



HAL
open science

Établissement et stabilisation d'une formulation lipidique équilibrée nutritionnellement : résolution des problèmes de texture et de flaveur, et validation nutritionnelle sur modèle animal

Virginie Dubois

► **To cite this version:**

Virginie Dubois. Établissement et stabilisation d'une formulation lipidique équilibrée nutritionnellement : résolution des problèmes de texture et de flaveur, et validation nutritionnelle sur modèle animal. Alimentation et Nutrition. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2007. Français. NNT : 2007INPL064N . tel-01754532

HAL Id: tel-01754532

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754532v1>

Submitted on 21 May 2021

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

St Hubert

*Mémoire de Thèse
présenté à l'Institut National Polytechnique de Lorraine
en vue d'obtention du grade de Docteur de l'INPL
Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires*

Présenté par Virginie Dubois
Ingénieur ENITIAA

le 18 Octobre 2007
Soutenance confidentielle

**Etablissement et stabilisation d'une formulation
lipidique équilibrée nutritionnellement : résolution
des problèmes de texture et de flaveur, et validation
nutritionnelle sur modèle animal.**

Rapporteurs :

*Pr. Denis PONCELET, ENITIAA, Nantes
Dr Alain GRYNBERG, Directeur de recherche, INRA, Jouy-en-Josas*

Examineurs :

*Pr. Michel PARMENTIER, Directeur de thèse, LSGA, Nancy-Université
Pr. Jacques FANNI, Co-directeur de thèse, LSGA, Nancy-Université
Dr Sylvie BRETON, Responsable affaires scientifiques, ST HUBERT, Rungis
Pierre VERDELLET, Consultant, R&D FOOD INNOV, Paris*

« Ce que ni beurre ni whisky ne peuvent guérir est incurable ».

[Proverbe irlandais]

*A mes parents et mes grands-parents.
A Papy, à Mamie...*

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée dans le Laboratoire de Science et Génie Alimentaires de Nancy-Université, je tiens donc tout d'abord à remercier MM. Joël HARDY et Stéphane DESOBRY de m'avoir accueillie dans ce laboratoire pendant ces trois ans.

Comme ce travail s'est fait sous Convention industrielle de formation par la recherche (CIFRE), je remercie MM. Patrick CAHUZAC et Pierre VERDELLET de m'avoir permis de passer ces trois années financées dans l'entreprise St Hubert.

Je remercie également Mme Nicole COMBE et son équipe pour leur accueil à l'ITERG-Nutrition à Talence, et leur support technique.

Pour leurs conseils, je remercie mes encadrants, MM. Michel PARMENTIER et Jacques FANNI, ainsi que M. Michel LINDER. Sur un plan plus personnel, je les remercie chaudement pour leur grande qualité de « remonteurs de moral », et pour l'ambiance inimitable des congrès de lipidistes !

La solidarité entre thésards dans le laboratoire est une chance, et j'ai pu en faire l'expérience grâce à Claire, Sandrine, Reine et Kassem, un très grand merci d'avoir traversé les mêmes épreuves que moi, et de m'avoir soutenue dans mes coups de stress...

Merci aussi à Aude pour les soirées « thésardes CIFRE », pour les fous rires et les pâtes au roquefort !

Je tiens également à remercier Mme Sylvie BRETON, responsable industriel, pour sa grande disponibilité et sa bonne humeur constante.

Merci à M. Fabien HAMON et Mme Béatrice LEMOIS de m'avoir fait une place dans l'usine, et de m'avoir donné leur confiance tout au long de ces trois ans.

Pour leur accueil, l'intégration dans l'équipe « usine », leurs gâteaux et leur bonne humeur qui rend les pauses de midi tellement sympathiques, je remercie Nadine, Béatrice, Céline, Valérie, Eric, Jean-Paul, Christophe, Sylvain, Charles, Olivier...

Derniers mais pas des moindres, un grand merci à Norbert MARCHAL et David BARRET pour leur fausse mauvaise humeur face à l'huile de poisson lors de mes (très) nombreuses séances d'essais, et pour les manips de dernière minute. Merci pour l'hébergement dans le bureau, l'utilisation abusive de la « clé à café », et l'observation attentive de la lécithine qui plisse !

Parce qu'un thésard n'est pas qu'un membre de la grande famille des chercheurs, un très grand merci à ceux qui m'ont supportée ces derniers mois.

Tout d'abord, un merci tout particulier à maman, pour ses précieuses corrections, sa présence et ses conseils.

A mon « Conseil de famille », mes parents et mon frère, pour leur soutien de tous les instants, je n'en serais pas là sans eux (alors, il y en a encore, des « points qui manquent », maintenant ?...).

Enfin, à Fabrice, un grand, un énorme merci du fond du coeur pour sa patience d'ange, son soutien et sa tendresse (mais oui, on va dire qu'il y a des oméga3 dans le *chorizo iberico*...).

Abréviations

ABREVIATIONS

α -TE	Equivalent α -tocophérol
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine (<i>angiotensin converting enzyme</i>)
AET	Apport énergétique total
AFSSA	Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AG	Acide gras
ALA	Acide α -linoléique
ANC	Apports nutritionnels conseillés
apo	Apolipoprotéine
ARA	Acide arachidonique
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluène
CA	Acide caprique
Cdk	Kinase cycline-dépendante (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CEDAP	Commission d'étude des denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière
COX	Cyclooxygénase
CRP	Protéine C réactive (<i>C-reactive protein</i>)
CSHPF	Conseil supérieur d'hygiène publique de France
CV	Cardio-vasculaire
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DHA	Acide docosahexaénoïque
dihomo-GLA	Acide dihomogamma-linoléique
DPA	Acide docosapentaénoïque
EC	Ester de cholestérol
EFSA	Autorité européenne de sécurité alimentaire (<i>European food safety authority</i>)
EPA	Acide eicosapentaénoïque
GLA	Acide gamma-linoléique
GUV	Liposome unilamellaire géant (<i>giant unilamellar vesicle</i>)
Gx (mitose)	Phase de transition (x = 1 ou 2)
HDL	Lipoprotéine de haute densité (<i>high density lipoprotein</i>)
HLB	Balance hydrophile-lipophile (<i>hydrophilic-lipophilic balance</i>)
IDL	Lipoprotéine de densité intermédiaire (<i>intermediate density lipoprotein</i>)
IL-x	Interleukine x
IMC	Indice de masse corporelle
IP	Indice de peroxyde
IpA	Indice de para-anisidine
J+x	Jour x après la fabrication
LA	Acide linoléique
LCAT	Lécithine-cholestérol acyl transférase
LCPUFA	Acide gras polyinsaturé à longue chaîne
LCSFA	Acide gras saturé à longue chaîne
LDL	Lipoprotéine de faible densité (<i>low density lipoprotein</i>)
LOX	Lipoxygénase
LPC	Lyso-phosphatidylcholine
LRA	Acide laurique
LRP	Récepteur hépatique des chylomicrons (<i>LDL-related protein</i>)
LT	Leucotriène
LUV	Liposome unilamellaire de grande taille (<i>large unilamellar vesicle</i>)
M (mitose)	Phase de division cellulaire
MA	Acide myristique
MAPA	Monitoring ambulatoire de pression artérielle
MG	Taux de matière grasse

MGLA	Matière grasse laitière anhydre
MLV	Liposome multilamellaire (<i>multilamellar vesicle</i>)
MUFA	Acide gras monoinsaturé
NF- κ B	Facteur de transcription pour VCAM-1 (<i>nuclear factor κB</i>)
OA	Acide oléique
PA	Acide palmitique
PAI-1	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène (<i>plasminogen activator inhibitor</i>)
PC-PLC	Phospholipase C spécifique de la PC (<i>PC-specific phospholipase C</i>)
PG	Prostaglandine
PGPR	Polyglycérol de polyricinoléate
PI	Phosphatidylinositol
PL	Phospholipide
PS	Phosphatidylsérine
PUFA	Acide gras polyinsaturé
S (mitose)	Phase de synthèse
SA	Acide stéarique
SFA	Acide gras saturé
SFC	Taux de solide (<i>solid fat content</i>)
SL	Sphingolipide
SR-B1	Récepteur hépatique des HDL (<i>scavenger receptor B1</i>)
SUV	Liposome unilamellaire de petite taille (<i>small unilamellar vesicle</i>)
TAG	Triacylglycérol
TAGp	« Triglycérides » plasmatiques
TBA	Acide thiobarbiturique
TBARs	Substances réagissant au TBA (<i>thiobarbituric acid reacting substances</i>)
TNF- α	Cytokine inflammatoire (<i>tumor necrosis factor α</i>)
Totox	Indice total d'oxydation des lipides (<i>total oxidative value</i>)
t-PA	Activateur du plasminogène tissulaire (<i>tissue plasminogen activator</i>)
Tx	Thromboxane
u.a.	Unité arbitraire d'aire de pic en chromatographie
VCAM-1	Molécule d'adhésion (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VLDL	Lipoprotéine de très faible densité (<i>very low density lipoprotein</i>)

Sommaire

SOMMAIRE

A. INTRODUCTION

INTRODUCTION.....	1
--------------------------	----------

B. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

LES LIPIDES ALIMENTAIRES.....	3
--------------------------------------	----------

I/ Structure des lipides.....	3
--------------------------------------	----------

I. 1) Les acides gras.....	5
----------------------------	---

I. 2) Les triacylglycérols.....	5
---------------------------------	---

I. 3) Les phospholipides.....	6
-------------------------------	---

II/ Propriétés physiques des corps gras.....	7
---	----------

II. 1) Point de fusion.....	7
-----------------------------	---

II. 2) Structure cristalline.....	7
-----------------------------------	---

LE METABOLISME DES LIPIDES.....	9
--	----------

I/ Nutrition lipidique : mécanismes et régulation alimentaire.....	9
---	----------

I. 1) Mécanismes.....	9
-----------------------	---

I. 2) Influence de la structure des acides gras.....	10
--	----

I. 3) Influence de la structure des triacylglycérols.....	10
---	----

I. 4) Le cas des phospholipides.....	11
--------------------------------------	----

II/ Métabolisme des lipoprotéines : mécanismes, régulation.....	11
--	-----------

II. 1) Les acteurs du métabolisme des lipoprotéines.....	12
--	----

II. 2) Le métabolisme des lipoprotéines.....	14
--	----

II. 3) L'influence de la structure des acides gras.....	16
---	----

II. 4) L'importance de la position des acides gras dans les triacylglycérols.....	19
---	----

PATHOLOGIES LIÉES AU METABOLISME DES LIPIDES.....	21
--	-----------

I/ Les facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires.....	21
---	-----------

I. 1) Facteurs non modifiables.....	22
-------------------------------------	----

I. 2) Facteurs modifiables.....	22
---------------------------------	----

II/ L'athérosclérose.....	25
----------------------------------	-----------

III/ L'accident cardio-vasculaire.....	27
---	-----------

III. 1) La contraction des cardio-myocytes.....	28
---	----

III. 2) La contraction du myocarde.....	28
---	----

III. 3) L'accident ischémique.....	29
------------------------------------	----

IV/ Influence de la structure des acides gras.....	30
---	-----------

IV. 1) Oxydation des LDL.....	30
-------------------------------	----

IV. 2) Inflammation.....	30
--------------------------	----

IV. 3) Prolifération des cellules musculaires lisses.....	31
---	----

IV. 4) Sécrétion de molécules d'adhésion.....	32
---	----

IV. 5) Coagulation.....	33
-------------------------	----

IV. 6) Hypertension.....	34
--------------------------	----

IV. 7) Fréquence cardiaque.....	34
---------------------------------	----

IV. 8) Accident cardio-vasculaire.....	35
--	----

IV. 9) Le rôle particulier du précurseur.....	37
---	----

OXYDATION ET ANTIOXYDANTS.....	39
---------------------------------------	-----------

I/ Mécanisme général de l'oxydation.....	39
---	-----------

II/ Evaluation de l'oxydation.....	41
---	-----------

II. 1) Méthodes instantanées.....	41
-----------------------------------	----

II. 2) Méthodes accélérées.....	43
---------------------------------	----

III/ Les antioxydants dans les produits alimentaires.....	43
--	-----------

III. 1) Différents types d'antioxydants.....	43
--	----

III. 2) Synergie entre les antioxydants.....	45
--	----

IV/	La protection de l'organisme contre l'oxydation	46
LA MICROENCAPSULATION.....		47
I/	Le cahier des charges des particules.....	47
I. 1)	Température et pH.....	47
I. 2)	Contraintes mécaniques et enzymatiques.....	48
I. 3)	Taille des particules et solubilité	48
II/	Les techniques de microencapsulation	48
II. 1)	Définitions	49
II. 2)	Procédés physico-chimiques	49
II. 3)	Procédés mécaniques	51
II. 4)	Inconvénients des différentes techniques présentées	53
III/	Les matériaux utilisés.....	54
III. 1)	Matériaux envisageables dans le cadre de ce projet.....	54
III. 2)	Matériaux non envisageables dans le cadre de ce projet.....	54
IV/	Discussion sur ces technologies.....	55
LES LIPOSOMES.....		57
I/	Structure des liposomes	57
I. 1)	Organisation spatiale des solutions aqueuses de phospholipides.....	57
I. 2)	Propriétés physiques des phospholipides	58
II/	Procédés de fabrication.....	60
II. 1)	Préparation de MLV.....	60
II. 2)	Préparation de SUV	60
II. 3)	Préparation de LUV	61
III/	Application des liposomes, la vectorisation d'ingrédients.....	62
III. 1)	Origine des liposomes	62
III. 2)	Formulations.....	62
III. 3)	Protection d'ingrédients.....	63
III. 4)	Vectorisation dans des aliments	63
III. 5)	Vectorisation chez l'homme	63
III. 6)	Aide technologique.....	63
IV/	Discussion sur la technologie des liposomes	63
<u>C. LE PROJET DE THESE</u>		
	LE PROJET DE THESE.....	65
<u>D. BASES DE LA FORMULATION</u>		
LES CORPS GRAS DE 3^{EME} GENERATION.....		67
I/	Introduction	67
I. 1)	Historique	67
I. 2)	Définitions	68
II/	Le marché des corps gras « non beurre ».....	68
III/	Les trois générations de corps gras « non beurre ».....	70
III. 1)	Présentation des générations de produits.....	70
III. 2)	Panorama du marché des corps gras santé.....	71
LES MATIERES PREMIERES : LES HUILES.....		77
I/	Composition en acides gras des huiles végétales.....	77
I. 1)	Groupe acides gras saturés.....	78
I. 2)	Groupe acides gras monoinsaturés.....	79
I. 3)	Groupe acides gras polyinsaturés.....	79
I. 4)	Les sources végétales classées selon leur profil nutritionnel	81
I. 5)	Discussion sur ces sources végétales.....	88
II/	Composition des huiles de poissons et autres organismes marins.....	89
II. 1)	Majorité d'EPA.....	89
II. 2)	Majorité de DHA	89

II. 3)	Proportions équivalentes d'EPA et de DHA	90
II. 4)	Les sources classées selon leur profil nutritionnel	90
II. 5)	Discussion sur ces sources animales	96
III/	Composés volatils des huiles de poissons	97

LE PROFIL EN ACIDES GRAS OPTIMAL 101

I/	Le cadre législatif entourant les allégations	101
II/	Consommations et recommandations	102
III/	Etablissement du profil optimal.....	103

E. FORMULATION ET PHYSICO-CHIMIE

INFLUENCE DE LA FORMULATION DE LA PHASE CONCRETE SUR LA TEXTURE..... 105

I/	Caractéristiques des matières premières.....	105
I. 1)	Graisses concrètes	105
I. 2)	Huiles fluides	108

INFLUENCE DE LA FORMULATION DE LA PHASE FLUIDE SUR LA FLAVEUR..... 111

I/	Lavage d'huile de poisson à l'eau.....	111
I. 1)	Profil en composés volatils des huiles de poisson anhydres.....	113
I. 2)	Protocole de lavage.....	114
I. 3)	Impact des lavages à l'eau sur les huiles de poisson	114
I. 4)	Caractérisation des composés volatils	120

F. RESULTATS NUTRITIONNELS

ETUDE DE LA BIODISPONIBILITE CHEZ LE RAT DE PUFA INCORPORES DANS UN CORPS GRAS..... 123

I/	Description de l'étude	123
I. 1)	Design de l'étude.....	123
I. 2)	Analyses effectuées.....	124
I. 3)	Croissance des animaux	125
II/	Composition en acides gras des lipides plasmatiques	126
II. 1)	Composition en acides gras des triacylglycérols plasmatiques	127
II. 2)	Composition en acides gras des phospholipides plasmatiques	128
II. 3)	Composition en acides gras des esters de cholestérol plasmatiques.....	129
III/	Biodisponibilité cellulaire	130
III. 1)	Composition en acides gras du tissu adipeux.....	130
III. 2)	Composition en acides gras des membranes érythrocytaires	132
III. 3)	Composition en acides gras de la membrane des cellules cérébrales.....	133
IV/	Evaluation du statut oxydatif	134
V/	Discussion.....	137

PARAMETRAGE DE L'ETUDE CLINIQUE..... 139

I/	Introduction	139
II/	Facteurs cible.....	140
III/	Marqueurs physiologiques	140
IV/	Design de l'étude.....	141
V/	Conclusion.....	142

G. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES	143
---	------------

H. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES.....	147
------------------------	------------

I. ANNEXES

ANNEXES EXPERIMENTALES	173
-------------------------------------	------------

I/ Extraction et transméthylation des acides gras..... 173

I. 1) Extraction par la technique de Folch et al. (1957) [154]	173
I. 2) Extraction par la technique de Peuchant et al. (1989) [389].....	173
I. 3) Extraction et transméthylation par la technique de Lepage et Roy (1984) [292].....	174
I. 4) Transméthylation par la technique BF ₃ -méthanol de Morrison et Smith (1964) [345].....	174

II/ Techniques chromatographiques..... 174

II. 1) Analyse du profil en acides gras par chromatographie en phase gazeuse	174
II. 2) Analyse des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse	175
II. 3) Séparation des classes de lipides par chromatographie sur couche mince	176
II. 4) Séparation des classes de lipides en chromatographie sur rod, Iatroscan®.....	176
II. 5) Analyse de l' α -tocophérol par chromatographie liquide haute performance	177

III/ Estimation de l'oxydation

III. 1) Oxydation dans le produit fini : Indice de peroxyde (NF EN ISO 3960).....	178
III. 2) Oxydation dans l'organisme : Mesure des TBARs par spectrophotométrie.....	178

IV/ Analyse de la texture des corps gras..... 179

IV. 1) Calorimétrie différentielle à balayage	179
IV. 2) Pénétrométrie.....	179

REMERCIEMENTS PARTICULIERS.....	181
--	------------

LISTE DES FIGURES

B. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure B-1 : Structure générale d'un acide gras, l'acide palmitoléique.....	4
Figure B-2 : Représentation schématique des acides α -linoléique (haut) et linoléique (bas), respectivement les précurseurs des familles n-3 et n-6.	4
Figure B-3 : Conversion des acides linoléique et α -linoléique en dérivés à longue chaîne et synthèse des eicosanoïdes à partir des acides arachidonique et eicosapentaenoïque [d'après 61, 357].	4
Figure B-4 : Représentation schématique d'un triacylglycérol, formé d'un squelette glycérol sur lequel sont estérifiés trois acides gras, en position sn-1, 2 et 3.	5
Figure B-5 : Représentation schématique des quatre types de glycérophospholipides [d'après 394].	6
Figure B-6 : Principales sous-cellules adoptées par les chaînes cristallisées des résidus acides gras [d'après 372].	8
Figure B-7 : Représentation de villosités intestinales [59].	10
Figure B-8 : Structure schématique d'une lipoprotéine [540].	12
Figure B-9 : Illustration de l'évolution du risque d'accident cardio-vasculaire fatal à 10 ans en fonction de certains facteurs de risque [487].	21
Figure B-10 : Représentation schématique de la constitution des cellules spumeuses [358].	26
Figure B-11 : Représentation schématique d'une plaque d'athérome adulte [358].	27
Figure B-12 : Evolution du potentiel de membrane d'un myocyte pendant une contraction [d'après 285].	28
Figure B-13 : Electrocardiogramme schématique [d'après 541].	29
Figure B-14 : Synthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique (gauche) et de l'acide eicosapentaenoïque (droite) [d'après 2, 3, 288].	31
Figure B-15 : Intervention de la kinase cycline-dépendante 2 pendant le cycle mitotique [d'après 545].	32
Figure B-16 : Cascade de réactions aboutissant à la coagulation. Mise en évidence des composés à tendance procoagulante et anticoagulante [d'après 160, 213, 363].	33
Figure B-17 : Systèmes rénine-angiotensine et kinine-kallicréine [d'après 152 et 420].	34
Figure B-18 : Risque relatif de mort subite, ajusté pour les facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires, en fonction de la consommation journalière de LCPUFA n-3 (environ 10^5 person-years) [d'après 19, 467].	36
Figure B-19 : Risque relatif d'accident cardio-vasculaire fatal, ajusté pour les facteurs de risque classiques, en fonction de la consommation journalière de LCPUFA n-3 (environ $1,2 \cdot 10^6$ person-years) [d'après 112, 209, 265].	37
Figure B-20 : Mécanisme de la peroxydation induite par l'oxygène triplet [d'après 395].	40
Figure B-21 : Mécanisme de la peroxydation induite par l'oxygène singulet [d'après 395, 494].	40
Figure B-22 : Illustration de l'évolution des trois grandeurs permettant d'évaluer l'oxydation d'un corps gras [d'après 234, 387].	42
Figure B-23 : Formule topologique des tocophérols [d'après 368].	44
Figure B-24 : Formule topologique des tocotriénols [d'après 368, 447].	44
Figure B-25 : Formule topologique de l'acide citrique.	45
Figure B-26 : Formule topologique de l'acide ascorbique.	45
Figure B-27 : Diamètre moyen des particules produites par différentes techniques d'encapsulation [d'après 156].	48
Figure B-28 : Représentation schématique du principe de la technique de coacervation simple.	50
Figure B-29 : Représentation schématique du principe de la technique de polycondensation interfaciale.	51
Figure B-30 : Représentation schématique de la technique de spray-drying.	52
Figure B-31 : Représentation schématique de la technique d'extrusion-gélification de goutte.	52
Figure B-32 : Représentation schématique du principe de la technique d'évaporation de solvant.	53
Figure B-33 : Représentation schématique de deux types d'émulsions stabilisées par des phospholipides.	57
Figure B-34 : Représentation d'une bicouche phospholipidique dans un milieu aqueux [d'après 538].	58
Figure B-35 : Représentation d'un liposome, coupé en une demi-sphère [d'après 538].	58

Figure B-36 : Diagramme de phase d'un mélange binaire phosphatidylcholine – eau.	59
Figure B-37 : Comportement de couches de phosphatidylcholine en présence d'eau.	59

D. BASES DE LA FORMULATION

Figure D-1 : Production mondiale de corps gras « non beurre » en 2003, exprimée en tonnes [196]. ...	69
Figure D-2 : Segmentation du marché français des corps gras « non beurre », exprimée en parts de marché valeur (Mars 2007, source : Panel distributeur IRI).	69
Figure D-3 : Produits de l'entreprise St Hubert correspondant à la première génération de corps gras « non beurre ».	70
Figure D-4 : Produit St Hubert de la deuxième génération de corps gras « non beurre ».	70
Figure D-5 : Produits St Hubert de la troisième génération de corps gras « non beurre ».	70
Figure D-6 : Hydratation et conversion rétro-aldol du E,Z-2,6-nonadienal en Z-4-heptenal [d'après 231].	99
Figure D-7 : Diagramme représentant le procédé de fabrication d'un corps gras « non beurre », tel que pratiqué dans l'entreprise.	104

E. FORMULATION ET PHYSICO-CHIMIE

Figure E-1 : Thermogrammes des graisses concrètes utilisées dans l'étude (calorimétrie différentielle à balayage).	107
Figure E-2 : Thermogrammes des huiles fluides utilisées dans l'étude, obtenus par calorimétrie différentielle à balayage.	109
Figure E-3 : Comparaison des chromatogrammes espace de tête des deux huiles anhydres utilisées pour les lavages.	113
Figure E-4 : Evolution de l'aire des pics obtenus par chromatographie espace de tête au cours du lavage à l'eau distillée d'huile de poisson récente.	115
Figure E-5 : Evolution de l'aire des pics obtenus par chromatographie espace de tête au cours du lavage à l'eau distillée d'huile de poisson ancienne.	116
Figure E-6 : Evolution de l'aire des pics obtenus par chromatographie espace de tête au cours du lavage à l'eau de ville d'huile de poisson ancienne.	117
Figure E-7 : Evolution de l'aire des pics obtenus par chromatographie espace de tête au cours du lavage à l'eau distillée désaérée d'huile de poisson ancienne.	118
Figure E-8 : Histogramme représentant la répartition huile / eau des composés volatils retrouvés sur les chromatogrammes espace de tête.	120

F. RESULTATS NUTRITIONNELS

Figure F-1 : Evolution du poids des animaux des trois groupes au cours des six semaines de régime.	125
Figure F-2 : Profil en acides gras des triacylglycérols plasmatiques, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.	127
Figure F-3 : Profil en acides gras des phospholipides plasmatiques, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.	128
Figure F-4 : Profil en acides gras des esters de cholestérol plasmatiques, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.	129
Figure F-5 : Profil en acides gras du tissu adipeux, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.	131
Figure F-6 : Profil en acides gras de la phosphatidyléthanolamine des érythrocytes, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.	132
Figure F-7 : Profil en acides gras de la phosphatidyléthanolamine des cellules cérébrales, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.	134
Figure F-8 : Taux plasmatique d' α -tocophérol des rats et activité vitaminique E des régimes, obtenus par chromatographie liquide haute performance (a) et taux de substances plasmatiques réagissant à l'acide thiobarbiturique, obtenu par spectrophotométrie (b).	135
Figure F-9 : Représentation schématique de l'enchaînement d'événements menant à l'accident cardiovasculaire fatal.	139

I. ANNEXES

Figure I-1 : Graphe obtenu par analyse de pénétrométrie.	180
---	-----

LISTE DES TABLEAUX

B. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau B-I : Point de fusion de quelques acides gras libres [d'après 72, 181, 372, 399].	7
Tableau B-II : Composition moyenne des différentes classes de lipoprotéines, exprimée en pourcentage [d'après 59, 60].	12
Tableau B-III : Risque relatif d'accidents cardio-vasculaires dans les études ayant observé l'effet de la consommation d'acides gras n-3 à longue chaîne (en supplémentation ou par apport alimentaire).	36
Tableau B-IV : Seuil de perception de quelques composés volatils secondaires de l'oxydation des lipides [d'après 388].	41

D. BASES DE LA FORMULATION

Tableau D-I : Appellation des corps gras en fonction de (A) : leur taux de matière grasse total et (B) : le taux de matière grasse animale dans la phase grasse [d'après 121].	68
Tableau D-II : Présentation du marché français des corps gras segment « oméga3 ».	72
Tableau D-III : Production mondiale d'acides gras utilisables en alimentation humaine (chiffres 2004-2005) [d'après 179].	77
Tableau D-IV : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement saturé (sous-groupes CA, LRA+MA, PA et SA).	82
Tableau D-V : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement monoinsaturé (sous-groupe MUFA).	83
Tableau D-VI : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement monoinsaturé (sous-groupe MUFA+SFA+LA).	84
Tableau D-VII : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement polyinsaturé (sous-groupes LA et LA+SFA).	85
Tableau D-VIII : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement polyinsaturé (sous-groupe LA+MUFA).	86
Tableau D-IX : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement polyinsaturé (sous-groupes ALA+MUFA et ALA+LA).	87
Tableau D-X : Composition en acides gras des huiles de poissons et organismes marins contenant en majorité de l'EPA comme acide gras polyinsaturé à longue chaîne (sous-groupes « plus de 20% des acides gras totaux » et « moins de 20% des acides gras totaux »).	91
Tableau D-XI : Composition en acides gras des huiles de poissons et organismes marins contenant en majorité du DHA comme acide gras polyinsaturé à longue chaîne (sous-groupe « plus de 20% des acides gras totaux »).	92
Tableau D-XII : Composition en acides gras des huiles de poissons et organismes marins contenant en majorité du DHA comme acide gras polyinsaturé à longue chaîne (sous-groupe « moins de 20% des acides gras totaux »).	93
Tableau D-XIII : Composition en acides gras des huiles de poissons et organismes marins contenant des proportions équivalentes d'EPA et de DHA (sous-groupe « plus de 20% des acides gras totaux »).	94
Tableau D-XIV : Composition en acides gras des huiles de poissons et organismes marins contenant des proportions équivalentes d'EPA et de DHA (sous-groupe « moins de 20% des acides gras totaux »).	95
Tableau D-XV : Composés volatils impliqués dans l'odeur de poisson, retrouvés dans différents produits.	97
Tableau D-XVI : Consommation française en lipides, et comparaison par rapport aux apports nutritionnels conseillés par l'AFSSA.	102
Tableau D-XVII : Le profil en acides gras choisi pour le produit de l'étude.	104

E. FORMULATION ET PHYSICO-CHIMIE

Tableau E-I : Profil en acides gras des graisses concrètes intervenant dans les formules de l'étude.	106
Tableau E-II : Températures de sommet des pics de fusion relevées sur les thermogrammes des graisses concrètes utilisées (calorimétrie différentielle à balayage).	107
Tableau E-III : Profil en acides gras des huiles fluides intervenant dans les formules de l'étude.	108
Tableau E-IV : Températures de sommet des pics de fusion relevées sur les thermogrammes des huiles fluides utilisées (calorimétrie différentielle à balayage).	110

Tableau E-V : Comparaison des temps de rétention des pics sur les deux colonnes de chromatographie en phase gazeuse (injecteur espace de tête) utilisées dans l'étude. 112

F. RESULTATS NUTRITIONNELS

Tableau F-I : Profil en acides gras des corps gras utilisés dans l'étude, obtenu par chromatographie en phase gazeuse. 124

Tableau F-II : Masse des organes des rats, exprimée brute et rapportée à la masse corporelle totale. 126

A. Introduction

« Que ton alimentation soit ta première médecine. »
[Hippocrate]

INTRODUCTION

Un aliment ayant une fonctionnalité positive peut être défini comme suit : « un produit alimentaire peut être considéré comme [ayant une fonctionnalité positive] si une démonstration satisfaisante a été faite qu'il influence d'une manière bénéfique une ou plusieurs fonctions de l'organisme au-delà de ce qui peut être attendu des effets d'une alimentation adéquate et d'une manière telle qu'il améliore l'état de bien-être et de santé ou réduit le risque d'une maladie. Cet aliment doit rester un aliment et la démonstration de son effet doit être faite pour des quantités qui peuvent être consommées dans l'alimentation habituelle. » [427]. Le nombre de produits alimentaires dont la communication est basée sur une fonctionnalité positive est en développement exponentiel depuis quelques années, et devient pour le consommateur un moyen simple de préserver sa santé sans avoir recours au médicament. Cet enjeu est encore plus important dans les pays où le système de santé diffère du système français de solidarité nationale institutionnelle, comme les Etats-Unis ou le Royaume-Uni.

La fonctionnalisation des aliments ne doit cependant pas être effectuée dans n'importe quelles conditions. En effet, ce n'est pas en introduisant un nutriment fonctionnel à n'importe quelle dose dans n'importe quelle matrice alimentaire, que le produit montrera une fonctionnalité intéressante dans l'organisme. Les interactions qui peuvent survenir entre la matrice et le nutriment, ou encore le mode de préparation de l'aliment, sont susceptibles d'annuler (ou d'exacerber) l'effet recherché. Dans ce contexte, il paraît évident que de tels projets de développement doivent être menés scientifiquement, en prenant en compte le procédé de fabrication et le mode de préparation de l'aliment, la nature de la matrice, la biodisponibilité du nutriment, ou encore son potentiel d'action dans l'organisme.

A l'heure où la méfiance des consommateurs vis-à-vis des messages diffusés par la publicité grandit aussi rapidement que le nombre de produits et de « nouvelles formules » proposés, tout industriel souhaitant jouer la carte de la fonctionnalité devrait effectuer un travail de fond, sous peine de contribuer à la décrédibilisation du secteur entier des aliments à fonctionnalité positive.

Au vu des études réalisées depuis une cinquantaine d'années, il est devenu évident que tous les acides gras ne se valent pas, et les nutritionnistes, aussi bien que les médecins, ont attiré l'attention des industriels agroalimentaires sur la notion de « qualité de lipides » au lieu de la seule « quantité de lipides ».

Malgré cela, les apports lipidiques de la population française restent déséquilibrés, comme c'est le cas dans la plupart des pays industrialisés. Ajoutée au déséquilibre global du régime alimentaire, l'augmentation de la prévalence de l'obésité dans l'ensemble de ces pays a occasionné une prise de conscience générale, et la lutte contre ces dérives alimentaires est devenue un enjeu de santé publique.

L'AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) a publié des apports nutritionnels conseillés (ANC), définissant les besoins en chaque nutriment pour les différents groupes de la population française [287]. La comparaison des chiffres de la consommation moyenne de lipides avec les ANC préconisés par l'AFSSA montre clairement que les lipides en général, et les acides gras saturés en particulier sont apportés en excès dans le régime alimentaire des français [239, 503, 504]. Les acides gras monoinsaturés, l'acide α -linoléique et les acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont quant à eux en déficit. L'une des premières conséquences de ce déséquilibre est l'augmentation des pathologies cardio-vasculaires. En effet, en France, un décès sur trois est dû à un accident cardio-vasculaire, en particulier un infarctus fatal ou une mort subite induite par l'ischémie.

Le sujet de cette thèse est issu de ce constat. Le but est de mettre au point un produit alimentaire type corps gras possédant un profil en acides gras susceptible de participer au rééquilibrage du régime alimentaire français, avec comme cible la prévention des pathologies cardio-vasculaires. Dans ce sens, l'accent a été mis sur les acides gras de la famille $n-3$, et en particulier sur les dérivés à longue chaîne, les acides eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque (respectivement EPA et DHA).

Ce manuscrit est organisé en quatre parties principales.

La première est constituée de synthèses bibliographiques sur les sujets abordés au cours de l'étude. Ainsi, la digestion des lipides alimentaires, leur absorption, leur métabolisme et les pathologies associées à la nutrition lipidique sont abordés dans un premier temps. Puis ce sont les différentes techniques de protection des corps gras qui sont décrites, avec l'utilisation des antioxydants, et la mise en œuvre de technologies spécifiques comme la microencapsulation et la formation de liposomes.

La deuxième partie du manuscrit correspond à une phase de travail théorique sur la problématique de la thèse, qui a conduit à la mise au point du profil en acides gras optimal pour le produit d'intérêt. Pour ce faire, le marché des corps gras « santé » a été étudié, dans le but d'obtenir une image globale de l'environnement concurrentiel du produit à mettre au point, en particulier concernant les produits dont la communication est axée sur les acides gras *n-3*. De manière à identifier d'éventuelles sources d'acides gras intéressantes dans le cadre de ce projet, le profil en acides gras de 80 huiles végétales et de 56 huiles de poissons et organismes marins a été étudié, ce qui a conduit à l'élaboration de deux classifications, basées sur le potentiel nutritionnel de ces deux catégories d'huiles. Enfin, après une rapide présentation du procédé de fabrication de la margarine et des ingrédients mis en œuvre dans l'entreprise St Hubert, la démarche menant à la mise au point du profil en acides gras du produit est présentée dans la dernière partie de ce chapitre.

La troisième partie du manuscrit regroupe les différentes études menées au cours de la mise au point de ce corps gras, qu'elles concernent l'impact de la formulation sur la texture et sur la flaveur du produit, ou encore la mise au point d'une technologie de vectorisation et de protection des nutriments d'intérêt.

La dernière partie du manuscrit présente les résultats de l'étude de la biodisponibilité des acides gras d'intérêt menée chez le rat, nourri avec le corps gras mis au point au cours de la thèse. Le paramétrage de l'étude clinique qui doit suivre constitue la dernière partie de ce chapitre. Le but de cette étude est d'une part de confirmer la biodisponibilité des nutriments cibles chez l'homme, mais aussi, et surtout, de mettre en évidence l'impact positif de ces composés incorporés dans une matrice alimentaire sur des facteurs identifiés du risque cardio-vasculaire.

B. Synthèse bibliographique

« Si vous volez un seul auteur, c'est du plagiat, plusieurs, c'est de la recherche. »

[W. Mizner]

Lipides : Métabolisme et pathologies

LES LIPIDES ALIMENTAIRES

Dans cette première partie du manuscrit sont présentés les différents acides gras rencontrés dans les huiles végétales et animales, ainsi que les principaux vecteurs d'acides gras alimentaires, les triacylglycérols (TAG) et les phospholipides (PL). Les propriétés physiques des TAG sont présentées dans le dernier paragraphe.

Le chapitre suivant présente la digestion, l'absorption et le métabolisme des lipides alimentaires, et le dernier chapitre décrit les mécanismes régissant les pathologies associées au métabolisme des lipides, c'est-à-dire l'athérosclérose et les accidents cardio-vasculaires fatals.

I/ Structure des lipides

I. 1) Les acides gras

Les acides gras (AG) sont des acides organiques faibles, qui ne possèdent qu'une seule fonction carboxyle par molécule. Ils sont constitués d'une chaîne à nombre presque toujours pair d'atomes de carbone, le plus souvent compris entre quatre et vingt-quatre. La fonction carboxyle est à une extrémité de la chaîne, l'autre étant occupée par un groupe méthyle CH_3 . La chaîne carbonée d'un acide gras peut être de type alcane, c'est-à-dire que chaque atome de carbone est saturé, ou de type alcène, avec une ou plusieurs insaturations. Les acides gras sont ainsi classés en trois groupes, AG saturés (SFA), AG monoinsaturés (MUFA) et AG polyinsaturés (PUFA) [15, 182, 357, 394].

Dans la nature, la configuration de ces doubles liaisons est presque toujours *cis*, tandis que les procédés industriels comme l'hydrogénation produisent en quantités égales des doubles liaisons *cis* et *trans*.

Remarque : Les acides gras insaturés cités dans le reste du manuscrit sont en configuration *cis*, la configuration *trans* étant assimilée à un risque accru d'accidents cardio-vasculaires [377], et de plus n'est pas retrouvée dans le produit alimentaire concerné par la thèse.

Le groupement méthyle peut être appelé extrémité ω , et avec la chaîne carbonée il constitue la partie hydrophobe de la molécule. Le groupement carboxyle, ou extrémité Δ , représente quant à lui la partie acide, polaire de l'acide gras. Selon l'extrémité à laquelle on se réfère pour numéroter les atomes de carbone, il existe deux nomenclatures pour décrire un acide gras [182].

La première prend comme référence la fonction carboxylique de la molécule. La structure de l'acide gras est donc décrite en fonction du nombre d'atomes de carbone de la chaîne, du nombre d'insaturations, et de leur position :

$$n : m \Delta x, y, z$$

où n est le nombre d'atomes de carbone, m le nombre d'insaturations, et $x, y, etc.$ les numéros des carbones portant les doubles liaisons, le $n^{\circ}1$ étant l'extrémité $-\text{COOH}$ [182].

La deuxième nomenclature se réfère à l'extrémité méthylrique de la chaîne carbonée :

$$n : m \omega x', y', z' \quad \text{ou} \quad n : m n-x', y', z'$$

où cette fois la position des insaturations est donnée à partir de l'extrémité méthyle [182].

Dans ce manuscrit, la nomenclature choisie est celle prenant comme référence l'extrémité méthyle, en choisissant la dénomination « $n-x'$ ».

La figure B-1 illustre ces deux nomenclatures en prenant comme exemple l'acide palmitoléique, qui comprend seize atomes de carbone et une double liaison. Celle-ci est portée par le carbone $n^{\circ}9$ si on prend comme origine l'extrémité carboxylique, et par le carbone $n^{\circ}7$ si la fonction méthylrique est prise comme référence.

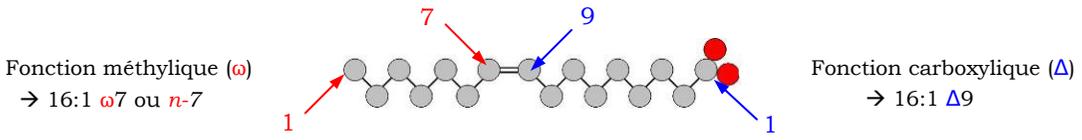


Figure B-1 : Structure générale d'un acide gras, l'acide palmitoléique.

Symboles : gris : carbone, rouge : oxygène.

Les SFA sont classés selon la longueur de la chaîne carbonée. Les SFA à courte chaîne, de quatre à huit atomes de carbone, comprennent, entre autres, les acides butyrique (4:0), caproïque (6:0) et caprylique (8:0) que l'on rencontre dans le lait de vache, pour le premier, et le lait de chèvre, pour les deux suivants [394]. Les SFA à moyenne chaîne (dix à quatorze carbones) les plus répandus sont les acides laurique (12:0) et myristique (14:0) [357]. Enfin, les SFA ayant une chaîne carbonée comptant seize atomes de carbone et plus sont dits à longue chaîne et les plus répandus sont les acides palmitique (16:0) et stéarique (18:0) [357].

Le plus connu des MUFA est l'acide oléique (OA, 18:1 n -9), qui représente plus de 70% des acides gras de l'huile d'olive [15, 182, 357, 394].

Parmi les PUFA figurent deux acides gras essentiels, les acides linoléique (LA, 18:2 n -6) et α -linoléique (ALA, 18:3 n -3). Ce sont les précurseurs de deux familles d'acides gras à fonctions multiples dans l'organisme, les séries n -6 et n -3, respectivement. Ces précurseurs sont dits essentiels car si l'organisme humain parvient à les convertir en dérivés à plus longue chaîne, il est incapable de les synthétiser, et doit donc les trouver dans la ration alimentaire [15, 182, 357, 394].

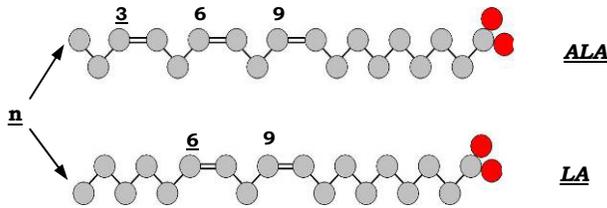


Figure B-2 : Représentation schématique des acides α -linoléique (haut) et linoléique (bas), respectivement les précurseurs des familles n -3 et n -6.

Symboles : gris : carbone, rouge : oxygène.

Les mêmes enzymes assurent la conversion des précurseurs en PUFA à longue chaîne (LCPUFA), provoquant une compétition entre les deux familles. En effet, l'excès de l'un des composés précurseurs entraîne une monopolisation des enzymes et donc une diminution du rendement de conversion de l'autre famille [61, 344].

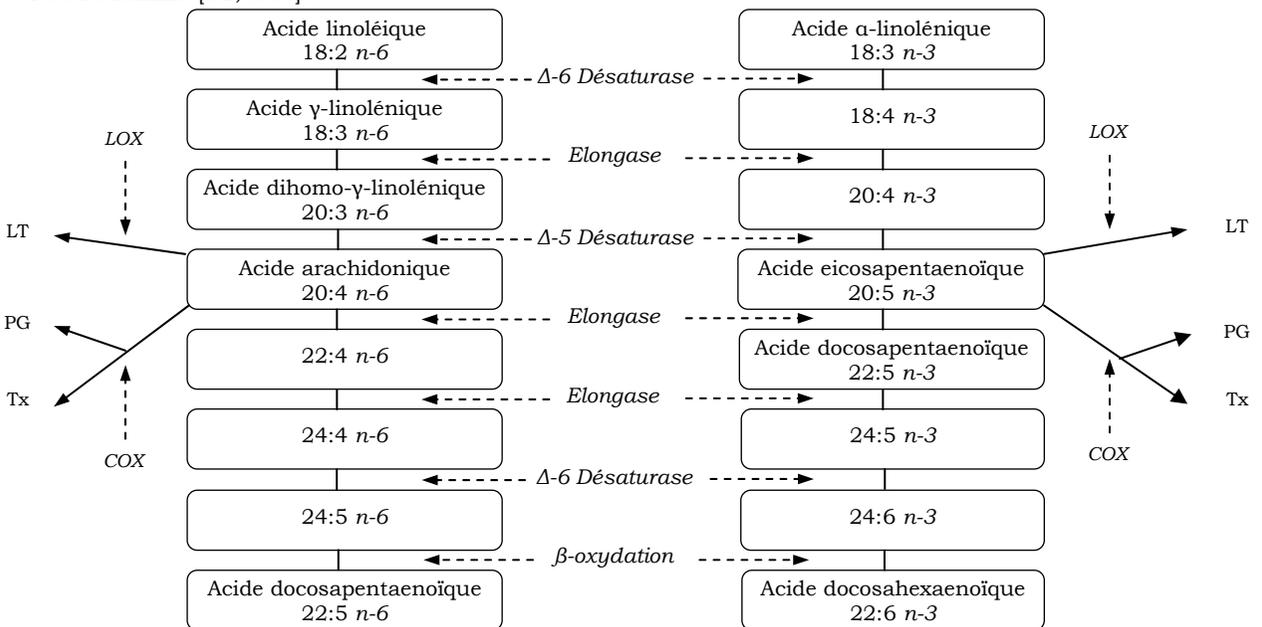


Figure B-3 : Conversion des acides linoléique et α -linoléique en dérivés à longue chaîne et synthèse des eicosanoïdes à partir des acides arachidonique et eicosapentaénoïque [d'après 61, 357].

Abréviations: LOX: lipoxigénase, COX: cyclooxygénase, LT: leucotriènes, PG: prostaglandines, Tx: thromboxane.

Une succession de désaturations et d'élongations convertit le LA en acide arachidonique (ARA, 22:4 *n*-6) et l'ALA en acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 *n*-3). Puis une suite d'élongations, de désaturations et une oxydation partielle conduisent à l'acide docosapentaénoïque *n*-6 (22:5 *n*-6) à partir de l'ARA et à l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 *n*-3) à partir de l'EPA [61, 357]. L'étape de β -oxydation nécessite une translocation du 24:5 *n*-6 et du 24:6 *n*-3 depuis le réticulum endoplasmique vers les peroxysomes, organites cellulaires responsables de cette opération [65].

Le rendement de la conversion de l'ALA en EPA et DHA dans l'organisme humain est faible. Il a été estimé à moins de 10% pour l'EPA [66-68, 333], et à moins de 1% pour le DHA [57, 67, 68, 102]. Même la conversion d'EPA en DHA est faible, voire inexistante [41, 185, 341, 411]. Une remarque cependant, il semblerait que la conversion en DHA soit plus efficace chez les femmes (10%) que chez les hommes (quasi nulle) [67, 68]. Les auteurs de ces deux études ont également montré que, parmi les femmes, cette conversion serait plus importante chez les utilisatrices de contraceptifs de type œstrogène. Leur hypothèse est que les œstrogènes pourraient stimuler la conversion, un phénomène qui aurait son importance pendant la grossesse afin d'apporter une dose suffisante de DHA au fœtus pendant le développement du cerveau et de la rétine [67, 68].

Outre la similitude de métabolisme entre les AG *n*-3 et *n*-6, la conversion en composés biologiquement actifs suit également un schéma identique pour les deux familles. En effet, l'ARA et l'EPA sont convertis par les mêmes enzymes en eicosanoïdes, parmi lesquels les prostaglandines et les leucotriènes. Ces molécules agissent comme des hormones, ce sont des signaux paracrines ou autocrines qui permettent la communication entre des cellules distantes [61]. Si les composés dérivés des AG *n*-3 sont anti-inflammatoires, hypotenseurs, antiarythmiques et anticoagulants, ceux issus des composés *n*-6 sont au contraire pro-inflammatoires, hypertenseurs, proarythmiques et procoagulants [2, 3, 288].

La notion de ratio *n*-6/*n*-3 dérive de cette observation. Puisque l'équilibre entre *n*-6 et *n*-3 influence la proportion des composés fabriqués, un excès d'acides gras *n*-6 entraînera un statut pro-inflammatoire dans l'organisme. Si l'inflammation est nécessaire en cas de défense contre une infection, elle est indésirable, par exemple, dans le cas d'une réaction allergique. L'alimentation dans les pays industrialisés est déjà excédentaire en AG *n*-6, c'est pourquoi il est urgent de s'intéresser aux apports en AG *n*-3, et de chercher à rééquilibrer ce ratio.

I. 2) Les triacylglycérols

Dans les huiles végétales, 90 à 95% des acides gras sont apportés sous forme de TAG. Ils sont composés d'une molécule de glycérol sur laquelle sont estérifiés trois acides gras, par réaction entre une fonction alcool -OH du glycérol et le groupement carboxyle -COOH de l'acide gras [15, 182, 357, 394]. Les acides gras portés par les TAG peuvent être différents, ou identiques entre eux.

La structure d'un TAG dépend de la position d'estérification des acides gras sur le squelette glycérol. Trois positions sont possibles, comme le montre la figure B-4, les positions externes étant appelées *sn*-1 et *sn*-3, et la position interne *sn*-2 [15, 182, 357, 394].

Cet arrangement sur le glycérol influence certaines propriétés des acides gras, en particulier leur biodisponibilité (cf. chapitre « Métabolisme des lipides »).

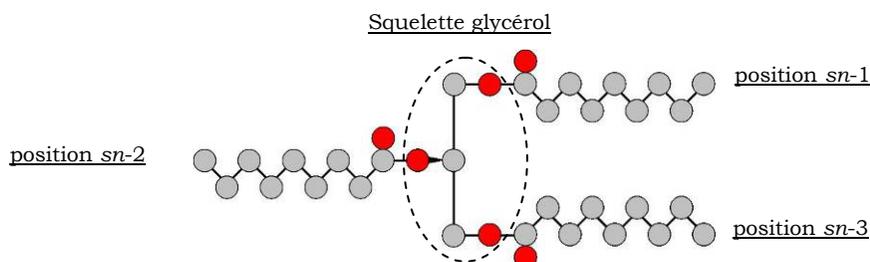


Figure B-4 : Représentation schématique d'un triacylglycérol, formé d'un squelette glycérol sur lequel sont estérifiés trois acides gras, en position *sn*-1, 2 et 3.

Symboles : gris : carbone, rouge : oxygène.

La position interne des TAG naturels dans les huiles végétales est préférentiellement occupée par des acides gras insaturés, prioritairement, et dans l'ordre : LA, OA et ALA [394]. L'acylation préférentielle est quasi absolue pour les huiles de graines et importante pour les huiles de pulpe, tandis qu'elle est moins nette pour les graisses d'origine animale [394].

I. 3) Les phospholipides

1) Structure des phospholipides

Un autre type de vecteur d'acides gras est rencontré dans l'alimentation, les phospholipides (PL). Ne seront détaillés ici que les quatre glycérophospholipides, puisque ce sont les seuls PL utilisés dans l'étude. Ce sont des composés formés d'un squelette glycérol, sur lequel sont estérifiés deux acides gras, et dont la troisième position est occupée par un groupement phosphatidyl. Selon la nature de ce groupement, on distingue la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, le phosphatidylinositol et la phosphatidylsérine [15, 394].

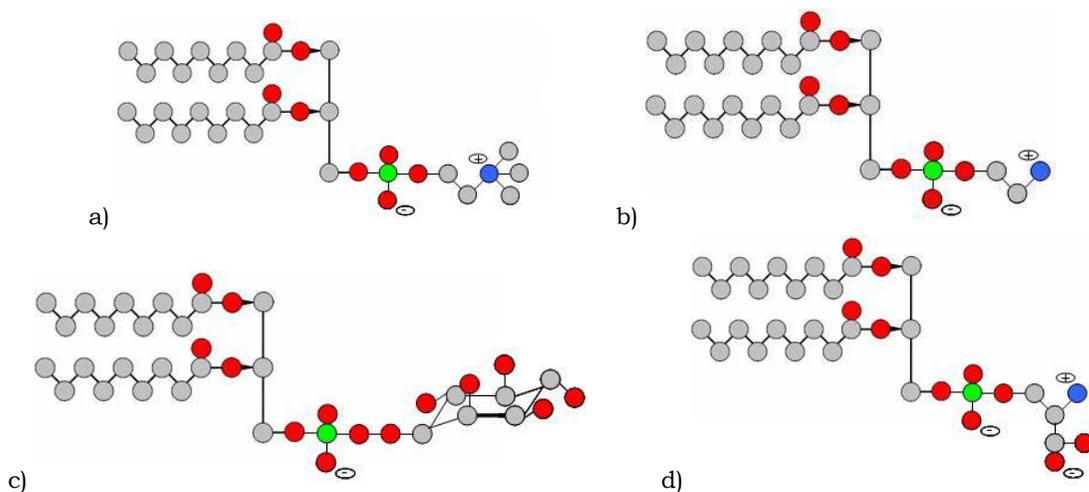


Figure B-5 : Représentation schématique des quatre types de glycérophospholipides [d'après 394].

a) Phosphatidylcholine, b) Phosphatidyléthanolamine, c) Phosphatidylinositol, d) Phosphatidylsérine.

Légende : gris : carbone, rouge : oxygène, vert : phosphore, bleu : azote.

Les charges positives et négatives illustrent les groupements ionisables des molécules.

La structure de ces composés en fait des molécules amphiphiles, c'est-à-dire comprenant une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Ici c'est le squelette glycérol et les acides gras qui constituent la portion apolaire, tandis que le groupement phosphate est polaire [15, 394].

La phosphatidylcholine (PC) est la molécule phospholipidique la plus répandue dans les sources alimentaires. C'est par exemple le PL majoritaire de la lécithine. Très abondante dans le jaune d'œuf, mais en général extraite du soja, elle est soluble dans les solvants organiques et les solutions aqueuses de sels biliaires. De par son fort caractère amphiphile, la PC est un très bon émulsifiant [394].

La phosphatidyléthanolamine (PE), bien que moins abondante que la PC, est malgré tout très répandue. Son caractère polaire est moins marqué en raison du caractère basique plus faible de sa fonction amine non substituée. Son activité interfaciale reste cependant importante [394].

La phosphatidylsérine (PS) a un caractère acide, en raison de la présence d'un groupement carboxylique supplémentaire. Toujours amphiphile, la molécule est moins active que la PC ou la PE [394].

Le phosphatidylinositol (PI) n'a pas de groupement ionisable en dehors de la fonction phosphate. Les cinq hydroxyles libres de l'inositol confèrent néanmoins à cette molécule un caractère polaire suffisant pour que son activité amphiphile soit nette [394].

II/ Propriétés physiques des corps gras

Le choix d'un corps gras pour une application particulière est souvent déterminé par les propriétés physiques de celui-ci, comme c'est le cas dans les margarines par exemple. On distingue classiquement les graisses et les huiles par leur état à température ambiante, les premières étant solides, et les dernières liquides.

II. 1) Point de fusion

Le point de fusion des acides gras varie en fonction de leur structure. En effet, il diminue quand le nombre de doubles liaisons augmente, et augmente avec la longueur de la chaîne carbonée. De plus, un MUFA en configuration *cis* aura un point de fusion inférieur au même acide gras, mais en configuration *trans* [372, 399, 498].

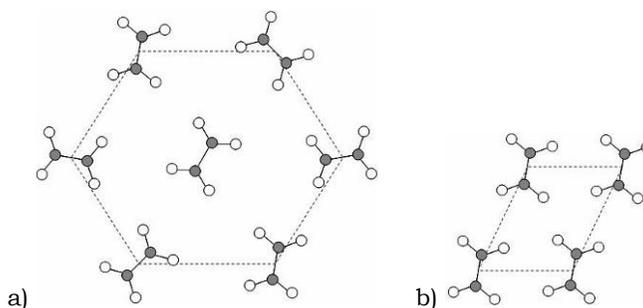
Tableau B-I : Point de fusion de quelques acides gras libres [d'après 72, 181, 372, 399].

Acide gras	Nomenclature	Point de fusion (°C)
Acide butyrique	4:0	-5
Acide caproïque	6:0	-3
Acide caprylique	8:0	16,5
Acide caprique	10:0	31,5
Acide laurique	12:0	45
Acide myristique	14:0	54
Acide palmitique	16:0	62
Acide stéarique	18:0	70
Acide oléique	18:1 <i>n-9 cis</i>	15
Acide élaïdique	18:1 <i>n-9 trans</i>	42
Acide linoléique	18:2 <i>n-6</i>	-5
Acide α -linoléique	18:3 <i>n-3</i>	-11
Acide arachidonique	20:4 <i>n-6</i>	-45,5

Le point de fusion d'un TAG est déterminé par la structure des trois acides gras qu'il porte, et par la position occupée par ces acides gras sur le squelette glycérol. En effet, si un TAG portant trois SFA a un point de fusion supérieur à un TAG portant au moins un acide gras insaturé, il faut également prendre en compte le fait qu'un TAG dont l'acide gras insaturé est placé en *sn-2* a un point de fusion supérieur à un TAG dont l'acide gras insaturé est en *sn-1* ou 3 [372, 399, 498].

II. 2) Structure cristalline

En deçà de leur température de fusion, les huiles et les corps gras sont sous forme de solides cristallisés. Les cristaux lipidiques d'un corps gras sont constitués de TAG organisés en un réseau cristallin. Ce dernier est formé par l'arrangement spatial des chaînes grasses des TAG les unes par rapport aux autres. Les trois types principaux de cristaux sont appelés α , correspondant à une organisation hexagonale, β en orthorhombique perpendiculaire ou parallèle, et β' en triclinique [372, 399].



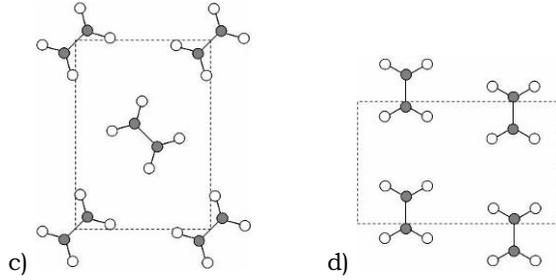


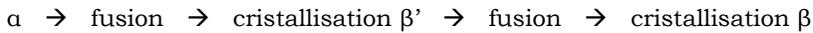
Figure B-6 : Principales sous-cellules adoptées par les chaînes cristallisées des résidus acides gras [d'après 372].

a) Hexagonal, b) Triclinique, c) Orthorhombique perpendiculaire, d) Orthorhombique parallèle.

Symboles : gris : carbone, blanc : hydrogène.

Les chaînes grasses sont représentées dans l'axe des liaisons carbone – carbone.

Le passage d'un type de cristal à un autre se fait en général par transition liquide, c'est-à-dire qu'un cristal de type 1 doit fondre pour cristalliser à nouveau, cette fois dans le type 2 [146] :



La représentation des sous-cellules cristallines de la figure B-6 permet de comprendre l'enchaînement $\alpha - \beta' - \beta$. En effet, les chaînes hydrocarbonées s'organisent de manière de plus en plus structurée en passant de la forme α à la forme β , le réseau créé devenant ainsi de plus en plus dense.

