments.

2.6 Static digestion of 1 μm mixed GL and GL₄₅/DPPS₄₅/pS₁₀ liposomes by gPLRP2

1 μm liposomes of i) GL, ii) GL/DPPC/pS, and iii) MGDG/DGDG/SQDG/PG model solutions, respectively, were prepared at a final concentration of 0.4% wt. in Tris HCl buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7).

Liposomes were then incubated under constant agitation in Tris HCl buffer (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7) containing gPLRP2 at 3.3 mg/L in presence of 4 mM NaTDC (above CMC value). 100 μL aliquots were sampled at T₀ (control) and after 5 min of gPLRP2 digestion (T_{5min}) and substrates and lipolysis products were extracted by Folch method before deposited in thin layer chromatography (TLC) to determine their concentrations. The organic and aqueous phases resulting from the extraction were separated and eluted on TLC plates using a mixture of chloroform/methanol/water (95:20:2.5, v/v/v). The TLC plate revelation was made using an orthophosphoric acid/copper sulphate solution. It was thus possible to monitor the enzymatic activity of gPLRP2 on 1 μm liposomes of both galactolipid mixtures in presence of bile salt-related detergent.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Interfacial behavior of model lipid monolayers versus total lipid monolayer extracted from *Chlorella vulgaris*

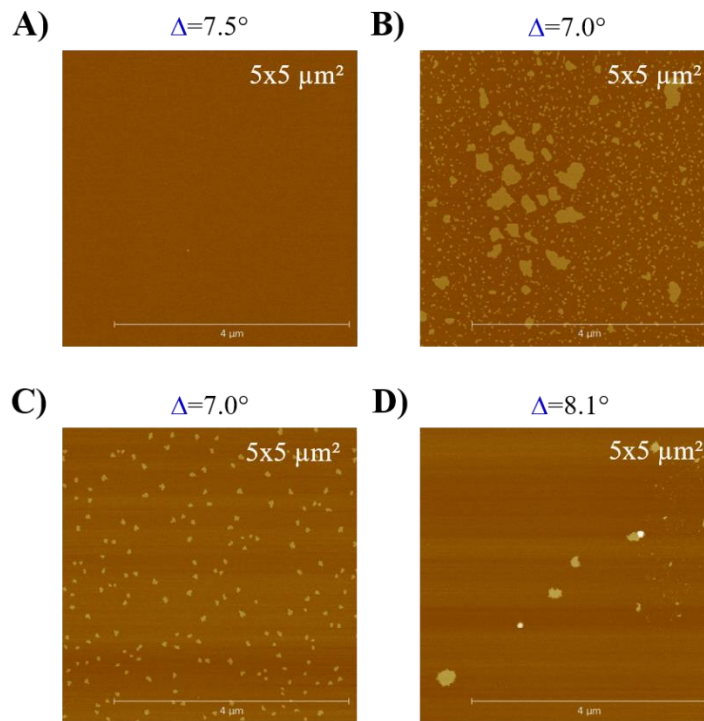


Figure 1 - $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ AFM images of A) GL, B) GL/DPPC/pS, C) MGDG/DGDG/SQDG/PG, and D) total lipid extracted from *Chlorella vulgaris* Purasana monolayer at 20 mN/m.

Lipid-lipid interactions and molecular organization at the air/water interface of the monolayers studied have been investigated at 20 mN/m and pH 7 and are presented figure 1. We were able to form stable galactolipid based-monolayers at the air/water interface. The GL interface was characterized by a fluid phase, presenting some roughness due to the intercalation of the polar heads of MGDG and DGDG. The GL/DPPC/pS system showed a coexistence of condensed liquid/expanded liquid phases, with the presence of condensed phase domains visible on the AFM images, enriched in DPPC-MGDG and pS. Additionally, the presence of pS in condensed domains

have induced the appearance of defects, that could modulate the subsequent adsorption of lipolytic enzymes (Kergomard et al., 2022). For the MGDG/DGDG/SQDG/PG biomimetic monolayer, small flower-shape nanodomains of 1.6 ± 0.1 nm height were evidenced at the air/water interface, coexisting with a fluid phase. The morphology of the LC domains was close to the ones obtained at the interface of the *Chlorella vulgaris* total lipid monolayer, which was not surprising given the close chemical heterogeneity of both systems. In the case of the *Chlorella vulgaris* lipid interface, however, the LC domains were characterized by two different heights, with the presence of a central domain of 2.2 ± 0.1 in height, surrounded by a lower crown with irregular edges of 1.5 ± 0.1 nm in height. Small condensed domains with heights between 5 and 6 nm were also visible, very likely due to the presence of TAG in the sample.

3.2. Interfacial adsorption and enzymatic activity of gPLRP2 onto homogenous galactolipid monolayer

The interfacial adsorption and enzymatic activity of gPLRP2 onto homogeneous galactolipid monolayer (GL) was monitored using tensiometry coupled with ellipsometric measurements. Figure 2.A shows the evolution of surface pressure and ellipsometric angle over one hour after the injection of gPLRP2 at 0.128 mg/L in the subphase. Right after the injection of the enzyme below the GL monolayer, the surface pressure started to decrease drastically, indicating the modifications of the interactions between molecules at the interface and the probable lipolysis of the acyl chains of galactolipids by gPLRP2. When considering the maximal slope of this decreasing curve, the range surface pressure of 15 to 10 mN/m was identified as the one where the enzymatic activity of gPLRP2 was the highest. This latter result was in line with previous studies, in which the maximum level of activity of gPLRP2 and hPLRP2 was reported between 10 and 15 mN/m onto medium chain MGDG monolayer (De Caro et al., 2004; Eydoux et al., 2007).

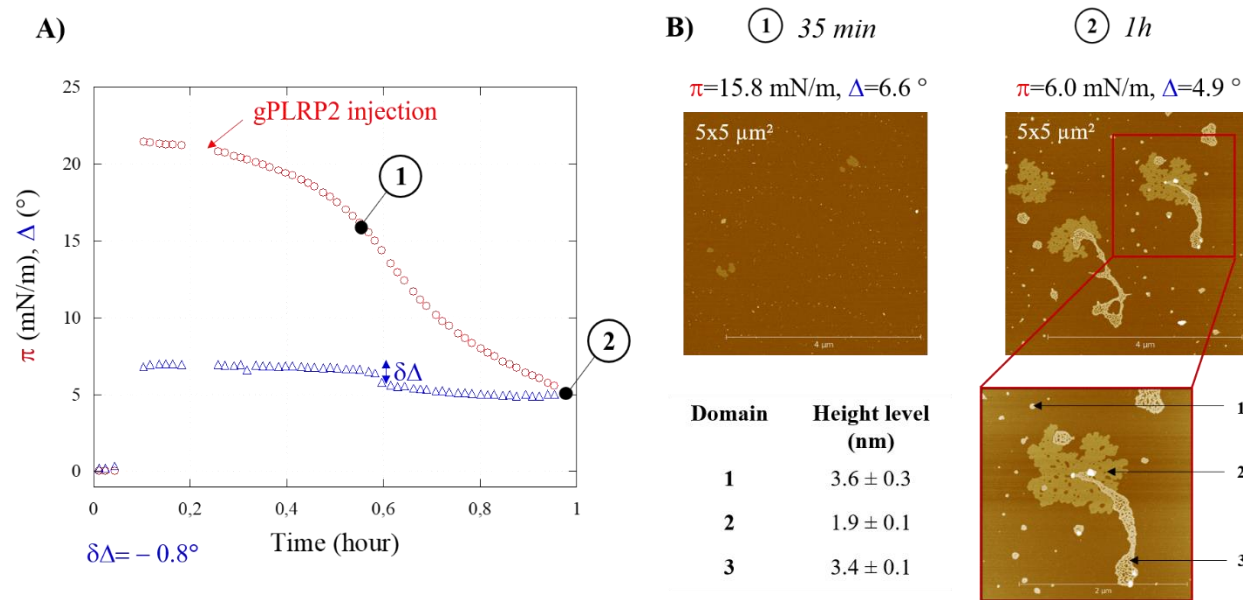


Figure 2 - A) Kinetic evolution of surface pressure (π , mN/m, red circles) and ellipsometric angle (Δ , $^{\circ}$, blue triangle) upon the adsorption and kinetic activity of gPLRP2 (0.128 mg/L) onto GL monolayer. B) AFM images of Langmuir-Blodgett samples after 1) 35 minutes and 2) 1 hour kinetic of gPLRP2 adsorption onto GL monolayer, respectively.

The evolution of the surface pressure was consistent with a localization of most of the gPLRP2 molecules right below the surface and not directly adsorbed at the interface onto the monolayer, or an adsorption counterbalanced by lipolysis product generation, giving the fact that the surface pressure did not show a significant increase, contrary to what has been observed with other lipases on heterogeneous monolayers (Bourlieu et al., 2016). This assumption was consistent with the evolution of the ellipsometric angle, as no evolution was observed during the first 35 minutes of kinetic after the lipase injection in the subphase. Nevertheless, after 35 minutes of kinetic, the ellipsometric angle showed a sharp drop of $\Delta\delta=0.8$ at $\pi=15$ mN/m, probably related to the high activity of the enzyme at this surface pressure and the subsequent lipolysis of an important concentration of GL substrates by gPLRP2.

In order to understand the partitioning of the enzyme and the disorganization of the interface induced by the enzymatic activity, two Langmuir-Blodgett sampling of the interface were realized; before and after the drop of the ellipsometric angle. The $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ AFM images of the two samples, after 35 minutes and 1 hour kinetic, respectively, are presented figure 2.B. After 35 minutes of enzymatic kinetic, small flower-like gel phase domains of 1.9 ± 0.1 nm height appeared at the air/water interface, presumably attributed to the generation of digestion products by degradation of MGDG and DGDG by gPLRP2, in accordance to the subsequent decrease of the surface pressure. Protuberances of 3.6 ± 0.3 nm height were also visible, likely to be attributed to some lipase molecules adsorbed at the air/water interface without losing their enzymatic activity, gPLRP2 being resistant to surface denaturation (Aloulou et al., 2006). After 1 hour kinetic, the resulting interface had evolved further. Surprisingly, gPLRP2 seems to have formed protein network of 3.4 ± 0.1 nm in height, in addition to the protuberances observed on the 35 minutes images, despite the absence of increase in the surface pressure. Additionally, gel phase domains have grown, reinforcing the hypothesis of their attribution to the generation of lipolysis products. gPLRP2 is known to stereoselectively hydrolyze the *sn*-1 position of galactolipids, generating monogalactosylmonoacylglycerol (MGMG) and digalactosylmonoacylglycerol (DGMG) in the case of MGDG and DGDG, respectively, as well as free fatty acids (FFA) (Amara et al., 2010; Withers-Martinez et al., 1996). Due to their polyunsaturated content, it is likely that MGMG and DGMG molecules remained in the fluid phase at the air/water interface and that the gel phase domains were probably enriched in saturated fatty acids, the palmitic acid being in the *sn*-1 position of DGDG and thus being hydrolyzed by PLRP2. The hydrolysis of MGMG and DGMG by gPLRP2 could also have led to the production of galactosylated products: monogalactosylglycerol (MGG) and digalactosylglycerol (DGG), respectively, which, due to their polar structure, were likely to partition into the solution (Sahaka et al., 2021). Thus, the optimal activity observed at 15 mN/m in

the gPLRP2 activity could correspond to the optimal pressure at which MGMG and DGMG could be hydrolyzed by gPLRP2, leading to the production of MGG and DGG, and explaining the drop in the ellipsometric angle corresponding to a loss of matter at the interface.

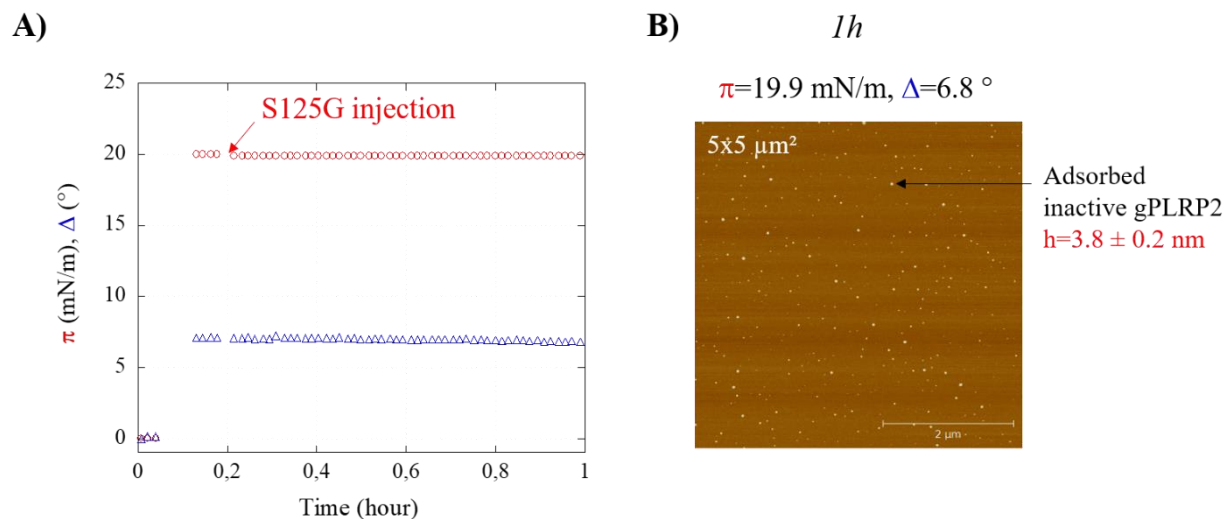


Figure 3 - Kinetic evolution of the surface pressure (π , mN/m, red circle) and the ellipsometric angle (Δ , °, blue triangle) over one hour after the injection of the inactive variant of gPLRP2 in the subphase of the GL monolayer. B) 5x5 μm^2 images of the Langmuir-Blodgett sample obtained after 1 hour kinetic.

To verify that the evolution of the surface pressure and the ellipsometric angle was consistent to the galactolipase activity of gPLRP2, and not only to the interactions with the lipid monolayer, the experiment was reproduced using an inactive variant (S125G), where the catalytic serine S152 was replaced by a glycine, resulting in the loss of the enzymatic activity. The S125G variant of gPLRP2 was characterized using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the study of Mateos-Diaz et al. (2018), showing that the inactive variant retained his correct folding and its lipid-binding site compared to active gPLRP2, so that its interfacial behavior should not be affected.

Figure 3.A. presents the kinetic evolution of the surface pressure and ellipsometric angle over 1 hour after the injection of the inactive variant of gPLRP2 into the subphase of the GL monolayer.

After the S125G gPLRP2 injection in the subphase, there was no evolution in the surface pressure, nor in the ellipsometric angle, confirming the absence of enzymatic activity. AFM image showed figure 3.B indicated the presence of the same protuberances observed with the active enzyme, with similar height of 3.8 ± 0.2 nm. It thus seems that, despite the lack of surface pressure increase, the enzyme has adsorbed at the air/water interface.

3.3. Modulation of the gPLRP2 adsorption and kinetic activity onto heterogeneous model monolayer of galactolipids, phospholipids and phytosterols (GL/DPPC/pS)

Figure 4.A shows the kinetic evolution of the surface pressure and ellipsometric angle upon the adsorption and enzymatic activity of gPLRP2 onto GL/DPPC/pS monolayer. The surface pressure showed a similar evolution than for the GL monolayer, with a decrease right after the injection of the enzyme in the subphase of the GL/DPPC/pS monolayer. However, the decrease in surface pressure was less pronounced at the beginning of the kinetic in the case of the heterogeneous monolayer, reflecting the slowing down of the lipolysis rate. A lag phase was indeed observed before reaching the maximum activity of gPLRP2 at 15 mN/m, with a concomitant decrease in the ellipsometric angle ($\delta\Delta=0.9^\circ$) probably corresponding to the loss of matter at the interface due to the generation of MGG and DGG. This lag phase could be explained by a greater difficulty for gPLRP2 to reach the acyl chains of galactolipids, due to the higher packing of the heterogeneous monolayer induced by DPPC. The previous characterization study of homogeneous and heterogeneous GL monolayers has indeed shown that the addition of DPPC into the monolayer led to the formation of gel phase domains enriched in DPPC and MGDG, reducing the lateral distance between the acyl chains available for gPLRP2 to insert (Kergomard et al., 2022). This higher packing could thus explain the lag phase observed before the gPLRP2 could reach its optimal activity, a high packing density at the air/water interface having been proposed to explain the long

induction times observed for other lipases onto tightly packed short-chained phospholipids (Verger et al., 1973) and diacylglycerols (Wieloch et al., 1982) monolayers. In the case of GL/DPPC/pS monolayer, the initiation of lipolysis on the substrate allows the formation of lipolysis products and the subsequent decrease in surface pressure, thus decreasing the packing of the monolayer and facilitating the access of gPLRP2.

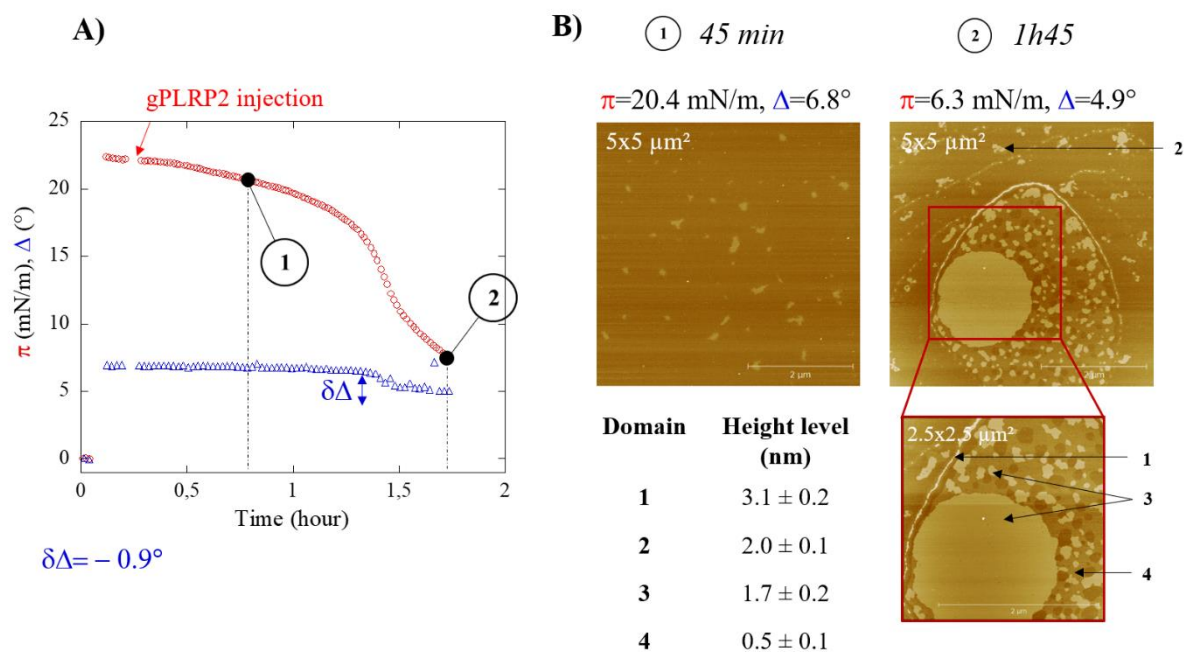


Figure 4 - A) Kinetic evolution of surface pressure (π , mN/m, red circles) and ellipsometric angle (Δ , °, blue triangle) upon the adsorption and kinetic activity of gPLRP2 (0.128 mg/L) onto GL/DPPC/pS monolayer. B) AFM images of Langmuir-Blodgett samples after 1) 45 minutes and 2) 1h45 kinetic of gPLRP2 adsorption onto GL/DPPC/pS monolayer, respectively.

Two Langmuir-Blodgett samples were taken after 45 minutes and 1h45 of kinetics, respectively, and AFM images of the interfacial organization are available figure 4.B. After 45 minutes kinetic, condensed domains of 1.5 ± 0.2 nm in height were visible at the air/water interface. Given the small drop in surface pressure observed at 45 min, these domains are probably not related to the

generation of digestion products. Furthermore, the interfacial organization and heights observed are similar to those obtained at T_0 before the injection of gPLRP2 into the subphase (Figure 1.B), supporting the hypothesis that lipolysis is probably not yet initiated at this stage of the kinetics. At 1h45 minutes of kinetics, AFM images of the film interface revealed a very different interfacial organization at $\pi=6.3$ mN/m, consistent with the associated surface pressure and ellipsometric angle drops. Thin and discontinuous lines of $h_1=3.1 \pm 0.2$ nm in height were visible in the fluid phase and around the condensed domains, probably attributed to the presence of gPLRP2 molecules adsorbed at the monolayer interface. Condensed domains of three different heights were also identified. First, small flower-like shape condensed domains were visible in the fluid phase, with a height h_2 of 2.0 ± 0.1 nm, probably attributed to the generation of lipolysis product MGMG and DGMG, as observed for the GL monolayer. Fragmented gel phase domains were also revealed, composed of at least three different height levels (h_3 , h_4 , fluid bottom). This observed fragmentation could be due to the disorganization caused by the adsorption and enzymatic activity of gPLRP2, but also to the low-pressure value ($\pi=6.3$ mN/m), causing phase segregation within the gel phase domains thought to be enriched in DPPC-MGDG-pS. The lateral pressure was indeed probably no longer sufficient to ensure the miscibility of DPPC and pS with MGDG, causing phase segregation which explains the observed height differences.

These observations nevertheless confirm the miscibility of these three compounds and the phase heterogeneity in the gel phase domains at 20 mN/m, as well as the condensation effect of DPPC and pS on MGDG chains observed in our previous study (Kergomard et al., 2022). Given the molar composition of the GL/DPPC/pS monolayer, the central rounded domain ($h_3=1.7 \pm 0.2$) observed at 1h45 of kinetic could be attributed to the presence of condensed DPPC. The smaller domains of h_3 and h_4 heights, coexisting with the fluid phase, could be attributed to the presence of FFA and

pS, coexisting with MGDG and MGMG in the fluid phase, but probably not to lyso-phosphatidylcholine (lyso-PC). In the range of surface pressure considered, it is indeed unlikely that gPLRP2 shows significant enzymatic activity on DPPC, since monolayer studies have shown that gPLRP2 was only active on this substrate at low surface pressure ($\pi < 5$ mN/m) and was totally inactive at $\pi > 10$ mN/m (Hjorth et al., 1993). However, it remains difficult to attribute each type of domain to a species of molecule, given the complex interactions and differences in miscibility observed in this type of ternary mixture. Surface composition studies will be needed to answer these questions, but the small quantities used for interfacial characterizations do not facilitate these analyses.

3.4. Influence of the presence of charged lipids on the adsorption capacity and enzymatic activity of gPLRP2 in biomimetic and natural lipid monolayers

The impact of a charged interface on the adsorption capacities and enzymatic activity of gPLRP2 was studied using MGDG/DGDG/SQDG/PG and total lipid monolayers extracted from *Chlorella vulgaris*, presenting chemical heterogeneities representative of photosynthetic plant membranes. The evolution of surface pressure and ellipsometric angle upon the adsorption of gPLRP2 at the air/water interface onto both monolayers are presented figure 5.A and 5.B, respectively. In the case of the MGDG/DGDG/SQDG/PG monolayer, a continuous decrease of the surface pressure was observed right after the injection of gPLRP2 in the sub-phase until it reached a value of $\pi = 8.5$ mN/m after 1h of kinetic. In contrast to the GL/DPPC/pS complex system, no lag phase was observed before the onset of lipolysis, and the decrease was continuous, revealing a constant enzymatic activity of gPLRP2 over the 1h kinetic. This observation could be explained by the presence of negatively charged lipids at the interface (SQDG, PG), which could facilitate the adsorption of gPLRP2 underneath the monolayer, and the subsequent degradation of galactolipids.

CHAPITRE 5

The facilitated adsorption onto a charged surface was previously observed for recombinant dog gastric lipase (rDGL) at the level of heterogeneous monolayers of polar dairy lipids, with the establishment of electrostatic interactions between the interface and the interfacial recognition site facilitating the orientation and approach of the active site onto the lipid substrates (Bourlieu et al., 2016). In our case however the surface potential electrostatic distribution of charge is very different between rDGL and gPLRP2, but seems to result in favorable interactions with negatively charged lipid interface. The ellipsometric angle did not significantly evolved during the first 30 minutes of the kinetics. After this, it decreased again ($\delta\Delta=-0.7^\circ$) at $\pi=15$ mN/m, in the range of the optimal surface pressure for the activity of gPLRP2, as previously observed on GL and GL/DPPC/pS monolayers. The ellipsometric angle then slowly decreased until it reached a value of $\Delta=5.2^\circ$ after 1h kinetic, reflecting a decrease in the thickness of the monolayer due to the degradation of galactolipids and the progressive release of polar lipolysis products into the subphase.

The evolution of the surface pressure and ellipsometric angle was followed during 2h kinetic upon the adsorption of gPLRP2 onto the total lipid of *Chlorella vulgaris* monolayer (figure 5.B). A continuous decrease (slope=-9.7) of the surface pressure was observed during the first one hour of kinetic, until a value of $\pi=13.2$ mN/m was reached. A change in slope was then observed (slope=-3.8), marking a slowdown in the lipolytic activity until a value of $\pi=9.4$ mN/m was reached. This behavior reflects the facilitated adsorption of the enzyme by the presence of charged lipids at the interface, but also the slowing down of lipolysis induced by the marked chemical heterogeneity of the monolayer, explaining the slower decrease of the surface pressure compared to the MGDG/DGDG/SQDG/PG (2h *versus* 1h, respectively, before a surface pressure of ~ 9 mN/m was reached).

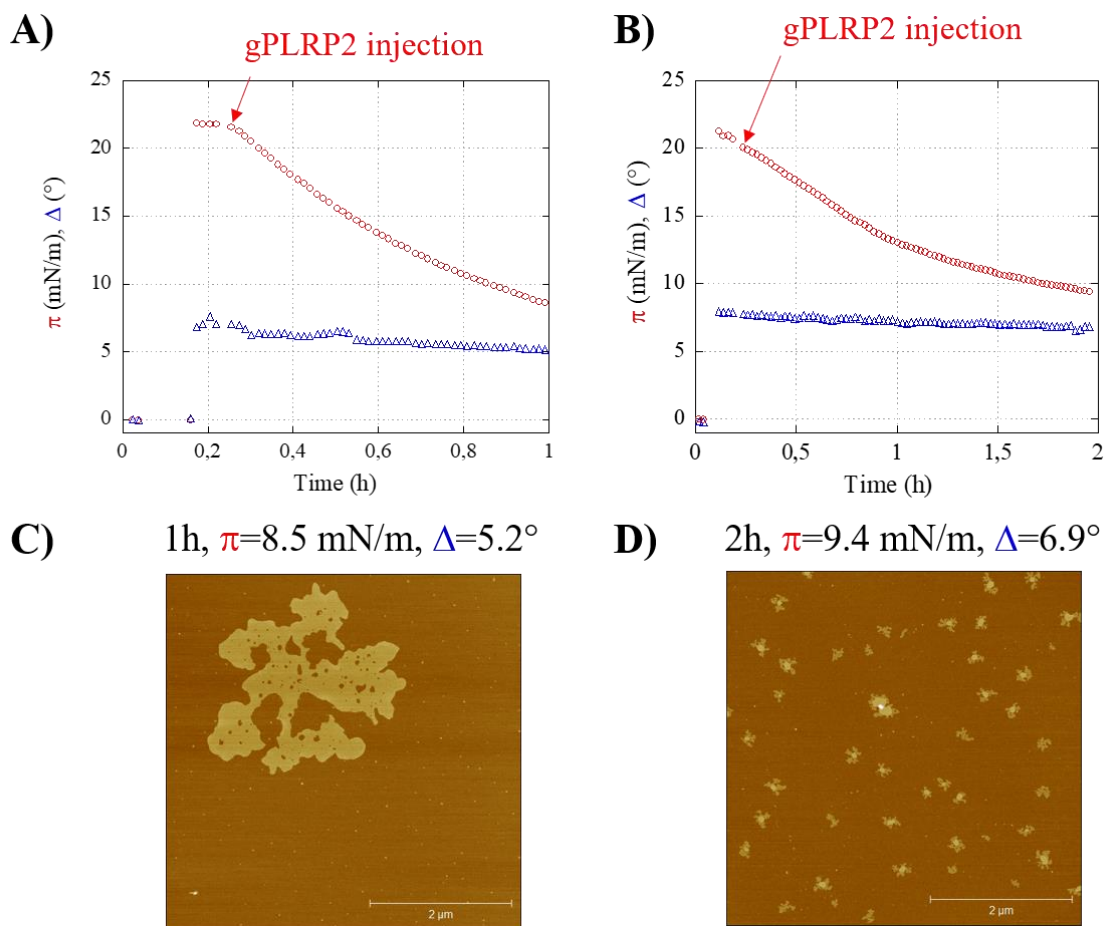


Figure 5 - Evolution of the surface pressure (π , red, mN/m) and the ellipsometric angle (Δ , blue, $^\circ$) upon the adsorption of gPLRP2 onto A) MGDG/DGDG/SQDG/PG (1h kinetic), and B) total lipids extracted from *Chlorella vulgaris* Purasana monolayers (2h kinetic). AFM images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) of the interface of C) MGDG/DGDG/SQDG/PG (1h kinetic, $\pi=8.5$ mN/m, $\Delta=5.2^\circ$), and D) total lipids extracted from *Chlorella vulgaris* Purasana (2h kinetic, $\pi=9.4$ mN/m, $\Delta=6.9^\circ$) monolayers after the injection of gPLRP2 in the sub-phase.

Langmuir-Blodgett transfer of the interface was performed on the MGDG/DGDG/SQDG/PG and *Chlorella vulgaris* lipid monolayer after 1 and 2h kinetic, respectively. AFM image (figure 5.C.) of the MGDG/DGDG/SQDG/PG after 1h kinetic of incubation with gPLRP2 showed the coexistence of LC snowflake-shape domains of 2.2 ± 0.1 in height in the fluid phase. These domains shared a similar morphology with those obtained after 35 minutes of digestion of the GL

monolayer by gPLRP2, and can therefore be attributed to the generation of FFA digestion products by galactolipid degradation. As previously observed, small protuberances of 3.3 ± 0.3 nm in height were also observed, attributed to the adsorbed gPLRP2 molecules in the fluid phase. AFM image of the Langmuir-Blodgett film of *Chlorella vulgaris* lipid monolayer is presented figure 5.D. After 2h of kinetics, the morphology of the domains had evolved, showing a "snowflake" shape as previously observed in the model systems. Some domains could be the result of the generation of FFA by gPLRP2, leading to a reduction in line tension probably related to the increase in miscibility between the LC and LE phases. Again, as observed when studying the adsorption of gPLRP2 at the interface of the GL and GL/DPPC/pS model systems, small protrusions of 3.5 nm in height were visible, indicating the adsorption of at least some lipase molecules at the air/water interface, despite the low surfactant capacity of gPLRP2 and its propensity to locate just below the interface.

3.5. Bulk digestion of 1 μ m homogenous and heterogenous galactolipid-based liposomes by gPLRP2 in presence of bile salt

The galactolipase and phospholipase A1 activities of gPLRP2 were then assayed in "bulk conditions" onto dispersed liposomes in presence of bile salts and results are presented table 1. In a previous study regarding the digestion of galactolipid/bile salt emulsions by hPLRP2 and gPLRP2, Amara et al. (2010) reported that the rate of hydrolysis of long-chain GL was strongly dependent on the NaTDC/galactolipid ratio. With natural long-chain MGDG and DGDG, the optimal ratio NaTDC/substrates giving the optimum galactolipase activity of both gPLRP2 and hPLRP2 was obtained for a molar ratio of 1.33 and 0.5, respectively. In our study, the NaTDC/substrate molar ratios were 1.67 and 1.49 for 1 μ m GL and GL/DPPC/pS liposomes, respectively.

Table 1 – Quantitative determination of lipid classes composition obtained by TLC at T₀ and after 5 minutes (T_{5min}) digestion by gPLRP2 of 1 μm GL, GL/DPPC/pS, MGDG/DGDG/SQDG/PG liposomes. The reaction was performed at pH 7 in Tris HCl buffer containing 4 mM of NaTDC. Data are given in relative percentages of the total lipids.

Relative %	GL		GL/DPPC/pS		MGDG/DGDG/SQDG/PG	
	T ₀	T _{5min}	T ₀	T _{5min}	T ₀	T _{5min}
FFA	-	43.8 ± 7.5	-	37.9 ± 7.4	-	54.3 ± 2.4
MGDG	48.2 ± 0.3	4.9 ± 1.5	41.6 ± 4.7	13.6 ± 7.7	65.4 ± 1.0	10.6 ± 0.1
MGMG	-	18.8 ± 2.2	-	20.8 ± 3.1	-	31.3 ± 2.2
DGDG	51.8 ± 0.3	3.1 ± 0.8	37.8 ± 4.0	9.8 ± 4.7	34.6 ± 1.0	3.7 ± 0.1
DGMG	-	29.5 ± 3.5	-	<i>n.q.</i>	<i>n.q.</i>	<i>n.q.</i>
DPPC	-	-	11.0 ± 5.6	<i>n.q.</i>	-	-
Lyso-PC				0.6 ± 0.1	-	-
pS	-	-	9.6 ± 1.4	8.9 ± 1.6	-	-
SQDG	-	-	-	-	24.7 ± 0.4	2.3 ± 0.3

**n.q. – non-quantifiable*

After 5 minutes incubation of the GL liposomes with gPLRP2 in presence of bile salt, about 90% wt. of MGDG and 94% wt. of DGDG have been converted into their lipolysis products, MGMG, DGMG, respectively, and FFA. Given the differences in the substrate and lipolysis product concentrations, it is likely that MGMG and DGMG have been in turn converted by gPLRP2 into MGG and DGG, respectively, but these two compounds being water-soluble, they were not

extracted for the TLC analysis (Sahaka, 2020). This result confirmed the strong ability of gPLRP2 to exert galactolipase activity on galactolipid liposomes in the presence of bile salts in relevant concentrations. This is an important result, since the activity of gPLRP2 is highly dependent on the supramolecular structure of its substrate and the presence or absence of surfactant species such as bile salts (Eydoux et al., 2008; Van Tilbeurgh et al., 1992).

The galactolipase activity of gPLRP2 was again observed on 1 μm GL/DPPC/pS liposomes after 5 minutes incubation in presence of bile salt-related surfactant, but to a lesser extent than on GL liposomes. Around 67% wt. of MGDG and 74% wt. of DGDG were converted in MGDG, MGG, DGMG, DGG, respectively and FFA. Nevertheless, the quantification of DGMG after 5 minutes digestion was hampered, given the fact that its retention factor was similar to the DPPC ones on the TLC plate. The lower extent of galactolipase activity in this heterogenous system compared to the GL ones could be explained by the higher packing due to the presence of DPPC in the system, that could have hindered the access of gPLRP2 to the acyl chains of galactolipids. In addition to its galactolipase activity, the results also highlight the phospholipase activity of gPLRP2 on heterogeneous liposomes of galactolipids, phospholipids and phytosterols (GL/DPPC/pS) in presence of bile salts. Indeed, the presence of a small amount of lyso-PC was detected in the system after 5 minutes of digestion with gPLRP2. Even if the gPLRP2 is known to exert phospholipase A1 activity, this result supplements the study by Mateos-Diaz et al. (2018) which has shown that gPLRP2 was active on mixed bile salts/DPPC micelles, but did not possess enzymatic activity on DPPC liposomes in absence of bile salts, due to the high packing of the bilayer which prevents gPLRP2 penetration (Kergomard et al., 2022). In our case, the presence of galactolipids but especially phytosterols could have reduced the packing of the DPPC domains by creating heterogeneous zones in the gel phase, thus inducing a higher mobility of the DPPC bilayer chains,

allowing gPLRP2 to insert and exert its phospholipase A1 activity. In addition, our systems contained bile salts in the aqueous phase, which could have spaced out the neighboring DPPC molecules at the interface, thus disordering their tight packing and the interfacial organization (Chu et al., 2010).

This enzymatic activity of gPLRP2 was finally assessed on MGDG/DGDG/SQDG/PG 1 μm liposomes again in the presence of bile salts to determine its ability to exert a galactolipase activity on SQDG. As previously observed for GL and GL/DPPC/pS liposomes, gPLRP2 was able to lipolyze MGDG and DGDG, onto MGMG and DGMG, respectively. More interestingly, gPLRP2 was also able to hydrolyze 91% of the initial SQDG substrate (table 1), emphasizing its wide specificity of substrate.

3.6. Interfacial organization of GL and GL/DPPC/pS liposomes in presence of bile salts obtained at T_0 and after 5 min of gPLRP2 digestion

Lipids products obtained at T_0 and after 5 minutes incubation of 1 μm GL or GL/DPPC/pS liposomes in the presence of gPLRP2 and bile salts were extracted by Folch method and deposited at the air/water interface at $\pi=7.2 \pm 0.1$ mN/m. After stabilization of the respective T_0 and $T_{5\text{min}}$ films, Langmuir-Blodgett samples were observed in AFM. For both systems, the images obtained at T_0 and $T_{5\text{min}}$ are available in figure S4 and figure 6, respectively. For the GL system, AFM images obtained at T_0 revealed the presence of small condensed domains of $h_1=1.3 \pm 0.1$ nm height, that could be attributed to the presence of small non-micellized assemblies of NaTDC adsorbed at the air/water interface. At $T_{5\text{min}}$, flower-shape domains of $h_1=1.9 \pm 0.1$ nm in height were evidenced, similar to those obtained after 2h hour kinetic digestion of GL monolayer by gPLRP2 at the air/water interface. These domains were attributed to the generation of the FFA by lipolysis of MGDG and DGDG, in agreement with their detection by TLC (table 1). The remaining substrates

and digestion products MGMG and DGMG were assumed to be present in the fluid phase giving their unsaturated composition. The absence of the lines and protuberances observed in the interfacial characterization study (3.1) confirms the hypothesis of their attribution to gPLRP2 adsorbed at the air/water interface.

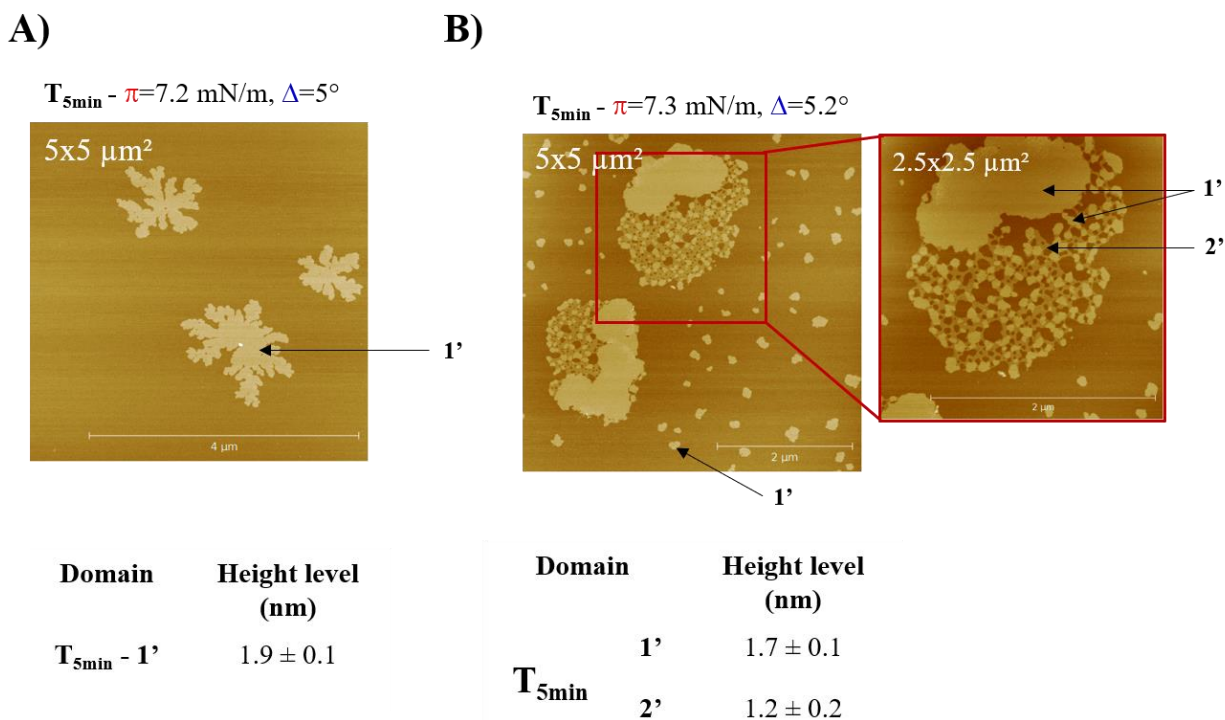


Figure 6 - AFM images ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) of substrates and lipolysis products obtained at T_{5min} and deposited at $7.2 \pm 0.1 \text{ mN/m}$ at the air/water interface of A) GL, B) GL/DPPC/pS monolayers. For each identified domain, the mean height level was given in the table and was obtained as an average over three sections of the image. Lipophilic substrates and products were extracted using Folch method.

For the GL/DPPC/pS system, the interface obtained at T_0 was clearly different from the one obtained for the GL/DPPC/pS monolayer at 20 mN/m during the interfacial study, but was surprisingly quite similar with the one obtained after two hours kinetic after gPLRP2 injection in the subphase, at a similar surface pressure ($\pi = 6.3 \text{ mN/m}$). Thus, the low surface pressure could explain the fragmentation of the condensed phase domains, as previously observed, with two

identified height levels (h1 and h2) probably enriched in DPPC, pS, coexisting with a fluid phase probably enriched in MGDG. Additionally, the inclusion of bile salts at the interface could have spaced out the neighboring DPPC molecules, thus disordering their tight packing and the interfacial organization (Chu et al., 2010). At $T_{5\text{min}}$, the highest domains became more numerous, probably related to the generation of FFA, with a height $h1'=1.7 \pm 0.1$ nm. The organization of the interface was similar to that obtained in the images at 2h kinetics after injection of gPLRP2 in the subphase of GL/DPPC/pS monolayers, highlighting the galactolipase activity of gPLRP2 at the level of heterogeneous liposomes in the presence of bile salts, but also at the level of heterogeneous monolayers.

CONCLUSION

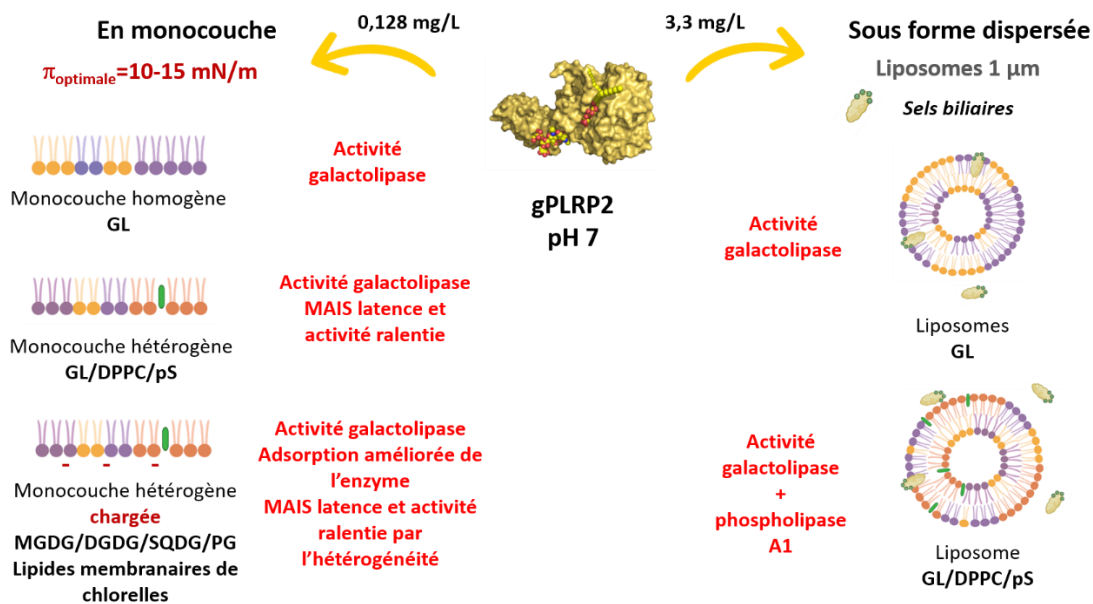
The organizational properties and enzymatic activity of gPLRP2 was studied on galactolipid-based substrates exhibiting different supramolecular structures, and presenting or not phase heterogeneity. The galactolipase activity of gPLRP2 was evidenced at the level of homogeneous galactolipid monolayer, but also heterogeneous galactolipid, phospholipid and phytosterol monolayer. The presence of charged lipids at the interface improved the adsorption capacities of the enzyme through the establishment of electrostatic interactions between the substrate and the interfacial recognition site of the active site, resulting in improved adsorption and enzymatic activity of gPLRP2. The optimal activity of gPLRP2 was obtained at a surface pressure of 15 mN/m for both systems, even if the tighter packing of the heterogeneous monolayer has induced a lag phase period before the on-set of the lipolysis. The galactolipase activity of gPLRP2 was also observed in lipid monolayers extracted from the microalgae *Chlorella vulgaris* for the first time. The chemical heterogeneity of the lipids extracted from this natural matrix induced a physical

CHAPITRE 5

heterogeneity of the monolayer, leading to a better adsorption of the enzyme but a slower apparent activity deduced from the interfacial experiments.

The galactolipase activity of the gPLRP2 was confirmed on 1 μm galactolipid-based model liposomes after 5 minutes incubation in presence of bile salts. Phospholipase A1 activity was also found on heterogeneous GL/DPPC/pS liposomes in the presence of bile salts. In addition to the obvious effects of bile salts, this could be explained by the phase heterogeneity induced by the presence of galactolipids in the mixture, as well as by the inclusion of phytosterols which induced the presence of defects in the condensed phase, thus decreasing packing and allowing access of the enzyme to the acyl chains of phospholipids. These experiments should be repeated in the absence of bile salt to sort out these effects.

Principaux résultats de l'étude



- La gPLRP2 s'adsorbe en phase fluide et possède une activité galactolipase sur une gamme de surface optimale de 10 à 15 mN/m au niveau des monocouches homogène et hétérogène de galactolipides à pH 7. La présence d'une coexistence de phase LC-LE et d'un packing local important dans les systèmes modèles et naturels hétérogènes retarde néanmoins l'initiation de la lipolyse et ralentie l'activité enzymatique. La présence de molécules chargées à l'interface des films améliore les capacités d'adsorption de l'enzyme grâce à l'établissement d'interactions électrostatiques entre le substrat et l'enzyme.
- La gPLRP2 possède une activité galactolipase sur les liposomes microniques riches en galactolipides (systèmes modèles et extraits naturels) en présence de sels biliaires. La gPLRP2 possède également une activité phospholipase A1 sur les liposomes hétérogènes GL/DPPC/pS, probablement grâce à la présence de sels biliaires mais aussi grâce à des défauts au niveau du packing local des phases LC riches en DPPC et en MGDG.

*Les résultats d'adsorption et de dégradation des monocouches de lipides membranaires d'OB de noix et d'amandes par la gPLRP2 ont été obtenus et sont disponibles en **Annexe VI**.

II – Dégradation enzymatique des substrats lipidiques modèles et naturels par la sPLA2-IB

Les PLA2 purifiées (sPLA2-IB et PLA-NMM-CM III) utilisées dans cette étude ont été aimablement fournies par l'équipe de Gérard Lambeau, directeur de recherche au CNRS de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IMPC, Nice, France).

II.1 – Comportement d'adsorption et activité enzymatique de différentes PLA2 au niveau d'une monocouche modèle hétérogène GL/DPPC/pS en fonction de la pression de surface initiale du film interfacial

Deux espèces de PLA2 ont été injectées en sous-phase de la monocouche modèle hétérogène GL/DPPC/pS à différentes pressions de surface initiales, afin de déterminer l'impact de celles-ci sur les capacités d'adsorption et l'activité enzymatique des PLA2 étudiées. Une attention particulière a notamment été donnée à la sPLA2-IB, une enzyme lipolytique sécrétée par le pancréas au cours des repas chez l'Homme, et qui joue plusieurs rôles clés dans la digestion des lipides. Il a en effet été établi que cette enzyme hydrolyse la chaîne d'acide gras en position *sn*-2 des phospholipides avant leur absorption dans la muqueuse intestinale (Richmond et al., 2001). En particulier, cette enzyme soluble est conçue pour attaquer *in vivo* les agrégats micellaires ou lamellaires de phospholipides. L'hydrolyse des phospholipides par la sPLA2-IB serait une étape clé dans le métabolisme lipidique, l'augmentation des concentrations en phospholipides au niveau de la lumière intestinale ayant été montrée comme retardant l'absorption du cholestérol (Rampone & Machida, 1981). Enfin, la dégradation des phospholipides par la sPLA2-IB permettrait de limiter

l'inhibition de certaines enzymes pancréatiques, comme la HPL et la BSSL/CEH (Venuti et al., 2017). De précédentes études suggèrent une voie commune d'accès aux substrats entre différentes PLA2, et décrivent celle de la PLA2 de venin de cobra chinois, qui peut être extrapolée au comportement de la sPLA2-IB, dont sont connus certains analogues chez l'animal (porc et bovins notamment). En particulier, l'activité hydrolytique de la PLA2 a été montrée comme calcium-dépendante, l'ion calcium permettant de stabiliser électrostatiquement l'intermédiaire de transition oxyanion au cours du cycle catalytique, et est essentiel à la liaison du substrat (Scott et al., 1990). La PLA2 a également été montrée beaucoup plus active à l'interface lipide-eau qu'en solution, du fait du phénomène d'activation interfaciale (cf. chapitre 1.III.3.2). L'activité enzymatique de la PLA2 se manifeste en effet grâce à son site catalytique, responsable de la liaison du substrat, mais également d'un site de liaison interfaciale, permettant de lier la protéine à ses substrats lipidiques, et composé de résidus hydrophobes et chargés positivement sur la surface externe de la molécule (Alekseeva et al., 2021). Le mécanisme d'action de la PLA2 de venin d'abeille a été étudié au niveau de bicouches de DPPC par une combinaison de techniques expérimentales et de simulations informatiques. Les résultats ont montré l'établissement de liaisons hydrogènes entre la protéine et l'interface lipidique, conduisant à la déformation de la membrane dépendamment de son état de phase. En phase LC, la faible diffusion des lipides a en effet entraîné leur fusion, tandis qu'en phase fluide ceux-ci ont été exclus de la zone de contact avec l'enzyme, entraînant un amincissement local de la bicouche et l'apparition d'une zone hydrophobe. De la même façon que pour la gPLRP2, le comportement d'adsorption et l'activité catalytique de la PLA2 seraient donc gouvernés par la composition chimique et l'état de phase local des assemblages lipidiques (P. Zhang et al., 2019).

Dans notre étude, les capacités d'adsorption et d'activité de la sPLA2-IB à l'interface d'une monocouche modèle hétérogène de galactolipides et de phospholipides (GL/DPPC/pS) ont été

comparées avec celles de la PLA2-NMM-CM III, extraite du venin de cobra du Mozambique (*Naja Mossambica*). Cette phospholipase possède une séquence protéique proche de la sPLA2-IB, mais serait plus active à l'interface.

II.1.1 – Absence d'activité enzymatique de la sPLA2-IB à une pression de surface initiale de $\pi=20$ mN/m au niveau du film modèle hétérogène GL/DPPC/pS

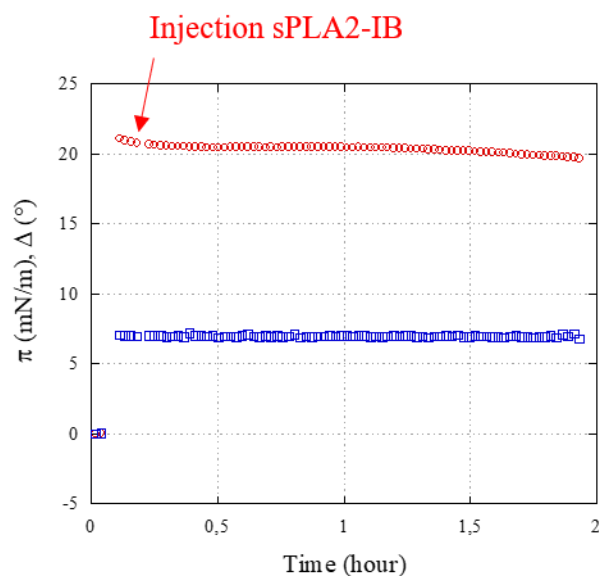


Figure 49 - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à 20 mN/m, pH 7.

La sPLA2-IB a été injectée en sous-phase (pH 7) de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à une concentration de 0,128 mg/L et à une pression de surface initiale $\pi=20$ mN/m, dans des conditions similaires à celles utilisées pour l'étude de la gPLRP2. La **Figure 49** présente l'évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique après l'injection de la sPLA2-IB en sous-phase sur une cinétique de 2h. Durant l'intégralité de la cinétique, aucune évolution de la pression de surface ni de l'angle ellipsométrique n'a été observée, soulignant l'absence d'activité de la sPLA2-IB à l'interface de la monocouche à 20 mN/m.

A 2h de cinétique (**Figure 50**), de fines trainées discontinues de $0,8 \pm 0,4$ nm de hauteur étaient visibles sur les images AFM, en plus des domaines en phase LC de $1,6 \pm 0,2$ nm de hauteur attribués à l'organisation initiale du film GL/DPPC/pS à 20 mN/m. Ces fines trainées discontinues pourraient correspondre à l'adsorption de molécules de sPLA2-IB dépliées à l'interface air/eau, la pression de surface de 20 mN/m étant trop importante pour permettre l'insertion de l'enzyme en conformation active, expliquant l'absence d'évolution de la pression de surface sur les courbes cinétiques.

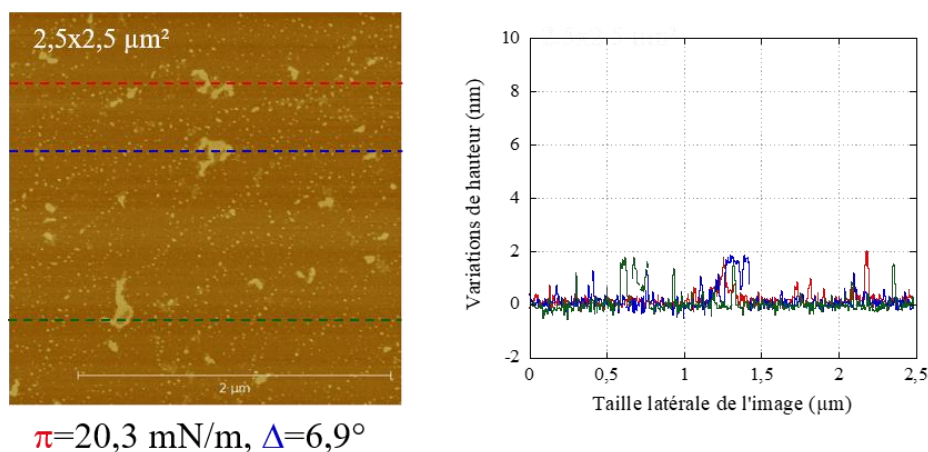


Figure 50 - Image AFM ($2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$) et histogramme de hauteurs du film interfacial obtenus à 2h de cinétique ($\pi=20,3$ mN/m, $\Delta=6,9^\circ$) après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à 20 mN/m.

II.1.2 – Pénétration de la PLA2 extraite de venin de cobra (PLA2-NMM-CM III) à une pression de surface initiale de $\pi=20$ mN/m au niveau de la monocouche hétérogène GL/DPPC/pS

L'expérience a ensuite été reproduite dans des conditions similaires en utilisant une PLA2 de venin de cobra du Mozambique, la PLA2-NMM-CM III, pensée comme ayant une capacité de pénétration plus importante que la sPLA2-IB à des valeurs élevées de pression de surface. L'évolution des courbes de pression de surface et d'angle ellipsométrique au cours de l'adsorption

et l'insertion de la PLA2-NMM-CM III au niveau du film modèle hétérogène GL/DPPC/pS est présentée **Figure 51**.

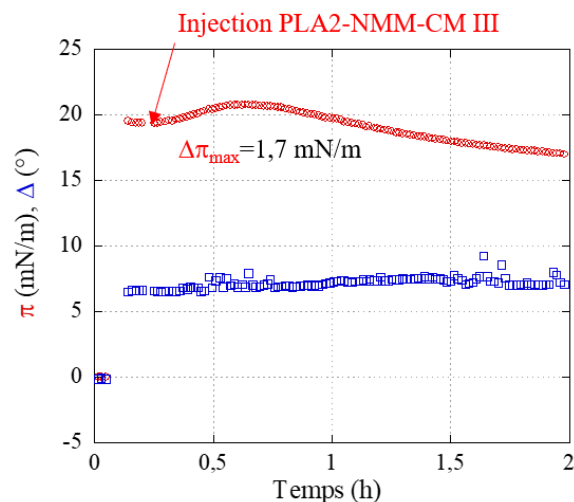
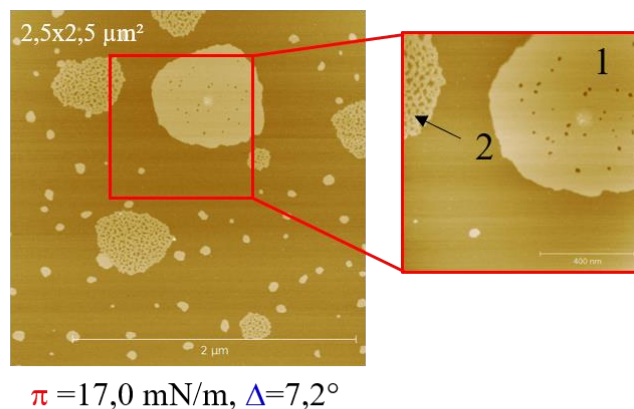


Figure 51 - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la PLA2-NMM-CM III (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à **20 mN/m**, pH 7.

Dans le cas de la PLA2-NMM-CM III, la pression de surface a augmenté de $\delta\pi=1,7$ mN/m juste après l'injection de l'enzyme en sous-phase, soulignant ainsi la capacité d'insertion de la PLA2 de venin de serpent à 20 mN/m au niveau de la monocouche GL/DPPC/pS. Après 45 minutes de cinétique, la pression de surface a commencé à décroître, probablement dû à l'activité phospholipase de l'enzyme, conduisant la désorption des produits de digestion hydrosolubles, comme le lysoPC. Néanmoins, la faible diminution de la pression de surface semble indiquer une activité enzymatique peu étendue de la PLA2-NMM-CM III sur la monocouche modèle hétérogène, probablement en raison du packing important des domaines en phase LC enrichis en DPPC à des valeurs élevées de pression de surface. En accord avec cette hypothèse, l'angle ellipsométrique n'a montré qu'une légère augmentation au cours des deux heures de cinétique.



Domaine	Hauteur (nm)
1	$2,0 \pm 0,1$
2	$1,5 \pm 0,2$

Figure 52 - Images AFM ($2,5 \times 2,5$ et 1×1 tabe μm^2) et hauteurs des domaines du film interfacial obtenu après 2h de cinétique ($\pi=20,3 \text{ mN/m}$, $\Delta=6,9^\circ$) après injection de la PLA2-NMM-CM III ($0,128 \text{ mg/L}$) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à 20 mN/m .

Les images AFM obtenues après 2h de cinétique (**Figure 52**) confirment l'insertion de l'enzyme à l'interface du film mixte GL/DPPC/pS. En effet, un réseau protéique de $1,5 \pm 0,2 \text{ nm}$ de hauteur était visible à l'interface air/eau, ce niveau de hauteur correspondant probablement à la conformation de l'enzyme sous sa forme active. Les réseaux protéiques se sont formés en phase fluide et autour des petits domaines LC enrichis en DPPC ($h=2,0 \pm 0,1 \text{ nm}$). Néanmoins, la PLA2-NMM-CM III ne s'est pas insérée au niveau des plus gros domaines en phase condensée, malgré la présence des défauts induits par l'inclusion des phytostérols. Le packing trop important de ces domaines à 20 mN/m pourrait gêner l'adsorption et l'insertion de l'enzyme, expliquant son exclusion à ce niveau.

II.1.3 – Adsorption et activité enzymatique de la sPLA2-IB à une pression de surface initiale de $\pi=10$ mN/m au niveau de la monocouche hétérogène GL/DPPC/pS

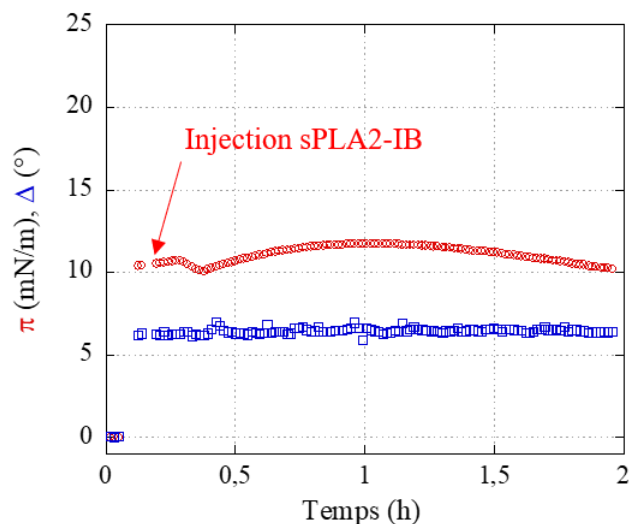
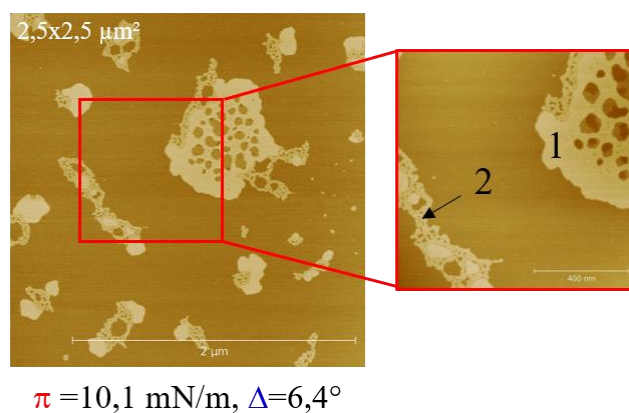


Figure 53 - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à **10 mN/m**, pH 7.

L'expérience a été reproduite dans des conditions similaires en injectant la sPLA2-IB à une pression de surface de $\pi=10$ mN/m en sous-phase de la monocouche de GL/DPPC/pS afin de déterminer si pression de surface initiale plus basse permettait d'améliorer la capacité d'insertion et l'activité enzymatique de l'enzyme. L'évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique obtenue sur une cinétique de 2h est présentée **Figure 53**. Juste après l'injection de la sPLA2-IB en sous-phase, une brève augmentation de la pression a été observée ($\delta\pi=0,6$ mN/m, $\delta t=8$ min), reflétant l'établissement de nouvelles interactions entre les molécules à l'interface, relatives à l'insertion de la sPLA2-IB dans le film. Ce résultat n'est pas surprenant, la capacité d'insertion au niveau des monocouches de DPPC de la PLA2 pancréatique porcine, proche analogue de la sPLA2-IB, ayant été montrée comme plus favorable à une pression proche de 10 mN/m dans la littérature (Ransac et al., 1992). Une diminution de la pression sur un temps court a

ensuite été constatée ($\delta\pi=-0,8$ mN/m, $\delta t=7$ minutes), résultant probablement d'une réorganisation interfaciale liée à l'adsorption des premières molécules de sPLA2-IB à l'interface et à leur activité phospholipase, conduisant à la désorption des molécules de lysoPC en sous-phase. Une augmentation plus importante de la pression a ensuite été observée pendant les 40 minutes suivantes de cinétique ($\delta\pi=1,8$ mN/m), supposée comme étant liée à l'adsorption de nouvelles molécules de sPLA2-IB à l'interface après la réorganisation du film lipidique, posant la question d'une organisation préférentielle plus favorable à l'insertion de l'enzyme après l'adsorption des premières molécules de sPLA2 et la dégradation de quelques molécules de DPPC, conduisant à la création de défauts en phase LC. Une diminution lente de la pression de surface a ensuite été observée, liée à l'activité phospholipase de la sPLA2-IB ($\delta\pi=-1,8$ mN/m, $\delta t=7$ minutes), jusqu'à atteindre une valeur finale de $\pi=10,1$ mN/m à 2h de cinétique. Contrairement à la pression, l'angle ellipsométrique n'a, quant à lui, pas montré d'évolution significative au cours des 2h de cinétique.



Domaine	Hauteur (nm)
1	$2,0 \pm 0,1$
2	$1,6 \pm 0,2$

Figure 54 - Images AFM ($2,5 \times 2,5$ et $1 \times 1 \mu\text{m}^2$) et hauteurs des domaines du film interfacial obtenu à 2h de cinétique ($\pi=20,3$ mN/m, $\Delta=6,9^\circ$) après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche modèle GL/DPPC/pS à 10 mN/m.

La **Figure 54** présente les images AFM du film interfacial obtenu après 2h de cinétique en présence de sPLA2-IB. Un réseau protéique irrégulier de $1,6 \pm 0,2$ nm de hauteur était visible à la frontière des domaines en phase LC ($2,0 \pm 0,1$ nm) enrichis en DPPC, confirmant l'insertion de l'enzyme à ce niveau. Les domaines de lipides organisés (riches en AG saturés) présentaient la présence de trous en leur centre, confirmant l'activité phospholipase de la sPLA2-IB. Ce résultat tend par ailleurs à confirmer la composition complexe des domaines en phase LC, également enrichis en MGDG, et souligne la potentielle absence d'activité galactolipase de la sPLA2-IB.

II.2 – Dégradation enzymatique des liposomes modèles de GL/DPPC/pS (1 μ m) par la sPLA2-IB en présence de sels biliaries

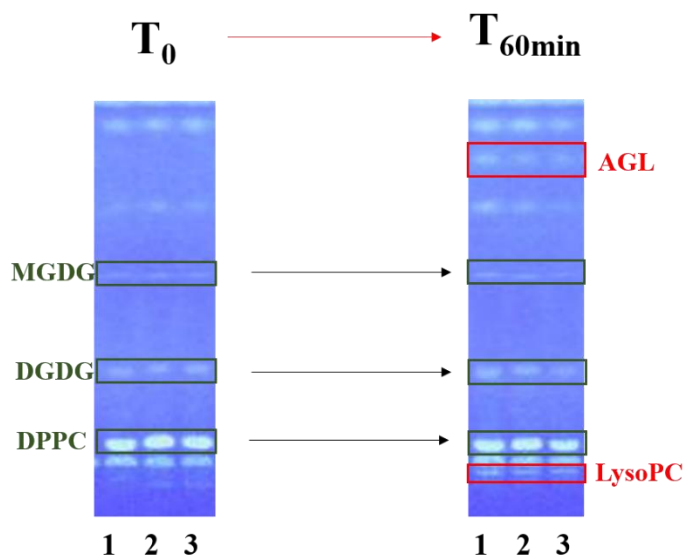


Figure 55 – A) Dépôts CCM (révélation primuline, visualisation à 365 nm) des substrats et des produits de digestion à T0 et après 5 minutes de digestion par la sPLA2-IB (3,3 mg/L), respectivement, des liposomes micrométriques GL/DPPC/pS.

La dégradation des liposomes micrométriques GL/DPPC/pS a ensuite été étudiée en phase dispersée (0,2%) en présence de sPLA2-IB (3,3 mg/L) et de sels biliaries (NaTDC 4 mM), dans des conditions similaires à celles utilisées précédemment pour la gPLRP2 (tampon Tris HCl, pH

7). Les substrats à T_0 et les produits de digestion obtenus après 60 minutes d'incubation des liposomes avec la sPLA2-IB ont été analysés par CCM et les résultats sont disponibles dans la **Figure 55**.

Après 60 minutes de digestion, l'analyse CCM a révélé la génération d'AGL et de lysoPC par dégradation du DPPC, confirmant l'activité phospholipase de la sPLA2-IB sur les liposomes GL/DPPC/pS en présence de sels biliaires. En revanche, la dégradation des MGDG et DGDG n'a pas été mise en évidence, soulignant l'absence d'activité galactolipase de l'enzyme sur ce système.