Le changement de phase n'est pas identique selon qu'il s'agit de réchauffement (fusion) ou de refroidissement (cristallisation). En effet, si la fusion n'est jamais retardée, la cristallisation l'est souvent [372]. Plus précisément, dans le cas de la fusion, si on fait passer un corps gras d'une température T_1 à une température T_2 (supérieure à T_1), tous les TAG qui ont un point de fusion inférieur ou égal à T_2 auront fondu quand le produit atteindra T_2 [372].

Au contraire, la cristallisation peut être retardée, car la formation de cristaux est une réaction exothermique, qui nécessite des étapes d'équilibrage énergétique [372]. Au cours de la fabrication d'une margarine, par exemple, le produit en sortie de process est en état de surfusion, c'est-à-dire qu'il est moins cristallisé qu'il ne devrait l'être à la température de sortie machine. Un délai est nécessaire pour que la cristallisation complète s'achève.

LE METABOLISME DES LIPIDES

Ce chapitre décrit la digestion et l'absorption des lipides, ainsi que le rôle que jouent les différents acides gras dans la nutrition lipidique et le métabolisme des lipoprotéines, ces particules qui véhiculent les lipides alimentaires jusqu'aux cellules qui les métabolisent.

I/ Nutrition lipidique : mécanismes et régulation alimentaire

I. 1) Mécanismes

Dans le bol alimentaire, les acides gras sont sous forme de TAG. Dès l'étape buccale ils sont dégradés par la lipase salivaire, hydrolyse qui est poursuivie dans l'estomac par la lipase gastrique [59, 412]. Cette dernière hydrolyse les TAG en libérant des acides gras libres et des mono et diacylglycérols [81]. Les acides gras à courte et moyenne chaîne libérés lors de cette lipolyse peuvent être absorbés par la muqueuse gastrique et passer directement dans la circulation sanguine [216, 251]. Pris en charge par l'albumine sérique, ils atteindront le foie par la veine porte [48], même si ce mécanisme ne représente, malgré tout, qu'une faible partie de la digestion totale. Les mono et diacylglycérols libérés par la lipase gastrique ont des propriétés émulsifiantes, qui aideront à la solubilisation des composés hydrophobes dans la phase intestinale de la digestion [412].

Le reste des TAG atteint l'intestin, où ils sont solubilisés par les sels biliaires. Sont ainsi inclus dans les micelles les TAG, mais également des PL et des esters de cholestérol (EC), autres vecteurs d'acides gras alimentaires [59]. Comme décrit dans le chapitre précédent, les TAG comprennent trois acides gras dans leur structure, et les PL deux [357, 394]. Les esters de cholestérol, quant à eux, comprennent une molécule de cholestérol sur laquelle est estérifié un acide gras [79].

Ces trois vecteurs sont attaqués par des enzymes spécifiques, qui libèrent les acides gras estérifiés sur le glycérol ou le cholestérol. Elles agissent dans les micelles, ancrées à leur surface par l'intermédiaire d'un cofacteur spécifique (la colipase dans le cas de la lipase pancréatique par exemple, [59]).

La lipase pancréatique libère les acides gras situés en *sn*-1 et 3, c'est-à-dire les positions externes du TAG [48, 59, 79]. Cette enzyme est dite stéréospécifique, elle clive les acides gras en fonction de leur position, et non de leur structure [59]. De la même manière la phospholipase pancréatique libère l'acide gras en position externe (*sn*-1) des PL [79, 290], et la cholestérol ester hydrolase libère l'acide gras porté par le cholestérol dans les EC [79]. Tous ces sous-produits de la digestion restent dans les micelles, qui sont ensuite absorbées par les entérocytes (cellules de la muqueuse intestinale) [59, 79]. L'absorption se fait par diffusion passive ou par transport actif, impliquant des protéines spécifiques [148]. Les différents vecteurs d'acides gras sont recréés au niveau du réticulum endoplasmique et inclus dans les chylomicrons [59, 79, 430].

Les chylomicrons sont des particules contenant des TAG, des PL, des EC, des vitamines liposolubles et différentes protéines, appelées apolipoprotéines, qui assurent le maintien de la structure et sont des cofacteurs enzymatiques [59, 79]. Elles sont assemblées dans le réticulum endoplasmique des entérocytes, et sont ensuite transportées jusqu'au pôle basal des cellules par des vésicules sécrétoires, d'où elles diffusent hors des cellules [59]. Elles gagnent ensuite le vaisseau lymphatique central des villosités intestinales (le lactéal, figure B-7), atteignent les nœuds lymphoïdes, puis le tronc thoracique. L'appellation « chylomicron » est issue de cette voie de circulation, l'autre nom de la lymphe étant « chyle » [542].

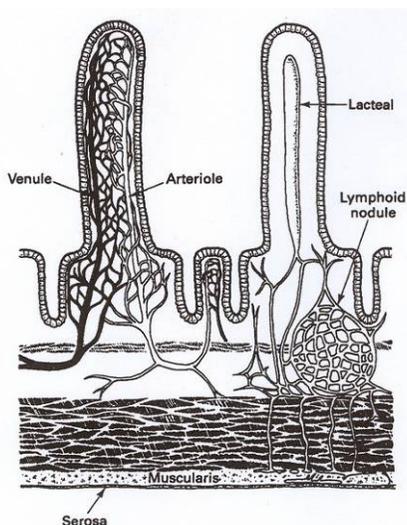


Figure B-7 : Représentation de villosités intestinales [59].

La partie gauche du schéma illustre l'irrigation de ces structures, le sang artériel arrivant oxygéné, et le sang veineux repartant chargé de nutriments issus de la lumière intestinale. La partie droite montre l'irrigation lymphatique d'une villosité, avec le lactéal central qui gagne un nodule lymphoïde, lui-même connecté à la circulation lymphatique générale.

Les chylomicrons rejoignent enfin la circulation sanguine par la veine sous-clavière, jusqu'aux cellules qui métabolisent leur contenu lipidique, puis sont éliminés par le foie [59, 79].

I. 2) Influence de la structure des acides gras

La structure des acides gras ingérés influence leur absorption. En effet, un acide gras est d'autant mieux absorbé qu'il possède une longue chaîne carbonée et de nombreuses insaturations [251, 412, 488]. Au contraire, l'absorption diminue si le point de fusion de l'acide gras augmente [30]. De ces trois facteurs, c'est le dernier qui est prépondérant, puisqu'il est déterminé par la longueur et le nombre de doubles liaisons de l'acide gras. Si un acide gras libéré par la lipase pancréatique est solide à la température du corps humain, il sera éliminé dans les fèces plutôt qu'absorbé [30]. Les acides gras insaturés, plus intéressants pour la santé, seront donc mieux absorbés que les SFA, du fait de leur point de fusion plus bas et de leur degré d'insaturation.

On peut citer en remarque l'effet de l'acide stéarique (point de fusion $> 70^{\circ}\text{C}$), qui, présent en grande quantité dans le repas, inhibe l'absorption du cholestérol alimentaire par un effet « fibre », en facilitant le transit intestinal, et en empêchant le cholestérol alimentaire d'être absorbé par les entérocytes [240].

I. 3) Influence de la structure des triacylglycérols

La position des acides gras sur le squelette glycérol des TAG influence leur absorption. La première cause est la régiospécificité de la lipase pancréatique [94]. Cette enzyme libère les acides gras en position externe des TAG, laissant l'acide gras interne sur le glycérol. Le monoacylglycérol ainsi créé est absorbé facilement par les entérocytes. Les acides gras situés en position interne des TAG ont donc plus de probabilité d'être absorbés. De plus, cette position interne protège l'acide gras de l'oxydation, évitant sa dégradation [404].

Dans les huiles végétales et de poisson, les acides gras insaturés, donc susceptibles d'être oxydés d'une part, et physiologiquement intéressants d'autre part, sont préférentiellement estérifiés en position interne des TAG [24, 54, 58, 95, 216, 268, 415]. Ceci leur assure une excellente absorption, supérieure à 95%.

I. 4) Le cas des phospholipides

Les PL sont des constituants des membranes cellulaires, dont ils assurent l'intégrité, la perméabilité et la fluidité [60]. Il existe à l'heure actuelle une polémique concernant la biodisponibilité des acides gras en fonction du vecteur sur lequel ils sont estérifiés dans l'alimentation. En effet, certains auteurs avancent que les acides gras portés par les PL seraient préférentiellement distribués aux tissus cibles par rapport à ceux portés par les TAG, en particulier dans le cas du cerveau.

Les travaux de recherche montrent dans certains cas une tendance de ce type chez les animaux [516], cependant tous les résultats ne convergent pas [22, 512].

De ces deux dernières études, la première montre une augmentation de la concentration en DHA dans le cerveau des souris du groupe « PL », mais uniquement dans la population d'animaux « malades » (chez lesquels a été provoquée une absence de sels biliaires) [512]. Ce résultat est logique, puisque sans sels biliaires les TAG alimentaires ne peuvent être solubilisés, et donc absorbés, tandis que les PL, amphiphiles, le sont de par leur nature.

Dans la seconde étude, deux expériences ont été menées, l'une comparant l'absorption d'acides gras (en particulier DHA) apportés sous forme de TAG ou de PL « natifs », et l'autre comparant ce même critère dans le cas d'un apport par TAG ou PL formés par réestérification d'acides gras [22]. Les auteurs montrent que dans le premier cas le vecteur TAG est plus efficace que le vecteur PL pour engendrer l'absorption du DHA, tandis que dans le second cas ils montrent le contraire [22]. Résultat également explicable, puisque dans le cas de TAG « naturels » le DHA sera majoritairement estérifié en position *sn*-2, la mieux conservée au cours de la digestion et de l'absorption. Tandis que dans le cas de la réestérification d'acides gras sur un glycérol, le DHA sera réparti dans les mêmes proportions sur chacune des trois positions, donc une moins grande quantité de DHA sera conservée lors du processus digestif.

Citons une dernière étude, dans laquelle les auteurs montrent que l'apport d'ARA et de DHA sous forme de PL entraîne une augmentation de la proportion de ces acides gras dans les PL des HDL (lipoprotéine de haute densité), tandis qu'un apport sous forme de TAG entraîne une augmentation dans les PL des LDL (lipoprotéine de faible densité) [23]. Ces constatations n'ont cependant pas été corrélées avec l'étude du profil en acides gras de différentes membranes cellulaires, comme celles du cœur ou du cerveau. La seule hypothèse pouvant être avancée est que le foie utilise les PL apportés par l'alimentation pour construire les HDL, tandis qu'il en synthétise de nouveaux à partir des TAG alimentaires pour construire les LDL. Aucune conclusion ne peut être tirée, au vu de ces seuls résultats, quant à un enrichissement spécifique de certains organes en DHA dans le cas d'un apport sous forme de PL.

Chez les nourrissons, les conclusions sont tout aussi divergentes, certains n'ayant montré aucune différence entre TAG et PL [438], d'autres ayant mis en évidence une différence, mais dans une expérience mal contrôlée, dont les conclusions sont donc discutables [80].

Enfin chez les adultes, aucune étude n'a pu être trouvée sur le sujet.

Il semble donc que cette problématique ne puisse pour le moment trouver de conclusion ferme vu le manque de résultats publiés. Quoiqu'il en soit, les études menées à l'heure actuelle sur le sujet s'intéressent à l'apport ciblé de PUFA au cerveau, en particulier à l'efficacité du passage de la barrière hémato-encéphalique, plutôt qu'au système cardio-vasculaire. Etant donné l'objectif cardio-vasculaire de la thèse, la question des PL comme vecteurs d'acides gras alimentaires n'a pas été envisagée.

II/ Métabolisme des lipoprotéines : mécanismes, régulation

Les lipoprotéines, dont font partie les chylomicrons, sont des particules qui assurent le transport des lipides alimentaires dans le sang, pour les délivrer aux tissus qui en ont besoin [60]. Les lipides, hydrophobes, ne sont en effet pas solubles dans le plasma. Ils sont transportés grâce à une organisation en macromolécules, dans lesquelles ils sont associés à des protéines appelées apolipoprotéines (apo). Cette partie protéique remplit plusieurs rôles, comme cofacteur des enzymes et ligand des récepteurs [60, 455, 460].

Le métabolisme des lipoprotéines fait intervenir différents acteurs parmi lesquels figurent, outre les apolipoprotéines, des enzymes et des récepteurs.

II. 1) Les acteurs du métabolisme des lipoprotéines

1) Les lipoprotéines

Toutes les lipoprotéines répondent au schéma de la figure B-8, comprenant un noyau central hydrophobe formé d'EC et de TAG, et une couronne périphérique faite de l'assemblage d'apolipoprotéines, de PL et de cholestérol libre [60, 455, 460]. Cette enveloppe monocouche assure la solubilité de la lipoprotéine dans le plasma et permet donc le transport des lipides non hydrosolubles.

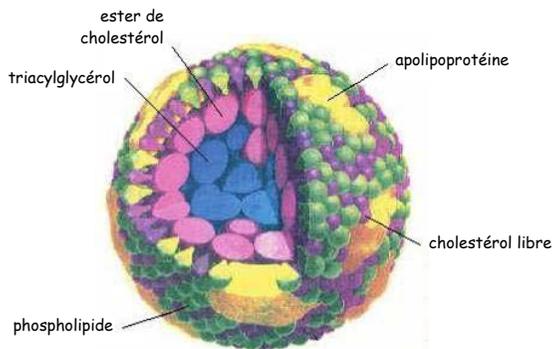


Figure B-8 : Structure schématique d'une lipoprotéine [540].

Le cœur de la lipoprotéine contient les éléments les plus hydrophobes, c'est-à-dire les esters de cholestérol et les triacylglycérols, tandis que la partie externe contient les phospholipides, les apolipoprotéines et les molécules de cholestérol libre.

Il existe cinq types de lipoprotéines, qui diffèrent selon leur composition lipidique et le type d'apolipoprotéine présente dans leur structure [60, 455]. Les lipides étant moins denses que l'eau, la densité de la particule diminue lorsque leur proportion augmente dans la lipoprotéine. On distingue donc :

1. les chylomicrons,
2. les VLDL (*very low density lipoproteins*, ou lipoprotéines de très faible densité),
3. les IDL (*intermediate density lipoproteins* ou lipoprotéines de densité intermédiaire),
4. les LDL (*low density lipoproteins* ou lipoprotéines de faible densité),
5. les HDL (*high density lipoproteins* ou lipoprotéines de forte densité).

Le tableau B-II présente les caractéristiques des différentes classes de lipoprotéines. Les lipides totaux comprennent les TAG, les PL, les EC, le cholestérol et éventuellement des vitamines liposolubles (A, D, E ou K), ces trois derniers types de composés étant regroupés dans la catégorie « Chol. et autres » [59, 60, 168].

Tableau B-II : Composition moyenne des différentes classes de lipoprotéines, exprimée en pourcentage [d'après 59, 60].

Abréviations : VLDL : lipoprotéine de très faible densité, IDL : lipoprotéine de densité intermédiaire, LDL : lipoprotéine de faible densité, HDL : lipoprotéine de forte densité, PL : phospholipides, TAG : triacylglycérols.

Particule	Diamètre (nm)	Densité	Protéines (% m/m)	Lipides totaux (% m/m)	PL (% m/m)	TAG (% m/m)	Chol. et autres (% m/m)
Chylomicron	75 – 1200	< 0,930	1 – 2	98 – 99	3 – 8	80 – 95	1 – 9
VLDL	30 – 80	0,930 – 1,006	8 – 10	90 – 92	15 – 20	55 – 60	10 – 20
IDL	25 – 35	1,006 – 1,019	19 – 20	80 – 81	20 – 25	35 – 40	40 – 45
LDL	18 – 25	1,019 – 1,063	25	75	20	30	50
HDL	5 – 12	1,063 – 1,210	50	50	25 – 30	1 – 2	19 – 23

Comme le montre le tableau, les chylomicrons, les VLDL et les IDL sont très riches en TAG (35 à 95%), comparativement aux LDL et aux HDL, qui comprennent, quant à elles, une grande proportion de cholestérol (15 à 50%) [59, 60, 140, 168, 455]

☞ **Les chylomicrons** sont les plus grandes et les moins denses des lipoprotéines. Ils sont constitués de lipides alimentaires d'origine intestinale. Les TAG représentent 80 à 95% de leur masse, et les protéines 1 à 2% [59, 60].

☞ **Les VLDL** transportent les TAG issus du métabolisme hépatique. Elles sont plus petites que les chylomicrons et un peu plus denses. Elles contiennent 90 à 92% de lipides répartis en 55 à 60% de TAG, 15 à 20% de PL et 10 à 20% de cholestérol. Les protéines représentent quant à elles 8 à 10% de leur masse [59, 60].

☞ **Les IDL et LDL** sont plus petites et plus denses que les VLDL. Elles sont formées au cours de la lipolyse des VLDL. Les protéines représentent 19 à 25% de leur masse totale, tandis que le cholestérol représente 10 à 45% de la masse des lipides [59, 60].

☞ **Les HDL** sont les plus petites et les plus denses des lipoprotéines. Les protéines constituent en moyenne 50% de leur masse totale. Les PL (25 à 30%) et le cholestérol (19 à 23%) sont les principaux lipides [59, 60].

Des techniques d'analyse fine permettent de définir des sous-classes de ces principales lipoprotéines. Les LDL ont ainsi été séparées en plusieurs classes en fonction de leur taille. Parmi elles, les LDL petites et denses sont présentes à des concentrations élevées chez des patients à haut risque d'athérosclérose [226]. Quant aux HDL, elles ont été classées en sous-classes en fonction de leur composition lipidique et protéique : les HDL₂ de faible densité, et les HDL₃ de densité plus élevée [440].

2) Les apolipoprotéines

Les apolipoprotéines ont une double fonction de structure et de régulation métabolique. En effet, elles assurent la cohésion du complexe lipidique et sa solubilisation, d'une part, et elles agissent comme cofacteur et/ou activateur de nombreuses enzymes plasmatiques, d'autre part. De plus, elles servent de ligands pour les interactions avec les récepteurs cellulaires des cellules endothéliales et des hépatocytes, par exemple [168, 455, 460].

Il existe quatre classes d'apolipoprotéines majeures : A, B, C et E [455]. Ne sont présentées ci-dessous que leurs principales sous-classes :

☞ **Les apos A-I et A-II** sont les principales apolipoprotéines des HDL. Si la fonction de l'apo A-II n'est pas encore bien connue, celle de l'apo A-I l'est beaucoup mieux. En effet, elle est synthétisée par le foie et à un moindre degré par l'intestin. Lors de sa sécrétion elle est associée à des PL pour former des HDL naissantes [546]. Elle active la lécithine-cholestérol acyl transférase qui joue un rôle fondamental dans le transport inverse du cholestérol [455].

☞ **L'apo B-100** est la principale apolipoprotéine des VLDL et des LDL. Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique granuleux de l'hépatocyte, puis est associée aux lipides endogènes et est enfin excrétée avec les VLDL [455].

☞ **L'apo B-48** est la principale apolipoprotéine des chylomicrons. Elle est synthétisée par l'entérocyte à partir du gène de l'apo B-100. Un seul exemplaire d'apo B (100 ou 48) est présent par lipoprotéine [455].

☞ **L'apo C-II** est le cofacteur de la lipoprotéine lipase, elle est donc nécessaire à la lipolyse des TAG des VLDL et des chylomicrons [455].

☞ **L'apo E** a un rôle essentiel dans l'élimination des VLDL et des chylomicrons. Elle assure l'ancrage de ces lipoprotéines à la surface de l'endothélium en favorisant les interactions avec des protéoglycanes membranaires. Puis elle sert de ligand aux lipoprotéines avec les récepteurs cellulaires, en particulier hépatiques [60, 168, 455].

Contrairement à l'apo B, les apo C et E sont transférables entre différentes lipoprotéines. Elles sont sécrétées par le foie et l'intestin, probablement sous forme libre. Dans le compartiment sanguin, elles s'associent très rapidement aux VLDL et aux HDL. Schématiquement, si le pool des apolipoprotéines des VLDL est métaboliquement actif, celui des HDL sert principalement de réservoir [455].

3) Les enzymes

Trois enzymes jouent un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques : la lipoprotéine lipase, la lipase hépatique et la lécithine-cholestérol acyl transférase [455].

☞ **La lipoprotéine lipase** est synthétisée dans de nombreux tissus, mais plus particulièrement dans le tissu adipeux et les muscles striés squelettiques. Elle se fixe à la surface des cellules endothéliales, d'où elle exerce ses effets métaboliques. La principale fonction de la lipoprotéine lipase est d'hydrolyser des TAG des VLDL et des chylomicrons. Les acides gras libérés au cours de ce processus sont captés par les tissus pour leurs besoins métaboliques. Comme cité précédemment, l'apo C-II est un cofacteur indispensable de cette réaction [455].

☞ La structure de **la lipase hépatique** est proche de celle de la lipoprotéine lipase. Elle est synthétisée par le foie et reste localisée dans cet organe à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux capillaires. Elle assure l'hydrolyse des IDL en LDL et celle des HDL₂ en HDL₃ [455].

☞ **La lécithine-cholestérol acyl transférase** (LCAT) est synthétisée par le foie puis est excrétée hors des hépatocytes. Dans le compartiment sanguin, elle s'associe aux HDL où elle catalyse l'estérification du cholestérol libre excédentaire des membranes cellulaires avec les acides gras de la phosphatidylcholine des HDL. Cette réaction est activée par l'apo A-I [455].

4) Les récepteurs

Plusieurs récepteurs membranaires interviennent dans le métabolisme des lipoprotéines.

☞ **Le récepteur B/E** est exprimé à la surface des hépatocytes. Il reconnaît l'apo B-100 et l'apo E des LDL et IDL, mais pas l'apo B-48 des chylomicrons. L'interaction du récepteur avec une lipoprotéine stimule l'internalisation du complexe ligand / récepteur, les particules captées étant ensuite dégradées, et leurs différents composants recyclés [455].

☞ **Le récepteur LRP** (*LDL-related protein*) permet la récupération des chylomicrons au niveau du foie, grâce à l'interaction avec les apos B-48 et E des particules [455].

☞ **Le récepteur SR-B1** (*scavenger receptor*) permet la fixation des HDL au niveau du foie et le transfert de leur contenu dans les hépatocytes, mais sans qu'il y ait internalisation des particules [140].

☞ Enfin, **les récepteurs scavenger de classe A** sont essentiellement présents sur les macrophages. Il en existe plusieurs types, qui peuvent capter en particulier les LDL oxydées. Ces récepteurs ne sont pas régulés par la concentration intracellulaire de cholestérol. Ils sont ainsi toujours présents à la surface des cellules, ce qui peut conduire à un excès d'accumulation lipidique dans les tissus où résident les macrophages. Ce phénomène est à l'origine des cellules spumeuses, point de départ de l'athérosclérose [455].

II. 2) Le métabolisme des lipoprotéines

1) Le cas des chylomicrons

Les chylomicrons sont sécrétés dans la lymphe et rejoignent la circulation générale par l'intermédiaire du canal thoracique [59, 460]. Durant ce passage, les particules captent les apos E et C-II à partir d'autres lipoprotéines, notamment les HDL [460].

A proximité des cellules cibles, la lipoprotéine lipase hydrolyse les TAG en acides gras libres, mono et diacylglycérols, qui sont libérés du chylomicron [60, 140]. Comme précisé précédemment, l'action de l'enzyme est rendue possible par la présence de l'apo C-II, cofacteur indispensable [455]. L'albumine sérique prend en charge les lipides libérés et les transporte à proximité des cellules, où ils passent à travers la bicouche phospholipidique pour gagner le cytoplasme [47].

Les chylomicrons qui ont perdu leur contenu lipidique sous l'action de la lipoprotéine lipase se transforment en particules de plus petite taille, plus denses, relativement plus riches en protéines, cholestérol et PL : les remnants (ou « vestiges » de chylomicrons) [60, 140]. Les remnants sont rapidement éliminés par le foie (70%), cette épuration se faisant grâce à l'interaction entre le récepteur LRP des hépatocytes et l'apo E des vestiges de chylomicrons [60, 140].

Les chylomicrons ont une durée de vie de quelques heures, ils ne sont donc retrouvés dans le sang qu'en période post-prandiale [60, 140].

2) Le cas des particules de faible densité

Durant la période interprandiale, le foie met en circulation de nouvelles lipoprotéines synthétisées *in situ* : les VLDL, qui contiennent l'apo B-100, et qui assurent le transport des TAG du foie vers les tissus périphériques [140].

Dans la circulation sanguine, les particules sont rapidement délestées de leurs TAG par la lipoprotéine lipase. Pendant cette période l'apo C masque l'apo E, empêchant la récupération par le foie. Les VLDL deviennent à l'issue de ce processus des vestiges de VLDL, ou IDL (particules de densité intermédiaire).

Deux voies différentes existent pour les IDL. Dans la première, l'apo C libère l'apo E, permettant une internalisation rapide dans les hépatocytes [60, 140].

Dans la seconde voie, les IDL perdent leur apo E, ce qui allonge leur temps de résidence dans la circulation sanguine. En réalité, l'apo B-100 peut également se lier au récepteur B/E, mais avec une affinité bien moindre [60, 140]. Les IDL deviennent des LDL au fur et à mesure qu'elles continuent à délivrer leur contenu lipidique aux cellules cibles [60, 140, 455]. Ces LDL, du fait de leur temps de séjour plus long dans le sang, sont plus sujettes à l'oxydation que les autres particules. Si elles sont oxydées, elles sont captées par les macrophages des parois vasculaires par l'intermédiaire de leur récepteur *scavenger* de classe A [60, 140, 157].

3) Le cas des particules de haute densité

Les HDL, produites par les hépatocytes, assurent le transport du cholestérol excédentaire des tissus périphériques vers le foie. Les expressions de « transport inverse du cholestérol » ou « voie retour du cholestérol » sont utilisées pour caractériser cette voie métabolique [60, 140]. Très schématiquement, elles vont capter le cholestérol libre excédentaire au niveau de la membrane plasmique des cellules périphériques et le ramener au foie, où il sera catabolisé en acides biliaires et éliminé par le cycle entéro-hépatique [140].

Les HDL naissantes sont synthétisées au niveau du foie ou de l'intestin, sous forme de particules discoïdes pauvres en lipides et riches en apo A-I (pré-HDL). Au contact des cellules périphériques, les pré-HDL vont capter le cholestérol libre excédentaire, et le ramener au foie sous forme estérifiée. Pour ce faire, la LCAT libère l'acide gras en position *sn-2* des PL de la surface des HDL et l'estérifie sur une molécule de cholestérol libre, formant un EC [140]. Au fur et à mesure que le contenu lipidique des pré-HDL augmente, elles deviennent des HDL₂ sphériques de taille croissante (aboutissant à des HDL₃) [140].

Ces particules peuvent échanger des molécules avec les autres particules circulantes, en donnant aux IDL et aux LDL des EC, tandis que les chylomicrons et les VLDL leur transfèrent des TAG [140].

Les HDL peuvent enfin se fixer sur un récepteur SR-B1 hépatique, qui permet de transférer les EC dans l'hépatocyte sans que toute la lipoprotéine ne soit internalisée [140].

4) Les lipides sanguins : notions de LDL-, HDL-cholestérol et triglycérides

Les expressions LDL- et HDL-cholestérol concernent les contenus en cholestérol libre et estérifié des lipoprotéines de faible et haute densité, respectivement (LDL et HDL).

Le LDL-cholestérol est souvent appelé « mauvais cholestérol » car au fur et à mesure que les LDL délivrent leurs TAG, leurs proportions relatives de cholestérol libre et d'EC augmentent. Si ces particules sont oxydées dans la circulation sanguine et récupérées par des macrophages de la paroi, elles initient le processus de formation de la strie lipidique, qui est une des premières étapes de l'athérosclérose (*cf.* chapitre « Pathologies liées au métabolisme des lipides ») [60, 168].

Au contraire, le HDL-cholestérol est considéré comme « bon » car le transport inverse est un moyen efficace de régulation du taux de cholestérol cellulaire et d'entretien du cycle de recyclage du cholestérol [60]. Le foie transfère une grande partie des EC des lipoprotéines dans la bile. Quarante-vingts pour cent de ce cholestérol est réabsorbé par le cycle entéro-hépatique. L'essentiel du cholestérol de l'organisme provient de ce recyclage et/ou de la synthèse endogène à partir de l'acétate et finalement assez peu du cholestérol alimentaire (10-20%) [140].

Le dernier paramètre qui peut être évalué par l'étude du contenu des lipoprotéines est le taux de « triglycérides » plasmatiques (TAGp). Cette valeur représente le contenu en TAG des différentes lipoprotéines, et permet l'évaluation des lipides circulants. Le taux de TAGp interprandial comprend le contenu des VLDL, IDL, LDL et HDL, et le taux postprandial comprend en plus le contenu des chylomicrons.

II. 3) L'influence de la structure des acides gras

La structure des acides gras ingérés influence le métabolisme des lipoprotéines.

Historiquement, l'influence des lipides alimentaires sur le taux de cholestérol sanguin est calculé grâce aux équations de Keys et Hegsted :

$$\text{Keys et al. (1965) [248]} : \Delta TC = 2,4 * \Delta SFA' - 1,2 * \Delta UFA + 1,5 * \sqrt{\Delta C}$$

Avec TC : cholestérol sanguin

SFA' : proportion d'acides gras saturés, sans acide stéarique (en % de l'apport énergétique total)

UFA : proportion d'acides gras insaturés (en % de l'AET)

C : cholestérol alimentaire, exprimé en mg pour 1000 kcal/jour.

$$\text{Hegsted et al. (1965) [191]} : \Delta TC = 2,32 * \Delta SFA - 1,46 * \Delta UFA + 6,51 * \Delta C' + 0,83$$

Avec SFA : proportion d'acides gras saturés (en % de l'AET)

C' : cholestérol alimentaire, exprimé en mg/jour.

1) Acides gras saturés

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer l'effet hypercholestérolémiant des SFA :

- i) Ils pourraient être responsables de la diminution de l'expression du récepteur B/E sur les hépatocytes, empêchant une récupération efficace des LDL, augmentant ainsi la concentration plasmatique en cholestérol [176] ;
- ii) Leur incorporation dans les PL membranaires pourrait rigidifier la membrane hépatocytaire du fait de leur point de fusion élevé. Celle-ci perdrait ainsi de sa fluidité, et le fonctionnement des récepteurs aux LDL pourrait en être perturbé [176].

a) Saturés à courte chaîne

Les SFA à courte chaîne (moins de 12 atomes de carbone) ne sont pas présents en grande quantité dans les huiles végétales. C'est peut-être la raison pour laquelle leur éventuel effet sur les lipides sanguins a été peu étudié [264]. Dans les quelques études publiées sur ce sujet, il semble que ces acides gras soient neutres, que ce soit vis-à-vis du LDL-, du HDL-cholestérol ou des TAGp [176]. Deux hypothèses peuvent expliquer ce fait :

- i) Du fait de leur courte chaîne, leur point de fusion est inférieur à la température du corps, ils ne rigidifient donc peut-être pas la membrane des cellules ;
- ii) Peut-être sont-ils rapidement utilisés par les cellules pour produire de l'énergie, ce qui les retirerait rapidement du métabolisme normal des lipides, et diminuerait leur influence sur les paramètres sanguins.

b) Acides laurique et myristique

Les acides laurique et myristique augmentent le LDL-cholestérol [216, 249, 264, 268]. L'acide myristique semble plus délétère que le laurique, mais la position d'estérification sur le squelette glycérol semble avoir une importance prépondérante dans le cas de l'impact de cet acide gras (cf. le paragraphe « Importance de la position des acides gras dans les TAG ») [216, 264, 268].

c) Acide palmitique

L'acide palmitique est particulier. En effet, si la majorité des études a montré un effet hypercholestérolémiant de cet acide gras [51, 216, 264, 268], d'autres ont démontré une relative neutralité [190, 249]. Les auteurs de ces deux dernières études émettent l'hypothèse d'un seuil. Ils postulent qu'au-delà de 400 mg de cholestérol alimentaire ingéré par jour, l'acide palmitique augmenterait le taux de LDL-cholestérol (de manière peut-être supérieure à l'acide myristique), tandis

qu'il serait plutôt neutre en deçà [190, 249]. Il semble que des études supplémentaires soient nécessaires pour expliquer la disparité entre ces résultats.

d) Acide stéarique

L'acide stéarique semble n'avoir aucun effet délétère sur les lipides sanguins [51, 99, 176, 217, 264, 268]. En fait, il a été prouvé qu'un régime riche en acide stéarique n'augmente pas les lipides plasmatiques comparé à un régime riche soit en OA, soit en LA [217].

Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer ce phénomène :

i) Le point de fusion de l'acide stéarique libre est bien supérieur à la température du corps humain (70°C, [357]), ce qui fait qu'il est solide à 37°C, et qu'il est probablement susceptible d'être éliminé dans les fèces au lieu d'être absorbé par l'épithélium intestinal ;

Remarque : Pendant le processus de digestion, la lipase libère spécifiquement les acides gras placés aux positions extérieures des TAG (position préférentielle des SFA dans les huiles végétales), en laissant l'acide gras interne en place. L'acide stéarique se retrouve donc dans la lumière intestinale, solide du fait de son point de fusion élevé [42].

ii) L'acide stéarique est peut-être rapidement désaturé en OA, et donc son éventuel effet propre serait masqué [51].

e) Saturés à longue chaîne

L'absorption des SFA à longue chaîne (LCSFA) n'est pas efficace, du fait de leur point de fusion élevé (cf. hypothèse « i » du paragraphe précédent). Il n'est donc pas étonnant qu'aucun effet sur les lipides sanguins n'ait été mis en évidence [51, 264, 268]. De plus, la quantité de LCSFA dans les huiles végétales étant très faible, leur contribution à l'apport lipidique général peut être considéré comme négligeable.

A noter, un effet positif des SFA qui augmentent la concentration de HDL-cholestérol sanguin, et ce d'autant plus qu'ils augmentent le LDL-cholestérol [221, 264]. Cet effet positif ne permet cependant pas de compenser l'action sur le LDL-cholestérol, c'est pourquoi la surveillance des apports en SFA reste un point important de la nutrition à l'heure actuelle. De manière générale, les SFA ont également tendance à augmenter la concentration en TAGp [176].

2) Acides gras monoinsaturés

Le OA est l'acide gras majoritaire de nombreuses huiles végétales, en particulier des huiles d'olive et de colza, et est le MUFA alimentaire principal. Il montre un effet neutre ou légèrement positif vis-à-vis du cholestérol total et du LDL-cholestérol [51, 99, 175, 176, 186, 187, 217, 264].

L'huile d'olive a longtemps été considérée comme « saine » du fait de la proportion d'OA qu'elle contient, mais il semble à présent que d'autres composés de l'huile pourraient être actifs. L'action positive des MUFA sur les lipides sanguins a, en effet, été démontrée par des études dans lesquelles le régime témoin était composé de SFA. Ce choix a introduit un biais dans les résultats du fait de l'action délétère de ces acides gras sur le LDL-cholestérol [51, 176, 264]. Quand l'effet des MUFA a été étudié contre un régime riche en glucides, il a été prouvé que ces acides gras sont neutres vis-à-vis des lipides sanguins [99, 175].

A part l'action sur le LDL-cholestérol, il semble que l'acide oléique soit neutre vis-à-vis des TAGp et du HDL-cholestérol [99 et 175, 264, respectivement].

3) Acides gras polyinsaturés

a) Acide linoléique

Parmi les PUFA, le LA, précurseur de la famille des AG *n-6*, est le seul à diminuer le taux de LDL-cholestérol [190, 262, 264]. Certains auteurs nuancent ces résultats, en démontrant que le LA est neutre vis-à-vis du LDL-cholestérol [176, 217]. D'autres avancent l'hypothèse d'une valeur seuil, au-delà de laquelle cet acide gras deviendrait neutre [249, 517]. D'après eux, l'effet positif sur le cholestérol n'est visible que pour un apport compris entre 10 et 17% des lipides totaux [517]. Quoi qu'il en soit, les acides gras témoins dans la majorité de ces études sont des SFA, et la seule conclusion acceptable dans ce cas est que remplacer des SFA par du LA permet de diminuer la concentration en LDL-cholestérol [233, 325, 521].

Certains auteurs proposent une autre hypothèse, selon laquelle l'un des métabolites du LA, vraisemblablement l'acide γ -linoléique (GLA) ou l'acide dihomo- γ -linoléique (dihomo-GLA), serait actif à la place du LA [206]. Sachant que la $\Delta 6$ -désaturation (transformation du LA en GLA) est l'étape limitante de la conversion du LA [206], il semble évident que si le dihomo-GLA est le composé actif, apporter directement du GLA soit plus efficace qu'apporter du LA. De plus, un excès de LA inhibe sa propre conversion en LCPUFA [283]. Ceci permet de renforcer les deux hypothèses présentées dans les différentes études :

- i) Le GLA ou le dihomo-GLA est actif au lieu du LA ;
- ii) Apporter du LA en excès inhibe l'effet positif observé sur le LDL-cholestérol.

Le LA semble diminuer le taux de HDL-cholestérol de manière concomitante à la baisse du LDL-cholestérol [325]. Le LA diminue également, mais de manière faible, le taux de TAGp [262].

Enfin, comme décrit précédemment, un excès de LA dans le régime alimentaire provoque un état pro-inflammatoire dans l'organisme [2, 3, 288]. C'est pourquoi le ratio $n-6/n-3$ recommandé préconise que la consommation de LA dans nos régimes occidentaux soit diminuée [287].

b) Acide α -linoléique

L'ALA semble neutre vis-à-vis du LDL-cholestérol [117, 151, 376, 464]. Pourtant, certaines études ont montré un effet positif de ce précurseur sur le LDL-cholestérol, mais dans des tests où d'autres acides gras du régime ont été modifiés en même temps, comme par exemple le LA [432], les SFA [220, 519, 536], ou même le régime entier [463, 465].

L'action du précurseur sur le HDL-cholestérol et les TAGp n'est pas plus claire. Certaines études n'ont montré aucun effet [117, 151, 220, 376, 432], deux ont trouvé une diminution des TAGp et du HDL-cholestérol [519, 536], une étude a vu une diminution du HDL-cholestérol seulement [464], et deux ont montré une diminution des TAGp et une augmentation du HDL-cholestérol [463, 465]. De même que pour les résultats concernant le LDL-cholestérol, la plupart de ces études ne concernaient pas uniquement une modification de l'apport en ALA, mais une modification plus importante du régime.

Il paraît évident que des études mieux contrôlées sont nécessaires pour permettre de tirer des conclusions fermes quant à l'effet du précurseur sur les lipides sanguins. L'agence alimentaire britannique (*UK food standard agency*) est parvenue à la même remarque dans son rapport sur la comparaison de l'impact de l'ALA par rapport à ses dérivés à longue chaîne, EPA et DHA [443].

Quoi qu'il en soit, l'apport en acides gras $n-3$, et en particulier en ALA, est insuffisant dans nos régimes alimentaires [287], et devrait être augmenté pour :

- i) Augmenter la production de composés anti-inflammatoires grâce à la conversion de l'ALA en EPA ;
- ii) Réguler la production des métabolites issus du LA, et par là éviter que le déséquilibre du ratio $n-6/n-3$ provoque un statut pro-inflammatoire [2, 3, 288].

c) Acides eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque

Les multiples études qui ont évalué les effets des LCPUFA $n-3$ (EPA et DHA) sur le risque cardiovasculaire ont montré une action positive significative sur les TAGp [110, 166, 167, 171, 174, 311, 343, 400, 411, 439, 461, 462, 464, 490], ainsi qu'une légère augmentation du HDL-cholestérol [110, 122, 174, 411, 461, 462, 464]. En exemple, citons l'étude INTERLIPID, qui a montré une corrélation positive entre l'apport en EPA et DHA et la concentration en HDL-cholestérol sanguin [369].

Malgré tout, cette action sur le HDL-cholestérol reste controversée [166, 171, 235, 311, 343, 439, 490]. Les auteurs qui ont fait la distinction entre les sous-classes de HDL, HDL₂ (dites antiathérogènes) et HDL₃ (rôle plus incertain) ont montré que l'EPA et le DHA agiraient principalement en augmentant le HDL₂-cholestérol, et seraient neutres ou légèrement positifs vis-à-vis du HDL₃-cholestérol [122, 311, 343, 411]. Ceci a permis de mieux cerner l'action positive de l'EPA et du DHA sur le HDL-cholestérol.

Les effets observés des LCPUFA $n-3$ montrent une diminution des TAGp de l'ordre de 10 à 30%, et une augmentation du HDL-cholestérol de 5 à 15%, pour une dose d'EPA+DHA de 0,7 à 1 g par jour [110, 166, 167, 439, 461, 490]. Augmenter cette dose au-delà de 1 g par jour n'augmente visiblement pas la force de l'effet [171, 174, 311, 343, 400, 411, 462, 464].

Il semble important de rappeler que remplacer des SFA par des MUFA ou des PUFA améliore le profil lipidique plasmatique. Il n'y a pas, à l'heure actuelle, de consensus quant à une action positive de l'OA ou du LA, en grande partie à cause de la difficulté à augmenter un acide gras sans influencer la proportion des autres.

Une autre approche possible est de remplacer les lipides d'intérêt par des glucides dans le régime témoin [175]. Une méta-analyse de 395 publications a étudié le remplacement isocalorique de classes d'acides gras par d'autres, ou par des glucides complexes, ce qui a permis une meilleure appréciation de l'effet de chacun des groupes d'acides gras. Les auteurs concluent que les SFA augmentent le LDL- et le HDL-cholestérol, que les MUFA n'ont pas d'impact sur le LDL- mais augmentent le HDL-cholestérol, et que les PUFA diminuent le LDL- et augmentent le HDL-cholestérol [99].

II. 4) L'importance de la position des acides gras dans les triacylglycérols

La structure des acides gras n'a pas permis jusqu'à présent d'expliquer entièrement l'influence des lipides alimentaires sur les lipides sanguins. En effet, la position des acides gras sur le squelette des TAG influence également le métabolisme des lipoprotéines.

Par exemple, l'acide myristique serait moins hypercholestérolémiant en position *sn*-2 que *sn*-1 ou 3 [108], comme c'est le cas dans la matière grasse laitière [216, 394]. De plus, dans cette configuration il semble que l'acide myristique stimule la conversion d'ALA en EPA et DHA [108].

L'effet serait inverse pour l'acide palmitique, qui augmenterait plus le LDL-cholestérol sanguin en étant placé en position interne [268], ce qui est le cas dans la matière grasse laitière [216, 394], ou le lait maternel [131].

Quant aux LCSFA, ils ralentiraient l'élimination des chylomicrons par le foie en étant estérifiés en position interne du glycérol [346]. Dans cette position, ils pourraient également augmenter la concentration des LDL pathologiques. En effet, lors de l'hydrolyse des TAG par la lipoprotéine lipase et la lipase hépatique, les mono et diacylglycérols formés agissent comme des tensioactifs. Ils migrent à la surface des particules, et pourraient les rigidifier du fait de leur haut point de fusion s'ils contiennent des LCSFA. Ceci aurait pour effet de gêner l'interaction entre les apolipoprotéines de la particule et les récepteurs hépatiques, empêchant la récupération par le foie [346, 418].

Sachant que dans les huiles végétales les SFA sont préférentiellement estérifiés en position externe, et étant donné les résultats présentés ci-dessus, il semble que seul l'acide myristique soit plus délétère dans les huiles végétales que dans la matière grasse laitière [216, 415] par rapport aux différents SFA cités. On peut donc conclure que les huiles végétales semblent plus intéressantes que les graisses animales pour leur impact sur les lipides sanguins.

PATHOLOGIES LIÉES AU MÉTABOLISME DES LIPIDES

Cette partie concerne les mécanismes des pathologies associées aux lipides, et les bénéfices que peuvent apporter les acides gras alimentaires, particulièrement les PUFA *n-3*.

Dans ce chapitre sont présentés les différents facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires. Dans un deuxième temps, les mécanismes qui régissent les pathologies liées aux lipides sont décrits, et enfin l'impact des acides gras *n-3* est détaillé.

I/ Les facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires

Les facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires peuvent être classés en deux catégories :

- ⊗ les facteurs non modifiables : antécédents familiaux, âge, sexe ;
- ⊗ les facteurs modifiables : hyperlipidémies (LDL-cholestérol, HDL-cholestérol, TAGp), surpoids, hypertension artérielle, diabète, syndrome métabolique, sédentarité, tabagisme, facteurs de coagulation, apports lipidiques déséquilibrés, inflammation, rythme cardiaque.

Le projet SCORE a permis la mise au point d'une grille d'évaluation du risque cardio-vasculaire à 10 ans en prévention primaire, adaptée à la France (figure B-9) [487]. L'élaboration de cette grille est un travail important qui se différencie de nombreux travaux antérieurs du même type car il est le premier à fournir une estimation du risque cardio-vasculaire adaptée aux différents pays d'Europe, en prenant en compte les régions à risque élevé et celles à risque plus faible. Pour ce faire, des études de cohorte provenant de 12 pays européens ont été analysées de manière commune, et quatre grilles ont pu être construites, représentant les risques pour hommes et femmes, pour les régions à risque fort et à risque faible. Les pays d'Europe considérés à risque faible sont la Belgique, la France, la Grèce, l'Italie, l'Espagne, la Suisse et le Portugal, les autres étant considérés à risque élevé (Allemagne, Danemark, Royaume-Uni, Suède, Finlande, Russie, Norvège...) [487].

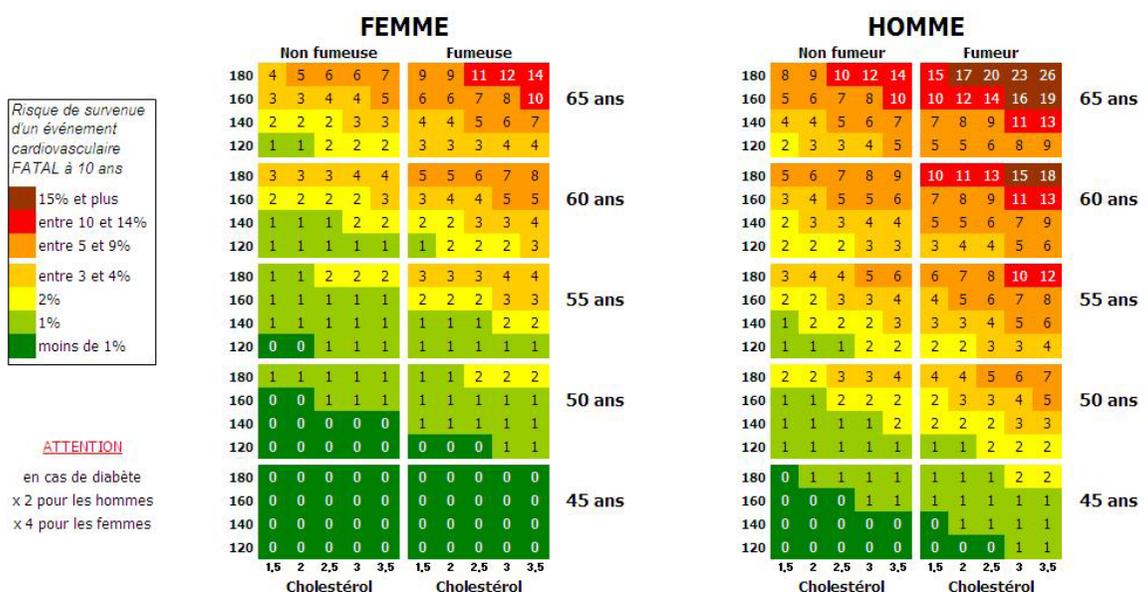


Figure B-9 : Illustration de l'évolution du risque d'accident cardio-vasculaire fatal à 10 ans en fonction de certains facteurs de risque [487].

Légende : tableau de gauche : femmes, tableau de droite : hommes, demi-tableau de gauche : non fumeur, demi-tableau de droite : fumeur, abscisse : taux de cholestérol total (g/L), ordonnée gauche : tension artérielle systolique (mm Hg), ordonnée droite : âge.

I. 1) Facteurs non modifiables

1) Le sexe

Les tableaux de la figure précédente permettent de mettre en évidence l'inégalité des hommes et des femmes devant les pathologies cardio-vasculaires [113, 356, 487, 535]. En effet, si on considère une personne de 55 ans, fumeuse, ayant un taux de cholestérol total de 2,5 g/L et une tension systolique de 140 mmHg, le risque est 4 fois moindre pour une femme que pour un homme [113, 487].

Différentes hypothèses sont envisageables :

- i) Un statut hormonal différent, qui pourrait protéger les femmes contre le développement de l'athérosclérose par exemple ;
- ii) Ou des différences dans les habitudes de vie, alimentaires ou tabagiques, qui pourraient expliquer que les études menées jusqu'à présent montrent de tels résultats, même si ces différences tendent à être gommées dans les nouvelles générations [487].

2) L'âge

Cette figure permet également de montrer l'impact de l'âge sur l'évolution du risque [113, 356, 487, 535]. Si l'on reprend la personne de l'exemple précédent (homme, fumeur, 2,5 g/L de cholestérol total, tension systolique de 140 mmHg.), son risque augmente de 1 à 14% en passant de 45 à 65 ans [113, 487].

3) Les antécédents familiaux

L'historique cardio-vasculaire de la famille du patient est également reconnu comme étant un facteur de risque des accidents ischémiques [356].

Citons en exemple deux études, une qui a relié l'apparition d'accidents cardio-vasculaires avec les antécédents familiaux des patients [158], et une autre qui a étudié l'occurrence d'accidents dans des couples de jumeaux homozygotes [319]. La première étude a montré que le risque de maladie cardio-vasculaire est plus élevé chez les personnes dont les proches ont des antécédents d'infarctus [158], et la deuxième a montré que si un des deux jumeaux fait un infarctus, le deuxième a plus de risque d'en faire un aussi [319].

Les auteurs de ces deux études nuancent leurs résultats de la même manière, en disant que l'impact des antécédents familiaux sur le risque d'accident vasculaire est d'autant plus marqué que le patient est jeune [158, 319]. En effet, plus le patient avance en âge, et moins son historique familial a un impact.

I. 2) Facteurs modifiables

1) Hyperlipidémies

Depuis de nombreuses années, le LDL-, le HDL-cholestérol et les TAGp ont été identifiés comme étant des facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires, en particulier dans les accidents ischémiques [356]. Les concentrations de ces lipides sanguins considérées comme normales sont les suivantes :

- ∅ le LDL-cholestérol doit être inférieur à 1,9 g/L si la personne n'a aucun facteur de risque ; inférieur à 1,6 g/L si elle a un facteur de risque ; inférieur à 1,3 g/L si elle en a deux et inférieur à 1 g/L si elle a un antécédent d'infarctus ;
- ∅ le HDL-cholestérol doit être supérieur à 0,4 g/L chez les hommes, et à 0,5 g/L chez les femmes ;
- ∅ le taux de TAGp doit être compris entre 0,3 et 1,5 g/L.

Beaucoup d'études ont montré que le LDL-cholestérol est positivement corrélé avec le risque de survenue d'un accident cardio-vasculaire [106, 113, 124, 160, 226, 356, 430, 535]. De nouveaux médicaments destinés à réguler ce paramètre sanguin ont, depuis, fait leur apparition, comme les statines ou les fibrates. Même l'industrie alimentaire a fait de la baisse du LDL-cholestérol un cheval de bataille, avec la mise sur le marché de produits contenant des stérols ou stanols végétaux, dans des matrices type corps gras ou laits fermentés.

Le HDL-cholestérol et les TAGp ont, dans un premier temps, été identifiés comme un unique facteur de risque, « HDL-cholestérol faible / TAGp élevés » [124, 226]. Mais des études plus récentes ont montré que les deux composantes de ce facteur sont des facteurs de risque indépendants, avec des

signes opposés. Cela revient à dire qu'un taux élevé de TAGp est un facteur de risque [106, 113, 134, 160, 262, 356, 430, 473, 535], tandis qu'un taux élevé de HDL-cholestérol, particulièrement de HDL₂-cholestérol, est protecteur [49, 106, 113, 155, 160, 356, 430, 440, 473, 535].

En effet, une distinction peut être faite entre les deux sous-classes de HDL, c'est-à-dire les HDL₂ et les HDL₃. La corrélation entre accidents cardio-vasculaires et concentration du HDL-cholestérol est plus forte dans le cas du HDL₂- que du HDL₃-cholestérol [440]. Plus précisément, si le risque est ajusté pour le HDL₂- en plus des facteurs « normaux » (âge, sexe, tabagisme, activité physique, etc.), la concentration en HDL₃-cholestérol n'est plus significative [440]. Il semble donc que le HDL₂-cholestérol soit bénéfique, tandis que le rôle du HDL₃- est plus incertain. Cependant, il existe encore à l'heure actuelle un manque d'études prospectives larges pour mettre en évidence la pertinence du HDL₂-cholestérol comme indicateur de maladies cardio-vasculaires [356].

Quelques données chiffrées pour illustrer la force des relations décrites dans ce paragraphe entre lipides sanguins et occurrence des maladies cardio-vasculaires, et prouver le besoin de maîtriser ces paramètres chez les personnes à risque :

- un taux de LDL-cholestérol supérieur de 10% à la normale correspond à un risque d'accident cardio-vasculaire amplifié de 15% [124] ;
- un taux de TAGp supérieur de 10% à la normale correspond à un risque accru de 7% [124] ;
- un taux de HDL-cholestérol inférieur de 10% à la normale augmente le risque de 13% [124] ;
- augmenter la concentration en HDL-cholestérol de 1% correspond à une diminution du risque de 3% [49, 155].

Grundy et Demke (1990) [176] ont publié une revue sur l'influence des SFA sur les lipides sanguins, dans laquelle ils mettent en évidence la grande variabilité interindividuelle dans la réponse à ces acides gras. Ils évoquent la possibilité d'une composante génétique. D'autres études se sont depuis intéressées aux variations génétiques susceptibles d'expliquer cette disparité [31, 135, 207].

L'apoE est l'apolipoprotéine assurant l'interaction avec le récepteur hépatique pour la récupération des VLDL, IDL et LDL. Le gène codant l'apoE a trois allèles possibles, appelés $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$, qui donnent lieu aux protéines apoE2, E3 et E4, respectivement. La différence entre ces apolipoprotéines réside dans le nombre de résidus cystéine présents (deux dans E2, un dans E3, et aucun dans E4, remplacés par des résidus arginine) [31, 135].

En étudiant les concentrations en lipides sanguins de patients par rapport à leur phénotype apoE, il apparaît que le génotype $\epsilon 4/4$ conduit à un taux de LDL-cholestérol supérieur à la normale, et un taux de HDL-cholestérol inférieur [135, 207]. Il semble également que les phénotypes apoE3 engendrent des concentrations en TAGp inférieures à la moyenne [207], et les phénotypes apoE2 un taux de LDL-cholestérol inférieur [136]. Le phénotype apoE4 a également été positivement corrélé avec la survenue d'infarctus [107, 136, 362, 497]. Plus particulièrement, Cumming et Robertson (1984) [107] ont montré que les survivants d'infarctus de phénotype apoE4 avaient eu leur accident cardio-vasculaire plus jeunes que la moyenne des patients, tous phénotypes confondus. Cette notion de déterminant génétique dans le profil lipidique sanguin et dans le risque d'infarctus pourrait en partie expliquer l'influence des antécédents familiaux. Les groupes de travail qui recensent les données sur les différents facteurs de risque commencent d'ailleurs à s'intéresser au phénotype apoE [160].

2) *Syndrome métabolique*

Présenter plusieurs facteurs de risque augmente le risque de survenue d'un accident cardio-vasculaire de manière plus importante que la somme des risques ne le laisse prévoir [12, 25, 243]. Cette constatation a donné naissance à la notion de syndrome métabolique.

Un patient a ce syndrome s'il répond aux critères suivants [113, 128, 356] :

- ☞ Obésité abdominale (diamètre abdominal supérieur à 94cm pour les hommes et 80cm pour les femmes en France, mais nécessité de prendre en compte des différences interethniques) ;
- ☞ + 2 facteurs parmi les 4 suivants :
 - TAGp > 1,5 g/L ou traitement hypotriglycémiant,
 - HDL-cholestérol < 0,4 g/L pour les hommes et 0,5 g/L pour les femmes ou traitement hypolipémiant,
 - tension artérielle > 130/85 mmHg ou traitement hypotenseur,
 - glycémie > 1 g/L.

Outre les TAGp et le HDL-cholestérol, déjà décrits ci-dessus, le syndrome métabolique prend donc en compte trois facteurs de risque : le surpoids, l'hypertension, et le diabète.

✂ Surpoids - Obésité

L'obésité n'a été reconnue comme un facteur de risque modifiable majeur des maladies cardio-vasculaires qu'en 1998, sous l'impulsion de l'AHA (*American heart association*, [449]). Depuis, ce facteur est clairement surveillé, et l'indice de masse corporelle (IMC) a été remplacé par le périmètre abdominal, visiblement mieux corrélé avec le risque [113, 356, 535], que ce soit de mortalité totale ou d'accident cardio-vasculaire [109].

$$IMC = \frac{M}{T^2}$$

Avec : M : masse (kg)

T : taille (m)

✂ Hypertension artérielle

L'association entre la pression artérielle et le risque d'accident cardio-vasculaire est bien connue [113, 124, 243, 295, 315, 356, 487, 535], et semble linéaire [243, 315]. Plus précisément, il semble que cette corrélation ne permettrait pas d'identifier une valeur seuil au-delà de laquelle le risque deviendrait réel. Une diminution de la tension, quelle que soit la valeur de départ, semble toujours bénéfique pour réduire le risque cardio-vasculaire [243, 315]. En effet, une pression artérielle élevée fragilise les parois vasculaires, qui perdent, avec le temps, leur élasticité et leur capacité à laisser passer le flux sanguin.

✂ Diabète

Le diabète de type 2, ou une glycémie élevée, sont tous deux reconnus comme facteur de risque des maladies cardio-vasculaires par de nombreux groupes de travail internationaux [52, 113, 160, 356, 487, 535].

3) Sédentarité

Citons deux études concernant le manque d'activité physique, celle de Oguma et Shinoda-Tagawa (2004) [367], qui a prouvé que l'activité physique protège les femmes du risque d'accidents cardio-vasculaires, et celle de Kruger *et al.* (2003) [267] qui a démontré que l'inactivité physique est corrélée avec le risque vasculaire, en particulier chez les personnes en surpoids.

4) Tabagisme

Le tabagisme est depuis longtemps considéré comme un facteur de risque des accidents cardio-vasculaires [113, 356, 487, 535]. La figure B-9 montre qu'à valeurs équivalentes pour les autres facteurs de risque, le fait de fumer multiplie environ par 2 le risque d'accident à 10 ans.