Les prélèvements des substrats et produits de digestion obtenus à T_0 et à $T_{60\text{min}}$, respectivement, ont été déposés à l'interface air/eau à une pression de surface d'environ 10 mN/m, afin de comparer l'organisation de l'interface avec celle obtenue après 2h d'adsorption de la sPLA2-IB à l'interface de la monocouche GL/DPPC/pS (**Figure 56**).

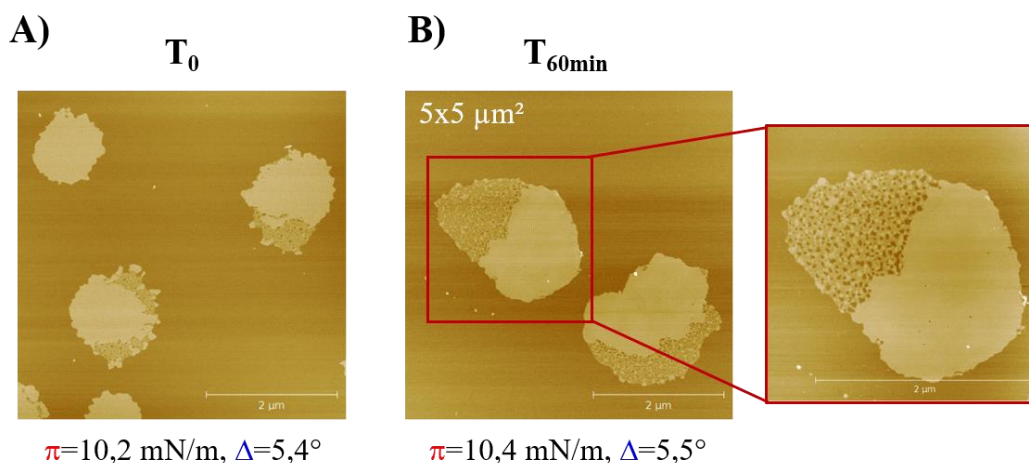


Figure 56 – Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de l'interface des films des substrats et produits de lipolyse obtenus à A) T_0 et B) T_{60} minutes à une pression d'environ 10 mN/m.

La morphologie des domaines en phase LC à T_0 témoigne de la désorganisation du film induite par l'adsorption des sels biliaires à l'interface. A $T_{60\text{min}}$, les domaines présentaient une organisation

similaire, mais une taille plus importante, probablement du fait de l'accumulation des AGL saturés produits de digestion à ce niveau, confirmant l'activité phospholipase de la sPLA2-IB et les résultats CCM.

II.3 – Capacité d'adsorption et activité enzymatique de la sPLA2-IB au niveau des monocouches de lipides totaux extraits des fragments membranaires de *Chlorella vulgaris* Purasana

La capacité d'adsorption et l'activité enzymatique de la sPLA2-IB ont été étudiés à une pression de surface initiale de 10 mN/m au niveau des monocouches de lipides extraits des matrices naturelles (*i.e.* i) lipides totaux de fragments membranaires de *Chlorella vulgaris*, et ii) phospholipides membranaires d'OB de noix et d'amandes). Afin de simplifier la lecture de ce manuscrit, seuls les résultats concernant les monocouches de lipides totaux extraits de *Ch. vulgaris* seront présentés. Les résultats concernant les membranes d'OB de noix et d'amandes sont disponibles en **Annexe VII**.

L'évolution de la pression de surface et de l'angle ellipsométrique sur une cinétique de 2h après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche de lipides totaux extraits de *Chlorella vulgaris* Purasana est présentée **Figure 57.A**. Juste après l'injection de la sPLA2-IB en sous-phase, une légère augmentation de la pression de surface a été observée ($\delta\pi=0,6$ mN/m, $\delta t=6$ min), reflétant l'insertion de la phospholipase au niveau du film, en accord avec les précédentes observations sur les systèmes modèles à une pression de initiale de 10 mN/m. La pression de surface a ensuite montré une nette diminution jusqu'à 2h de cinétique, jusqu'à atteindre une pression de surface finale de $\pi=9,9$ mN/m ($\delta\pi=-1,8$ mN/m), probablement liée à la désorption de lysoPC de l'interface air/eau, confirmant l'activité phospholipase de la sPLA2-IB sur les

phospholipides du film de lipides totaux de chlorelles (54% massique des lipides totaux). Ce résultat a été confirmé par l'évolution de l'angle ellipsométrique, qui a montré une légère augmentation au cours des 2h de cinétique ($\delta\Delta=0,3^\circ$), liée à la génération et à l'accumulation des AGL à l'interface, et à l'insertion de la sPLA2-IB au niveau du film.

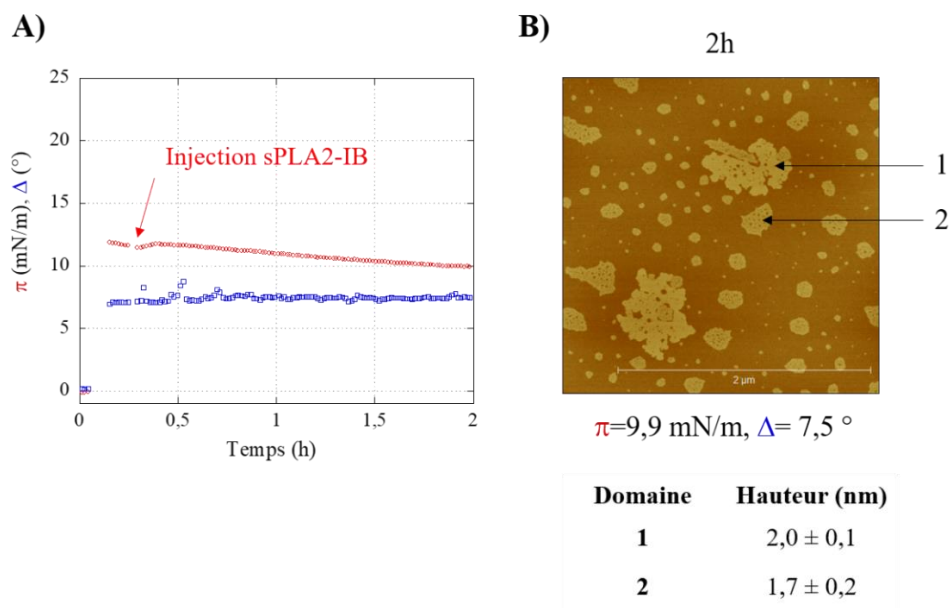
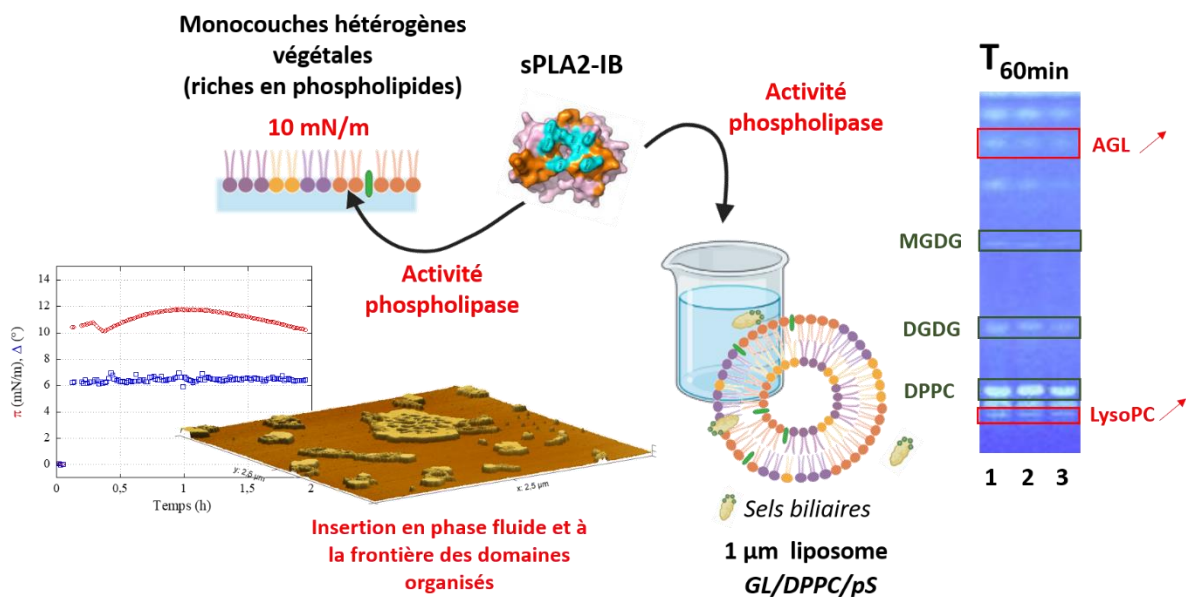


Figure 57 – A) Evolution et la pression de surface (π , mN/m, rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, bleu), et B) image AFM ($2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$) et hauteurs des domaines à l'interface du film obtenu après 2h de cinétique ($\pi=9,9$ mN/m, $\Delta=7,5^\circ$) ; après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase de la monocouche de lipides totaux extraits de fragments membranaires de *chlorella vulgaris* Purasana.

L'image AFM obtenue après 2h de cinétique d'adsorption de la sPLA2-IB au niveau du film de lipides totaux de chlorelle Purasana est présentée **Figure 57.B**. Comme précédemment observé sur les systèmes modèles, un réseau protéique de $1,7 \pm 0,2$ nm était visible à proximité des domaines organisés de $2,0 \pm 0,1$ nm de hauteur, mais également en phase fluide, formant des patches. La forme « flocon de neige » des domaines en phase LC était attribuable à la présence d'AGL générés par la dégradation des phospholipides par la sPLA2-IB.

Principaux résultats de l'étude



- A **20 mN/m**, la pression latérale entre les lipides est trop importante pour permettre à la sPLA2-IB de s'insérer en conformation active à l'interface air/eau.
- A **10 mN/m**, la sPLA2-IB montre une activité phospholipase et est capable de dégrader les phospholipides des monocouches modèles et naturelles hétérogènes de lipides. La sPLA2-IB montre une genericité d'adsorption en phase fluide, et à la frontière des domaines en phase LC riches en phospholipides.
- L'activité phospholipase de la sPLA2-IB a été confirmée au niveau des liposomes hétérogènes de phospholipides et de galactolipides (GL/DPPC/pS) en système dispersé en présence de sels biliaires, conduisant à la génération de lyso-phospholipides et d'acides gras libres. Aucune activité galactolipase n'a été mise en évidence pour la sPLA2-IB, aussi bien par les études interfaciales que par les études en phase dispersée.

CHAPITRE 6

DISCUSSION GÉNÉRALE

Table des matières du chapitre 6

I - Comportement interfacial d'extraits naturels de chlorelles ou d'OB de noix/amandes	288
II- Modèles de membranes végétales : modularité des états physiques, intérêts, et limites	293
III - Spécificité d'action des lipases digestives sur les molécules lipidiques du végétal	296
IV – Généricité des effets de l'état physique et de charges sur l'adsorption des lipases digestives au sein d'interfaces naturelles	307
V – Intérêt des extraits de lipides végétaux comme sources d'AO et vecteurs d' $\omega 3$?.....	312

CHAPITRE 6 – Discussion générale

Ce chapitre 6 a pour objectif de résumer les résultats obtenus dans ce travail et de discuter des nouvelles avancées concernant la digestibilité des assemblages membranaires végétaux par les enzymes digestives, comparés aux données disponibles à ce jour dans la littérature. Dans un premier temps, le comportement interfacial des lipides et assemblages membranaires extraits des matrices naturelles de microalgues *Chlorella vulgaris*, ainsi que des oléosomes de noix et d'amandes est résumé, ainsi que l'impact de la composition lipidique sur le comportement de phase et les propriétés biologiques globales des membranes. Dans un second temps, la modularité physique, les intérêts et limites des monocouches modèles de membranes végétales sont discutés. Les spécificités d'action des enzymes digestives étudiées dans ce travail sur les substrats lipidiques végétaux sont ensuite résumées, de même que la généralité des effets de l'état physique et des charges sur leur adsorption au sein d'interfaces naturelles. Enfin, l'utilisation des extraits de lipides végétaux comme sources d'AO et vecteurs d' $\omega 3$ est discutée, et souligne l'intérêt des lipides membranaires et des assemblages végétaux en tant que sources d'ingrédients fonctionnels et bioactifs.

I - Comportement interfacial d'extraits naturels de chlorelles ou d'OB de noix/amandes

Les assemblages membranaires végétaux sont riches en AG $\omega 3$, qui sont déficients dans les diètes française et européenne. Ces assemblages représentent d'excellents candidats pour le développement d'une vaste gamme d'applications alimentaires d'intérêt nutritionnel, en plus de leur intérêt dans les matrices naturelles. Ainsi, nous avons choisi d'étudier deux sources majeures d'assemblages et/ou membranes végétales que sont les chloroplastes (modèle microalgue) et les oléosomes (modèles noix/amande). En sélectionnant ces deux types d'extraits, nous avons émis l'hypothèse que leur composition membranaire, dominée d'un côté par les galactolipides et de l'autre par les phospholipides, entraînerait un comportement interfacial très différent qui pourrait impacter sur leur digestibilité. A ma connaissance, peu d'études basées sur la caractérisation interfaciale des films lipidiques riches en galactolipides sont aujourd'hui disponibles (Bottier et al., 2007; Eydoux et al., 2007; Kergomard et al., 2022). Concernant les oléosomes, les études ont principalement porté sur le comportement interfacial de ces objets entiers (tailles microniques) (Nikiforidis, 2019), mais peu se sont intéressées au comportement des lipides polaires extraits de leur membrane lipidique.

Comme supposés, les résultats ont montré une organisation interfaciale très différente des films lipidiques extraits des deux grands types de matrices naturelles, notamment entre les membranes de chlorelles et celles d'OB. Ces différences s'expliquent par la structure chimique des lipides, leur tête polaire (galactolipides *versus* phospholipides), leur composition en AG ($\omega 3$ et $\omega 6$ *versus* $\omega 9$), mais également par des effets de charges (galactolipides neutres *versus* phospholipides zwitterioniques ou chargés), engendrant des interactions latérales distinctes impactant l'organisation interfaciale. Cet aspect moléculaire a nécessité la mise en œuvre d'une

caractérisation fine de ces systèmes à l'échelle moléculaire, permise par le couplage de techniques biophysiques (ellipsométrie/tensiométrie/AFM).

Tableau 11 – Valeurs de Δ (°) des monocouches de lipides extraits des systèmes naturels à une pression de surface d'environ 20 mN/m.

Monocouche	Δ (°)
Lipides totaux <i>Ch. vulgaris</i>	$8.1 \pm 0.5^\circ$
Lipides totaux <i>Ch. sorokiniana</i>	$8.4 \pm 0.5^\circ$
Lipides totaux OB noix	$8.1 \pm 1^\circ$
Lipides totaux OB amande	$9.1 \pm 0.5^\circ$
MGDG/DGDG (1:1 mol/mol) blé ^a	$8.1 \pm 0.5^\circ$

± désigne la déviation standard calculée sur les duplicatas de mesure.

L'erreur du système instrumental est de $\pm 0.5^\circ$. Les déviations standards ≤ 0.5 ont été minorées par l'erreur instrumentale.

^aBottier (2006)

En particulier, l'ellipsométrie a permis de mettre en évidence des différences significatives d'épaisseur entre les monocouches de phospholipides des membranes d'OB d'amandes, particulièrement riches en $\omega 9$ et pauvres en $\omega 3$, et les trois autres systèmes naturels, plus riches en $\omega 3$ et en $\omega 6$, confirmant l'impact des longueurs de chaînes d'AG sur l'épaisseur des monocouches (**Tableau 11**).

La visualisation des monocouches de lipides totaux de chlorelles a révélé une organisation majoritairement en phase fluide, coexistant avec des nanodomains en phase LC résultant d'une

forte affinité moléculaire entre les AG saturés (acides palmitiques dans nos extraits). Les monocouches de lipides totaux extraits des *Chlorelles* sont caractérisées par une compressibilité importante des films, et montrent un comportement fluide même à des valeurs de pressions élevées (**Figure 58**). L'absence de transition sur les isothermes de compression peut s'expliquer par le fait que la contribution des lipides à chaînes saturées en phase condensée à l'aire moléculaire moyenne de la monocouche est masquée par celle des lipides aux chaînes insaturées.

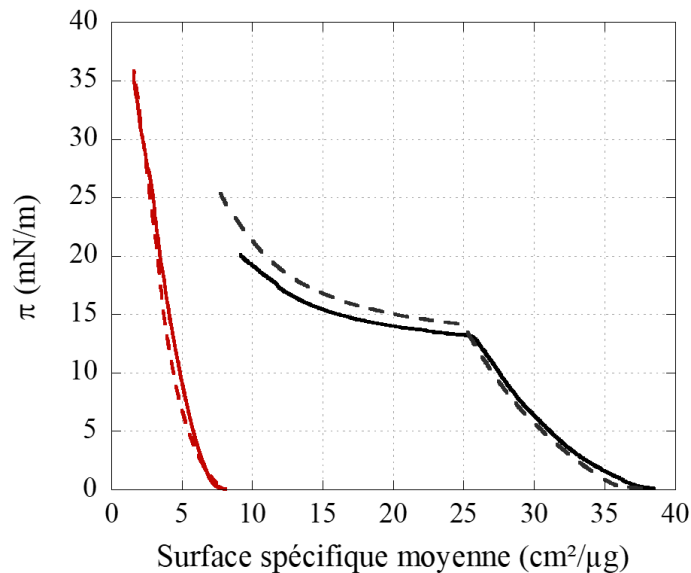


Figure 58 - Isothermes de compression des monocouches des lipides totaux de *Ch. vulgaris* Purasana (trait rouge continu) et *sorokiniana* (trait rouge pointillé) et des lipides membranaires de noix (trait noir continu) et d'amandes (trait noir pointillé).

Au contraire, les phospholipides extraits des membranes d'OB forment des monocouches présentant des coexistences de phase LC-LE à 20 mN/m. La formation de micro-domaines visibles en AFM avaient déjà été observée par Gallier et al. (2010) au niveau de monocouches de phospholipides extraits de lait bovin, comme modèle membranaire de globules gras laitiers natifs. Cette ségrégation latérale avait également été rapportée à des pressions inférieures (dès 10 mN/m) par Bourlieu et al. (2020) sur des extraits membranaires de globules gras laitiers humain (HMM)

et bovin (BMM), en accord avec les isothermes de compression respectives. Il est important de souligner que ces extraits contenaient, en plus des phospholipides, un lipide polaire spécifique, la sphingomyéline, basée sur un aminodiol (la sphingosine) lié à un acide gras par sa fonction amide, et à une choline *via* une liaison phosphodiester. En restant centré sur la composition en AGT de ces extraits, une compressibilité plus importante des monocouches de HMM que celle des BMM avait été mise en évidence, en lien avec la composition plus riche en DHA (0,8%), favorisant une meilleure insertion de la lipase gastrique. La longueur et le degré d'insaturation des chaînes acyles est en effet un facteur clé de la compressibilité des monocouches. Les insaturations augmentent la flexibilité des chaînes, qui se réorientent et se redressent progressivement perpendiculairement à l'interface au cours de la compression. Ainsi, la réorganisation des molécules sous compression est favorisée par la présence des AGPI-LC ω 3 (DHA). De même, la teneur plus élevée en AGPI ω 9 des monocouches de lipides membranaires d'OB d'amandes en comparaison avec les OB de noix impacte également l'organisation et la morphologie des micro-domaines, tout en augmentant la pression de surface de transition de phase LC-LE.

Dans la littérature, il a été montré que les frontières entre les phases LC et LE sont des zones de désordre présentant des lignes de tension fortes, pouvant induire l'adsorption préférentielle de certaines protéines (Bourlieu et al., 2016; Chu et al., 2010; Leidy et al., 2011). Ce comportement de phase, et notamment la présence de domaines en phase LC coexistant avec une phase LE, pourrait ainsi impacter l'adsorption des protéines impliquées dans les processus métaboliques des organites végétaux, en offrant des plateformes d'interactions propices aux interactions lipides-protéines (Staneva et al., 2004).

Globalement, l'auto-assemblage des lipides sous la forme de membranes stabilisant les objets biologiques microniques permet d'assurer de nombreux procédés biologiques. En particulier, la

membrane plasmique exerce un rôle essentiel dans la protection de l'intégrité des cellules en jouant le rôle de barrière avec l'environnement extérieur, et régule les échanges de diverses substances entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. L'auto-organisation des différents constituants protéiques et lipidiques créant l'assemblage membranaire dépend de plusieurs facteurs, et notamment de la composition lipidique et de leur géométrie, induisant des propriétés physico-chimiques spécifiques dont découlent les propriétés biologiques des membranes (Sych et al., 2018). La structure native des membranes d'OB, organisée en monocouche de protéines et de phospholipides, permet par exemple de leur conférer *in vivo* des propriétés de protection en maintenant une stabilité physique (coalescence limitée) et chimique (oxydation) (Kergomard et al., 2021). Chez les chloroplastes, la composition lipidique permet d'assurer la structure spécifique d'un empilement de membranes de thylakoïdes, et ainsi d'optimiser les fonctions photosynthétiques de l'ensemble (Bishop et al., 1980).

Nos résultats montrent un comportement interfacial dépendant de la composition en têtes polaires et en acides gras, impactant la compressibilité locale des monocouches et, *in fine*, leurs interactions avec les molécules biologiques. Les caractérisations interfaciales des monocouches naturelles permettent de définir des modèles d'organisation pour des systèmes présentant des compositions lipidiques proches, et peuvent donc servir de base pour accéder à la compréhension des interactions lipides-lipides et protéines/lipides des membranes biologiques. Il convient cependant de réaliser une caractérisation approfondie de ces systèmes, couvrant un large panel de compositions, certaines microalgues pouvant par exemple présenter des profils plus riches en EPA et DHA, et donc une compressibilité plus importante localement, impactant le comportement interfacial global et multipliant les applications possibles pour ces membranes naturelles. La compressibilité locale des monocouches naturelles pourrait en effet être un paramètre clé des

interactions lipides-protéines. Sa détermination pourrait notamment permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la digestion des objets micronutritionnels alimentaires chez l'Homme, la barrière membranaire représentant le premier rempart entre leur interface et les enzymes digestives.

II- Modèles de membranes végétales : modularité des états physiques, intérêts, et limites

Les monocouches de lipides constituent un modèle pertinent pour reproduire l'interface des gouttelettes d'émulsions alimentaires, lieu de la dégradation enzymatique des lipides dans le système digestif. A ma connaissance, les études référencées dans la littérature ont principalement porté sur la caractérisation interfaciale des monocouches modèles de membranes animales, homogènes ou hétérogènes, mais peu concernent le comportement des films de lipides modèles ou extraits du végétal, alors que cette caractérisation représente une étape essentielle à la compréhension des mécanismes biologiques *in vivo*, et notamment concernant la digestion des membranes biologiques végétales par l'Homme.

Dans ce contexte, les systèmes végétaux naturels étudiés ont été simplifiés à quelques molécules clés (dichotomie galactolipides *versus* phospholipides), afin de constituer une base pour accéder à une compréhension fine au niveau moléculaire des interactions protéines (ici enzymes) - lipides. Ces systèmes présentent donc des limites, notamment de par le fait qu'ils n'incluent pas tous les lipides majoritaires des membranes végétales, et ne sont pas chargés (absence de phospholipides anioniques comme la PS ou la PI, et de SQDG et de PG dans les systèmes photosynthétiques, bien que ces derniers aient été intégrés en fin d'étude), ce qui peut influencer sur les capacités d'adsorption de certaines enzymes (Smith, 2012). Des systèmes homogènes et hétérogènes ont été étudiés, comprenant des compositions en ALA fixées (MGDG et DGDG commerciaux issus de feuilles

CHAPITRE 6

d'épinard, ALA=50 et 70% massique, respectivement). Deux types de lipides ont été utilisés pour moduler l'état physique et la compressibilité des monocouches : d'une part le DPPC, dont le comportement de phase est très bien connu, ainsi que les phytostérols, molécules du végétal homologues au cholestérol largement étudié dans les membranes de mammifères. Le DPPC pur montre une transition de phase claire en monocouche. Il possède deux chaînes saturées, et est la molécule de référence pour induire une hétérogénéité de phases dans les mélanges étudiés. En fonction de la composition et des ratios molaires des systèmes modèles, un effet mixte des constituants a été observé. Le DPPC a induit une rigidification et une coexistence de phase dans les mélanges de galactolipides. Dans les systèmes purs de galactolipides, l'ajout de pS a diminué la compressibilité de la monocouche en condensant les chaînes acyles, mais également en modifiant l'orientation particulière des têtes polaires galactosyles. Dans les systèmes hétérogènes, le pS a fluidifié les micro-domaines enrichis en DPPC (rôle analogue au cholestérol), tout en augmentant l'ordre dans la phase fluide enrichie en galactolipides. Cet effet des phytostérols peut être corrélé avec leur rôle de molécules structurales dans les végétaux. *In vivo*, par ces mêmes effets, les phytostérols sont indispensables à la vie des plantes, car ils leur permettent de s'adapter à leur environnement en fonction des conditions de stress extérieur (thermiques, hydriques, etc...) (Itzhaki et al., 1990; Kamal & Raghunathan, 2012; McKersie & Thompson, 1979). Ce comportement « rigidifiant » ou « fluidifiant » en fonction des phases environnantes, peut être généralisé aux propriétés globales de structuration des stérols dans les membranes biologiques. Néanmoins, cet effet est plus marqué chez le cholestérol, le stérol majoritaire des membranes animales (Moreau et al., 2002). Contrairement aux membranes animales, la diversité de stérols dans les membranes végétales est très forte : plus de 250 espèces de stérols différentes ont été rapportées (Evans, 1991). Dans la nature, les phytostérols et les sphingolipides sont responsables de la formation de radeaux lipidiques qui se déplacent dans la bicouche fluide, et interagissent avec

les protéines et les lipides de la membrane cellulaire végétale (Simons & Ikonen, 1997). Contrairement à la membrane plasmique végétale, qui ne contient qu'entre 20 et 40% de phytostérols, leur proportion peut être multipliée par deux dans les rafts, et cet enrichissement est particulièrement clair pour les stérols conjugués, qui jouent un rôle important dans la signalétique des membranes (Cacas et al., 2012). Une telle diversité de phytostérols dans le règne végétal s'explique par la présence de différentes voies de synthèse, mais également par des procédés de glycosylation et d'interconversion entre les composés conjugués, permettant aux végétaux de résister aux multiples facteurs de stress de leur environnement extérieur (Griebel & Zeier, 2010; Rudell et al., 2011).

Malgré la simplicité apparente des systèmes modèles étudiés, les outils de caractérisation interfaciale et le SAXS nous ont permis de mettre en évidence des miscibilités différentes entre les molécules, induisant une complexité locale dans l'organisation interfaciale des monocouches modèles. La miscibilité préférentielle du MGDG avec le DPPC a en effet été observée, ainsi que la génération de défauts fonctionnels au niveau des microdomaines organisés par l'inclusion des phytostérols, pouvant influencer sur les processus biologiques comme la digestion. Dans nos mélanges, le MGDG a induit une miscibilité encore plus importante avec le DPPC qu'avec d'autres molécules rigidifiantes (comme le cholestérol et la sphingomyéline) dans des systèmes pourtant simplifiés (Bourliou et al., 2016), le MGDG agissant comme un solvant pour les molécules rigides de DPPC. Contrairement aux systèmes animaux, dans lesquels la miscibilité entre les molécules est gouvernée essentiellement par les chaînes aliphatiques, dans les systèmes modèles végétaux, la tête glycosylée des galactolipides semble jouer un rôle non-négligeable. Ce comportement peut être rapproché de la miscibilité observée du GM1 dans un mélange présentant des séparations de phases. Ce ganglioside composé d'une tête polaire glycosylée de grande taille et deux chaînes

d'AG saturées forme des sous-domaines dans la phase LC du DPPC (Vié et al., 1998). Les systèmes développés dans ce travail ouvrent un nouveau champ de comparaison avec d'autres types de glycolipides (cérébrosides, gangliosides...), pouvant avoir un comportement interfacial spécifique, et des propriétés de miscibilité avec des molécules lipidiques à chaînes saturées.

La caractérisation interfaciale des monocouches de lipides modèles, ainsi que l'identification de zones de miscibilité distinctes incluant des mélanges de molécules contrastées (galactolipides *versus* phospholipides), ont ainsi permis de mettre en lumière la complexité d'organisation des molécules végétales, même dans le cas des systèmes simplifiés, pouvant impacter considérablement l'activité enzymatique des lipases digestives humaines ou analogues. En effet, si la spécificité chimique des enzymes gastrique et intestinales impacte l'activité des enzymes et a pu être vérifiée au cours de ce travail, des phénomènes génériques d'interactions physiques sont apparus clairement. Outre la spécificité chimique, ces phénomènes d'interactions physiques conditionnent l'accès et l'activité des enzymes à leurs substrats.

III - Spécificité d'action des lipases digestives sur les molécules lipidiques du végétal

La digestion des lipides, et en particulier des lipides apolaires, a fait l'objet de nombreux travaux de recherche, et notamment dans les années 1980-1990, où la spécificité d'action des lipases a été mise en évidence à l'interface de substrats donnés (Bernbäck et al., 1990; de La Fournière et al., 1994; Gargouri et al., 1986). Davantage d'attention a été portée sur la digestion des lipides polaires à partir des années 1990-2000. Cependant, la majorité des groupes de recherche se sont concentrés sur la digestion des phospholipides par l'action spécifique de la sPLA2 pancréatique (Borgström, 1980, 1993; Karray et al., 2011; Lengsfeld et al., 2004). Les mécanismes impliqués dans la digestion des galactolipides par la PLRP2 ne sont quant à eux pas encore complètement compris,

malgré leurs propriétés nutritionnelles, et l'intérêt croissant porté à leur utilisation dans des applications alimentaires (Amara et al., 2010; Ohlsson, 2000; Wattanakul et al., 2019) dans le cadre des recommandations de « végétalisation des régimes alimentaires ». Dans ce travail, nous contribuons à la compréhension fine des mécanismes d'interactions interfaciaux impliqués dans la digestion des lipides polaires végétaux, en portant une attention particulière à l'action de la PLRP2, dont les activités galactolipase et phospholipase A1 ont été démontrées précédemment dans la littérature (De Caro et al., 2004; Sahaka et al., 2020).

L'action des enzymes digestives humaines ou de proches analogues a été étudiée séparément avec nos outils de caractérisation interfaciale, car leur mécanisme n'étaient pas totalement connus à l'échelle moléculaire, et de nombreuses questions étaient encore ouvertes. Le choix d'étudier chaque enzyme séparément peut aussi être justifié par des conditions d'action assez différentes (sous-phase, pH, déstabilisation interfaciale...), et non-compatibles avec les expériences en conditions interfaciales. Ainsi, les expériences en monocouche ont été réalisées en excès de substrat, afin d'accéder à une compréhension mécanistique de l'activité enzymatique à l'échelle moléculaire. En complément, la digestion des assemblages moléculaires de lipides à l'état natif a également été étudiée en systèmes statique et dynamique en présence d'excès d'enzymes, afin de suivre les cinétiques globales de dégradation à l'échelle de l'objet micronique.

Comme attendue, l'absence d'activité lipolytique de la lipase gastrique (modèle rDGL) a été confirmée sur les lipides polaires. Sa capacité d'insertion et/ou d'adsorption a été vérifiée dans les différentes expériences en monocouche et en systèmes statique (« bulk ») et dynamique (microfluidique). Au niveau des monocouches étudiées, elle a entraîné une désorganisation moléculaire importante des films, pouvant ensuite impacter l'étendue de la lipolyse intestinale (Infantes-Garcia et al., 2022; Lengsfeld et al., 2004). Cette observation a été confirmée en cellule

microfluidique sur les OB d'amandes, où l'adsorption hétérogène de l'enzyme au niveau de la membrane lipidique a été observée grâce à sa fluorescence intrinsèque (résidus tryptophane). Concernant la sPLA2 (modèle IB et NMM-CM III), aucune activité galactolipase n'a été détectée, malgré son adsorption à l'interface des monocouches mixtes de galactolipides et de phospholipides. Ce résultat n'est pas surprenant, l'interaction substrat-site actif de la sPLA2 étant beaucoup plus contraint que celui d'une lipase, entravant sa capacité à accommoder des substrats présentant des têtes polaires encombrées comme les galactolipides. De plus, le mode d'action calcium-dépendant de la sPLA2 implique une interaction avec le calcium, qui, contrairement à son interaction avec les têtes polaires des phospholipides, ne se trouve pas à proximité immédiate des têtes sucres de galactolipides. De façon moins surprenante, une activité phospholipase a ainsi été mise en évidence au niveau des monocouches GL/DPPC/pS, ainsi que sur les liposomes mixtes GL/DPPC/pS en systèmes de digestion statique en présence de sels biliaires. Enfin, comme présumée, l'activité galactolipase de la PLRP2 (modèle gPLRP2) a été confirmée au niveau des monocouches homogènes et hétérogènes de galactolipides, et au niveau des liposomes en système de digestion statique en présence de sels biliaires, sur les systèmes lipidiques modèles ou extraits des matrices naturelles. De plus, une activité phospholipase, bien que faible, a également été détectée sur les phospholipides saturés des liposomes mixtes galactolipides/phospholipides en présence de sels biliaires. Cet élément vient compléter de précédents résultats de Mateos-Diaz et al. (2018), qui avait montré une absence d'activité enzymatique sur les liposomes de DPPC en absence de sels biliaires, le packing important de la bicouche de DPPC empêchant l'accès de la gPLRP2 à son substrat. Ainsi, la présence de sels biliaires, mais également l'apparition de défauts au niveau des phases organisées riches en galactolipides dans les systèmes mixtes permet d'améliorer la pénétration de l'enzyme et son activité enzymatique sur les têtes polaires de DPPC.

Les spécificités d'action des enzymes digestives peuvent s'expliquer par les différences structurelles observées au niveau de leur site actif. En outre, au-delà du site actif, la structure tridimensionnelle de l'enzyme, la présence d'un volet, et le site de reconnaissance interfacial (IRS), modulent les interactions enzyme-substrat. La structure 3D de la lipase gastrique est basée sur un repliement α/β hydrolase ainsi que sur un site actif composé d'une triade catalytique Ser-His-Asp et d'un trou oxyanion, retrouvés chez la majorité des lipases (Canaan et al., 1999; Roussel et al., 1999, 2002). L'activité optimale inhabituelle « apparente » de la lipase gastrique à pH acide s'explique par une meilleure capacité d'adsorption à l'interface lipide/eau à de faibles valeurs de pH, tandis qu'elle a tendance à rester en phase aqueuse au-dessus d'un pH neutre, le pH modifiant la charge surfacique de la lipase. L'adsorption interfaciale de la lipase gastrique serait principalement gouvernée par des interactions hydrophobes entre le substrat et le site actif, entouré par un large anneau apolaire (Chahinian et al., 2006). Des travaux plus récents en systèmes modèles avec des films pouvant contenir des phospholipides anioniques et des modèles de potentiel de surface de la rDGL ont néanmoins démontré la contribution des interactions électrostatiques aux interactions enzyme-substrat de la rDGL avec des extraits membranaires naturels (Bénarouche et al., 2017; Bourlieu et al., 2016). La structure de la hPLRP2 inclue également une triade catalytique Ser-His-Asp et partage 65-68% de la séquence en acides aminés des lipases pancréatiques classiques (Giller et al., 1992; Roussel et al., 1998). L'accès au site actif de la hPLRP2 est contrôlé par la présence d'un volet, dont la structure est légèrement différente de celle retrouvée chez les autres lipases pancréatiques, lui permettant d'accommoder des substrats plus hydrophiles comme les galactolipides et les phospholipides, qui présentent des larges têtes polaires (Withers-Martinez et al., 1996). Ce volet est en revanche absent sur la gPLRP2. Les lipases pancréatiques « classiques » des mammifères ne présentent d'activité enzymatique que sur les TAG. Ainsi, les

CHAPITRE 6

différences de cinétiques observées pour la PLRP2, en comparaison avec la PTL, seraient corrélées avec la structure particulière du volet recouvrant le site actif, expliquant sa spécificité de substrat (Eydoux et al., 2008). La longueur des chaînes acyles et la nature des têtes polaires de galactolipides naturels n'ont pas montré d'impact significatif sur l'activité de la PLRP2 purifiée du jus pancréatique de cochon d'Inde (gPLRP2) et humain (hPLRP2), respectivement (Amara et al., 2010). L'activité des deux enzymes était en effet importante sur les AG à chaînes moyennes (1786 ± 208 à 5420 ± 85 U/mg) et à longues chaînes (1756 ± 208 à 4167 ± 167 U/mg), et a uniquement été détectée en position *sn*-1 des ponts esters de galactolipides. Une activité similaire peu importe la nature de la tête polaire des galactolipides avait également été obtenue par Wattanakul et al. (2019), lors de l'incubation de CRF de pois et d'épinards, riches en MGDG et DGDG à longues chaînes, en présence de jus pancréatique porcin contenant de la gPLRP2. L'hydrolyse rapide des galactolipides et leur présence en mélange dans les végétaux verts expliquent le choix de ne pas différencier dans cette étude la dégradation du MGDG et du DGDG à longues chaînes par la gPLRP2 purifiée. En bulk, les concentrations des substrats MGDG et DGDG des liposomes de lipides modèles et naturels n'ont d'ailleurs pas montré d'évolution significative après 5 minutes de dégradation par la gPLRP2.

Certaines enzymes présentent ainsi des spécificités de substrats assez strictes, tandis que d'autres, comme la gPLRP2, présentent des spécificités moins strictes, et une activité sur différents types de substrats (activité galactolipase et phospholipase A1). Cette spécificité plus large de substrats permet d'induire une notion de complémentarité d'action, malgré l'étude de l'action individuelle des enzymes. Les données obtenues dans ce projet, ainsi que celles rapportées dans la littérature, permettent ainsi d'offrir une compréhension plus approfondie des mécanismes de digestion des lipides végétaux chez l'Homme. Les lipases gastro-intestinales, de par leur complémentarité de

spécificité d'action, ont la capacité de digérer les lipides alimentaires issus de différentes sources, aussi bien animales que végétales. Pour obtenir des informations sur les activités spécifiques comparatives des enzymes, la reproduction du système digestif *in vitro* statique ou en « bulk » dans des conditions proches des conditions physiologiques, semble plus adaptée que la caractérisation interfaciale (Wattanakul et al., 2019). Néanmoins, nous avons utilisé ici des enzymes purifiées, ce qui n'est pas toujours le cas dans la littérature (sécrétions pancréatiques, sucs gastriques, enzymes non purifiées, etc...), et peut induire un biais sur la compréhension des mécanismes d'adsorption des lipases digestives et leur activité enzymatique.

Les principaux résultats précédemment répertoriés dans la littérature et les nouveaux résultats apportés dans cette étude concernant l'activité des principales enzymes digestives humaines et leurs proches analogues sont résumés dans le **tableau 13**.

Tableau 13 - Activités des principales enzymes digestives humaines et leurs proches analogues

Enzyme	Concentration molaire moyenne (μM) ⁺	Activité spécifique (substrat)	Spécificité de substrat démontré avant cette étude	Ref	Effet de l'état physique démontré avant cette étude	Ref	Complément sur la spécificité de substrat démontré dans cette étude	Effet de l'état physique démontré dans cette étude
HGL <i>DGL</i>	Jus gastrique 2,4 Contenu gastrique 0,6 Contenu duodéal 0,4	Activité sur Intralipid (pH 5, 30%*) 600 U/mg#	Activité sur les TAG>DAG>>MAG ; stéréosélectivité pour la position <i>sn</i> -3 des TAG ; Pas d'activité sur les lipides polaires PEG et les esters de cholestérol <i>Similaire, mais activité optimale à pH 4 et non pH 5</i>		Pression critique d'insertion sur DLPC=30 mN/m (Bénarouche et al.) <i>Adsorption en phase fluide au niveau des monocouches hétérogènes de lipides extraits de globules gras laitiers.</i>	Bénarouche et al., 2017 <i>Bénarouche et al., 2013 Bourlieu et al., 2016</i>	<i>Pas d'activité sur MGDG, ni sur DGDG.</i> <i>Pas d'activité sur les phospholipides membranaires d'OB de noix et d'amandes.</i>	<i>Insertion en phase fluide des monocouches de phospholipides et des galactolipides, adsorption moins importante au niveau des monocouches de galactolipides (gène stérique et interface non chargée). Adsorption favorisée au niveau des défauts en phase condensée quand présence de phytostérols. Adsorption favorisée au niveau des interfaces de lipides végétaux chargés grâce à l'établissement d'interactions électrostatiques avec le site actif. Adsorption hétérogène et localisée sur les OB d'amandes en conditions gastriques.</i>
HPL	Jus pancréatique 15,2	Activité sur tributyrine 8500±500 U/mg	Activité sur les TAG> DAG ; stéréosélectivité pour les positions	De Caro, BBA, 1998			<i>Pas d'activité sur les galactolipides et les phospholipides végétaux.</i>	<i>Distribution en phase fluide et à la frontière des domaines en phase organisée.</i>

<i>PPL</i>	Contenu duodéal 6,5	<i>Activité sur tributyrine</i> 10200±500 U/mg	<i>sn-1 et sn-3 des TAG ; Pas d'activité sur les MAG à longues chaînes, les esters de cholestérol, les phospholipides et les GL, faible activité sur les 2-MAG à chaînes moyennes, et sur les esters-PEG. pH optimal : 7,0-7,5</i>				<i>Activité hydrolytique sur les TAG des OB d'amandes.</i>	
CEH/BSSL	Contenu duodéal 7,9	CEH native: 240±17 U/mg sur micelles NaDC/MGDG ; 240±17 U/mg sur micelles NaTDC/MGDG, et 16±2 U/mg sur MGDG sans sels biliaires ; Recombinante : 432 ± 62 U/mg sur micelles mixtes sels biliaires/MGDG	Activité sur MGDG>SQDG>DGDG	Amara et al. BBA, 2009			Non étudiée	Non étudiée
sPLA2-IB <i>PPLA2</i>	Contenu duodéal 9,4	0 sur MGDG, 0 sur tributyrine	Activité enzymatique médiée par le calcium	Eydoux et al., JLR, 2007			Activité phospholipase sur les liposomes (GUV) GL/DPPC/pS en	Adsorption et activité enzymatique modulées par l'état de phase local des monocouches.

		<i>500 U/mg sur L-α-PC purifiés à 24 mM CaCl₂</i>	Activité lipolytique sur la position <i>sn</i> -2 des phospholipides Activité préférentielle sur les agrégats de substrats tels que les micelles, les monocouches, les vésicules et les membranes Pas d'activité sur les monomères dispersés de phospholipides	Scott, Sciences, 1990			présence de sels biliaires. Activité phospholipase supposée sur les monocouches de lipides mixtes galactolipides/phospholipides modèles et extraits du végétal (ch. vulgaris, OB noix et amandes) à une pression de surface initiale de 10 mN/m.	Insertion en phase fluide et à la frontière des domaines en phase condensée riches en phospholipides à chaînes saturées.
HPLRP2	Jus pancréatique 4,3 Contenu duodéna 1,8	Maximum de 2800 \pm 60 U/mg sur les micelles mixtes NaDC/MGDG (dioctanoylglycero)l=1,33:1 (pH 8.00-9.00); 1786 \pm 100 sur les micelles mixtes NaTDC/MGDG; 1250 \pm 150 U/mg sur la tributyrine <i>~74 U/mg sur les L-α-PC purifiés à 24 mM CaCl₂; Maximum de 8000 \pm500 U/mg</i>	Activité sur les MAG, les phospholipides (position <i>sn</i> -1), les galactolipides, les esters de vitamines Pas d'activité sur les TAG à chaînes moyennes à longues mais il subsiste des incohérences, par exemple Andersson et al. 2011 ont conclu à une activité sur les TAG	Amara et al. BBA, 2009 Andersson et al. 2011	La HPLRP2 recombinante est active à des pressions de surface plus élevées sur les MGDG et DGDG que la GPLRP2 (conformation différente du couvercle recouvrant le site actif). Activité plus importante sur le DGDG C12:0 à une pression de 12 mN/m versus 5	Eydoux et al., JLR, 2007 <i>(Mateos-Diaz et al. Chem Phys Lipids, 2018)</i>	<i>Activité phospholipase lorsque le DPPC est pris dans un système hétérogène et en particulier en interaction avec le MGDG en présence de sels biliaires.</i> <i>Activité galactolipase très rapide (> 145 U/mg) sur les MGDG et DGDG à longues chaînes polyinsaturées en monocouche et en système dispersé en</i>	<i>La gPLRP2 s'adsorbe en phase fluide et possède une activité enzymatique optimale sur une gamme de pression de surface située entre 10 et 15 mN/m au niveau des monocouches homogène et hétérogène de galactolipides. L'hétérogénéité de phases et l'organisation condensée des lipides retardent l'initiation de la lipolyse et ralentissent l'activité enzymatique. La présence de molécules chargées à l'interface des films améliore les capacités d'adsorption de l'enzyme</i>

	<p><i>sur les micelles mixtes NaDC/MGDG (dioctanoylglycerol)=1,33:1 (pH 8.00-9.00); 5420±85 U/mg sur les micelles mixtes NaTDC/MGDG; 700±100 U/mg sur les MGDG e, l'absence de sels biliaires ; 2700±300 U/mg sur la tributyrine</i></p>	<p>(trioléine) et sur la tributyrine</p>		<p>mN/m pour la rGPLRP2. Activité plus importante sur le MGDG C12:0 à 20 mN/m versus 10-17 mN/m pour la rGPLRP2.</p> <p><i>La GPLRP2 hydrolyse le DPPC dans les micelles mixtes en présence de sels biliaires NaTDC, mais pas dans les MLV et LUB de DPPC.</i></p> <p>Explication : <i>l'interaction entre GPLRP2 S152G et DPPC n'est observée que lorsque le NaTDC est ajouté au système pour former des micelles et cela peut être expliqué par l'organisation différente du DPPC dans les micelles mixtes par rapport aux vésicules lamellaires (hydratation plus élevée de la tête</i></p>	<p><i>présence de sels biliaires.</i></p> <p><i>Pas d'activité sur les TAG des extraits lipidiques de chlorelle.</i></p>	<p><i>grâce à l'établissement d'interactions électrostatiques entre le substrat et l'enzyme.</i></p>
--	--	--	--	--	--	--

					<i>polaire, mobilité plus importante des chaînes alkyles), qui favorisent la pénétration de GPLRP2 dans la couche de phospholipides.</i>			
--	--	--	--	--	--	--	--	--

*Intralipid : huile de soja émulsionnée avec de la lécithine d'œuf.

** PEG : Les conjugués polyéthylène glycol (PEG) - lipides sont des dérivés du PEG contenant des molécules lipidiques telles que le DMG ou le DSPE, et qui sont utilisés dans la bioconjugaison et l'administration de médicaments par nanoparticules lipidiques (LNP).

***Activité sur la tributyrine : L'activité de la lipase a été déterminée par potentiométrie en titrant automatiquement les acides gras libres libérés par une émulsion de tributyrine agitée mécaniquement, à l'aide de NaOH 0,1 N et d'un dispositif pH-stat. Chaque essai a été effectué dans un récipient thermostaté (37 °C) contenant 0,5 mL de tributyrine (TC4) et 14,5 mL de tampon Tris-HCl 1 mM, pH 8,0 contenant 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂ et diverses concentrations de NaTDC lorsque nécessaire. Les activités spécifiques sont exprimées en unités internationales (U) par milligramme d'enzyme. Une U correspond à 1 µmol d'acide gras libéré par minute.

[†]Bakala et al. 2012

IV – Généricité des effets de l'état physique et de charges sur l'adsorption des lipases digestives au sein d'interfaces naturelles

Les systèmes complexes étudiés, modèles ou naturels, présentaient des hétérogénéités chimiques induisant une hétérogénéité physique, pouvant impacter l'adsorption et l'activité enzymatique des lipases digestives.

L'organisation locale des systèmes lipidiques impacte l'adsorption des enzymes digestives et leur activité enzymatique subséquente. La présence d'AGPI augmente la fluidité des systèmes lipidiques, favorisant globalement l'adsorption des enzymes à l'interface. Une généricité d'insertion des lipases digestives humaines a ainsi pu être observée dans les zones fluides à l'interface des monocouches végétales modèles et naturelles étudiées. La rDGL a notamment montré une capacité d'insertion en phase fluide dans les membranes hétérogènes des végétaux, un comportement déjà observé au niveau des monocouches hétérogènes de phospholipides et de lipides extraits de globules gras laitiers, aussi bien humains que bovins (Bourlieu et al., 2016). La présence des têtes polaires galactosyles des galactolipides a cependant gêné l'insertion de l'enzyme et l'accès à l'interface hydrophobe, du fait d'un encombrement stérique plus important que dans le cas des têtes polaires de phospholipides. La gPLRP2 ne s'est pas insérée, mais s'est en revanche adsorbée de façon plus homogène en phase fluide en dessous de l'interface des monocouches. L'écartement des têtes et la capacité des chaînes à pouvoir se réorganiser semblent favoriser localement l'adsorption des enzymes.

La présence de microdomaines en phase LC induite par l'hétérogénéité chimique a impacté l'adsorption de certaines lipases chez les systèmes présentant des coexistences de phases LC/LE. Or, il a été rapporté que le « packing » local des monocouches de lipides pouvait impacter ou non la capacité d'adsorption de certaines protéines, et leur rôle dans le métabolisme des lipides (Chièze

et al., 2012). En effet, bien que la pression de surface soit identique en tout point d'un même échantillon, la compacité locale des molécules est variable, et ce phénomène est d'autant plus marqué chez les systèmes présentant des hétérogénéités de phases. L'aire moléculaire des lipides se trouvant dans les microdomaines en phase LC est faible, contrairement à celle des molécules en phase LE, qui présentent une moindre capacité à se compacter sous l'influence de l'insertion de molécules exogènes.

La pression de surface donne donc une indication sur la pression latérale des monocouches, mais ne constitue pas un outil idéal pour décrire et prédire l'insertion et/ou l'adsorption de molécules externes au système, alors que la compressibilité et l'état physique local de l'interface représentent des paramètres qui apparaissent primordiaux. La rDGL montre d'ailleurs une insertion à différents niveaux de hauteur en fonction du packing local dans les monocouches hétérogènes. Dans la littérature, de nombreuses études ont pourtant rapporté l'existence d'une pression critique d'insertion pour les enzymes au niveau des monocouches de substrats (Damodaran, 2015). Des gammes de pression de 15-25, 10-15 et 5-10 mN/m ont notamment été rapportées pour la rDGL, la gPLRP2, et la sPLA2 pancréatique de porc, respectivement (Bénarouche et al., 2013; De Caro et al., 1998; Ransac et al., 1992). Cette pression critique d'insertion peut en effet s'appliquer dans le cas des systèmes lipidiques homogènes (lipides purs, système monophasique), mais pour les systèmes hétérogènes, l'organisation locale des molécules étant différente, elle va drastiquement impacter l'insertion de l'enzyme. Plusieurs facteurs sont donc à considérer pour étudier les mécanismes d'adsorption des lipases digestives humaines : la pression de surface à l'interface, mais également la compressibilité locale de la monocouche. A partir des pressions de surface optimales rapportées pour l'activité respective des lipases étudiées, nous avons pu déterminer des valeurs de coefficients de compressibilité (C^{-1} , mN/m) idéales pour l'insertion de chacune des enzymes, peu

importe la composition de l'interface. Les valeurs de C^{-1} obtenues à différentes pressions de surface (10, 15 et 20 mN/m pour l'insertion optimale de la sPLA2, gPLRP2 et rDGL, respectivement) pour chacun des systèmes modèles étudiés sont résumées dans le **Tableau 12**. Pour chaque pression de surface considérée, les systèmes ont montré des gammes de C^{-1} équivalentes. Il serait donc possible de générer des mélanges lipidiques dans des fenêtres de compressibilité idéale pour l'insertion des enzymes digestives humaines en fonction de leurs propriétés, peu importe la composition de l'interface, améliorant ainsi l'absorption dans la lumière intestinale des AGL libérés. Ce résultat ouvre la voie vers le développement d'applications spécifiques, comme par exemple le design de systèmes de délivrances membranaires vers des zones ciblées du tractus gastro-intestinal.

Tableau 12 – Valeurs de coefficient de compressibilité (C^{-1} , mN/m) obtenues à 10, 15, et 20 mN/m pour chacune des monocouches modèles étudiées (GL, GL/DPPC, GL/DPPC/pS). La détermination du C^{-1} à partir des isothermes de compression est explicitée dans Kergomard et al. (2022).

π (mN/m)	C^{-1} (mN/m)		
	GL	GL/DPPC	GL/DPPC/pS
10	$36,0 \pm 2,8$	$37,0 \pm 2,8$	$34,0 \pm 4,2$
	(34 – 38)	(35 – 39)	(31 – 37)
15	$42,0 \pm 7,1$	$44,5 \pm 0,7$	$43,5 \pm 2,1$
	(37 – 47)	(44 – 45)	(42 – 45)
20	$48,0 \pm 2,8$	$47,0 \pm 2,8$	$50,0 \pm 2,8$
	(46 – 50)	(45 – 49)	(48 – 52)

La présence de défauts et de points d'ancrage spécifiques améliore également l'adsorption/insertion de l'enzyme. L'inclusion des phytostérols dans les systèmes lipidiques hétérogènes permet notamment de créer des défauts au niveau des phases LC et de diminuer la tension de ligne au niveau des frontières de phases, améliorant de façon notable l'adsorption des

CHAPITRE 6

enzymes digestives à ce niveau. Les défauts structuraux présents dans les substrats en monocouche ont en effet déjà été montrés comme étant des sites préférentiels d'adsorption de certaines enzymes à l'interface (Prim et al., 2006). L'effet de solvation du MGDG sur les molécules lipidiques rigides a également permis de créer des zones de miscibilité complexe, mais son inclusion dans les phases LC pourrait ralentir l'action de la PLRP2 à ce niveau, étant donné l'adsorption préférentielle de l'enzyme en phase LE. L'hétérogénéité chimique et physique des membranes naturelles, végétales ou animales, favorise donc globalement leur dégradation par les enzymes digestives humaines, mais peut induire, suivant les molécules dominantes et le jeu de spécificité de substrats, une phase de latence ralentissant l'initiation de la lipolyse.

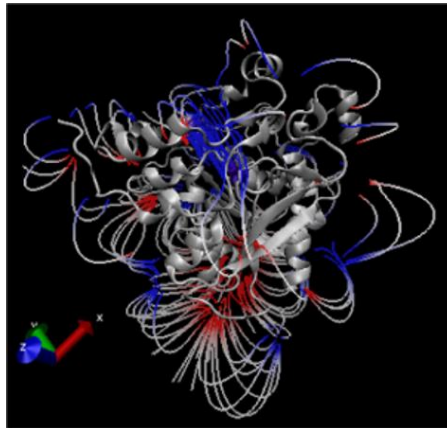


Figure 59 – Représentation du potentiel électrostatique de surface de la structure 3D ruban ouverte de la rDGL, calculé à pH 5. Les potentiels électrostatiques de surface sont représentés avec un code couleur sur une surface de van der Waals en utilisant le système graphique moléculaire PyMOL (version 1.3, Schrödinger, LLC). Les couleurs rouge et bleue représentent les charges nettes négatives et positives, tandis que la couleur blanche représente les positions globalement neutres, respectivement. A partir de Bourlieu et al. (2016).

La présence de lipides chargés à l'interface a également été montrée comme influençant la capacité d'adsorption et/ou d'insertion des lipases digestives humaines ou analogues. Dans le cas de la rDGL, la présence de charges négatives favorise l'adsorption du site de reconnaissance interfacial (IRS) hydrophobe entourant le site actif, *via* une couronne de résidus basiques entourant cet IRS.

La modélisation du potentiel de surface de la rDGL (**Figure 59**) montre en effet la présence de charges positives sur l'extérieur de l'IRS, ainsi que de patches de charges négatives à l'opposé de l'entrée du site actif, permettant l'attraction de l'anneau chargé positivement vers l'interface concentrant des charges négatives. Une distribution similaire de charges est également retrouvée chez la HGL, laissant présager une insertion également facilitée dans le cas d'une interface négative. Dans le cas de la gPLRP2, la présence de lipides chargés (SQDG, PG, et par extrapolation PE, PI) semble également pouvoir améliorer son adsorption et accélérer la dégradation de la monocouche. Le processus d'adsorption des enzymes digestives semble donc globalement modulé par les interactions hydrophobes, mais également par les interactions électrostatiques, qui jouent un rôle clé dans la première étape des interactions protéines/membranes.

Concernant le processus de dégradation des lipides, la génération de produits de digestion par les enzymes digestives module l'adsorption des lipases, et notamment par libération des AGL (Bhat & Brockman, 1982; Sugar et al., 2001). La dégradation des substrats lipidiques et la libération des produits de digestion induit en effet une modification de l'organisation interfaciale des monocouches lipidiques, et conduit à une diminution de la tension de ligne en améliorant la miscibilité entre les phases. Les produits de lipolyse générés montrent une tendance à rester proche du site d'adsorption des lipases et phospholipases en formant des nanodomains, favorisant ou empêchant l'action de l'enzyme en fonction de ses propriétés. Dans le cas de la rDGL, l'environnement acide (pH 5) induit une protonation des produits de digestion, qui encombrant davantage la surface des gouttelettes que pour les autres lipases agissant à pH neutre et empêchent ainsi son adsorption. Une adsorption plus faible de l'enzyme avait en effet déjà été observée au niveau des monocouches modèles de phospholipides en présence d'AGL (Bourlieu et al., 2016). Dans le cas des monocouches de galactolipides, le fort caractère insaturé des produits de digestion

a tendance à entraîner leur désorption en sous-phase. La formation d'un réseau protéique a néanmoins été observée autour des domaines supposés enrichis en AGL dans les monocouches homogènes, alors qu'un tel phénomène n'a pas été observé dans les systèmes hétérogènes à l'interface.

V – Intérêt des extraits de lipides végétaux comme sources d'AO et vecteurs d' $\omega 3$?

Les extraits lipidiques végétaux sont riches en lipides polaires variés (galactolipides, phospholipides), et concentrent des quantités importantes d'AGPI $\omega 3$. La dégradation de ces lipides par les enzymes digestives spécifiques dans le tractus gastrointestinal humain pourrait ouvrir la voie vers des applications de délivrance vers des tissus cibles de l'organisme. En particulier, la PLRP2 pourrait être utilisée pour produire des fractions lipidiques et des AGL riches en AGPI $\omega 3$ C16:3 ou C18:3, trouvés en quantité importante chez les galactolipides, et dont la bioaccessibilité a été montrée *in vitro* (Wattanakul et al., 2022). Néanmoins, la bioaccessibilité et la biodisponibilité des AG et des nutriments lipophiles des chloroplastes isolés demandent encore à être établies chez l'Homme. Les lécithines végétales, riches en phospholipides, ont également déjà été proposées chez la souris comme des vecteurs d'ALA efficaces et prometteurs, en plus de leurs propriétés d'émulsifiants naturels alimentaires sans effet néfaste notable sur la santé métabolique, contrairement à certains émulsifiants synthétiques (Robert, 2021). La supplémentation en lécithines végétales permettrait en effet d'augmenter significativement l'absorption intestinale des lipides, un effet dose-réponse ayant été mis en évidence chez le rat pour des doses de supplémentation représentant à minima 30% des lipides totaux (supérieure à une dose nutritionnelle). En particulier, la supplémentation en lécithines de colza, riches en AGPI $\omega 3$, chez le rat, a permis d'accélérer la biodisponibilité de l'ALA en engendrant une apparition plus précoce

des lipides dans la lymphe, mais également d'augmenter dans le plasma en période postprandiale sa bioconversion en ses dérivés à longues chaînes, dont les effets physiologiques bénéfiques sur l'organisme ont déjà été montrés (Robert, Couëdelo, Knibbe, et al., 2020; Shahidi & Ambigaipalan, 2018). Une question demeure néanmoins sur la généralisation de ces effets aux lécithines végétales de manière générale chez l'Homme. L'utilisation des lécithines en tant qu'émulsifiants naturels impacte également l'activité des lipases digestives, et ce, en fonction de leur composition et du type de phospholipide. Des études *in vitro* ont en effet montré que les émulsions stabilisées par la lécithine de soja engendraient une lipolyse plus rapide et plus étendue que celles stabilisées par du Tween 80 ou du caséinate de sodium (Couëdelo et al., 2015; Vors et al., 2012). A contrario, l'hydrolyse des lipides était plus importante dans le cas d'une émulsification par des lipides polaires laitiers, ce qui peut s'expliquer par la présence de sphingomyéline, par ailleurs absente des lécithines végétales (Lecomte et al., 2016).

En plus de leur potentiel en tant que vecteurs d'ALA, les lipides polaires végétaux (galactolipides, phospholipides) présentent des activités AO et sont plus stables à l'oxydation que les TAG. La capacité antioxydante et l'activité de chélation des métaux des chlorophylles, souvent associées aux lipides polaires dans les membranes végétales, en font notamment d'excellents candidats pour leur utilisation sous forme de fragments AO dans des applications alimentaires. Leur organisation de phase ($L\alpha$ pour le DGDG) leur confère également une stabilité physique et augmente leur résistance à l'oxydation. Les phospholipides des lécithines végétales possèdent également des propriétés antioxydantes naturelles, la charge négative des groupements phosphates pouvant se lier aux métaux pro-oxydants, inhibant ainsi l'oxydation des lipides (Cui & Decker, 2016). En outre, les phospholipides interviennent dans la régénération de la vitamine E (Barouh et al., 2022). Néanmoins, il convient de noter que les propriétés antioxydantes des lécithines dépendent de leurs

CHAPITRE 6

propriétés intrinsèques, mais sont également modulées par les différents procédés d'extraction (Li et al., 2018).

De manière générale, les assemblages de lipides sous la forme d'objets microniques (OB, chloroplastes) présentent des structures natives complexes, qui les protègent des déstabilisations physique et chimique *in vivo*. Dans un contexte physiologique de digestion, ces assemblages résistent à l'hydrolyse dans le compartiment gastrique, et atteignent le duodénum en conservant globalement leurs propriétés d'assemblage.

Les lipides membranaires et les assemblages végétaux constituent donc des sources intéressantes d'ingrédients fonctionnels et bioactifs, et représentent des composés très prometteurs avec une vaste gamme d'applications pour vectoriser des AGPI $\omega 3$ et rééquilibrer le régime humain. Des assemblages qui peuvent résister jusqu'à des sites distants intestinaux sont certes d'intérêt pour pouvoir véhiculer des constituants ou pour leurs effets prébiotiques potentiels, mais ouvrent aussi des questions concernant leur tolérance intestinale. Ils peuvent en effet moduler la balance perméabilité/inflammation intestinale et perturber certains équilibres. Ces assemblages contiennent en outre des phytostérols, qui, en plus de leur propriété structurelle, présentent un intérêt nutritionnel de par leur effet hypocholestérolémiant chez l'Homme, soulignant l'intérêt de leur utilisation dans les applications alimentaires (St-Onge & Jones, 2003).

CHAPITRE 7

CONCLUSION GÉNÉRALE

CHAPITRE 7 – Conclusion générale

Les résultats obtenus dans ce travail de recherche viennent apporter une compréhension approfondie des mécanismes d'interactions entre les enzymes digestives et les assemblages membranaires végétaux. En particulier, ce travail est pionnier en ce qui concerne la digestion des monocouches hétérogènes de galactolipides et de phospholipides par de proches analogues des principales enzymes responsables de la dégradation gastro-intestinale des lipides végétaux chez l'Homme. L'originalité de cette étude repose sur une caractérisation poussée du comportement interfacial de systèmes lipidiques végétaux modèles biomimétiques, ou issus de matrices naturelles, présentant une hétérogénéité chimique induisant une hétérogénéité physique. La singularité de composition de ces systèmes influence les propriétés physico-chimiques des assemblages lipidiques et apporte une meilleure compréhension des relations composition-structures-propriétés biologiques des membranes végétales naturelles.

La digestibilité des assemblages lipidiques végétaux hétérogènes naturels a également été étudiée pour la première fois par de proches analogues des principales enzymes digestives humaines à l'échelle moléculaire, mais également à l'échelle de l'objet micronique. Ce travail a permis de rendre compte de la spécificité de substrat des lipases et phospholipase étudiées (rDGL, sPLA2-IB, gPLRP2) sur les lipides polaires végétaux. En particulier, les activités galactolipase, mais également phospholipase A1 de la gPLRP2, ont été observées au niveau des systèmes hétérogènes de galactolipides et de phospholipides. La genericité d'action de ces enzymes par rapport à l'état physique des membranes (adsorption préférentielle en zone fluide et au niveau des défauts dans les phases organisées où la ligne de tension est abaissée) a également été prouvée, et a conforté les résultats obtenus sur la lipase gastrique sur des systèmes hétérogènes modèles animaux (globules gras laitiers). Il semble donc primordial pour étudier les mécanismes d'action des biocatalyseurs

de prendre en compte l'état physique du substrat à l'échelle nanoscopique, en plus des différents niveaux d'échelles. Outre la pression de surface à l'interface des assemblages lipidiques et la présence de molécules chargées, nous démontrons ici que la compressibilité locale, qui renseigne sur l'organisation des molécules et leur capacité à se compacter pour permettre l'insertion de molécules exogènes, est un paramètre primordial pour étudier les interactions lipase-substrat. Ainsi, des fenêtres de compressibilité idéale pour l'insertion des enzymes digestives, peu importe la composition de l'interface, ont été mises en évidence dans ce travail. Ces fenêtres pourraient améliorer la bioaccessibilité et la biodisponibilité des AGL libérés, et ouvrent le champ libre au développement d'applications de délivrances ciblées. La libération des AGL est toutefois un paramètre à prendre en compte, puisque leur accumulation à proximité des enzymes digestives humaines module leur activité. *In vivo*, la présence des sels biliaires permet de décharger les interfaces lipidiques encombrées par les AGL, et ce paramètre a été pris en compte en systèmes *in vitro* statiques, permettant de s'affranchir de l'inhibition des sels biliaires sur l'action enzymatique et la dégradation des assemblages microniques.

Nous démontrons ici qu'au niveau des interfaces lipidiques, une forte teneur en groupements acyles polyinsaturés peut amplifier la compressibilité locale et être un atout pour l'insertion des lipases digestives. Néanmoins, ces systèmes sont généralement plus sensibles à l'oxydation chimique. Dans notre étude, des interfaces stabilisées par des galactolipides et des molécules AO naturelles (par exemple la chlorophylle et les tocophérols) peuvent donc être des atouts pour la génération d'assemblages lipidiques résistants à la déstabilisation chimique et présentant des propriétés nutritionnelles d'intérêt. Globalement, les assemblages lipidiques végétaux sont en effet riches en lipides polaires et particulièrement en galactolipides, qui concentrent des quantités importantes d'AGPI $\omega 3$, et présentent des propriétés émulsifiantes et antioxydantes naturelles. L'activité

galactolipase de la PLRP2 purifiée au niveau des monocouches membranaires modèles modulables, mais également au niveau des assemblages membranaires naturels, ouvre la voie vers le développement d'alternatives alimentaires végétales pour vectoriser des AGPI $\omega 3$ bioaccessibles, et rééquilibrer ainsi les régimes alimentaires humains et animaux.

Limites et perspectives

Dans ce travail, l'approche mécanistique des interactions entre les enzymes digestives et des substrats modèles et naturels nous a permis de vérifier la généralité des interactions enzymes-substrats tout en accédant à une caractérisation fine de l'état physique des systèmes. Toutefois, certains aspects n'ont pas été explorés dans ce travail, et mériteraient de l'être, comme par exemple :

- **Les synergies d'action des lipases digestives.** Dans ce travail, l'activité des enzymes a été étudiée individuellement, alors que leurs actions coordonnées pourraient modifier l'organisation interfaciale et les cinétiques d'hydrolyse des lipides polaires végétaux. Les actions simultanées de la rDGL et de la lipase pancréatique sur les OB d'amandes ont néanmoins été étudiées en microfluidique, mais ce travail demande à être approfondi sur d'autres sources d'assemblages végétaux en utilisant un cocktail enzymatique plus complexe. Par exemple, l'action de la CEH n'a pas été étudiée dans ce travail, alors qu'elle agit en synergie avec la PLRP2 sur les galactolipides.
- **L'effet d'inhibition d'autres constituants membranaires** que les phytostérols, comme par exemple des molécules AO, sur l'activité enzymatique. En particulier, le comportement interfacial et l'activité enzymatique du complexe PTL-coPTL au niveau des lipides végétaux pourraient être approfondis, des premiers résultats ayant déjà été obtenus dans ce travail sur les monocouches de galactolipides et de phospholipides. La difficulté

d'interprétation rencontrée dans cette étude réside principalement dans l'association entre la lipase et sa colipase, toutes deux tensioactives, multipliant le nombre de molécules adsorbées à l'interface des monocouches, et ne permettant pas une compréhension claire des mécanismes d'interactions entre cette enzyme et son cofacteur avec les lipides polaires végétaux. Dans la littérature, le complexe PTL-coPTL a également été montré comme moins actif sur les chaînes acyles polyinsaturées. Il aurait également pu être intéressant de déterminer l'impact de la teneur en pigments AO sur l'activité des enzymes digestives, certaines molécules AO pouvant inhiber l'activité de certaines enzymes lipolytiques, comme la PTL. Nos systèmes modèles et naturels contenaient de la chlorophylle, mais que nous n'avons pas quantifié.