Il est important de noter que sur 3 morts dues au tabac, 2 seront de cause cardio-vasculaire tandis qu'une seule sera due à un cancer. En effet, une étude publiée en 2003 [143] estime que sur les 4,83 millions de décès dus au tabac dans le monde, 35% sont cardio-vasculaires contre 18% pour le cancer du poumon et 20% pour d'autres maladies pulmonaires.

5) Coagulation

Ce paragraphe sur la coagulation comprend trois paramètres qui semblent corrélés avec la survenue des accidents cardio-vasculaires. Ce sont les concentrations plasmatiques en fibrinogène et en PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor*), ainsi que la viscosité du sang.

La coagulation sanguine est un phénomène complexe, résultant d'un équilibre entre des cascades de réaction à tendance procoagulante, et d'autres anticoagulantes, qui seront détaillées plus loin dans ce chapitre [160, 213, 363]. Pour résumer, le fibrinogène et le PAI-1 sont deux composés intervenant dans des cascades procoagulantes, donc plus leur concentration respective est élevée, plus les plaquettes sanguines ont tendance à s'agréger [160, 213, 363]. Ainsi, un taux de fibrinogène sanguin élevé a été identifié comme étant un facteur de risque des accidents cardio-vasculaires [160, 193, 244, 320, 356, 491], et, inversement, un taux faible semble protecteur, même chez les personnes ayant un taux de LDL-cholestérol élevé [193]. De même, un taux de PAI-1 élevé est un facteur de risque, et est associé avec une tendance à la formation de caillots sanguins [35, 160, 213]. Enfin, il est intéressant de noter que les personnes présentant le syndrome métabolique ont des taux de fibrinogène et de PAI-1 significativement plus élevés que ceux ne présentant pas ce syndrome [25, 363].

La viscosité du sang est déterminée par la concentration en hématies (hématocrite), le volume, la déformabilité et l'agrégation des hématies, et enfin la viscosité du plasma [434]. Parmi ces caractéristiques, il a été démontré que l'hématocrite est positivement corrélée avec la survenue d'accidents cardio-vasculaires [433, 470].

6) Apports lipidiques

Le chapitre précédent a montré l'impact des différents acides gras alimentaires sur les lipides sanguins. Chacun des lipides sanguins (LDL- et HDL-cholestérol, TAG) étant considéré comme un facteur de risque des accidents cardio-vasculaires, il est aisé de voir l'impact que peut avoir le régime alimentaire sur le risque d'infarctus.

Les groupes qui récapitulent les données connues sur les différents facteurs de risque insistent sur ce fait, et citent régulièrement la structure du régime alimentaire lipidique comme étant à surveiller chez les patients à risque, en particulier au niveau des lipides totaux, des SFA et des acides gras *trans* [113, 356, 535]. C'est en effet le cas des auteurs de l'INTERHEART Study, qui a étudié l'impact des facteurs de risque modifiables sur la survenue d'accidents cardio-vasculaires dans 52 pays [535], du 3^{ème} groupe de travail des sociétés européennes et autres de prévention des maladies cardio-vasculaires en pratique clinique (*Third task force of european and other societies on cardio-vascular disease prevention in clinical practice*) [113], et du panel expert du *National cholesterol education program* [356].

7) Inflammation

L'athérosclérose, qui mène à l'infarctus, est une pathologie qui a une composante inflammatoire importante (cf. paragraphe « Athérosclérose » ci-après).

Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation positive entre certains marqueurs physiologiques de l'inflammation et le risque d'infarctus [227, 316, 416], en particulier la protéine C réactive (CRP), ou certaines interleukines inflammatoires (TNF- α , IL-6...). La surveillance de ces facteurs physiologiques est d'ailleurs recommandée aux cliniciens, de manière à identifier les patients à risque [160, 356].

8) Fréquence cardiaque

Plusieurs aspects de la fréquence cardiaque ont été corrélés avec le risque cardio-vasculaire : la fréquence de base, la longueur de l'intervalle QT, et la variabilité du rythme.

Une valeur pour illustrer l'impact de la fréquence de base sur le risque d'infarctus : 10 battements supplémentaires par minute augmenteraient le risque d'accident de 14% [243]. Un cœur qui bat vite est en effet plus susceptible de « fatiguer » avec l'âge, et de subir des défaillances. De plus, une fréquence cardiaque de base élevée est un signe de mauvaise efficacité du cœur, qui doit pomper plus vite le sang pour compenser un volume d'éjection insuffisant.

La longueur de l'intervalle QT est une mesure effectuée sur l'électrocardiogramme. Cette grandeur, explicitée dans le paragraphe « Rythme cardiaque » ci-après, a été inversement corrélée avec le risque d'accident cardio-vasculaire dans les études de Karjalainen *et al.* (2003) [426] et de Robbins *et al.* (1997) [247] (en particulier après correction par rapport à la fréquence de base).

La variabilité du rythme cardiaque représente la capacité du cœur à s'adapter aux différentes étapes d'une journée, que ce soit dans l'alternance activité – repos, ou l'alternance nyctémérale. Cette variabilité doit être élevée pour que le cœur arrive à s'adapter aux besoins de l'organisme, en battant lentement dans les périodes de repos, et en étant capable d'accélérer rapidement en cas d'effort physique. Les marqueurs physiologiques qui permettent d'évaluer cette variabilité ont été inversement corrélés avec le risque d'infarctus dans plusieurs études [277, 384, 481].

II/ L'athérosclérose

Ce chapitre décrit les mécanismes régissant l'athérosclérose, ainsi que l'impact des acides gras alimentaires sur cette pathologie.

Le développement de l'athérosclérose est décrit en quatre étapes, qui sont l'activation inopportune de l'endothélium vasculaire, la multiplication des cellules spumeuses, le développement de la plaque d'athérome proprement dite, et finalement l'obstruction de la lumière vasculaire.

a) Activation de l'endothélium

Comme il a été expliqué dans le chapitre « Le métabolisme des lipides », les LDL sont susceptibles d'être oxydées durant leur séjour dans la circulation sanguine. Les macrophages des parois

vasculaires expriment un récepteur, qui reconnaît spécifiquement ces LDL oxydées, le récepteur *scavenger* de classe A. Ayant capté une particule pathologique, le macrophage quitte la surface de la paroi vasculaire et s'infiltré dans les couches sous-jacentes [60, 157]. Certains macrophages conservent les LDL oxydées dans leur cytoplasme, ils sont alors appelés cellules spumeuses. D'autres macrophages relarguent les LDL dans la paroi, provoquant une inflammation locale (figure B-10) [60, 157].

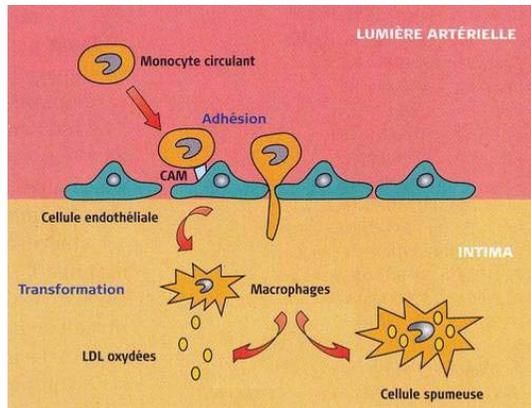


Figure B-10 : Représentation schématique de la constitution des cellules spumeuses [358].

Les monocytes s'infiltrent à travers l'endothélium et se transforment en macrophages qui captent les LDL oxydées, devenant une cellule spumeuse. Certains macrophages, quant à eux, libèrent les LDL oxydées qu'ils contiennent, provoquant une réaction d'inflammation locale.

En temps normal, l'endothélium vasculaire assure différentes fonctions [116]:

- ✓ régulation de la pression artérielle par un équilibre complexe entre synthèse de composés vasodilatateurs (comme l'oxyde nitrique, NO• ou les prostaglandines E₂ et E₃, PGE₂ et PGE₃) et vasoconstricteurs (ex. thromboxane A₂, TxA₂) [2, 116] ;
- ✓ coordination de la contraction des cellules musculaires lisses de la paroi (les muscles lisses, au contraire des muscles striés comme le biceps, ont un contrôle « inconscient ») [116] ;
- ✓ contrôle de la prolifération de ces cellules musculaires [116] ;
- ✓ contrôle de la perméabilité endothéliale (le flux de composés entrant dans les cellules de la paroi) [116] ;
- ✓ contrôle de la coagulation plaquettaire par la synthèse de composés coagulants (TxA₂) ou anticoagulants (PGE₂, PGE₃) [2, 116].

En cas d'invasion bactérienne ou de blessure, l'endothélium est donc capable de réagir, déclenchant la coagulation des plaquettes ou encore une réaction inflammatoire, dont le but est d'attirer les leucocytes nécessaires pour combattre l'attaque microbienne. C'est l'activation de l'endothélium [116].

L'inflammation produite par la présence de LDL oxydées entraîne une activation inopportune de l'endothélium, et le recrutement de monocytes circulants [116]. Ceci se fait par l'intermédiaire de molécules d'adhésion, comme la sélectine et VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*), et de substances chimioattractantes sécrétées par l'endothélium activé [116, 224, 408].

b) Multiplication des cellules spumeuses

Véhiculés par la circulation sanguine, les monocytes s'accrochent faiblement à la sélectine puis, ralentis, ils se rapprochent de l'endothélium (c'est le phénomène de « *rolling* »), où ils sont sensibles aux chimioattractants. Ils interagissent ensuite plus fortement avec VCAM-1, et s'infiltrent dans la paroi artérielle, où ils se différencient en macrophages (figure B-10) [116, 408]. Ceux-ci captent à leur tour une LDL pathologique, et s'infiltrent dans la paroi pour devenir des cellules spumeuses [60, 157].

C'est un cercle vicieux : plus il y a de macrophages dans la paroi, plus l'inflammation s'aggrave ; et plus l'endothélium est attaqué, plus il attire de nouveaux monocytes [116]. Le « dépôt de cholestérol

dans les artères » correspond à ce processus de multiplication des cellules spumeuses, contenant des globules lipidiques essentiellement constitués d'EC et de cholestérol libre, puisque les LDL ne contiennent quasiment plus de TAG [60].

c) Formation de la plaque d'athérome

Les cellules spumeuses forment une strie lipidique, rapidement envahie par des cellules musculaires lisses ayant proliféré de manière anarchique sous l'influence de l'endothélium activé (figure B-11) [60, 116].

Les cellules endothéliales situées dans la strie lipidique produisent du collagène, qui diminue l'élasticité de la paroi et rétrécit la lumière vasculaire [458]. La strie lipidique devient alors une plaque fibreuse. Enfin, du phosphate de calcium peut se déposer sur la lésion, rigidifiant cette plaque fibreuse [60].

L'athérosclérose est cliniquement déclarée à partir du moment où la lumière vasculaire est diminuée par les plaques fibreuses en formation [458].

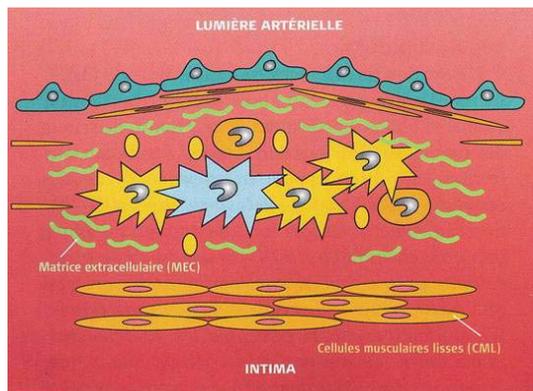


Figure B-11 : Représentation schématique d'une plaque d'athérome adulte [358].

Les cellules spumeuses s'accumulent dans l'intima et forment le centre lipidique de la plaque, entourées par une accumulation de cellules musculaires lisses.

d) Obstruction de la lumière vasculaire

Les plaquettes sanguines augmentent la sévérité de l'athérosclérose par deux mécanismes différents. En effet, identifiant une lésion de l'endothélium à cause des substances inflammatoires produites, elles tendent à cicatrifier la « plaie » en coagulant sur la plaque, ce qui diminue davantage la lumière artérielle [458]. D'autre part, la libération de TxA_2 par l'endothélium activé provoque l'activation des plaquettes et la formation de caillots dans la circulation sanguine [60, 478].

Si le vaisseau concerné est une artère coronaire, le rétrécissement de la lumière vasculaire entraîne la formation d'une zone dite ischémique dans le cœur, c'est-à-dire une zone dans laquelle les cellules ne reçoivent plus suffisamment d'oxygène [34]. Tant que le flot sanguin est seulement diminué, l'ischémie est dite partielle. C'est l'insuffisance cardiaque, ou angine de poitrine, transparente au repos, mais causant des douleurs à l'effort. L'ischémie devient totale quand l'artère est complètement obstruée par les caillots, c'est l'infarctus [34].

Dans le cas d'une artère irrigant le cerveau, une telle obstruction conduit à l'accident vasculaire cérébral [34].

III/ L'accident cardio-vasculaire

Après avoir détaillé le développement de l'athérosclérose, ce chapitre détaille les mécanismes régissant l'accident cardio-vasculaire. En effet, l'accident vasculaire cérébral ne sera pas abordé, étant donné le point de *focus* choisi pour la thèse. Dans un premier temps c'est la contraction des cardio-myocytes qui sera abordée, puis la contraction cardiaque, et enfin l'infarctus.

III. 1) La contraction des cardio-myocytes

Toute cellule est chargée électriquement, car elle contient des ions portant des charges positives ou négatives. D'une manière globale, le cytoplasme des cellules est chargé négativement, le milieu extracellulaire positivement, et la différence de potentiel entre ces deux milieux est appelée potentiel de membrane [285]. Ce potentiel fluctue, en particulier à cause de flux ioniques entre l'extérieur et l'intérieur d'une cellule. Ce sont des canaux ioniques Na^+/K^+ ATP dépendants, qui assurent l'entrée et la sortie des ions dans les cardio-myocytes. Le transport des ions à travers les canaux ioniques nécessite de l'énergie, apportée sous forme d'ATP (adénosine triphosphate) [285].

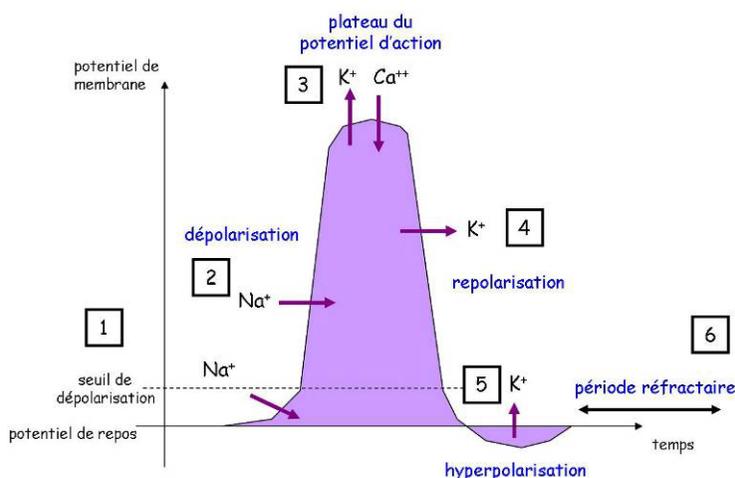


Figure B-12 : Evolution du potentiel de membrane d'un myocyte pendant une contraction [d'après 285].

Symbolisation des flux ioniques : l'aire colorée sous la courbe représente le compartiment intracellulaire, c'est-à-dire qu'une flèche se dirigeant de la zone blanche vers la partie violette symbolise un flux entrant d'ions, et inversement.

1) Le potentiel de membrane atteint le seuil de dépolarisation, 2) La dépolarisation se poursuit, c'est le potentiel d'action, 3) Les flux ioniques engendrent l'apparition d'un plateau, 4) La cellule est repolarisée grâce à un flux sortant de K^+ , 5) Ce flux provoque une légère hyperpolarisation de la cellule, 6) Après un potentiel d'action, les canaux ioniques sont inactivés, et la cellule entre dans une période réfractaire à tout nouveau potentiel d'action.

Un changement du potentiel de membrane peut provoquer la contraction des cardio-myocytes selon l'enchaînement suivant [285] :

- 1) Au repos, le potentiel de membrane des myocytes est de l'ordre de -80mV . Un flux entrant de Na^+ diminue la différence de potentiel avec l'extérieur en dépolarisant la cellule. Le potentiel d'action, et donc la contraction du myocyte, ne se déclenche que si le potentiel de membrane atteint un seuil de dépolarisation (loi du « tout ou rien »).
- 2) Le flux entrant de Na^+ entraîne le dépassement du seuil de dépolarisation. Le potentiel de membrane de la cellule atteint au maximum une valeur de l'ordre de -10mV .
- 3) Un flux sortant de K^+ tend à repolariser la cellule, contré par une entrée de Ca^{++} , qui retarde la repolarisation et crée le plateau du potentiel d'action.
- 4) Le flux entrant de K^+ repolarise finalement le myocyte.
- 5) Il provoque même une légère hyperpolarisation de la cellule par rapport à sa valeur de repos.
- 6) Après un potentiel d'action, les canaux ioniques sont inactivés. Cette période réfractaire empêche une nouvelle contraction trop rapide [285].

III. 2) La contraction du myocarde

La contraction cardiaque est la résultante de la contraction organisée de tous les myocytes.

Pour synchroniser les cardio-myocytes, une partie du cœur, le tissu nodal, assure la transmission du signal électrique [539]. Il est constitué de deux structures nodulaires : le nœud sinusal, ou nœud de Keith et Flack, situé dans l'épaisseur de la paroi de l'oreillette droite, et le nœud auriculo-ventriculaire, ou nœud d'Aschoff-Tawara, situé à l'intersection des oreillettes et des ventricules [539].

C'est le nœud sinusal qui impose la fréquence cardiaque (120 battements/min), mais celle-ci est modulée par l'innervation extrinsèque du myocarde, parasympathique (nerfs vagues droit et gauche, 10^{ème} paire de nerfs crâniens) et sympathique, pour atteindre une valeur moyenne de 70 battements/min [111, 539].

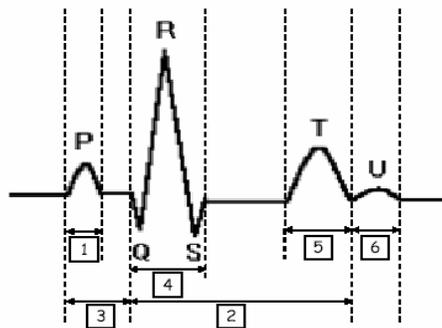


Figure B-13 : Electrocardiogramme schématique [d'après 541].

Légende : 1) onde P, 2) intervalle QT, 3) intervalle PR, 4) complexe QRS, 5) onde T, 6) onde U.

L'électrocardiogramme permet d'illustrer la suite dans le temps des événements constituant la contraction cardiaque [541] :

- 1) L'onde P correspond à la dépolarisation (et la contraction) des oreillettes.
- 2) L'intervalle QT, mesuré du début du QRS à la fin de l'onde T, correspond à l'ensemble de la dépolarisation et de la repolarisation ventriculaire.
- 3) L'intervalle PR est situé entre le début de P et le début du complexe QRS, et représente le temps nécessaire à la transmission de l'influx électrique des oreillettes aux ventricules.
- 4) Le complexe QRS correspond à la dépolarisation (et la contraction) des ventricules. L'onde Q est la première onde négative du complexe, l'onde R la première composante positive, et l'onde S la deuxième négative.
- 5) L'onde T illustre la repolarisation (la relaxation) des ventricules. En remarque, notons que la repolarisation des oreillettes s'effectue pendant le complexe QRS, et est donc masquée par la contraction ventriculaire.
- 6) L'onde U est, quant à elle, mal connue [541].

La fréquence cardiaque résulte de l'équilibre entre innervation sympathique (qui accélère le rythme) et parasympathique (antiarythmique), cette dernière étant estimée par la variabilité cardiaque [277].

III. 3) L'accident ischémique

Si une artère coronaire mineure est bouchée, une petite zone nécrotique se développe, qui ne met pas en danger la vie du patient [34].

Au contraire, trois scénarios peuvent entraîner le décès :

- i) A la périphérie d'une zone ischémique les myocytes sont hyperexcitables [285]. Au moindre stimulus, comme un stress ou un exercice physique violent, la contraction peut se déclencher. Si ces myocytes se contractent à un moment inopportun du cycle cardiaque, le cœur peut passer en fibrillation ventriculaire (suite de contractions incomplètes et très rapprochées). La mort subite induite par l'ischémie survient alors en moins de 3 minutes [34] ;
- ii) Si le nœud sinusal est touché, l'arythmie est inévitable et l'issue est souvent fatale [34] ;
- iii) Si une artère majeure est obstruée, la zone nécrotique est importante, et le cœur trop endommagé ne peut pas continuer à fonctionner [34].

Il est généralement admis que les acides gras estérifiés sur les PL membranaires seraient libérés immédiatement après un infarctus [352, 461]. Cette augmentation du pool cellulaire d'acides gras libres serait en partie responsable de la survenue d'une arythmie consécutive à l'infarctus [352, 461].

Nair *et al.* (1997) [352] ont démontré que la structure de ces acides gras déterminerait la survenue ou non d'une arythmie, les PUFA étant anti-arythmiques.

Remarque : La fibrillation ventriculaire n'est pas uniquement induite par l'ischémie. Elle peut également se déclencher à la suite du rétablissement de la circulation sanguine dans un vaisseau obstrué. Les mécanismes régissant ce dernier type de fibrillation sont différents de ceux impliqués dans le cas de la fibrillation induite par l'ischémie [34].

IV/ Influence de la structure des acides gras

Les PUFA de la famille des *n-3* ont un impact positif observé à chacune des étapes du développement de l'athérosclérose et de la survenue de l'accident cardio-vasculaire, c'est pourquoi la description du rôle des acides gras sur ces pathologies sera centrée sur ces composés.

IV. 1) Oxydation des LDL

L'EPA et le DHA agissent au niveau de la dégradation oxydative des LDL, en augmentant la résistance de ces particules à l'oxydation [157]. Cette action serait principalement due à l'impact des LCPUFA *n-3* sur le pool d'enzymes antioxydantes de l'organisme. En effet, il a été montré chez le rat que l'EPA et le DHA stimulent la synthèse d'enzymes antioxydantes dans le cœur et le foie (superoxyde dismutase [312], catalase [501]). Enfin l'EPA et le DHA augmentent l'activité de ces enzymes chez le rat [435]. Chez l'homme, la consommation de LCPUFA *n-3* diminue la production d'isoprostanes de manière importante (-20% pour une dose de 3,5 g/j), ce qui montre que le statut antioxydant des sujets a été amélioré [342]. Les isoprostanes sont des produits de la dégradation oxydative des PUFA membranaires, que l'on retrouve dans les urines [342]. Cet effet particulier semble malgré tout difficile à atteindre, vu la dose importante d'EPA et de DHA nécessaire pour observer ces résultats. Cependant, il serait intéressant d'étudier l'effet sur le pool d'enzymes antioxydantes, comme cela a été fait chez le rat, car il pourrait probablement être obtenu avec des doses plus faibles d'AG *n-3*.

IV. 2) Inflammation

Comme cela a été décrit dans le chapitre « Structure des lipides », l'ARA est un acide gras *n-6*, précurseur de molécules appelées eicosanoïdes, produites en particulier dans les cellules endothéliales vasculaires [3]. Les eicosanoïdes permettent à l'endothélium d'assurer ses différentes fonctions, et comprennent notamment des leucotriènes et des prostaglandines. Ces composés sont en majorité pro-inflammatoires et procoagulants (figure B-14), propriétés utiles lors d'une infection ou d'une blessure [493].

La même cascade de réactions se produit à partir de l'EPA, aboutissant à des composés similaires, mais avec des effets très différents, souvent antagonistes [493]. Il est donc aisément compréhensible que les eicosanoïdes dérivés de l'EPA soient préférables pour enrayer le déroulement d'une pathologie inflammatoire comme l'athérosclérose.

Les enzymes impliquées dans ces réactions, la lipoxygénase (LOX) et la cyclooxygénase (COX), étant les mêmes quel que soit l'acide gras source, il est aisément compréhensible qu'un excès de l'un des deux conduise à une saturation des enzymes, et donc à une domination des eicosanoïdes dérivés de l'acide gras en question. L'intérêt de la maîtrise du ratio *n-6/n-3* découle en grande partie de ce phénomène [493].

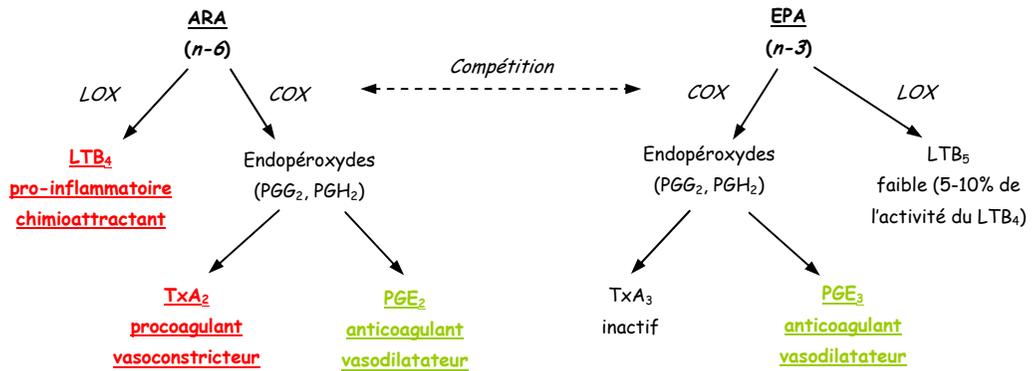


Figure B-14 : Synthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique (gauche) et de l'acide eicosapentaénoïque (droite) [d'après 2, 3, 288].

Abréviations : ARA : acide arachidonique, EPA : acide eicosapentaénoïque, LOX : lipoxygénase ; COX : cyclooxygénase ; LT : leucotriène ; Tx : thromboxane ; PG : prostaglandine.

D'autre part, l'EPA et le DHA inhibent la production de cytokines inflammatoires (composés sécrétés pour activer les cellules avoisinantes) par les cellules endothéliales. Ces molécules peuvent être le TNF- α (*tumor necrosis factor*), l'IL-1 α (interleukine), l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-6 ou encore l'IL-8 [84, 115, 138, 224, 288]. Enfin, la concentration en récepteurs au TNF- α est inversement corrélée avec la consommation de LCPUFA *n-3* [291].

IV. 3) Prolifération des cellules musculaires lisses

Avant de détailler les effets des AG *n-3* sur la prolifération anarchique des cellules musculaires lisses, il semble nécessaire de faire quelques rappels sur le cycle mitotique et les enzymes responsables de l'activation des protéines impliquées.

1) Rappels sur la mitose

Le cycle cellulaire des eucaryotes supérieurs comprend 4 phases (G1, S, G2 et M). Pendant les phases S et M les cellules exécutent les deux phénomènes fondamentaux du cycle, c'est-à-dire la réplication de l'ADN pendant la phase S (synthèse), et le partage égal des chromatides entre les deux cellules filles pendant la phase M (mitose). Les deux autres phases du cycle représentent des intervalles (G pour « gap ») pendant lesquels la cellule se prépare aux phases importantes, et est sensible aux signaux moléculaires, comme les hormones, ou encore les eicosanoïdes [545].

La régulation du cycle est assurée par des kinases cycline-dépendantes (Cdk), qui assurent deux fonctions différentes. D'une part, elles provoquent les événements du cycle en phosphorylant les protéines nécessaires, et, d'autre part, elles permettent à la cellule de progresser dans le cycle en passant les points de contrôle entre les phases [545].

Les Cdk ne deviennent fonctionnelles que lorsqu'elles forment un complexe avec une cycline. C'est le complexe entier qui assure la phosphorylation de protéines nécessaires à la réalisation des événements du cycle mitotique (figure B-15) [545].

2) Influence de l'EPA et du DHA

L'EPA diminue la prolifération anarchique des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle en inhibant de manière importante l'activité du complexe Cdk 2/Cycline E [354, 482]. Les cellules sont bloquées au niveau de la phase G1 du cycle, et n'atteignent pas la phase S (figure B-15). Plus précisément, l'EPA agirait au niveau de la production de l'ARNm de la Cdk 2 [482].

Selon les auteurs, le DHA est soit moins actif que l'EPA [482], soit complètement inactif [354]. Il existe par contre un consensus entre ces deux équipes selon lequel les acides OA, LA et ARA sont inactifs vis-à-vis de ces phénomènes [354, 482].

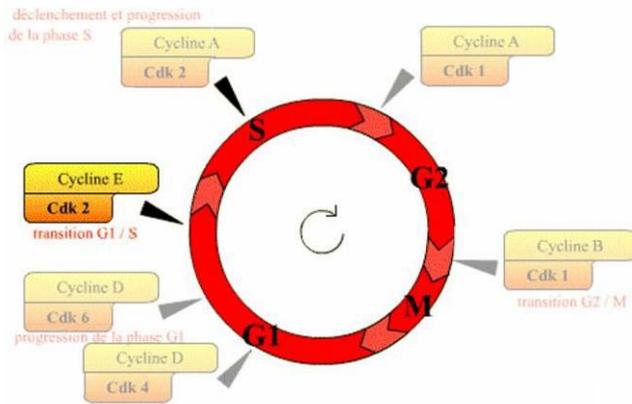


Figure B-15 : Intervention de la kinase cycline-dépendante 2 pendant le cycle mitotique [d'après 545].

Abréviations : Cdk : kinase cycline-dépendante, G1 et G2 : phases de transition, S : phase de synthèse de l'ADN, M : phase de séparation des deux cellules filles.

La Cdk 2 intervient dans la transition de la phase G1 à la phase S de réplication des chromosomes, ainsi que pendant cette dernière phase. Ces deux interventions nécessitent la formation d'un complexe cycline-CdK avec des cyclines différentes selon la phase du cycle.

Cette action de l'EPA semble ne se produire que dans le cas de cellules en état de multiplication anarchique, et non dans des cellules en cours de division cellulaire normale. Les facteurs permettant cette régulation ne sont pas encore connus, et leur identification permettra vraisemblablement de progresser dans la compréhension de l'impact de l'EPA sur le cycle cellulaire.

IV. 4) Sécrétion de molécules d'adhésion

L'effet des AG *n-3* sur la sécrétion de molécules d'adhésion (VCAM-1 et sélectine) n'est pas le même selon l'acide gras considéré. En effet, si un consensus reconnaît clairement l'action positive du DHA sur l'expression de VCAM-1 [114, 115, 288, 509] et de la sélectine [114], le cas de l'EPA est moins clair, étant donné le manque de résultats *in vivo*. Des études sur modèles cellulaires ont en effet montré des effets positifs [114] ou neutres [509] de l'EPA sur l'expression de VCAM-1, tandis que les études sur l'animal ou l'homme n'ont pas testé ce composé seul. Concernant l'ALA, deux études, l'une chez l'homme, l'autre en culture cellulaire, ont montré un effet bénéfique sur l'expression de VCAM-1 [114, 408]. Les autres études citées ci-dessus n'ont pas testé cet acide gras.

Quoi qu'il en soit, l'action du DHA a été décrite en détail, et il a été démontré que cet acide gras agit indépendamment de la production d'eicosanoïdes, car le blocage de la COX n'a pas restauré l'expression de VCAM-1 et de la sélectine [114]. Le DHA aurait un effet spécifique sur l'expression de VCAM-1, au niveau pré-transcriptionnel [114], en bloquant l'activation du facteur de transcription NF- κ B [115, 509] :

- En cas d'inflammation, les cellules endothéliales sécrètent du TNF- α , qui stimule une enzyme (la PC-phospholipase spécifique C, ou PC-PLC) ;
- Celle-ci dégrade les PC membranaires pour donner des diacylglycérols ;
- Ces composés activent, à leur tour, le NF- κ B, qui se fixe sur le gène codant VCAM-1, provoquant son expression et donc la synthèse de la molécule d'adhésion [509] ;
- Le DHA, apporté aux cellules endothéliales par les lipoprotéines, s'incorpore dans les PL membranaires, dont les PC ;
- Quand la PC-PLC libère des diacylglycérols contenant du DHA, cette suite de réaction n'a pas lieu [115, 509].

Remarque : l'effet des PUFA de la famille *n-6* n'est pas beaucoup plus clair que celui de l'EPA. Le LA, comme l'ALA, a montré des effets positifs chez l'homme et sur un modèle cellulaire [114, 408], tandis que l'ARA aurait des effets positifs [114] ou neutres [509], sur modèles cellulaires.

La conclusion la plus prudente, à l'heure actuelle, est que le DHA inhibe l'expression des molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement des monocytes, que l'ALA et le LA sont peut-être actifs, tandis que leur produit d'élongation respectif (EPA et ARA) est plus incertain.

IV. 5) Coagulation

La cascade de réactions aboutissant à la coagulation est représentée dans la figure B-16. Pour résumer, la fibrine, issue du fibrinogène, est responsable de la formation de caillots, tandis que la plasmine, issue du plasminogène, lyse la fibrine, détruisant les caillots. L'équilibre entre ces deux composés régit l'équilibre de la coagulation dans l'organisme.

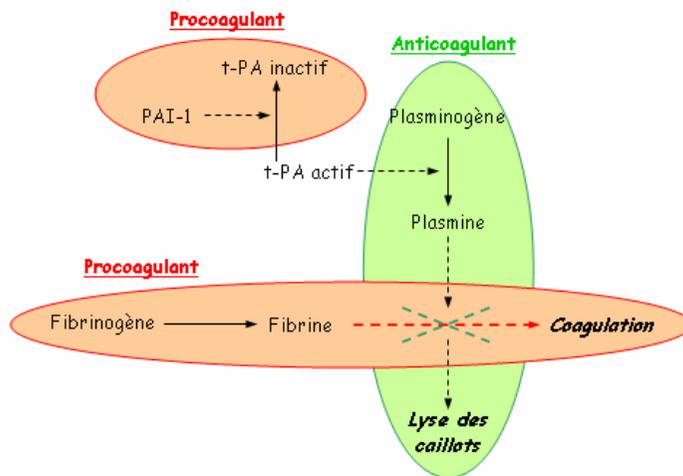


Figure B-16 : Cascade de réactions aboutissant à la coagulation. Mise en évidence des composés à tendance procoagulante et anticoagulante [d'après 160, 213, 363].

Abréviations : PAI-1 : inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 ; t-PA : activateur du plasminogène tissulaire.

Symboles : : flèche pleine : « se transforme en » ; flèche pointillée : « agit sur », zones rouges : cascade de réactions menant à la coagulation, zones vertes : cascade de réactions menant à la fibrinolyse.

Il a été prouvé que les synthèses de fibrinogène et d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) sont atténuées en présence d'EPA [160, 320, 363, 403, 446] et de DHA [213, 446]. Ceci a pour conséquence de stimuler la lyse de la fibrine, et donc de dégrader les caillots formés. De plus, une augmentation significative de l'activité fibrinolytique a été observée chez des patients recevant soit un régime à base de poisson (0,6 g EPA+DHA/jour), soit un régime à base de poisson supplémenté en huile de poisson (2 g EPA+DHA/jour) [62]. Une dose raisonnable de LCPUFA *n*-3 est donc suffisante pour provoquer un effet sur la coagulation sanguine.

Les eicosanoïdes formés à partir de l'EPA agissent également sur la coagulation, la PGI₃ (prostacycline) procoagulante produite à partir de l'EPA ayant une activité beaucoup plus faible que la PGI₂ produite à partir des acides gras de la série *n*-6. Le DHA agit également sur la coagulation, car sa rétroconversion en EPA dans l'organisme permet d'assurer cette chaîne de réaction même en l'absence d'EPA dans la ration alimentaire [41, 493, 510].

Mais l'EPA et le DHA ont d'autres effets sur les eicosanoïdes procoagulants. Le DHA inhibe la synthèse du TxA₂, et avec l'EPA ils bloquent l'activation des plaquettes en étant antagonistes du TxA₂ sur ses récepteurs plaquettaires spécifiques [3, 478, 510].

Un exemple clinique concret de ces actions est la diminution du nombre d'occlusions vasculaires chez les patients ayant subi un pontage, et étant consommateurs d'EPA et de DHA [141]. Le pontage coronarien est une opération chirurgicale permettant de court-circuiter une portion d'une artère coronaire, dont la lumière est diminuée de manière trop importante par une plaque d'athérome. Après l'intervention, les patients sont en général placés sous traitement anticoagulant, de manière à éviter une occlusion de la zone traitée. La supplémentation en LCPUFA *n*-3 a permis de diminuer le risque d'apparition de ces complications en augmentant le statut anticoagulant du patient [141].

IV. 6) Hypertension

La régulation de la pression artérielle est en majeure partie effectuée grâce à l'équilibre entre un composé vasodilatateur, la bradykinine, et un composé vasoconstricteur, l'angiotensine II. La production de ces composés est représentée schématiquement dans la figure B-17.

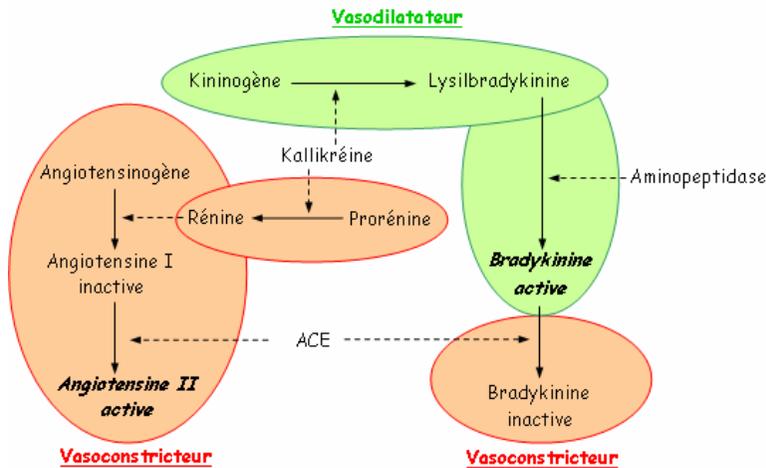


Figure B-17 : Systèmes rénine-angiotensine et kinine-kallicréine [d'après 152 et 420].

Abréviation : ACE : angiotensin converting enzyme, ou enzyme de conversion.

Symboles : : flèche pleine : « se transforme en » ; flèche pointillée : « agit sur », zones rouges : cascade de réactions menant à la coagulation, zones vertes : cascade de réactions menant à la fibrinolyse.

Les deux systèmes rénine-angiotensine et kinine-kallicréine sont intimement liés, puisque l'enzyme qui assure la synthèse de l'angiotensine II et la dégradation de la bradykinine est la même, appelée enzyme de conversion (ACE) [152]. D'autres molécules participent également à la régulation de la pression artérielle, en particulier celles sécrétées par l'endothélium vasculaire, comme le radical NO• (cf. paragraphe « L'athérosclérose »).

Remarque : Le tissu adipeux est un organe qui possède un système rénine-angiotensine, et qui produit donc de l'angiotensine II, responsable de « l'hypertension induite par l'obésité » [139, 323]. Ces deux facteurs de risque se retrouvent donc associés chez les patients en surpoids : une perte de poids pouvant faire baisser leur tension artérielle, et une baisse de tension occasionnée par exemple par une intervention nutritionnelle (AG *n*-3) pouvant contrecarrer une des conséquences délétères du surpoids.

Le DHA semble être le seul PUFA capable de diminuer la tension artérielle, que ce soit chez des patients sains ou hypertendus [110, 127, 311, 341, 400, 490, 502]. Ce phénomène serait dû à une stimulation de la production de radicaux NO• ou encore à une modification de la perception du signal adrénergique (composante cardiaque de la régulation de la pression artérielle) [188, 370].

IV. 7) Fréquence cardiaque

L'impact des PUFA *n*-3 sur la fréquence cardiaque s'exerce à plusieurs niveaux, que ce soit moléculaire avec les canaux ioniques, ou macroscopique avec la fréquence cardiaque de base.

a) Effet sur les canaux ioniques des cardio-myocytes

L'EPA et le DHA augmentent la période réfractaire des canaux Na⁺/K⁺, en les bloquant en position inactivée, et en allongeant leur cinétique de retour à l'état excitable [47, 523, 524].

D'autre part, les LCPUFA *n*-3 rendent les myocytes plus résistants aux perturbations [242], en amplifiant l'hyperpolarisation des cellules, éloignant le potentiel de membrane du seuil d'induction d'un potentiel d'action [289, 523, 524]. Ils évitent ainsi l'apparition de la fibrillation ventriculaire à la suite d'un léger stress, le stimulus devant être plus important pour déclencher la fibrillation.

Xiao *et al.* (1995 et 1998) [523, 524] ont montré que les acides gras doivent être sous forme non estérifiée pour agir sur les cardio-myocytes. Ceci est cohérent avec les observations de Nair *et al.* (1997) [352], selon lesquelles la nature des acides gras des PL membranaires libérés immédiatement après un infarctus détermine la survenue ou non d'une arythmie induite par l'ischémie [352].

b) Effet sur la fréquence cardiaque

Le DHA tend à diminuer la fréquence cardiaque de base, c'est-à-dire à augmenter l'intervalle entre deux potentiels d'action, que ce soit chez l'homme [110, 341], le chien [47], ou même dans le cas de cultures de cardio-myocytes de rats [242]. L'EPA montre le même type d'effet [47, 110, 242], mais il n'y a pas de consensus dans toutes les études [341].

De plus, la concentration en DHA dans l'organisme (tissu adipeux ou cellules circulantes) a été positivement corrélée avec la variabilité cardiaque, montrant un effet protecteur de cet AG *n-3* contre les accidents cardio-vasculaires [90-93]. L'effet de l'EPA sur ce paramètre semble plus incertain [90-93].

c) Effet sur les événements arythmiques graves

Une analyse supplémentaire des résultats de l'étude GISSI (supplémentation de 0,85g d'EPA+DHA sous forme d'esters éthyliques en gélule en prévention secondaire de l'infarctus) a montré que la protection contre la mort subite induite par la supplémentation en EPA et DHA était plus marquée chez les patients atteints d'un dysfonctionnement de la systole du ventricule gauche [314]. Cette anomalie est détectée par la mesure du volume d'éjection du ventricule gauche lors de sa contraction. En effet, si le ventricule a des difficultés à se contracter, donc si sa fraction d'éjection est diminuée, il est d'autant plus susceptible de partir en fibrillation lors d'un infarctus. Cette déficience serait liée à un trouble de la conduction du signal de contraction dans le ventricule [314]. Les LCPUFA *n-3* semblent agir plus particulièrement sur ces ventricules pathologiques, ce qui renforce l'idée d'une action de ces acides gras sur la conduction du signal électrique dans le coeur.

Raitt *et al.* (2005) [405] ont étudié l'effet d'une supplémentation en EPA et DHA chez des patients atteints d'arythmie ventriculaire, et possédant un défibrillateur implanté. Ils ont montré que cette supplémentation n'a pas diminué l'occurrence des épisodes arythmiques. Ceci a permis de préciser l'action des LCPUFA *n-3*. En effet, les mécanismes régissant l'arythmie chronique et l'arythmie induite par un événement vasculaire sont vraisemblablement différents, et les AG *n-3* n'agiraient que sur cette dernière.

Plus précisément, deux types d'événements vasculaires peuvent déclencher une fibrillation ventriculaire. Le premier type est l'ischémie (manque d'approvisionnement en oxygène des cardio-myocytes), décrite plus haut dans le paragraphe « Accident cardio-vasculaire », le second étant l'occlusion-reperfusion (occlusion temporaire d'un vaisseau puis dégagement du caillot qui obstrue le flot sanguin et rétablissement de la circulation). Les AG *n-3* ont montré un effet protecteur contre ces deux types de fibrillations ventriculaires [47, 48, 285, 324, 330-332], tandis que les acides gras *n-6* ont montré une légère protection contre la fibrillation induite par l'ischémie [48, 285, 331], mais pas contre celle induite par l'occlusion-reperfusion [47, 330, 332].

IV. 8) Accident cardio-vasculaire

Il y a actuellement dans la communauté scientifique un consensus sur l'action positive des LCPUFA *n-3* contre le décès cardio-vasculaire, en particulier contre la mort subite induite par l'ischémie (infarctus fatal) [19, 69, 112, 166, 167, 209, 265, 314, 431, 464, 467, 513]. Il n'y aurait, par contre, pas d'effet sur l'infarctus non fatal [166, 523, 524]. Ceci plaide en faveur de l'hypothèse développée dans le paragraphe précédent, selon laquelle les AG *n-3* agiraient sur l'arythmie induite par l'ischémie. Dans ce cas, c'est l'issue fatale de l'infarctus qui est évitée, et non l'apparition de l'infarctus lui-même.

Le tableau B-III récapitule les risques relatifs calculés dans plusieurs études ayant mesuré l'impact de la consommation d'EPA et de DHA sur la survenue d'accidents cardio-vasculaires. Ces valeurs représentent la différence d'accidents observée dans un groupe consommateur d'AG *n-3* par rapport à un groupe contrôle (risque ramené à 1). Une valeur inférieure à 1 montre une diminution du risque d'accident, tandis qu'une valeur supérieure à 1 montre un risque accru.

Tableau B-III : Risque relatif d'accidents cardio-vasculaires dans les études ayant observé l'effet de la consommation d'acides gras n-3 à longue chaîne (en supplémentation ou par apport alimentaire).

Abréviation : Accident CV : accidents cardio-vasculaires totaux.

Symbole : * : estimation de la consommation de n-3 par rapport à la consommation de poisson.

Etude	LCPUFA n-3 (g/jour)	End point	Risque relatif
GISSI [166, 167, 314]	0,86 g/j	Accident CV	0,70
		Infarctus fatal	0,65
Singh <i>et al.</i> [464]	1,8 g/j	Accident CV	0,70
Daviglius <i>et al.</i> [112]	>0,33 g/j *	Accident CV	0,62
		Infarctus fatal	0,56
Siscovick <i>et al.</i> [467]	0,2 g/j *	Infarctus fatal	0,50
Hu <i>et al.</i> [209]	0,67 g/j *	Accident CV	0,68
Rodriguez <i>et al.</i> [431]	>0,4 g/j *	Accident CV	0,50
Kromhout <i>et al.</i> [265]	0,35 g/j *	Accident CV	0,46
Albert <i>et al.</i> [18, 19]	0,3 g/j *	Accident CV	0,80
		Infarctus fatal	0,47
Yuan <i>et al.</i> [534]	>0,2 g/j *	Accident CV	0,43
Kromhout <i>et al.</i> [266]	0,23 g/j *	Accident CV	0,51

Ces résultats montrent que de faibles doses d'acides gras n-3 confèrent une protection contre les accidents cardio-vasculaires, en particulier contre l'infarctus fatal.

La figure B-18 de la page suivante présente l'évolution du risque relatif de mort subite induite par l'ischémie en fonction de la dose de LCPUFA n-3 ingérée.

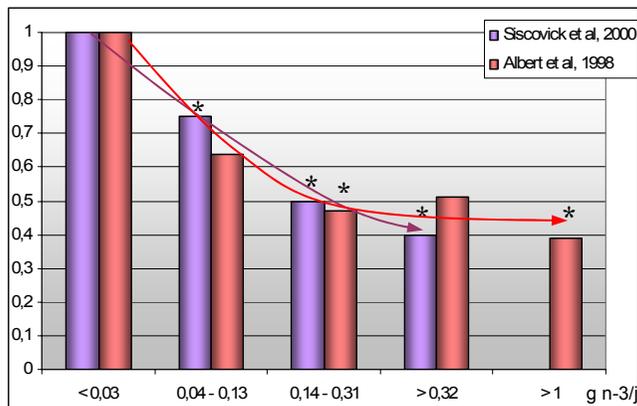


Figure B-18 : Risque relatif de mort subite, ajusté pour les facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires, en fonction de la consommation journalière de LCPUFA n-3 (environ 10⁵ person-years) [d'après 19, 467].

Symbole : * : significativement différent de la référence (risque = 1).

L'effet dose ne semble pas linéaire, comme le montre la figure B-18. En effet, la diminution du risque relatif tend à stagner quand la dose journalière d'AG n-3 est fortement augmentée. Ceci est particulièrement visible dans l'étude de Albert *et al.* (1998) [19] (barres roses), où le risque relatif des trois derniers quintiles de consommation d'AG n-3 n'évolue pas.

La même observation peut être faite à propos des accidents cardio-vasculaires fatals totaux (figure B-19).

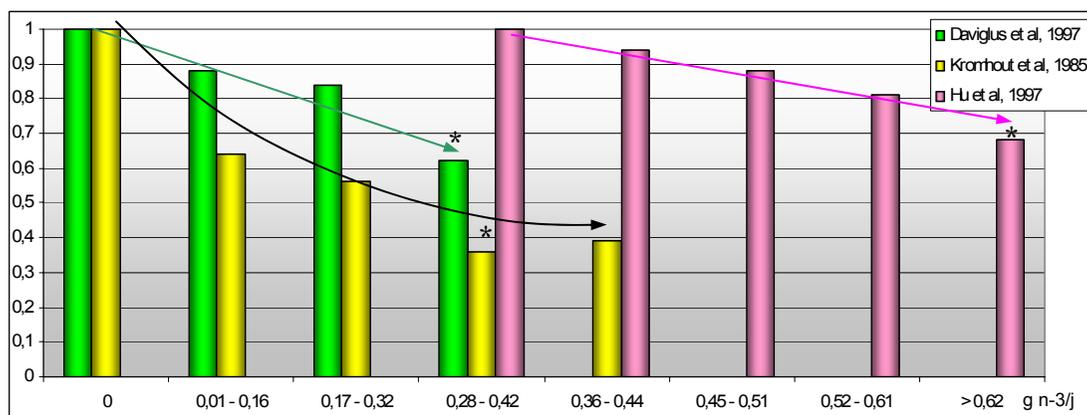


Figure B-19 : Risque relatif d'accident cardio-vasculaire fatal, ajusté pour les facteurs de risque classiques, en fonction de la consommation journalière de LCPUFA n-3 (environ $1,2 \cdot 10^6$ person-years) [d'après 112, 209, 265].

Symbole : * : significativement différent de la référence (risque = 1).

Les données illustrées dans la figure B-19 montrent qu'augmenter la dose d'AG n-3 de 0 à 0,3-0,4 g/j permet de diminuer le risque de 40 à 60%, tandis que l'augmenter de 0,3-0,4 à 0,6 g/j ne fait gagner que 15% supplémentaires [112, 209, 265].

Sachant qu'une dose de 0,3-0,4 g/j correspond environ à 1,5-2 repas de poisson gras par semaine [5, 71, 85, 130, 170, 215, 313, 429, 454, 475, 530], il paraît important de commencer par renforcer les messages visant à faire augmenter la consommation de poissons gras avant de soumettre les patients à risque à une médication systématique.

Réaliser des études comme celles-ci est une tâche difficile, comme toutes les études d'intervention nutritionnelle. En effet :

- i) En dehors de quelques cas particuliers, les régimes alimentaires d'une population sont hétérogènes. Ils sont évalués à l'aide de questionnaires, parfois complétés par des entretiens avec des diététiciennes ou des médecins, ce qui induit un biais indéniable par rapport à une évaluation objective des prises alimentaires ;
- ii) Le régime alimentaire des personnes incluses dans l'étude peut varier avec le temps, en particulier dans les études longues (plusieurs années) ;
- iii) Les questionnaires sont rarement assez détaillés. Souvent les enquêtes n'indiquent que la fréquence de consommation de poisson, alors que le paramètre principal devrait être la quantité de LCPUFA n-3, puisque tous les poissons ne sont pas équivalents (en taux de lipides d'une part, en concentration en AG n-3 d'autre part). Un moyen de pallier à ceci est la mesure de paramètres biologiques de biodisponibilité, mais les études les incluant sont rares ;
- iv) Le reste du régime peut grandement influencer le résultat d'une étude, que ce soit au niveau de la consommation d'AG n-6, d'antioxydants, de fibres, ou encore de SFA.

Malgré ces difficultés, qui peuvent permettre d'expliquer la disparité des résultats de certaines études cliniques, la communauté scientifique soutient tout de même le consensus selon lequel les LCPUFA n-3 ont des effets bénéfiques dans la prévention des accidents cardio-vasculaires fatals.

IV. 9) Le rôle particulier du précurseur

Deux écoles existent à l'heure actuelle dans la communauté scientifique concernant l'effet des AG n-3 sur le système cardio-vasculaire. Certains auteurs font la promotion de l'ALA, le précurseur de la famille, présent dans les huiles végétales, tandis que les autres revendiquent au contraire un effet supérieur des dérivés à longue chaîne, EPA et DHA, apportés par les huiles de poissons et crustacés. La partie précédente montre toutefois que l'EPA et le DHA semblent plus efficaces que le précurseur sur tous les facteurs de risque et mécanismes étudiés.

La UK food standard agency a publié en 2002 un rapport intitulé « Alpha-linolenic acid workshop report » [443]. Leur conclusion est que peu d'effets comparables à ceux de l'EPA et du DHA ont été

démontrés pour l'ALA, et que dans ces quelques cas les doses (10, 15, voire 20 g/j !) sont bien au-delà des recommandations nutritionnelles (2 g/j en France, [287]).

Les études les plus souvent citées pour illustrer l'effet de l'ALA sur les accidents cardio-vasculaires sont les études de de Lorgeril *et al.* (1999) [117] et de Singh *et al.* (1992 et 2002) [463, 465]. Dans la première les auteurs ont montré une diminution spectaculaire des accidents cardiaques dans le groupe d'intervention (margarine au colza). Cependant, il est nécessaire de préciser que le groupe test mangeait un régime de type méditerranéen en plus de la supplémentation. Il paraît donc ambitieux de conclure que les bénéfices observés aient été entièrement dus à l'ALA. De la même manière, les études indiennes ont étudié la consommation d'ALA en plus du passage à un régime type méditerranéen. Une autre étude d'intervention a comparé l'effet de l'ALA contre celui de l'EPA et du DHA [519]. Le premier a montré une baisse des TAGp, mais également une baisse du HDL-cholestérol, alors que les LCPUFA *n-3* ont entraîné une diminution des TAGp, mais une augmentation du HDL-cholestérol et un changement de taille des particules de LDL-cholestérol (diminution des particules petites et denses, considérées comme étant les plus athérogènes).

Concernant les études d'observation, les résultats sont divergents. En effet, autant les auteurs de la *Nurses' Health Study* voient une diminution du risque d'infarctus fatal dans le groupe qui consomme le plus d'ALA [210], autant les auteurs de la *Zutphen Study* (une partie de l'étude des 7 Pays) ne trouvent pas d'association entre consommation du précurseur et risque d'accident cardio-vasculaire [376].

Une méta-analyse publiée en 2006 [511] a étudié l'impact de l'ALA sur plusieurs facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires. Cet article montre une faible diminution du taux de fibrinogène plasmatique, mais aucun autre changement (TAGp sanguins, HDL- ou LDL-cholestérol, pression artérielle). Leur conclusion est que la supplémentation en ALA ne peut pas, à elle seule, être recommandée dans la prévention des maladies cardio-vasculaires.

Rappelons enfin que la conversion de l'ALA en EPA et DHA dans l'organisme humain n'est pas efficace, et qu'elle a été estimée à moins de 10% pour l'EPA [66-68, 333], et à moins de 5% pour le DHA [57, 67, 68, 102].

Au regard de toutes ces informations, deux remarques ressortent concernant la formulation d'un corps gras à visée préventive contre les pathologies cardio-vasculaires :

- i) la supplémentation en EPA et DHA paraît inévitable ;
- ii) le précurseur doit également être apporté, du fait du déficit dans les apports de la population française, et de l'importance du ratio *n-6/n-3*, mais ce n'est pas cet acide gras qui assurera les effets physiologiques recherchés.

Protection des corps gras

OXYDATION ET ANTIOXYDANTS

Après avoir présenté dans la première partie du manuscrit les lipides alimentaires et leur impact sur le métabolisme des lipides et les pathologies associées, cette deuxième partie aborde le thème de la protection des corps gras. Dans ce premier chapitre, c'est l'oxydation et les antioxydants qui sont présentés, le chapitre suivant traite de la microencapsulation, et enfin le dernier chapitre présente la technologie des liposomes.

La peroxydation lipidique est un phénomène général, qui se produit dès l'introduction d'oxygène dans un milieu lipidique. Tous les lipides contenant des acides gras insaturés sont concernés, que ce soit dans des produits alimentaires ou *in vivo* (membranes cellulaires, lipoprotéines...).

In vitro, l'oxydation des lipides dans les aliments pose de sérieux problèmes pour l'industrie alimentaire, qui utilise des acides gras de plus en plus insaturés (familles *n-6* et *n-3*). L'oxydation des lipides alimentaires entraîne des altérations qualitatives (rancissement), nutritionnelles (perte d'acides gras essentiels, de vitamines), voire même une toxicité due aux produits issus de ces réactions (peroxydes, aldéhydes...) [15, 98, 395].

In vivo, la peroxydation lipidique est un phénomène également très important, comme expliqué dans le chapitre « Pathologies liées au métabolisme des lipides ». En effet, les LDL oxydées, comme détaillé précédemment, conduisent au développement des plaques d'athérome dans les parois vasculaires. De plus, l'oxydation des acides gras des membranes cellulaires altère leur fonctionnalité, modifiant leur perméabilité, leur fluidité, l'activité de leurs enzymes et récepteurs [98]. Enfin, de nombreuses autres pathologies ont été associées à la peroxydation des lipides. C'est le cas des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson), du diabète, des cancers, des maladies inflammatoires, du vieillissement... [98].

Dans ce chapitre sont présentés les mécanismes de l'oxydation des lipides, ainsi que les différents types d'antioxydants et leur mode d'action, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

I/ Mécanisme général de l'oxydation

Trois types d'oxydation peuvent être observés, selon les conditions et la composition de la matrice alimentaire : peroxydation due à l'oxygène triplet (ou autoxydation), peroxydation due à l'oxygène singulet, et oxydation enzymatique [15, 98, 395]. Ici ne seront présentées que les oxydations dues à l'oxygène, puisque ce sont elles qui concernent le type de produit alimentaire choisi.

La peroxydation est une réaction directe de l'oxygène moléculaire avec des composés organiques. Dans le cas des acides gras insaturés, l'oxygène se fixe sur les doubles liaisons pour donner des hydroperoxydes [98, 395].

L'oxygène moléculaire est une espèce chimique avec deux électrons non appariés à l'état fondamental, dit état triplet ($^3\text{O}_2$). L'oxydation directe des acides gras insaturés par $^3\text{O}_2$ nécessite une étape d'initiation par des radicaux libres, pour permettre la fixation de l'oxygène sur les acides gras.