- **L'activité des enzymes digestives humaines.** Dans ce travail, les enzymes utilisées, bien que purifiées, étaient issues de sources analogues et partageaient une structure et une séquence d'acides aminés proches des lipases et phospholipases humaines. Néanmoins, certaines différences existent et pourraient impacter sur les capacités d'adsorption et la spécificité de substrat entre les enzymes humaines et analogues. Par exemple, la gPLRP2 et la hPLRP2 présentent des différences de conformation au niveau de leur site actif, pouvant impacter sur leur capacité à accommoder les substrats et leur activité d'hydrolyse.

D'autres outils et études pourraient permettre d'aller plus loin :

- Nous avons été capables de former des monocouches de galactolipides riches en AGPI stables à l'oxydation sur des temps courts de cinétique (1h), nous permettant de nous affranchir de travailler dans des **conditions inertes**, plus lourdes à mettre en place. Néanmoins, si de futurs travaux sont réalisés sur des sources photosynthétiques riches en AGPI-LC (EPA, DHA), particulièrement sensibles à l'oxydation, il sera nécessaire de

systematiser les études sous atmosphère inerte, en utilisant un montage similaire à celui utilisé dans le chapitre 3.II.

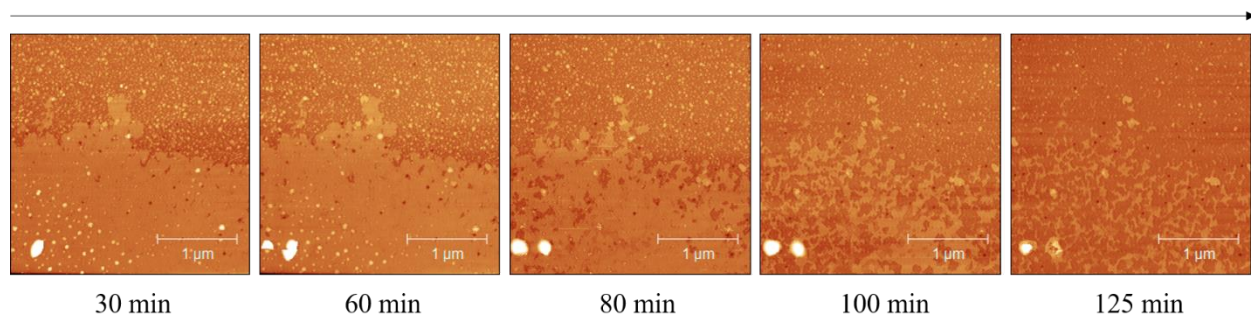


Figure 60 - Images obtenues par AFM-cellule liquide ($3 \times 3 \mu\text{m}^2$) de la dégradation cinétique par la gPLRP2 d'une bicouche lipidique obtenue par fusion de liposomes modèles GL/DPPC/pS

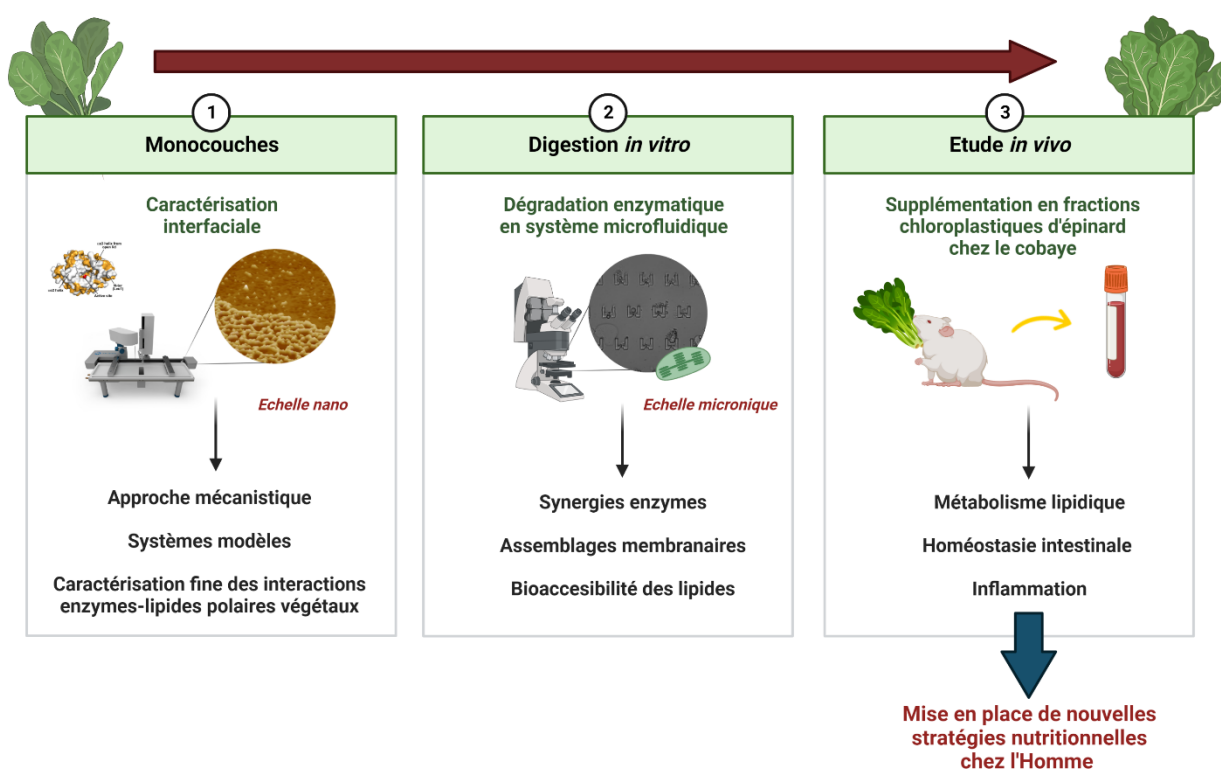
- Afin de compléter l'approche en monocouche, il aurait également été intéressant d'étudier la dégradation enzymatique de vésicules lipidiques en utilisant l'**AFM à haute vitesse ou de plus haute résolution temporelle**, ou encore un **couplage AFM/fluorescence** en travaillant avec l'auto-fluorescence naturelle de la chlorophylle. Ce travail a été initié à la fin de ma thèse *via* une collaboration avec le Centre de Biochimie Structurale (CBS) de Montpellier, ce qui a permis d'étudier par AFM-cellule liquide la dégradation de bicouches lipidiques après fusion de liposomes modèles GL/DPPC/pS par la gPLRP2 (**Figure 60**) et la sPLA2-IB. En effet, bien que certaines organelles comportent des membranes en monocouche dans la nature, la majorité sont entourées d'une bicouche, et il serait intéressant d'obtenir des informations sur les niveaux d'insertions des enzymes lipolytiques et l'étendue de la dégradation de ces systèmes. Continuer ces investigations est donc une perspective proche, qui a déjà été initiée sur ma thèse.
- L'utilisation d'une **cuve de Langmuir à ordre 0** permettant un apport continu en substrat (excès) à pression constante permettrait également d'apporter une caractérisation fine du

suivi cinétique en s'affranchissant du biais apporté par l'excès d'enzyme dans nos expériences en monocouche. Un tel travail permettrait notamment de faire le lien entre les résultats obtenus à l'échelle nanoscopique en monocouche *versus* microscopique en « bulk ».

- Le développement de **systèmes microfluidiques de digestion *in vitro*** a été initié sur le projet GLIMMER (GaLactolipids from Microalgae as a new source of oMEga-3 to Rebalance human diet – co-encadrement d'une stagiaire de M2). Des puces microfluidique ont notamment été fabriquées à Rennes, dans l'optique de caractériser optiquement la dégradation de gouttelettes lipidiques bloquées dans des puits par l'action successive des enzymes digestives. Ce travail a été initié au cours de ma thèse, et pourrait par la suite faire l'objet d'un futur projet de recherche. Des tests d'observation en microscopie confocale de la dégradation par la gPLRP2 de liposomes marqués ont notamment été réalisés. Cet outil de digestion *in vitro* représente un réel potentiel pour l'étude des synergies entre les enzymes digestives et la persistance des assemblages, ces deux paramètres ayant un impact crucial sur l'absorption intestinale subséquente des acides gras.
- Au vu des résultats obtenus dans cette thèse, il semble maintenant intéressant d'effectuer une **étude nutritionnelle** chez l'animal et l'humain en se focalisant sur les effets de la supplémentation en galactolipides riches en ALA sur la bioaccessibilité et biodisponibilité subséquente de cet AGPI ω 3. Un projet *in vivo* en collaboration avec C. Vors a par ailleurs obtenu une subvention du GLN (Groupe Lipides et Nutrition) et doit être mis en place, afin de déterminer l'impact de la supplémentation en fractions chloroplastiques chez la souris en surpoids, et d'évaluer le potentiel des galactolipides dans les stratégies nutritionnelles préventives dans la lutte contre l'obésité et les maladies métaboliques. Cette étude

permettrait de compléter les efforts en cours à l'international pour démontrer l'intérêt des sources photosynthétiques riches en galactolipides et en AGPI $\omega 3$ en nutrition humaine.

Ce travail ouvre donc des perspectives tant sur des recherches fondamentales nécessitant des outils biophysiques pour des approches fines de mécanistique, que sur des recherches en nutrition sur des modèles animaux.



Références

- Abdullah, Weiss, J., & Zhang, H. (2020). Recent advances in the composition, extraction and food applications of plant-derived oleosomes. *Trends in Food Science & Technology*, *106*, 322-332. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.029>
- Ackman, R. G. (1967). Characteristics of the fatty acid composition and biochemistry of some fresh-water fish oils and lipids in comparison with marine oils and lipids. *Comparative Biochemistry and Physiology*, *22*(3), 907-922. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(67\)90781-5](https://doi.org/10.1016/0010-406X(67)90781-5)
- Akhavan, S., Assadpour, E., Katouzian, I., & Jafari, S. M. (2018). Lipid nano scale cargos for the protection and delivery of food bioactive ingredients and nutraceuticals. *Trends in Food Science & Technology*, *74*, 132-146. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.02.001>
- Albertsson, P.-Å., Köhnke, R., Emek, S. C., Mei, J., Rehfeld, J. F., Åkerlund, H.-E., & Erlanson-Albertsson, C. (2007). Chloroplast membranes retard fat digestion and induce satiety : Effect of biological membranes on pancreatic lipase/co-lipase. *Biochemical Journal*, *401*(Pt 3), 727-733. <https://doi.org/10.1042/BJ20061463>
- Alekseeva, A. S., Volynsky, P. E., Krylov, N. A., Chernikov, V. P., Vodovozova, E. L., & Boldyrev, I. A. (2021). Phospholipase A2 way to hydrolysis : Dint formation, hydrophobic mismatch, and lipid exclusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1863*(1), 183481. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183481>
- Aloulou, A., Rodriguez, J. A., Fernandez, S., van Oosterhout, D., Puccinelli, D., & Carrière, F. (2006). Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1761*(9), 995-1013. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.06.009>

- Amara, S., Barouh, N., Lecomte, J., Lafont, D., Robert, S., Villeneuve, P., De Caro, A., & Carrière, F. (2010). Lipolysis of natural long chain and synthetic medium chain galactolipids by pancreatic lipase-related protein 2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(4), 508-516.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.01.003>
- Amara, S., Lafont, D., Fiorentino, B., Boullanger, P., Carrière, F., & De Caro, A. (2009). Continuous measurement of galactolipid hydrolysis by pancreatic lipolytic enzymes using the pH-stat technique and a medium chain monogalactosyl diglyceride as substrate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(10), 983-990. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.05.002>
- Amara, S., Lafont, D., Parsiegla, G., Point, V., Chabannes, A., Rousset, A., & Carrière, F. (2013). The galactolipase activity of some microbial lipases and pancreatic enzymes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(4), 442-451.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201300004>
- Andersson, L., Bratt, C., Arnoldsson, K. C., Herslöf, B., Olsson, N. U., Sternby, B., & Nilsson, A. (1995). Hydrolysis of galactolipids by human pancreatic lipolytic enzymes and duodenal contents. *Journal of Lipid Research*, 36(6), 1392-1400.
- Saisine n° 2006-SA-0359, ANC AG, ANSES*, (2011) (testimony of Anonymous ANSES).
<https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2006sa0359.pdf>
- Arab-Tehrany, E., Jacquot, M., Gaiani, C., Imran, M., Desobry, S., & Linder, M. (2012). Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Trends in Food Science & Technology*, 25(1), 24-33.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.12.002>

RÉFÉRENCES

- 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. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 70(6), 1096-1106. <https://doi.org/10.1093/ajcn/70.6.1096>
- Azzam, R. M. A., Bashara, N. M., & Ballard, S. S. (1978). Ellipsometry and Polarized Light. *Physics Today*, 31(11), 72-72. <https://doi.org/10.1063/1.2994821>
- 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. *Therapeutic Delivery*, 3(1), 105-124. <https://doi.org/10.4155/tde.11.138>
- Balashev, K., Jensen, T. R., Kjaer, K., & Bjørnholm, T. (2001). Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part I. Atomic force microscopy. *Biochimie*, 83(5), 387-397. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01264-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01264-0)
- Balashev, K., John DiNardo, N., Callisen, T. H., Svendsen, A., & Bjørnholm, T. (2007). Atomic force microscope visualization of lipid bilayer degradation due to action of phospholipase A2 and Humicola lanuginosa lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(1), 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.028>
- Barouh, N., Bourlieu-Lacanal, C., Figueroa-Espinoza, M. C., Durand, E., & Villeneuve, P. (2022). Tocopherols as antioxidants in lipid-based systems : The combination of chemical and physicochemical interactions determines their efficiency. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 642-688. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12867>
- Barre, A., Simplicien, M., Cassan, G., Benoist, H., & Rougé, P. (2018). Oil bodies (oleosomes) : Occurrence, structure, allergenicity. *Revue Française d’Allergologie*, 58(8), 574-580. <https://doi.org/10.1016/j.reval.2018.10.005>

- Beck, J. G., Mathieu, D., Loudet, C., Buchoux, S., & Dufourc, E. J. (2007). Plant sterols in "rafts" : A better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB Journal*, *21*(8), 1714-1723. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7809com>
- Beisson, F., Ferté, N., Bruley, S., Voultoury, R., Verger, R., & Arondel, V. (2001). Oil-bodies as substrates for lipolytic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1531*(1-2), 47-58. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(01\)00086-5](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(01)00086-5)
- Bénarouche, A., Point, V., Parsiegl, G., Carrière, F., & Cavalier, J.-F. (2013). New insights into the pH-dependent interfacial adsorption of dog gastric lipase using the monolayer technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *111*, 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.06.025>
- Bénarouche, A., Sams, L., Bourlieu, C., Vié, V., Point, V., Cavalier, J. F., & Carrière, F. (2017). Chapter Eleven—Studying Gastric Lipase Adsorption Onto Phospholipid Monolayers by Surface Tensiometry, Ellipsometry, and Atomic Force Microscopy. In M. H. Gelb (Éd.), *Methods in Enzymology* (Vol. 583, p. 255-278). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.09.039>
- Berge, B., & Renault, A. (1993). Ellipsometry Study of 2D Crystallization of 1-Alcohol Monolayers at the Water Surface. *Europhysics Letters (EPL)*, *21*(7), 773-777. <https://doi.org/10.1209/0295-5075/21/7/010>
- Bernbäck, S., Bläckberg, L., & Hernell, O. (1990). The complete digestion of human milk triacylglycerol in vitro requires gastric lipase, pancreatic colipase-dependent lipase, and bile salt-stimulated lipase. *The Journal of Clinical Investigation*, *85*(4), 1221-1226. <https://doi.org/10.1172/JCI114556>

RÉFÉRENCES

- 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(5), 945-977. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12097>
- Bettini, S., Santino, A., Giancane, G., & Valli, L. (2014). Reconstituted oil bodies characterization at the air/water and at the air/oil/water interfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 122, 12-18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.044>
- Bhat, & Brockman, H. L. (1982). Lipid hydrolyses catalyzed by pancreatic cholesterol esterase. Regulation by substrate and product phase distribution and packing density. *Biochemistry*, 21(7), 1547-1552. <https://doi.org/10.1021/bi00536a013>
- Bhat, R. A., & Panstruga, R. (2005). Lipid rafts in plants. *Planta*, 223(1), 5. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0096-9>
- Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, Ch. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 930-933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- Bishop, D. G., Kenrick, J. R., Bayston, J. H., Macpherson, A. S., & Johns, S. R. (1980). Monolayer properties of chloroplast lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 602(2), 248-259. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(80\)90308-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(80)90308-9)
- Blodgett. (1935). Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface | Journal of the American Chemical Society. *Journal of the American Chemical Society*, 57(6), 1007-1022. <https://doi.org/10.1021/ja01309a011>
- Blodgett, & Langmuir, I. (1937). Built-Up Films of Barium Stearate and Their Optical Properties. *Physical Review*, 51(11), 964-982. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.51.964>
- Bolanos-Garcia, V. M., Renault, A., & Beaufils, S. (2008). Surface Rheology and Adsorption Kinetics Reveal the Relative Amphiphilicity, Interfacial Activity, and Stability of Human

- Exchangeable Apolipoproteins. *Biophysical Journal*, 94(5), 1735-1745.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.115220>
- Borel, P., Armand, M., & Ythier, P. (1994). Digestion and Absorption of Tube-Feeding Emulsions With Different Droplet Sizes and Compositions in the Rat. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, 18(6).
- 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(5, Part 1), 954-962. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(80\)90777-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(80)90777-5)
- Borgström, B. (1993). Phosphatidylcholine as substrate for human pancreatic phospholipase A2. Importance of the physical state of the substrate. *Lipids*, 28(5), 371-375.
<https://doi.org/10.1007/BF02535932>
- Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., MacAskill, A., Napier, J. A., Beale, M. H., Lilley, K. S., & Dupree, P. (2005). Analysis of Detergent-Resistant Membranes in Arabidopsis. Evidence for Plasma Membrane Lipid Rafts. *Plant Physiology*, 137(1), 104-116. <https://doi.org/10.1104/pp.104.053041>
- Botet-Carreras, A., Montero, M. T., Domènech, Ò., & Borrell, J. H. (2019). Effect of cholesterol on monolayer structure of different acyl chained phospholipids. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 374-383. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.040>
- Bottier, C. (2006). *Caractérisation des puroindolines, des galactolipides du blé et de leurs interactions : Mesures physiques aux interfaces* [Phdthesis, Université Rennes 1].
<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00148405>
- Bottier, C., Géan, J., Artzner, F., Desbat, B., Pézolet, M., Renault, A., Marion, D., & Vié, V. (2007). Galactosyl headgroup interactions control the molecular packing of wheat lipids

RÉFÉRENCES

- in Langmuir films and in hydrated liquid-crystalline mesophases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1768(6), 1526-1540. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.02.021>
- Bourlieu, C., Bouhallab, S., & Lopez, C. (2009). Biocatalyzed modifications of milk lipids : Applications and potentialities. *Trends in Food Science & Technology*, 20(10), 458-469. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.005>
- Bourlieu, C., Mahdoueni, W., Paboeuf, G., Gicquel, E., Ménard, O., Pezennec, S., Bouhallab, S., Deglaire, A., Dupont, D., Carrière, F., & Vié, V. (2020). Physico-chemical behaviors of human and bovine milk membrane extracts and their influence on gastric lipase adsorption. *Biochimie*, 169, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.12.003>
- Bourlieu, C., Ménard, O., Bouzerzour, K., Mandalari, G., Macierzanka, A., Mackie, A. R., & Dupont, D. (2014). Specificity of infant digestive conditions : Some clues for developing relevant in vitro models. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(11), 1427-1457. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.640757>
- Bourlieu, C., Ménard, O., De La Chevasnerie, A., Sams, L., Rousseau, F., Madec, M.-N., Robert, B., Deglaire, A., Pezennec, S., Bouhallab, S., Carrière, F., & Dupont, D. (2015). The structure of infant formulas impacts their lipolysis, proteolysis and disintegration during in vitro gastric digestion. *Food Chemistry*, 182, 224-235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.001>
- Bourlieu, C., Paboeuf, G., Chever, S., Pezennec, S., Cavalier, J.-F., Guyomarc'h, F., Deglaire, A., Bouhallab, S., Dupont, D., Carrière, F., & Vié, V. (2016). Adsorption of gastric lipase onto multicomponent model lipid monolayers with phase separation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 143, 97-106. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.03.032>
- Bourlieu, C., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Madec, M.-N., & Bouhallab, S. (2012). Hydrolysis of native milk fat globules by microbial lipases : Mechanisms and modulation of

- interfacial quality. *Food Research International*, 49(1), 533-544.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.036>
- Brentel, I., Selstam, E., & Lindblom, G. (1985). Phase equilibria of mixtures of plant galactolipids. The formation of a bicontinuous cubic phase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 812(3), 816-826. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(85\)90277-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(85)90277-9)
- Brezesinski, G., & Möhwald, H. (2003). Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 100-102, 563-584.
[https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(02\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(02)00071-4)
- Browse, J., & Somerville, C. (1991). Glycerolipid Synthesis : Biochemistry and Regulation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42(1), 467-506.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.002343>
- Cacas, J.-L., Furt, F., Le Guédard, M., Schmitter, J.-M., Buré, C., Gerbeau-Pissot, P., Moreau, P., Bessoule, J.-J., Simon-Plas, F., & Mongrand, S. (2012). Lipids of plant membrane rafts. *Progress in Lipid Research*, 51(3), 272-299. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.04.001>
- Callisen, T. H., & Talmon, Y. (1998). Direct imaging by cryo-TEM shows membrane break-up by phospholipase A2 enzymatic activity. *Biochemistry*, 37(31), 10987-10993.
<https://doi.org/10.1021/bi980255d>
- Canaan, S., Roussel, A., Verger, R., & Cambillau, C. (1999). Gastric lipase : Crystal structure and activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1441(2), 197-204. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00160-2](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00160-2)
- Cañabate-Díaz, B., Segura Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Belmonte Vega, A., Garrido Frenich, A., Martínez Vidal, J. L., & Duran Martos, J. (2007). Separation and

RÉFÉRENCES

- determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry*, 102(3), 593-598.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.05.038>
- Carey, M. C., Small, D. M., & Bliss, C. M. (1983). Lipid digestion and absorption. *Annual Review of Physiology*, 45, 651-677. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.45.030183.003251>
- Carrière, F., Moreau, H., Raphel, V., Laugier, R., Benicourt, C., Junien, J. L., & Verger, R. (1991). Purification and biochemical characterization of dog gastric lipase. *European Journal of Biochemistry*, 202(1), 75-83. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16346.x>
- Carrière, F., Renou, C., Ransac, S., Lopez, V., De Caro, J., Ferrato, F., De Caro, A., Fleury, A., Sanwald-Ducray, P., Lengsfeld, H., Beglinger, C., Hadvary, P., Verger, R., & Laugier, R. (2001). Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(1), G16-G28. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.1.G16>
- Castro, V., Dvinskikh, S. V., Widmalm, G., Sandström, D., & Maliniak, A. (2007). NMR studies of membranes composed of glycolipids and phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(10), 2432-2437.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.05.010>
- Chahinian, H., Snabe, T., Attias, C., Fojan, P., Petersen, S. B., & Carrière, F. (2006). How Gastric Lipase, an Interfacial Enzyme with a Ser-His-Asp Catalytic Triad, Acts Optimally at Acidic pH. *Biochemistry*, 45(3), 993-1001. <https://doi.org/10.1021/bi0518803>
- Chen, B., McClements, D. J., Gray, D. A., & Decker, E. A. (2012). Physical and oxidative stability of pre-emulsified oil bodies extracted from soybeans. *Food Chemistry*, 132(3), 1514-1520. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.144>

- Chen, Y., Cao, Y., Zhao, L., Kong, X., & Hua, Y. (2014). Macronutrients and Micronutrients of Soybean Oil Bodies Extracted at Different pH. *Journal of Food Science*, 79(7), C1285-C1291. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12516>
- Chen, Y., Lu, Y., Yu, A., Kong, X., & Hua, Y. (2014). Stable Mixed Beverage is Produced from Walnut Milk and Raw Soymilk by Homogenization with Subsequent Heating. *Food Science and Technology Research*, 20(3), 583-591. <https://doi.org/10.3136/fstr.20.583>
- Chen, Y., & Ono, T. (2010). Simple Extraction Method of Non-allergenic Intact Soybean Oil Bodies That Are Thermally Stable in an Aqueous Medium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12), 7402-7407. <https://doi.org/10.1021/jf1006159>
- Chièze, L., Bolanos-Garcia, V. M., Le Caër, G., Renault, A., Vié, V., & Beaufils, S. (2012). Difference in lipid packing sensitivity of exchangeable apolipoproteins apoA-I and apoA-II : An important determinant for their distinctive role in lipid metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(11), 2732-2741. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.05.016>
- Christopoulos, M. V., & Tsantili, E. (2015). Oil composition in stored walnut cultivars—Quality and nutritional value. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(3), 338-348. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400082>
- Chu, B.-S., Gunning, A. P., Rich, G. T., Ridout, M. J., Faulks, R. M., Wickham, M. S. J., Morris, V. J., & Wilde, P. J. (2010). Adsorption of Bile Salts and Pancreatic Colipase and Lipase onto Digalactosyldiacylglycerol and Dipalmitoylphosphatidylcholine Monolayers. *Langmuir*, 26(12), 9782-9793. <https://doi.org/10.1021/la1000446>
- Chu, B.-S., Rich, G. T., Ridout, M. J., Faulks, R. M., Wickham, M. S. J., & Wilde, P. J. (2009). Modulating Pancreatic Lipase Activity with Galactolipids : Effects of Emulsion Interfacial Composition. *Langmuir*, 25(16), 9352-9360. <https://doi.org/10.1021/la9008174>

RÉFÉRENCES

- 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 & Function*, 6(5), 1726-1735. <https://doi.org/10.1039/C5FO00070J>
- Cui, L., & Decker, E. A. (2016). Phospholipids in foods : Prooxidants or antioxidants? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(1), 18-31. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7320>
- Cunnane, S. C., Hamadeh, M. J., Liede, A. C., Thompson, L. U., Wolever, T. M., & Jenkins, D. J. (1995). Nutritional attributes of traditional flaxseed in healthy young adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61(1), 62-68. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.1.62>
- Damodaran, S. (2015). Beyond the hydrophobic effect : Critical function of water at biological phase boundaries — A hypothesis. *Advances in Colloid and Interface Science*, 221, 22-33. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.03.005>
- Dasgupta, A., & Klein, K. (2014). Chapter 2 Methods for Measuring Oxidative Stress in the Laboratory. In *Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements* (p. 19-40). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-405872-9.00002-1>
- De Caro, J., Carrière, F., Barboni, P., Giller, T., Verger, R., & De Caro, A. (1998). Pancreatic lipase-related protein 1 (PLRP1) is present in the pancreatic juice of several species. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1387(1-2), 331-341. [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(98\)00143-5](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(98)00143-5)
- De Caro, J., Eydoux, C., Chérif, S., Lebrun, R., Gargouri, Y., Carrière, F., & De Caro, A. (2008). Occurrence of pancreatic lipase-related protein-2 in various species and its relationship with herbivore diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 150(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.01.007>

- De Caro, J., Sias, B., Grandval, P., Ferrato, F., Halimi, H., Carrière, F., & De Caro, A. (2004). Characterization of pancreatic lipase-related protein 2 isolated from human pancreatic juice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1701(1), 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.06.005>
- De Chirico, S., di Bari, V., Romero Guzmán, M. J., Nikiforidis, C. V., Foster, T., & Gray, D. (2020). Assessment of rapeseed oil body (oleosome) lipolytic activity as an effective predictor of emulsion purity and stability. *Food Chemistry*, 316, 126355. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126355>
- De Haas, G. H., Postema, N. M., Nieuwenhuizen, W., & van Deenen, L. L. M. (1968). Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 159(1), 103-117. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(68\)90248-9](https://doi.org/10.1016/0005-2744(68)90248-9)
- Decker, E. A., McClements, D. J., Bourlieu-Lacanal, C., Durand, E., Figueroa-Espinoza, M. C., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2017). Hurdles in Predicting Antioxidant Efficacy in Oil-in-water emulsions. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 183-194. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.001>
- Deckers, H. (2002). *Products for topical applications comprising oil bodies Patent Application* (Patent N° 20020114820). <https://patents.justia.com/patent/20020114820>
- de La Fournière, L., Ivanova, M. G., Blond, J.-P., Carrière, F., & Verger, R. (1994). Surface behaviour of human pancreatic and gastric lipases. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2(6), 585-593. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(94\)80069-3](https://doi.org/10.1016/0927-7765(94)80069-3)
- Demarco, M., Oliveira de Moraes, J., Matos, Â. P., Derner, R. B., de Farias Neves, F., & Tribuzi, G. (2022). Digestibility, bioaccessibility and bioactivity of compounds from algae. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.004>

RÉFÉRENCES

- Demé, B., Cataye, C., Block, M. A., Maréchal, E., & Jouhet, J. (2014). Contribution of galactoglycerolipids to the 3-dimensional architecture of thylakoids. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(8), 3373-3383. <https://doi.org/10.1096/fj.13-247395>
- Dervichian, D. G. (1939). Changes of Phase and Transformations of Higher Order in Monolayers. *The Journal of Chemical Physics*, 7(10), 931-948. <https://doi.org/10.1063/1.1750347>
- Deshpande, S., Caspi, Y., Meijering, A. E. C., & Dekker, C. (2016). Octanol-assisted liposome assembly on chip. *Nature Communications*, 7(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/ncomms10447>
- de Souza, L. M., Sassaki, G. L., Romanos, M. T. V., & Barreto-Bergter, E. (2012). Structural Characterization and Anti-HSV-1 and HSV-2 Activity of Glycolipids from the Marine Algae *Osmundaria obtusiloba* Isolated from Southeastern Brazilian Coast. *Marine Drugs*, 10(4), 918-931. <https://doi.org/10.3390/md10040918>
- Ding, J., Xu, Z., Qi, B., Jiang, L., & Sui, X. (2018). Physicochemical and oxidative stability of a soybean oleosome-based emulsion and its in vitro digestive fate as affected by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Food & Function*, 9(12), 6146-6154. <https://doi.org/10.1039/C8FO01215F>
- Ding, J., Xu, Z., Qi, B., Liu, Z., Yu, L., Yan, Z., Jiang, L., & Sui, X. (2020). Thermally treated soya bean oleosomes : The changes in their stability and associated proteins. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(1), 229-238. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14266>
- Dörmann, P. (2013). Galactolipids in Plant Membranes. In *ELS*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020100.pub2>

- Dörmann, P., & Benning, C. (2002). Galactolipids rule in seed plants. *Trends in Plant Science*, 7(3), 112-118. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)02216-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)02216-6)
- Douce, R., Holtz, R. B., & Benson, A. A. (1973). Isolation and Properties of the Envelope of Spinach Chloroplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 248(20), 7215-7222.
- Dufourc, E. J. (2008). The role of phytosterols in plant adaptation to temperature. *Plant Signaling & Behavior*, 3(2), 133-134. <https://doi.org/10.4161/psb.3.2.5051>
- El Hadi, H., Di Vincenzo, A., Vettor, R., & Rossato, M. (2019). Cardio-Metabolic Disorders in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2215. <https://doi.org/10.3390/ijms20092215>
- Enos, R. T., Velázquez, K. T., McClellan, J. L., Cranford, T. L., Walla, M. D., & Murphy, E. A. (2014). Reducing the Dietary Omega-6:Omega-3 Utilizing α -Linolenic Acid; Not a Sufficient Therapy for Attenuating High-Fat-Diet-Induced Obesity Development Nor Related Detrimental Metabolic and Adipose Tissue Inflammatory Outcomes. *PLoS ONE*, 9(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094897>
- Erlanson-Albertsson, C., & Albertsson, P.-Å. (2015). The Use of Green Leaf Membranes to Promote Appetite Control, Suppress Hedonic Hunger and Loose Body Weight. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70(3), 281-290. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0491-8>
- Et-Thakafy, O., Delorme, N., Gaillard, C., Mériadec, C., Artzner, F., Lopez, C., & Guyomarc'h, F. (2017). Mechanical Properties of Membranes Composed of Gel-Phase or Fluid-Phase Phospholipids Probed on Liposomes by Atomic Force Spectroscopy. *Langmuir*, 33(21), 5117-5126. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00363>
- Evans, C. S. (1991). J. B. Harborne (ED.) Methods in plant biochemistry : 1. plant phenolics. Academic Press, New York and London, 1990. *Phytochemical Analysis*, 2(1), 48-48. <https://doi.org/10.1002/pca.2800020110>

RÉFÉRENCES

- Eydoux, C., De Caro, J., Ferrato, F., Boullanger, P., Lafont, D., Laugier, R., Carrière, F., & De Caro, A. (2007). Further biochemical characterization of human pancreatic lipase-related protein 2 expressed in yeast cells. *Journal of Lipid Research*, 48(7), 1539-1549.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M600486-JLR200>
- Eydoux, C., Spinelli, S., Davis, T. L., Walker, J. R., Seitova, A., Dhe-Paganon, S., De Caro, A., Cambillau, C., & Carrière, F. (2008). Structure of Human Pancreatic Lipase-Related Protein 2 with the Lid in an Open Conformation,. *Biochemistry*, 47(36), 9553-9564.
<https://doi.org/10.1021/bi8005576>
- Fisk, I. D., White, D. A., Carvalho, A., & Gray, D. A. (2006). Tocopherol—An intrinsic component of sunflower seed oil bodies. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83(4), 341-344. <https://doi.org/10.1007/s11746-006-1210-2>
- Folch, J. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *J Biol Chem*, 226, 497-509.
- Frandsen, G. I., Mundy, J., & Tzen, J. T. C. (2001). Oil bodies and their associated proteins, oleosin and caleosin. *Physiologia Plantarum*, 112(3), 301-307.
<https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1120301.x>
- Frentzen, M., Heinz, E., McKeon, T. A., & Stumpf, P. K. (1983). Specificities and selectivities of glycerol-3-phosphate acyltransferase and monoacylglycerol-3-phosphate acyltransferase from pea and spinach chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*, 129(3), 629-636.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1983.tb07096.x>
- Furt, F., Lefebvre, B., Cullimore, J., Bessoule, J.-J., & Mongrand, S. (2007). Plant Lipid Rafts, Fluctuat nec mergitur. *Plant Signaling & Behavior*, 2(6), 508-511.
<https://doi.org/10.4161/psb.2.6.4636>