L'oxygène peut également exister sous une forme beaucoup plus réactive, correspondant à l'état excité, appelé oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) [98, 395]. A la différence de l'oxygène triplet, l'oxygène singulet se fixe directement sur les doubles liaisons pour former des hydroperoxydes. L'oxygène singulet est produit lors d'une réaction avec une molécule photosensible, sous l'excitation de photons [395].

On distingue trois étapes dans le mécanisme de l'oxydation des lipides :

☞ **L'initiation**, qui à partir d'acides gras insaturés conduit à la formation de radicaux libres ou de peroxydes lipidiques. Cette réaction, qui a une énergie d'activation élevée, est favorisée non seulement par des températures élevées mais surtout par la lumière et par les traces de certains métaux. Lorsque la teneur en peroxydes s'accroît, on observe l'initiation dite secondaire qui résulte essentiellement de la décomposition des peroxydes en radicaux peroxy (figures B-20 et B-21) [15, 395]. Dans le cas de la peroxydation par l'oxygène triplet, l'étape d'initiation peut s'effectuer sous l'impulsion de la chaleur, ou de traces de métaux de transition. Dans le cas de la peroxydation par

l'oxygène singulet, cette étape fait intervenir un photosensibilisateur, qui passe à l'état excité sous l'effet des photons, et excite à son tour l'oxygène [494].

☞ **La propagation**, qui est une réaction en chaîne lors de laquelle les radicaux peroxy captent un hydrogène d'un autre lipide insaturé pour redevenir des peroxydes (l'autre lipide devenant à son tour radicalaire). L'énergie d'activation de cette réaction est très faible (figures B-20 et B-21) [15, 395].

☞ **La terminaison**, au cours de laquelle les radicaux libres s'associent pour donner des composés non radicalaires très divers [15, 395].

Les figures B-20 et B-21 présentent le mécanisme général de l'oxydation, dans le premier cas induite par l'oxygène triplet, et dans le second, induite par l'oxygène singulet.

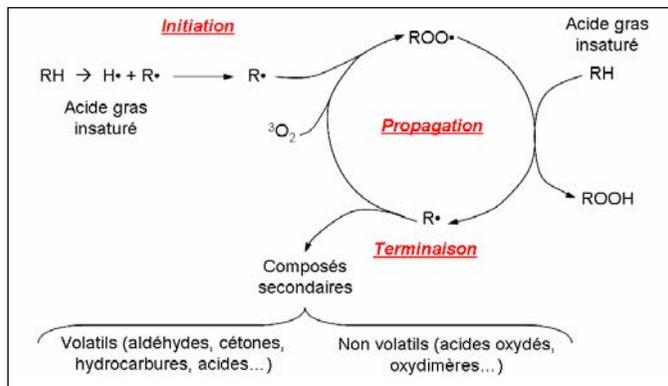


Figure B-20 : Mécanisme de la peroxydation induite par l'oxygène triplet [d'après 395].

Abréviations : RH : acide gras insaturé, R• : radical alkyl, ROO• : radical peroxy, ROOH : hydroperoxyde.

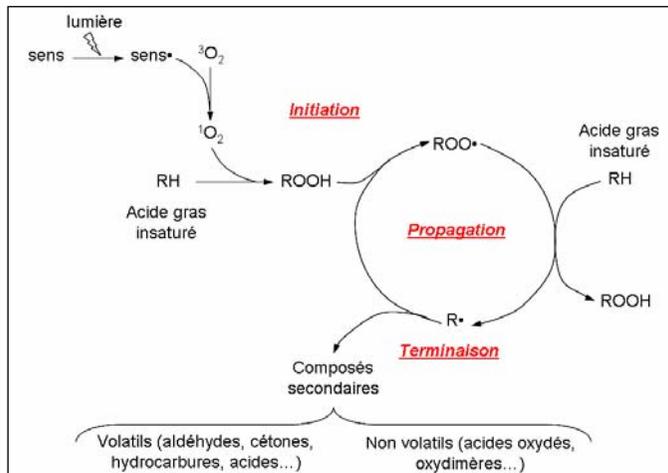


Figure B-21 : Mécanisme de la peroxydation induite par l'oxygène singulet [d'après 395, 494].

Abréviations : sens : photosensibilisateur, sens• : photosensibilisateur radicalaire, RH : acide gras insaturé, R• : radical alkyl, ROO• : radical peroxy, ROOH : hydroperoxyde.

Les PUFA sont d'autant plus oxydables qu'ils possèdent de nombreuses doubles liaisons. Pour une même longueur de chaîne carbonée, si la vitesse d'oxydation du monoinsaturé est fixée à 1, celle du di-insaturé sera de 10, et celle du tri-insaturé de 200 [395]. De même, les deux types de peroxydations ne sont pas équivalents en ce qui concerne la vitesse de la réaction. En effet, la peroxydation induite par l'oxygène singulet est en général 1000 fois plus rapide que l'autoxydation [494].

Les réactions d'oxydation donnent naissance à de nombreux composés. Les composés primaires sont les hydroperoxydes formés lors de l'initiation et de la propagation de la réaction, et les composés secondaires sont des produits de dégradation des hydroperoxydes [15, 98, 395]. Ce sont des molécules volatiles, généralement issues du clivage de la double liaison adjacente au groupement peroxy des

hydroperoxydes [395]. En premier lieu, il convient de citer les aldéhydes et cétones de faible poids moléculaire, qui sont responsables de la dégradation organoleptique du produit, car très volatils [15]. Cette odeur typique, de « rance » ou « d'oxydé », est la première altération qui se manifeste dans un corps gras. Certains de ces composés volatils (hexanal, 2-decenal, ...) sont perçus à des concentrations très faibles, de l'ordre du microgramme par kilo (ppb, 10⁻⁹) [15].

A titre d'exemple, le tableau B-IV présente les seuils de perception de quelques composés volatils produits lors de l'oxydation des lipides.

Tableau B-IV : Seuil de perception de quelques composés volatils secondaires de l'oxydation des lipides [d'après 388].

Composé volatil	Seuil de perception (ppb)
Hexanal	60
Z-4-heptenal	0,5
E,Z-2,4-decadienal	100
1-penten-3-one	3

L'oxydation des lipides entraîne également des pertes d'activité vitaminique, de couleur ou d'arôme, et enfin la dégradation oxydative des acides gras essentiels provoque une diminution de la valeur nutritive des produits alimentaires oxydés [15, 98].

II/ Evaluation de l'oxydation

Différentes méthodes permettent d'évaluer l'oxydation d'un produit alimentaire. La plupart sont des mesures « instantanées », qui donnent une information sur l'état du produit au jour de l'analyse. C'est le cas par exemple de la mesure de l'indice de peroxyde (IP), de l'indice de para-anisidine (IpA), de l'indice Totox, ou encore du taux de substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBARs). Néanmoins, il existe également des méthodes de vieillissement accéléré, qui donnent une estimation du comportement du produit lors de son vieillissement, ou de la résistance du produit à l'oxydation. Plusieurs protocoles existent, parmi lesquels la méthode Rancimat, qui est décrite dans le paragraphe II.2) [387].

II. 1) Méthodes instantanées

1) Indice de peroxyde

Les hydroperoxydes sont les premiers composés formés lors de l'oxydation des lipides, ensuite dégradés en produits secondaires volatils. L'IP permet de mesurer la concentration des hydroperoxydes, c'est donc un critère très utile pour apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative [387].

Par définition, l'IP est le nombre de microgrammes d'oxygène actif du peroxyde contenu dans 1 g de corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode [234, 387]. L'iode libéré est dosé par thiosulfate de sodium, l'empois d'amidon étant utilisé comme indicateur coloré. Cet indice est exprimé en milliéquivalents d'oxygène actif par gramme de corps gras à partir de la valeur massique obtenue par le dosage selon l'équation suivante [387] :

$$IP = \frac{1}{8} * IPm$$

Avec IP : indice de peroxyde (mEq/g)

IPm : indice de peroxyde (µg/g)

La détermination de l'IP est un moyen fiable pour prédire la détérioration des qualités organoleptiques d'un corps gras, puisqu'elle permet de doser les précurseurs des composés volatils, en particulier au cours du stockage à température modérée. En effet, lors d'un chauffage, l'oxydation des lipides est accélérée, et les hydroperoxydes sont dégradés en composés secondaires très rapidement. Il est donc très difficile de les doser dans ce cas.

L'IP ne permet pas d'évaluer le passé oxydatif d'une huile, puisque cette grandeur atteint un maximum au cours de l'oxydation pour diminuer par la suite, quand les peroxydes produits au cours

de la propagation de l'oxydation sont dégradés en composés secondaires [395]. Une huile ayant une valeur d'IP faible peut ainsi être soit très peu oxydée, soit déjà très oxydée.

2) Indice de para-anisidine

L'IpA permet la détermination des composés aldéhydiques insaturés, qui font partie des produits secondaires de l'oxydation des lipides [234, 387].

Le principe de cette méthode est basé sur la réaction, en solution acétique, entre les aldéhydes présents dans l'échantillon et la para-anisidine pour former un complexe coloré jaune dont l'absorbance est mesurée à 350 nm [387].

La classe des aldéhydes est l'une des plus importantes sur le plan sensoriel. L'IpA permet donc d'évaluer, de manière relativement fiable, le rancissement d'un corps gras. Cependant, d'autres constituants que les aldéhydes participent à la flaveur du produit, et ne réagissent pas à ce test, comme les cétones [387].

Au contraire de l'IP, l'IpA permet d'évaluer le passé oxydatif d'une huile, puisque les aldéhydes ne sont pas dégradés au cours du vieillissement du produit.

3) Indice Totox

La valeur de l'IpA est souvent associée à celle de l'IP pour donner la valeur Totox (*total oxidative value*), qui est calculée selon l'équation suivante [387] :

$$\text{Totox} = 2 * \text{IP} + \text{IpA}$$

Avec IP : indice de peroxyde (mEq/kg)

IpA : indice de para-anisidine (absorbance)

La valeur Totox a l'avantage de combiner le passé oxydatif de l'huile (IpA) et sa potentialité à donner des produits secondaires d'oxydation (IP). La figure B-22 illustre cette combinaison.

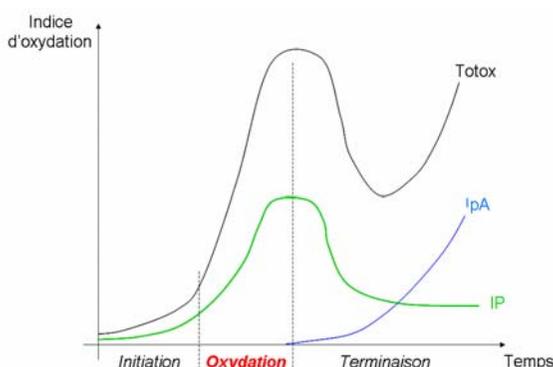


Figure B-22 : Illustration de l'évolution des trois grandeurs permettant d'évaluer l'oxydation d'un corps gras [d'après 234, 387].

Abréviations : Totox : indice total d'oxydation des lipides, IpA : indice de para-anisidine, IP : indice de peroxyde.

Tandis que l'IP diminue au fur et à mesure de la dégradation des hydroperoxydes, l'IpA augmente, suite à la production de composés secondaires d'oxydation (aldéhydes). L'indice Totox permet donc de prendre en compte ces deux informations.

4) Taux de TBARS

Certains produits d'oxydation des lipides réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) en formant un pigment rouge dont un des maximums d'absorbance est situé à 532nm. C'est le cas en particulier du malonalaldéhyde, qui est formé lors de l'oxydation des PUFA [387].

Ces substances réagissant au TBA (TABRs) sont dosées en mesurant l'augmentation de l'absorbance à 532 nm lors de la réaction d'1 mg de corps gras dans 1 mL de butanol contenant une quantité précise de TBA [387].

Cependant, si cette méthode est répandue, un de ces inconvénients majeurs est la méconnaissance de l'ensemble des molécules qui réagissent avec le TBA. En effet, des protéines oxydées, ou certains glucides simples, sont soupçonnés de donner une réponse positive au TBA. Néanmoins, la mesure du taux de TBARS est particulièrement adaptée aux corps gras possédant des chaînes grasses au moins tri-insaturées. Elle est donc intéressante pour déterminer l'oxydation des LCPUFA contenus dans les lipides circulants d'un organisme [387].

II. 2) Méthodes accélérées

Les méthodes de vieillissement accéléré permettent, à la différence des dosages présentés ci-dessus, d'évaluer la susceptibilité à l'oxydation d'un produit au cours de sa durée de vie, et ce dès le jour de la fabrication.

Parmi les différentes méthodes qui existent, test Sylvester, test à l'étuve ou encore test de Swift, le protocole Rancimat est un des plus répandus [387]. Il consiste en un appareillage dans lequel un courant d'air barbote dans un échantillon de corps gras. Cet air qui a servi à l'oxydation du corps gras est récupéré et injecté dans de l'eau distillée. Les composés issus de l'oxydation des lipides du corps gras provoquent une modification de la conductivité de l'eau, qui peut être corrélée à l'état d'oxydation du produit.

Ce test permet donc d'évaluer le temps nécessaire pour que le produit atteigne un certain état de dégradation oxydative, dans des conditions proches du stockage d'un corps gras, puisque la température de l'échantillon est maîtrisée.

III/ Les antioxydants dans les produits alimentaires

Les procédés de fabrication utilisés dans l'industrie agroalimentaire ne permettent pas toujours d'isoler le produit de l'oxygène, de la lumière ou de traces métalliques. Il est donc souvent nécessaire d'ajouter un antioxydant dans la formule, en particulier dans le cas de produits à forte teneur en lipides. Les antioxydants n'empêchent pas l'oxydation, mais la ralentissent, en allongeant la période d'induction et en augmentant ainsi la durée de vie des produits [180].

Après avoir présenté les mécanismes de la réaction de peroxydation lipidique, ainsi que différentes méthodes d'évaluation de la qualité d'un produit, cette troisième partie présente les classes d'antioxydants, leurs modes d'action, ainsi que des exemples de molécules dans chaque classe (les antioxydants pouvant avoir plusieurs modes d'action différents, il est possible qu'un composé soit cité dans plusieurs catégories). Les composés utilisés dans cette étude seront illustrés par leur formule topologique.

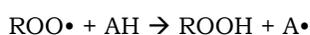
III. 1) Différents types d'antioxydants

Les antioxydants peuvent avoir des modes d'action différents selon l'étape de l'oxydation à laquelle ils agissent. En effet, ils peuvent intervenir durant la propagation, en donnant un hydrogène aux radicaux lipidiques, à l'initiation de l'autoxydation en piégeant les métaux de transition ou l'oxygène triplet lui-même, ou encore à l'initiation de la peroxydation induite par l'oxygène singulet en désactivant cette espèce réactive.

1) Antiradicalaires

Les antioxydants antiradicalaires stabilisent les radicaux libres générés pendant l'oxydation des lipides, et permettent ainsi de limiter la propagation de la réaction. Ce sont soit des donneurs d'hydrogène, soit des composés qui fixent le radical peroxy.

Dans le premier cas, dont font partie les amines et les phénols, l'antioxydant (A) stabilise le radical peroxy en cédant un atome d'hydrogène, devenant lui-même un radical libre [395] :



Dans le second cas, la réaction de propagation est arrêtée car l'antioxydant (B) fixe le peroxy [395]. Le carotène est un antioxydant antiradicalaire de ce type :



Leur effet s'arrête quand il n'y a plus d'antioxydant susceptible de stabiliser un radical libre, à moins qu'un régénérateur ne soit inclus dans la formulation du produit. Ce régénérateur permet de stabiliser

l'antioxydant, qui peut ainsi à nouveau stabiliser un radical (ex. : régénération des tocophérols par l'acide ascorbique).

Les composés suivants sont des antioxydants de type antiradicalaire : BHA (butylhydroxyanisol), BHT (butylhydroxytoluène), gallates, tocophérols, flavonoïdes, vanilline, carnosol et acide carnosique du romarin, palmitate d'ascorbyle, acides ascorbique, malique, tartrique, citrique et phosphorique [98, 395, 399].

Dans le cas des produits type corps gras, le principal composé antiradicalaire utilisé est la vitamine E. Les figures B-23 et B-24 illustrent la structure générale des deux types de formes de ce composé, les tocophérols et les tocotriénols.

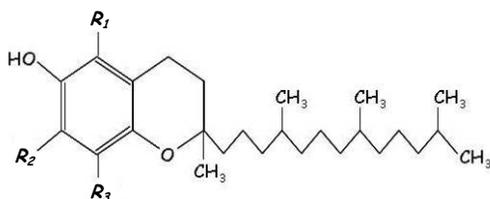


Figure B-23 : Formule topologique des tocophérols [d'après 368].

Légende : R_1 , R_2 et R_3 : groupements qui diffèrent entre les quatre tocophérols.

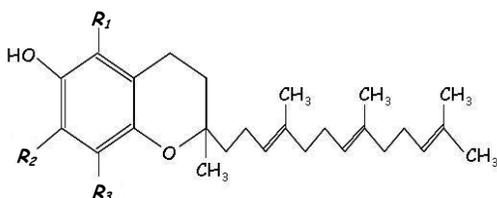


Figure B-24 : Formule topologique des tocotriénols [d'après 368, 447].

Légende : R_1 , R_2 et R_3 : groupements qui diffèrent entre les quatre tocotriénols.

Selon les groupements R_1 , R_2 et R_3 du cycle benzénique, on distingue l' α -, le β -, le γ - et le δ -tocophérol. L' α -tocophérol comprend trois groupements méthyles, le β -tocophérol deux méthyles placés en position para (R_1 et R_3), le γ -tocophérol deux méthyles placés en ortho (R_2 et R_3), et le δ -tocophérol, un seul méthyle en R_3 . Les tocotriénols sont les équivalents des tocophérols dans lesquels la chaîne carbonée latérale est insaturée.

L'activité antioxydante relative des différentes formes de la vitamine E est la suivante [368] :



Les deux formes les plus actives contre l'oxydation des lipides dans un produit sont donc les γ - et δ -tocophérols.

2) Chélateurs de métaux de transition

Les chélateurs de métaux de transition comme le fer et le cuivre peuvent retarder l'initiation de l'oxydation. Ces antioxydants forment des complexes avec les métaux, inhibant le cycle rédox du métal, et donc son action sur les lipides insaturés [98]. Dans les produits alimentaires, les antioxydants de ce type sont de petites molécules, comme les acides phosphorique, citrique (figure B-25), succinique, ascorbique, phytique, ou encore le calcium disodium EDTA (éthylène-diamine-tétracétate de calcium disodium) [98, 399]. Les flavonoïdes sont également de bons antioxydants puisque ce sont des chélateurs du fer [399].

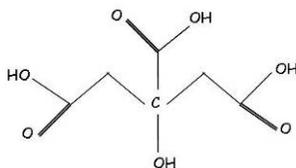


Figure B-25 : Formule topologique de l'acide citrique.

L'acide citrique peut être utilisé dans les corps gras comme antioxydant hydrosoluble, pour piéger les traces métalliques présentes dans l'eau des produits.

3) Piégeurs d'oxygène triplet

Ces antioxydants, dont font partie l'acide ascorbique (figure B-26), le palmitate d'ascorbyle, ou encore les sulfites, agissent en piégeant l'oxygène triplet [98].

Le palmitate d'ascorbyle est un ester liposoluble d'acide ascorbique, ce qui permet de l'incorporer dans la phase lipidique des formulations qui contiennent des tocophérols, optimisant ainsi leur régénération [293].

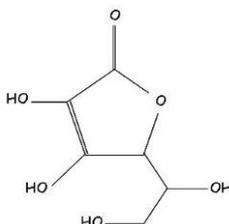


Figure B-26 : Formule topologique de l'acide ascorbique.

4) Désactivateur d'oxygène singulet

Ces composés peuvent agir en désactivant physiquement l'oxygène singulet, par exemple en le piégeant par stabilisation électronique dans un cycle aromatique (carotène, xanthophylle) [368]. Ainsi l'énergie d'excitation de l'oxygène est éliminée, sans changement chimique [98].

Parmi les molécules agissant selon ce mode, les caroténoïdes sont les plus actifs. Le lycopène est le plus réactif, étant six fois plus rapide que le β -carotène pour transformer un oxygène singulet en oxygène aréactif [98]. Les tocophérols et l'acide ascorbique sont beaucoup moins rapides, cependant leur grande concentration dans les produits alimentaires rend leur action non négligeable vis-à-vis de la protection contre l'oxydation [399].

III. 2) Synergie entre les antioxydants

La présence concomitante d'antioxydants différents dans un produit peut permettre une réaction de synergie entre les composés. En effet, un antioxydant de type antiradicalaire peut être régénéré par un autre, ce qui permet d'allonger la durée de son action dans le produit.

Quelques exemples :

- ✓ l'acide ascorbique est un désactivateur d'oxygène singulet, un piégeur d'oxygène triplet, un chélateur de métaux et un antiradicalaire. Cette dernière action permet de régénérer les tocophérols en fournissant un hydrogène à un radical tocophéryl [98] ;
- ✓ les acides citrique, tartrique, malique et phosphorique sont des chélateurs de métaux et également des antiradicalaires, qui peuvent donc régénérer les tocophérols [395] ;
- ✓ les flavonoïdes tels que les anthocyanines, les catéchines, les flavonols, les flavones, les isoflavones et les proanthocyanidines sont chélateurs de métaux et donneurs d'hydrogène [98].

IV/ La protection de l'organisme contre l'oxydation

L'oxydation des lipides est un phénomène qui se produit également dans l'organisme. Si les radicaux libres peuvent être générés par divers agents extérieurs tels que les radiations ionisantes ou les polluants de l'environnement, ils sont également produits dans l'organisme [361]. Ces composés interviennent dans des mécanismes physiologiques telles que la production de prostaglandines, la régulation de la pression artérielle ou la transduction du signal régulant l'expression de certains gènes [361]. Parmi les espèces oxydantes réactives rencontrées dans l'organisme figurent l'oxygène singulet, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion radicalaire superoxyde (O_2^-), l'oxyde nitrique ($NO\bullet$) ou encore le radical hydroxyle ($HO\bullet$) [361].

Le système de défense de l'organisme contre l'oxydation des lipides est assuré par deux voies différentes. Premièrement, par les antioxydants apportés par l'alimentation, qui protègent les lipides par les mêmes mécanismes que ceux décrits précédemment. Deuxièmement, par des enzymes spécifiques, qui permettent de réduire les molécules pro-oxydantes ou les radicaux créés au cours de l'oxydation.

Parmi les antioxydants apportés par l'alimentation figurent par exemple la vitamine E, la vitamine C, les composés phénoliques, ou encore les protéines liant les métaux [359]. L'activité vitaminique E de l'organisme comprend l'activité antioxydante des différents tocophérols et tocotriénols, comme décrit dans le cas des produits alimentaires. Elle est exprimée en « équivalents α -tocophérol » (α -TE). Cependant, il a été démontré que l'efficacité relative des différentes formes de la vitamine E est inversée par rapport à ce qui est observé dans un produit [180]. En effet, dans l'organisme l'ordre d'efficacité est le suivant [447, 480] :

α -tocophérol > β -tocophérol > α -tocotriénol > γ -tocophérol > β -tocotriénol > δ -tocophérol > γ - et δ -tocotriénols.

Plusieurs systèmes enzymatiques catalysent la conversion des molécules pro-oxydantes dans l'organisme. Ce sont les superoxydes dismutases (à cuivre-zinc ou à manganèse), la catalase (à fer) ou les glutathion peroxydases (à sélénium) [359]. La présence des oligo-éléments dans le centre actif des enzymes est indispensable à leur fonctionnement. N'étant pas synthétisés dans l'organisme, ces composés doivent être apportés par l'alimentation [361]. Ces enzymes agissent, par exemple, en convertissant les ions superoxydes en H_2O_2 , en dégradant l' H_2O_2 en eau et oxygène, ou encore en réduisant l' H_2O_2 et les hydroperoxydes [359].

LA MICROENCAPSULATION

L'utilisation d'huile de poisson dans un produit alimentaire soulève plusieurs problèmes. Tout d'abord au niveau de l'altération des qualités organoleptiques du corps gras, du fait de l'odeur de l'huile, et au niveau de la stabilité, ce type de matière première étant très sensible à l'oxydation. Le chapitre précédent a décrit les réactions d'oxydation des lipides, et les différents types d'antioxydants que le formulateur peut ajouter au produit alimentaire pour le protéger. Cependant, cette alternative peut ne pas être suffisante dans le cas d'une supplémentation importante en huile de poisson, et c'est pourquoi ce chapitre et le suivant décrivent d'autres méthodes pour protéger cette matière première, comme la microencapsulation et la fabrication de liposomes.

La microencapsulation permet d'enrober des gouttelettes microscopiques d'huile dans un matériau de type polymère digestible (amidon, alginate...). Il en résulte une poudre qui peut être dispersée dans une phase liquide. De cette façon l'huile est mieux protégée de l'oxydation, et les composés volatils indésirables responsables de l'odeur de poisson sont retenus dans les particules. Cette approche semble d'autant plus pertinente qu'une étude a montré que la biodisponibilité de l'huile de poisson est équivalente, qu'elle soit apportée sous forme libre ou encapsulée [505].

La microencapsulation produit des particules de taille comprise entre 1 μm et 1 mm. La structure peut être de deux types : capsule ou sphère. Dans le cas des microcapsules, une membrane de matériau entoure un cœur de matière active (l'huile de poisson), tandis que dans le cas des microsphères la matière active est dispersée dans une matrice de matériau, comme l'eau dans une éponge. La libération du contenu se fait grâce à un événement déclenchant pour les microcapsules que ce soit un choc thermique, mécanique ou de pH, et par un phénomène de diffusion pour les microsphères.

Ce chapitre présente différentes méthodes d'encapsulation et leurs contraintes, puis un panorama des matériaux utilisables, interprétés par rapport à leur pertinence dans le cadre du projet de thèse. Avant cela, un premier paragraphe présente le « cahier des charges » de la microencapsulation dans le cadre du projet de thèse, contraintes qui permettent de critiquer les méthodes et matériaux cités dans la suite du chapitre.

I/ Le cahier des charges des particules

I. 1) Température et pH

Des particules contenant de l'huile de poisson destinées à être incorporées dans un corps gras doivent être capables de résister à différentes contraintes physico-chimiques. En effet, que ce soit au cours du procédé de fabrication, ou pendant la vie du produit chez le consommateur, elles subiront des variations de température et de pH.

La difficulté liée à l'utilisation de particules dans un produit de ce type est le maintien de la structure. Il est évident que si l'huile de poisson est libérée dans la margarine au cours de la fabrication ou du stockage, le goût du produit risque d'en être affecté. De même, au cours de l'absorption du produit, il semble important que les particules ne cèdent pas dans l'estomac, car il a souvent été constaté des renvois désagréables à odeur de poisson en cas d'utilisation de gélules d'huile (qui libèrent leur contenu à ce niveau).

Le point sensible concernant la température est principalement la pasteurisation à 86-88°C. Le reste du procédé de fabrication de la margarine ne dépasse pas cette température, et chez le consommateur la barquette est susceptible de passer au maximum d'un réfrigérateur à 4°C à une terrasse en été à 30-35°C, puisque le produit ne sera pas utilisé en cuisson.

Le pH de la phase aqueuse du produit est situé aux alentours de 4,4. Cependant, l'utilisation en tartine suggère la possibilité de voir la margarine recouverte de confiture, produit souvent acide. Par ailleurs, la mastication a lieu à pH physiologique, donc plus proche de 7,4, tandis que la phase de digestion gastrique peut engendrer des pH très acides, de l'ordre de 3, voire 2. Ainsi les capsules doivent conserver leur intégrité dans une grande plage de pH.

I. 2) Contraintes mécaniques et enzymatiques

Le procédé de fabrication de la margarine inclut des étapes de malaxage poussé dans des échangeurs à surface raclée. Une poudre d'huile de poisson ajoutée au produit doit donc pouvoir résister aux forces de cisaillement développées dans ces étapes.

Au cours de la digestion, différentes enzymes interviennent avant même que le bol alimentaire n'atteigne l'intestin grêle. Ce sont notamment les amylases salivaires et les lipases salivaires et gastriques. Ceci est important à prendre en compte, car si le matériau d'enrobage des particules est dégradé par ces enzymes, l'huile sera libérée trop tôt.

I. 3) Taille des particules et solubilité

La margarine est une émulsion de type eau dans huile. La distribution de taille des gouttelettes d'eau dans une formulation proche de celle recherchée dans le projet (ex. St Hubert Oméga3) se répartit comme suit : 80% d'entre elles ont un diamètre inférieur à 10 μm , 50% inférieur à 5 μm , et 20% inférieur à 2 μm . La taille moyenne est située aux alentours de 5 μm .

La taille des particules produites par différentes techniques est présentée sur le graphique B-27.

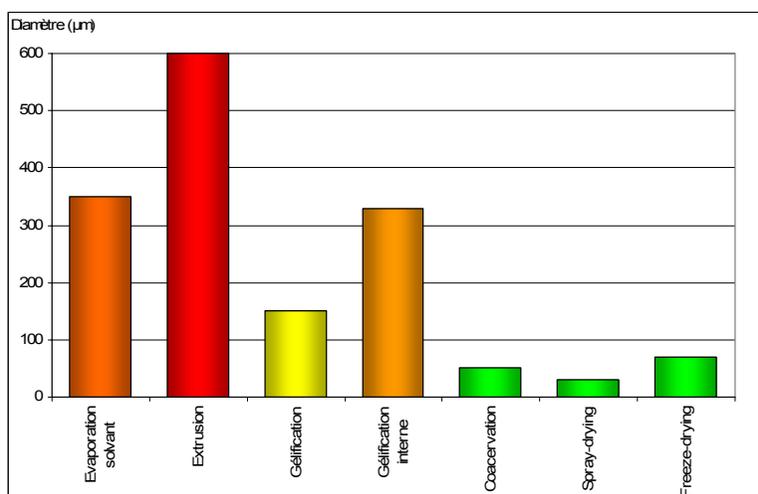


Figure B-27 : Diamètre moyen des particules produites par différentes techniques d'encapsulation [d'après 156].

Symboles : vert : diamètre moyen des particules compris entre 10 et 100 μm , jaune : diamètre moyen compris entre 100 et 250 μm , orange : diamètre moyen compris entre 250 et 500 μm , rouge : diamètre moyen supérieur à 500 μm .

Aucune technique ne permet de produire des particules de diamètre inférieur à la taille moyenne des gouttelettes d'eau présentes dans le corps gras. Il sera donc nécessaire de disperser la poudre dans la partie lipidique du produit et non dans la phase aqueuse. Ceci implique que le matériau d'enrobage des capsules ne soit pas soluble dans l'huile, car, dans ce cas, le contenu serait libéré dès la fabrication du produit.

De plus, il apparaît clairement sur ce graphique que des particules produites par certaines techniques risquent d'être négatives au niveau de la texture du produit, car de diamètre trop grand. En effet, plus les particules sont petites, moins elles risquent d'engendrer une texture « sableuse ».

II/ Les techniques de microencapsulation

Les différentes méthodes de microencapsulation peuvent être classées en deux grands groupes, les procédés physico-chimiques et les procédés mécaniques. L'étape commune à toutes ces techniques est une dispersion de la matière active dans une solution de matériau enrobant, donc une émulsion, qui peut être multiple.

Cette présentation de techniques d'encapsulation n'est pas exhaustive, cependant ces mécanismes sont les plus couramment employés à l'échelle industrielle en agroalimentaire, cosmétique ou pharmacie.

Dans cette première partie, quelques définitions sont précisées avant la description des différentes techniques et matériaux.

II. 1) Définitions

1) Capacité d'encapsulation

La capacité d'encapsulation représente le rapport entre la masse de substance active incorporée dans les particules et la masse finale de poudre obtenue [156]. Cette notion est très importante dans le cadre d'un projet alimentaire, car si la capacité d'encapsulation de la technique choisie est trop faible, la quantité de poudre à ajouter dans le produit pour apporter la dose voulue de substance active sera trop importante.

2) Taille des particules

Différents paramètres affectent la taille des particules produites par encapsulation, comme par exemple la concentration en polymère ou l'ajout d'additifs spécifiques. En effet, l'utilisation d'un émulsifiant au cours du procédé d'encapsulation permet de diminuer la taille des gouttelettes dans l'émulsion, et donc la taille des particules produites. De même, augmenter la vitesse d'agitation pendant la création de l'émulsion permet également de diminuer la granulométrie de la poudre [156].

Une granulométrie fine peut être recherchée dans le but de limiter l'impact des particules sur la texture finale du produit.

Néanmoins, les particules de petite taille montrent généralement une libération plus rapide de la substance active [212]. De plus, de petites particules signifient une efficacité d'encapsulation limitée.

Au vu de ces considérations, il semble nécessaire de faire un compromis entre les différentes exigences d'un projet.

3) Burst release

Le « *burst release* » est une libération rapide de la substance active observée au début de l'hydratation de la poudre dans certains cas d'encapsulation [212]. Ce phénomène peut s'expliquer par une présence de matière active à l'extérieur des particules (adhésion à la surface du matériau enrobant), ou encore par une structure trop poreuse dans le cas de microsphères, ce qui provoque une libération rapide de la substance active se trouvant près de la surface de la particule [212].

Cette libération rapide est influencée par la nature de la substance encapsulée. Ainsi, une petite molécule pourra plus facilement migrer dans le polymère et diffuser hors de la particule, tandis qu'une substance hydrophobe n'aura pas tendance à sortir de la particule lors de la dispersion de la poudre en milieu aqueux [212].

4) Double coating

Le « *double coating* » est réalisé par addition d'une couche externe autour d'une particule finie, ce qui permet de limiter la libération et l'effet de « *burst release* » [156, 258].

Exemple : couche de chitosane autour de billes d'alginate, couche de cellulose autour de particules de chitosane...

Dans la suite de ce chapitre, une particule formée d'un matériau encapsulant X, recouverte par une couche de matériau Y sera désignée comme suit : X // Y. A l'inverse, le mélange de deux matériaux X' et Y' préalablement à l'encapsulation sera noté X' + Y'.

II. 2) Procédés physico-chimiques

Dans cette première catégorie de techniques de microencapsulation sont classées les méthodes d'évaporation de solvant, de gélification, de gélification interne, de coacervation (simple ou complexe) et de polymérisation interfaciale.

1) Emulsion – Evaporation de solvant

Cette technique repose sur l'évaporation de la phase centrale d'une émulsion multiple. Un polymère hydrophobe est solubilisé dans un solvant organique, solution dans laquelle est ensuite dispersée la substance active. Cette phase organique est finalement dispersée dans une phase aqueuse, formant

une émulsion actif/solvant/eau. Le solvant s'évapore sous agitation, laissant le polymère encapsuler la substance active [163, 304, 364, 422, 459, 522, 526].

Dans le cas d'un matériau d'enrobage hydrophile, le solvant organique est remplacé par de l'eau ou de l'éthanol, et la phase aqueuse extérieure par une phase lipidique [425].

2) Emulsion – Gélification

Cette technique, qui a plusieurs déclinaisons, implique dans un premier temps la formation d'une émulsion actif/encapsulant, puis la gélification du matériau d'enrobage autour des gouttelettes dispersées de substance d'intérêt.

a) Emulsion – Gélification thermique

Dans ce cas, la substance active est dispersée dans un polymère fondu, et le tout est ensuite dispersé dans une phase différente, chauffée à une température supérieure au point de fusion du polymère. La polymérisation a lieu quand l'émulsion est refroidie [425]. L'exemple type de cette réaction est la prise en masse de la gélatine quand on la refroidit.

b) Emulsion – Gélification ionique

La substance active est dispersée dans un polymère solubilisé, qui gélifie par ajout d'un agent ionique (exemple : le chlorure de calcium pour l'alginate, ou le triphosphate pour le chitosane). La formation d'interactions ioniques entre les chaînes de polymère et le réactif permet le maintien d'une structure qui entoure et enrobe la matière active [70, 253, 296, 336, 425, 520].

c) Emulsion multiple – Gélification interne

Cette variante de l'émulsion-gélification ionique implique la réalisation d'une émulsion multiple (huile dans eau, le tout dans huile, ou l'inverse). La gélification a lieu dans la phase centrale par ajout d'un agent ionique [86, 396, 424].

L'avantage de cette technique est un meilleur contrôle de la taille des particules produites, car c'est dans ce cas la finesse de l'émulsion de polymère qui détermine la taille des microgranules. Dans le cas de l'émulsion-gélification simple, ce paramètre est dû à la qualité de la dispersion de la substance active dans la solution de polymère, cependant l'épaisseur de la couche de polymère peut être très aléatoire.

3) Emulsion – Coacervation

La coacervation est une réaction entre deux chaînes de polymère qui repose sur des interactions ioniques [425]. Par analogie avec l'émulsion-gélification, c'est une deuxième molécule de polymère qui assure le rôle de l'agent ionique dans la réaction. Dans le cas de la coacervation simple, deux molécules d'un même matériau interagissent, tandis que, dans la coacervation complexe, ce sont deux polymères différents.

a) Emulsion – Coacervation simple

La substance active à encapsuler est dispersée dans une solution aqueuse de polymère. La coacervation génère des agglomérats qui se placent à l'interface des gouttelettes de phase dispersée, puis forment une couche continue.

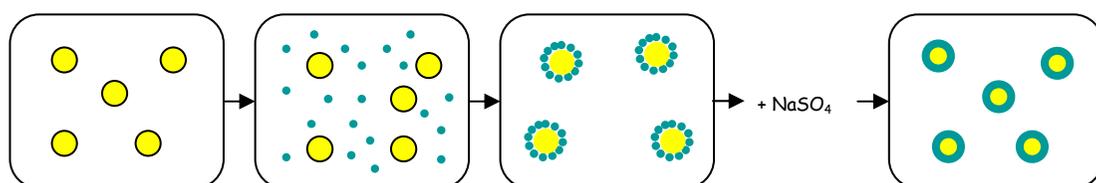


Figure B-28 : Représentation schématique du principe de la technique de coacervation simple.

L'exemple illustré dans cette figure est celui de la gélatine, dont la coacervation est induite par ajout de sulfate de sodium. Un film de gélatine se forme ainsi autour des gouttelettes de substance active, préalablement dispersées dans une solution de gélatine liquide.

Dans le cas d'un matériau hydrophile, la dispersion est effectuée dans un milieu aqueux. Par exemple, la gélatine est solubilisée dans de l'eau, et la coacervation est induite par ajout de sulfate de sodium [425]. De même, un polymère hydrophobe comme l'éthylcellulose sera dispersé dans un solvant organique, la coacervation étant ensuite provoquée par abaissement de la température.

b) Emulsion – Coacervation complexe

Cette technique repose sur le même principe que la coacervation simple, mais deux polymères sont impliqués. L'attraction électrostatique des deux polymères provoque l'apparition d'un coacervat mixte, sous forme d'un agglomérat, quand le pH atteint la valeur à laquelle les charges des deux composés s'équilibrent [44, 82, 83, 425]. Les gouttelettes de coacervat recouvrent et entourent ensuite la substance active dispersée [38, 211, 228, 232, 278, 317, 348, 421, 471].

L'enrobage peut être consolidé par réticulation des molécules du coacervat, c'est-à-dire par ajout d'un agent, chimique par exemple (glutaraldéhyde), qui provoque la formation de liaisons covalentes entre les chaînes de polymère [425].

4) Emulsion – Polymérisation interfaciale

Cette technique repose sur la polymérisation du matériau enrobant à la surface des gouttelettes de matière active [425]. C'est donc dans une solution de monomères qu'est dispersée la substance d'intérêt, et le polymère se crée à l'interface, comme illustré dans la figure B-29.a (exemple : monomères d'isocyanates qui forment une membrane de polyurée).

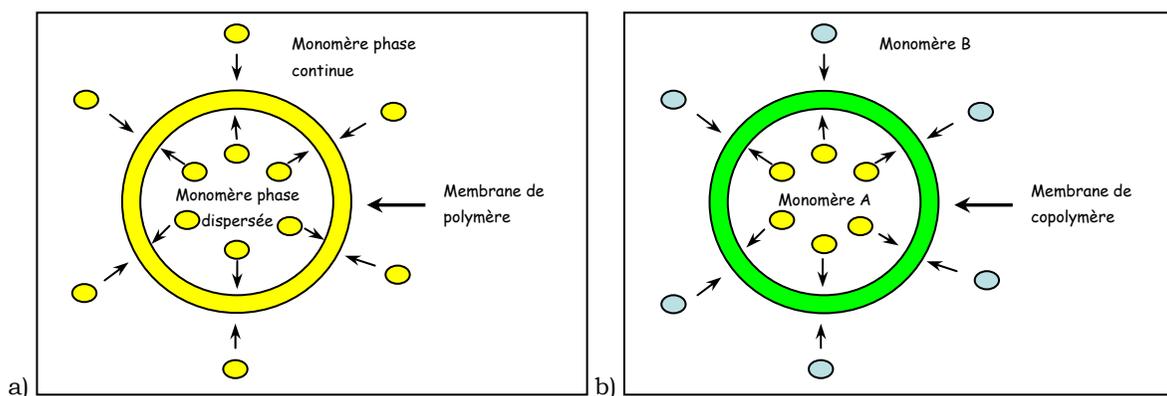


Figure B-29 : Représentation schématique du principe de la technique de polycondensation interfaciale.

a) Formation d'un polymère homogène, b) Formation d'un copolymère : le monomère A dissous dans la phase dispersée interagit avec le monomère B dissous dans la phase continue pour former un copolymère à l'interface des gouttelettes.

Deux monomères différents peuvent être utilisés, l'un hydrosoluble, l'autre liposoluble, dans deux phases différentes (figure B-29.b). Dans l'une des deux se trouve également la substance active. Une émulsion est créée, et la polymérisation a lieu à l'interface des deux phases (exemple : chlorure d'acide et diamines, qui forment une membrane de polyamide).

II. 3) Procédés mécaniques

Dans ce deuxième groupe sont retrouvées les techniques de nébulisation-séchage, d'extrusion-gélification, de lyophilisation, d'enrobage en lit fluidisé et d'extrusion-sphéronisation.

1) Dispersion – Nébulisation – Séchage (spray-drying)

La nébulisation-séchage est un procédé continu en une seule étape permettant de transformer une formulation liquide en une poudre solide (figure B-30) [425]. La phase liquide peut être une solution de matière active et de polymère, une dispersion de particules solides de matière active dans une solution de polymère, ou encore une émulsion de matière active dans une solution de polymère.

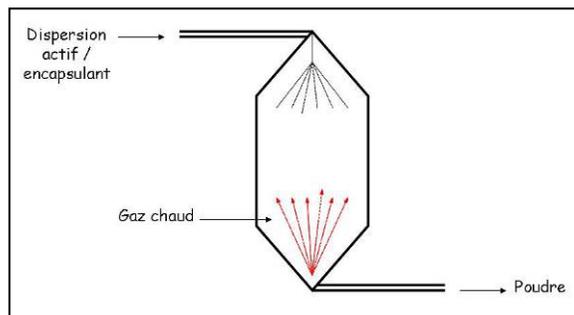


Figure B-30 : Représentation schématique de la technique de spray-drying.

La phase liquide est nébulisée pour former un aérosol, qui est séché par contact avec un flux d'air ou d'azote chaud dans une tour de séchage [133, 147, 201-203, 255, 373, 380, 385, 451, 508].

2) Extrusion – Gélification de gouttes

La matière active est solubilisée ou dispersée dans une solution de matériau encapsulant. Des gouttes de ce mélange sont ensuite formées par extrusion et tombent dans un milieu qui induit la gélification du polymère (figure B-31), qu'elle soit ionique ou thermique [21, 37, 87, 126, 150, 214, 259, 456, 474].

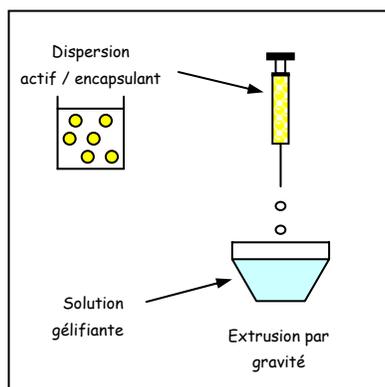


Figure B-31 : Représentation schématique de la technique d'extrusion-gélification de goutte.

La substance active est dispersée dans une solution de polymère liquide. Cette émulsion est extrudée dans un bain de gélification, ce qui induit la formation d'un film de polymère autour des gouttelettes de substance active.

Quelques exemples : alginate dans une solution de CaCl_2 , chitosane dans une solution alcaline, ou encore agar à 80°C dans une solution à 30°C.

3) Emulsion – Lyophilisation (freeze-drying)

Pour encapsuler une matière active par la technique de lyophilisation, une émulsion substance d'intérêt/solution de polymère est tout d'abord réalisée. Celle-ci est ensuite congelée, puis les agrégats obtenus sont broyés en une poudre de la finesse voulue [194, 195]. La lyophilisation consiste en un séchage de la poudre par sublimation de l'eau congelée, ce qui est obtenu par chauffage sous vide de la poudre congelée [172, 425].

4) Enrobage en lit fluidisé (spray-coating)

Cette technique ne concerne que des particules de matière active solide, qui sont réparties en une couche très fine sur laquelle l'enrobage est pulvérisé. (figure B-32).

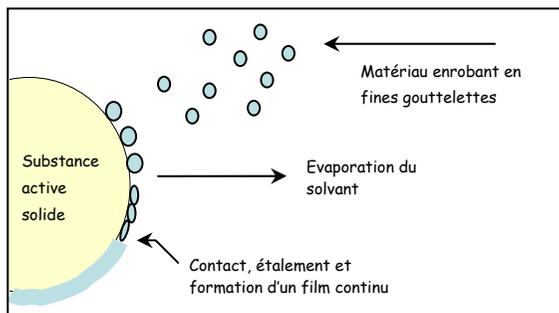


Figure B-32 : Représentation schématique du principe de la technique d'évaporation de solvant.

Une solution de polymère dissous dans un solvant est pulvérisée à la surface de particules de matière active. L'évaporation du solvant conduit à la formation d'un film de polymère enrobant les particules d'intérêt.

Après pulvérisation du matériau encapsulant, une étape de chauffage permet de faire évaporer le solvant, qui forme une couche à la surface des particules d'intérêt [149, 425].

5) Extrusion – Sphéronisation

Cette technique consiste à coextruder un mélange fondu de poudre de polymère thermoélastique et de matière active (qui doit être solide). En sortie d'appareillage, le filet enrobé produit est découpé en cylindres par un microtome. Ces structures sont enfin érodées mécaniquement pour leur donner une forme sphérique [425].

II. 4) Inconvénients des différentes techniques présentées

Deux inconvénients majeurs sont rencontrés dans la plupart des techniques présentées qui sont, d'une part, l'utilisation de solvants organiques, et d'autre part, des traitements thermiques poussés. L'emploi de solvants ne peut pas être envisagé dans le cadre du présent projet, à finalité alimentaire, car il ne pourra être garanti qu'aucune trace résiduelle de solvant ne subsiste dans la poudre obtenue, donc finalement dans le produit consommé.

Dans le cas de l'encapsulation d'huile de poisson, un chauffage important est également indésirable car ce paramètre accélère les réactions d'oxydation. Il est donc nécessaire de limiter au maximum la température du procédé.

De ce fait, les techniques d'évaporation de solvant, de gélification ionique, interne, de coacervation et d'extrusion-gélification sont à proscrire, du fait de l'utilisation de solvants organiques dans le cas de la mise en œuvre de polymères insolubles dans l'eau. Dans le cas de matériaux solubles dans l'eau, la technique d'évaporation du solvant aqueux nécessite un chauffage important pendant plusieurs heures, de même que la méthode de gélification thermique.

D'autres difficultés conduisent à proscrire l'emploi des autres techniques. La polymérisation interfaciale, par exemple, n'est pas envisageable, car les matériaux utilisés ne sont pas considérés comme « alimentaires ». De plus, cette technique nécessite souvent l'utilisation de solvants organiques. L'extrusion-sphéronisation et l'enrobage en lit fluidisé ne s'adressent qu'à des matières actives solides, elles ne sont donc pas adaptées dans le cas de l'encapsulation d'huile de poisson. En effet, congeler l'huile de poisson pour obtenir une matière solide nécessite de descendre très bas en température du fait de la nature très insaturée de l'huile, ce qui est incompatible avec la température à laquelle un polymère doit être chauffé pour fondre et être pulvérisé.

La lyophilisation est un procédé encore très coûteux, donc difficile à mettre en place en industrie.

Enfin, l'extrusion est également problématique, puisqu'elle est en général destinée à n'être utilisée qu'à l'échelle laboratoire, ne produisant qu'une particule à la fois, de grande taille qui plus est (quelques centaines de μm , voire quelques mm).

La technique la plus utilisée aujourd'hui à l'échelle industrielle est la nébulisation-séchage. Deux précautions sont cependant à prendre en compte dans le cas d'encapsulation d'huile de poisson. Premièrement, il est nécessaire de réduire au minimum la température de séchage de l'aérosol, pour

éviter de déclencher l'oxydation des acides gras sensibles. Et deuxièmement, il est indispensable d'utiliser de l'azote plutôt que de l'air atmosphérique, dans le même but. C'est cette technique qui semble tout de même la plus adaptée à la production d'une poudre alimentaire d'huile de poisson à l'échelle industrielle, au vu des verrous associés aux autres techniques présentées.

III/ Les matériaux utilisés

Ce paragraphe présente une analyse critique des différents polymères cités dans les publications scientifiques. Plus de quarante associations de polymères relevées dans la littérature ont été classées en groupes, selon leur pertinence par rapport aux contraintes identifiées dans le cahier des charges du projet.

III. 1) Matériaux envisageables dans le cadre de ce projet

Certains polymères paraissent très simples d'emploi et ont déjà été utilisés pour l'encapsulation d'huile : les maltodextrines [133, 385, 508] et la gomme arabique [385, 508]. Ces deux polymères sont des polysaccharides : les maltodextrines sont des produits de dégradation de l'amidon, tandis que la gomme arabique contient principalement des glucides simples comme le galactose et l'arabinose [508]. La fabrication de telles microparticules semble simple à réaliser par nébulisation-séchage, en n'utilisant que de l'eau comme solvant.

Citons en anecdote la gomme de mesquite, polysaccharide issu de la mesquite (*Prosopis juliflora*), une plante exotique d'Inde [385]. Bien que des microparticules contenant de l'huile ait été produites par nébulisation-séchage avec ce composé, il semble trop peu répandu et disponible pour être employé de manière industrielle.

Deux autres matériaux semblent intéressants : l'acétophtalate de cellulose et le phtalate d'hydroxypropylméthylcellulose, utilisés en pharmacie pour protéger des principes actifs de l'acidité de l'estomac. Des particules peuvent être produites avec ces matériaux par la technique de nébulisation-séchage [147, 258, 304, 317, 364, 380, 459]. De plus, ces dérivés de la cellulose semblent adaptés au projet car ils sont insolubles dans l'eau à pH acide (inférieur à 5) et solubles au-dessus. Cela signifie que les microparticules peuvent être produites en créant une émulsion huile de poisson dans eau (pH 7, le matériau est soluble) puis en nébulisant cette solution. Cependant, il n'a été reporté que l'encapsulation de substances actives hydrosolubles dans ces matériaux.

Quatre associations de polymères peuvent également être envisagées, maltodextrines + méthylcellulose [255], caséinate + lactose [194, 195], alginate + amidon [86] et acétophtalate de cellulose + saccharose [317]. Des particules enrobées par ces mélanges de composés se comportent conformément au cahier des charges, cependant aucune publication ne mentionne une possibilité de production par nébulisation-séchage dans le cas des trois dernières associations.

Plusieurs réserves peuvent être émises vis-à-vis de tous ces composés. Tout d'abord, le statut alimentaire qui est incertain dans la plupart des cas, comme pour tous les dérivés de la cellulose, ou la gomme Mesquite. Ensuite, les publications scientifiques ne mentionnent pas toujours la possibilité de produire ces particules par nébulisation-séchage, ni d'y encapsuler une huile. Enfin, la nécessité de créer une émulsion dans l'eau est un point critique, le contact entre l'eau et l'huile de poisson étant susceptible d'accélérer l'oxydation des lipides, et donc de générer des composés volatils indésirables.

III. 2) Matériaux non envisageables dans le cadre de ce projet

Les composés cités dans ce paragraphe ne respectent pas le cahier des charges de ce projet. Les raisons peuvent être soit une difficulté dans le procédé de fabrication des particules, soit un problème de législation.

1) Problème dans le procédé de fabrication

L'éthylcellulose a un comportement intéressant, et permet d'encapsuler des huiles par nébulisation-séchage [522, 526]. Cependant, ce polymère est insoluble dans l'eau, impliquant l'utilisation de solvants organiques, ce qui n'est pas envisageable en technologie alimentaire du fait du risque de résidus dans l'aliment final.

D'autre part, l'association caséinate + glucides [203] pourrait également être envisagée, cependant des microparticules d'huile de poisson formées avec cette formulation ont été décrites comme ayant une forte odeur de poisson [203]. C'est également le cas de l'association gélatine + gomme arabique, liées de manière covalente par addition d'acide ascorbique, dans laquelle une oxydation poussée d'huile de poisson a été décrite [278].

2) Problème de législation

Plusieurs associations ne sont pas envisageables dans le cadre de ce projet du fait de contraintes législatives.

En effet, le chitosane [9, 21, 44, 70, 163, 253], et toutes les particules faisant intervenir cette molécule ne pourront être utilisées dans un produit alimentaire car un avis du Conseil supérieur d'hygiène publique de France (CSHPF) du 14 avril 1998 stipule que « Le CSHPF émet un avis défavorable à l'emploi de chitosane, fibre extraite de la carapace des crevettes et des crabes en alimentation humaine » [103]. C'est donc également le cas des formulations suivantes : chitosane + gélatine [421], pectine + alginate // chitosane [126, 302], pectine + chitosane [149, 302], alginate // chitosane [214, 259, 296, 424, 456], chitosane // éthylcellulose [422, 451], chitosane // cellulose acétate butyrate [422], chitosane // cellulose acétate propionate [422] et pectine amidée // chitosane [348]. De même, les associations alginate // oligochitosane [37] et carraghénanes + oligochitosane [38, 258] ne sont pas envisageables, car l'oligochitosane est un produit de dégradation du chitosane.

D'autre part, même dans le cas d'une autorisation future de la part du CSHPF, d'autres problèmes se posent concernant ces associations. Le chitosane est difficile à disperser dans l'eau, son utilisation risque donc d'être plus problématique que celle d'autres polymères [9, 44]. D'autre part, l'éthylcellulose n'est soluble, comme cité dans le paragraphe précédent, que dans des solvants organiques, interdisant son utilisation en association avec le chitosane [522, 526].

Dernier point, une publication démontre la production de microparticules d'huile enrobées dans des polysaccharides de soja [508]. Cependant la démarche de restriction des allergènes dans l'usine limite l'utilisation de matières premières issues du soja. De plus, la méfiance des consommateurs à l'égard des végétaux pouvant être issus d'organismes génétiquement modifiés constitue une raison supplémentaire de rejeter cette formulation.

IV/ Discussion sur ces technologies

La recherche bibliographique a permis de mettre en évidence les contraintes associées à l'utilisation de la microencapsulation dans le cadre d'un projet à but alimentaire.

En effet, l'utilisation de solvants organiques et de matériaux non alimentaires est le principal frein à l'emploi de cette technologie, le statut alimentaire des dérivés de la cellulose comme l'acétophtalate de cellulose, le phtalate d'hydroxypropylméthylcellulose ou encore la méthylcellulose étant incertain. Les contraintes de process comme le besoin de températures modérées et de suppression d'azote pour prévenir l'oxydation de l'huile de poisson sont autant de difficultés supplémentaires.

Enfin, la microencapsulation donne en général naissance à des particules de plusieurs centaines de µm de diamètre, ce qui est problématique dans un corps gras, puisque la texture d'un produit de ce type doit rester homogène et fondante. La présence de microcapsules lors de la post-cristallisation risque en effet de constituer des germes de cristallisation, et de provoquer la formation de cristaux grossiers, aboutissant à un défaut de texture.

Une autre technologie envisageable au vu de ces inconvénients est l'utilisation de liposomes. En effet, l'emploi de phospholipides permet de s'affranchir du risque de non-alimentarité des matériaux, et la production de vésicules souples et de taille plus petite permet de limiter le risque de dégradation de la texture en bouche. C'est l'objet du chapitre suivant.

LES LIPOSOMES

Le chapitre précédent montre que, même si la microencapsulation est une technique répandue de protection de substances actives, de nombreuses contraintes ne permettent pas de l'envisager dans la présente étude. Une autre forme de protection d'une phase liquide dans une matrice liquide est la voie des liposomes.

Dans les années 1900, le bactériologiste allemand Paul Ehrlich prédit que des médicaments agissant comme des « cartouches magiques » seraient inventés, capables de viser et de détruire des tissus malades sans toucher aux tissus sains [529]. Malheureusement, ce concept resta pendant longtemps dans les rêves d'Ehrlich, jusqu'à ces dernières années où les avancées médicales ont permis la réalisation de telles « cartouches » : des molécules actives incorporées dans des « capsules » lipidiques. Les prémices des liposomes apparaissent dans les années 60, quand Alec D. Bangham découvre que le mélange de phospholipides (PL) et d'eau donne naissance à de microscopiques bulles [33, 529]. Ces gouttelettes, appelées liposomes, consistent en une bicouche phospholipidique délimitant un compartiment interne hydrophile [33]. Presque immédiatement, les liposomes sont apparus prometteurs comme vecteurs de principes actifs grâce à trois caractéristiques :

- i) ils peuvent transporter des molécules hydrophiles dans leur compartiment central, aussi bien que des molécules hydrophobes dans l'épaisseur de la bicouche ;
- ii) les PL qui forment la bicouche des liposomes entrent également dans la composition des membranes cellulaires, ce qui laisse présager leur innocuité dans l'organisme ;
- iii) et enfin il paraît possible de concevoir les liposomes de manière à ce qu'ils s'accumulent dans des tissus spécifiques, où les molécules actives encapsulées seraient libérées.

Ces caractéristiques font des liposomes une voie envisageable pour répondre à la problématique de la thèse, et ce chapitre présente la structure et la fabrication de ces particules imaginées par Ehrlich il y a maintenant plus d'un siècle.

I/ Structure des liposomes

I. 1) Organisation spatiale des solutions aqueuses de phospholipides

Les PL sont utilisés dans les produits alimentaires comme émulsifiants, puisqu'en se plaçant à l'interface d'une émulsion ils sont capables de diminuer la tension superficielle, et ainsi de stabiliser un mélange de phases non miscibles [397]. La figure B-33 montre l'organisation de deux types d'émulsions stabilisées par des PL, la partie polaire en contact avec la phase aqueuse, et la partie apolaire en contact avec la phase grasse.