- Furt, F., Simon-Plas, F., & Mongrand, S. (2011). Lipids of the Plant Plasma Membrane. In A. S. Murphy, B. Schulz, & W. Peer (Éds.), *The Plant Plasma Membrane* (p. 3-30). Springer.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9_1
- Gaines, G. L., & Prigogine, I. P. (1966). *Insoluble monolayers at liquid-gas interfaces*.
- Gallier, S., Gragson, D., Jiménez-Flores, R., & Everett, D. W. (2010). Surface Characterization of Bovine Milk Phospholipid Monolayers by Langmuir Isotherms and Microscopic Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12275-12285.
<https://doi.org/10.1021/jf102185a>
- Gallier, S., & Singh, H. (2012). Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion. *Food & Function*, 3(5), 547-555.
<https://doi.org/10.1039/C2FO10259E>
- Gallier, S., Tate, H., & Singh, H. (2013). In Vitro Gastric and Intestinal Digestion of a Walnut Oil Body Dispersion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 410-417.
<https://doi.org/10.1021/jf303456a>
- Garcia-Manyes, S., Redondo-Morata, L., Oncins, G., & Sanz, F. (2010). Nanomechanics of Lipid Bilayers : Heads or Tails? *Journal of the American Chemical Society*, 132(37), 12874-12886. <https://doi.org/10.1021/ja1002185>
- García-Sáez, A. J., Chiantia, S., & Schwille, P. (2007). Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(46), 33537-33544. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706162200>
- Gargouri, Y., Pieroni, G., Rivière, C., Lowe, P. A., Saunière, J. F., Sarda, L., & Verger, R. (1986). Importance of human gastric lipase for intestinal lipolysis : An in vitro study. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 879(3), 419-423. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(86\)90234-1](https://doi.org/10.1016/0005-2760(86)90234-1)

RÉFÉRENCES

- 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*(4), 919-925. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(86\)90695-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(86)90695-5)
- Gargouri, Y., Sarda, L., Piéroni, G., Rivière, C., Lowe, P., Ferrato, F., & Verger, R. (1986). Kinetic Assay of Human Gastric Lipase on Short and Long Chain Triacylglycerol Emulsions. In L. Freysz, H. Dreyfus, R. Massarelli, & S. Gatt (Éds.), *Enzymes of Lipid Metabolism II* (p. 19-22). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5212-9_2
- Genot, C., & Michalski, M.-C. (2010). Impact métabolique des structures et de l'oxydation des lipides dans les aliments. *Innovations Agronomiques* (10), 43-67. (2010). <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=LV2016008646>
- Ghaderi-Ghahfarrokhi, M., Sadeghi-Mahoonak, A. R., Alami, M., & Mousavi Khanegah, A. (2017). Effect of processing treatments on polyphenol removal from kernel of two Iranian acorns varieties. *International Food Research Journal*, *24*(1), 86-93.
- Ghani, M. A., Barril, C., Bedgood, D. R., & Prenzler, P. D. (2017). Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Food Chemistry*, *230*, 195-207. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.127>
- Giller, T., Buchwald, P., Blum-Kaelin, D., & Hunziker, W. (1992). Two novel human pancreatic lipase related proteins, hPLRP1 and hPLRP2. Differences in colipase dependence and in lipase activity. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(23), 16509-16516. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42032-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42032-7)
- Glöckner, C. (2013). *The donor and acceptor side of photosystem II : Structural and functional investigations*. <https://doi.org/10.14279/depositonce-152>

- Golding, M., & Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1), 90-101.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.006>
- Gounaris, K., & Barber, J. (1983). Monogalactosyldiacylglycerol : The most abundant polar lipid in nature. *Trends in Biochemical Sciences*, 8(10), 378-381. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(83\)90366-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(83)90366-3)
- Gray, D. A., Payne, G., McClements, D. J., Decker, E. A., & Lad, M. (2010). Oxidative stability of Echimium plantagineum seed oil bodies. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(7), 741-749. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200900280>
- Griebel, T., & Zeier, J. (2010). A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 63(2), 254-268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04235.x>
- Grosjean, K., Mongrand, S., Beney, L., Simon-Plas, F., & Gerbeau-Pissot, P. (2015). Differential Effect of Plant Lipids on Membrane Organization : SPECIFICITIES OF PHYTOSPHINGOLIPIDS AND PHYTOSTEROLS*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(9), 5810-5825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.598805>
- Gurevich, V., Bondarenko, B., Gundermann, K. J., Schumacher, R., Astashkina, T., Ivanov, V., Popov, Y., Shatilina, L., & Kazennova, N. (1997). Poly-unsaturated phospholipids increase the hypolipidemic effect of Lovastatin. *European Journal of Internal Medicine*, 8(1), 15-20.
- Gzyl-Malcher, B., Filek, M., Makyla, K., & Paluch, M. (2008). Differences in surface behaviour of galactolipoids originating from different kind of wheat tissue cultivated in vitro. *Chemistry and Physics of Lipids*, 155(1), 24-30.
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.06.004>

RÉFÉRENCES

- Haahr, A.-M., & Jacobsen, C. (2008). Emulsifier type, metal chelation and pH affect oxidative stability of n-3-enriched emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *110*(10), 949-961. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200800035>
- Hąc-Wydro, K., Wydro, P., Jagoda, A., & Kapusta, J. (2007). The study on the interaction between phytosterols and phospholipids in model membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, *150*(1), 22-34. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2007.06.211>
- Han, S. K., Lee, B.-I., & Cho, W. (1997). Bacterial expression and characterization of human pancreatic phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, *1346*(2), 185-192. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(97\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(97)00034-9)
- Hancock, J. F. (2006). Lipid rafts : Contentious only from simplistic standpoints. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(6), 456-462. <https://doi.org/10.1038/nrm1925>
- Hassan, Z. ul, Ali, S., Ahmad, R., Rizwan, M., Abbas, F., Yasmeen, T., & Iqbal, M. (2017). Biochemical and molecular responses of oilseed crops to heavy metal stress. In *Oilseed Crops* (p. 236-248). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119048800.ch13>
- Hayes, D., Angove, M. J., Tucci, J., & Dennis, C. (2016). Walnuts (*Juglans regia*) Chemical Composition and Research in Human Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*(8), 1231-1241. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.760516>
- Hazahari, N. Y. B., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2018). *Comparison of Oxidative Stability of Monogalactosyl Diacylglycerol, Digalactosyl Diacylglycerol, and Triacylglycerol Containing Polyunsaturated Fatty Acids*. <https://doi.org/10.4236/fns.2018.93017>
- Hjorth, A., Carriere, F., Cudrey, C., Woldike, H., Boel, E., Lawson, D. M., Ferrato, F., Cambillau, C., & Dodson, G. G. (1993). A structural domain (the lid) found in pancreatic

- lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase. *Biochemistry*, 32(18), 4702-4707.
<https://doi.org/10.1021/bi00069a003>
- Hoyo, J., Guaus, E., & Torrent-Burgués, J. (2016). Monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol role, physical states, applications and biomimetic monolayer films. *The European Physical Journal E*, 39(3), 39. <https://doi.org/10.1140/epje/i2016-16039-0>
- Huang, A. H. C. (1987). 4—Lipases. In P. K. Stumpf (Éd.), *Lipids : Structure and Function* (Vol. 9, p. 91-119). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-675409-4.50010-1>
- Huang, A. H. C. (1992). Oil Bodies and Oleosins in Seeds. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43(1), 177-200.
<https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.001141>
- Huang, A. H. C. (1994). Structure of plant seed oil bodies. *Current Opinion in Structural Biology*, 4(4), 493-498. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(94)90210-0)
- Huang, C.-Y., & Huang, A. H. C. (2017). Unique Motifs and Length of Hairpin in Oleosin Target the Cytosolic Side of Endoplasmic Reticulum and Budding Lipid Droplet. *Plant Physiology*, 174(4), 2248-2260. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00366>
- Huang, M.-D., & Huang, A. H. C. (2015). Bioinformatics Reveal Five Lineages of Oleosins and the Mechanism of Lineage Evolution Related to Structure/Function from Green Algae to Seed Plants1[OPEN]. *Plant Physiology*, 169(1), 453-470.
<https://doi.org/10.1104/pp.15.00634>
- Ibrahim, E. A. (2019). *Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer activities of avocado (Persea americana) fruit and seed extract*.
https://www.academia.edu/38028579/Anti_oxidant_anti_inflammatory_and_anti_cancer_activities_of_avocado_Persea_americana_fruit_and_seed_extract

RÉFÉRENCES

- Ikekawa, N., Morisaki, N., Tsuda, K., & Yoshida, T. (1968). Sterol compositions in some green algae and brown algae. *Steroids*, *12*(1), 41-48. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(68\)80078-9](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(68)80078-9)
- Infantes-Garcia, M. R., Verkempinck, S. H. E., Hendrickx, M. E., & Grauwet, T. (2021). Kinetic Modeling of In Vitro Small Intestinal Lipid Digestion as Affected by the Emulsion Interfacial Composition and Gastric Prelipolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(16), 4708-4719. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00432>
- Infantes-Garcia, M. R., Verkempinck, S. H. E., Saadi, M. R., Hendrickx, M. E., & Grauwet, T. (2022). Towards understanding the modulation of in vitro gastrointestinal lipolysis kinetics through emulsions with mixed interfaces. *Food Hydrocolloids*, *124*, 107240. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107240>
- Islam Shishir, M. R., Karim, N., Gowd, V., Zheng, X., & Chen, W. (2019). Liposomal delivery of natural product : A promising approach in health research. *Trends in Food Science & Technology*, *85*, 177-200. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.01.013>
- Itoh, T., Tamura, T., Matsumoto, T., & Surugadai, K. (1973). *Sterol composition of 19 vegetable oils*. 4.
- Itzhaki, H., Borochoy, A., & Mayak, S. (1990). Age-Related Changes in Petal Membranes from Attached and Detached Rose Flowers. *Plant Physiology*, *94*(3), 1233-1236.
- Jacobson, K., Mouritsen, O. G., & Anderson, R. G. W. (2007). Lipid rafts : At a crossroad between cell biology and physics. *Nature Cell Biology*, *9*(1), 7-14. <https://doi.org/10.1038/ncb0107-7>
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M., & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews*, *15*(1), 29-63. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00121.x>

- James, L. K., & Augenstein, L. G. (1966). Adsorption of enzymes at interfaces : Film formation and the effect on activity. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 28, 1-40. <https://doi.org/10.1002/9780470122730.ch1>
- Jouhet, J. (2013). Importance of the hexagonal lipid phase in biological membrane organization. *Frontiers in Plant Science*, 4, 494. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00494>
- Judde, A., Villeneuve, P., Rossignol-Castera, A., & Le Guillou, A. (2003). Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80(12), 1209-1215. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0844-4>
- Jurak, M. (2013). Thermodynamic Aspects of Cholesterol Effect on Properties of Phospholipid Monolayers : Langmuir and Langmuir–Blodgett Monolayer Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(13), 3496-3502. <https://doi.org/10.1021/jp401182c>
- Kamal, M. A., & Raghunathan, V. A. (2012). Phase behavior of phospholipid–phytosterol membranes. *Soft Matter*, 8(34), 8952-8958. <https://doi.org/10.1039/C2SM25912E>
- Kanduc, M., Schlaich, A., de Vries, A. H., Jouhet, J., Marechal, E., Deme, B., Netz, R. R., & Schneck, E. (2017). Tight cohesion between glycolipid membranes results from balanced water-headgroup interactions. *Nature Communications*, 8, 14899. <https://doi.org/10.1038/ncomms14899>
- Kapchie, V. N., Hauck, C. C., Wang, H., & Murphy, P. A. (2011). Process Improvement for Semipurified Oleosomes on a Pilot-Plant Scale. *Journal of Food Science*, 76(6), C853-C860. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02278.x>
- Kapchie, V. N., Yao, L., Hauck, C. C., Wang, T., & Murphy, P. A. (2013). Oxidative stability of soybean oil in oleosomes as affected by pH and iron. *Food Chemistry*, 141(3), 2286-2293. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.018>

RÉFÉRENCES

- Karray, A., Zarai, Z., Gargouri, Y., Verger, R., & Bezzine, S. (2011). Kinetic properties of pancreatic and intestinal sPLA2 from chicken and mammals using the monomolecular film technique. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(2), 620-625.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.041>
- Kergomard, J., Carrière, F., Barouh, N., Villeneuve, P., Vié, V., & Bourlieu, C. (2021). Digestibility and oxidative stability of plant lipid assemblies : An underexplored source of potentially bioactive surfactants? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-20.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2005532>
- Kergomard, J., Carrière, F., Paboeuf, G., Artzner, F., Barouh, N., Bourlieu, C., & Vié, V. (2022). Interfacial organization and phase behavior of mixed galactolipid-DPPC-phytosterol assemblies at the air-water interface and in hydrated mesophases. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112646. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112646>
- Kergomard, J., Paboeuf, G., Barouh, N., Villeneuve, P., Schafer, O., Wooster, T. J., Bourlieu, C., & Vié, V. (2021). Stability to oxidation and interfacial behavior at the air/water interface of minimally-processed versus processed walnut oil-bodies. *Food Chemistry*, 360, 129880. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129880>
- Khor, V. K., Shen, W.-J., & Kraemer, F. B. (2013). Lipid Droplet Metabolism. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 16(6), 632-637.
<https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283651106>
- Köhnke, R., Lindbo, A., Larsson, T., Lindqvist, A., Rayner, M., Emek, S. C., Albertsson, P.-Å., Rehfeld, J. F., Landin-Olsson, M., & Erlanson-Albertsson, C. (2009). Thylakoids promote release of the satiety hormone cholecystokinin while reducing insulin in healthy humans. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44(6), 712-719.
<https://doi.org/10.1080/00365520902803499>

- Köhnke, R., Lindqvist, A., Göransson, N., Emek, S. C., Albertsson, P.-Å., Rehfeld, J. F., Hultgårdh-Nilsson, A., & Erlanson-Albertsson, C. (2009). Thylakoids suppress appetite by increasing cholecystokinin resulting in lower food intake and body weight in high-fat fed mice. *Phytotherapy Research*, *23*(12), 1778-1783. <https://doi.org/10.1002/ptr.2855>
- Kumar, M. S. S., Mawlong, I., & Singh, D. (2017). Phytosterol recovery from oilseeds : Recent advances. *Journal of Food Process Engineering*, *40*(3), e12466. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12466>
- Lane, K., Derbyshire, E., Li, W., & Brennan, C. (2014). Bioavailability and Potential Uses of Vegetarian Sources of Omega-3 Fatty Acids : A Review of the Literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(5), 572-579. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.596292>
- Langmuir, I. (1917). The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. *JACS*, *39*, 1848-1906.
- Lecomte, M., Couëdelo, L., Meugnier, E., Plaisancié, P., Létisse, M., Benoit, B., Gabert, L., Penhoat, A., Durand, A., Pineau, G., Joffre, F., Géloën, A., Vaysse, C., Laugere, F., & Michalski, M.-C. (2016). Dietary emulsifiers from milk and soybean differently impact adiposity and inflammation in association with modulation of colonic goblet cells in high-fat fed mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, *60*(3), 609-620. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500703>
- Lee. (2000). Membrane lipids : It's only a phase. *Current Biology*, *10*(10), R377-R380. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00477-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00477-2)
- Lee, D.-S., Noh, B.-S., Bae, S.-Y., & Kim, K. (1998). Characterization of fatty acids composition in vegetable oils by gas chromatography and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, *358*(2), 163-175. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00574-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00574-6)

RÉFÉRENCES

- Lee, H. S., Nam, Y., Chung, Y. H., Kim, H. R., Park, E. S., Chung, S. J., Kim, J. H., Sohn, U. D., Kim, H.-C., Oh, K. W., & Jeong, J. H. (2014). Beneficial effects of phosphatidylcholine on high-fat diet-induced obesity, hyperlipidemia and fatty liver in mice. *Life Sciences*, *118*(1), 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.027>
- Leidy, C., Ocampo, J., Duelund, L., Mouritsen, O. G., Jørgensen, K., & Peters, G. H. (2011). Membrane Restructuring by Phospholipase A2 Is Regulated by the Presence of Lipid Domains. *Biophysical Journal*, *101*(1), 90-99. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.02.062>
- Lengsfeld, H., Beaumier-Gallon, G., Chahinian, H., De Caro, A., Verger, R., Laugier, R., & Carrière, F. (2004). Physiology of Gastrointestinal Lipolysis and Therapeutical Use of Lipases and Digestive Lipase Inhibitors. In *Lipases and Phospholipases in Drug Development* (p. 195-229). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/3527601910.ch10>
- Lerique, B., Lepetit-Thévenin, J., Vérine, A., Delpéro, C., & Boyer, J. (1994). Triacylglycerol in biomembranes. *Life Sciences*, *54*(13), 831-840. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(94\)00619-9](https://doi.org/10.1016/0024-3205(94)00619-9)
- Let, M. B., Jacobsen, C., & Meyer, A. S. (2007). Lipid oxidation in milk, yoghurt, and salad dressing enriched with neat fish oil or pre-emulsified fish oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(19), 7802-7809. <https://doi.org/10.1021/jf070830x>
- Li, J., & Guo, Z. (2016). Identification and quantification of phenolic compounds in rapeseed originated lecithin and antioxidant activity evaluation. *LWT*, *73*, 397-405. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.039>
- Li, M., Murphy, D. J., Lee, K.-H. K., Wilson, R., Smith, L. J., Clark, D. C., & Sung, J.-Y. (2002). Purification and structural characterization of the central hydrophobic domain of oleosin.

- The Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37888-37895.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M202721200>
- Li, Pedersen, J. N., Anankanbil, S., & Guo, Z. (2018). Enhanced fish oil-in-water emulsions enabled by rapeseed lecithins obtained under different processing conditions. *Food Chemistry*, 264, 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.053>
- Li, X.-M., Momsen, M. M., Brockman, H. L., & Brown, R. E. (2003). Sterol Structure and Sphingomyelin Acyl Chain Length Modulate Lateral Packing Elasticity and Detergent Solubility in Model Membranes. *Biophysical Journal*, 85(6), 3788-3801.
- Li, X.-M., Momsen, M. M., Smaby, J. M., Brockman, H. L., & Brown, R. E. (2001). Cholesterol Decreases the Interfacial Elasticity and Detergent Solubility of Sphingomyelins. *Biochemistry*, 40(20), 5954-5963. <https://doi.org/10.1021/bi002791n>
- Liu, W., Hou, Y., Jin, Y., Wang, Y., Xu, X., & Han, J. (2020). Research progress on liposomes : Application in food, digestion behavior and absorption mechanism. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 177-189. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.012>
- Lyu, J., Gao, R., & Guo, Z. (2021). Galactosyldiacylglycerols : From a Photosynthesis-Associated Apparatus to Structure-Defined *In Vitro* Assembling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(32), 8910-8928. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00204>
- Maeda, N., Matsubara, K., Yoshida, H., & Mizushima, Y. (2011). Anti-cancer Effect of Spinach Glycoglycerolipids as Angiogenesis Inhibitors Based on the Selective Inhibition of DNA Polymerase Activity. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(1), 32-38.
<https://doi.org/10.2174/138955711793564042>
- Maguire, L. S., O'Sullivan, S. M., Galvin, K., O'Connor, T. P., & O'Brien, N. M. (2004). Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts,

RÉFÉRENCES

- hazelnuts and the macadamia nut. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55(3), 171-178. <https://doi.org/10.1080/09637480410001725175>
- Makkhun, S., Khosla, A., Foster, T., McClements, D. J., Grundy, M. M. L., & Gray, D. A. (2015). Impact of extraneous proteins on the gastrointestinal fate of sunflower seed (*Helianthus annuus*) oil bodies : A simulated gastrointestinal tract study. *Food & Function*, 6(1), 124-133. <https://doi.org/10.1039/C4FO00422A>
- Marsh, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1286(3), 183-223. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3)
- Marsh, D. (2007). Lateral Pressure Profile, Spontaneous Curvature Frustration, and the Incorporation and Conformation of Proteins in Membranes. *Biophysical Journal*, 93(11), 3884-3899. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.107938>
- Mateos-Diaz, E., Amara, S., Roussel, A., Longhi, S., Cambillau, C., & Carrière, F. (2017). Probing Conformational Changes and Interfacial Recognition Site of Lipases With Surfactants and Inhibitors. *Methods in Enzymology*, 583, 279-307. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.09.040>
- Mateos-Diaz, E., Bakala N’Goma, J.-C., Byrne, D., Robert, S., Carrière, F., & Gaussier, H. (2018). IR spectroscopy analysis of pancreatic lipase-related protein 2 interaction with phospholipids : 1. Discriminative recognition of mixed micelles versus liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 211, 52-65. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.02.005>
- Maurer, S., Waschatko, G., Schach, D., Zielbauer, B. I., Dahl, J., Weidner, T., Bonn, M., & Vilgis, T. A. (2013). The Role of Intact Oleosin for Stabilization and Function of

- Oleosomes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(44), 13872-13883.
<https://doi.org/10.1021/jp403893n>
- McKersie, B. D., & Thompson, J. E. (1979). Influence of Plant Sterols on the Phase Properties of Phospholipid Bilayers 1. *Plant Physiology*, 63(5), 802-805.
- 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. *Progress in Lipid Research*, 52(4), 354-373.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.04.004>
- Mihaljević, B., Katušin-Ražem, B., & Ražem, D. (1996). The reevaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanistic aspects of the response. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(1), 53-63.
[https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02224-4](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02224-4)
- Millichip, M., Tatham, A. S., Jackson, F., Griffiths, G., Shewry, P. R., & Stobart, A. K. (1996). Purification and characterization of oil-bodies (oleosomes) and oil-body boundary proteins (oleosins) from the developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biochemical Journal*, 314(Pt 1), 333-337.
- Miraliakbari, H., & Shahidi, F. (2008). Lipid Class Compositions, Tocopherols and Sterols of Tree Nut Oils Extracted with Different Solvents. *Journal of Food Lipids*, 15(1), 81-96.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2007.00104.x>
- Mizusawa, N., & Wada, H. (2012). The role of lipids in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(1), 194-208.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.04.008>

RÉFÉRENCES

- Moghadasian, M. H., & Frohlich, J. J. (1999). Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis : Clinical and experimental evidence. *The American Journal of Medicine*, *107*(6), 588-594. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(99\)00285-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(99)00285-5)
- Mohammadi, R., Mahmoudzadeh, M., Atefi, M., Khosravi-Darani, K., & Mozafari, M. R. (2015). Applications of nanoliposomes in cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, *68*(1), 11-23. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12174>
- Moloney, M. M., Weselake, R. J., Nykiforuk, C. L., & Yurchenko, O. P. (2012). *Oil Bodies and Associated Proteins As Affinity Matrices* (Patent N° 7786352). <https://patents.justia.com/assignee/sembiosys-genetics-inc>
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J.-P., Hartmann, M.-A., Bonneu, M., Simon-Plas, F., Lessire, R., & Bessoule, J.-J. (2004). Lipid rafts in higher plant cells : Purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(35), 36277-36286. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403440200>
- Mongrand, S., Stanislas, T., Bayer, E. M. F., Lherminier, J., & Simon-Plas, F. (2010). Membrane rafts in plant cells. *Trends in Plant Science*, *15*(12), 656-663. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.09.003>
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods : Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, *41*(6), 457-500. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(02\)00006-1](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(02)00006-1)
- Moustiés, C., Bourlieu, C., Barea, B., Servent, A., Alter, P., Lebrun, M., Hemery, Y. M., Laillou, A., & Avallone, S. (2019). Lipid Composition and State of Oxidation of Fortified Infant Flours in Low-Income Countries Are Not Optimal and Strongly Affected by the Time of

- Storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(11), 1900173.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201900173>
- Munro, S. (2003). Lipid Rafts : Elusive or Illusive? *Cell*, 115(4), 377-388.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00882-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00882-1)
- Napier, J. A., Beaudoin, F., Tatham, A. S., Alexander, L. G., & Shewry, P. R. (2001). The seed oleosins : Structure, properties and biological role. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 35, p. 111-138). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(01\)35005-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(01)35005-X)
- Nielsen, L. K., Balashev, K., Callisen, T. H., & Bjørnholm, T. (2002). Influence of product phase separation on phospholipase A(2) hydrolysis of supported phospholipid bilayers studied by force microscopy. *Biophysical Journal*, 83(5), 2617-2624.
- Nielsen, L. K., Risbo, J., Callisen, T. H., & Bjørnholm, T. (1999). Lag-burst kinetics in phospholipase A2 hydrolysis of DPPC bilayers visualized by atomic force microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1420(1), 266-271.
[https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00103-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00103-0)
- Nikiforidis, C. V. (2019). Structure and functions of oleosomes (oil bodies). *Advances in Colloid and Interface Science*, 274, 102039. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102039>
- Nikiforidis, C. V., Ampatzidis, C., Lalou, S., Scholten, E., Karapantsios, T. D., & Kiosseoglou, V. (2012). Purified oleosins at air–water interfaces. *Soft Matter*, 9(4), 1354-1363.
<https://doi.org/10.1039/C2SM27118D>
- Nikiforidis, C. V., Kiosseoglou, V., & Scholten, E. (2013). Oil bodies : An insight on their microstructure — maize germ vs sunflower seed. *Food Research International*, 52(1), 136-141. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.052>

RÉFÉRENCES

- Nikiforidis, C. V., Matsakidou, A., & Kiosseoglou, V. (2014). Composition, properties and potential food applications of natural emulsions and cream materials based on oil bodies. *RSC Advances*, 4(48), 25067-25078. <https://doi.org/10.1039/C4RA00903G>
- Noll, F., May, C., & Kindl, H. (2000). Phospholipid monolayer of plant lipid bodies attacked by phospholipase A2 shows 80 nm holes analyzed by atomic force microscopy. *Biophysical Chemistry*, 86(1), 29-35. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(00\)00156-3](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(00)00156-3)
- Nuchi, C. D., Hernandez, P., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2002). Ability of lipid hydroperoxides to partition into surfactant micelles and alter lipid oxidation rates in emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(19), 5445-5449. <https://doi.org/10.1021/jf020095j>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Ohlsson, L. (2000). *Digestion and absorption of galactolipids* [Inst of Medicine, University Hospital of Lund, S-221 85 Lund.,]. [https://portal.research.lu.se/portal/en/publications/digestion-and-absorption-of-galactolipids\(5d1374fe-3c0b-41f9-b756-32fc36f23147\).html](https://portal.research.lu.se/portal/en/publications/digestion-and-absorption-of-galactolipids(5d1374fe-3c0b-41f9-b756-32fc36f23147).html)
- Pafumi, Y., Lairon, D., de la Porte, P. L., Juhel, C., Storch, J., Hamosh, M., & Armand, M. (2002). Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 28070-28079. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202839200>
- Pata, M. O., Hannun, Y. A., & Ng, C. K.-Y. (2010). Plant sphingolipids : Decoding the enigma of the Sphinx. *The New Phytologist*, 185(3), 611-630. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03123.x>

- Pérez-Gálvez, A., Viera, I., & Roca, M. (2020). Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants*, 9(6), 505. <https://doi.org/10.3390/antiox9060505>
- Peskan, T., Westermann, M., & Oelmüller, R. (2000). Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *European Journal of Biochemistry*, 267(24), 6989-6995. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01776.x>
- Phillips, K. M., Ruggio, D. M., & Ashraf-Khorassani, M. (2005). Phytosterol Composition of Nuts and Seeds Commonly Consumed in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9436-9445. <https://doi.org/10.1021/jf051505h>
- Piironen, V., Lindsay, D. G., Miettinen, T. A., Toivo, J., & Lampi, A.-M. (2000). Plant sterols : Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 939-966. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C)
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined : A report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of Lipid Research*, 47(7), 1597-1598. <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>
- Piombo, G., Barouh, N., Barea, B., Boulanger, R., Brat, P., Pina, M., & Villeneuve, P. (2006). Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinidia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*). *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 13(2-3), Art. 2-3. <https://doi.org/10.1051/ocl.2006.0026>
- Popova, A. V., & Hinch, D. K. (2011). Thermotropic phase behavior and headgroup interactions of the nonbilayer lipids phosphatidylethanolamine and monogalactosyldiacylglycerol in the dry state. *BMC Biophysics*, 4(1), 11. <https://doi.org/10.1186/2046-1682-4-11>
- Pourteymour Fard Tabrizi, F., & Abbasalizad Farhangi, M. (2021). A Systematic Review of the Potential Effects of Thylakoids in the Management of Obesity and Its Related Issues.

RÉFÉRENCES

- Food Reviews International*, 37(5), 469-490.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1710747>
- Pribil, M., Labs, M., & Leister, D. (2014). Structure and dynamics of thylakoids in land plants. *Journal of Experimental Botany*, 65(8), 1955-1972. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru090>
- Prim, N., Iversen, L., Diaz, P., & Bjørnholm, T. (2006). Atomic force microscope studies on the interactions of *Candida rugosa* lipase and supported lipidic bilayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 52(2), 138-142. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.05.018>
- Queiroz Zepka, L., Jacob-Lopes, E., & Roca, M. (2019). Catabolism and bioactive properties of chlorophylls. *Current Opinion in Food Science*, 26, 94-100.
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.04.004>
- Rampone, A. J., & Machida, C. M. (1981). Mode of action of lecithin in suppressing cholesterol absorption. *Journal of Lipid Research*, 22(5), 744-752.
- Rangl, M., Rima, L., Klement, J., Miyagi, A., Keller, S., & Scheuring, S. (2017). Real-time Visualization of Phospholipid Degradation by Outer Membrane Phospholipase A using High-Speed Atomic Force Microscopy. *Journal of Molecular Biology*, 429(7), 977-986.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.004>
- Ransac, S., Aarsman, A. J., Bosch, H., Gancet, C., Haas, G. H., & Verger, R. (1992). Rat platelet phospholipase A2. Kinetic characterization using the monomolecular film technique. *European Journal of Biochemistry*, 204(2), 793-797. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16697.x>
- Reis, A., & Spickett, C. M. (2012). Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(10), 2374-2387.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.02.002>

- Richmond, B. L., Boileau, A. C., Zheng, S., Huggins, K. W., Granholm, N. A., Tso, P., & Hui, D. Y. (2001). Compensatory phospholipid digestion is required for cholesterol absorption in pancreatic phospholipase A(2)-deficient mice. *Gastroenterology*, *120*(5), 1193-1202. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.23254>
- Robert, C. (2021). *Les lécithines végétales comme vecteurs d'acide alpha-linolénique : Impacts métaboliques et inflammatoires associés à la biodisponibilité intestinale* [These de doctorat, Lyon]. <http://www.theses.fr/2021LYSE1006>
- Robert, C., Couédelo, L., Knibbe, C., Fonseca, L., Buisson, C., Errazuriz-Cerda, E., Meugnier, E., Loizon, E., Vaysse, C., & Michalski, M.-C. (2020). Rapeseed Lecithin Increases Lymphatic Lipid Output and α -Linolenic Acid Bioavailability in Rats. *The Journal of Nutrition*, *150*(11), 2900-2911. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa244>
- Robert, C., Couédelo, L., Vaysse, C., & Michalski, M.-C. (2020). Vegetable lecithins : A review of their compositional diversity, impact on lipid metabolism and potential in cardiometabolic disease prevention. *Biochimie*, *169*, 121-132. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.11.017>
- Roussel, A., Canaan, S., Egloff, M.-P., Rivière, M., Dupuis, L., Verger, R., & Cambillau, C. (1999). Crystal Structure of Human Gastric Lipase and Model of Lysosomal Acid Lipase, Two Lipolytic Enzymes of Medical Interest*. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(24), 16995-17002. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16995>
- Roussel, A., Miled, N., Berti-Dupuis, L., Rivière, M., Spinelli, S., Berna, P., Gruber, V., Verger, R., & Cambillau, C. (2002). Crystal Structure of the Open Form of Dog Gastric Lipase in Complex with a Phosphonate Inhibitor*. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(3), 2266-2274. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109484200>

RÉFÉRENCES

Roussel, A., Yang, Y., Ferrato, F., Verger, R., Cambillau, C., & Lowe, M. (1998). Structure and Activity of Rat Pancreatic Lipase-related Protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 273(48), 32121-32128. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.48.32121>

Rudell, D. R., Buchanan, D. A., Leisso, R. S., Whitaker, B. D., Mattheis, J. P., Zhu, Y., & Varanasi, V. (2011). Ripening, storage temperature, ethylene action, and oxidative stress alter apple peel phytosterol metabolism. *Phytochemistry*, 72(11-12), 1328-1340. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.04.018>

Sahaka. (2020). *Etude de l'hydrolyse enzymatique des galactolipides par diverses approches chromatographique et spectroscopiques* [These de doctorat, Aix-Marseille]. <http://www.theses.fr/2020AIXM0467>

Sahaka, M., Amara, S., Lecomte, J., Rodier, J.-D., Lafont, D., Villeneuve, P., Gontero, B., & Carrière, F. (2021). Quantitative monitoring of galactolipid hydrolysis by pancreatic lipase-related protein 2 using thin layer chromatography and thymol-sulfuric acid derivatization. *Journal of Chromatography B*, 1173, 122674. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122674>

Sahaka, M., Amara, S., Wattanakul, J., Gedi, M. A., Aldai, N., Parsiegla, G., Lecomte, J., Christeller, J. T., Gray, D., Gontero, B., Villeneuve, P., & Carrière, F. (2020). The digestion of galactolipids and its ubiquitous function in Nature for the uptake of the essential α -linolenic acid. *Food & Function*. <https://doi.org/10.1039/D0FO01040E>

Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids : Dietary sources, metabolism, and significance — A review. *Life Sciences*, 203, 255-267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.049>

Salhi, A., Amara, S., Mansuelle, P., Puppo, R., Lebrun, R., Gontero, B., Aloulou, A., & Carrière, F. (2020). Characterization of all the lipolytic activities in pancreatin and comparison with

- porcine and human pancreatic juices. *Biochimie*, 169, 106-120.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.004>
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(15), 3939-3948.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00677>
- Sandstrom, R. P., & Cleland, R. E. (1989). Comparison of the Lipid Composition of Oat Root and Coleoptile Plasma Membranes : Lack of Short-Term Change in Response to Auxin. *Plant Physiology*, 90(3), 1207-1213. <https://doi.org/10.1104/pp.90.3.1207>
- Sarkis, J., Rocha, J., Maniti, O., Jouhet, J., Vié, V., Block, M. A., Breton, C., Maréchal, E., & Girard-Egrot, A. (2014). The influence of lipids on MGD1 membrane binding highlights novel mechanisms for galactolipid biosynthesis regulation in chloroplasts. *The FASEB Journal*, 28(7), 3114-3123. <https://doi.org/10.1096/fj.14-250415>
- Sarkis, J., & Vié, V. (2020). Biomimetic Models to Investigate Membrane Biophysics Affecting Lipid–Protein Interaction. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2020.00270>
- Scott, D. L., White, S. P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M. H., & Sigler, P. B. (1990). Interfacial Catalysis : The Mechanism of Phospholipase A2. *Science*.
<https://doi.org/10.1126/science.2274785>
- Sethi, S., Tyagi, S. K., & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages : A review. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3408-3423. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>

RÉFÉRENCES

- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2018). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annual Review of Food Science and Technology*, 9(1), 345-381.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-111317-095850>
- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, Sensitive, Iron-Based Spectrophotometric Methods for Determination of Peroxide Values of Food Lipids. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 77(2), 421-424. <https://doi.org/10.1093/jaoac/77.2.421>
- Shimada, T. L., Hayashi, M., & Hara-Nishimura, I. (2018). Membrane Dynamics and Multiple Functions of Oil Bodies in Seeds and Leaves. *Plant Physiology*, 176(1), 199-207.
<https://doi.org/10.1104/pp.17.01522>
- Silva, C., Aranda, F. J., Ortiz, A., Carvajal, M., Martínez, V., & Teruel, J. A. (2007). Root Plasma Membrane Lipid Changes in Relation to Water Transport in Pepper : A Response to NaCl and CaCl₂ Treatment. *Journal of Plant Biology*, 50(6), 650-657.
<https://doi.org/10.1007/BF03030609>
- Silva, C., Aranda, F. J., Ortiz, A., Martínez, V., Carvajal, M., & Teruel, J. A. (2011). Molecular aspects of the interaction between plants sterols and DPPC bilayers : An experimental and theoretical approach. *Journal of Colloid and Interface Science*, 358(1), 192-201.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.02.048>
- Silvius, J. R. (2003). Role of cholesterol in lipid raft formation : Lessons from lipid model systems. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1610(2), 174-183.
[https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00016-6](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00016-6)
- Silvius, J. R. (2005). Partitioning of membrane molecules between raft and non-raft domains : Insights from model-membrane studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1746(3), 193-202.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.09.003>

- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), Art. 6633. <https://doi.org/10.1038/42408>
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 56(8), 365-379. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(02\)00253-6](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(02)00253-6)
- Simpson, T. D., & Nakamura, L. K. (1989). Phospholipid degradation in membranes of isolated soybean lipid bodies. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 66(8), 1093-1096. <https://doi.org/10.1007/BF02670091>
- Sintra, T. E., Ventura, S. P. M., & Coutinho, J. A. P. (2014). Superactivity induced by micellar systems as the key for boosting the yield of enzymatic reactions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 107, 140-151. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.001>
- Smaby, J. M., Momsen, M. M., Brockman, H. L., & Brown, R. E. (1997). Phosphatidylcholine acyl unsaturation modulates the decrease in interfacial elasticity induced by cholesterol. *Biophysical Journal*, 73(3), 1492-1505. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78181-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78181-5)
- Smith, A. W. (2012). Lipid–protein interactions in biological membranes : A dynamic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(2), 172-177. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.06.015>
- Staneva, G., Angelova, M. I., & Koumanov, K. (2004). Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 129(1), 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2003.11.005>
- Sternby, B., Nilsson, Å., Melin, T., & Borgström, B. (1991). Pancreatic Lipolytic Enzymes in Human Duodenal Contents Radioimmunoassay Compared with Enzyme Activity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 26(8), 859-866. <https://doi.org/10.3109/00365529109037023>

RÉFÉRENCES

- Stillwell, W., & Wassall, S. R. (2003). Docosahexaenoic acid : Membrane properties of a unique fatty acid. *Chemistry and Physics of Lipids*, 126(1), 1-27. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(03\)00101-4](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(03)00101-4)
- St-Onge, M.-P., & Jones, P. J. H. (2003). Phytosterols and human lipid metabolism : Efficacy, safety, and novel foods. *Lipids*, 38(4), 367-375. <https://doi.org/10.1007/s11745-003-1071-3>
- St-Pierre, A., Blondeau, D., Boivin, M., Beaupré, V., Boucher, N., & Desgagné-Penix, I. (2019). Study of antioxidant properties of thylakoids and application in UV protection and repair of UV-induced damage. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 18(6), 1980-1991. <https://doi.org/10.1111/jocd.12936>
- Su, Y., Li, Q., Chen, L., & Yu, Z. (2007). Condensation effect of cholesterol, stigmasterol, and sitosterol on dipalmitoylphosphatidylcholine in molecular monolayers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 293(1), 123-129. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.07.016>
- Sugar, I. P., Mizuno, N. K., Momsen, M. M., & Brockman, H. L. (2001). Lipid lateral organization in fluid interfaces controls the rate of colipase association. *Biophysical Journal*, 81(6), 3387-3397. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75971-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75971-1)
- Sych, T., Mély, Y., & Römer, W. (2018). Lipid self-assembly and lectin-induced reorganization of the plasma membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1747), 20170117. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0117>
- Tomoaia-Cotișel, M., Zsako, J., Chifu, E., & Quinn, P. J. (1989). Hysteresis in compression-expansion cycles of distearoylmonogalactosylglycerol monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 50(2), 127-133. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(89\)90036-4](https://doi.org/10.1016/0009-3084(89)90036-4)

- Torres-Tiji, Y., Fields, F. J., & Mayfield, S. P. (2020). Microalgae as a future food source. *Biotechnology Advances*, *41*, 107536. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107536>
- Tzen, J., Cao, Y., Laurent, P., Ratnayake, C., & Huang, A. (1993). Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species. *Plant Physiology*, *101*(1), 267-276. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.267>
- Tzen, J. T., Lai, Y. K., Chan, K. L., & Huang, A. H. (1990). Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in the oil bodies of diverse seed species. *Plant Physiology*, *94*(3), 1282-1289. <https://doi.org/10.1104/pp.94.3.1282>
- Tzen, JTC., Cao, Yz., Laurent, P., Ratnayake, C., & Huang, AHC. (1993). Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species. *Plant Physiology*, *101*(1), 267-276.
- Uemura, M., Joseph, R. A., & Steponkus, P. L. (1995). Cold Acclimation of *Arabidopsis thaliana* (Effect on Plasma Membrane Lipid Composition and Freeze-Induced Lesions). *Plant Physiology*, *109*(1), 15-30. <https://doi.org/10.1104/pp.109.1.15>
- Uemura, M., & Steponkus, P. L. (1994). A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiology*, *104*(2), 479-496. <https://doi.org/10.1104/pp.104.2.479>
- Van Tilbeurgh, H., Sarda, L., Verger, R., & Cambillau, C. (1992). Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature*, *359*(6391), 159-162. <https://doi.org/10.1038/359159a0>
- Varga, Z., Bóta, A., & Goerigk, G. (2007). Localization of dihalogenated phenols in vesicle systems determined by contrast variation X-ray scattering. *Journal of Applied Crystallography*, *40*(s1), Art. s1. <https://doi.org/10.1107/S0021889807001987>

RÉFÉRENCES

- Venkatachalam, M., & Sathe, S. K. (2006). Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4705-4714.
<https://doi.org/10.1021/jf0606959>
- Venuti, E., Shishmarev, D., Kuchel, P. W., Dutt, S., Blumenthal, C. S., & Gaskin, K. J. (2017). Bile salt stimulated lipase : Inhibition by phospholipids and relief by phospholipase A2. *Journal of Cystic Fibrosis*, 16(6), 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2017.07.005>
- Verger, R., Mieras, M. C. E., & Haas, G. H. de. (1973). Action of Phospholipase A at Interfaces. *Journal of Biological Chemistry*, 248(11), 4023-4034.
- Vié, V., Van Mau, N., Lesniewska, E., Goudonnet, J. P., Heitz, F., & Le Grimellec, C. (1998). Distribution of Ganglioside GM1 between Two-Component, Two-Phase Phosphatidylcholine Monolayers. *Langmuir*, 14(16), 4574-4583.
<https://doi.org/10.1021/la980203p>
- Villière, A. (2005). *Approche physico-chimique et sensorielle de l'oxydation des lipides dans des émulsions stabilisées par des protéines* [These de doctorat, Nantes].
<https://www.theses.fr/2005NANT2042>
- Vindigni, J.-D., Wien, F., Giuliani, A., Erpapazoglou, Z., Tache, R., Jagic, F., Chardot, T., Gohon, Y., & Froissard, M. (2013). Fold of an oleosin targeted to cellular oil bodies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1828(8), 1881-1888.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.04.009>
- von Bergmann, K., Sudhop, T., & Lütjohann, D. (2005). Cholesterol and Plant Sterol Absorption : Recent Insights. *The American Journal of Cardiology*, 96(1, Supplement), 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.03.014>
- 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(5), 537-546. <https://doi.org/10.1039/C2FO10248J>
- Vors, C., Drai, J., Pineau, G., Laville, M., Vidal, H., Laugerette, F., & Michalski, M.-C. (2017). Emulsifying dietary fat modulates postprandial endotoxemia associated with chylomicronemia in obese men : A pilot randomized crossover study. *Lipids in Health and Disease*, 16, 97. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0486-6>
- Vors, C., Pineau, G., Gabert, L., Drai, J., Louche-Pélissier, C., Defoort, C., Lairon, D., Désage, M., Danthine, S., Lambert-Porcheron, S., Vidal, H., Laville, M., & Michalski, M.-C. (2013). Modulating absorption and postprandial handling of dietary fatty acids by structuring fat in the meal : A randomized crossover clinical trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(1), 23-36. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.043976>
- Walther, T. C., & Farese, R. V. (2012). Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 81(1), 687-714. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430>
- Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. *Trends in Food Science & Technology*, 22(1), 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.003>
- Waschatko, G., Schiedt, B., Vilgis, T. A., & Junghans, A. (2012). Soybean Oleosomes Behavior at the Air–Water Interface. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(35), 10832-10841. <https://doi.org/10.1021/jp211871v>
- Wattanakul, J., Sahaka, M., Amara, S., Mansor, S., Gontero, B., Carrière, F., & Gray, D. (2019). In vitro digestion of galactolipids from chloroplast-rich fraction (CRF) of postharvest, pea vine field residue (haulm) and spinach leaves. *Food & Function*, 10(12), 7806-7817. <https://doi.org/10.1039/C9FO01867K>

RÉFÉRENCES

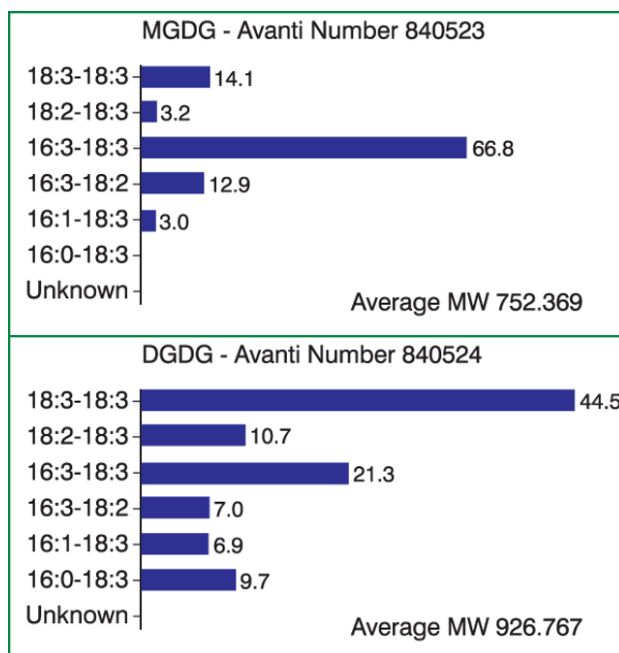
- Wattanakul, J., Syamila, M., Darwish, R., Gedi, M. A., Sutcharit, P., Chi, C., Akepach, P., Sahaka, M., Gontero, B., Carrière, F., & Gray, D. A. (2022). Bioaccessibility of essential lipophilic nutrients in a chloroplast-rich fraction (CRF) from agricultural green waste during simulated human gastrointestinal tract digestion. *Food & Function*, *13*(9), 5365-5380. <https://doi.org/10.1039/D2FO00604A>
- Weise, K., Triola, G., Janosch, S., Waldmann, H., & Winter, R. (2010). Visualizing association of lipidated signaling proteins in heterogeneous membranes—Partitioning into subdomains, lipid sorting, interfacial adsorption, and protein association. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *1798*(7), 1409-1417. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2009.12.006>
- White, D. A., Fisk, I. D., Mitchell, J. R., Wolf, B., Hill, S. E., & Gray, D. A. (2008). Sunflower-seed oil body emulsions : Rheology and stability assessment of a natural emulsion. *Food Hydrocolloids*, *22*(7), 1224-1232. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.07.004>
- Wieloch, T., Borgström, B., Piéroni, G., Pattus, F., & Verger, R. (1982). Product activation of pancreatic lipase. Lipolytic enzymes as probes for lipid/water interfaces. *Journal of Biological Chemistry*, *257*(19), 11523-11528. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)33792-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)33792-X)
- Wisniak, J. (2015). William Prout. *Educación Química*, *26*(2), Art. 2. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eq.2015.04.011>
- Withers-Martinez, C., Carrière, F., Verger, R., Bourgeois, D., & Cambillau, C. (1996). A pancreatic lipase with a phospholipase A1 activity : Crystal structure of a chimeric pancreatic lipase-related protein 2 from guinea pig. *Structure*, *4*(11), 1363-1374. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00143-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00143-8)

- Wu, N., Dai, J., & Micale, F. J. (1999). Dynamic Surface Tension Measurement with a Dynamic Wilhelmy Plate Technique. *Journal of Colloid and Interface Science*, 215(2), 258-269. <https://doi.org/10.1006/jcis.1999.6270>
- Xu, L., & Zuo, Y. Y. (2018). Reversible Phase Transitions in the Phospholipid Monolayer. *Langmuir*, 34(29), 8694-8700. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01544>
- Yamaguchi, T., Sugimura, R., Shimajiri, J., Suda, M., Abe, M., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2012). Oxidative Stability of Glyceroglycolipids Containing Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Oleo Science*, 61(9), 505-513. <https://doi.org/10.5650/jos.61.505>
- Yamauchi, R., Kojima, M., Kato, K., & Ueno, Y. (Gifu U. (1983). Autoxidation products of polyunsaturated galactolipids [prepared from spinach leaves]. *Agricultural and Biological Chemistry (Japan)*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP8503846>
- Yang, J., Wen, C., Duan, Y., Deng, Q., Peng, D., Zhang, H., & Ma, H. (2021). The composition, extraction, analysis, bioactivities, bioavailability and applications in food system of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 118, 252-260. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.09.025>
- Zaaboul, F., Raza, H., Cao, C., & Yuanfa, L. (2019). The impact of roasting, high pressure homogenization and sterilization on peanut milk and its oil bodies. *Food Chemistry*, 280, 270-277. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.047>
- Zhang, J., Sun, Y., Wang, W., Zhang, X., Li, C., & Guan, H. (2013). Synthesis and antiviral evaluation of 6'-acylamido-6'-deoxy- α -D-mannoglycerolipids. *Carbohydrate Research*, 381, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.08.010>
- Zhang, P., Villanueva, V., Kalkowski, J., Liu, C., Pham, T., Perez-Salas, U., Bu, W., Lin, B., & Liu, Y. (2019). Polyunsaturated Phospholipid Modified Membrane Degradation

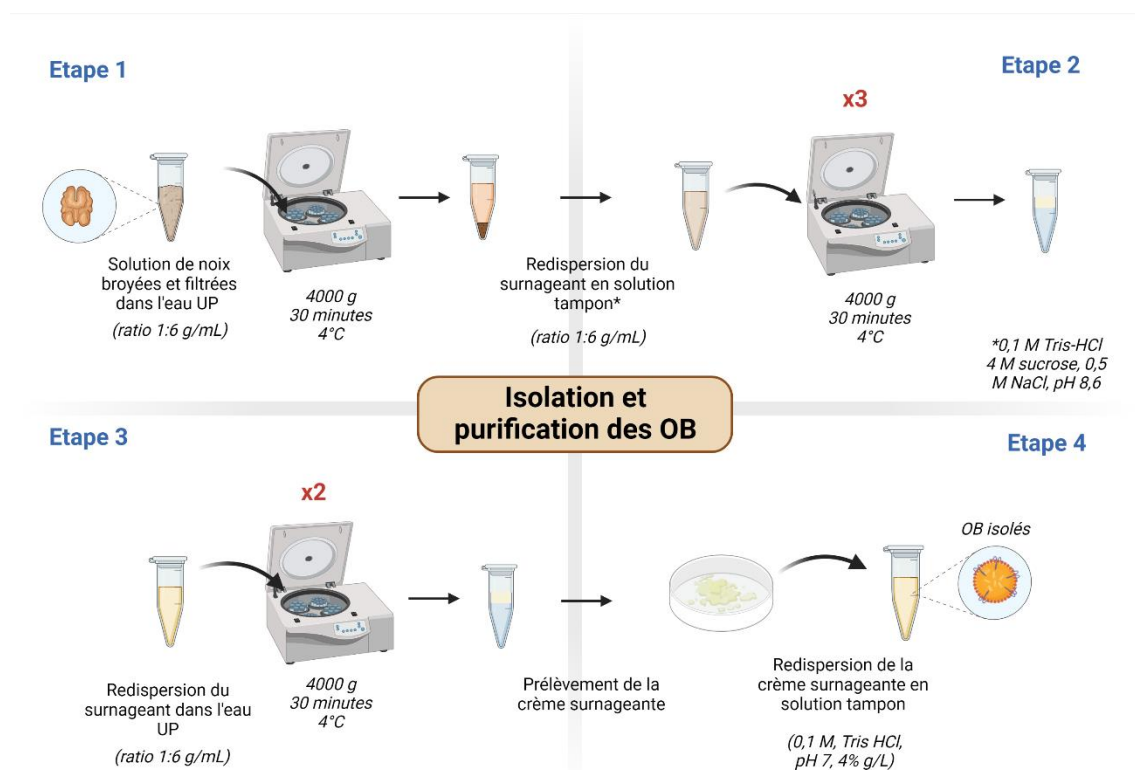
RÉFÉRENCES

- Catalyzed by a Secreted Phospholipase A2. *Langmuir*, 35(36), 11643-11650.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01476>
- Zhang, Z., Liao, L., Moore, J., Wu, T., & Wang, Z. (2009). Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chemistry*, 113(1), 160-165.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.061>
- Zhao, L., Chen, Y., Yan, Z., Kong, X., & Hua, Y. (2016). Physicochemical and rheological properties and oxidative stability of oil bodies recovered from soybean aqueous extract at different pHs. *Food Hydrocolloids*, 61, 685-694.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.032>
- Zhou, L., Chen, F., Hao, L., Du, Y., & Liu, C. (2019). Peanut Oil Body Composition and Stability. *Journal of Food Science*, 84(10), 2812-2819. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14801>
- Zielbauer, B. I., Jackson, A. J., Maurer, S., Waschatko, G., Ghebremedhin, M., Rogers, S. E., Heenan, R. K., Porcar, L., & Vilgis, T. A. (2018). Soybean oleosomes studied by small angle neutron scattering (SANS). *Journal of Colloid and Interface Science*, 529, 197-204.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.080>
- Zlatanov, M., Ivanov, S., & Aitzetmüller, K. (1999). Phospholipid and fatty acid composition of Bulgarian nut oils. *Lipid / Fett*, 101(11), 437-439. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4133\(199911\)101:11<437::AID-LIPI437>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4133(199911)101:11<437::AID-LIPI437>3.0.CO;2-T)

Annexes



Annexe I – Distribution en AG des MGDG et DGDG achetés chez Avanti Polar Lipids.



Annexe II – Procédure d'isolation et de purification des OB, adapté de Kapchie et al. (2011).

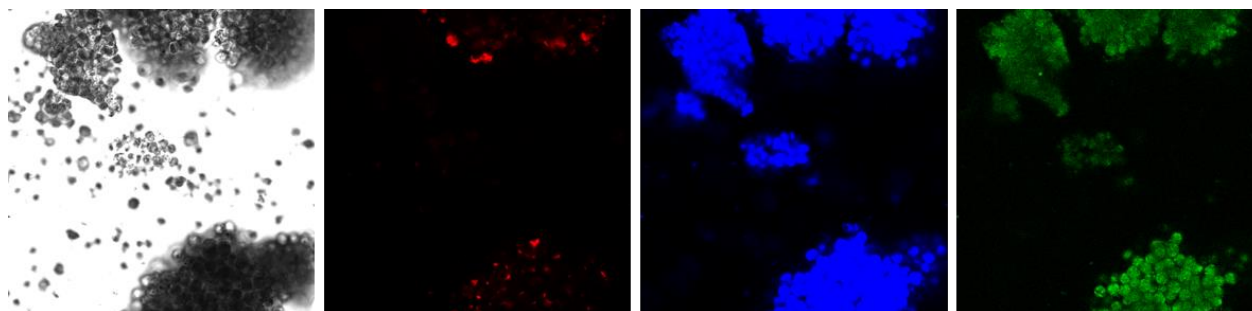
ANNEXES

Valeurs nutritionnelles	/100g	Minéraux	/100g	% AJR*	Vitamines	/100g	%AJR*
Energie	1515 kJ/359 kcal	Potassium	800 mg	40%	K	40 µg	53%
Matière grasses	2,3 g	Phosphore	1200 mg	171%	B1 - thiamine	3 mg	272 %
Dont AG saturés	0,4 g	Fer	100 mg	714%	B2 - riboflavine	6 mg	428 %
Dont AG monoinsaturés	0,3 g	Zinc	25 mg	250%	B3 - niacine	30 mg	187%
Dont AGPI	0,41 g	Cuivre	3 mg	300%	B6	2 mg	142%
Glucides	17,3 g	Manganèse	5 mg	250%			
Sucres	0,5 g	Sélénium	300 µg	545%			
Fibres	12,1 g						
Protéines	61,1 g						
Sel	0,1 g						

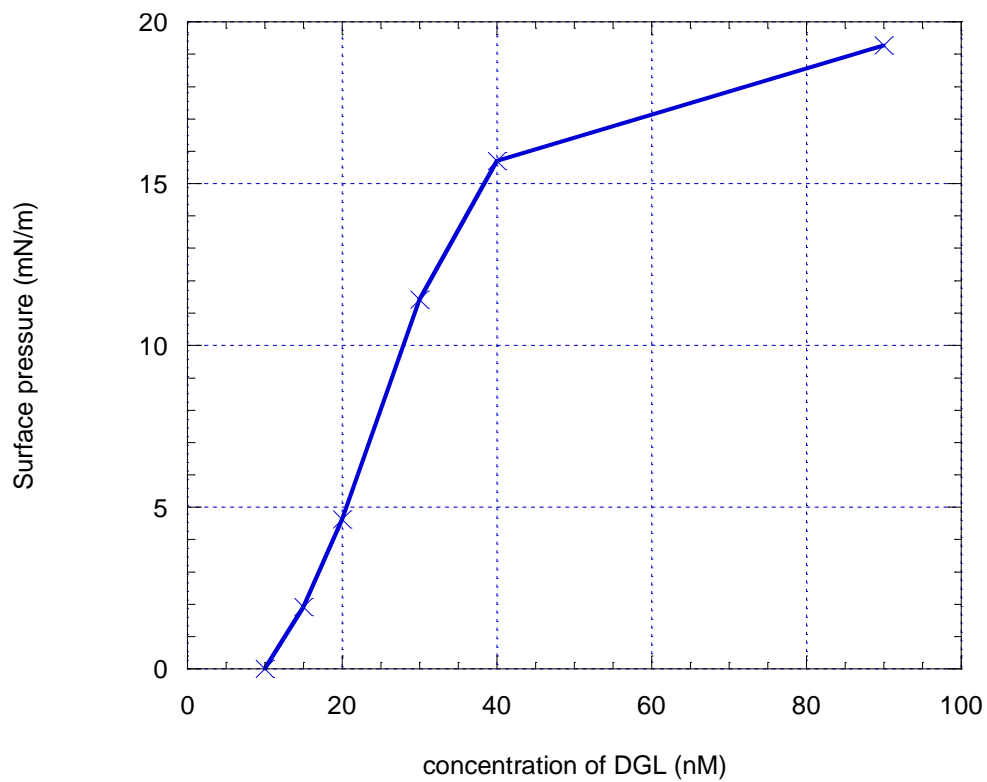


*Apports journaliers recommandés

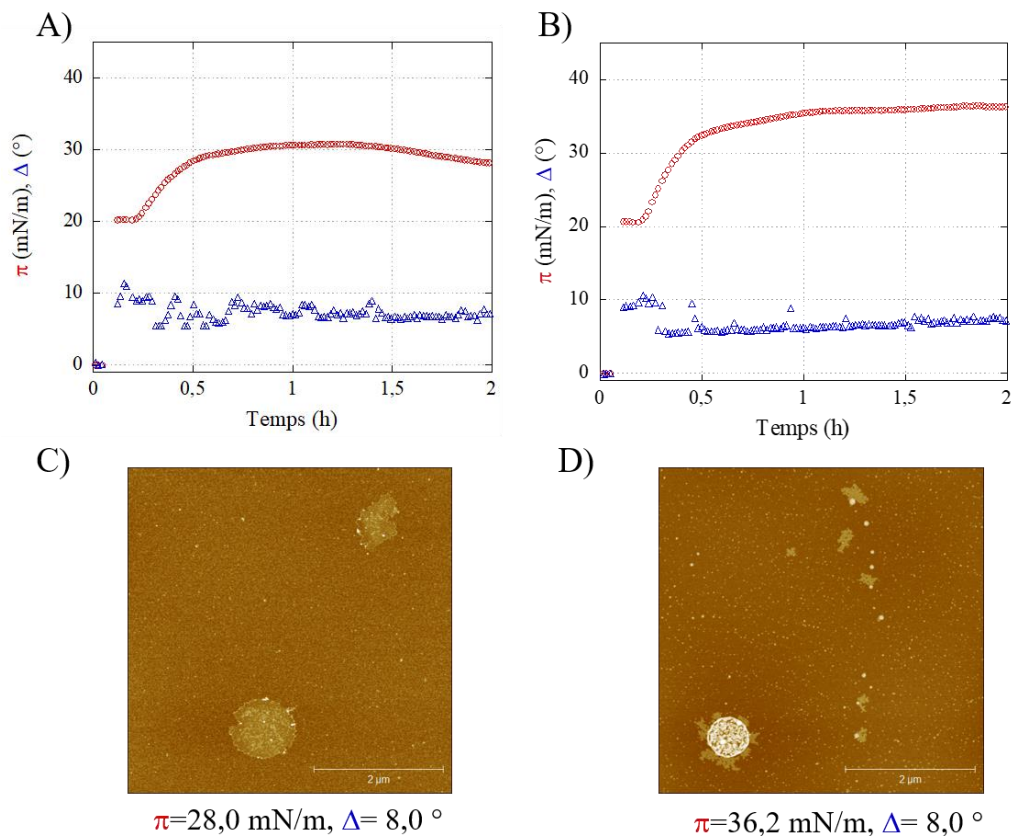
Annexe III – Composition de la poudre de chlorelles entières *Ch. vulgaris* (Purasana, France).



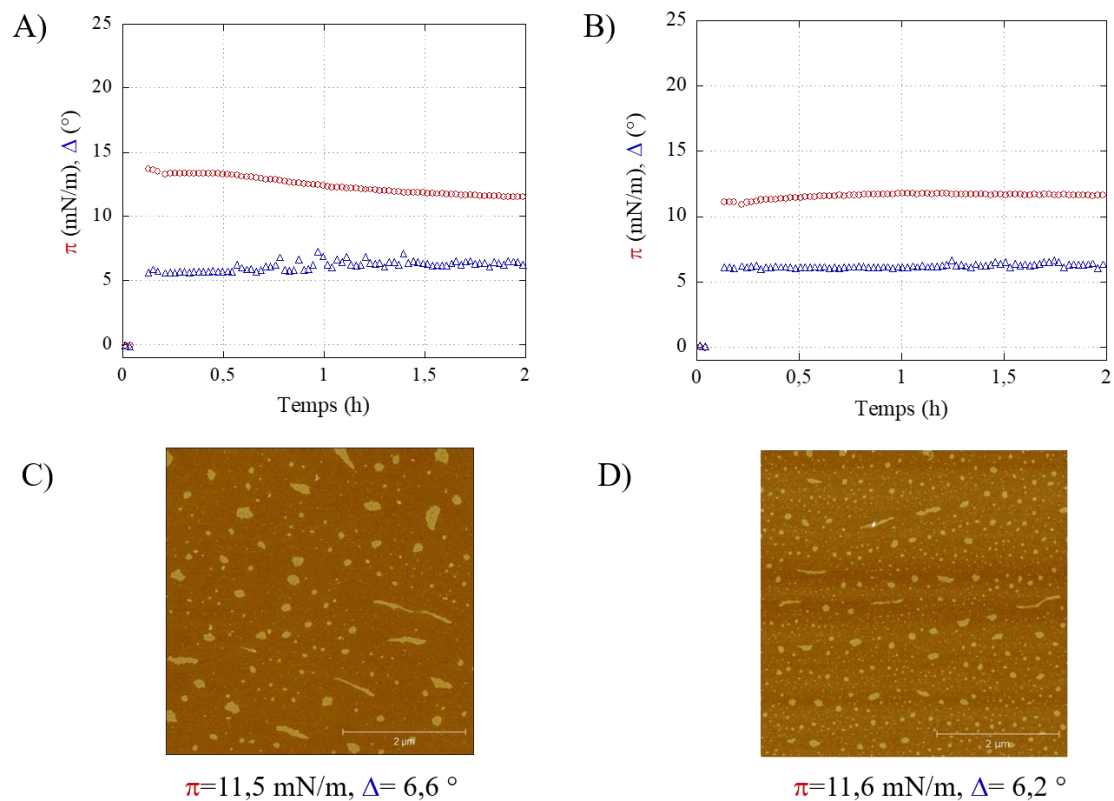
Annexe IV – Images CLSM (88×88 µm²) de la poudre de chlorelles entières (Purasana, France) en présence de sondes Lipitox et Rho-PE. De gauche à droite : transmission (nuance de gris), excitation et collecte aux trois longueurs d'onde 561 (rouge, amphiphiles marqués à la RhodaminePE), 633 (bleu, chlorophylle) et 488 nm (vert, lipides apolaires marqués au Lipitox).



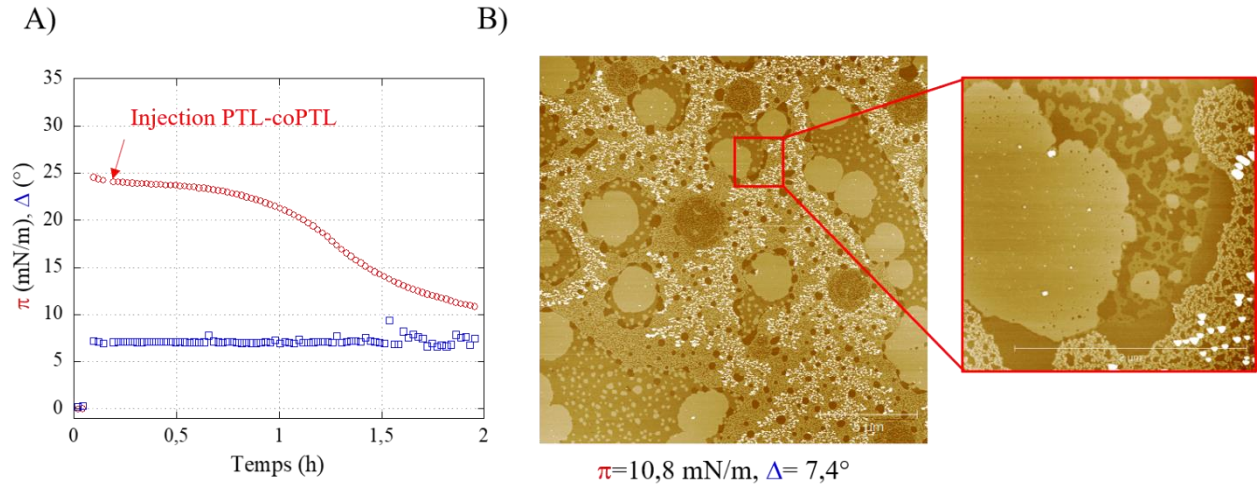
Annexe V - Evolution de la pression de surface (π , mN/m) en fonction de la concentration de la rDGL en sous-phase (pH 5) après 15h de cinétique.