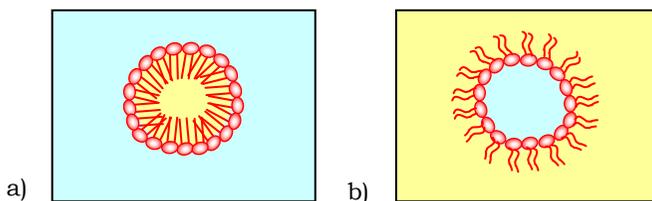


Figure B-33 : Représentation schématique de deux types d'émulsions stabilisées par des phospholipides.

a) Emulsion type huile dans eau (micelle), b) Emulsion type eau dans huile (micelle inverse).

Dans le premier cas (figure B-33.a), dénommé « émulsion huile dans eau » (mayonnaise, vinaigrette), l'émulsifiant se place de manière à ce que la tête polaire soit tournée vers la phase continue et les queues hydrophobes vers la phase dispersée. La structure formée par le PL dans ce cas est appelée

micelle [397]. Dans le second cas (figure B-33.b), émulsion dite « eau dans huile » (margarine), l'émulsifiant présente ses têtes hydrophiles vers l'intérieur des gouttelettes, et ses parties hydrophobes vers l'extérieur. Cette structure est une micelle inverse.

Ces organisations ne sont rencontrées que dans des émulsions, c'est-à-dire si les deux compartiments sont de polarité différente. Dans le cas où des phases de même nature doivent être séparées, les PL présentent une orientation de type bicouche, où les molécules sont placées tête-bêche, présentant de part et d'autre les parties de même polarité [45, 282, 310]. La figure B-34 illustre ce propos.

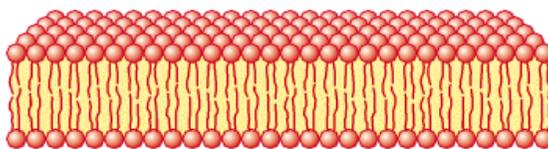


Figure B-34 : Représentation d'une bicouche phospholipidique dans un milieu aqueux [d'après 538].

L'épaisseur d'une bicouche dépend de la structure des acides gras portés par les PL, cependant elle ne dépasse pas 10 nm [310].

Dans la nature, le rôle principal des PL est la formation des cellules. En effet, les membranes cellulaires sont des bicouches phospholipidiques. Bien qu'elles contiennent également du cholestérol libre, des protéines, des canaux, des récepteurs, des glycoprotéines, ou encore des polysaccharides, les PL en sont les principaux constituants. Ils permettent de délimiter un compartiment interne aqueux, le cytoplasme, du milieu extérieur, également hydrophile.

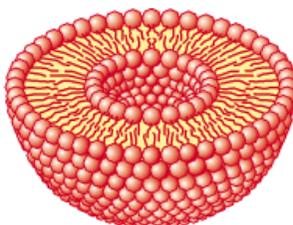


Figure B-35 : Représentation d'un liposome, coupé en une demi-sphère [d'après 538].

Un liposome présente la même organisation générale qu'une cellule, c'est-à-dire un compartiment interne hydrophile séparé d'un milieu externe également hydrophile par une membrane constituée d'une bicouche phospholipidique. Elle peut-être stabilisée par incorporation de cholestérol libre ou d' α -tocophérol [45].

La figure B-35 propose une représentation schématisée d'un liposome. Un liposome peut également posséder plusieurs bicouches concentriques, délimitant autant de compartiments internes aqueux.

Les liposomes sont ainsi classés en fonction de leur taille et du nombre de bicouches les constituant. On distingue les vésicules multilamellaires (MLV, *multilamellar vesicle*), les unilamellaires de petite taille (SUV, *small unilamellar vesicle*), les unilamellaires de grande taille (LUV, *large unilamellar vesicle*), et les unilamellaires géants (GUV, *giant unilamellar vesicle*). Si les MLV ont un diamètre supérieur à 200 nm, les SUV sont inférieurs à 200 nm, les LUV sont compris entre 200 et 1000 nm, et les GUV ont un diamètre supérieur à 1000 nm [310].

I. 2) Propriétés physiques des phospholipides

Comme introduit précédemment, les PL sont essentiellement utilisés en solution aqueuse, et il est donc important de présenter leur comportement par rapport à ce solvant. Les diagrammes de phase des mélanges PL – eau sont rarement parfaitement connus, ceci étant dû à leur grande complexité. La figure B-36 présente le diagramme de phase d'un mélange phosphatidylcholine – eau.

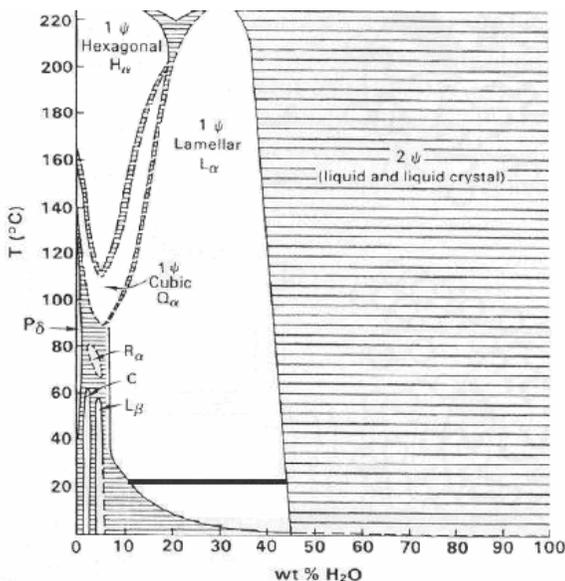


Figure B-36 : Diagramme de phase d'un mélange binaire phosphatidylcholine – eau.

Abscisse : pourcentage d'eau dans le mélange phospholipide – eau ; Ordonnée : température du mélange.

Abréviations : C : phase cristalline ; H_{α} : phase hexagonale de micelles inverses ; L_{α} et L_{β} : phases liquides cristallines lamellaires ; Q_{α} : phase cubique de micelles ; R_{α} : phase rhomboédrique [468].

Pour un pourcentage donné d'eau dans le mélange, le PL passe d'un état solide à un état lamellaire fluide (aussi appelé liquide cristallin) par une transition de premier ordre [372]. La température de cette transition est déterminée par la température de fusion des acides gras estérifiés sur le squelette glycérol du PL [310].

En dessous de la température de transition des PL, les vésicules sont considérées comme solides, même si l'état macroscopique correspond plus à un gel, et sont liquides au-dessus. La fabrication des liposomes ne peut se faire qu'en phase non solide, et plus précisément en phase lamellaire [45].

En effet, comme le montre la figure B-37 ci-dessous, c'est à ce stade lamellaire que les bicouches peuvent s'hydrater, ce qui occasionne dans un premier temps un gonflement (a), puis le décollement des bicouches supérieures (b), et enfin la formation d'un liposome multilamellaire par détachement des bicouches (c).

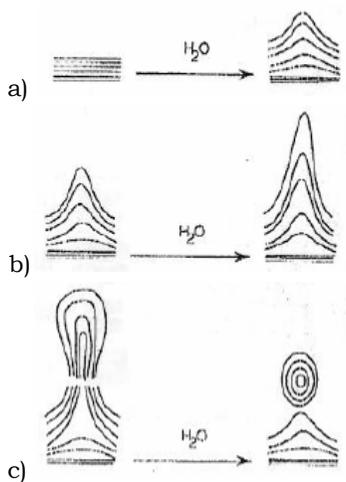


Figure B-37 : Comportement de couches de phosphatidylcholine en présence d'eau.

Différentes phases : a) gonflement par augmentation de la concentration en eau entre les bicouches, b) décollement des bicouches supérieures, c) détachement des bicouches et formation d'un liposome multilamellaire [d'après 33, 45, 310].

Différents PL peuvent entrer dans la formulation des membranes de liposomes, que ce soit des composés purifiés ou des lécithines extraites à partir de différentes sources : soja, colza, œuf ou même huile de poisson (Marinosomes® : liposomes réalisés avec de la lécithine marine [347]).

II/ Procédés de fabrication

La fabrication des liposomes implique une phase d'évaporation du solvant organique dans lequel sont dissous les PL, puis une phase de suspension du film de PL dans un milieu aqueux [33, 45]. Cette opération doit se dérouler dans des conditions de températures dépendant de la nature des PL choisis, puisque les liposomes ne se forment qu'à une température supérieure à leur transition de phase. Agiter le milieu permet souvent d'améliorer les résultats [282, 310].

Cette partie décrit différents modes opératoires de fabrication de liposomes, classés en fonction de la structure des vésicules obtenues.

II. 1) Préparation de MLV

Différentes techniques permettent d'obtenir des MLV, qui seront, par la suite, transformées en SUV ou LUV selon l'application et les besoins du projet. En effet, les MLV sont généralement caractérisées par une distribution de taille très grande, et un traitement physique doit leur être appliqué pour les transformer en vésicules de plus petite taille, de répartition plus homogène, et délimitées par une seule membrane.

Parmi les techniques de production de MLV peuvent être citées l'hydratation d'un film lipidique sec, l'hydratation de lipides dans un solvant, la méthode des cycles de congélation – décongélation ou encore la microfluidisation.

☞ *Hydratation d'un film lipidique sec*

Les PL sont dissous dans un solvant organique, cette solution étant ensuite placée dans un évaporateur rotatif. Cet appareillage permet l'évaporation du solvant, ce qui laisse un film lipidique sec sur les parois du flacon, constitué de bicouches phospholipidiques superposées. La solution aqueuse à encapsuler est ensuite ajoutée dans le flacon sous agitation. Le milieu aqueux conduit le film à gonfler, à se détacher, et enfin à se détacher (figure B-37) [33, 45, 281, 282, 452].

☞ *Hydratation de lipides dans un solvant organique*

Cette méthode consiste à préparer un mélange équimolaire d'une solution lipidique d'éther de pétrole (ou de diéthyléther) contenant des PL, et de la solution aqueuse à emprisonner. Les deux phases sont agitées fortement par vortex ou par sonication, pendant qu'un flux d'azote est insufflé dans le mélange. Tandis que le solvant organique est évaporé par le gaz porteur, des MLV sont formées dans la phase aqueuse [310].

☞ *Cycles congélation – décongélation*

Des MLV peuvent être obtenues par des cycles de congélation–décongélation d'une solution aqueuse contenant des PL. Après 5 cycles la distance entre les bicouches des MLV est grandement augmentée, permettant ainsi d'optimiser le volume d'encapsulation. Cette méthode se distingue par le fait qu'elle ne nécessite pas de solvant organique [45, 328].

☞ *Microfluidisation*

La méthode du microfluidiseur consiste à pomper une suspension de lipides dans une solution aqueuse, et à forcer son passage dans des filtres étroits, puis des microtunnels qui se rencontrent à angles droits. La haute pression générée par la pompe impose une grande vitesse au liquide, ce qui provoque des chocs à haut transfert d'énergie. Une population de liposomes de petit diamètre et de distribution homogène peut être obtenue en multipliant le nombre de recyclages de la solution dans l'appareil [310].

II. 2) Préparation de SUV

Classiquement, les MLV peuvent être soumises à des ultrasons, à une homogénéisation haute pression, à l'extrusion à travers une filière ou à la méthode d'injection de solvant pour obtenir des SUV [45, 310].

☞ **Sonication**

La méthode la plus répandue pour obtenir des SUV à partir de MLV est la sonication [45]. En effet, l'induction d'une haute énergie casse les bicouches en petits fragments. Quand les ultrasons sont stoppés, les fragments se réorganisent spontanément en SUV. Deux types d'appareillage existent, le sonicateur à bain, dans lequel une solution aqueuse de liposomes est dispersée dans le bain d'eau de la machine, ou la sonde à ultrasons, qui peut être introduite directement dans un flacon de MLV. Si le premier nécessite un temps long et génère un résultat qualitativement moyen, le second peut provoquer des ruptures de membrane, une montée en température et une dégradation générale des liposomes [45].

Un autre inconvénient de la sonication est la dégradation des composés d'intérêt. En effet, il a été démontré que la sonication dégradait plus de 90% de l' α -tocophérol intégré dans la membrane liposomale [45]. Dans le cas de l'utilisation de cette technique, il peut donc être nécessaire d'inclure des agents protecteurs dans la solution d'incubation des liposomes, comme du BHT ou de l'acide ascorbique [45].

☞ **Homogénéisation haute pression**

L'utilisation d'un homogénéisateur haute pression permet également d'obtenir des SUV à partir d'une solution de MLV. La température doit être supérieure à la transition de phase des liposomes pour permettre le réarrangement des membranes, et ainsi former des vésicules unilamellaires de petite taille [36].

☞ **Extrusion**

Cette méthode permet d'obtenir des SUV à partir de MLV, et ce, dans des conditions douces. Elle consiste à forcer le passage d'une solution de MLV à travers une filière. De multiples passages sont nécessaires pour arriver à une population homogène en taille. Néanmoins, cette méthode est simple, non destructrice et reproductible, et la taille finale des SUV peut être choisie en fonction des conditions de température et de pression, et selon le diamètre de la filière [45, 205, 327].

☞ **Injection de solvant**

Dans cette technique, une solution de lipides dissous dans un solvant miscible à l'eau (exemple : éthanol) est injectée dans un bain de solution aqueuse à l'aide d'une fine aiguille, ce qui provoque la formation de vésicules unilamellaires. Une autre approche peut être l'utilisation d'un solvant non-miscible à l'eau, tel que le diéthyléther. Le principe est le même, à la différence près que la pression est réduite de manière à aider l'évaporation du solvant. Cette dernière méthode donne lieu à des vésicules avec une plus grande capacité d'encapsulation, et l'élimination de l'éther est plus facile que celle de l'éthanol [45]. Néanmoins, la présence de ce solvant organique proscrit l'utilisation de cette méthode dans le cadre du présent projet de produit alimentaire.

II. 3) Préparation de LUV

De la même manière, les MLV peuvent être soumises à l'extrusion à travers des filtres, à la dialyse de détergent, à la méthode de dispersion-évaporation, à la double dispersion-évaporation, ou à des cycles de déshydratation-réhydratation pour obtenir des LUV [45].

☞ **Extrusion**

Selon le même principe que la méthode d'extrusion pour transformer des MLV en SUV, l'extrusion à travers des filtres permet d'obtenir des LUV à partir de MLV. Deux types de filtres existent, en polycarbonate ou en céramique [45].

Quand une suspension de MLV est forcée à passer à travers le filtre, les liposomes de diamètre supérieur à ceux des pores se cassent, et se reforment en vésicules unilamellaires en aval [347, 355, 452]. L'inconvénient majeur de l'utilisation des filtres en polycarbonate est le risque de colmatage des pores, du fait de la présence de constituants hydrophiles et hydrophobes dans la formulation des liposomes, en particulier lorsqu'elle comprend du cholestérol.

L'emploi de filtres en céramique asymétriques permet de passer outre cet inconvénient, en particulier en filtrant la suspension de MLV, alternativement dans le sens de rétrécissement des pores, puis dans l'autre sens. Ceci permet non seulement d'éviter le colmatage du filtre, mais aussi de recycler la suspension, de manière à obtenir une population de LUV de taille plus homogène [45].

☞ **Dialyse de détergent**

Cette méthode consiste à solubiliser des PL dans de l'eau à l'aide d'un détergent. Des micelles mixtes de lipides et de détergent se forment, qui se transforment en liposomes au fur et à mesure que le détergent est éliminé par dialyse. Les deux inconvénients principaux de cette technique sont, d'une part, la difficulté à éliminer la totalité du détergent, et d'autre part, le contact direct entre le principe actif et le solvant [45].

☞ **Dispersion – évaporation**

Dans cette technique, les PL sont dissous dans un solvant organique, solution dans laquelle une phase aqueuse est dispersée par agitation mécanique poussée. L'émulsion obtenue est débarrassée de la majorité du solvant par évaporation sous pression réduite, ce qui donne naissance à un gel. Une faible quantité de solution aqueuse est alors ajoutée, ce qui permet d'inverser le gel et d'obtenir des liposomes sous agitation lente. Le solvant restant est ensuite éliminé par dialyse ou par chromatographie, ce qui permet également d'éliminer les éventuelles traces de composé actif non encapsulé [45, 479].

☞ **Double dispersion – évaporation**

Cette méthode reprend le principe de la précédente, c'est-à-dire l'utilisation de l'interface d'une émulsion pour générer des liposomes. Ici, une émulsion triple eau/huile/eau est réalisée, dans laquelle la phase d'eau dispersée contient le principe actif à encapsuler, et la phase hydrophobe contient les PL solubilisés dans un solvant organique. Des liposomes sont obtenus par évaporation du solvant entre les deux phases aqueuses [45].

☞ **Déshydratation – réhydratation**

Cette méthode permet de transformer des SUV contenant déjà le principe actif en LUV, de manière à augmenter la capacité d'encapsulation des liposomes préexistants. Une suspension de SUV lyophilisés est réhydratée, ce qui provoque la fusion des SUV pour donner naissance à des LUV. L'inconvénient majeur de cette méthode est le risque de fuite du composé actif par dilution osmotique entre l'intérieur des SUV et la solution aqueuse utilisée pour la réhydratation [45].

III/ Application des liposomes, la vectorisation d'ingrédients

Des dizaines de milliers de brevets et de demandes de brevets ont été déposés concernant des liposomes. Ne seront cités ici que quelques exemples, de manière à illustrer les différents domaines d'application de ces vésicules.

III. 1) Origine des liposomes

Les brevets EU 0'160'286 [483] et EU 0'182'934 [159], intitulés respectivement « *Liposomes* » et « *New surfactants* » décrivent des liposomes dès les années 1980, tandis que le brevet EU 0'357'773 (1990) [486], « *Process for preparing liposomes* », décrit des méthodes de préparation.

III. 2) Formulations

L'Oréal a déposé une série de demandes de brevet concernant des systèmes de vectorisation d'ingrédients ou d'actifs. Le brevet WO 98/56333 [309] concerne une composition contenant un phospholipide organique capable de former une bicouche en solution aqueuse (de préférence la lécithine), un agent tensioactif amphotère (du type bêtaïnes, imidazolines ou autres), et un agent tensioactif non ionique (comme par exemple un acide gras). De préférence, la proportion de chacun de ces éléments est respectivement de 0-5%, 10-20% et 5-20% m/m. Ces compositions peuvent servir de transporteurs de matières lipophiles comme des huiles naturelles, qui sont alors solubilisées dans la membrane.

Les brevets US 6'524'614 [306] et WO 00/33798 [305] protègent des compositions identiques à celle de WO 98/56333 [309], mais qui contiennent, en plus, un quatrième élément : un polymère cationique qui contrôle le taux d'ingrédients liposolubles incorporés dans la bicouche.

Les brevets US 6'440'456 [307] et WO 00/74644 [308], appartenant à la même famille, concernent des compositions identiques à celle du WO 98/56333 [309], servant de systèmes de diffusion d'ingrédients

lipophiles, mais qui contiennent comme quatrième élément un agent de fixation qui stabilise la solution lipidique, comme par exemple l'hydroxyméthylcellulose ou un stéarate.

III. 3) Protection d'ingrédients

Différents brevets décrivent des liposomes destinés à la protection d'ingrédients spécifiques. Citons les brevets US 6'440'456 [307] pour des ingrédients lipophiles, WO 98/56333 [309] pour des composés insolubles dans l'eau, US 5'139'803 [350] et US 5'015'483 [349] pour la stabilisation de substances oxydables, 2003-003190 [525] pour des PUFA, EU 1'386'905 [241] pour du coenzyme Q réduit, EU 0'170'247 [484] et EU 0'615'747 [485] pour de l'hémoglobine.

III. 4) Vectorisation dans des aliments

Ces ingrédients protégés peuvent être incorporés dans des produits alimentaires, ce qui a fait l'objet de nombreux brevets. Par exemple, le brevet EU 0'455'386 [496] décrit une préparation de liposomes pour incorporer des vitamines C et E dans des produits à forte teneur en matière grasse, comme des chocolats ou des fourrages, tandis que le brevet 2003-003190 [525] revendique l'incorporation de PUFA dans des produits alimentaires, des boissons ou des médicaments.

III. 5) Vectorisation chez l'homme

Une autre application des liposomes est la vectorisation de substances actives dans l'organisme, que ce soit dans des solutions injectables ou dans des crèmes destinées au traitement de la peau. Le brevet EU 0'636'020 [390] propose ainsi un système de vectorisation de lipides à des fins pharmaceutiques, tandis que le brevet WO 00/33798 [305] et le brevet US 6'524'614 [306] décrivent le moyen d'incorporer des substances actives dans des crèmes dermatologiques. Le brevet EU 0'702'552 [391] traite de vésicules à noyau lipidique, délimitées par des monocouches successives de PL, comme vecteurs de molécules médicamenteuses, et les brevets US 5'653'998 [40] et EU 0'700'679 [39] proposent des liposomes utilisables en injection pharmacologique.

III. 6) Aide technologique

Les liposomes peuvent également servir d'aides technologiques. Par exemple, Cargill a déposé le brevet US 6'303'803 [78] (tout comme le brevet WO 98/33875 [77] de la même famille), qui décrit une méthode pour réduire le taux de stérols, comme le cholestérol, dans des produits gras ou à base d'huile du type beurre ou huile de poisson. Le procédé est basé sur l'affinité des stérols amphiphiles avec d'autres molécules de même comportement, présentes sous forme d'agrégats dans l'invention et capables de former des bicouches hydrophobes fluides, comme la lécithine, ce qui provoque la séquestration des stérols. Le domaine technique de ce brevet est l'agroalimentaire, et un des exemples cités concerne une préparation de PL capables de former des bicouches, mises en contact avec un produit alimentaire gras dans le but de diminuer la teneur en cholestérol de la matrice.

IV/ Discussion sur la technologie des liposomes

Même si les liposomes permettent de s'affranchir de beaucoup des contraintes identifiées dans le chapitre concernant la microencapsulation, certaines subsistent malgré tout, comme l'utilisation quasi obligatoire de solvants organiques.

Autre réserve, le fait que l'ingrédient à protéger soit hydrophobe implique qu'il soit inclus dans l'épaisseur de la bicouche phospholipidique, ce qui diminue grandement le rendement d'encapsulation par rapport à un composé hydrophile qui peut être incorporé à l'intérieur de la vésicule.

De plus, et comme cité dans le cas de la microencapsulation, les différents procédés de fabrication nécessitent tous une phase de contact entre le composé d'intérêt et l'eau, ce qui augmente le risque d'oxydation de l'huile de poisson.

Enfin, la polarité des vésicules obtenues engendre un autre problème. En effet, les liposomes peuvent être dispersés dans une solution hydrophile, mais pas hydrophobe, du fait de la position des PL, qui présentent leur tête polaire à l'extérieur de la bicouche. Ceci augmente d'autant plus le risque de

contact avec l'eau, et donc l'oxydation des lipides contenus dans les structures. De plus, dans un corps gras type St Hubert Oméga3, qui est le produit de la gamme de la société le plus proche de celui du projet en terme d'exigences nutritionnelles, la distribution de taille des gouttelettes de phase aqueuse est telle que 50% d'entre elles ont un diamètre inférieur à 5 μm . Ceci limite le diamètre que devront avoir les liposomes, d'une part, et risque de déstabiliser l'émulsion par encombrement stérique, d'autre part.

Au vu de toutes ces contraintes, il s'est avéré nécessaire au cours de la thèse d'envisager une nouvelle approche pour permettre l'encapsulation de l'huile de poisson, de manière à la protéger de l'oxydation, et en même temps de prévenir une dégradation organoleptique du produit, due à la production de composés volatils par contact eau-huile.

C. Le projet de thèse

« Chercher la vérité c'est comme cueillir des framboises : quand on n'aborde le buisson que sous un seul angle, on perd une bonne partie de la récolte. »

[R. Marlin]

LE PROJET DE THESE

La problématique de cette thèse, comme cité précédemment, est d'élaborer une formulation lipidique possédant un profil en acides gras optimal du point de vue nutritionnel, dans le but d'obtenir le maximum d'effets bénéfiques des lipides sur le système cardio-vasculaire, tout en conservant à la fois une bonne faisabilité industrielle et un profil organoleptique conforme au positionnement commercial.

Les verrous technologiques identifiés au cours de l'étude ont été les suivants:

- i) faire un compromis entre les exigences nutritionnelles et les contraintes techniques de manière à mettre au point un produit dans la cible de l'entreprise en terme de texture ;
- ii) incorporer la quantité nécessaire de LCPUFA *n-3*, sous forme d'huile de poisson, sans dégrader la saveur du produit ;
- iii) et assurer la stabilité dans le temps de ce produit, en particulier en protégeant ces nutriments d'intérêt de l'oxydation.

La résolution de ces verrous techniques a nécessité de conduire des études scientifiques incluant la relation entre formule en acides gras et texture, et deux problèmes fondamentaux mal résolus actuellement en ce qui concerne les lipides d'origine marine : leur particulière sensibilité à l'oxydation et leur contribution négative en matière de saveur.

Pour répondre à cette problématique industrielle et lever ces verrous, le travail de thèse a été organisé en quatre étapes.

Premièrement, le profil en acides gras du produit « optimal » a été déterminé sur la base de plusieurs études : tout d'abord, une analyse du marché des corps gras, qui a eu comme objectif principal l'identification de la concurrence dans le secteur des corps gras orientés « oméga 3 » ; Puis une étude bibliographique de la composition en acides gras de plusieurs dizaines d'huiles végétales et d'huiles de poissons et organismes marins, permettant de classer ces huiles en fonction de leur potentiel nutritionnel ; Enfin, le profil en acides gras du produit a été élaboré en relation avec les recherches effectuées sur l'impact des acides gras sur le développement des maladies cardio-vasculaires, et en prenant en compte la faisabilité technique, que ce soit en terme de texture, de disponibilité de matières premières, ou encore d'environnement concurrentiel.

La deuxième étape a été consacrée à l'élaboration du produit alimentaire, ce qui a donné lieu à deux études menées en parallèle : la première a été consacrée à la texture et à la cristallisation des matières grasses, car la volonté de diminuer au maximum le taux d'acides gras saturés s'est heurté à la cible de dureté et de rendu en bouche imposée par les standards de l'entreprise ; la seconde a concerné la saveur du produit. En effet, la formulation a été élaborée de manière à diminuer au maximum l'impact organoleptique négatif de l'huile de poisson, de par la maîtrise de l'oxydation des lipides polyinsaturés marins et de leur contact avec l'eau.

La troisième étape de la thèse a été consacrée à la mise au point d'un procédé innovant de vectorisation et de protection des nutriments d'intérêt, dans le but de limiter le développement des composés volatils au cours du vieillissement du produit. Il s'agissait d'abord de protéger l'huile de poisson du contact avec l'eau, et enfin de ralentir les réactions d'oxydation des acides gras hautement polyinsaturés.

Enfin, la dernière étape de la thèse a consisté en une étude de la biodisponibilité des acides gras chez l'animal. A cet effet, l'absorption, le stockage et le métabolisme des acides gras d'intérêt ont été étudiés chez le rat, nourri avec le produit alimentaire mis au point. Ce régime a été confronté à deux autres produits, l'un contenant en majorité des acides gras de la famille *n-6*, et l'autre contenant des acides gras *n-3* uniquement sous la forme d'ALA, le précurseur des polyinsaturés à longues chaînes de cette série.

D. Bases de la formulation

*« S'il n'y a pas de solution, c'est qu'il n'y a pas de problème. »
[Proverbe Shadok]*

LES CORPS GRAS DE 3^{EME} GENERATION

La première partie du manuscrit a été consacrée à l'état de l'art sur l'impact des acides gras alimentaires, et en particulier ceux de la famille *n-3* (ALA, EPA et DHA) sur le développement des pathologies cardio-vasculaires, ainsi qu'à la présentation de différents types de procédés de protection des corps gras. Cette deuxième partie présente les résultats de plusieurs études bibliographiques ayant permis d'aboutir à la mise au point du profil en acides gras du produit cible.

Dans ce chapitre, les différents types de corps gras « non beurre » sont présentés, ainsi que l'évolution récente du marché vers des produits de plus en plus axés santé. Le chapitre suivant présente une étude de la composition en acides gras de plusieurs dizaines d'huiles végétales et de poissons et autres organismes marins. Il est suivi par un chapitre qui décrit les ingrédients et le procédé de fabrication des corps gras chez St Hubert. Enfin, la dernière partie est consacrée à l'établissement du profil en acides gras du produit, en relation avec l'étude bibliographique présentée « Pathologies liées au métabolisme des lipides » (chapitre B).

I/ Introduction

De son positionnement initial de substitut à bas prix du beurre, la margarine a largement évolué durant ces vingt-cinq dernières années. Plusieurs générations de produits se sont succédé, orientées respectivement vers le plaisir, l'équilibre des apports lipidiques, et plus récemment vers des problématiques de santé.

Ce chapitre présente dans un premier temps un bref historique de la margarine, suivi d'une présentation globale du marché des corps gras « non beurre barquettes » (hors huiles), de la description des trois générations successives de produits, et se termine par un instantané du marché français des corps gras, segment « oméga3 ».

I. 1) Historique

Si les corps gras sont consommés par les hommes depuis des temps très anciens, leur utilisation a largement évolué au fil des siècles.

Aux XIV^e et XV^e siècles, le bacon, le lard et les autres graisses animales sont utilisés comme corps gras [105]. Le beurre est délaissé par la grande cuisine qui lui préfère l'huile pour les jours maigres, et le lard pour les jours gras. Ce n'est qu'au début du XV^e siècle que le beurre apparaît dans les recettes, en particulier avec les poissons, les crevettes et les amandes. A cette époque, les plats sont principalement composés de viande, et accompagnés de sauces. Celles-ci se composent d'ingrédients acides comme les vinaigres ou les jus d'agrumes, auxquels sont ajoutées des épices, mais très peu de graisse.

Aux XVI^e et XVII^e siècles, la cuisine « grasse » est synonyme de richesse, de plaisir et d'abondance, « Sans graisse, pas de goût » disait-on [105], ou encore « On ne gâte pas la semoule avec du beurre » [173]. L'élaboration croissante de sauces à base de lipides au XVI^e siècle correspond à l'apparition d'un nouvel usage alimentaire : la consommation d'oignons et de pain frits [105]. En France comme en Angleterre, davantage de plats contiennent du beurre, mais celui-ci est encore considéré comme un ingrédient populaire et bas de gamme. Ce scepticisme à l'égard des graisses est visible dans les recettes des XVI^e et XVII^e siècles, où les corps gras sont très peu cités.

Néanmoins, c'est à cette époque que l'assaisonnement acide et épicé du Moyen-Orient est substitué par un assaisonnement gras, plus neutre vis-à-vis de la saveur propre des aliments. Au XVIII^e siècle, le beurre et l'huile commencent seulement à être considérés comme de véritables aliments [105].

A partir du XIX^e siècle, les corps gras prennent de l'importance au fur et à mesure du développement de l'industrialisation, de l'augmentation de l'offre, et de l'amélioration de la qualité des repas [105]. En 1866, Napoléon III organise un concours original pour l'invention d'un corps gras « sain, économique et de bonne conservation », destiné à la Marine et à l'Armée, qui ne peuvent conserver le beurre dans de bonnes conditions pendant la durée de leurs campagnes [498].

C'est un pharmacien français, Hippolyte Mège-Mouriès (1817-1880), qui gagne ce concours en inventant la margarine en 1869. Appelée à l'origine « oléo-margarine », elle devient par la suite

« margarine Mouriès », puis « margarine ». Ce nom de margarine provient de l'acide gras découvert par Eugène Chevreul, qu'il avait baptisé acide margarique (17:0) [498].

En 1871, Mège-Mouriès vend son procédé à un important négociant de beurre hollandais qui est aussitôt imité par son voisin et concurrent Van den Bergh. Le succès des deux industriels est tel qu'en 1895 la production mondiale de margarine atteint 300 000 tonnes, c'est-à-dire environ 10% de la production de beurre [105].

En France, les débuts de la margarine sont modestes du fait de l'opposition des producteurs de beurre. Pourtant, en 1969, à la date anniversaire du dépôt du brevet, la production mondiale de margarine rejoignait pratiquement celle du beurre, avec 5 millions de tonnes [105].

I. 2) Définitions

La margarine est une émulsion de type eau dans huile, c'est donc une dispersion de fines gouttelettes d'eau dans une phase continue d'huile. Cette phase continue est constituée d'une fraction solide, qui constitue un réseau cristallin tridimensionnel organisé en feuillets superposés ou en agrégats de cristaux, et d'une fraction liquide piégée dans ce réseau [498]. L'intégrité de la structure est due à des liaisons covalentes irréversibles et à des liaisons secondaires réversibles (forces de Van der Waals) à l'intérieur du réseau [498]. La phase lipidique contient, outre les matières grasses, des ingrédients liposolubles, comme des caroténoïdes, des arômes et des émulsifiants, et la phase aqueuse contient des arômes, des conservateurs et du sel.

La fabrication de la margarine est réalisée selon la succession d'étapes suivante : la préparation des phases grasse et aqueuse, l'émulsification, la cristallisation, le conditionnement et le stockage au froid.

Un décret européen (CE 2991/94) [121] prévoit les différentes appellations autorisées pour les corps gras selon la nature des matières grasses utilisées et le taux de lipides, qui sont résumées dans le tableau D-I.

Tableau D-I : Appellation des corps gras en fonction de (A) : leur taux de matière grasse total et (B) : le taux de matière grasse animale dans la phase grasse [d'après 121].

Abréviation : MG : matière grasse.

A \ B		B		
		0 à 3%	10 à 80%	80 à 90%
80 à 90%		margarine	MG composée	beurre
60 à 62%		¾ margarine ou margarine allégée	¾ MG composée	¾ beurre ou beurre allégé
39 à 41%		½ margarine ou margarine light	½ MG composée ou MG composée light	½ beurre ou beurre light
x < 39%				
41 > x > 60%		MG à tartiner à x%	mélange de MG à tartiner à x%	MG laitière à tartiner à x%
62 > x > 80%				

Cependant cette législation ne prend pas en compte tous les types de produits. En effet, des corps gras comme le St Hubert 41 ne rentrent dans aucune catégorie, puisqu'ils contiennent des teneurs en matière grasse animale comprises entre 3 et 10%.

II/ Le marché des corps gras « non beurre »

Depuis quelques années, le secteur des corps gras « non beurre » tend à se consolider, et les différents acteurs qui le composent adoptent, en général, des démarches de recentrage sur leur cœur de métier.

Les habitudes alimentaires des consommateurs ayant évolué suite aux messages puissamment relayés de prévention nutritionnelle, la consommation des corps gras décline dans les pays industriels depuis plusieurs décennies. Cependant, les industriels ont su réagir, en optimisant les formulations, et en proposant des produits de plus en plus marketés « santé ». Ainsi, une attention toute particulière est portée aux lipides insaturés, comme aux produits à visée curative, tels que les anticholestérol à base de stérols et stanols végétaux.

La figure D-1 présente la répartition de la production de corps gras « non beurre », exprimée en tonnage, selon les données de 2003.

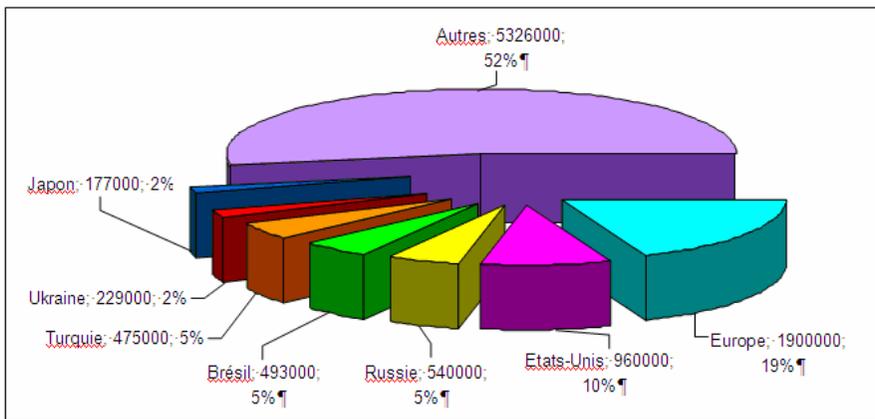


Figure D-1 : Production mondiale de corps gras « non beurre » en 2003, exprimée en tonnes [196].

Légende : pays producteur ; tonnage ; proportion de la production mondiale.

La production européenne de corps gras « non beurre » représente moins de 20% de la production mondiale, alors qu'elle représentait une proportion plus importante dans les années précédentes [196]. Ce recul s'explique, d'une part, par la baisse de la consommation, et, d'autre part, par la chute des exportations vers la Russie. En effet, ce pays a vu sa propre production augmenter largement, passant de 210 000 tonnes en 1998 à 540 000 tonnes en 2003 [196]. L'Ukraine a connu la même évolution, sa production ayant augmenté de 135% entre 1998 et 2003, pour atteindre 229 000 tonnes [196].

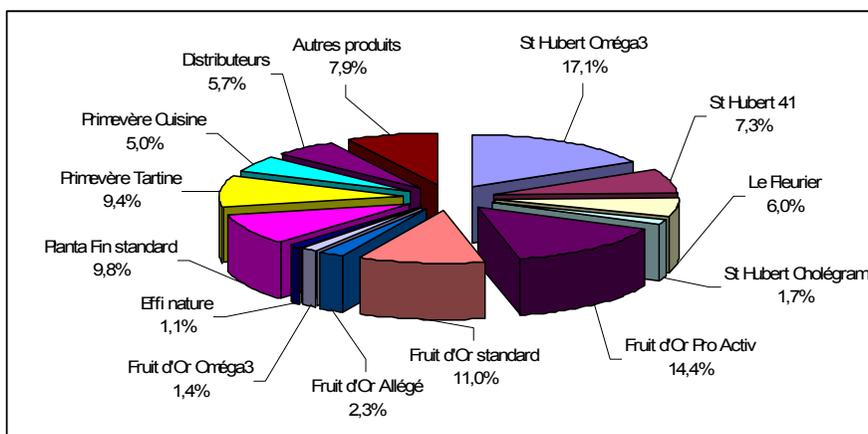


Figure D-2 : Segmentation du marché français des corps gras « non beurre », exprimée en parts de marché valeur (Mars 2007, source : Panel distributeur IRI).

En France, le marché des corps gras « non beurre » est réparti entre trois marques principales, Unilever, St Hubert et Primevère. Le premier représente 44,2% des parts de marché en valeur, avec les marques Fruit d'Or, Planta Fin et Effi, St Hubert suit avec 34,2% des parts, et Primevère ferme la marche avec 15,6% [Panel distributeur IRI, mars 2007].

Les produits les plus présents sur le marché sont St Hubert Oméga3 -17,1%-, Fruit d'Or Pro Activ -14,4%-, Fruit d'Or standard -11%-, Planta Fin standard -9,8%-, Primevère tartine et son homologue cuisine -9,4 et 5%-, et enfin St Hubert 41 -7,3% et Le Fleurier -6% (figure D-2) [Panel distributeur IRI, mars 2007].

Les produits cités peuvent être classés en fonction du message mis en avant, que ce soit des corps gras à bas prix (Fruit d'Or standard), des corps gras « plaisir » (Le Fleurier), des produits axés

« équilibre des apports lipidiques » (St Hubert Oméga3) et des corps gras axés « santé active » (Fruit d'Or Pro Activ, Cholegram). Les trois derniers groupes correspondent aux différentes générations de corps gras qui se sont développées ces dernières années, et qui sont décrites dans le paragraphe suivant.

III/ Les trois générations de corps gras « non beurre »

III. 1) Présentation des générations de produits

La première génération regroupe des produits « plaisir », dont le but est de concurrencer le beurre en terme de qualités organoleptiques, tout en ayant un taux de matière grasse inférieur.

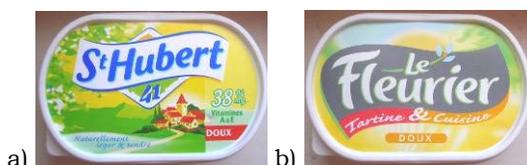


Figure D-3 : Produits de l'entreprise St Hubert correspondant à la première génération de corps gras « non beurre ».

Ainsi, des produits à base mixte, contenant des matières grasses végétales et animale, ont vu le jour, comme le St Hubert 41 ou Le Fleurier (utilisation de beurre, de matière grasse laitière anhydre (MGLA), ou encore de babeurre mûré).

Avec l'intérêt grandissant pour la santé publique et la prise de conscience de l'importance de la nutrition dans la prévention des pathologies cardio-vasculaires, les industriels ont été amenés à améliorer les qualités nutritionnelles de leurs produits.



Figure D-4 : Produit St Hubert de la deuxième génération de corps gras « non beurre ».

La deuxième génération de corps gras se caractérise donc par un enrichissement en nutriments essentiels (produits enrichis en acides gras précurseurs, LA et ALA), une diminution du taux d'acides gras *trans* (due aux inquiétudes concernant l'implication de ces acides gras dans le développement des maladies cardio-vasculaires [249, 377]), la réduction des SFA, et l'amélioration du ratio *n-6/n-3*.

Ces améliorations ont été provoquées par la législation, qui, avec la mise en place du système des allégations, a permis aux fabricants de communiquer sur les avantages santé de leurs produits. Le St Hubert Oméga 3 est un exemple de cette évolution.

Parallèlement à cette génération de produits destinés à rééquilibrer les apports nutritionnels de la population générale, des corps gras de troisième génération ont vu le jour.



Figure D-5 : Produits St Hubert de la troisième génération de corps gras « non beurre ».

Ce sont des produits à visée préventive ou/et curative, contenant des ingrédients spécifiques, actifs sur la santé. Deux grandes catégories existent actuellement sur le marché, avec, d'un côté, les corps gras aux phytostérols et stanols, destinés à diminuer le taux de LDL-cholestérol en limitant

l'absorption du cholestérol alimentaire, et de l'autre, les corps gras contenant des LCPUFA $n-3$ (EPA et DHA), à visée cœur et cerveau. La gamme St Hubert Cholégram illustre la première de ces catégories, tandis que la deuxième n'est représentée par aucun produit à l'heure actuelle.

III. 2) Panorama du marché des corps gras santé

Le tableau D-II ci-après présente le marché français des corps gras dont la communication est axée sur les AG $n-3$. Ces produits font donc partie de la deuxième génération. Cet instantané du marché est de juillet 2007.

Dans ce tableau, les valeurs entre parenthèses représentent les taux estimés de LCPUFA, quand le produit ne détaille pas la proportion des différents PUFA $n-3$ à longue chaîne, EPA et DHA. L'estimation a été effectuée en fonction du ratio moyen EPA/DHA des huiles de poisson disponibles à l'échelle industrielle (60% d'EPA, 40% de DHA).

Tableau D-II : Présentation du marché français des corps gras segment « oméga3 ».

Produit	Visuel	Liste d'ingrédients	MG (%)	SFA (g/100)	MUFA (g/100)	PUFA (g/100)	LA (g/100)	ALA (g/100)	n-6/n-3	LC n-3 (g/100)	EPA (g/100)	DHA (g/100)
Fruit d'Or doux (Unilever)		Huiles végétales non hydrogénées 60%, eau, sel (0,4%), émulsifiants (lécithine de tournesol, mono et diglycérides d'acides gras), poudre de babeurre (lait), conservateur (sorbate de potassium), correcteur d'acidité (acide citrique), arômes, vitamine E, colorant (bêta-carotène).	60%	13,4	17,8	28,8	23,8	5	4,8	0	0	0
Fruit d'Or Oméga3plus (Unilever)		Huiles non hydrogénées 50% (dont huiles végétales 48,8% et huile de poisson 1,2%), eau, sel (0,3%), amidon modifié de tapioca, émulsifiants (lécithine de soja, mono et diglycérides d'acides gras), conservateur (sorbate de potassium), correcteur d'acidité (acide citrique), antioxydant (extrait riche en tocophérols), vitamine E, arômes, colorant (bêta-carotène).	50%	11	24	15	11	3	3,7	0,54	0,27	0,18
Fruit d'Or allégé (Unilever)		Huiles végétales non hydrogénées 50% (colza, tournesol, palme, coprah/palmiste), eau, émulsifiants (lécithine de tournesol, mono et diglycérides d'acides gras), sel (0,3%), amidon de maïs, conservateur (sorbate de potassium), correcteur d'acidité (acide citrique), arômes, vitamine E, colorant (bêta-carotène).	50%	10,6	21,6	17,8	15,3	2,5	6,1	0	0	0
Planta Fin Idea! (Unilever)		Eau, huiles végétales en l'état et hydrogénées, amidon modifié, huile de poisson, lait fermenté en poudre, émulsifiants (mono et diglycérides d'acides gras, lécithine de tournesol), sel (0,3%), conservateur (sorbate de potassium), correcteur d'acidité (acide citrique), arômes, antioxydants (extrait riche en tocophérols, calcium disodium EDTA), vitamines E et A, colorant (bêta-carotène).	39%	9,2	18,2	11	(8)	2,5	(3,2)	0,5	(0,3)	(0,2)
St Hubert Oméga3 (St Hubert)		Huiles végétales non hydrogénées 59% (colza, palmiste, tournesol, palme), eau, émulsifiants végétaux (mono et diglycérides d'acides gras et lécithine de soja), sel (0,4%), arômes, conservateur (sorbate de potassium), correcteur d'acidité (acide lactique), colorant (bêta-carotène).	59%	16,4	31,2	11,2	(8,12)	2,9	2,8	0	0	0

Abréviations : MG : taux de matière grasse (% m/m), SFA : acides gras saturés, MUFA : acides gras monoinsaturés, PUFA : acides gras polyinsaturés, LA : acide linoléique, ALA : acide α -linoléique, n-6/n-3 : ratio LA/ALA, LCn-3 : acides gras polyinsaturés n-3 longue chaîne, EPA : acide eicosapentaénoïque, DHA : acide docosahexaénoïque.

Tableau D-II : (suite).

Produit	Visuel	Liste d'ingrédients	MG (%)	SFA (g/100)	MUFA (g/100)	PUFA (g/100)	LA (g/100)	ALA (g/100)	n-6/n-3	LC n-3 (g/100)	EPA (g/100)	DHA (g/100)
Primevère double effet spécial cuisson (Cema)		Huiles végétales non hydrogénées 63% (colza, palme, carthame, palmiste, tournesol oléique, tournesol, olive), eau, émulsifiants (mono et diglycérides d'acides gras, lécithine de soja, esters citriques de mono et diglycérides d'acides gras), sel (0,25%), lait écrémé en poudre, conservateur (sorbate de potassium), arômes, antioxydant (extrait riche en tocophérols), correcteur d'acidité (acide citrique), vitamine E, colorant (bêta-carotène).	63%	14,5	31,6	16,6	13,4	3,2	4,2	0	0	0
Primevère double effet tartine (Cema)		Huiles non hydrogénées 59% (soja, colza, palme, carthame, poisson), eau, émulsifiants (mono et diglycérides d'acides gras, lécithine de soja), sel (0,4%), arômes (lait), conservateur (sorbate de potassium), antioxydant (extrait riche en tocophérols), correcteur d'acidité (acide citrique), vitamine E, colorant (bêta-carotène).	59%	13,1	21	24,4	21,3	2,7	7,9	0,4	(0,25)	(0,15)
Primevère double effet de table (Cema)		Huiles non hydrogénées 59% (soja, colza, palme, carthame, poisson), eau, émulsifiants (mono et diglycérides d'acides gras, lécithine de soja), sel (0,4%), arômes (lait), conservateur (sorbate de potassium), antioxydant (extrait riche en tocophérols), correcteur d'acidité (acide citrique), vitamine E, colorant (bêta-carotène).	59%	13,1	21	24,4	21,3	2,7	7,9	0,4	(0,25)	(0,15)
Primevère double effet tartines légères 25% MG (Cema)		Eau, huiles et graisses en l'état non hydrogénées 25% (colza, palme, tournesol, palmiste), émulsifiants (mono et diglycérides d'acides gras, polyricinoléate de polyglycérol), sel (0,5%), épaississant (pectine), conservateur (sorbate de potassium), arômes, correcteur d'acidité (acide citrique), antioxydant (extrait riche en tocophérols), vitamine E, colorant (bêta-carotène).	25%	5,5	12,5	6,7	5,4	1,3	4,2	0	0	0
Elle&Vire Oméga 3 (Elvir)		Eau, matière grasse de lait, amidon modifié, lactose, maltodextrine, émulsifiants (mono et diglycérides d'acides gras, esters citriques de mono et diglycérides d'acides gras, polyricinoléate de polyglycérol), sel (0,4%), conservateur (sorbate de potassium), colorant (bêta-carotène), vitamine E, vitamine A.	41%	25,8	13,1	2,1	(0,81)	0,3	2,7	0	0	0

Abréviations : MG : taux de matière grasse (% m/m), SFA : acides gras saturés, MUFA : acides gras monoinsaturés, PUFA : acides gras polyinsaturés, LA : acide linoléique, ALA : acide α -linoléique, n-6/n-3 : ratio LA/ALA, LCn-3 : acides gras polyinsaturés n-3 longue chaîne, EPA : acide eicosapentaénoïque, DHA : acide docosahexaénoïque.

Tableau D-II : (suite).

Produit	Visuel	Liste d'ingrédients	MG (%)	SFA (g/100)	MUFA (g/100)	PUFA (g/100)	LA (g/100)	ALA (g/100)	n-6/n-3	LC n-3 (g/100)	EPA (g/100)	DHA (g/100)
Matière grasse à tartiner riche en oméga 3 (Auchan)		Huiles végétales en l'état et hydrogénées 59% (colza, palmiste), eau, émulsifiants (mono et diglycérides d'acides gras), poudre de lait écrémé, sel (0,4%), arôme, conservateur (sorbate de potassium), acidifiant (acide citrique), vitamine E, colorants (caroténoïdes mélangés naturels).	59%	15	29	14	(11)	3	(3,7)	0	0	0
Naturellement riche en Oméga3 (Cora)		Huiles et graisses végétales non hydrogénées 59% (colza, palmiste, tournesol, palme), eau, émulsifiants (mono et diglycérides d'acides gras, lécithine de soja), sel (0,4%), lait écrémé en poudre, conservateur (sorbate de potassium), arômes (lait), correcteur d'acidité (acide lactique), antioxydant (extrait riche en tocophérols), colorant (bêta-carotène).	59%	17	26,9	15,1	11,9	3,2	3,7	0	0	0
Naturellement riche en Oméga 3 (U)		Matières grasses végétales en l'état 59% (colza, palme), eau, sel marin, émulsifiants (esters citriques de mono et diglycérides d'acides gras), conservateur (sorbate de potassium), arôme, correcteur d'acidité (acide citrique), vitamine E, colorant (bêta-carotène).	59%	16,6	29,8	12,6	10,1	2,5	4,0	0	0	0
Bouton d'Or Oméga3 (Intermarché)		Matières grasses végétales en l'état et non hydrogénées 59%, eau, sel marin (0,75%), émulsifiants (esters citriques de mono et diglycérides d'acides gras), arôme, conservateur (sorbate de potassium), correcteur d'acidité (acide citrique), vitamine E, colorant (bêta-carotène).	59%	16,7	30	12,7	10,2	2,5	4,1	0	0	0
Tartine et Cuisson Omega3 (Carrefour)		Huiles et graisses en l'état et hydrogénées 60% (colza, palme, palmiste), huile de poisson, eau, émulsifiant (esters citriques de mono et diglycérides d'acides gras), sel (0,3%), arômes, conservateur (sorbate de potassium), acidifiant (acide citrique), vitamine E, colorants (caroténoïdes mélangés naturels).	60%	12	31,5	15,5	11,5	4	2,9	(0,32)	(0,18)	0,14

Abréviations : MG : taux de matière grasse (% m/m), SFA : acides gras saturés, MUFA : acides gras monoinsaturés, PUFA : acides gras polyinsaturés, LA : acide linoléique, ALA : acide α -linoléique, n-6/n-3 : ratio LA/ALA, LCn-3 : acides gras polyinsaturés n-3 longue chaîne, EPA : acide eicosapentaénoïque, DHA : acide docosahexaénoïque.

Tableau D-II : (suite).

Produit	Visuel	Liste d'ingrédients	MG (%)	SFA (g/100)	MUFA (g/100)	PUFA (g/100)	LA (g/100)	ALA (g/100)	n-6/n-3	LC n-3 (g/100)	EPA (g/100)	DHA (g/100)
Nadya Tournesol allégée (Leclerc)		Huiles et graisses végétales 59% (tournesol, colza, palme, palmiste), eau, émulsifiants (esters citriques de mono et diglycérides d'acides gras), sel (0,4%), lait écrémé en poudre, arômes, conservateur (sorbate de potassium), correcteur d'acidité (acide citrique), vitamine E, antioxydant (extrait riche en tocophérols), colorant (bêta-carotène).	55%	13	19,5	22	20,6	1,4	14,7	0	0	0
Margarine allégée riche en Oméga3 (Champion)		Huiles et graisses en l'état et hydrogénées 59% (colza, palme, palmiste, huile de poisson), eau, émulsifiants (esters citriques de mono et diglycérides d'acides gras), sel (0,3%), arômes, conservateur (sorbate de potassium), acidifiant (acide citrique), vitamine E, colorants (caroténoïdes mélangés naturels).	60%	12	31,5	15,5	11,5	4	2,9	(0,32)	(0,18)	0,14
naturellement riche en Oméga3 (Casino)		Huiles et graisses végétales non hydrogénées 59% (colza, palmiste, tournesol, palme), eau, émulsifiants (mono et diglycérides d'acides gras, lécithine de soja), sel (0,4%), lait écrémé en poudre, conservateur (sorbate de potassium), arômes naturels (dont lait), correcteur d'acidité (acide lactique), antioxydant (extrait riche en tocophérols), colorant (bêta-carotène).	59%	17	26,9	15,1	11,9	3,2	3,7	0	0	0
Mon Equilibre, Riche en Omega 3 (Monoprix)		Huiles et graisses végétales non hydrogénées 59% (colza, palmiste, tournesol, palme), eau, émulsifiants (mono et diglycérides d'acides gras, lécithine de soja), sel (0,4%), lait écrémé en poudre, conservateur (sorbate de potassium), arômes naturels (lait), correcteur d'acidité (acide lactique), antioxydant (extrait riche en tocophérols), colorant (bêta-carotène).	59%	17	27	15	12	3,2	3,8	0	0	0
Vifine Riche en Omega 3 (ED)		Huiles et graisses végétales en l'état et hydrogénées 60% (colza, palme, palmiste), eau, huile de poisson, émulsifiants (esters citriques des mono et diglycérides d'acides gras), sel (0,3%), conservateur (sorbate de potassium), arômes, acidifiant (acide citrique), vitamine E, colorants (mélange de caroténoïdes).	60%	12	31,5	15,5	11,5	4	2,9	(0,32)	(0,18)	0,14

Abréviations : MG : taux de matière grasse (% m/m), SFA : acides gras saturés, MUFA : acides gras monoinsaturés, PUFA : acides gras polyinsaturés, LA : acide linoléique, ALA : acide α -linoléique, n-6/n-3 : ratio LA/ALA, LCn-3 : acides gras polyinsaturés n-3 longue chaîne, EPA : acide eicosapentaénoïque, DHA : acide docosahexaénoïque.

Le marché français des corps gras « oméga3 » comprend 20 produits (à la date de l'étude), répartis en 10 produits à marque et 10 produits de marque de distributeur. Unilever et Cema proposent chacun 4 références, Fruit d'Or, Fruit d'Or léger, Fruit d'Or Omega3plus et Planta Fin Idea pour le premier, et Primevère double effet tartine, tartine léger, cuisine et de table pour le second. Elvir communique sur le taux d'AG *n-3* d'un beurre, tandis que St Hubert propose une référence, St Hubert Omega3. Parmi les distributeurs sont retrouvés Auchan, Cora, Système U, Intermarché, Carrefour, Leclerc, Champion, Casino, Monoprix et ED.

Parmi ces produits, 7 contiennent des LCPUFA *n-3*, issus d'huile de poisson : Fruit d'Or Omega3plus, Planta Fin Idea, Primevère double effet tartine et de table, ainsi que les produits de Carrefour, Champion et ED. Le taux de LCPUFA est compris entre 0,3 g/100 g pour les marques de distributeur et 0,54 g/100 g pour Fruit d'Or Omega3plus.

Concernant les additifs, tous ces produits contiennent des antioxydants, en particulier des tocophérols, complétés par du calcium disodium EDTA (éthylène-diamine-tétra-acétate de calcium disodium, E 385) dans le cas de Planta Fin Idea. Seul ce produit est autorisé à utiliser cet additif, puisque la législation française restreint l'emploi de cette molécule aux demi-margarines, c'est-à-dire aux corps gras de 39 à 41% de matière grasse, dont 0 à 3% de matière grasse animale [119].

Enfin, concernant le ratio *n-6/n-3*, le produit ayant le rapport le plus faible est St Hubert Omega3, avec 2,8 (le seul beurre de la liste a été écarté, l'apport en LA et ALA de ce produit étant largement inférieur à celui des matières grasses végétales).

LES MATIERES PREMIERES : LES HUILES

Avec ce nouvel intérêt pour les acides gras individualisés, les industriels de l'agroalimentaire sont à la recherche d'huiles particulières pour optimiser le « profil gras » de leurs produits. Un nouveau marché émerge, avec des fournisseurs qui proposent de plus en plus d'huiles spécifiques, chacune ayant une composition en acides gras particulière.

Ce chapitre présente la composition en acides gras d'un grand nombre d'huiles végétales et animales (poissons et autres organismes marins), rassemblées selon leur profil général, et interprétées selon l'impact de leurs acides gras majoritaires sur les lipides sanguins.

La dernière partie du chapitre décrit les composés volatils principaux impliqués dans l'odeur de poisson.

I/ Composition en acides gras des huiles végétales

Les huiles végétales produites dans le monde sont à 80% utilisées pour l'alimentation humaine [179]. Fractionnées, hydrogénées, mélangées, leur composition naturelle en acides gras est modifiée. Le tableau D-III montre une estimation de la production mondiale, exprimée en acides gras individuels, avant et après les traitements d'hydrogénation (partielle ou totale).

Tableau D-III : Production mondiale d'acides gras utilisables en alimentation humaine (chiffres 2004-2005) [d'après 179].

*Symbole : * : contient des isomères de configuration et de position après hydrogénation partielle.*

Acide gras	Production mondiale pour alimentation humaine (10 ⁶ T)		
	Avant hydrogénation	Après hydrogénation	Différence
12:0	2,0	2,0	-
14:0	1,8	1,8	-
16:0	21,7	21,7	-
18:0	5,5	5,9	+ 7,3%
18:1 *	38,4	48,8	+ 27,1%
18:2 n-6	31,9	23,8	- 25,4%
18:3 n-3	3,5	0,8	- 77,1%
Autres	3,9	3,9	-

L'hydrogénation des huiles végétales conduit à une production accrue d'OA, aux dépens des acides gras essentiels, LA et ALA. La perte en précurseur de la famille des n-3 est dramatique, plus de 75% de la production de cet acide gras étant éliminée par les traitements d'hydrogénation. Le ratio n-6/n-3 passe ainsi de 9 à 30, ce qui traduit un large déficit en ALA [179].

Cette perte en acides gras d'intérêt rend la recherche de sources d'ALA d'autant plus importante.

Les recherches bibliographiques effectuées sur les huiles végétales ont permis de créer une base de données contenant les compositions en acides gras de 80 huiles végétales, regroupées en classes de même profil général en acides gras.

Les huiles ont été sélectionnées par une recherche sur Science Direct, en utilisant des mots-clés tels que « profil en acides gras », « huiles végétales », ou encore « composition en lipides des huiles ». Seules les données complètes issues de publications scientifiques ont été incluses dans l'analyse, certains auteurs n'ayant en effet étudié qu'un type d'acides gras, comme les PUFA. C'est pourquoi, des huiles mineures, mais disponibles dans des circuits de distribution « diététiques », peuvent ne pas être incluses, tandis que d'autres, non disponibles, le sont.

Les huiles les plus largement utilisées actuellement dans le monde sont les huiles de soja, palme, colza et tournesol [252]. Parmi elles, les huiles de soja et de colza apportent des quantités

intéressantes d'ALA (respectivement 7,8% et 9,9%), l'acide gras qui est considéré comme le plus déficient par les agences sanitaires européennes [287]. Pour permettre l'identification de toutes les huiles potentiellement intéressantes dans la classification qui suit, un sous-groupe a été créé dans chaque groupe contenant des huiles avec plus de 7,8% d'ALA. La teneur en ALA de l'huile de soja est donc utilisée ici comme un seuil au dessus duquel une huile devient particulièrement intéressante du point de vue nutritionnel.

En dehors de la problématique du « statut inflammatoire » imposé par les proportions respectives en composés des familles *n-3* et *n-6*, l'effet principalement reconnu des acides gras sur la santé est l'impact sur les lipides sanguins. Ces paramètres (LDL-, HDL-cholestérol et TAGp) sont étroitement surveillés par le corps médical, car ils sont facilement mesurables, et ont tous été démontrés comme étant des facteurs de risque indépendants des accidents cardio-vasculaires [106, 124, 134, 160, 226, 262, 430, 473]. Ce sont donc ces deux points, action sur la lipémie sanguine et ratio *n-6/n-3*, qui seront utilisés comme des clés pour interpréter chaque groupe d'huiles.

I. 1) Groupe acides gras saturés

1) Sous-groupe acide caprique

Ce type de profil n'est pas courant. En effet, seules deux huiles ont été incluses dans ce groupe : deux sous-espèces de *Cupheae* (*Cuphea ilavea* et *leptopoda* [436]). Elles contiennent majoritairement des SFA à courte chaîne, en particulier de l'acide caprique (10:0), jusqu'à 92% pour *Cuphea leptopoda*. Leur profil est intéressant dans le cas d'un besoin de lipides rapidement convertis en énergie [176, 264].

2) Sous-groupe acides laurique et myristique

Les huiles de noix de coco (*Cocos nucifera* [75, 284, 382, 530]) et de palmiste (*Elaeis guineensis* [43, 382]) ont deux profils semblables, incluant une majorité de SFA, en particulier de l'acide laurique (12:0). Des huiles moins connues peuvent également être ajoutées dans ce groupe, comme des sous-espèces de *Cupheae* (*Cuphea laminuligera*, *tolucana* et *wrightii* [436]), l'huile de noix du Cambodge (*Irvingia malayana* [32]) ou encore la graisse de babassu (*Orbignya oleifera* [164]).

Ces huiles ne sont pas recherchées d'un point de vue nutritionnel, puisque les acides laurique et myristique sont connus comme les SFA les plus hypercholestérolémiants [108, 216, 249, 264, 268, 394, 415]. Elles sont pourtant utilisées dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser la texture des produits, comme par exemple dans les matières grasses à tartiner.

3) Sous-groupe acide palmitique

Le meilleur exemple de ce groupe est l'huile de palme (*Elaeis guineensis* [297, 365, 406, 530]), couramment utilisée dans les formulations cosmétiques ou alimentaires pour donner de la souplesse et de la texture aux produits.

L'huile de noix pili (*Canarium ovatum* [237]), quoique moins connue, a le même profil en acides gras. Ces huiles sont plus intéressantes que les précédentes, car l'acide palmitique est moins délétère que les acides laurique ou myristique [51, 190, 216, 249, 264, 268], en particulier quand il est estérifié sur la position externe du glycérol [268], comme c'est le cas dans ces huiles (cf. chapitre « Métabolisme des lipides »).

4) Sous-groupe acide stéarique

Trois huiles sont incluses dans ce groupe, caractérisées par un profil majoritairement saturé, avec acide gras principal l'acide stéarique. Ce sont les beurres de cacao (*Theobroma cacao* [300]) et de karité (*Vitellaria paradoxa* – anciennement *Butyrospermum parkii* – [300]), et l'huile d'amande de mangue (*Mangifera indica* [469, 495]). Le beurre de cacao est utilisé principalement par l'industrie alimentaire, tandis que le beurre de karité est rencontré dans des produits cosmétiques, mais aussi alimentaires puisque son utilisation en tant qu'alternative au beurre de cacao a été autorisée en France [300].

L'intérêt nutritionnel de ces sources réside dans la neutralité des acides stéarique et oléique (le deuxième composé majoritaire des huiles de ce profil) vis-à-vis des lipides sanguins [51, 99, 176, 217, 264, 268].

I. 2) Groupe acides gras monoinsaturés

1) Sous-groupe MUFA (>60%)

Le meilleur représentant de ce groupe à profil monoinsaturé est bien évidemment l'huile d'olive (*Olea europaea* [53, 286, 318, 371, 413, 530]), qui contient presque 80% d'OA. Les huiles de noisette (*Corylus avellana* [17, 96]), de noix de macadamia (*Macadamia tetraphylla* [236]), d'avocat (*Persea americana* [340]), de noyau d'abricot (*Prunus armeniaca* [1]), de chufa (*Cyperus esculentus* [299]), d'adjouaba (*Haematostaphis barteri* [142]) et de crambe (*Crambe abyssinica* [507]) ont le même type de profil.

Comme vu dans un chapitre précédent, l'OA est neutre vis-à-vis des lipides sanguins, en particulier du LDL-cholestérol [99, 175, 186, 187, 217]. Utiliser une huile comme celles de ce groupe permet donc de compléter une formulation, à la manière d'un excipient.

Ce groupe est le premier dans lequel on retrouve des huiles ayant la même composition de base, mais complétée par plus de 7,8% d'ALA. Dans ce sous-groupe « riche en ALA » sont classées les huiles de colza (*Brassica napus* [286, 402, 506]), de bélize (*Ximenia americana* [142]) et de graine de moutarde blanche (*Brassica alba* [96, 530]). Elles contiennent respectivement 9,9%, 12,5% et 10,3% d'ALA, et associent donc la neutralité de l'OA à la présence de l'ALA [2, 3, 288].

Deux huiles font partie de ce groupe malgré un profil inhabituel. En effet, les huiles de crambe et de graine de moutarde blanche contiennent de l'acide érucique (22:1 *n-9*) comme MUFA majoritaire, au lieu de l'OA. Cet acide gras, donné chez l'animal à des doses importantes, a été soupçonné d'avoir des effets délétères sur la santé [489]. Cette polémique a engendré la production d'une variété de colza sans acide érucique (ni glucosinolate, un autre composé néfaste pour l'alimentation animale utilisatrice des tourteaux) : le colza 0:0, ou canola.

2) Sous-groupe MUFA+SFA+LA

Ce groupe est caractérisé par un profil en acides gras contenant moins de MUFA que le précédent, avec du LA en remplacement. Il comprend les huiles d'arachide (*Arachis hypogea* [96, 129, 442, 506, 531]), de son de riz (*Oryza sativa* [223, 254, 321, 379]), d'avoine (*Avena sativa* [537]), de sarrasin (*Polygonum fagopyrum* [223]), de pistache (*Pistacia atlantica* [533]), d'érable cendré (*Acer saccharinum* [125]), de ratanjyot (*Jatropha curcas* [161]), d'argan (*Argania spinosa* [423]) et de gokhru (*Tribulus terrestris* [495]).

Le sous-groupe « riche en ALA » comprend les huiles d'érable -9% d'ALA- (*Acer saccharum* [125]) et de baie d'argousier -8,8%- (*Hippophae rhamnoides* [238, 527]). Cette dernière montre un profil très intéressant, car elle apporte une proportion non négligeable de précurseur des AG *n-3* avec moins de 20% de LA (15,65%), ce qui lui confère un ratio *n-6/n-3* inférieur à 2.

I. 3) Groupe acides gras polyinsaturés

1) Sous-groupe LA (>60%)

Les huiles de ce groupe comprennent une majorité de PUFA, dont plus de 60% de LA. En gardant à l'esprit qu'un excès d'AG *n-6* provoque un état pro-inflammatoire dans l'organisme [2, 3, 288], ces huiles semblent être trop riches en LA pour être intéressantes. Cela rend complexe leur utilisation en formulation, à cause du ratio *n-6/n-3*, dont la valeur recommandée inférieure à 5 semble alors difficile à maintenir [287]. La seule alternative permettant leur utilisation est de les mélanger avec des huiles de profils différents.

Les produits rassemblés dans ce groupe sont les huiles de pépin de raisin (*Vitis vinifera* [76, 472, 495, 530]), d'onagre (*Oenothera biennis* [197, 417, 448, 530]), de pépin de melon (*Cucumis melo* [118]), de graine de tabac (*Nicotiana tabacum* [495]), de graine de paprika (*Capsicum annuum* [137]), de carthame (*Carthamus tinctorius* [27, 96, 375, 407, 530]), de salicorne (*Salicornia bigelovii* [27]), et de thumba [495].

L'huile de pépin de cassis (*Ribes nigrum* [472]) contient plus de 7,8% d'ALA en complément de cette grande quantité de LA (11,9%). De plus, cette matière première contient plus de 12% de GLA [472], qui pourrait être le composé hypocholestérolémiant de la famille *n-6*, selon Horrobin et Huang (1987)

[206]. Au contraire, l'huile d'onagre contient également une proportion importante de GLA, mais quasiment pas d'ALA.

Ce niveau de précurseur des AG *n-3* dans l'huile de pépin de cassis en fait le produit le plus intéressant de ce groupe car son ratio *n-6/n-3* est abaissé à 4,4 par cet apport en ALA. Il est malgré tout nécessaire de rappeler que la consommation d'AG *n-6* dans la population française est excédentaire, et que les dérivés pro-inflammatoires générés par ces acides gras imposent certaines précautions quant à l'utilisation d'une telle huile (cf. chapitre « Métabolisme des lipides »).

2) Sous-groupe LA+SFA

Le profil des produits de ce groupe contient majoritairement du LA, additionné de SFA (principalement du palmitique), et, comme dans le cas précédent, ils ne paraissent pas intéressants utilisés seuls [51, 216, 249, 264, 268, 517]. Sont retrouvées dans ce groupe les huiles de graine de coton (*Gossypium hirsutum* [96, 223, 230, 366, 506, 530]), de cumin noir (*Nigella sativa* [28]), de pépin de pastèque (*Citrullus* sp. [137]), de cactus (*Opuntia ficus indica* [409]), d'amarante (*Amaranthus hypocondriacus* [223]) et de graine de niger (*Guizotia abyssinica* [410, 495]).

Les huiles de noix (*Juglans regia* [492]) et de lupin (*Lupinus mexicanus* [162]) montrent un profil comparable, avec en supplément 10% et 8% d'ALA, respectivement.

3) Sous-groupe LA+MUFA

L'huile de tournesol (*Helianthus annuus* [96, 178, 183, 365, 506, 530]) contient principalement du LA et de l'OA. Les huiles suivantes ont le même profil : maïs (*Zea mays* [96, 169, 223, 286, 339, 476, 530]), germe de blé (*Triticum aestivum* [132, 381, 530]), artichaut (*Cynara scolymus* [334]), sésame (*Sesamum indicum* [4, 20, 96, 97, 123, 223, 254, 286, 530]), pépin de citrouille (*Cucurbita pepo* [137, 532]), oignon (*Allium cepa* [495]), cumin (*Cuminum cyminum* [383]), bourrache (*Borago officinalis* [338, 417, 448]), quinoa (*Chenopodium quinoa* [223]), deux sous-espèces d'amarante (*Amaranthus caudatus* [63] et *Amaranthus cruentus* [223]), haricot africain (*Pentaclethra macrophylla* [13]) et kénaf (*Hibiscus cannabinus* [337]).

Parmi ces sources, l'huile de bourrache se distingue par sa teneur en GLA, qui atteint 22% des acides gras totaux [338, 417, 448]. Comme pour l'huile de pépin de cassis dans le sous-groupe précédent, l'huile de bourrache pourrait avoir un effet hypocholestérolémiant grâce à cette particularité de composition [206].

Quelques huiles ont le même profil que celles citées ci-dessus, mais additionné de plus de 7,8% d'ALA. Ce sont les huiles de soja (*Glycine max* [96, 223, 286, 466, 506, 530]), chanvre (*Cannabis sativa* [374, 383, 530]), fénugrec (*Trigonella foenum-graecum* [528]) et pépin de canneberge (*Vaccinium oxycoccos* [383]). Ces trois produits contiennent respectivement 7,8%, 19,7%, 23,2% et 22,3% de précurseur des *n-3*, ce qui leur confère des ratios *n-6/n-3* compris entre 1,8 et 6,7.

Si une huile riche en LA est nécessaire pour préparer un mélange, ces dernières devront être préférées à celles des paragraphes 1) et 2), puisqu'elles apportent de l'ALA plutôt que des SFA [99, 175].

4) Sous-groupe ALA+MUFA

Ces deux derniers groupes sont dédiés aux huiles contenant en majorité de l'ALA, de 28% à presque 55% des acides gras totaux.

Même si la conversion de l'ALA n'est pas suffisante pour produire la quantité de dérivés à longue chaîne nécessaire à l'organisme, sa conversion en EPA est malgré tout utile pour contrecarrer les effets délétères d'un régime trop riche en AG *n-6* [2, 3, 288].

Dans ce premier groupe, les huiles contiennent en majorité des MUFA en plus du précurseur des *n-3*. Ce sont les huiles de cameline (*Camelina sativa* [457]), de lin (*Linum usitatissimum* [254, 407, 530]), de périlla (*Perilla frutescens* [286, 303]) et de matthiolo (*Matthiola tricuspidata* [197]). Parmi elles, les huiles de lin et de périlla sont les plus riches en ALA, avec des valeurs de 55% chacune, contre 43,9% et 38,1% pour la matthiolo et la cameline, respectivement.

5) Sous-groupe ALA+LA

Le dernier groupe de ce classement comprend les huiles de pourpier (*Portulaca oleracea* [177, 301]), de chia (*Salvia hispanica* [29, 100, 197]), de pépin de framboise (*Rubus idaeus* [375]), de graine d'argousier (*Hippophae rhamnoides* [238, 527]) et de salicorne (*Salicornia europaea* [177]).

Le profil des produits de ce groupe associe un niveau d'ALA supérieur à 28% (pourpier : 32,4%, chia : 61,3%, pépin de framboise : 29,1%, graine d'argousier : 28,8%, salicorne : 28%), avec 20% ou plus de LA. Avec des ratios $n-6/n-3$ inférieurs à 2, ces huiles sont très intéressantes car elles permettent d'apporter les deux acides gras essentiels.

I. 4) Les sources végétales classées selon leur profil nutritionnel

Les tableaux D-IV à D-IX résument les données disponibles à propos des sources d'huiles, classées selon les clés présentées ci-dessus, c'est-à-dire selon leur profil en acides gras et donc selon leur impact sur les lipides sanguins.

Les sources sont regroupées en fonction de leur type d'acides gras majoritaire (SFA, MUFA et PUFA). Chaque classe est subdivisée selon le deuxième acide gras majoritaire du profil.

Cette classification permet d'avoir une image générale du potentiel nutritionnel de nombreuses sources d'huiles végétales, et constitue un outil intéressant pour le formulateur de produits à matrice lipidique.

Tableau D-IV : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement saturé (sous-groupes CA, LRA+MA, PA et SA).

Sous-groupe	SFA													
	CA		LRA + MA							PA		SA		
Nom	Cuphea	Cuphea	Noix de coco	Palmiste	Cuphea	Cuphea	Cuphea	Noix du Cambodge	Babassu	Palme	Noix pili	Beurre de cacao	Beurre de karité	Amande de mangue
Latin	<i>Cuphea ilavea</i>	<i>Cuphea leptopoda</i>	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>Cuphea laminuligena</i>	<i>Cuphea toluicana</i>	<i>Cuphea wrightii</i>	<i>Irvingia malayana</i>	<i>Orbignya oleifera</i>	<i>Elaeis guineensis</i>	<i>Canarium ovatum</i>	<i>Theobroma cacao</i>	<i>Vitellaria paradoxa</i>	<i>Mangifera indica</i>
C8:0	1,0	1,8	7,6	4,1	0,5	0,5	0,4	-	5,5	0,1	-	-	-	-
C10:0	85,8	92,6	6,5	3,7	19,5	22,7	29,6	2,7	6,1	0,1	-	-	-	-
C12:0	1,7	0,2	48,2	46,0	65,4	62,2	57,2	42,5	34,1	0,4	-	-	-	-
C14:0	-	0,3	18,5	17,8	6,3	4,7	3,3	42,1	19,2	1,1	0,1	-	-	-
C16:0	2,1	1,2	8,7	8,4	2,1	1,9	1,7	7,3	10,6	43,8	33,3	25,1	5,0	8,9
C18:0	0,6	0,2	2,7	1,6	0,2	0,2	0,2	1,6	4,3	4,4	10,9	36,4	41,0	40,3
C20:0	0,4	0,1	0,1	-	0,2	0,2	0,1	-	-	0,3	0,2	1,2	0,6	2,5
C22:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	0,2	-	0,6
C24:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	0,5
Total SFA	91,6	96,4	92,6	81,9	94,2	92,4	92,5	96,2	79,8	50,4	44,5	62,9	46,5	52,8
C16:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
C16:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
C17:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:1 n-9	-	-	6,0	16,4	-	-	-	2,3	17,1	39,1	44,7	34,1	48,0	41,3
C18:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:1 n-9	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	0,1	-
C20:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C24:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total MUFA	0,0	0,0	6,1	16,4	0,0	0,0	0,0	2,3	17,1	39,4	45,0	34,1	48,0	41,3
C18:2 n-6	4,0	1,5	1,8	3,1	1,4	2,2	2,1	1,5	3,1	10,2	10,1	2,8	5,1	6,9
C18:3 n-3	4,2	2,0	0,1	-	4,3	5,3	5,1	-	-	0,3	0,5	0,2	0,3	0,5
C18:3 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:4 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:3 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:4 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:5 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:4 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total PUFA	8,2	3,5	1,9	3,1	5,7	7,5	7,2	1,5	3,1	10,5	10,6	3,0	5,4	7,4
Total n-6	4,0	1,5	1,8	3,1	1,4	2,2	2,1	1,5	3,1	10,2	10,1	2,8	5,1	6,9
Total n-3	4,2	2,0	0,1	-	4,3	5,3	5,1	-	-	0,3	0,5	0,2	0,3	0,5
Ratio n-6/n-3	1,0	0,8	18	-	0,3	0,4	0,4	-	-	34	20	14	17	14
Références	[436]	[436]	[75, 284, 382, 530]	[43, 382]	[436]	[436]	[436]	[164]	[32]	[297, 365, 406, 530]	[237]	[300]	[300]	[469, 495]

Abréviations : SFA : acides gras saturés ; CA : acide caprique ; LRA : acide laurique ; MA : acide myristique ; PA : acide palmitique ; SA : acide stéarique.

Tableau D-V: Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement monoinsaturé (sous-groupe MUFA).

Sous-groupe	MUFA										
	MUFA										
Nom	Olive	Noisette	Noix de Macadamia	Avocat	Noyau d'abricot	Chufa	Adjouaba	Crambe	Colza	Bélize	Graine de moutarde blanche
Latin	<i>Olea europaea</i>	<i>Corylus avellana</i>	<i>Macadamia tetraphylla</i>	<i>Persea americana</i>	<i>Prunus armeniaca</i>	<i>Cyperus esculentus</i>	<i>Haemastaphis barteri</i>	<i>Crambe abyssinica</i>	<i>Brassica napus</i>	<i>Ximenia americana</i>	<i>Brassica alba</i>
C8:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-
C10:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	0,0	0,0	1,3	-	-	0,2	4,2	-	0,1	-	-
C16:0	12,1	4,9	9,7	15,7	4,4	13,8	1,4	2,2	5,1	3,3	-
C18:0	2,6	2,7	2,1	0,7	0,5	3,2	15,4	-	1,7	3,5	-
C20:0	0,4	0,1	1,7	-	-	0,4	-	-	0,6	-	1,6
C22:0	0,1	0,1	0,5	-	-	-	-	-	0,3	-	1,2
C24:0	0,1	0,0	0,2	-	-	-	-	-	0,2	-	0,6
Total SFA	15,3	7,8	15,4	16,4	4,8	17,5	21,0	2,2	8,0	7,3	3,4
C16:1 <i>n-7</i>	0,8	0,2	26,7	7,3	0,1	0,3	-	-	0,2	-	-
C16:1 <i>n-9</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:1 <i>n-7</i>	0,2	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:1 <i>n-9</i>	72,5	82,7	48,4	60,3	66,3	72,6	69,4	16,5	60,1	72,1	23,2
C18:1 <i>n-7</i>	-	-	3,0	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:1 <i>n-9</i>	0,3	0,2	2,0	0,2	-	-	-	4,7	1,4	-	8,8
C20:1 <i>n-7</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:1 <i>n-9</i>	-	0,0	0,7	-	-	-	2,7	62,5	0,4	3,5	36,5
C24:1 <i>n-9</i>	-	0,0	-	-	-	-	-	-	0,3	1,2	-
Total MUFA	73,8	83,1	80,4	67,8	66,4	72,9	72,1	83,7	62,4	76,8	68,5
C18:2 <i>n-6</i>	9,4	8,9	3,4	13,7	28,6	8,9	-	9,3	21,5	1,3	8,9
C18:3 <i>n-3</i>	0,6	0,1	0,2	1,4	0,1	0,4	-	4,8	9,9	10,3	12,5
C18:3 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:4 <i>n-3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:2 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	6,9	-	0,1	-	-
C20:3 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,4	-
C20:4 <i>n-6</i>	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	0,6	-
C20:5 <i>n-3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:2 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:4 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total PUFA	10,0	9,0	3,6	15,2	28,8	9,3	6,9	14,1	31,5	15,6	21,4
Total n-6	9,4	8,9	3,4	13,8	28,6	8,9	6,9	9,3	21,6	5,3	8,9
Total n-3	0,6	0,1	0,2	1,4	0,1	0,4	-	4,8	9,9	10,3	12,5
Ratio n-6/n-3	16	89	17	9,8	286	22	-	1,9	2,2	0,1	0,7
Références	[53, 286, 318, 371, 413, 530]	[17, 96]	[236]	[340]	[1]	[299]	[142]	[507]	[286, 402, 506]	[142]	[96, 530]

Abréviation : MUFA : acides gras monoinsaturés.

Tableau D-VI : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement monoinsaturé (sous-groupe MUFA+SFA+LA).

Sous-groupe	MUFA										
	MUFA + SFA + LA										
Nom	Arachide	Son de riz	Avoine	Sarrasin	Pistache	Erable argenté	Ratanjot	Argan	Gokhru	Erable	Baie d'argousier
Latin	<i>Arachis hypogea</i>	<i>Oryza sativa</i>	<i>Avena sativa</i>	<i>Polygonum fagopyrum</i>	<i>Pistacia atlantica</i>	<i>Acer saccharinum</i>	<i>Jatropha curcas</i>	<i>Argania spinosa</i>	<i>Tribulus terrestris</i>	<i>Acer saccharum</i>	<i>Hippophae rhamnoides</i>
C8:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	0,1	0,4	-	0,2	-	-	0,1	0,1	23,5	-	-
C16:0	10,4	18,2	18,0	19,5	24,0	10,5	15,3	12,3	12,9	10,1	27,0
C18:0	3,0	1,9	1,7	2,2	1,8	3,0	6,6	5,1	-	2,5	1,4
C20:0	1,2	0,7	-	1,5	-	0,3	0,2	0,2	-	0,3	-
C22:0	2,30	0,2	-	1,3	-	0,3	-	0,1	-	0,3	-
C24:0	1,4	-	-	0,5	-	0,3	-	-	-	0,2	-
Total SFA	18,3	21,3	19,8	25,2	25,8	14,4	22,2	17,8	36,4	13,4	28,3
C16:1 <i>n</i> -7	0,2	0,2	-	0,3	1,2	0,5	-	0,1	-	0,6	25,6
C16:1 <i>n</i> -9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:1 <i>n</i> -7	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:1 <i>n</i> -9	47,9	41,7	39,8	37,1	46,0	27,6	40,1	45,7	34,0	21,3	14,9
C18:1 <i>n</i> -7	-	-	-	-	-	7,9	-	-	-	9,0	6,8
C20:1 <i>n</i> -9	1,3	-	-	-	-	4,0	-	0,2	-	3,7	-
C20:1 <i>n</i> -7	-	0,5	-	-	-	0,5	-	-	-	0,6	-
C22:1 <i>n</i> -9	0,1	-	-	-	-	3,1	-	-	-	3,4	-
C24:1 <i>n</i> -9	-	-	-	-	-	2,4	-	-	-	2,7	-
Total MUFA	49,6	42,4	39,8	37,4	47,2	46,0	40,1	45,9	34,0	41,3	47,2
C18:2 <i>n</i> -6	30,3	34,6	37,7	35,5	27,4	29,4	35,9	34,4	20,8	30,8	15,7
C18:3 <i>n</i> -3	0,4	1,2	1,3	1,9	-	5,2	0,2	1,4	-	9,0	8,8
C18:3 <i>n</i> -6	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	0,8	-
C18:4 <i>n</i> -3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:2 <i>n</i> -6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:3 <i>n</i> -6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:4 <i>n</i> -6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:5 <i>n</i> -3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:2 <i>n</i> -6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:4 <i>n</i> -6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total PUFA	30,8	35,9	38,9	37,4	27,4	35,1	36,1	35,8	20,8	40,6	24,5
Total n-6	30,3	34,6	37,7	35,5	27,4	29,9	35,9	34,4	20,8	31,6	15,7
Total n-3	0,4	1,2	1,3	1,9	-	5,2	0,2	1,4	-	9,0	8,8
Ratio n-6/n-3	76	29	29	19	-	5,7	180	25	-	3,4	1,8
Références	[96, 129, 442, 506, 531]	[223, 254, 321, 379]	[537]	[223]	[533]	[125]	[161]	[423]	[495]	[125]	[238, 527]

Abréviations : MUFA : acides gras monoinsaturés ; SFA : acides gras saturés ; LA : acide linoléique.

Tableau D-VII : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement polyinsaturé (sous-groupes LA et LA+SFA).

Sous-groupe	PUFA										LA + SFA						
	LA										LA + SFA						
Nom	Pépin de raisin	Onagre	Pépin de melon	Graine de tabac	Graine de paprika	Carthame	Salicorne	Thumba	Pépin de cassis	Graine de coton	Cumin noir	Pépin de pastèque	Cactus	Amarante	Graine de niger	Noix	Lupin
Latin	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Oenothera biennis</i>	<i>Cucumis melo</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Capsicum annuum</i>	<i>Carthamus tintorius</i>	<i>Salicornia bigelovii</i>	?	<i>Ribes nigrum</i>	<i>Gossypium hirsutum</i>	<i>Nigella sativa</i>	<i>Citrullus sp.</i>	<i>Opuntia ficus indica</i>	<i>Amaranthus hypochoeridifolius</i>	<i>Guizotia abyssinica</i>	<i>Juglans regia</i>	<i>Lupinus mexicanus</i>
C8:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	-	0,0	0,0	0,7	-	-	-	9,2	-	0,8	10,5	0,1	0,6	0,3	4,4	0,1	0,4
C16:0	4,5	6,0	9,5	9,4	13,8	6,1	7,5	6,9	6,3	24,2	11,0	11,3	27,3	23,1	12,0	10,4	20,8
C18:0	2,1	1,6	4,9	-	3,7	2,3	1,5	-	2,0	2,3	3,5	10,2	2,6	3,6	3,0	3,9	5,0
C20:0	0,2	0,3	0,2	-	-	0,4	-	-	-	0,2	1,0	-	-	0,7	0,2	0,3	0,2
C22:0	-	0,1	-	-	-	0,3	-	-	-	0,1	0,9	-	-	0,2	0,3	0,1	0,0
C24:0	-	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-	0,1	0,3	-	-	-	0,1	-	-
Total SFA	6,7	8,1	14,8	10,1	17,6	9,1	9,0	16,1	8,3	27,8	27,0	21,7	30,4	27,9	20,0	14,8	26,4
C16:1 n-7	-	0,1	0,2	-	0,1	0,1	-	-	-	0,7	0,6	0,3	1,7	0,1	-	0,4	-
C16:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5
C17:1 n-7	-	-	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:1 n-9	17,6	8,3	19,4	13,7	14,6	13,4	13,4	19,6	14,4	17,4	19,5	18,1	14,6	25,3	13,5	-	16,9
C18:1 n-7	0,8	0,6	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:1 n-9	-	0,3	0,1	-	-	0,2	-	-	1,0	0,1	-	-	-	0,2	-	-	-
C20:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:1 n-9	-	0,1	0,4	-	-	-	-	-	-	0,0	0,9	-	-	-	-	-	-
C24:1 n-9	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total MUFA	18,4	9,4	20,1	13,7	14,7	13,9	13,4	19,6	16,3	18,2	21,0	18,4	16,3	25,6	13,5	0,4	17,4
C18:2 n-6	64,5	73,8	64,1	70,7	67,8	76,0	75,5	62,7	48,3	53,2	48,3	59,6	45,3	45,8	65,4	74,0	47,7
C18:3 n-3	0,6	0,1	0,2	0,9	-	0,3	2,0	0,2	11,9	0,2	2,4	0,4	7,3	0,8	0,1	10,0	8,2
C18:3 n-6	0,4	9,5	-	-	-	-	-	-	12,9	-	-	-	0,3	-	-	-	-
C18:4 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:2 n-6	-	0,1	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:3 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:4 n-6	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:5 n-3	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-	-
C22:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:4 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total PUFA	65,4	83,4	64,3	71,6	67,8	77,3	77,5	62,9	75,3	53,4	50,7	60,0	52,9	46,6	66,5	84,0	55,8
Total n-6	64,9	83,3	64,1	70,7	67,8	76,5	75,5	62,7	61,5	53,2	48,3	59,6	45,6	45,8	65,4	74,0	47,7
Total n-3	0,6	0,1	0,2	0,9	-	0,8	2,0	0,2	13,8	0,2	2,4	0,4	7,3	0,8	1,1	10,0	8,2
Ratio n-6/n-3	108	738	321	79	-	253	38	313	4,1	266	20	149	6,2	57	654	7,4	5,8
Références	[76, 472, 475, 530]	[197, 417, 448, 530]	[118]	[495]	[137]	[27, 96, 375, 407, 530]	[27]	[495]	[472]	[96, 223, 230, 366, 506, 530]	[28]	[137]	[409]	[223]	[410, 495]	[492]	[162]

Abréviations : PUFA : acides gras polyinsaturés ; LA : acide linoléique ; SFA : acides gras saturés.

Tableau D-VIII : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement polyinsaturé (sous-groupe LA+MUFA).

Sous-groupe	PUFA																	
	LA + MUFA																	
Nom	Tournesol	Maïs	Germe de blé	Artichaut	Sésame	Pépin de citrouille	Oignon	Cumin	Bourrache	Quinoa	Amarante	Amarante	Haricot africain	Kénaf	Soja	Chanvre	Fénu grec	Pépin de canneberge
Latin	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Sesamum indicum</i>	<i>Cucurbita pepo</i>	<i>Allium cepa</i>	<i>Cuminum cymimum</i>	<i>Borago officinalis</i>	<i>Chenopodium quinua</i>	<i>Amaranthus caudatus</i>	<i>Amaranthus cruentus</i>	<i>Pentaclethra macrophylla</i>	<i>Hibiscus cannabinus</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Cannabis sativa</i>	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	<i>Vaccinium oxycoccus</i>
C8:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12:0	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	0,5	-	-	-	-
C14:0	0,1	-	-	-	0,1	0,2	0,7	0,2	0,1	0,3	0,2	-	-	0,5	0,1	-	0,2	-
C16:0	6,4	12,3	17,5	13,9	9,6	12,8	9,1	12,1	11,9	11,4	15,4	21,3	3,8	20,1	10,8	6,3	10,8	7,8
C18:0	4,5	1,9	1,0	3,4	5,0	9,0	4,4	3,4	4,3	0,8	3,5	3,7	0,7	3,2	3,9	2,8	5,1	1,9
C20:0	0,3	0,4	0,2	0,3	0,6	-	-	0,2	0,2	0,3	0,8	0,7	1,5	0,5	0,3	0,7	2,1	-
C22:0	0,8	0,1	-	0,1	0,2	-	-	-	0,2	0,2	0,4	0,3	3,9	0,3	0,2	0,3	0,9	-
C24:0	0,2	0,1	-	0,3	0,1	-	-	-	-	-	0,3	-	12,5	0,1	0,3	-	-	-
Total SFA	12,8	14,8	18,7	18,0	15,7	22,0	14,2	16,0	16,6	13,0	20,4	27,0	22,4	25,1	15,7	10,1	19,1	9,7
C16:1 n-7	0,1	0,1	-	0,1	0,2	0,4	-	-	0,2	0,1	-	0,3	-	1,6	0,2	-	-	-
C16:1 n-9	-	-	1,1	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:1 n-9	22,1	27,7	19,1	30,0	39,7	25,7	34,3	24,0	18,7	25,6	29,7	31,1	28,2	29,2	23,9	12,1	15,9	22,7
C18:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-
C20:1 n-9	0,2	0,3	1,6	-	0,2	-	-	0,4	3,9	1,0	-	0,3	0,7	0,2	0,1	-	0,8	-
C20:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:1 n-9	0,1	0,0	0,4	-	0,0	-	-	-	2,1	0,5	-	-	1,6	0,7	-	-	9,7	-
C24:1 n-9	-	-	0,2	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total MUFA	22,4	28,1	22,4	30,1	40,1	26,1	34,3	25,4	26,1	27,2	29,7	32,9	30,5	31,7	24,2	12,1	26,4	22,7
C18:2 n-6	65,6	56,1	55,2	51,2	45,0	51,3	44,6	55,8	38,5	52,8	45,0	40,2	35,8	45,9	52,1	55,9	41,2	44,3
C18:3 n-3	0,5	1,0	6,1	-	0,4	0,2	0,3	0,2	0,4	7,0	-	0,7	-	0,7	7,8	19,7	23,2	22,3
C18:3 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	21,9	-	-	-	-	-	-	2,8	-	-
C18:4 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:2 n-6	-	-	0,2	-	0,1	-	-	2,6	0,2	-	-	-	0,9	-	-	0,8	-	1,0
C20:3 n-6	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:4 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:5 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7	-	-	-	-	-
C22:4 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total PUFA	66,0	57,1	61,5	51,2	45,7	51,5	44,9	58,7	60,9	59,8	45,0	40,9	40,4	46,6	59,8	79,1	64,4	67,6
Total n-6	65,6	56,1	55,4	51,2	45,3	51,3	44,6	58,4	60,6	52,8	45,0	40,2	40,4	45,9	52,1	59,4	41,2	45,3
Total n-3	0,5	1,0	6,1	-	0,4	0,2	0,3	0,2	0,4	7,0	-	0,7	-	0,7	7,8	19,7	23,2	22,3
Ratio n-6/n-3	131	56	9,2	-	113	257	149	279	96	7,5	-	57	-	66	6,7	2,8	1,8	2,0
Références	[96, 178, 183, 365, 506, 530]	[96, 169, 223, 286, 339, 476, 530]	[132, 381, 530]	[334]	[4, 20, 96, 97, 123, 223, 254, 286, 530]	[137, 532]	[495]	[383]	[338, 417, 448]	[223]	[63]	[223]	[13]	[337]	[96, 223, 286, 466, 506, 530]	[374, 383, 530]	[528]	[383]

Abréviations : PUFA : acides gras polyinsaturés ; LA : acide linoléique ; MUFA : acides gras monoinsaturés.

Tableau D-IX : Composition en acides gras des huiles végétales présentant un profil majoritairement polyinsaturé (sous-groupes ALA+MUFA et ALA+LA).

Sous-groupe	ALA + MUFA				PUFA				
	Cameline	Lin	Périlla	Matthiole	Pourpier	Chia	Pépin de framboise	Graine d'argousier	Salicorne
Latin	<i>Camelina sativa</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Perilla frutescens</i>	<i>Matthiola tricuspidata</i>	<i>Portulaca oleracea</i>	<i>Salvia hispanica</i>	<i>Rubus idaeus</i>	<i>Hippophae rhamnoides</i>	<i>Salicornia europaea</i>
C8:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	-	-	-	-	0,2	-	-	-	1,3
C16:0	5,3	6,1	9,1	9,5	16,4	6,8	2,7	8,4	21,6
C18:0	3,0	3,4	2,7	6,0	3,6	3,2	1,0	2,8	2,9
C20:0	1,4	0,5	-	-	1,2	-	-	-	2,4
C22:0	-	-	-	-	0,1	-	-	-	2,5
C24:0	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-
Total SFA	9,7	10,0	11,9	15,5	21,7	10,0	3,7	11,1	30,6
C16:1 <i>n-7</i>	-	0,1	-	-	-	-	-	-	1,4
C16:1 <i>n-9</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:1 <i>n-7</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:1 <i>n-9</i>	18,7	18,4	18,4	26,6	11,8	7,3	12,0	19,2	4,4
C18:1 <i>n-7</i>	-	-	-	-	-	-	-	2,3	1,5
C20:1 <i>n-9</i>	11,6	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:1 <i>n-7</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:1 <i>n-9</i>	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-
C24:1 <i>n-9</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total MUFA	32,8	18,5	18,4	26,6	11,8	7,3	12,0	21,5	7,3
C18:2 <i>n-6</i>	16,0	16,8	14,9	12,4	34,1	19,8	54,5	38,5	23,5
C18:3 <i>n-3</i>	38,1	55,0	55,0	43,9	32,4	61,3	29,1	28,8	28,0
C18:3 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6
C18:4 <i>n-3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
C20:2 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:3 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:4 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:5 <i>n-3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
C22:2 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:4 <i>n-6</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9
Total PUFA	54,1	71,8	69,9	56,3	66,5	81,1	83,6	67,3	54,8
Total n-6	16,0	16,8	14,9	12,4	34,1	19,8	54,5	38,5	25,9
Total n-3	38,1	55,0	55,0	43,9	32,4	61,3	29,1	28,8	28,9
Ratio n-6/n-3	0,4	0,3	0,3	0,3	1,1	0,3	1,9	1,3	0,8
Références	[457]	[254, 407, 530]	[286, 303]	[197]	[177, 301]	[29, 100, 197]	[375]	[238, 527]	[177]

Abréviations : PUFA : acides gras polyinsaturés ; ALA : acide α -linoléique ; MUFA : acides gras monoinsaturés ; LA : acide linoléique.

I. 5) Discussion sur ces sources végétales

Dans le régime alimentaire occidental, comme par exemple en France, en Allemagne ou au Royaume-Uni, les lipides représentent 40% de la ration calorique, les SFA comptant pour la moitié. La proportion de PUFA est inférieure à 15% (11% de LA, 0,8% d'ALA, 0,25% d'EPA+DHA), avec un ratio $n-6/n-3$ aux alentours de 15 [239, 503, 504]. Ceci ne correspond pas aux recommandations des différents gouvernements, qui conseillent en général un apport lipidique ne dépassant pas 30% de l'énergie, avec 33% de SFA et un ratio $n-6/n-3$ de 5 ou moins : l'AFSSA [287], le *National cholesterol education program* édité par un groupe de travail d'experts américains pour le management de l'hypercholestérolémie [356], l'*American heart association* [260] et la *Deutsche gesellschaft für ernährung* (équivalent allemand de l'AFSSA) [542].

Il y a, à l'heure actuelle, une prise de conscience de l'industrie agroalimentaire par rapport à la notion de « qualité des lipides », en dehors de celle de « quantité de lipides ». Pour répondre à cette demande, en particulier en PUFA comme l'ALA, de nouvelles sources d'huiles végétales doivent être utilisées à la place des classiques huiles de tournesol ou de palme.

La classification réalisée dans ce chapitre met en lumière deux groupes différents, selon les acides gras recherchés par le formulateur. Les huiles de l'avant-dernier groupe – cameline, lin, périlla et matthiole – se distinguent par leur forte teneur en ALA, si seul cet acide gras est nécessaire, et celles du dernier groupe – pourpier, chia, pépin de framboise et graine d'argousier – sont intéressantes si les deux PUFA essentiels sont recherchés.

L'EPA et le DHA, absents des huiles végétales, ont été mis en avant dans la synthèse bibliographique concernant l'impact des acides gras alimentaires sur les lipides sanguins [110, 122, 166, 167, 171, 174, 235, 311, 343, 369, 400, 411, 439, 461, 462, 464, 490]. Cependant, le rendement de conversion de l'ALA en ces dérivés à longue chaîne ne permet pas d'apporter à l'organisme les quantités suffisantes à son métabolisme, en particulier en ce qui concerne le DHA [41, 57, 66-68, 102, 185, 333, 341, 411]. C'est pourquoi des huiles de poisson ou d'algues peuvent être utilisées en plus des sources végétales présentées dans ce chapitre. Ceci est le sujet du chapitre suivant.

Pour revenir aux sources végétales présentées ici, plusieurs difficultés majeures peuvent empêcher l'utilisation de ces huiles nutritionnellement intéressantes.

La première est le statut alimentaire de ces produits. En effet, l'huile de périlla a reçu un avis défavorable du CSHPF [104], que ce soit en alimentation courante ou en complément alimentaire. L'huile de lin a été interdite en alimentation en France [198, 199], mais un rapport récent de l'AFSSA a émis un avis différent, qui doit encore être validé par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) [200]. Pour les autres huiles, la première entreprise qui voudra les utiliser dans un produit alimentaire devra remplir un dossier de « *novel food* » auprès de l'*European food safety authority* (EFSA), ce qui représente un parcours long et coûteux.

Une deuxième difficulté est la disponibilité de ces huiles. En effet, si la cameline, le périlla, le lin et l'argousier existent en format industriel ou semi-industriel, ce n'est pas le cas pour les huiles de pépin de framboise, de chia, de pourpier ou de salicorne. Une production industrielle de chia a été lancée en Argentine en 1998, mais il semble que des difficultés aient entravé le projet puisque cette matière première n'est toujours pas disponible sur le marché. Le pourpier est peut-être une piste intéressante, puisqu'il est utilisé en Grèce (en particulier en Crète) comme aliment pour le bétail.

Enfin, il est important de noter que l'utilisation d'huiles polyinsaturées, comme celles contenant de grandes quantités d'ALA par exemple, influe de manière négative sur la stabilité et donc sur la durée de vie des produits alimentaires. En effet, l'oxydabilité des huiles augmentant avec le nombre d'insaturations, l'emploi d'huile de cameline ou de lin nécessite un travail de formulation des matrices alimentaires, avec utilisation d'antioxydants, voire d'autres technologies de protection.

Additionnées, ces difficultés ont empêché les industriels agroalimentaires d'utiliser ces sources alternatives dans des produits finis commercialisés. Si une tendance vers des profils en acides gras plus équilibrés est visible dans le secteur des corps gras « non beurre », la majorité des produits

alimentaires à matrice lipidique ne montre rien de semblable. Dans ces derniers cas, le coût reste le facteur majeur en formulation, et conduit à l'utilisation de sources traditionnelles et bon marché.

II/ Composition des huiles de poissons et autres organismes marins

Contrairement au chapitre précédent, dans lequel des huiles végétales ont été classées en fonction de leur profil général en acides gras, 56 huiles de poisson ou d'autres organismes marins ont été étudiées, cette fois à la recherche exclusivement d'EPA et de DHA, les LCPUFA de la famille *n-3* impliqués dans le fonctionnement du système cardio-vasculaire. Les trois groupes principaux sont formés par les huiles dont le profil contient majoritairement de l'EPA, ou du DHA, ou les deux acides gras en quantités équivalentes. Dans ces groupes, une subdivision a été créée pour différencier les sources apportant plus ou moins de 20% des acides gras d'intérêt, de manière à mettre en lumière les huiles intéressantes du point de vue de l'apport en EPA et DHA.

Pour certaines huiles, les publications scientifiques offrent plus d'informations, en donnant les profils en acides gras de l'huile et de la lécithine de l'organisme de manière séparée. Dans le cas de la lécithine, le nom de l'organisme est suivi de l'abréviation PL.

II. 1) Majorité d'EPA

1) Supérieur à 20% des acides gras totaux

Dans ce premier sous-groupe, dans lequel sont classées les huiles contenant majoritairement de l'EPA, seules des huiles issues d'organismes marins autres que les poissons sont retrouvées, comme le homard (*Homarus americanus* [153]) ou le crabe vert (dit enragé, *Carcinus maenas* [351]), ainsi que la lécithine de crabe des neiges (PL, *Chionoectes opilio* [5]).

La plus riche en EPA est la lécithine de crabe des neiges, avec un taux approchant les 33% des acides gras totaux.

2) Inférieur à 20% des acides gras totaux

Parmi ces huiles dans lesquelles l'EPA est le LCPUFA majoritaire, certaines n'en contiennent cependant que moins de 20%.

C'est le cas de certains poissons de mer comme le colin d'Alaska (*Theragra calcogramma* [475]) et le mullet à grosses lèvres (*Mugil labrosus* [71]), d'un poisson d'eau douce comme le tilapia du Nil (*Tilapia nilotica* [313]), et de deux espèces de krill antarctique (*Thysanoessa macrura* et *Euphasia frigida* [392]).

Au vu de ces deux sous-groupes, l'huile de poisson la plus riche en EPA est extraite du colin d'Alaska (9,7% d'EPA). Dans les groupes ci-après, les huiles d'anchois, de sébaste du large, d'éperlan et de haddock entre autres, contiennent une proportion d'EPA supérieure à celle-ci (13 à 16%), mais pas en tant que LCPUFA majoritaire.

II. 2) Majorité de DHA

1) Supérieur à 20% des acides gras totaux

Ce premier groupe comprend des huiles et des lécithines dans lesquelles le DHA est le LCPUFA majoritaire. Concernant les poissons de mer, c'est le cas des huiles de saint-pierre (*Zeus faber* [215]), de haddock (*Meianogrammus* sp. [71, 530]), de saumon (*Salmo salar* [130, 215, 298, 530]), d'éperlan (*Osmerus mordax* [215]) ou encore de sole (*Solea vulgaris* [215]), et des lécithines de morue (PL, *Gadus morua* [5]), de hareng (PL, *Clupea harengus* [5]), de pagre (PL, *Pagrus pagrus* [85]) et de turbot (PL, *Psetta maxima* [428]).

Certains poissons de rivière donnent une huile au même profil, comme c'est le cas pour le brochet (*Esox lucius* [215]). La lécithine de truite commune (PL, *Salmo trutta* [428]) contient également du DHA comme LCPUFA majoritaire, à un taux supérieur à 20%.

Enfin, d'autres organismes marins, comme le copépode (*Macrocyclops albidus* [5]), peuvent être classés dans la même catégorie.

2) Inférieur à 20% des acides gras totaux

Ce groupe comprend également des huiles dont le LCPUFA majoritaire est le DHA, mais à un taux inférieur à 20%.

C'est le cas de certains poissons de mer comme l'ange de mer impérial (*Pomacanthus imperator* [215]), la morue (*Gadus morua* [5, 204, 215, 429, 475, 530]), le saumon keta (*Oncorhynchus keta* [475, 530]), l'aiguillat (*Squalus acanthias* [5, 204]), le turbot (*Psetta maxima* [428]), le sar (*Diplodus puntazzo* [215, 378]), la sardine d'Espagne (*Sardinella aurita* [313, 530]), l'anchois (*Engraulis encrasicolus* [5]) et l'empereur (*Hoplostethus atlanticus* [215]), de certains poissons d'eau douce comme la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss* [71, 73, 444, 475, 530]), la perche Macquarie (*Macquaria australasica* [450]), la truite commune (*Salmo trutta* [428]), et la crevette rayée (*Plesionika* sp. [85]).

Parmi les sources affiliées à ces deux sous-groupes « DHA », l'huile de poisson la plus riche en LCPUFA *n*-3 est l'huile de saint-pierre, dans laquelle le DHA représente 42,5% des acides gras totaux.

II. 3) Proportions équivalentes d'EPA et de DHA

1) Supérieurs à 20% des acides gras totaux

Parmi les huiles contenant des proportions équivalentes d'EPA et de DHA, avec un total EPA+DHA supérieur à 20% des acides gras totaux, sont retrouvées des huiles de poissons de mer comme le sébaste du large (*Sebastes mentella* [229]), la sardine du Japon (*Sardinops melanosticus* [5, 454]), la perche rose (ou perche de mer, *Sebastes marinus* [229, 450]), le petit sébaste (*Sebastes viviparus* [229]) et le menhaden (*Brevoortia tyrannus* [5, 71, 130, 475, 530]). La lécithine de sar (PL, *Diplodus puntazzo* [378]) entre également dans cette catégorie.

L'huile extraite de la carpe marbrée (*Aristichthys nobilis* [475]), un poisson d'eau douce, a le même type de profil.

Enfin, deux espèces de krill antarctique (*Euphasia superba* et *Euphasia tricantha* [392]) et la crevette grise (*Litopenaeus vannamei* [170]) sont d'autres organismes marins ayant le même profil lipidique.

2) Inférieurs à 20% des acides gras totaux

Ce dernier groupe comprend des huiles contenant un taux d'EPA et de DHA équivalent, mais en proportion inférieure à 20% des acides gras totaux.

De certains poissons d'eau de mer peut être extraite une huile avec ces caractéristiques, comme le maquereau (*Scomber scombrus* [71, 475, 530]), le sprat (*Sprattus sprattus* [71]), le capelan (*Mallotus villosus* [5, 218, 530]), le bar (ou loup de mer, *Morone labrax* [279]), le hareng (*Clupea harengus* [71, 475, 530]), le pagre (*Pagrus pagrus* [85]) et la courbine (*Micropogonias furneri* [313]).

Certains poissons d'eau douce sont dans le même cas, comme l'amour argenté (*Hypophthalmichthys molitrix* [475]), le curimbata (*Prochilodus* sp. [313]), le bar rayé (*Morone saxatilis* [245]), le malachigan (*Aplodinotus grunniens* [215]) et la coregone (*Coregonus artedi* [475]).

Enfin la crevette seabob (*Xiphopenaeus kroyeri* [313]) donne une huile avec le même profil.

Parmi ces deux sous-groupes « EPA+DHA », c'est l'huile de sar qui contient le plus de LCPUFA *n*-3, avec un total de 34,9% des acides gras totaux.

II. 4) Les sources classées selon leur profil nutritionnel

Les tableaux D-X à D-XIV résument les données disponibles à propos des sources d'huile de poisson et d'organismes marins, classées selon leur profil en acides gras. Plus précisément, les sources sont regroupées selon leur profil en LCPUFA (EPA majoritaire, DHA majoritaire, ou quantités équivalentes d'EPA et de DHA), et chaque classe est subdivisée selon que le(s) acide(s) d'intérêt représente(nt) plus ou moins de 20% des acides gras totaux.

Cette classification permet de repérer les sources riches en LCPUFA, tout en choisissant un rapport entre EPA et DHA voulu. Ce type d'huile permet de compléter une formulation grasse végétale à visée nutritionnelle, puisque le chapitre « Pathologies liées au métabolisme des lipides » a mis en évidence le rôle important de l'EPA et du DHA dans la prévention des pathologies cardio-vasculaires.

Tableau D-X : Composition en acides gras des huiles de poissons et organismes marins contenant en majorité de l'EPA comme acide gras polyinsaturé à longue chaîne (sous-groupes « plus de 20% des acides gras totaux » et « moins de 20% des acides gras totaux »).

Sous-groupe	plus de 20%			EPA				
	Crabe des neiges PL	Homard	Crabe vert, enragé	Krill antarctique	Krill antarctique	Lieu, Colin d'Alaska	Tilapia du Nil	Mulet (à grosses lèvres)
<i>Latin</i>	<i>Chionoecetes opilio</i>	<i>Homarus americanus</i>	<i>Carcinus maenas</i>	<i>Thysanoessa macrura</i>	<i>Euphasia frigida</i>	<i>Theragra calcogramma</i>	<i>Tilapia nilotica</i>	<i>Mugil labrosus</i>
C12:0	-	-	-	-	2,8	-	-	-
C14:0	0,2	1,0	0,4	15,3	8,4	5,8	1,0	8,1
C15:0	-	0,9	0,7	-	-	-	-	-
C16:0	9,1	14,4	10,2	22,9	27,4	10,8	36,0	27,0
C17:0	-	0,8	1,3	-	-	-	0,2	4,1
C18:0	3,5	4,0	6,2	4,0	7,1	3,3	13,6	3,6
C19:0	-	-	-	-	-	-	-	1,3
C20:0	-	-	0,6	-	-	-	3,4	-
C22:0	-	-	-	-	-	-	-	-
C24:0	-	-	-	-	-	-	-	-
Total SFA	12,8	21,1	19,4	42,2	45,6	19,9	54,2	44,0
C16:1 n-7	3,1	5,9	4,2	3,1	4,5	7,7	3,1	21,4
C16:1 n-9	-	0,3	-	-	-	-	-	-
C17:1 n-7	-	1,0	1,7	-	-	-	-	-
C18:1 n-9	20,3	11,1	11,7	9,6	15,5	13,7	13,7	10,4
C18:1 n-7	-	6,8	4,3	6,4	6,3	-	-	-
C20:1 n-9	1,2	1,4	0,7	0,8	0,7	20,1	-	-
C20:1 n-7	-	2,5	0,4	-	-	-	-	-
C22:1 n-9	-	-	0,7	-	-	14,6	-	-
C22:1 n-11	-	-	-	-	-	-	-	-
C24:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	-
Total MUFA	24,6	29,1	23,7	19,9	26,9	56,1	16,8	31,7
C16:2 n-6	-	-	-	-	0,1	-	-	-
C16:3 n-3	-	-	-	0,1	0,1	-	-	-
C18:2 n-6	1,3	0,8	0,9	2,1	1,8	0,8	-	1,7
C18:3 n-3	-	0,3	0,3	-	-	0,3	-	0,8
C18:3 n-6	-	-	-	0,3	0,6	-	-	-
C18:4 n-3	-	0,4	-	0,7	0,6	2,1	-	2,7
C20:2 n-6	-	-	1,4	-	-	-	-	-
C20:3 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:3 n-6	-	-	-	-	-	-	0,3	-
C20:4 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:4 n-6	5,5	2,6	6,9	-	0,5	0,3	-	-
C20:5 n-3	32,6	25,8	24,6	17,2	10,6	9,7	8,5	6,4
C21:5 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:2 n-6	-	-	-	-	-	-	0,3	-
C22:4 n-6	-	-	0,5	-	-	-	-	-
C22:5 n-3	0,7	-	2,0	-	-	0,7	-	3,2
C22:5 n-6	-	-	13,5	-	-	-	-	-
C22:6 n-3	19,3	12,8	11,6	10,2	5,0	5,7	1,5	2,3
Total PUFA	59,4	42,7	61,8	30,6	19,2	19,6	10,6	17,0
Total LCPUFA	58,1	41,3	60,6	27,4	16,1	16,4	10,6	11,8
Total EPA + DHA	51,9	38,6	36,2	27,4	15,6	15,4	10,0	8,7
Références	[5]	[153]	[351]	[392]	[392]	[475]	[313]	[71]

Tableau D-XI : Composition en acides gras des huiles de poissons et organismes marins contenant en majorité du DHA comme acide gras polyinsaturé à longue chaîne (sous-groupe « plus de 20% des acides gras totaux »).

Sous-groupe	DHA plus de 20%											
	Nom	Truite commune PL	Saint-pierre	Morue PL	Hareng PL	Brochet	Pagre PL	Copépode	Turbot PL	Haddock	Saumon	Eperlan
Latin	<i>Salmo trutta</i>	<i>Zeus faber</i>	<i>Gadus morua</i>	<i>Clupea harengus</i>	<i>Esox lucius</i>	<i>Pagrus pagrus</i>	<i>Macrocyclus albidus</i>	<i>Psetta maxima</i>	<i>Meianogrammus sp.</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Osmerus mordax</i>	<i>Solea vulgaris</i>
C12:0	-	-	0,4	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
C14:0	1,6	0,8	0,5	1,8	2,1	0,8	6,3	1,9	1,5	4,5	4,6	0,8
C15:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:0	21,2	21,6	8,8	21,4	16,2	22,2	25,5	22,9	20,0	20,1	13,8	21,5
C17:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:0	-	6,9	4,4	3,2	3,8	6,9	3,0	5,6	6,1	5,7	1,3	6,7
C19:0	5,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C24:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total SFA	28,2	29,3	14,1	26,4	22,1	29,9	34,8	30,4	27,6	30,3	19,7	29,0
C16:1 n-7	1,3	0,8	4,4	4,6	5,9	2,3	3,2	1,6	4,0	7,3	9,0	2,9
C16:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:1 n-9	5,6	8,0	14,4	13,0	12,7	12,6	7,4	11,2	14,2	14,2	17,5	11,0
C18:1 n-7	1,9	-	-	-	-	2,6	-	3,1	-	3,2	-	-
C20:1 n-9	-	0,1	4,0	2,4	-	1,6	0,7	3,7	3,1	1,8	-	0,6
C20:1 n-7	-	-	-	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-
C22:1 n-9	-	-	0,3	1,6	-	0,2	-	-	0,1	1,8	-	0,1
C22:1 n-11	-	-	-	-	-	0,5	-	1,3	-	-	-	-
C24:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total MUFA	8,8	8,9	23,1	21,6	18,6	21,3	11,2	20,9	21,4	28,2	26,5	14,6
C16:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:3 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:2 n-6	1,7	0,6	0,8	0,9	4,0	4,0	1,2	4,5	2,2	1,4	3,6	1,2
C18:3 n-3	0,5	0,1	0,3	0,3	3,0	-	0,1	0,4	0,4	1,0	4,5	0,4
C18:3 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:4 n-3	-	-	0,3	0,2	-	-	0,8	-	0,5	1,3	1,7	-
C20:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
C20:3 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:3 n-6	0,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:4 n-3	1,0	-	0,3	0,1	-	-	0,4	-	3,3	-	-	-
C20:4 n-6	1,5	3,5	10,7	1,4	7,5	1,4	1,2	2,4	-	1,6	3,5	10,1
C20:5 n-3	8,0	5,0	-	12,2	6,1	6,5	14,1	10,1	13,2	10,1	13,3	8,8
C21:5 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:4 n-6	-	0,4	-	-	1,1	-	-	-	-	0,1	-	1,4
C22:5 n-3	2,5	2,4	1,9	0,8	3,4	1,7	0,3	2,4	1,6	2,5	-	2,9
C22:5 n-6	-	0,9	-	-	1,3	0,5	-	-	-	0,7	1,1	1,6
C22:6 n-3	44,4	42,5	40,5	32,7	30,7	29,3	27,0	26,6	24,4	24,0	22,5	22,3
Total PUFA	59,9	55,4	54,8	48,6	57,1	43,3	45,0	46,8	45,5	42,6	50,2	48,7
Total LCPUFA	57,7	54,7	53,4	47,2	50,1	39,3	43,0	41,9	42,4	38,9	40,4	47,1
Total EPA + DHA	52,4	47,5	40,5	44,9	36,8	35,8	41,2	36,7	37,6	34,1	35,8	31,1
Références	[428]	[215]	[5]	[5]	[215]	[85]	[5]	[428]	[71, 530]	[130, 215, 530]	[215]	[215]

Tableau D-XII : Composition en acides gras des huiles de poissons et organismes marins contenant en majorité du DHA comme acide gras polyinsaturé à longue chaîne (sous-groupe « moins de 20% des acides gras totaux »).