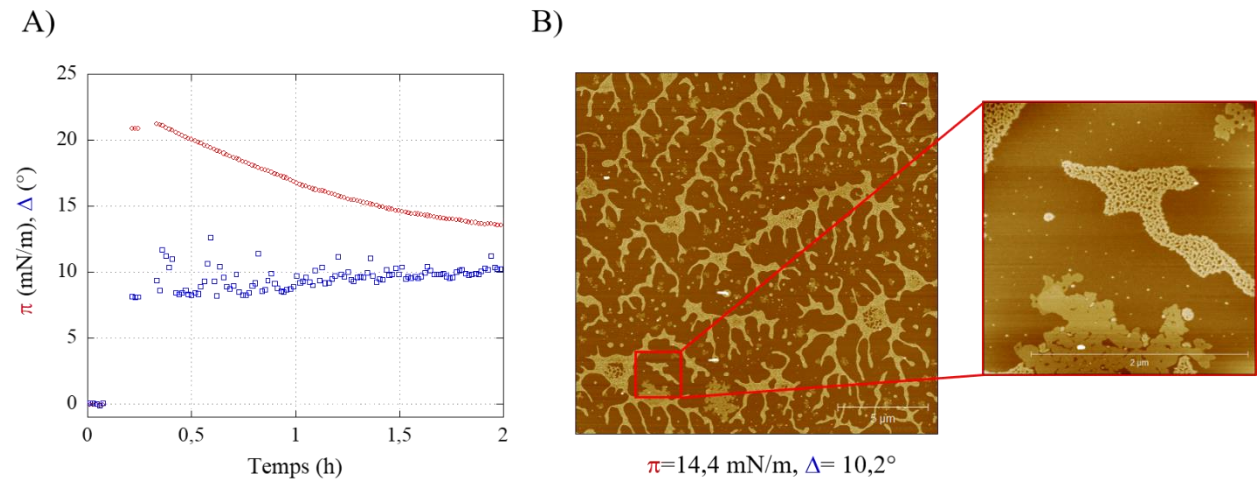
Annexe VI - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la gPLRP2 (0,128 mg/L) en sous-phase d'une monocouche de lipides membranaires d'OB de A) noix, et B) amande à 20 mN/m. Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de l'interface obtenues à 2h après injection de la gPLRP2 (0,128 mg/L) en sous-phase des monocouches de lipides membranaires d'OB de C) noix ($\pi=28,0$ mN/m, $\Delta=8,0^\circ$), D) amande ($\pi=36,2$ mN/m, $\Delta=8,0^\circ$).



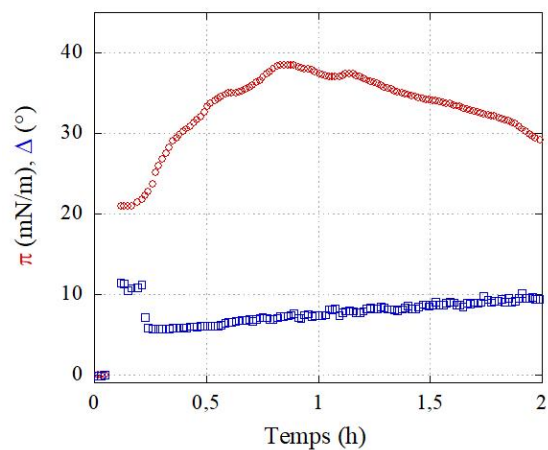
Annexe VII - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase d'une monocouche de lipides membranaires d'OB de A) noix, et B) amandes à 20 mN/m. Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de l'interface obtenues à 2h après injection de la sPLA2-IB (0,128 mg/L) en sous-phase des monocouches de lipides membranaires d'OB de C) noix ($\pi=11,5 \text{ mN/m}, \Delta=6,6^\circ$), D) amandes ($\pi=11,6 \text{ mN/m}, \Delta=6,2^\circ$).



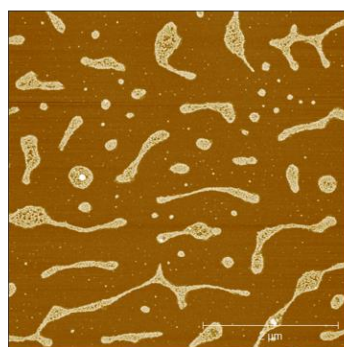
Annexe VIII - A) Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la PTL-coPTL (1-0,2 mg/L), et B) images AFM (20×20 et 2,5×2,5 μm^2) de l'interface obtenue 2h après l'injection de l'enzyme et de son cofacteur en sous-phase de la monocouche modèles de lipides GL/DPPC/pS.



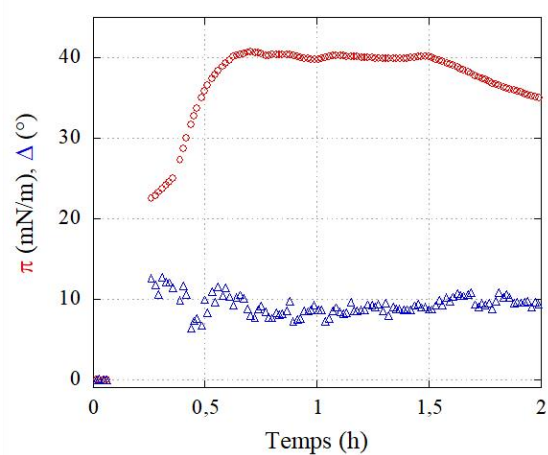
Annexe IX - A) Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la PTL-coPTL (1-0,2 mg/L), et B) images AFM (20×20 et 2,5×2,5 μm^2) de l'interface obtenue à 1h et 2h après injection de l'enzyme et de son cofacteur en sous-phase d'une monocouche de lipide totaux de *Chlorella vulgaris* Purasana.



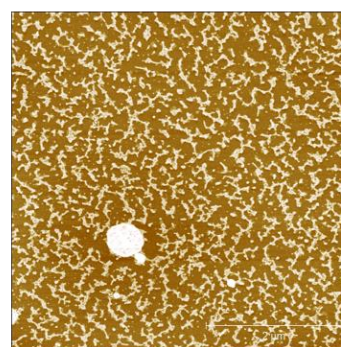
C)



$$\pi=28,3 \text{ mN/m}, \Delta= 10,1^\circ$$



D)



$$\pi=34,6 \text{ mN/m}, \Delta=9,4^\circ$$

Annexe X - Evolution de la pression de surface (π , mN/m, rond rouge) et de l'angle ellipsométrique (Δ , °, triangle bleu) sur une cinétique de 2h après injection de la PTL-coPTL (1-0,2 mg/L) en sous-phase d'une monocouche de lipides membranaires d'OB de A) noix, et B) amande à 20 mN/m. Images AFM ($5 \times 5 \mu\text{m}^2$) de l'interface obtenues à 2h après injection de la PTL-coPTL (1-0,2 mg/L) en sous-phase des monocouches de lipides membranaires d'OB de C) noix ($\pi=28,3 \text{ mN/m}$, $\Delta=10,1^\circ$), D) amande ($\pi=34,6 \text{ mN/m}$, $\Delta=9,4^\circ$).

What are the mechanisms of gastrointestinal lipases adsorption onto heterogenous biomimetic vegetal membranes?

J. KERGOMARD^{1,2}, F. CARRIÈRE³, G. LAMBEAU⁴, G. PABOEUF¹, N. BAROUH^{5,6}, P. VILLENEUVE^{5,6}, C. BOURLIEU² AND V. VIÉ^{1*}

*Jeanne.kergomard@univ-rennes1.fr, *claire.bourliou-lacanal@inrae.fr, *veronique.vie@univ-rennes1.fr

Objectives : to characterize main digestive lipases adsorption onto heterogeneous biomimetic vegetal membrane of increasing complexity and their lipolytic activities using complementary biophysical tools (tensiometry, ellipsometry, atomic force microscopy) and *in vitro* digestion.

Context

Gastrointestinal lipases are crucial for **lipid hydrolysis** and must get adsorbed onto the substrate **interface** prior lipolysis. Such adsorption has not been deeply investigated on biomimetic vegetal membranes containing **galactolipids** as backbone. We had previously demonstrated on model milk fat membrane that phase **heterogeneity** modulated lipase **adsorption**. We wanted to check whether this behavior was generic and the nature of lipolysis products released from such heterogeneous galactolipid based membranes.

What are galactolipids?

Materials and Methods

How did we proceed?

- Emulsion droplet:** Lipolysis = interfacial process. Principle: 01. Formation of the Langmuir lipid film, 02. Enzyme injection, 03. Kinetics (up to 5 h).
- Tensiometry/ellipsometry:** Molecular interfacial interactions (surface pressure), thickness of the interfacial film.
- Atomic Force Microscopy (AFM):** Isopographic visualization of the nanometric scale.

Model monolayer of lipids: 1- GL (MGDG₁₆/DGDG₁₆), 2- GL₁₆/DPPC₁₆/pS₁₀ (MGDG₁₆/DGDG₁₆/DPPC₁₆/pS₁₀). Simplified model of thylakoid membranes. Model vegetal membrane, introduction of DPPC in large quantities to induce phase heterogeneity.

Gastro-intestinal enzymes / microdigestions:

- 01 Gastric lipase (GL) → recombinant (mg gastric lipase) = 37 µg/ml
- 02 Pancreatic lipase protein-related 2 (PLRP2) = 22 µg/ml
- 03 Pancreatic secreted phospholipase A2 (sPLA2-IB) = 32 µg/ml
- 04 Pancreatic triacylglycerol lipase and its cofactor (PTL/coPTL) 250 µg/ml

Quantification of lipolysis products by thin layer chromatography and densitometry.

Results

Enzymes at work in Humans

- Gastric lipase (GL) - 47 kDa:** No lipolytic enzyme acting on polar lipids is observed in the gastric compartment. Responsible for the digestion of 10 to 30% of TAG. Highly active in acidic environment (pH 4-5.4).
- Pancreatic lipase related protein 2 (PLRP2) - 80 kDa:** Responsible for the digestion of galactolipids. Low activity toward TAG and phospholipids. High galactolipase activity on galactolipids and mixed micelles (free galactolipids). Specificity for the hydrolysis of ester bonds at the sn-2 position.
- Pancreatic phospholipase A2 (sPLA2) - 34 kDa:** Phospholipase activity on sn-2 position. Preference for anionic substrates (PE, PS).
- Colipase dependent pancreatic lipase (PTL) - 40 kDa:** Responsible for the digestion of 50% of TAG. Colipase Pancreatic Lipase (PL).

Model - GL₁₆/DPPC₁₆/pS₁₀ - Heterogenous system

Tensiometry/ellipsometry: CONTROL - NO ENZYME. rDGL (pH 5), sPLRP2 (pH 7), sPLA2-IB (pH 7), PTL/coPTL (pH 7).

AFM: rDGL preferentially adsorbed onto the fluid phase and excluded from the condensed domains. In line with previous results on Milk bovine membrane. Phytosterols => better adsorption of rDGL on condensed phases and at edges of the LE/LC phase.

Optimal activity of gPLRP2 at 15 mM, galactolipase and phospholipase activity on GL/DPPC/pS monolayers and liposomes.

Adsorption of sPLA2, more active at 10 mM than 20 mM, => FFA and lysophospholipids from DPPC, no activity on GL => self-organized domains enriched in DPPC or in FFA/lysophospholipids activity on micelles.

Adsorption of PTL/coPTL at the interface and subsequent disorganization of the lipid film, but no enzymatic activity, which is explained by its lack of activity on polar lipids.

Conclusions - A strong surfactant property of GL and its preferential adsorption onto fluid lipid phase and at phase boundary were observed, in line with previous results on milk fat globule membrane. With PLRP2, changes in surface pressure indicated strong galactolipase activity and film reorganization. The injection of sPLA2-IB resulted in DPPC lipolysis only and changed the morphology of condensed domains. PTL/coPTL is adsorbed but has no activity. This study is a step forward to understand the interactions of gastrointestinal lipases with plant lipid membranes, an overlooked aspect of lipid digestion.



Annexe XI - J. Kergomard, F. Carrière, G. Lambeau, G. Paboeuf, N. Barouh, P. Villeneuve, C. Bourliou and V. Vié, What are the mechanisms of gastrointestinal lipases adsorption onto heterogenous biomimetic vegetal membranes? 7th International Conference on Food Digestion ICFD 2022, May 2022, Cork, Ireland. pp.95. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03669301>

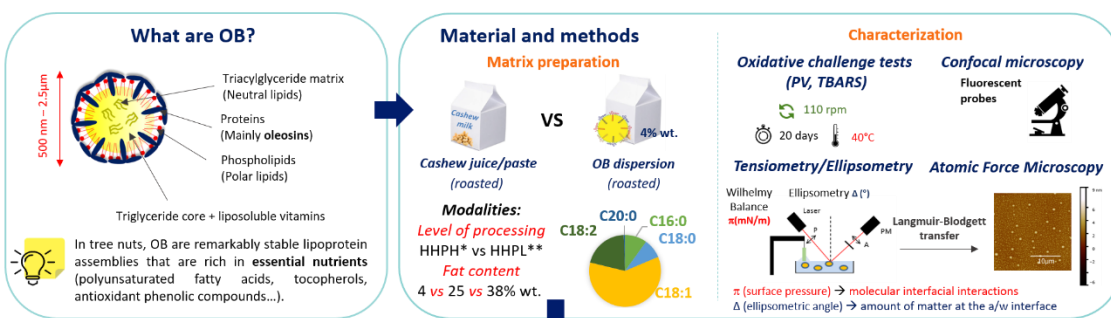


Jeanne Kergomard^{1,2*}, Mélina Robert³, Nathalie Barouh³, Gilles Paboef², Bruno Barea³, Pierre Villeneuve³, Olivier Schafer⁴, Tim J. Wooster⁴, Véronique Vié⁴ and Claire Bourlieu²

¹IPR Institute of Physics, UMR UR1 CNRS 5261, Rennes 1 University, France ; ²IATE, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France ; ³QUALISUD, Univ Montpellier, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ Réunion, Montpellier, France ; ⁴Institute of Materials Science, Nestlé Research, Lausanne, Switzerland

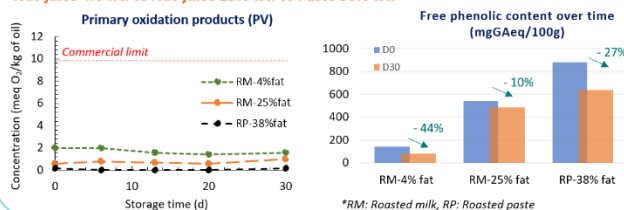
Introduction: The demand for **plant-based beverages** as an **alternative to dairy products** has considerably increased over the recent years. To preserve the **nutritional qualities** of tree nut oil bodies (OB) in these products, we need to control their **physico-chemical stability**.

In this aim, we need to understand i) **the impact of fat content** in the matrix, and ii) **the modification of ultrastructure** induced by usual **industrial processes** (High pressure homogenization, heat treatment).



Results: Impact of fat content – Does increasing fat concentration tend to stabilize the systems?

Nut-juice 4% wt. vs Nut-juice 25% wt. vs Paste 38% wt.



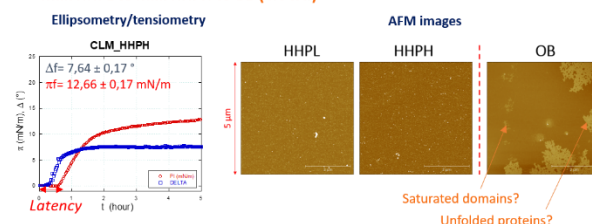
Conclusion: The results show that **increasing fat content tends to stabilize the systems** over time. Values of 25.2 ± 2.6 and 68.4 ± 5.2 meqO₂/kg of fat were reported for 4% wt and 25% wt. respectively after 75 days, supporting this hypothesis.

The **stability** of the three matrices over 30 days of storage can be explained by their **high content of free phenolic compounds**, which can act as **sacrificial agents and protect lipids from oxidation**.

The **FA composition** may also contribute to the chemical stability of the systems, as the samples are composed of 20% saturated fatty acids and 60% oleic acid, **less prone to oxidation than PUFA**.

Results: Impact of ultra-structure – Does processing induced an increase in the reactivity of the systems?

Milk HHPL vs Milk HHPH vs OB (4% wt.)



*HHPH: High pressure homogenization High strength (300/30 bars), **HHPL: High pressure homogenization Low strength (90/10 bars)

Conclusion: The results of the storage test on 4% wt. milks indicate that **HHPH tends to destabilize the systems**, however no significant difference was obtained between homogenization strength (around 2.0 meqO₂/kg of fat for HHPH and HHPL after 30 days of storage test). Nevertheless, ellipsometric studies indicate that **HHPH caused greater deterioration** of compounds in the nut-juice system than HHPL. Indeed, the **lag phase** observed before the increase of the surface pressure indicates that the particles cannot properly stabilize at the interface, probably due to a reduction in hydrophobic interactions. AFM images confirm the hypothesis, with more aggregation at the interface of the HHPH sample.

OB also show a very good stability to oxidation, which confirms the relevance of keeping the native assembly, as shown in a previous study on walnuts [Kergomard et al., Food Chem, 2021].

Conclusion: Overall, the results indicate that the fat content tends to stabilize the cashew juices and pastes, in particular thanks to the presence of free phenolic compounds in the matrix, which plays the role of sacrificial agents against oxidation. The FA profile, rich in saturated and monounsaturated fatty acids, also helps to limit the phenomenon of lipid oxidation. The processing tends to destabilize the systems and the larger scale of homogenization has induced an alteration of the OB interface. As previously described, the native OB assemblies are remarkably stable against oxidation, which raises the interest of their use in food applications.

*Corresponding author:
Jeanne.kergomard@univ-rennes1.fr



Annexe XII - J. Kergomard, M. Robert, N. Barouh, G. Paboef, B. Barea, P. Villeneuve, O. Schafer, T. Wooster, V. Vié & C. Bourlieu-Lacanal, Effects of processing and concentration on the oxidative stability and interfacial behavior of tree nuts oil bodies (OB). Euro Fed Lipid 2021, Oct 2021, Leipzig - Online, Germany.

STABILITY TO OXIDATION AND INTERFACIAL BEHAVIOR AT AIR-WATER INTERFACE OF MINIMALLY-PROCESSED VERSUS PROCESSED WALNUT OIL-BODIES

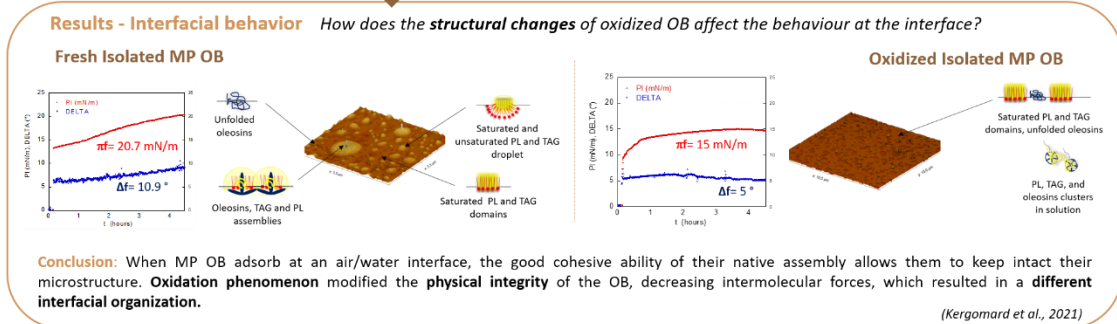
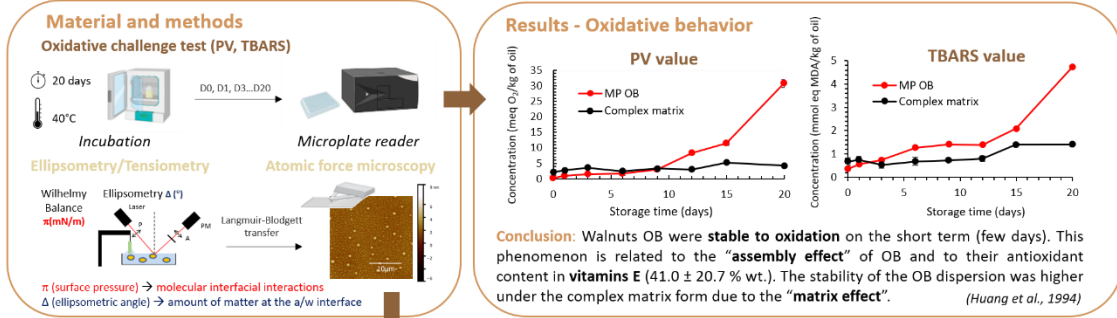
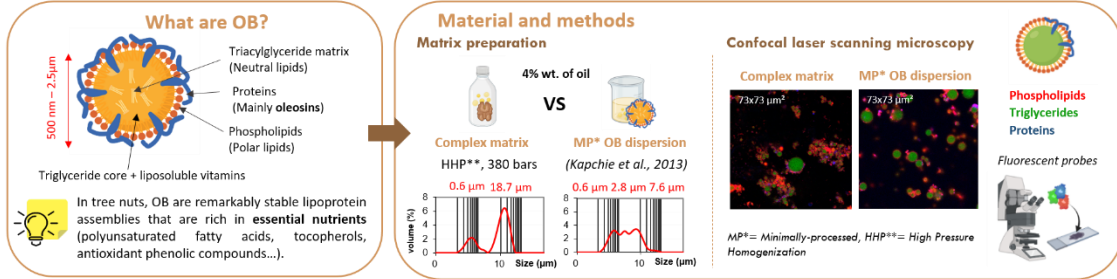


Jeanne Kergomard^{1,2*}, Nathalie Barouh³, Gilles Paboeuf², Pierre Villeneuve³, Olivier Schafer⁴, Tim J. Wooster⁴, Véronique Vié¹ and Claire Bourlieu²

¹IPR Institute of Physics, UMR UR1 CNRS 6251, Rennes 1 University, France ; ²IATE, Univ Montpellier, INRAE, Institut Agro, Montpellier, France ; ³QUALISUD, Univ Montpellier, CIRAD, Institut Agro, IRD, Univ Réunion, Montpellier, France ; ⁴Institute of Materials Science, Nestlé Research, Lausanne, Switzerland

The consumption of walnuts is associated with many health benefits, attributed to their fatty acid profiles, which is rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA). As a result, walnuts are used in several food products, such as walnut-based beverages, where fat is partly dispersed under the form of natural lipoproteic assemblies, which are called oil bodies (OB).

Two questions remain pressing: what is walnut OB's oxidative behavior and what are the consequences of oxidation on its interfacial reactivity?



Conclusion: Altogether, this study unveiled the interesting stability of OB and their specific interfacial reactivity, opening the way to the use of these natural lipoproteic assemblies in various food applications. Nevertheless, their physico-chemical stability during the design process should be taken into consideration. Indeed, the alteration of the physical structure of OB during processing may affect their chemical stability during storage and hence the quality of the final product expected by the consumer. This finding underlines the need to rethink food processing to preserve natural assemblies and their beneficial properties.

*Corresponding author: Jeanne.kergomard@univ-rennes1.fr



Annexe XIII - J. Kergomard, N. Barouh, G. Paboeuf, P. Villeneuve, O. Schafer, T. Wooster, V. Vié & C. Bourlieu-Lacanal, Stability to oxidation and interfacial behavior at the air-water interface of minimally-processed versus processed walnut oil-bodies. Lipid droplets & Oleosomes - 2nd International Conference, Dec 2021, Strasbourg, France. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03466652>

OXIDATIVE AND INTERFACIAL BEHAVIOR OF NATIVE OIL BODIES FROM WALNUT

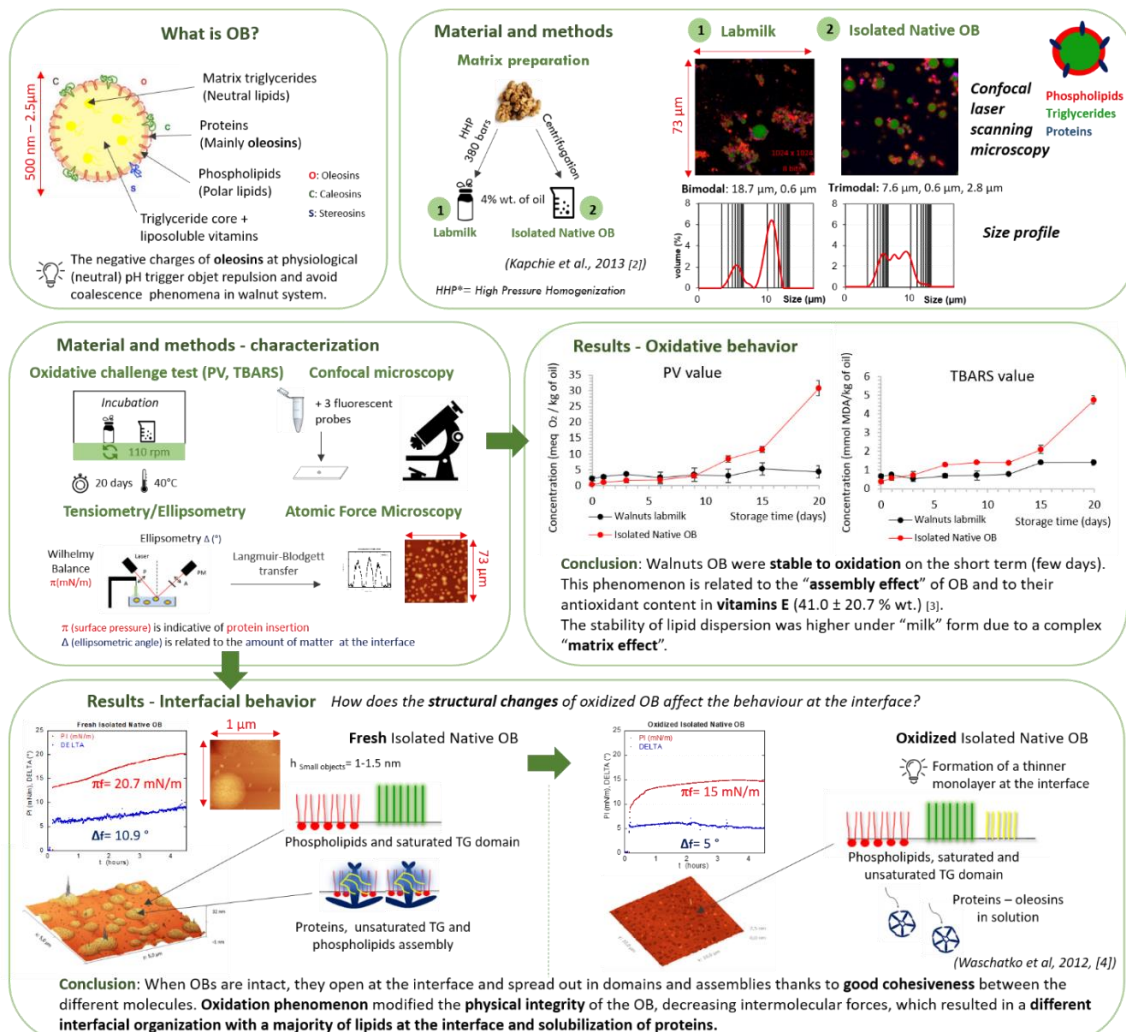
Jeanne Kergomard^{1,2}, Véronique Vié², Gilles Paboef², Nathalie Barouh¹, Bruno Barea¹, Pierre Villeneuve¹,
Olivier Schafer³, Tim J. Wooster³, Claire Bourlieu^{1*}

¹ INRA-CIRAD Montpellier 1253 IATE, France; ² IPR Institute of Physics, Rennes University 1, France; ³ IMS Nestlé Research, Lausanne, Switzerland



Walnuts are among the most widely consumed commercially grown tree nuts in the world. Indeed, their consumption is associated with many health benefits, such as reducing the risk of cardiovascular disease, coronary heart disease and other neurological disorders. These benefits are attributed to their fatty acid profiles, which is rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) [1]. As a result, walnuts are used in several food products, such as walnut-based beverages, where fat is partly dispersed under the form of natural lipoproteic assemblies, which are called oil bodies (OB).

Two questions remain pressing: what is walnut OB's oxidative behavior and what are the consequences of oxidation on its interfacial reactivity?



CONCLUSION: Altogether, this study unveiled the interesting stability of OB and their specific interfacial reactivity opening the way to interesting food applications of these natural lipoproteic assemblies.

References

- [1] D. Hayes, M. J. Angove, J. Tucci, C. Dennis, "Walnuts (*Juglans regia*) Chemical Composition and Research in Human Health", *Crit Rev Food Sci Nutr* vol. 56:8, pp. 1231-1241, 2016
- [2] V. Rapche, L. Yao, C. C. Hauck, T. Wang, P. A. Murphy, "Oxidative stability of soybean oil in oleosomes as affected by pH and iron", *Food Chemistry* vol. 141, pp. 2286-2295, 2013
- [3] S.-W. Huang, E. N. Frankel, J. B. German, "Antioxidant activity of alpha and gamma-tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions", *J. Agric. Food Chem.* Vol. 42, pp. 2508-2514, 1994
- [4] G. Waschatko, B. Schiebl, T. A. Vilgis, A. Junghans, "Soybean oleosomes behavior at the Air-Water Interface", *J. Phys. Chem. B* vol. 116, pp. 10831-10841, 2012



Jeanne.kergomard@univ-rennes1.fr

Annexe XIV - J. Kergomard, V. Vié, G. Paboef, N. Barouh, B. Barea, et al., Oxidative and interfacial behavior of native oil bodies from walnut. Euro Fed Lipid Seville 2019, Oct 2019, Séville, Spain. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02315046v2>

Titre : Activité enzymatique sur les lipides végétaux : combinaison de mesures interfaciales à l'échelle moléculaire (nm) et de mesures cinétiques de dégradation à l'échelle de l'objet (µm).

Mots-clés : Membranes végétales, hétérogénéité, galactolipides, lipases digestives

Résumé : Les organismes de santé recommandent aujourd'hui de diversifier et d'augmenter nos apports alimentaires en acides gras polyinsaturés (AGPI) ω3, essentiels au bon fonctionnement de nos cellules. Pour répondre à ces recommandations, les membranes végétales, et en particulier les membranes photosynthétiques, représentent un réel potentiel, car elles contiennent des lipides spécifiques, et notamment des galactolipides, dont la dégradation par des réactions enzymatiques fournit des AGPI ω3. De par leur composition particulière, ces systèmes présentent des coexistences de phases et donc une hétérogénéité latérale influant sur leur digestibilité. Or, afin d'exploiter de façon optimale les sources lipidiques végétales, il est nécessaire de comprendre leur devenir dans le tractus gastro-intestinal humain.

Les résultats obtenus dans ce travail de recherche viennent apporter une compréhension approfondie des mécanismes d'interactions entre les enzymes digestives et les assemblages membranaires végétaux. En particulier, ce travail est pionnier sur la digestion des monocouches hétérogènes de galactolipides et de phospholipides par de proches analogues des principales enzymes responsables de la dégradation gastro-intestinale des lipides végétaux chez l'Homme. L'originalité de cette étude repose sur une caractérisation poussée du comportement interfacial de systèmes lipidiques végétaux, présentant une hétérogénéité chimique induisant une hétérogénéité physique.

La digestibilité de ces assemblages lipidiques végétaux

hétérogènes a été étudiée à l'échelle moléculaire, mais également à l'échelle de l'objet micronique.

Ce travail a permis de rendre compte de la spécificité de substrat des lipases et phospholipase étudiées (rDGL, sPLA2-IB, gPLRP2) sur les lipides polaires végétaux. En particulier, les activités galactolipase, mais également phospholipase A1 de la gPLRP2 ont été observées au niveau des systèmes hétérogènes de galactolipides et de phospholipides. La généralité d'action de ces enzymes par rapport à l'état physique des membranes a également été prouvée. Nous démontrons ici qu'au niveau des interfaces lipidiques, une forte teneur en groupements acyls polyinsaturés peut amplifier la compressibilité locale et être un atout pour l'insertion des lipases digestives. Cet aspect physique reste à confronter avec la spécificité chimique de l'enzyme. Globalement, les assemblages lipidiques végétaux sont riches en lipides polaires et particulièrement en galactolipides, qui concentrent des quantités importantes d'AGPI ω3, et sont bioaccessibles en conditions modèles sous l'action de la gPLRP2. Ces assemblages présentent en outre des propriétés tensioactives et de stabilité à l'oxydation caractérisées dans ce travail. L'activité galactolipase de la PLRP2 au niveau des monocouches membranaires modèles modulables, mais également au niveau des assemblages membranaires naturels, ouvre la voie vers le développement d'alternatives alimentaires végétales pour vectoriser des AGPI ω3, et contribuer à rééquilibrer les régimes alimentaires humains et animaux.

Title: Enzymatic activity on plant lipids: combining interfacial measurements at the molecular (nm) scale with degradation kinetic measurements at the object (µm) scale.

Keywords: Plant membranes, heterogeneity, galactolipids, digestive lipases

Abstract: Health organizations now recommend diversifying and increasing our dietary intake of polyunsaturated fatty acids (PUFA) ω3, which are essential for the proper functions of our cells. To meet these recommendations, plant membranes, and in particular photosynthetic membranes, represent a real potential, as they contain specific lipids, and in particular galactolipids, whose degradation by enzymatic reactions provides PUFA ω3. Due to their particular composition, these systems present phase coexistences and thus lateral heterogeneity impacting their digestibility. In order to optimally exploit plant lipid sources, it is necessary to understand their fate in the human gastrointestinal tract.

The results obtained in this research work provide an in-depth understanding of the mechanisms of interaction between digestive enzymes and plant membrane assemblies. In particular, this work is the first to investigate the digestion of heterogeneous monolayers of galactolipids and phospholipids by close analogues of the main enzymes responsible for the gastrointestinal degradation of plant lipids in humans. The originality of this study is based on a thorough characterization of the interfacial behavior of plant lipid systems, presenting a chemical heterogeneity inducing a physical heterogeneity. The digestibility of these heterogeneous plant lipid assemblies was studied at the

molecular scale, but also at the micronic object scale.

This work allowed to report the substrate specificity of the studied lipases and phospholipases (rDGL, sPLA2-IB, gPLRP2) on plant polar lipids. In particular, the galactolipase, but also phospholipase A1 activities of gPLRP2 were observed in heterogeneous galactolipid and phospholipid systems. The genericity of action of these enzymes with respect to the physical state of the membranes has also been demonstrated. We demonstrate here that at the lipid interfaces, a high content of polyunsaturated acyl groups can amplify the local compressibility and be an asset for the insertion of digestive lipases. This physical aspect remains to be confronted with the chemical specificity of the enzyme. Overall, plant lipid assemblies are rich in polar lipids and particularly galactolipids, which concentrate significant quantities of ω3 PUFA, and are bioaccessible under model conditions under the action of gPLRP2. These assemblies also exhibit surface-active and oxidative stability properties characterized in this work. The galactolipase activity of PLRP2 at the level of modulable model membrane monolayers, but also at the level of natural membrane assemblies, opens the way to the development of plant-based dietary alternatives to vectorize ω3 PUFA, and contribute to rebalancing human and animal diets.