Sous-groupe	DHA moins de 20%												
	Nome de mer impérial	Truite arc-en- ciel	Morue	Crevette rayée	Saumon keta	Perche Macquarie	Truite commune	Aiguillat	Turbot	Sar	Sardine d'Espagne	Anchois	Empereur
Latin	<i>Pomacanthus imperator</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Gadus morua</i>	<i>Plesionika sp.</i>	<i>Oncorhynchus keta</i>	<i>Macquaria australasica</i>	<i>Salmo trutta</i>	<i>Squalus acanthias</i>	<i>Psetta maxima</i>	<i>Diplodus puntazzo</i>	<i>Sardinella aurita</i>	<i>Engraulis encrasicolus</i>	<i>Hoplostethus atlanticus</i>
C12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
C14:0	1,8	2,3	2,8	2,4	2,2	3,2	4,3	2,0	6,9	3,7	3,8	8,5	0,9
C15:0	-	-	-	1,1	-	0,5	-	-	-	0,5	0,1	-	-
C16:0	20,5	15,3	14,7	18,0	17,0	15,6	16,4	15,4	14,4	17,1	47,5	19,4	2,5
C17:0	-	0,2	-	1,3	-	-	-	-	-	0,6	1,0	-	-
C18:0	8,4	5,0	4,0	6,2	3,2	5,4	3,1	3,3	1,5	5,6	8,4	4,7	0,9
C19:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:0	-	0,1	0,2	-	-	0,4	-	-	-	0,3	-	-	-
C22:0	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C24:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total SFA	30,7	23,7	21,7	29,0	22,4	25,1	23,8	20,7	22,8	27,7	60,7	32,8	4,3
C16:1 n-7	3,7	5,3	6,5	5,1	4,1	13,2	6,1	5,8	5,9	6,5	2,8	8,8	9,1
C16:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:1 n-7	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	1,8	-	49,3
C18:1 n-9	13,3	20,3	18,1	14,5	21,4	21,2	20,7	25,3	14,4	15,1	15,6	12,5	-
C18:1 n-7	-	2,9	0,3	4,4	-	-	4,5	-	2,6	3,5	-	-	17,9
C20:1 n-9	0,6	4,3	5,9	1,3	5,4	0,6	5,2	12,1	9,2	1,4	-	2,3	7,4
C20:1 n-7	-	-	-	-	-	-	1,1	-	1,1	-	-	-	-
C22:1 n-9	0,4	1,2	3,2	-	9,4	-	-	13,6	1,1	0,5	-	1,9	-
C22:1 n-11	-	3,8	6,7	-	-	-	4,8	-	11,3	1,1	-	-	-
C24:1 n-9	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total MUFA	18,0	39,2	40,7	25,3	40,3	35,0	42,4	56,8	45,6	28,0	20,2	25,5	83,7
C16:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:3 n-3	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:2 n-6	1,4	4,4	1,5	2,0	2,0	4,1	7,1	1,0	5,3	4,6	0,3	1,8	1,8
C18:3 n-3	0,7	3,0	0,5	1,3	1,0	1,3	1,4	0,6	1,2	1,0	-	0,5	0,3
C18:3 n-6	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:4 n-3	0,4	1,0	1,1	0,5	2,0	-	1,3	0,9	2,2	1,1	-	1,0	-
C20:2 n-6	-	1,0	2,7	0,4	-	0,4	0,6	-	0,5	0,2	0,6	-	-
C20:3 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
C20:3 n-6	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-
C20:4 n-3	-	3,9	0,6	-	-	-	1,4	-	-	-	-	0,2	-
C20:4 n-6	7,9	1,1	2,8	3,5	0,9	6,9	0,6	2,3	0,4	5,3	-	0,4	0,6
C20:5 n-3	3,1	4,9	11,4	11,8	6,7	3,4	4,5	5,0	6,8	6,8	2,5	15,6	0,7
C21:5 n-3	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-
C22:4 n-6	2,7	0,5	0,4	-	-	1,0	-	-	-	5,0	-	-	0,2
C22:5 n-3	3,0	2,7	1,6	0,9	2,3	2,3	2,2	2,6	1,8	3,8	-	1,3	0,2
C22:5 n-6	2,4	0,4	0,3	1,0	0,6	0,8	-	-	-	2,1	-	-	0,2
C22:6 n-3	19,9	19,5	19,5	18,1	16,1	13,0	11,7	11,3	11,1	11,0	10,7	9,1	2,6
Total PUFA	41,5	42,4	42,6	40,8	31,6	33,6	30,8	23,7	29,3	40,8	15,3	30,0	6,6
Total LCPUFA	39,0	34,0	39,3	36,1	26,6	28,2	21,0	21,2	20,6	34,1	15,0	26,6	4,5
Total EPA + DHA	23,0	24,4	30,9	29,9	22,8	16,5	16,2	16,3	17,9	17,7	13,2	24,7	3,3
Références	[215]	[71, 73, 444, 475, 530]	[5, 71, 215, 429, 475, 530]	[85]	[475, 530]	[450]	[428]	[5, 204]	[428]	[215, 378]	[313, 530]	[5]	[475]

Tableau D-XIII : Composition en acides gras des huiles de poissons et organismes marins contenant des proportions équivalentes d'EPA et de DHA (sous-groupe « plus de 20% des acides gras totaux »).

Sous-groupe	EPA = DHA plus de 20%									
	Nom	Sar PL	Krill antarctique	Sébaste du large	Krill antarctique	Sardine du Japon	Crevette grise	Perche rose, de mer	Petit sébaste	Menhaden
Latin	<i>Diplodus puntazzo</i>	<i>Euphasia superba</i>	<i>Sebastes mentella</i>	<i>Euphasia tricantha</i>	<i>Sardinops melanostictus</i>	<i>Litopenaeus vannamei</i>	<i>Sebastes marinus</i>	<i>Sebastes viviparus</i>	<i>Brevoortia tyrannus</i>	<i>Aristichthys nobilis</i>
C12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
C14:0	0,8	7,0	3,7	3,7	6,7	-	4,0	5,6	8,4	2,4
C15:0	1,0	-	0,3	-	-	-	0,5	0,4	0,7	-
C16:0	26,0	21,6	15,2	21,4	19,5	21,1	16,3	14,5	23,4	10,8
C17:0	0,3	-	0,3	-	-	-	0,5	0,3	1,6	-
C18:0	6,7	0,8	3,7	1,2	3,9	11,8	3,6	3,1	4,3	2,5
C19:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:0	-	-	0,1	-	-	-	0,1	0,1	-	-
C22:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C24:0	-	-	0,1	-	-	-	0,1	0,1	-	-
Total SFA	34,7	29,4	23,5	26,2	30,0	32,9	25,0	23,9	38,5	15,7
C16:1 n-7	1,5	4,4	5,1	4,0	6,4	1,8	5,7	6,1	10,5	9,1
C16:1 n-9	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
C17:1 n-7	-	-	0,4	-	-	-	0,5	0,4	-	-
C18:1 n-9	9,7	7,4	15,5	15,4	9,7	16,2	14,1	13,7	11,7	27,0
C18:1 n-7	3,1	8,5	4,0	11,3	2,6	-	4,7	3,7	4,0	-
C20:1 n-9	0,0	0,4	6,8	1,6	4,4	-	7,5	13,1	1,6	2,8
C20:1 n-7	-	-	0,1	-	-	-	0,1	0,1	-	-
C22:1 n-9	-	-	1,1	-	3,4	-	4,9	1,6	1,0	3,1
C22:1 n-11	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-
C24:1 n-9	-	-	3,0	-	-	-	2,4	1,9	-	-
Total MUFA	14,4	20,6	36,1	32,3	26,6	18,0	39,8	40,6	30,0	42,0
C16:2 n-6	-	0,3	0,3	-	-	-	0,3	0,2	-	-
C16:3 n-3	-	0,3	0,3	0,1	-	-	0,3	0,6	-	-
C18:2 n-6	4,1	3,5	1,4	1,9	1,2	10,3	1,6	1,5	1,3	3,1
C18:3 n-3	-	-	0,8	-	0,8	1,2	0,8	1,3	1,5	7,8
C18:3 n-6	-	1,5	-	0,4	-	-	-	-	1,1	-
C18:4 n-3	-	4,5	4,2	0,5	2,0	-	2,0	-	1,9	-
C20:2 n-6	1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:3 n-3	-	-	0,2	-	-	-	0,2	0,2	-	-
C20:3 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
C20:4 n-3	-	-	-	-	0,9	-	-	-	1,4	-
C20:4 n-6	1,9	-	1,4	1,2	1,5	3,3	1,1	0,9	0,8	3,3
C20:5 n-3	15,8	18,8	15,1	15,0	12,8	13,9	12,0	13,0	11,5	10,7
C21:5 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:4 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	0,9	-
C22:5 n-3	3,8	-	-	-	1,8	-	0,6	-	2,0	2,1
C22:5 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	1,2
C22:6 n-3	19,0	14,2	16,4	15,6	15,3	12,2	13,8	11,9	10,4	9,9
Total PUFA	45,9	43,0	40,1	34,6	36,4	40,9	32,7	29,6	33,6	38,1
Total LCPUFA	41,8	33,0	33,1	31,7	32,4	29,4	27,6	26,0	27,8	27,2
Total EPA + DHA	34,9	33,0	31,6	30,6	28,1	26,1	25,8	24,9	21,9	20,6
Références	[378]	[392]	[229]	[392]	[5, 454]	[170]	[229, 530]	[229]	[5, 71, 130, 475, 530]	[475]

Tableau D-XIV : Composition en acides gras des huiles de poissons et organismes marins contenant des proportions équivalentes d'EPA et de DHA (sous-groupe « moins de 20% des acides gras totaux »).

Sous-groupe	EPA = DHA moins de 20%												
	Nom	Maquereau	Sprat	Capelan	Bar, loup de mer	Hareng	Amour argenté	Pagre	Crevette seabob	Courbine	Curimbata	Bar rayé	Malachigan
Latin	<i>Scomber scombrus</i>	<i>Sprattus sprattus</i>	<i>Mallotus villosus</i>	<i>Morone labrax</i>	<i>Clupea harengus</i>	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	<i>Pagrus pagrus</i>	<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	<i>Micropogonias furneri</i>	<i>Prochilodus sp.</i>	<i>Morone saxatilis</i>	<i>Aplodinotus grunniens</i>	<i>Coregonus artedi</i>
C12:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	6,8	6,0	6,1	3,9	6,4	4,5	5,0	-	0,9	2,9	10,6	2,2	4,6
C15:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-
C16:0	22,9	21,5	12,1	19,5	14,5	15,4	19,2	35,0	38,4	28,9	29,9	19,5	13,8
C17:0	-	-	-	-	-	-	-	2,2	0,3	0,4	-	-	-
C18:0	3,1	2,4	1,5	4,1	1,6	3,2	4,1	15,5	15,4	5,8	3,6	3,3	2,9
C19:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,9	-	-	-
C22:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C24:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total SFA	32,7	29,9	19,7	27,5	22,5	23,1	28,3	52,7	55,0	45,0	44,0	25,0	21,3
C16:1 n-7	7,7	5,3	8,4	5,6	9,8	10,5	7,6	4,7	3,6	12,3	16,8	16,6	21,5
C16:1 n-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:1 n-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,41	-	-	-
C18:1 n-9	17,1	16,5	12,2	25,9	15,6	24,8	19,0	22,0	17,7	13,0	12,1	26,4	25,2
C18:1 n-7	-	-	2,8	-	-	-	2,7	-	-	-	3,1	-	-
C20:1 n-9	4,9	7,0	14,2	4,3	11,6	2,5	3,6	-	-	-	1,2	1,2	1,3
C20:1 n-7	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-	0,5	-	-
C22:1 n-9	5,3	12,0	13,6	3,8	15,4	2,9	3,4	-	-	1,3	-	-	0,3
C22:1 n-11	-	-	-	-	-	-	4,0	-	-	-	-	-	-
C24:1 n-9	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total MUFA	34,9	40,8	51,9	39,6	52,5	40,7	44,3	26,7	21,3	27,9	33,7	44,2	48,3
C16:2 n-6	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C16:3 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:2 n-6	1,3	1,6	2,8	9,1	0,9	3,8	4,4	-	-	-	1,7	3,1	1,9
C18:3 n-3	1,1	1,3	0,8	1,4	0,5	7,4	1,2	-	-	1,2	1,6	2,5	2,6
C18:3 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:4 n-3	3,5	3,3	4,3	1,3	2,3	2,8	1,5	-	-	-	1,8	-	1,5
C20:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-
C20:3 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:3 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,3	-	-
C20:4 n-3	-	0,7	0,2	-	0,4	-	-	-	-	-	0,8	-	0,8
C20:4 n-6	1,7	-	1,0	0,5	0,4	3,1	0,4	-	1,6	0,3	1,9	-	1,7
C20:5 n-3	8,2	8,1	9,2	6,6	8,5	7,1	5,1	4,6	7,0	7,8	5,9	5,1	6,2
C21:5 n-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:2 n-6	-	-	-	-	-	-	-	2,8	7,8	8,1	-	-	-
C22:4 n-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C22:5 n-3	1,2	-	0,7	0,8	1,1	2,0	1,0	-	-	-	1,2	2,2	1,8
C22:5 n-6	-	-	-	-	0,4	1,4	-	-	-	-	-	1,1	0,5
C22:6 n-3	11,6	10,8	7,1	8,8	6,0	7,2	8,7	8,4	5,6	4,7	6,2	6,9	3,8
Total PUFA	28,4	25,8	26,5	28,5	20,5	34,7	22,3	15,7	21,9	22,4	21,7	20,9	20,8
Total LCPUFA	22,6	19,6	18,2	16,7	16,9	20,8	15,2	15,7	21,9	21,2	16,6	15,3	14,8
Total EPA + DHA	19,7	18,9	16,3	15,4	14,5	14,3	13,8	12,9	12,6	12,5	12,1	12,0	10,0
Références	[71, 475, 530]	[71]	[5, 218, 530]	[279]	[71, 475, 530]	[475]	[85]	[313]	[313]	[313]	[245]	[475]	[475]

II. 5) Discussion sur ces sources animales

Avant toute chose, il est important de noter que la teneur en lipides dans les poissons montre une grande variabilité, qui doit être prise en compte dans le choix d'un poisson en tant qu'aliment à part entière. Le but de la présente classification est de comparer les profils en acides gras des huiles pour identifier une source importante d'EPA et de DHA, c'est pourquoi ce paramètre n'a pas été intégré. Il faut noter par ailleurs que les poissons d'eau de mer maigres contiennent de 0,1 à 1% de lipides, les poissons d'eau de mer gras, 1 à 25%, et les poissons d'eau douce en général moins de 4% [71].

Au vu de cette classification, plusieurs conclusions s'imposent :

- ✓ D'une part, les poissons d'eau douce ne sont pas plus pauvres en LCPUFA que les poissons d'eau de mer, puisque dans chaque groupe figurent des poissons de chacune des deux sortes. C'est la teneur en lipides plus faible des poissons de rivière qui en fait une source moins intéressante. En effet, ces huiles, trop chères à extraire, ne sont pas disponibles sur le marché.
- ✓ D'autre part, si on s'intéresse aux autres organismes marins inclus dans la classification, il apparaît clairement que ces sources ont leur place dans les préoccupations des formulateurs, puisqu'elles sont également retrouvées dans tous les groupes. Ceci explique les axes actuels de recherche concernant les algues ou le krill, parallèlement aux poissons, cette dernière ressource devenant limitée suite au développement de la pêche intensive.
- ✓ Et enfin, dans le cas où les compositions permettent de distinguer les profils en acides gras de l'huile et de la lécithine de l'organisme, il apparaît que le DHA est préférentiellement porté par les PL (d'où l'existence de travaux de recherche à l'heure actuelle sur les lécithines marines en tant que vecteur de LCPUFA *n-3*). Cependant, et comme pour les huiles, les lécithines marines montrent également un profil en acides gras très différent selon les espèces. En effet, si la lécithine de crabe des neiges contient beaucoup d'EPA, et celle de sar des proportions équivalentes d'EPA et de DHA, les PL de truite commune, de morue, de hareng, de pagre et de turbot contiennent surtout du DHA.

La même remarque que pour les huiles végétales doit être faite dans cette partie, c'est-à-dire qu'étudier les profils en acides gras pour identifier une source intéressante ne suffit pas, il est également nécessaire de s'assurer que cette matière soit disponible sur le marché pour qu'un formulateur puisse la mettre en œuvre dans un produit alimentaire industriel. A ce niveau, la teneur en lipides des poissons intervient, puisqu'elle détermine le coût de l'huile, et donc sa disponibilité.

En effet, au vu de cette classification, la source la plus riche en LCPUFA, quelles que soient les quantités respectives d'EPA et de DHA, est l'huile de saint-pierre, tandis que l'huile de krill antarctique (*Euphasia superba*) permet également d'apporter une proportion importante de LCPUFA, avec un ratio EPA/DHA proche de 1. Ces deux huiles ne sont malheureusement pas disponibles en tant qu'ingrédient, et d'autres sources doivent être considérées par le formulateur. Actuellement, les sources les plus disponibles sur le marché sont les huiles d'anchois, de sardine, de maquereau, de menhaden, de saumon, et de foie de morue. Les plus riches en LCPUFA, parmi elles, sont les huiles de saumon et de foie de morue, qui sont également les plus riches en DHA, tandis que les huiles d'anchois et de sardine sont les plus riches en EPA.

Les teneurs en EPA et DHA apportées par ces sources disponibles sont malgré tout très pertinentes dans un projet de formulation faisant intervenir un enrichissement en LCPUFA de la famille *n-3*, même si ce ne sont pas les plus riches au vu de cette classification.

Une dernière remarque doit être notée, qui concerne la différence entre poissons sauvages et poissons d'élevage. Ces derniers représentent une nouvelle source de LCPUFA, car contrairement aux idées reçues, la surveillance étroite de leur alimentation leur permet de contenir une quantité de LCPUFA équivalente à celle des poissons sauvages [74]. De plus, la maîtrise de la qualité des eaux d'élevage permet de diminuer la teneur en métaux lourds dans la chair de ces poissons [74]. La pisciculture apparaît donc comme une alternative à la pêche intensive, qui cause actuellement une diminution sévère des réserves naturelles mondiales de poisson.

III/ Composés volatils des huiles de poissons

L'utilisation dans le cadre du projet de thèse de ce type de matière première engendre un challenge organoleptique évident, qui réside dans l'odeur de poisson tenace apportée au produit. Ce paragraphe présente une synthèse bibliographique des composés volatils impliqués dans le dégagement de l'odeur de poisson, dans le but de mieux cerner cette problématique.

Les composés responsables de l'odeur de poisson sont en majorité des aldéhydes et des cétones à courte chaîne de carbone (5 à 10 atomes de carbone en moyenne), saturée ou non [165, 208]. Le tableau D-XV présente les principaux composés volatils considérés comme responsables de l'odeur de poisson dans différents produits alimentaires, que ce soit des poissons crus, cuits, des huiles de poisson seules ou des huiles de poisson contenues dans des produits alimentaires.

Tableau D-XV : Composés volatils impliqués dans l'odeur de poisson, retrouvés dans différents produits.

Composés volatils	Huile de poisson en émulsion	Huile de poisson en émulsion	Huile de poisson dans lait	Huile de poisson dans lait	Huile de poisson dans lait	Huile de poisson dans mayonnaise	Chair de saumon	Filet de turbot	Différentes huiles de poisson	Huile de menhaden	Truite bouillie
Alcools											
1-pentanol	-	-	●	-	-	-	-	-	●	-	-
E-2-penten-1-ol	-	-	-	-	●	●	●	●	●	-	-
Z-2-penten-1-ol	-	-	-	-	-	●	-	●	-	-	-
1-penten-3-ol	-	-	●	-	-	●	●	-	●	-	-
Z-3-hexen-1-ol	●	●	-	-	-	-	-	-	●	-	-
1-octen-3-ol	-	-	-	-	-	●	●	-	-	-	-
1,5-octadien-3-ol	●	●	-	-	-	●	-	-	-	-	-
E-2-nonen-1-ol	-	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-
Cétones											
1-penten-3-one	-	-	●	●	●	●	-	●	-	●	-
2-hexanone	-	-	-	-	-	●	-	-	-	-	-
3-hexanone	-	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-
2-heptanone	-	-	●	-	-	●	-	-	-	-	-
3-heptanone	-	-	●	-	-	●	-	-	-	●	-
1-octen-3-one	-	-	●	●	-	●	●	-	-	-	●
Z-1,5-octadien-3-one	-	-	●	●	-	●	-	-	●	-	●
E,Z-3,5-octadien-2-one	●	-	●	-	-	●	●	-	-	-	-
E,E-3,5-octadien-2-one	●	-	●	-	-	●	●	-	-	●	-
2-nonanone	-	-	-	-	-	-	-	●	●	●	-
1-nonen-3-one	-	-	-	-	-	●	-	-	-	-	-
Aldéhydes											
Benzaldehyde	-	-	●	-	-	●	●	-	-	-	-
Propanal	-	-	●	-	-	-	●	-	-	-	-
Butanal	-	-	●	-	-	●	-	-	-	-	-
E-2-butenal	-	-	●	-	-	●	-	-	●	●	-
Pentanal	-	-	●	-	-	●	-	-	●	●	-
E-2-pentenal	-	-	●	-	-	●	-	-	●	●	-
Hexanal	●	-	●	-	-	●	●	●	●	●	●
E-2-hexenal	●	-	-	-	●	●	-	-	●	●	-
Z-3-hexenal	-	-	-	-	-	●	-	-	-	-	●
E,E-2,4-hexadienal	-	-	●	-	-	●	-	-	-	●	-
Heptanal	-	-	●	-	-	●	●	-	●	●	-
E-2-heptenal	-	-	-	-	-	●	●	-	●	●	-
Z-4-heptenal	●	-	●	●	●	●	-	●	●	-	●
E,E-2,4-heptadienal	●	-	●	●	●	-	●	-	●	●	-

Composés volatils	Huile de poisson en émulsion	Huile de poisson en émulsion	Huile de poisson dans lait	Huile de poisson dans lait	Huile de poisson dans lait	Huile de poisson dans mayonnaise	Chair de saumon	Filet de turbot	Différentes huiles de poisson	Huile de menhaden	Truite bouillie
Aldéhydes											
E,Z-2,4-heptadienal	●	●	●	-	-	●	●	-	-	●	-
Octanal	-	-	●	-	-	●	●	-	●	●	-
E-2-octenal	-	-	-	-	-	●	●	●	-	●	-
E,E-2,4-octadienal	-	-	-	-	-	●	-	●	-	-	-
E,Z-2,4-octadienal	-	-	-	-	-	●	-	●	-	-	-
Nonanal	-	-	-	-	-	●	●	-	●	●	-
E-2-nonenal	-	-	●	-	-	●	-	●	-	-	-
E,Z-2,6-nonadienal	●	-	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Decanal	-	-	●	-	-	●	-	-	-	-	-
E-2-decenal	-	-	●	-	-	●	-	-	-	-	-
E,Z-2,4-decadienal	●	-	●	-	-	-	-	●	●	●	-
E,E-2,4-decadienal	●	●	●	-	-	●	-	●	-	-	-
E,Z,Z-2,4,7-decatrienal	●	-	●	-	-	-	-	-	●	●	-
E,E,Z-2,4,7-decatrienal	●	-	●	-	-	-	-	-	●	●	-
Références	[145]	[144]	[499]	[500]	[294]	[189]	[165]	[401]	[246]	[208]	[335]

Parmi ces composés volatils, les plus souvent cités sont deux cétones : 1-penten-3-one et Z-1,5-octadien-3-one et cinq aldéhydes : hexanal, Z-4-heptenal, E,E-2,4-heptadienal, E,Z-2,6-nonadienal et E,Z-2,4-decadienal.

Une équipe danoise a cherché à modéliser l'impact relatif de certains de ces composés sur l'odeur de poisson générée dans un produit [500], et il a été mis en évidence que le Z-4-heptenal agissait plus par interaction avec d'autres composés, comme le E,Z-2,6-nonadienal ou la 1-penten-3-one, que comme composé seul. Les auteurs concluent que la présence de cet heptenal renforce l'odeur générée par les autres composés.

Il paraît évident que l'inclusion d'huile de poisson dans un produit alimentaire est délicate, du fait de la présence de ces composés volatils. Bien qu'il soit possible de trouver sur le marché des huiles de poisson désodorisées, le procédé de désodorisation est tellement complexe qu'il est rare que le produit soit réellement inodore à l'ouverture du contenant.

Deux difficultés viennent s'ajouter à ceci :

i) Premièrement, les huiles de poisson étant très insaturées, elles sont très sensibles à l'oxydation, et parmi les composés secondaires de l'oxydation des lipides sont retrouvés l'hexanal, le Z-4-heptenal, le E,Z-2,4-decadienal et la 1-penten-3-one (cf. chapitre « Oxydation des lipides »). Donc même désodorisée à la base, l'huile développera une odeur de poisson au cours de son oxydation [192, 388] ;

ii) Deuxièmement, les produits alimentaires dans lesquels l'huile de poisson est incluse contiennent quasiment tous une partie aqueuse, puisque rares sont les aliments qui n'en comprennent pas. Or, il a été prouvé que le E,Z-2,6-nonadienal peut être converti en Z-4-heptenal en présence d'eau par une réaction de type rétro-aldol [145, 231] (figure D-6), ce qui participe d'une manière supplémentaire à la dégradation organoleptique d'un produit alimentaire, puisque cet heptenal est connu pour renforcer les odeurs des autres composés volatils [500].

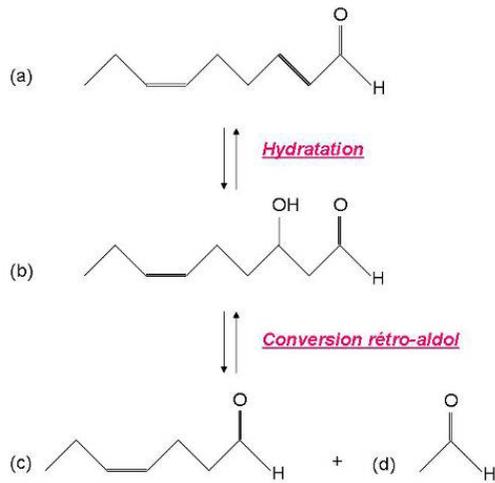


Figure D-6 : Hydratation et conversion rétro-aldol du E,Z-2,6-nonadienal en Z-4-heptenal [d'après 231].

Légende : (a) E,Z-2,6-nonadienal, (b) 3-hydroxy-Z-6-nonenal, (c) Z-4-heptenal, (d) éthanal.

Dans le cadre d'un projet visant à inclure une quantité non négligeable d'huile de poisson dans un produit alimentaire, il semble nécessaire de gérer non seulement la formulation du produit, mais également la protection et l'isolement de cet ingrédient pour éviter tout contact avec l'eau ou l'oxygène.

De plus, des études liées au comportement des composés volatils dans différentes matrices ont montré que ces molécules se dégagent plus rapidement s'ils sont présents dans une matrice aqueuse que dans une matrice hydrophobe [184].

Enfin, dans le cadre d'une étude sur les émulsions huile dans eau, il a été démontré que les composés se dégagent d'autant plus lentement que l'émulsion est stabilisée par l'ajout d'émulsifiants puissants [222].

L'encapsulation de l'huile de poisson paraît donc être une voie intéressante, que ce soit pour la protection contre l'oxydation, pour l'isolement par rapport à l'eau, ou pour limiter le dégagement des composés volatils délétères.

LE PROFIL EN ACIDES GRAS OPTIMAL

Après avoir présenté l'état de l'art sur l'impact des lipides alimentaires sur les lipides sanguins et le développement des pathologies cardio-vasculaires, les matières premières permettant d'apporter ces acides gras dans une formulation alimentaire, le type de produit choisi pour l'étude, son contexte de concurrence, ses contraintes techniques, organoleptiques et son procédé de fabrication, ce chapitre décrit la démarche effectuée pour mettre au point le profil en acides gras du produit.

Un corps gras mis au point selon les objectifs de la thèse est un produit à forte vocation « santé », et une bonne communication sur l'emballage est indispensable pour faire passer un message de prévention.

Ces annotations ayant trait à la santé sont appelées allégations, et l'AFSSA a mis en place des règles de manière à éviter les abus d'étiquetage. La première partie de ce chapitre concerne ce cadre législatif, tandis que la suite présente les données de la consommation de lipides en France, ainsi que le profil en acides gras retenu.

I/ Le cadre législatif entourant les allégations

L'AFSSA a mis en place des règles régissant les allégations « santé » qui peuvent être affichées sur les produits [239].

Celles-ci sont classées en trois familles :

- les *nutritionnelles quantitatives*, relatives à la teneur en énergie ou en nutriments ;
- les *fonctionnelles*, relatives au rôle d'un produit alimentaire ou de l'un de ses composants dans la croissance, le développement ou les fonctions normales de l'organisme (des critères pour l'utilisation de telles allégations concernant des vitamines ou des minéraux sont prévus par la CEDAP, la Commission d'étude des denrées alimentaires destinées à une alimentation particulière) [120] ;
- les *santé*, relatives à la relation existant entre le produit ou l'un de ses composants et la santé.

Les allégations santé, catégorie visée par ce projet, comportent deux niveaux :

- niveau a : concernant la nutrition de base, par exemple, concernant les acides gras de la famille *n-3* : « le produit participe/contribue au rééquilibrage des apports en acides gras oméga 3 »,
- niveau b : relatif à un effet sur la santé et les pathologies, par exemple : « les acides gras oméga 3 participent/contribuent au bon fonctionnement cardio-vasculaire ».

Ces niveaux sont définis par des propriétés particulières du produit. Dans le cas d'une allégation de niveau b, le produit doit :

- ✓ être « source » ou « riche » en acides gras *n-3*,
- ✓ contenir moins de 30% de SFA,
- ✓ avoir un ratio *n-6/n-3* inférieur à 5,
- ✓ et contenir moins de 150 mg de cholestérol pour 100 g de produit fini.

Remarque : Pour être source d'acides gras *n-3*, 100 g ou 100 kcal de produit doivent couvrir 15% des ANC en ALA. De même, pour être riche en *n-3*, ce sont 30% des ANC en ALA qui doivent être couverts par 100 g ou 100 kcal de produit.

Un point reste cependant tendancieux dans ces critères, qui concerne le mode de calcul du ratio *n-6/n-3*. En effet, le rapport de 2003 de l'AFSSA sur les acides gras *n-3* [239] stipule que « si le produit est enrichi en précurseur, le rapport LA/ALA devrait être inférieur à 5 » et que « si le produit enrichi en *n-3* [...] n'est pas enrichi en ALA, il doit être suffisamment riche ou enrichi en EPA et/ou DHA pour que le rapport pondéré [...] soit lui aussi inférieur à 5 ». Ce rapport pondéré étant LA/(EPA*10 + DHA*10).

Ce mode de calcul a été validé par la DGCCRF et relayé dans un document transmis aux industriels agroalimentaires (23/02/05) [64]. Il est précisé que la notion « d'équivalent ALA » (EPA*10 + DHA*10) n'est prise en compte pour calculer le ratio *n-6/n-3* que si le produit ne contient pas d'ALA.

Cependant, l'AFSSA diffuse depuis 2004 un résumé du rapport publié en 2003, où le mode de calcul présenté est différent : « le rapport LA/acides gras oméga 3, où les acides gras oméga 3 incluent l'ALA, le DHA et l'EPA (le facteur de bioéquivalence fixé à 10 permet de convertir les apports en DHA et EPA en ALA), on parlera plus généralement du rapport LA/équivalent ALA » [8].

Ce mode de calcul n'est pas reconnu par la DGCCRF, et cette dissension entre recommandation de l'AFSSA et décision de la DGCCRF permet à des corps gras ayant un ratio $n-6/n-3$ trop élevé (si le ratio est calculé selon la méthode de la DGCCRF) d'afficher des allégations santé, en mentionnant une valeur obtenue avec la formule révisée de l'AFSSA.

II/ Consommations et recommandations

L'AFSSA a défini les ANC, les besoins en chaque nutriment pour les différents groupes de la population française. Ces recommandations sont basées sur la couverture des besoins de chacun, selon son sexe, sa classe d'âge ou encore son niveau d'activité physique [287, 503].

Le tableau D-XVII présente les données de consommation moyenne de lipides de la population française, comparées aux ANC [239, 445, 504, 544]. Les catégories de lipides présentées ont été choisies pour leur influence sur la nutrition lipidique et les pathologies associées. En effet, les chapitres précédents ont montré que les SFA influent sur le métabolisme du cholestérol, tandis que le LA et l'ALA sont métabolisés en eicosanoïdes impliqués dans le développement de l'athérosclérose. Enfin les LCPUFA, et en particulier l'EPA et le DHA ont des rôles protecteurs multiples dans le mécanisme de ces pathologies.

Tableau D-XVII : Consommation française en lipides, et comparaison par rapport aux apports nutritionnels conseillés par l'AFSSA.

Abréviations : SFA : acides gras saturés, MUFA : acides gras monoinsaturés, LA : acide linoléique, ALA : acide α -linoléique, LCPUFA : acides gras polyinsaturés à longue chaîne, DHA : acide docosahexaénoïque, 6/3 : ratio LA / ALA, ANC : apports nutritionnels conseillés.

** Données issues des études SU.VI.MAX, Transfair et Aquitaine [239, 445, 504, 544].*

*** La valeur des ANC présentés est la moyenne pour hommes et femmes confondus [287, 503].*

	Energie	Lipides	SFA	MUFA	LA	ALA	LCPUFA	DHA	6/3
Consommation*	2110 kcal	39,4%	45,5%	40,2%	11,5%	0,8%	0,28%	0,15%	14
		92,4 g	42 g	37 g	10,6 g	0,7 g	0,26 g	0,13 g	
ANC**	2000 kcal	33%	24,2%	60,6%	12,1%	2,4%	0,61%	0,15%	5
		73,3 g	17,7 g	44,4 g	8,9 g	1,76 g	0,45 g	0,11 g	
Bilan	+110 kcal	+25%	+140%	-15%	+20%	-60%	-40%	-	excès

Si les données de consommation sont comparées aux ANC préconisés par l'AFSSA, il apparaît que les lipides en général, et les SFA en particulier, sont apportés en excès dans le régime alimentaire français. Les MUFA, l'ALA et les LCPUFA (autres que le DHA) sont quant à eux en déficit.

Un nouveau groupe de travail a été formé par l'AFSSA pour travailler sur les ANC, et plus particulièrement sur les AG $n-3$.

De nouveaux ANC pour les AG $n-3$ sont attendus, ainsi que des précisions concernant chaque acide gras de cette famille, en dissociant le précurseur et ses produits d'élongation. Il semble plausible que les ANC pour les LCPUFA soient augmentés, le rendement de conversion de l'ALA en EPA et DHA ayant été largement surestimé (cf. chapitre « Les lipides alimentaires »). De plus, l'établissement d'un ANC pour l'EPA paraît également inévitable, puisque, jusqu'à présent, seuls l'ALA et le DHA étaient concernés. La mise au point du profil en acides gras du produit doit donc aller au-delà des ANC actuels, pour répondre à ces futures recommandations.

Ce groupe de travail devra également rendre un rapport sur les effets spécifiques du précurseur, opposés à ceux de l'EPA et du DHA. Au vu de la recherche bibliographique effectuée sur l'impact des

AG *n-3* sur le développement des maladies cardio-vasculaires (chapitre « Pathologies liées au métabolisme des lipides »), la conclusion de ce rapport ne pourra qu'appuyer la démarche choisie dans la thèse, prouvant la nécessité d'apporter de l'EPA et du DHA, puisque, à ce jour, seuls ces acides gras ont montré de réels effets sur la santé cardio-vasculaire.

III/ Etablissement du profil optimal

L'objectif nutritionnel visé à travers ce produit est tout d'abord de participer au rééquilibrage des apports lipidiques de la population française, puisque, comme vu dans la partie précédente, l'alimentation moyenne en France est déficitaire en MUFA et en PUFA de la famille *n-3* (aussi bien le précurseur que les dérivés à longue chaîne). Il est également nécessaire de diminuer le ratio *n-6/n-3* [239, 503, 544].

Ce produit n'entend pas apporter l'ensemble des lipides nécessaires cités dans les ANC, mais participer à l'apport lipidique global de la manière la plus judicieuse, étant donné la composition du reste des apports d'une journée. Doivent donc être pris en compte les apports excédentaires en SFA et en LA dans le régime alimentaire français.

En effet, les produits laitiers, la viande, la charcuterie et les pâtisseries, sucreries, viennoiseries contiennent des SFA et MUFA, et les produits carnés et céréaliers des PUFA *n-6* (majoritairement LA) [544].

Etant donné la quantité croissante de produits alimentaires enrichis en *n-3*, il semble inutile d'apporter les ANC complets en précurseur dans une portion. Il a donc été décidé qu'une portion de 30 g de corps gras devrait apporter environ 30% des ANC en LA, et la moitié des ANC en ALA.

Ces choix fixent le ratio LA/ALA à une valeur de l'ordre de 3, ce qui est en phase avec les recommandations de différentes instances de santé publique. En effet, l'AFSSA recommande une valeur de 5 [287], au lieu de la valeur de 14 estimée par des études à grande échelle, comme SU.VI.MAX ou Aquitaine [445].

Cette tendance se retrouve dans la plupart des pays industrialisés, puisque le WHO/FAO parle d'un ratio de 3 ou 4 [514], la *Deutsche gesellschaft für ernährung* de 5 ou moins [261], et le Royaume-Uni de 4 [441, 542].

En ce qui concerne les LCPUFA *n-3*, l'apport d'une portion doit se baser sur les quantités observées en étude clinique comme étant suffisantes pour induire un effet bénéfique pour le système cardio-vasculaire. Dans ce sens, rappelons quelques chiffres :

- ✓ Accidents cardio-vasculaires fatals : des effets bénéfiques ont été observés pour des doses de 0,3 à 0,9 g/j selon les études [18, 19, 112, 166, 167, 209, 265, 266, 314, 431, 464, 467, 534],
- ✓ Lipides sanguins (TAGp, HDL-cholestérol) : 0,4-0,8 g/j [110, 122, 166, 167, 171, 174, 311, 343, 369, 400, 411, 439, 461, 462, 464, 490],
- ✓ Pression artérielle : à partir de 0,2 g/j, mais souvent supérieur à 0,7 g/j [110, 127, 311, 341, 400, 490, 502],
- ✓ Variabilité du rythme cardiaque et fréquence de base : à partir de 0,4 g/j [47, 90-93, 110, 242, 341],
- ✓ Facteurs de coagulation : 1-1,5 g/j [3, 41, 62, 160, 213, 320, 363, 403, 446, 478, 493, 510],
- ✓ Marqueurs de l'inflammation : 0,5-1 g/j [2, 3, 84, 115, 138, 224, 288, 291].

Si les apports nutritionnels conseillés par l'AFSSA pour les LCPUFA sont de 0,45 g/j environ [287], ils comprennent cependant les LCPUFA des familles *n-6* et *n-3*, donc également l'ARA et le DPA (entre autres), en plus de l'EPA et du DHA. Il peut donc être postulé que cette dose est répartie en 0,225 g/j de LCPUFA *n-6*, et 0,225 g/j LCPUFA *n-3*.

L'*American heart association* recommande un apport journalier en LCPUFA *n-3* de 0,3 à 0,5 g [261] tandis qu'une autre association de nutritionnistes américains va un peu plus loin, avec une valeur de 0,65 g/j [263]. Les recommandations britanniques dépassent quant à elles le gramme, avec 1,1 g/j [263, 441]. Rappelons, enfin, que l'estimation de la consommation d'EPA+DHA au Japon est comprise entre 1 et 2 g/j, pays où l'incidence des maladies cardio-vasculaires est très inférieure à celle observée dans les pays occidentaux, et où l'espérance de vie est la plus longue au monde [477].

Compte tenu de tout ceci, un apport compris entre 0,6 et 0,7 g d'EPA+DHA par portion semble raisonnable pour permettre de mettre en évidence des effets positifs sur des facteurs associés au risque de mortalité cardio-vasculaire.

La proportion de SFA doit être inférieure à 30% des acides gras totaux pour rester dans le cadre des allégations santé, mais ne peut être inférieure à 25% car le produit doit atteindre la cible de texture des produits de l'entreprise St Hubert.

Le profil d'acides gras retenu pour le produit comprend donc environ 25% de SFA, 45 à 50% de MUFA, 15 à 20% de LA, 5 à 7% d'ALA pour un ratio $n-6/n-3$ inférieur à 3, et enfin 4% de LCPUFA $n-3$ pour une dose journalière de 0,7g (tableau D-XVIII).

Tableau D-XVII : Le profil en acides gras choisi pour le produit de l'étude.

Abréviations : SFA : acides gras saturés, MUFA : acides gras monoinsaturés, LA : acide linoléique, ALA : acide α -linoléique, EPA : acide eicosapentaénoïque, DHA : acide docosahexaénoïque, $n-6/n-3$: ratio LA / ALA, FA : acides gras totaux, ANC : apports nutritionnels conseillés.

** La valeur des ANC présentés est la moyenne pour hommes et femmes confondus [287, 503].*

*** Les ANC des LCPUFA $n-3$ sont estimés à la moitié des ANC des LCPUFA totaux conseillés par l'AFSSA, soit 0,225 g/j.*

	Lipides	SFA	MUFA	LA	ALA	EPA+DHA	6/3
Profil (% FA)	59%	25%	45 à 50%	15 à 20%	5 à 7%	4%	< 3
Portion (30 g/j)	17,7 g	4,5 g	8 à 9 g	2,5 à 3,5 g	0,9 à 1,2 g	0,7 g	< 3
% ANC*/portion		25%	18 à 20%	28 à 38%	50 à 70%	310%**	

La balance entre EPA et DHA à l'intérieur de cette dose de 0,7 g par jour sera dirigée par la recherche de l'huile de poisson employée dans la formulation du produit. En effet, les différents fournisseurs présents sur le marché à l'heure actuelle ont des difficultés à proposer des produits réellement neutres en terme de goût et d'odeur.

Les huiles de poisson proposées montrent des répartitions variables entre EPA et DHA, avec deux types de profils majoritaires : un à 60% d'EPA et 40% de DHA (type huile d'anchois) et un à 20% d'EPA et 80% de DHA (type huile de foie de morue).

Il s'avère que dans ce projet le choix de l'huile de poisson, compte tenu des essais de fabrication, du coût de la matière et de la solidité du fournisseur, s'est porté sur un produit contenant au minimum 21% d'EPA et 15% de DHA (% des acides gras totaux). Les 4% de LCPUFA du profil optimal se répartissent donc en 2,3% d'EPA et 1,7% de DHA, soit une dose journalière de 0,4 g d'EPA et 0,3 g de DHA.

Ce profil a été présenté à un comité d'experts réuni par l'entreprise, et composé de scientifiques et de médecins reconnus dans les domaines de la nutrition, de la cardiologie, de la médecine générale ou encore dans la mise en place d'études cliniques. Il a été validé dans le cadre de ce projet, c'est-à-dire la mise au point d'un corps gras équilibré nutritionnellement, utile en prévention des accidents cardio-vasculaires.

E. Formulation – Physico-chimie

*« Il n'y a pas de poisson sans arête. »
[Proverbe breton]*

Influence de la formulation de la phase concrète sur la texture

INFLUENCE DE LA FORMULATION DE LA PHASE CONCRETE SUR LA TEXTURE

La problématique de la texture d'un produit axé santé est de réussir à intégrer aussi bien les exigences nutritionnelles que les contraintes techniques. En effet, un produit destiné à une allégation santé ne doit pas contenir plus de 30% de SFA (sur acides gras totaux), tandis que la cible de l'entreprise en terme de texture est un produit ferme, qui ne fonde pas trop rapidement à température ambiante, et qui soit « tartinable ». La conciliation de ces deux contraintes est déjà réalisée dans les produits de la gamme de St Hubert, mais le sujet de la thèse introduit une difficulté supplémentaire, de par la dose élevée d'huile de poisson à incorporer. Très insaturée, cette matière première reste fluide dans le produit, et comme elle contient plus de SFA qu'une huile fluide classique, elle augmente le total des SFA sans pour autant participer à l'élaboration du réseau cristallin.

Cette étude de formulation comprend deux types d'analyses différentes, la pénétrométrie et la calorimétrie différentielle à balayage, dont les protocoles sont décrits dans les annexes expérimentales. La première permet d'évaluer différents critères de texture, comme la dureté du produit, sa résistance, ou encore son caractère collant. La seconde permet d'apporter des explications sur les différences de texture observées entre les produits dans les résultats de pénétrométrie.

Dans ce chapitre, l'analyse des résultats de pénétrométrie et de calorimétrie différentielle est précédée de la présentation des matières premières utilisées dans cette étude.

I/ Caractéristiques des matières premières

Les différentes matières grasses utilisées dans cette étude peuvent être classées en deux groupes, en fonction de leur point de fusion. En effet, celles qui sont solides à température ambiante sont dites « concrètes », et les autres sont dites « fluides ». La texture d'un corps gras est majoritairement déterminé par les graisses concrètes, qui créent un réseau cristallin emprisonnant les huiles fluides.

I. 1) Graisses concrètes

Les matières premières intervenant dans la formulation du produit, et ayant un impact sur la texture, sont les graisses concrètes suivantes : graisse de coprah, stéarine de palme, mélange d'huiles fractionnées VD1 (référence produit du fournisseur) et huile de colza complètement hydrogénée.

La graisse de coprah est fournie par Cargill, ainsi que la stéarine de palme, dont le point de fusion est de 50°C.

Le mélange d'huiles VD1 comprend 45 à 53% m/m d'huile de palmiste fractionnée, 28 à 34% m/m d'huile de tournesol oléique et 18 à 23% m/m d'huile de palme fractionnée. Le fournisseur, ADM, garde confidentielles les proportions exactes de ce mélange qui est réalisé à façon, avec comme problématique de donner au produit un profil de fonte proche de celui obtenu avec une phase concrète contenant du coprah et de la stéarine de palme, mais en apportant moins de SFA.

L'étude de la formulation de la phase concrète des produits a conduit à l'utilisation d'huile de colza complètement hydrogénée (point de fusion de 68°C, RP68, Uni-Mills, teneur en AG *trans* <1%). Cette matière première contient presque 95% d'acide stéarique, complétés de 5% d'acide palmitique (cf. profil en acides gras des matières premières dans le tableau E-I page suivante). L'acide stéarique est issu de l'hydrogénation complète de l'OA, du LA et de l'ALA présents à l'origine dans l'huile de colza. De manière à simplifier les propos, l'huile de colza complètement hydrogénée sera désignée dans ce manuscrit sous le terme « colza hydrogéné ».

Remarque : l'hydrogénation des huiles consiste à diminuer le taux d'insaturation de la chaîne carbonée en faisant buller de l'hydrogène dans une huile raffinée en présence d'un catalyseur (souvent le nickel réduit) [146] ; le principe de la réaction est le suivant : une molécule de H₂ réagit avec une double liaison -CH=CH- pour conduire à l'obtention d'une simple liaison -CH₂-CH₂- par saturation des deux atomes de carbone impliqués dans la double liaison d'origine [146] ; l'hydrogénation partielle des

huiles conduit à la formation de doubles liaisons en configuration *trans*, ce qui n'est pas recherché dans le cas d'un produit alimentaire, au vu des préoccupations liées à l'influence négative des AG *trans* dans le développement des maladies cardio-vasculaires [249, 377] ; au contraire, l'hydrogénation totale conduit à un produit constitué presque à 100% de SFA, ne contenant donc pas d'AG *trans*.

Tableau E-1 : Profil en acides gras des graisses concrètes intervenant dans les formules de l'étude.

Stéarine de palme : stéarine ayant un point de fusion de 68°C, Mélange VD1 : mélange d'huiles fractionnées contenant du tournesol oléique et des fractions de palmiste et de palme, Colza hydrogéné : colza complètement hydrogéné, ayant un point de fusion de 68°C.

Abréviations : SCSFA : acides gras saturés à courte chaîne, LRA : acide laurique, MA : acide myristique, PA : acide palmitique, SA : acide stéarique, LCSFA : acides gras saturés à longue chaîne, SFA : acides gras saturés totaux, MUFA : acides gras monoinsaturés, LA : acide linoléique, ALA : acide α -linoléique, LCPUFA : acides gras polyinsaturés à longue chaîne.

Les acides gras sont exprimés en proportion des acides gras totaux, mesurés par l'aire des pics obtenus en chromatographie en phase gazeuse.

MP	SCSFA	LRA	MA	PA	SA	LCSFA	SFA	MUFA	LA	ALA	LCPUFA
Coprah	14,4	47,0	18,4	9,1	2,8	0,3	92,2	7,1	1,6	0,1	0,0
Stéarine de palme	0,3	0,2	1,2	56,9	4,9	0,6	64,3	28,7	6,5	0,1	0,0
Mélange VD1	2,9	27,4	10,6	16,8	3,2	0,6	61,6	34,0	4,6	0,1	0,0
Colza hydrogéné	0,3	0,1	0,1	4,7	93,0	1,0	98,9	0,0	0,0	0,0	0,0

Chaque matière première apporte sa propre contribution au profil en acides gras des formules. En effet, la graisse de coprah comprend en majorité des SFA à courtes chaînes, ainsi que les acides laurique et myristique, tandis que la stéarine de palme contient en majorité de l'acide palmitique. Enfin, le mélange d'huiles fractionnées apporte les acides laurique, myristique et palmitique et le colza hydrogéné, de l'acide stéarique.

La figure ci-contre montre les thermogrammes des graisses concrètes utilisées dans l'étude. La technique employée pour cette analyse est la calorimétrie différentielle à balayage. Elle consiste à balayer une plage de températures pour déterminer les zones de cristallisation ou de fusion des populations de TAG contenues dans un produit. Pour ce faire, la différence d'énergie absorbée par l'échantillon pour changer de température est comparée à l'énergie nécessaire pour augmenter de la même manière la température d'un témoin (capsule vide ou remplie d'un inerte).

Dans cette étude, le protocole choisi est une montée en température de -50°C à +100°C. Ceci permet d'évaluer la fusion des TAG, et a été déterminé de manière à analyser la zone problématique des produits, c'est-à-dire le comportement à la remontée en température.

L'analyse nécessite de faire fondre le produit, de manière à ne récupérer que la phase grasse, et ainsi à s'affranchir du pic de fusion de la glace, qui générerait la lecture du thermogramme. Cette étape efface l'historique de cristallisation du produit, et permet de comparer des formules indépendamment des conditions de leur fabrication.

Les pics d'enthalpie observés sur les thermogrammes représentent donc une zone de température à laquelle une réaction endothermique se produit, ce qui dans le cas des matières grasses évoque la fusion d'une fraction des TAG. Il peut donc être conclu que cette zone représente la plage de fusion d'une population de TAG relativement homogène en structure.

Les populations de TAG présentes dans chacune de ces matières premières sont très différentes d'une graisse à l'autre, ce qui engendre des différences de comportement dans les produits, et donc offre la possibilité d'optimiser leur texture en modifiant la formulation.

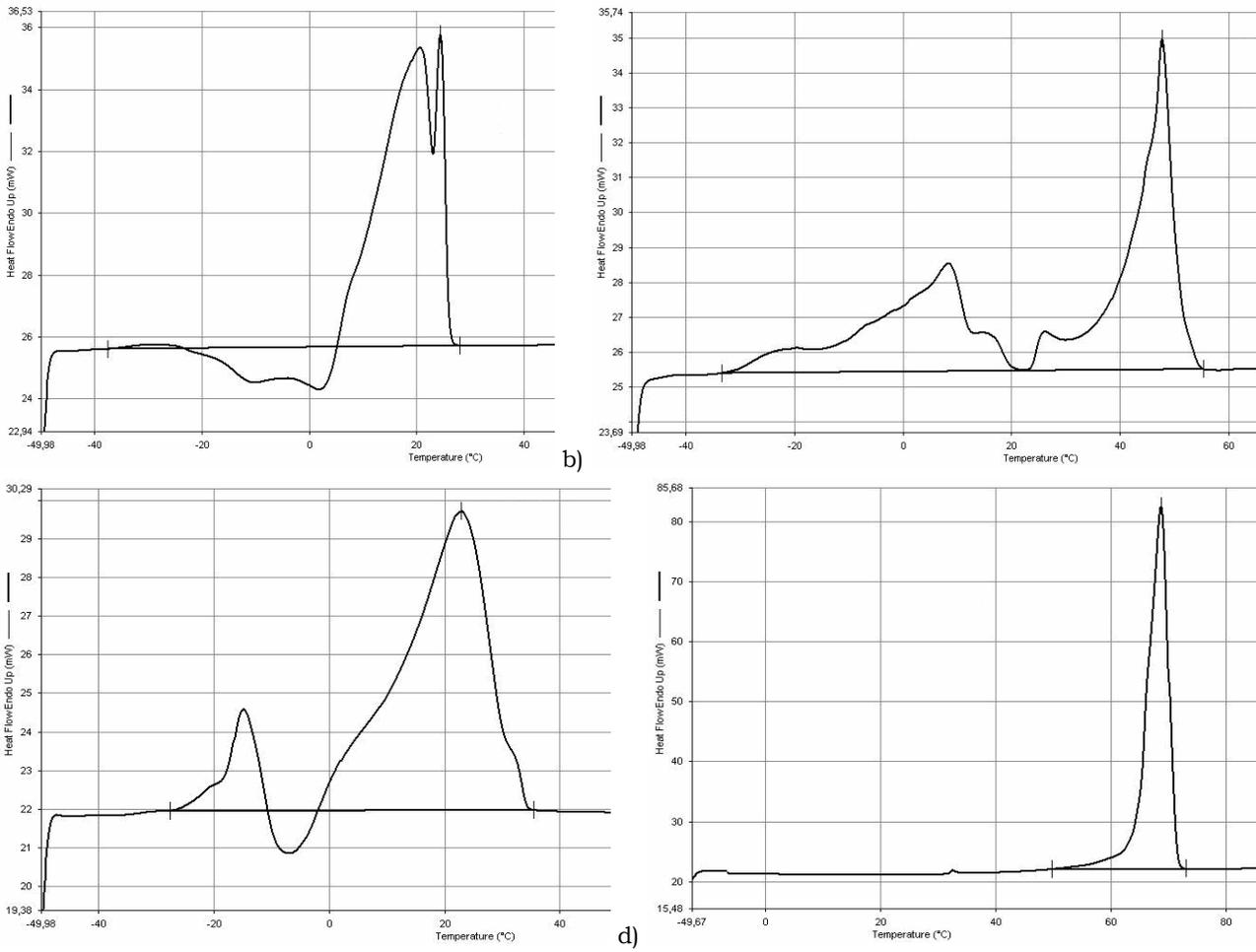


Figure E-1 : Thermogrammes des graisses concrètes utilisées dans l'étude (calorimétrie différentielle à balayage).

a) Huile de coprah, b) Stéarine de palme, c) Mélange d'huiles fractionnées, d) Colza complètement hydrogéné.

La montée en température a été effectuée de -50°C à $+100^{\circ}\text{C}$, à $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Abscisse : température ($^{\circ}\text{C}$), Ordonnée : énergie absorbée (mW).

Il apparaît clairement sur ces profils que la stéarine de palme et le mélange d'huiles fractionnées sont constitués de deux grandes populations de TAG, dont la fusion se produit aux alentours de 10°C et 45°C pour la première, et de -15°C et $+20^{\circ}\text{C}$ pour le second. La graisse de coprah a une fusion plus restreinte en terme de plage de température, puisque la totalité de cette matière première fond entre 20°C et 25°C . Le colza hydrogéné, quant à lui, ne montre qu'un seul pic, situé à 69°C , ce qui correspond au point de fusion de la tristéarine (TAG portant 3 résidus d'acide stéarique) [72].

Le tableau E-II ci-après récapitule les températures des pics de fusion des graisses concrètes, relevées sur les thermogrammes obtenus par calorimétrie différentielle à balayage.

Tableau E-II : Températures de sommet des pics de fusion relevées sur les thermogrammes des graisses concrètes utilisées (calorimétrie différentielle à balayage).

Abréviation : VD1 : mélange d'huiles fractionnées.

La signalétique de couleur des cases représente l'importance relative en terme de surface des pics d'une matière première : rouge > orange > jaune > incolore. Les températures sont exprimées en degré Celsius.

Pic	n°1	n°2	n°3	n°4	n°5	n°6	n°7	n°8	n°9	n°10	n°11
Coprah	-27,4	-	-16,0	-3,5	-	-	20,9	24,4	-	-	-
Stéarine de palme	-	-23,4	-	-	-	8,4	16,6	25,8	-	47,8	-
VD1	-	-23,6	-14,9	-	2,1	-	22,8	-	32,5	-	-
Colza hydrogéné	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	68,8

Comme estimé sur les profils, les graisses concrètes utilisées dans l'étude ont des plages de fusion qui diffèrent d'une matière à l'autre, et il est possible de les corréliser avec leur composition en acides gras. En effet, la graisse de coprah comprend majoritairement des SFA à chaîne carbonée relativement courte (de moins de 10 atomes de carbone à 14), et quasiment aucune insaturation. Ainsi les pics de fusion sont concentrés dans les valeurs positives de température. A l'inverse, la stéarine de palme comprend deux populations d'acides gras principaux, des SFA à 16 atomes de carbone environ, et des MUFA. Ceci correspond aux deux pics principaux relevés sur le thermogramme, aux alentours de 16°C et 48°C.

Le mélange d'huiles fractionnées, réalisé de manière à mimer le mélange graisse de coprah / stéarine de palme, présente ainsi un profil en acides gras basé, d'une part, sur des SFA à 12 et 16 atomes de carbone environ, et d'autre part, sur des MUFA. Les deux pics principaux, relevés à -15°C et +23°C illustrent ce fait. Malgré cela, il semble que les fractions d'huiles utilisées dans ce mélange soient constituées de TAG de structure différente de ceux qui sont rencontrés dans le coprah ou la stéarine de palme. En effet, cette matière présente un pic dans les températures négatives qui n'est retrouvé dans aucun de ces deux profils, malgré une proportion de MUFA proche de celle de la stéarine de palme (34% vs. 29% des acides gras totaux).

Enfin, le colza complètement hydrogéné a un comportement prévisible au vu de sa composition en acides gras, qui comprend 93% d'acide stéarique, ce qui n'engendre qu'un seul pic de fusion retrouvé à 69°C, dû à la tristéarine.

I. 2) Huiles fluides

Outre l'huile de colza, trois huiles fluides entrent dans la composition des formules. Ce sont les huiles de tournesol, de cameline et de poisson.

L'huile de tournesol a été utilisée au début de l'étude, étant une composante habituelle des produits St Hubert à ce moment. L'intérêt grandissant pour les acides gras essentiels, la problématique de consommation excessive d'AG *n-6* dans le régime alimentaire français, et en particulier le besoin de diminution du ratio *n-6/n-3*, ont conduit l'entreprise à retirer l'huile de tournesol de l'ensemble de ses produits, ce qui a également inclus les produits en développement.

Une huile particulière a été employée dans les premières formules testées, l'huile de cameline (Cavac). Contenant en moyenne 38% d'ALA pour un ratio *n-6/n-3* de 0,4, elle a été mise en avant lors de la recherche bibliographique sur la composition en acides gras des huiles végétales pour sa teneur élevée en précurseur (*cf.* chapitre « Les matières premières : les huiles »). La décision d'incorporer une autre source d'ALA en plus de l'huile de colza a été motivée par différentes raisons : mise en avant possible d'une source d'ALA particulière sur le produit (communication), possibilité d'augmenter la quantité d'ALA par portion et possibilité de diminuer le ratio *n-6/n-3*. Cependant la qualité insuffisante de cette matière première et son coût excessif a engendré l'abandon de cette huile au cours de l'étude.

Dernière huile fluide à entrer dans la composition du produit de ce projet, l'huile de poisson, proposée par Lipid Nutrition (Marinol C-38), contient au minimum 21% d'EPA et 15% de DHA selon les données du fournisseur. L'analyse en chromatographie en phase gazeuse de cette huile montre 22% d'EPA, 17,6% de DHA, et 6,6% d'autres LCPUFA *n-3* (20:3 *n-3*, 20:5 *n-3*, 22:4 *n-3*...).

Tableau E-III : Profil en acides gras des huiles fluides intervenant dans les formules de l'étude.

Abréviations : SCSFA : acides gras saturés à courte chaîne, LRA : acide laurique, MA : acide myristique, PA : acide palmitique, SA : acide stéarique, LCSFA : acides gras saturés à longue chaîne, SFA : acides gras saturés totaux, MUFA : acides gras monoinsaturés, LA : acide linoléique, ALA : acide α -linoléique, LCPUFA : acides gras polyinsaturés à longue chaîne.

Les acides gras sont exprimés en proportion des acides gras totaux, mesurés par l'aire des pics obtenus en chromatographie en phase gazeuse.

MP	SCSFA	LRA	MA	PA	SA	LCSFA	SFA	MUFA	LA	ALA	LCPUFA
Colza	0,0	0,0	0,1	4,6	1,7	1,0	7,6	64,8	19,1	8,1	0,0
Tournesol	0,0	0,1	0,1	6,3	4,0	1,2	11,9	26,6	61,1	0,1	0,0
Cameline	0,0	0,0	0,1	5,9	2,9	1,7	12,7	33,0	21,4	29,8	0,0
Poisson	0,0	0,1	5,5	9,9	2,6	0,9	19,8	18,5	1,2	0,5	50,1

Chacune des huiles fluides présentées dans le tableau E-III contient un ou deux acide(s) gras particulier(s), qu'il est intéressant d'inclure dans les formules. En effet, l'huile de colza apporte des MUFA et les précurseurs essentiels pour un ratio de 2,3, tandis que l'huile de cameline apporte les mêmes acides gras, mais pour un ratio de 0,7 (beaucoup plus d'ALA). Enfin, l'huile de tournesol contient surtout des MUFA et du LA, et l'huile de poisson des LCPUFA $n-3$. Cette dernière huile contient malgré tout 20% de SFA, ce qui est bien supérieur à la proportion habituelle de SFA dans une huile fluide. En effet, le colza n'en contient que 7,6%, le tournesol 11,9%, et la cameline 12,7%. La conséquence de cette particularité de composition est la difficulté à mettre au point un produit ayant un taux de SFA minimisé, tout en restant dans la cible de l'entreprise en terme de texture.

La figure ci-après présente les thermogrammes des huiles fluides utilisées dans l'étude, et permet de visualiser les différentes populations de TAG rencontrées dans ces matières premières.

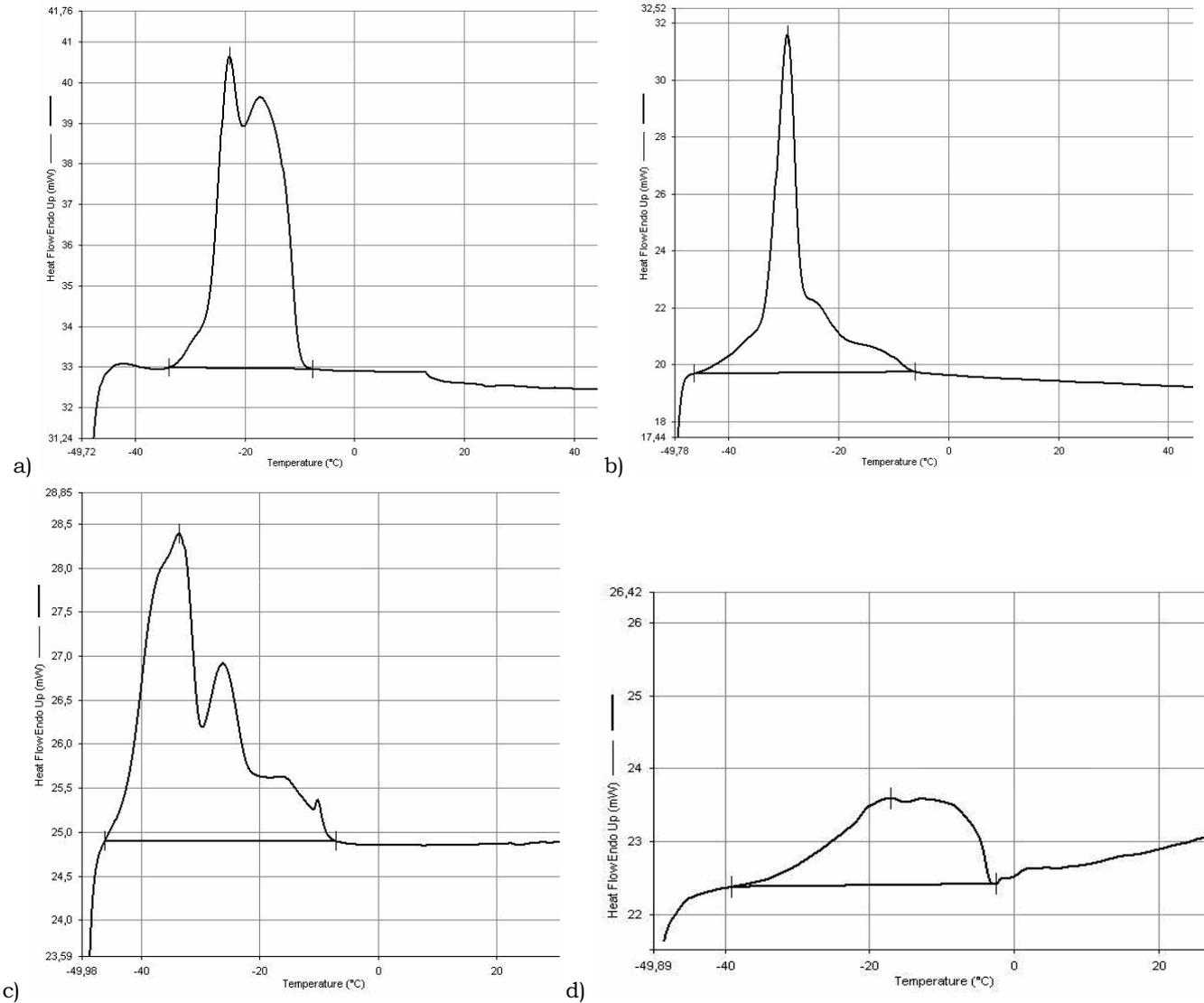


Figure E-2 : Thermogrammes des huiles fluides utilisées dans l'étude, obtenus par calorimétrie différentielle à balayage.

a) Huile de colza, b) Huile de tournesol, c) Huile de cameline, d) Huile de poisson.
La montée en température a été effectuée de -50°C à +100°C, à 5°C/min.
Abscisse : température (°C), Ordonnée : énergie absorbée (mW).

La première observation évidente est que ces huiles fondent toutes à des températures négatives, ce qui justifie leur classification dans la catégorie des matières premières dites « fluides ».

L'huile de colza se différencie de la cameline et du tournesol de par sa composition en acides gras, ce qui est visible sur les thermogrammes. En effet, cette matière première contient deux fois plus de MUFA que de PUFA (65% *vs.* 30%), au contraire des deux autres huiles qui sont constituées de 30% de MUFA en moyenne, *vs.* 55% de PUFA. Ceci explique les températures plus négatives des pics de fusion de ces dernières par rapport à l'huile de colza.

Contrairement à ce qui aurait pu être attendu, l'huile de poisson a une plage de fusion comprise entre -30°C et -5°C, avec deux maximums, à -17°C et -13°C au lieu de températures beaucoup plus négatives. Ceci dénote une composition en TAG homogène en terme de point de fusion, et donc en terme de structure (nature des trois acides gras estérifiés sur le glycérol).

De la même manière que pour les graisses concrètes, les profils présentés dans la figure E-2 ont été analysés et résumés dans le tableau E-IV ci-après.

Tableau E-IV : Températures de sommet des pics de fusion relevées sur les thermogrammes des huiles fluides utilisées (calorimétrie différentielle à balayage).

La signalétique de couleur des cases représente l'importance relative en terme de surface des pics d'une matière première : rouge > orange > jaune > incolore.

Les températures sont exprimées en degré Celsius.

Pic	n°1	n°2	n°3	n°4	n°5
Cameline	-37,2	-33,7	-25,9	-15,4	-10,2
Colza	-	-31,4	-23,1	-14,4	-
Tournesol	-39,6	-29,3	-23,4	-	-12,2
Poisson	-	-	-	-17,1	-12,8

Ce tableau montre que les huiles de cameline et de tournesol sont probablement constituées d'une plus grande variété de TAG que l'huile de colza, outre le fait que leur profil soit plus insaturé. En effet, si la fusion de la totalité de l'huile de colza est concentrée sur une plage de 15°C (-30°C à -15°C environ), la fusion de la cameline et du tournesol s'étale sur près de 30°C (-37°C à -10°C pour la première, et -40°C à -12°C pour le second). Au contraire des autres huiles fluides, l'huile de poisson, malgré la proportion importante de LCPUFA entrant dans sa composition, a une plage de fusion apparaissant à des températures plus proches de 0°C. Ceci est probablement dû à sa composition : environ 20% de SFA, 20% de MUFA et 60% de PUFA, tout en ayant des TAG assez homogènes, les PUFA étant majoritairement estérifiés en *sn*-2 [24, 54, 58, 95, 216, 268, 415].

Influence de la formulation de la phase fluide sur la flaveur

INFLUENCE DE LA FORMULATION DE LA PHASE FLUIDE SUR LA FLAVEUR

La problématique de cette partie de l'étude est la flaveur désagréable générée dans les produits supplémentés en huile de poisson, bien qu'elle ait été « désodorisée » par le fournisseur. Comme mis en évidence dans les chapitres « Protection des corps gras » et « Bases de la formulation », cette flaveur peut être due à deux phénomènes différents, l'oxydation des PUFA, d'une part, et la génération de composés volatils au cours de la fabrication, d'autre part. L'optimisation de la formulation de la phase fluide du produit a permis de limiter ces phénomènes de manière significative, ce qui fait l'objet du présent chapitre.

Les moyens d'analyse développés au cours de cette partie du travail ont été de deux types : premièrement, l'analyse des composés volatils par chromatographie espace de tête, et, deuxièmement, les « dégustations » réalisées au sein de l'équipe de recherche et développement de l'entreprise. Les produits n'ont pas été testés en analyse sensorielle proprement dite car la flaveur « poisson », importante dans les premiers produits, aurait perturbé le jury. Le protocole d'analyse concernant la chromatographie espace de tête est présenté dans les annexes expérimentales.

La première partie du chapitre concerne l'étude du comportement de l'huile de poisson au contact de l'eau, et la deuxième présente la formulation du produit de manière à diminuer la flaveur « poisson ».

I/ Lavage d'huile de poisson à l'eau

La première difficulté concernant la mise au point d'une margarine enrichie en huile de poisson réside dans le choix du fournisseur. En effet, la fragilité de cette matière première, due à la proportion importante d'acides gras hautement polyinsaturés, rend les processus de raffinage et de désodorisation d'autant plus complexes.

Le compromis nécessaire entre qualité de la désodorisation et maintien des qualités nutritionnelles pousse souvent certains fournisseurs à proposer des huiles qui ont encore une flaveur « poisson » prononcée. La phase de test de ces différents produits disponibles sur le marché a permis d'identifier une huile d'anchois et de sardines dont la teneur en EPA et DHA est très satisfaisante (21% d'EPA et 15% de DHA minimum, Marinol C-38, Lipid Nutrition), et dont la neutralité organoleptique – à l'ouverture des contenants – permet d'envisager une mise en œuvre facilitée.

Les premiers essais de fabrication ont rapidement mis à jour une réaction inconnue de l'huile de poisson au contact de l'eau, générant des composés volatils désagréables. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce fait : d'une part, l'oxydation de l'huile de poisson par l'oxygène dissous dans l'eau et les traces métalliques contenues dans l'eau de ville, et, d'autre part, la synthèse du Z-4-heptenal à partir du E,Z-2,6-nonadienal par hydratation et conversion rétro-aldol. La partie de l'étude présentée dans ce chapitre concerne donc l'analyse de ces phénomènes et la mise en évidence des molécules impliquées.

Le protocole de manipulation consiste en des lavages successifs de l'huile de poisson par de l'eau, et l'analyse en chromatographie espace de tête d'échantillons prélevés entre chaque lavage. Cette technique chromatographique permet de séparer sur une colonne les différents composés volatils contenus dans le produit, et dégagés pendant l'incubation de l'échantillon dans une enceinte thermostatée.

Le chromatogramme obtenu comporte 21 pics, retrouvés dans la plupart des formules de produits alimentaires. Ces pics ont été arbitrairement nommés Y, F, G, H, Z, A, X, B, B', C, D', D, E, E', I, I', J, K, L, L' et M, au fur et à mesure de l'étude. Dans l'étude sur le lavage des huiles de poisson, les pics trouvés sur les chromatogrammes, et communs avec ceux des produits finis (même temps de rétention dans les mêmes conditions d'analyse et la même colonne) ont été nommés avec la même lettre. Ont ainsi été retrouvés les pics Y, F, G, H, Z, A, X, B, B', C, D', D, E, E', I' et L'. Les échantillons étant de

même taille, il est possible d'assimiler la quantité d'un composé à l'aire du pic associé, et ainsi de comparer l'aire de ce pic d'un échantillon à l'autre. L'aire d'un pic est exprimée en unité arbitraire (u.a.), et est calculée par le logiciel d'acquisition des données.

Deux colonnes différentes ont été utilisées au cours de la thèse. En effet, la première colonne a été remplacée en cours d'étude. De manière à pouvoir continuer à analyser les produits sur la nouvelle colonne de mêmes caractéristiques, mais issue d'un lot de fabrication différent, une étude de correspondance a été réalisée, de manière à vérifier les temps de rétention des pics retrouvés dans les produits. Le tableau ci-après montre les temps de rétention des pics dans les deux colonnes.

Tableau E-V : Comparaison des temps de rétention des pics sur les deux colonnes de chromatographie en phase gazeuse (injecteur espace de tête) utilisées dans l'étude.

Pic	Temps sur colonne 1 (min)	Temps sur colonne 2 (min)
Y	1,03	1,09
F	1,07	1,12
G	1,21	1,27
H	1,25	1,30
Z	1,28	1,35
A	1,39	1,44
X	1,44	-
B	1,51	1,58
B'	1,53	-
C	1,55	1,61
D'	1,60	-
D	1,62	1,68
E	1,69	1,75
E'	1,72	-
I	1,85	1,91
I'	1,92	-
J	2,06	2,11
K	2,47	2,52
L	2,61	2,66
L'	2,67	-
M	3,81	3,92

La comparaison de ces temps de rétention montre que six pics ne sont pas retrouvés dans la deuxième colonne : X, B', D', E', I' et L'. Ces pics correspondent vraisemblablement à des isomères respectifs des composés A, B, D, E, I et L. En effet, dans la plupart des cas, ces pics ne sont que des épaulements sur le pic principal. Il semble qu'une faible différence entre les deux colonnes empêche la séparation correcte de ces composés sur la deuxième colonne. Les aires des pics des isomères ont donc été sommées dans l'étude des composés volatils, que ce soit lors du lavage des huiles de poisson par l'eau ou lors de la mise au point de la formulation des produits. Ainsi l'aire du pic A dans le reste de l'étude représente les aires des pics A et X, de la même manière B représente B+B', D représente D+D', E représente E+E', I représente I+I' et L représente L+L'.

La chromatographie espace de tête utilisée dans cette étude est une technique répandue pour l'analyse des composés volatils. En effet, cette méthode est connue pour générer moins d'artéfact de mesure que, par exemple, la distillation à la vapeur, la distillation sous vide ou encore l'extraction par solvant. Il existe deux types de chromatographie espace de tête, dont la technique dite statique, utilisée au cours de la thèse, qui consiste à incuber dans un four un échantillon scellé, et à prélever une fraction de l'espace de tête après équilibrage des composés volatils entre le produit et l'atmosphère. L'autre technique, dite dynamique, consiste à adsorber les composés volatils sur un piège, puis à les désorber pour les injecter dans la colonne. Cette dernière méthode est moins adaptée pour prévoir la réponse organoleptique d'un jury d'analyse sensorielle, car elle ne permet pas de mettre en évidence les

composés qui sont volatils dès les plus basses températures, ni ceux qui sont les plus représentatifs de la flaveur générale de l'échantillon [16].

L'identification de ces pics passe par l'utilisation d'un chromatographe espace de tête couplé à une spectrométrie de masse. Cette analyse, qui aurait été très intéressante pour permettre d'aller plus loin dans les interprétations et les hypothèses de cette partie de la thèse, n'a pas pu être réalisée par manque du matériel adéquat disponible sur place.

I. 1) Profil en composés volatils des huiles de poisson anhydres

Plusieurs qualités d'eau ont été testées dans cette étude sur le comportement de l'huile de poisson mise en contact avec de l'eau : eau de ville, eau distillée et eau distillée désaérée. Utiliser ces différentes eaux permet de mettre en évidence l'impact de la composition de l'eau sur le développement des composés volatils. En effet, la comparaison eau de ville / eau distillée permet d'étudier l'effet de la présence d'éléments ionisés et de traces métalliques, et la comparaison eau distillée / eau distillée désaérée, l'effet de l'oxygène dissous. De même, deux types d'huiles ont été utilisés, une huile de fabrication récente, neutre au niveau organoleptique, et une huile conservée plus longtemps, de laquelle une légère odeur de poisson se dégage. La figure ci-après permet de comparer les chromatogrammes des deux huiles anhydres.

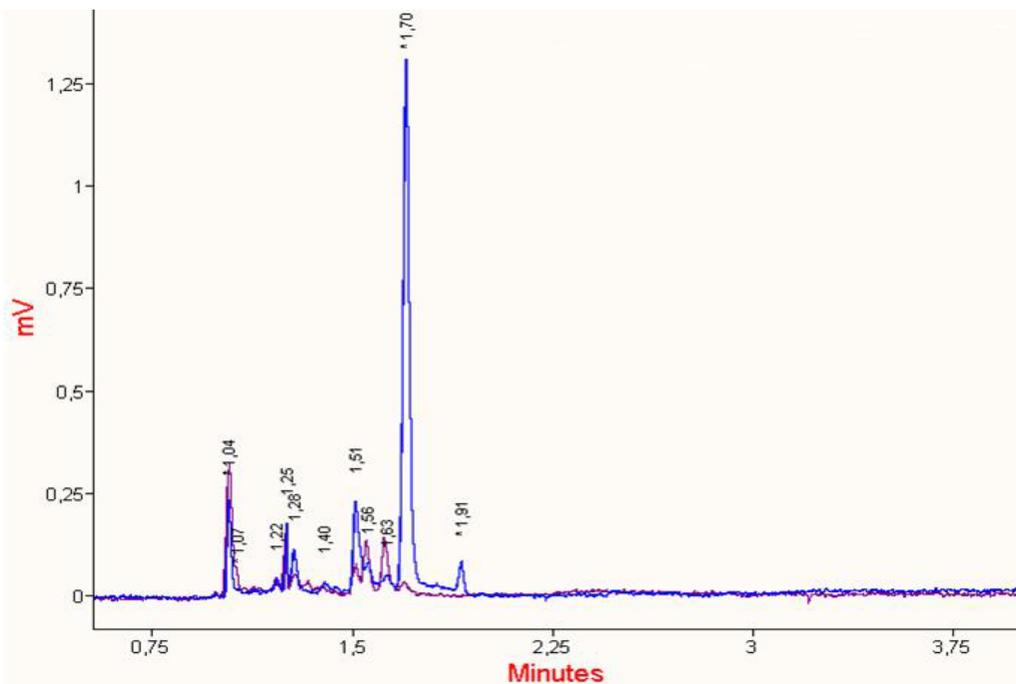


Figure E-3 : Comparaison des chromatogrammes espace de tête des deux huiles anhydres utilisées pour les lavages.

Symboles : Profil violet : huile de fabrication récente, Profil bleu : huile de fabrication ancienne.

Temps de rétention (min) : Y : 1,04 ; F : 1,07, G : 1,22, H : 1,25, Z : 1,28, A : 1,40, B : 1,51, C : 1,56, D : 1,63, E : 1,70, I : 1,91.

La comparaison des profils met en évidence la présence de sept composés principaux dans l'huile ancienne : Y, H, Z, B, C, E et I (aires de $0,24 \pm 0,00$, $0,09 \pm 0,01$, $0,15 \pm 0,00$, $0,37 \pm 0,02$, $0,10 \pm 0,01$, $2,07 \pm 0,04$ et $0,08 \pm 0,01$ u.a. respectivement). Le chromatogramme de l'huile récente n'en montre que cinq, et d'aires moins importantes : Y, H, B, C et D ($0,53 \pm 0,02$, $0,09 \pm 0,01$, $0,12 \pm 0,00$, $0,23 \pm 0,03$ et $0,23 \pm 0,00$ u.a. respectivement). Cependant les pics C et D ont une aire dans l'huile récente supérieure à celle dans l'huile ancienne.

Les deux huiles ayant la même provenance et la même qualité, il peut être conclu que :

i) Le vieillissement de cette matière première développe les pics Z, B, C, D, I et surtout E au cours du temps, composés que l'on peut associer à l'oxydation des PUFA (en absence d'eau) ;

ii) Les composés C et D seraient dégagés dans un premier temps, et dégradés par la suite, tandis que les pics Z, E et I seraient produits dans un second temps.

De manière à faciliter l'analyse de l'évolution des pics au cours des lavages, les chromatogrammes sont transposés en histogrammes dans le reste de l'étude.

I. 2) Protocole de lavage

Le protocole de manipulation est le suivant :

- 1) Placer 30 g d'huile de poisson contenant 2000 ppm d'antioxydants (1600 ppm de mélange de tocophérols naturels et 400 ppm de palmitate d'ascorbyle, la supplémentation est effectuée en amont de l'expérience) dans une bouteille en verre de 100 mL.
- 2) Ajouter 30 g d'eau de ville, distillée ou distillée désaérée (dégazée sous vide).
- 3) Remplacer l'espace de tête de la bouteille par de l'azote, et fermer rapidement la bouteille à l'aide d'un bouchon.
- 4) Agiter le mélange quelques secondes pour faciliter le contact eau / huile malgré la différence de densité entre les deux liquides, puis placer la bouteille en chambre froide (4°C) et à l'abri de la lumière pendant 15 minutes.
- 5) A l'issue du temps d'attente, prélever 4 g d'huile (huile lavée 1) et 4 g d'eau (eau de lavage 1).
- 6) Verser rapidement chaque échantillon dans un flacon en verre destiné à la chromatographie espace de tête, rendu hermétique par scellage d'un bouchon métallique à septum en caoutchouc.
- 7) Répéter les étapes 3 à 7 quatre fois supplémentaires.

Remarque : un échantillon de 4 g d'huile de poisson anhydre est également analysé en chromatographie espace de tête, pour servir de témoin. Cette huile est prélevée après supplémentation en tocophérols, mais pas en palmitate d'ascorbyle, la supplémentation en tocophérols étant réalisée dès réception de l'huile.

I. 3) Impact des lavages à l'eau sur les huiles de poisson

Les huiles de poisson ont été soumises à cinq lavages successifs à l'eau.

Les aires des pics citées dans cette partie de l'étude sont exprimées sans écart type car il n'a pas été fait de répétition.

Les histogrammes sont organisés comme suit : à gauche figure le profil de l'huile anhydre utilisée pour le lavage (dite native), au centre, les aires de chaque pic retrouvé après le premier lavage (somme de l'aire retrouvée dans l'huile et de celle retrouvée dans l'eau), et à droite, les aires des pics après le cinquième lavage. Le choix d'ajouter l'aire des pics retrouvés dans l'huile et dans l'eau a été fait de manière à identifier toute variation d'un pic, quelle que soit sa répartition huile / eau. Cette caractéristique sera abordée dans la suite de ce chapitre.

1) Impact du lavage à l'eau distillée sur une huile récente

Ce premier lavage concerne l'huile anhydre de fabrication récente, mise en contact avec de l'eau distillée.

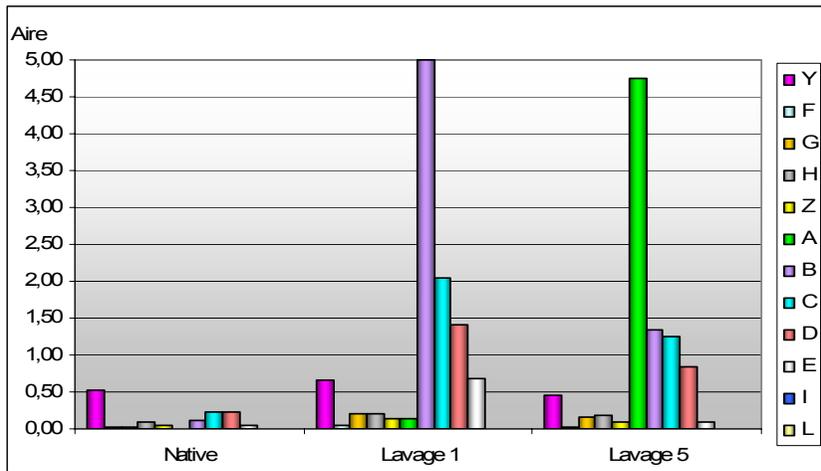


Figure E-4 : Evolution de l'aire des pics obtenus par chromatographie espace de tête au cours du lavage à l'eau distillée d'huile de poisson récente.

Native : profil de l'huile anhydre, Lavage 1 : profil du mélange eau / huile après le premier lavage (pour chaque pic l'aire retrouvée dans l'huile est ajoutée à l'aire retrouvée dans l'eau), Lavage 5 : profil du mélange eau / huile après le cinquième lavage.

Par rapport au profil de l'huile anhydre, il apparaît clairement sur le graphe ci-dessus que quatre composés se dégagent suite à ce premier contact avec l'eau : B, C, D et E. Si l'aire des pics C, D et E est comprise entre 0,5 et 2 u.a., celle de B est de plus de 40 u.a. (le sommet de la barre a été tronqué sur le graphique de manière à mettre en évidence les valeurs des autres pics).

Le contact prolongé entre l'eau et l'huile change profondément le profil du chromatogramme. En effet, les pics B et E diminuent de manière spectaculaire (-97% et -86% respectivement), tandis que les composés C et D montrent une diminution plus limitée, de l'ordre de 40%. Dans le même temps, le pic A augmente fortement, passant d'une valeur de 0,13 dans le lavage 1 à 4,74 u.a. dans le lavage 5. Il est possible que les composés B, C, D et E soient dégradés quand le contact avec l'eau se prolonge. Le vieillissement de l'huile en absence d'eau montre que le pic E est le seul qui subsiste au cours de la durée de vie de l'huile, les composés B, C et D n'atteignant pas, dans l'huile ancienne, des valeurs aussi importantes que celles relevées dans le cas du lavage.

A ce stade de l'étude, plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- Les composés B, C, D et E sont vraisemblablement impliqués dans l'oxydation de l'huile, confirmant l'analyse de la comparaison des profils des deux huiles anhydres en ce qui concerne B et E, mais aussi le fait que C et D soient également dus à l'oxydation, ceci à un stade plus précoce ;
- Le fait que B soit dégagé de manière aussi importante dans le cas du lavage à l'eau suggère que ce composé est un produit primaire de l'oxydation ;
- B, C et D sont dégradés quand l'oxydation des lipides se poursuit. Ce seraient donc des formes intermédiaires avant la formation d'autres composés finaux ;
- Concernant le pic E, soit sa dégradation est plus lente que celle des autres composés (ce qui expliquerait pourquoi il subsiste dans l'huile ancienne), soit il est dégradé en un autre composé uniquement en présence d'eau. Cette constatation rappelle la conversion rétro-aldol mise en évidence dans l'étude de Josephson et Lindsay (1987) [231] ;
- Et enfin, le pic A étant absent des profils des huiles anhydres, il est possible que ce composé soit issu d'une réaction particulière entre l'eau et l'huile. Ce composé est peut-être le produit terminal d'une conversion type rétro-aldol. Ainsi E, après avoir été dégagé suite à l'oxydation des lipides, serait converti en A au cours du contact avec l'eau.

Le comportement des composés minoritaires sera abordé dans le paragraphe de conclusion, leur interprétation étant plus aisée en comparant les différents lavages, étant donné la faible surface de ces pics.

2) Impact du lavage à l'eau distillée sur une huile ancienne

Les trois lavages suivants concernent l'huile de poisson de fabrication ancienne. Le graphe E-20 montre l'évolution de la surface des pics au cours du lavage de cette huile par de l'eau distillée. La comparaison de ce lavage avec celui du paragraphe précédent permet de mettre en évidence l'impact de l'état de l'huile de poisson sur son comportement au contact de l'eau.

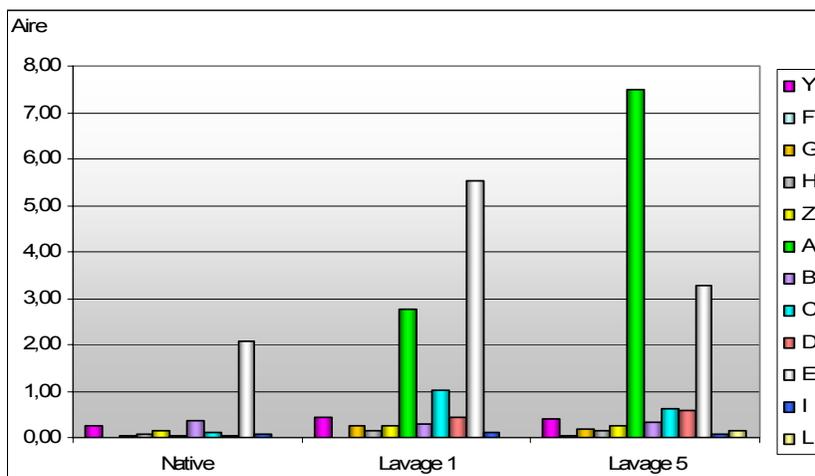


Figure E-5 : Evolution de l'aire des pics obtenus par chromatographie espace de tête au cours du lavage à l'eau distillée d'huile de poisson ancienne.

Native : profil de l'huile anhydre, Lavage 1 : profil du mélange eau / huile après le premier lavage (pour chaque pic l'aire retrouvée dans l'huile est ajoutée à l'aire retrouvée dans l'eau), Lavage 5 : profil du mélange eau / huile après le cinquième lavage.

L'huile de poisson ancienne contient déjà une quantité non négligeable du composé E (aire du pic de 2,07 u.a.). C'est ce pic qui augmente fortement (+166%) pour devenir le composé majoritaire du profil issu du premier contact avec l'eau. Les pics A et C se dégagent également, le pic A atteignant une surface de 2,76 u.a. et le pic C, 1,02 u.a.. On peut considérer que ces composés sont néo-formés, car leur valeur dans l'huile anhydre était quasiment nulle ($0,03 \pm 0,01$ u.a. pour A et $0,10 \pm 0,01$ u.a. pour C).

Le contact prolongé de l'huile ancienne avec l'eau distillée entraîne la diminution des pics C et E (-39% et -41%, respectivement), tandis que le composé A continue d'être formé, la surface du pic étant presque multipliée par 3 entre le premier et le dernier lavage.

La comparaison du comportement d'une huile ancienne ou récente vis-à-vis de l'eau distillée montre des points communs et des différences. En effet, les composés B et D ne sont pas dégagés lors du contact d'une huile ancienne avec l'eau, au profit de E. Par contre le pic C est également retrouvé dans cette expérience. De plus, le composé A se dégage de manière importante dès le premier contact avec l'eau, alors que dans le cas de l'huile récente ce phénomène intervient après un contact avec l'eau plus long. Il semblerait donc que l'état de l'huile avant contact avec l'eau ait un impact sur la nature des composés dégagés au cours du lavage, et sur leur vitesse de dégagement.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées suite à ces constatations :

- La poursuite de l'oxydation de l'huile continue de produire E, ce qui confirme que le composé E est probablement un produit terminal de l'oxydation des lipides ;
- Cette expérience semble confirmer le fait que A soit un produit de transformation de E, puisque dans la première expérience A n'est dégagé qu'après plusieurs lavages, quand E est produit, alors que, dans cette manipulation, il est dégagé dès le premier lavage, où E était déjà présent ;

iii) La diminution de E est vraisemblablement due à une réaction avec l'eau plutôt qu'à une dégradation comme celles de B, C ou D, puisque le composé A est produit très rapidement au contact avec l'eau, alors qu'il est absent d'une huile ancienne contenant E.

3) Impact du lavage à l'eau de ville sur une huile ancienne

Le graphique ci-après montre l'impact sur une huile de poisson ancienne du lavage à l'eau de ville. La comparaison avec le paragraphe précédent permet de montrer l'influence de la présence d'éléments ionisés et de traces métalliques sur le comportement de l'huile de poisson.

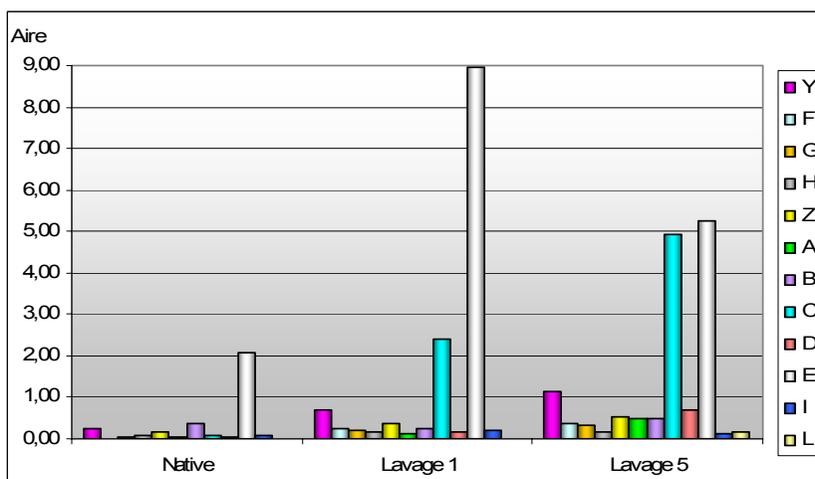


Figure E-6 : Evolution de l'aire des pics obtenus par chromatographie espace de tête au cours du lavage à l'eau de ville d'huile de poisson ancienne.

Native : profil de l'huile anhydre, Lavage 1 : profil du mélange eau / huile après le premier lavage (pour chaque pic l'aire retrouvée dans l'huile est ajoutée à l'aire retrouvée dans l'eau), Lavage 5 : profil du mélange eau / huile après le cinquième lavage.

Par rapport à l'huile anhydre, le premier lavage à l'eau de ville a pour conséquence le dégagement des composés C et E. L'aire de ces pics mesurée sur le chromatogramme est de 2,40 u.a. pour C, et de 8,97 u.a. pour E.

Le contact prolongé avec l'eau entraîne la diminution du pic E (-42%). Contrairement aux lavages précédents, non seulement le composé A n'est pas formé au contact de l'eau de ville, mais le pic C double de surface entre le premier et le dernier lavage, au lieu de diminuer. Le pic Y apparaît de manière plus importante dans le lavage à l'eau de ville que dans les précédents, sa surface atteignant une valeur de 1,14 u.a. à l'issue du dernier lavage.

La différence majeure entre l'eau de ville et l'eau distillée est l'absence d'ions et de traces métalliques dans la seconde. Il semble que cette différence de composition influence de manière importante le dégagement de composés volatils lors des lavages, empêchant la formation de A. Au contraire, certains pics, non impliqués dans les lavages précédents, sont formés uniquement lors du contact prolongé de l'huile de poisson avec l'eau de ville. C'est le cas des composés minoritaires Z, I et F, dont l'aire des pics est comprise dans ce cas entre 0,22 u.a. pour I et 0,52 u.a. pour F. Parmi eux, Z et F augmentent lors du premier lavage mais également pendant les suivants, tandis que I n'augmente que pendant le premier contact et stagne par la suite.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises suite à ces conclusions :

- Les composés Y, F, Z et I semblent être issus de l'oxydation des lipides, et leur dégagement serait stimulé par la présence de traces métalliques. Parmi eux, F et I semblent produits à un stade de réaction tardif, apparaissant plus tard dans les lavages ;
- Dans cette expérience, le composé A n'apparaît pas. La présence d'éléments ionisés ou de traces métalliques contenues dans l'eau de ville par rapport à l'eau distillée a visiblement un impact négatif

sur le dégagement de A. En restant dans l'hypothèse selon laquelle E est converti en A, il semble que la qualité de l'eau ait un impact sur cette réaction ;

iii) Le composé C apparaît dans cette expérience, mais continue à augmenter au lieu de diminuer comme dans les cas précédents, tandis que E diminue dans le même temps. Il est possible que C soit produit par deux réactions différentes, l'oxydation des lipides et la conversion de E, dans laquelle C serait un intermédiaire entre E et A.

4) Impact du lavage à l'eau distillée désaérée sur une huile ancienne

Ce dernier lavage fait intervenir de l'eau distillée désaérée. La comparaison avec le lavage à l'eau distillée permet d'observer l'influence de l'oxygène dissous dans l'eau sur le développement de composés volatils. En effet, l'espace de tête de la bouteille étant remplacé par de l'azote, la seule source d'oxygène disponible dans le milieu pour l'oxydation des lipides est l'oxygène dissous dans l'eau qui est ajoutée pour le lavage. La désaération n'est sûrement pas complète, car si l'eau distillée du départ a été préparée avec précaution, les différentes étapes de prélèvement d'échantillons ont pu réintroduire de l'oxygène dans l'eau.

Les réactions d'oxydation sont, malgré tout, réduites avec cette précaution supplémentaire, ce qui apparaît sur les profils.

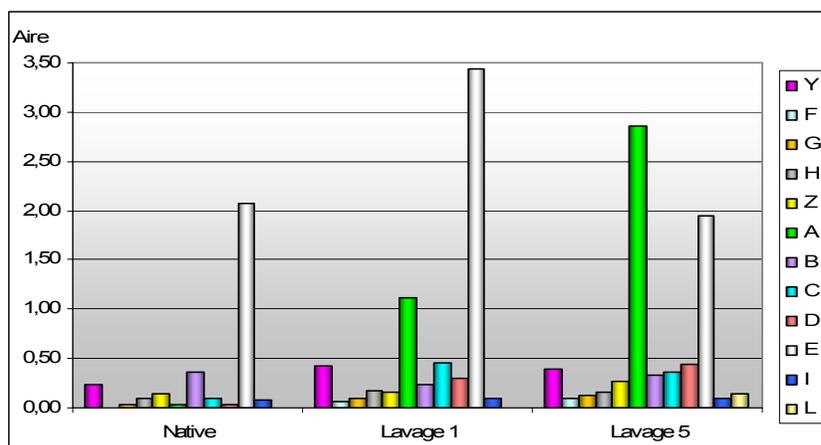


Figure E-7 : Evolution de l'aire des pics obtenus par chromatographie espace de tête au cours du lavage à l'eau distillée désaérée d'huile de poisson ancienne.

Native : profil de l'huile anhydre, Lavage 1 : profil du mélange eau / huile après le premier lavage (pour chaque pic l'aire retrouvée dans l'huile est ajoutée à l'aire retrouvée dans l'eau), Lavage 5 : profil du mélange eau / huile après le cinquième lavage.

Le premier contact avec l'eau engendre l'apparition des pics A, C et E, E étant le composé majoritaire avec une surface de pic de 3,44 u.a.. Le contact prolongé avec l'eau entraîne la diminution des pics E et C (-43% et -22% respectivement) et l'augmentation de A (+155%). Ainsi, si l'évolution du composé E est constante au cours des expériences de lavage d'huile ancienne, celle de A et C est différente :

- eau de ville : dégagement de C au premier contact, et augmentation par la suite, pas de dégagement de A ;
- eau distillée et distillée désaérée : dégagement de A et C au premier contact, augmentation de A et diminution de C par la suite.

La première conclusion de l'expérience de lavage de l'huile de poisson avec l'eau distillée désaérée est la plus faible surface des pics par rapport aux trois types de lavages précédents. En effet, l'aire maximale est ici de 3,44 u.a., contre 41,27 u.a. pour le lavage d'huile récente à l'eau distillée, 7,49 u.a. pour le lavage d'huile ancienne à l'eau distillée, et 8,97 u.a. pour le lavage d'huile ancienne à l'eau de ville. L'absence d'oxygène dissous dans l'eau, ainsi que l'absence de traces métalliques et d'éléments ionisés, sont donc des freins importants au dégagement des composés volatils, ce qui renforce l'hypothèse de l'implication de phénomènes oxydatifs dans l'apparition de ces pics. Ceci est particulièrement visible dans le cas du pic E. En effet, le premier lavage à l'eau de ville fait augmenter

l'aire du pic E de 2,07 u.a. (valeur dans l'huile anhydre) à 8,97 u.a., tandis que l'eau distillée fait augmenter E de 2,07 à 5,51 u.a., et l'eau distillée désaérée, de 2,07 à 3,44 u.a..

Les hypothèses émises suite à l'analyse de cette expérience sont les suivantes :

- i) Le composé C, après avoir été produit dans le premier lavage, diminue au cours du contact avec l'eau, tandis que A augmente, et ce dans les trois expériences où le composé A est retrouvé dans les chromatogrammes. De plus, dans l'expérience où aucun dégagement de A n'est observé (eau de ville), C continue à augmenter au cours des lavages, au lieu de diminuer. Ceci tend à confirmer la suite de dégradation ou de conversion suivante : $E \rightarrow C \rightarrow A$;
- ii) Le composé G apparaît sur le profil du premier lavage, et ce dans toutes les expériences. L'aire de ce pic ne varie pas lors des lavages suivants, ce qui semble indiquer que ce composé ne subit pas de réaction de dégradation. La présence de palmitate d'ascorbyle est une hypothèse pour expliquer ce pic, puisque les huiles natives ont été analysées avant la supplémentation en cet antioxydant, seuls profils sur lesquels ce composé n'apparaît pas. ;
- iii) Le composé H quant à lui, est retrouvé à toutes les étapes de l'étude. et dans la même optique que l'hypothèse précédente, il est possible que ce composé soit lié à la présence de tocophérols ;
- iv) Enfin, le composé L n'apparaît qu'au bout de plusieurs lavages, et uniquement dans le cas d'huile de poisson de fabrication ancienne. La surface du pic ne varie pas de manière importante en fonction de la composition de l'eau, il semble donc qu'il ne soit pas produit par une réaction d'oxydation. Une hypothèse quant à la nature de L est qu'il est peut-être produit lors de la dégradation d'un des composés issus des lavages précédents.

5) Conclusions sur les lavages

L'analyse des expériences présentées dans ce chapitre a conduit à la formulation d'un certain nombre d'hypothèses. Ce paragraphe constitue le résumé de ces interprétations.

L'évolution des différents composés au cours des expériences permet de mettre en évidence deux types de comportement, l'un lié à l'oxydation des lipides, et l'autre à une autre interaction entre l'huile et l'eau, probablement une conversion du type rétro-aldol.

Les composés Y, F, Z, B, C, D, E et I seraient issus de l'oxydation des lipides. Parmi eux, Y, Z, B, C, D, E et I peuvent se développer en absence d'eau, puisqu'ils ont été retrouvés dans l'huile de fabrication ancienne, qui a été conservée longtemps, mais à l'abri de l'eau. Malgré cela, le dégagement des composés Y, Z, I et F serait également stimulé par la présence de traces métalliques. Les composés B, C et D semblent impliqués dans les premières étapes de l'oxydation d'une huile de poisson, B et D étant vraisemblablement dégradés par la suite, tandis que E interviendrait plus tard au cours du vieillissement de l'huile.

Il semble que C soit également issu de la conversion des produits d'oxydation des lipides (en particulier E) au cours du contact avec l'eau. Le composé A serait quant à lui issu de la conversion de C, cette réaction étant inhibée par la présence d'éléments ionisés ou de traces métalliques. Et enfin, L serait produit lors d'une des réactions de dégradation ou de conversion des autres composés.

Les composés G et H, quant à eux, semblent être dus à la présence d'additifs dans l'huile de poisson, et non à une réaction propre de l'huile.

La qualité de l'eau influe vraisemblablement sur le développement de composés volatils, en agissant sur l'oxydation des lipides de l'huile de poisson. Des analyses de l'eau du réseau de la Communauté Urbaine du Grand Nancy montrent des traces de divers éléments ionisés, azotés et phosphorés, ainsi que des oligo-éléments et des micropolluants minéraux. Ainsi, au mois de juillet 2007, ont été retrouvés en particulier 40 µg/L de fer, 4 µg/L de cuivre et 0,9 µg/L de plomb (source : Laboratoire IPL).

Ces éléments peuvent être à l'origine de l'oxydation stimulée observée dans l'expérience de lavage d'huile de poisson avec de l'eau du réseau, et mise en évidence par comparaison avec le dégagement des composés volatils observé dans le cas du lavage de cette huile avec de l'eau distillée.

Cependant, il est apparu au cours de l'étude que l'oxygène dissous dans l'eau est responsable d'une plus grande augmentation de l'oxydation que ces traces métalliques dans l'eau du réseau. La

principale conséquence de l'emploi d'eau du réseau est le dégagement spécifique du composé C, au détriment de A.

I. 4) Caractérisation des composés volatils

De manière à caractériser plus précisément ces différents composés, la figure E-23 présente la répartition préférentielle huile / eau des composés volatils apparaissant sur les chromatogrammes, évaluée par la proportion de chaque composé, retrouvée soit dans l'eau, soit dans l'huile à l'issue d'un lavage. Ces valeurs ont été calculées à partir de la somme des lavages 1 et 5 (huile 1 + huile 5 ; eau 1 + eau 5) de chacune des expériences, et la moyenne figure sur le graphique. Cette somme a été faite de manière à prendre en compte le fait que certains pics ne se dégagent qu'après plusieurs lavages (ex. L), et que d'autres sont présents en plus grande quantité au début du contact avec l'eau (ex. B ou D). Sur le graphe ci-après, la barre bleue représente la proportion du composé retrouvée dans l'eau. Le complément entre cette valeur et 100% représente à l'inverse la proportion retrouvée dans l'huile.

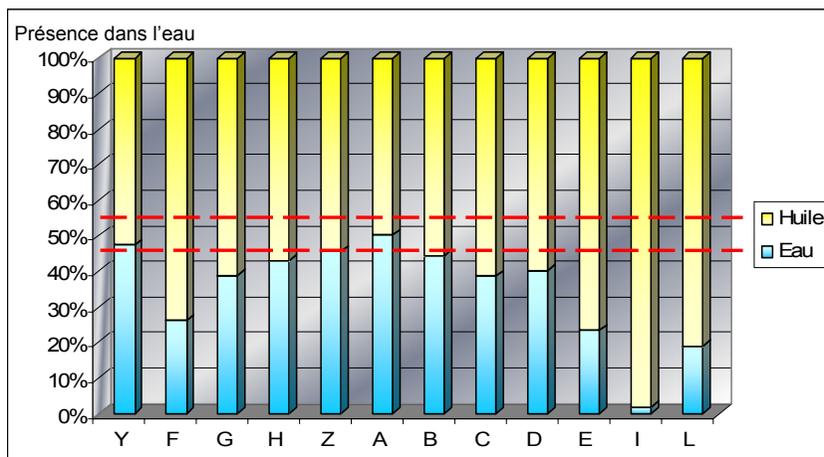


Figure E-8 : Histogramme représentant la répartition huile / eau des composés volatils retrouvés sur les chromatogrammes espace de tête.

Les deux lignes rouges représentent la zone dans laquelle les composés sont considérés comme n'ayant aucune préférence, ni pour les milieux polaires, ni pour les milieux apolaires (de 45 à 55% de présence dans l'eau). Les composés dont une proportion supérieure à 50% est retrouvée dans l'eau sont dits à tendance hydrophile, et à l'inverse, les composés dont la proportion est inférieure à 50% sont dits à tendance hydrophobe.

Les différents composés peuvent être répartis en trois catégories : volatils n'ayant aucune préférence de polarité, volatils à tendance hydrophobe, et volatils à tendance hydrophile. La zone de « neutralité » a été arbitrairement définie entre 45% et 55% de présence dans l'eau. Ce graphique montre que les différents composés étudiés sont soit « neutres », soit à tendance hydrophobe. En effet, les pics Y, Z et A peuvent être classés dans le premier groupe, tandis que les composés F, G, H, B, C, D, E, I et L peuvent être considérés comme étant hydrophobes.

Si l'on considère les composés en fonction de l'ordre dans lequel ils semblent se dégager au cours de la réaction d'oxydation mise en évidence dans cette étude, il apparaît que les composés primaires sont plus hydrophiles que les produits terminaux des réactions. En effet, les composés Y, Z, B, C et D, dégagés dans les premières étapes des réactions, sont les moins hydrophobes, tandis que les pics F, E, I et L, qui sont considérés comme des produits terminaux de l'oxydation, sont les plus hydrophobes. L'hypothèse avancée pour expliquer ce fait est que la réaction primaire d'oxydation est stimulée en présence d'oxygène et de traces métalliques, tous deux présents dans l'eau avec laquelle l'huile de poisson est lavée. Il est donc logique que les composés issus de la mise en contact de ces deux phases non miscibles soient plutôt neutres. Au contraire, il est possible que la dégradation de ces composés en produits terminaux soit une réaction qui ne nécessite pas la présence d'eau, d'où la nature hydrophobe de ces molécules.

Une exception cependant, le composé A, qui est le plus « neutre », alors que sa synthèse intervient dans une phase terminale de réaction. L'hypothèse selon laquelle ce composé serait issu de la transformation des produits d'oxydation selon une réaction de type conversion rétro-aldol permet d'expliquer cette observation. En effet, si A est produit en présence d'eau, il paraît nécessaire qu'il soit au moins à tendance hydrophile.

Jacobsen et Meyer (1999) [222] ont étudié la répartition huile / eau des produits d'oxydation de la mayonnaise. Elles concluent que la répartition préférentielle dans l'huile des composés volatils augmente avec la longueur de la chaîne carbonée, et augmente dans le cas des cétones par rapport aux aldéhydes correspondants. En suivant l'hypothèse selon laquelle les composés A et C sont issus d'une conversion de E de type rétro-aldol, A étant le produit terminal, il paraît logique de postuler que A et C sont des aldéhydes de chaîne carbonée plus courte que E, ce qui pourrait expliquer l'ordre de préférence pour l'huile $E > C > A$.

F. Résultats nutritionnels

*« Nourris bien ton corps, ton âme y restera plus longtemps. »
[Proverbe breton]*

Etude de la biodisponibilité chez le rat

ETUDE DE LA BIODISPONIBILITE CHEZ LE RAT DE PUFA INCORPORES DANS UN CORPS GRAS

Le produit alimentaire mis au point au cours de la thèse a été testé chez le rat, dans une étude préclinique ayant deux buts principaux : prouver la biodisponibilité des AG *n-3* ajoutés au produit et prouver que l'addition de ces nutriments n'est pas délétère pour le statut oxydatif des organismes.

La biodisponibilité d'un nutriment d'intérêt regroupe plusieurs aspects, que ce soit l'absorption au niveau intestinal, le métabolisme, ou encore l'utilisation au niveau cellulaire. Concernant les acides gras, la biodisponibilité s'évalue par la composition en acides gras des lipides circulants, qui apportent une information sur l'absorption intestinale et le métabolisme hépatique, mais aussi par la composition des membranes cellulaires (cellules circulantes ou d'organes spécifiques). L'évolution du statut oxydatif des lipides plasmatiques est observée en comparant l'activité vitaminique E et la concentration en marqueurs de l'oxydation dans le plasma des animaux.

Le rat, reconnu comme étant un bon modèle de digestion, d'absorption et de métabolisme des lipides par rapport à l'homme, est souvent utilisé dans les études publiées sur ces thèmes [55, 56, 88, 219, 225, 280, 329, 398, 414, 515].

Cette étude a été réalisée à l'ITERG Nutrition (Talence, 33), sous la direction du Dr Nicole COMBE.

I/ Description de l'étude

I. 1) Design de l'étude

La biodisponibilité des PUFA *n-6* et *n-3* a été évaluée dans trois régimes, dans lesquels la fraction lipidique (10% m/m) est apportée sous forme d'un corps gras type margarine, différant entre les groupes par son profil en acides gras.

31 rats mâles Wistar âgés de 7 semaines ont été nourris avec un régime standard (UAR, A04) pendant 10 jours, afin de stabiliser leurs apports alimentaires avant le début des régimes expérimentaux.

Au terme du régime de stabilisation, les 31 rats ont été séparés en trois groupes qui ont reçu pendant six semaines l'un des trois régimes suivants :

- ✓ régime *n-6* : composé d'un corps gras riche en AG *n-6* (régime correspondant à 3,8 g de LA pour 100 g de régime), 10 rats,
- ✓ régime *n-3* : composé d'un corps gras riche en ALA (type St Hubert Oméga3, correspondant à 1,8 g de LA et 400 mg d'ALA pour 100 g de régime), 10 rats,
- ✓ régime LC*n-3* : composé du corps gras mis au point, riche en ALA, EPA et DHA (correspondant à 1,2 g de LA, 450 mg d'ALA et 340 mg d'EPA-DHA pour 100 g de régime), 11 rats.

Remarque : Pour chaque régime, le corps gras a été ajouté à un aliment alipidique qui apporte aux animaux tous les nutriments nécessaires à leur entretien, exceptés les lipides.

Le profil en acides gras des corps gras utilisés est présenté dans le tableau F-I.

Tableau F-1 : Profil en acides gras des corps gras utilisés dans l'étude, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.

Les valeurs présentées sont exprimées en pourcentage des acides gras totaux.

Abréviations : n-6 : régime riche en acide linoléique, n-3 : régime riche en acide α -linoléique, LCn-3 : régime riche en acides α -linoléique, eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque, SFA : acides gras saturés, MUFA : acides gras monoinsaturés, PUFA : acides gras polyinsaturés.

(% acides gras totaux)	n-6	n-3	LCn-3
4:0	0,0	0,0	0,2
6:0	0,0	0,0	0,2
8:0	3,1	0,5	0,5
10:0	2,1	0,7	0,7
12:0	14,2	11,0	8,2
14:0	5,2	4,1	4,4
16:0	12,7	10,0	10,8
18:0	3,5	2,9	2,8
20:0	0,2	0,5	0,4
22:0	0,5	0,7	0,2
24:0	0,2	0,2	0,2
Total SFA	41,8	30,6	28,9
18:1 n-9	18,6	44,5	46,1
Total MUFA	19,2	47,1	48,6
18:2 n-6	38,1	17,6	12,4
20:3 n-6	0,0	0,0	0,0
20:4 n-6	0,0	0,0	0,2
Total PUFA n-6	38,1	17,6	12,9
18:3 n-3	0,1	4,0	4,5
20:5 n-3	0,0	0,0	1,9
22:5 n-3	0,0	0,0	0,3
22:6 n-3	0,0	0,0	1,5
Total PUFA n-3	0,1	4,0	8,5
Total trans	0,6	0,5	0,7
Autres	0,2	0,2	0,4
Total	100,0	100,0	100,0

Le profil en acides gras du produit LCn-3 mis au point au cours de la thèse a été suivi dans le temps, à la recherche d'une éventuelle dégradation des composés d'intérêt, et ce, afin de vérifier que l'apport en LCPUFA n-3 des animaux est constant au cours de l'étude. De plus, la législation impose que la dose d'acides gras d'intérêt à la fin de vie du produit soit au minimum égale à 90% de la dose de départ.

Le profil en acides gras de ce corps gras a donc été suivi depuis sa fabrication jusqu'à 80 jours de durée de vie. Le taux d'EPA et de DHA est conservé à 95%, ce qui est conforme à la réglementation (données non illustrées).

Le poids des animaux a été mesuré trois fois par semaine, et à la fin des six semaines de régime, les animaux ont été sacrifiés, à jeun. Lors de cette opération, le sang, le tissu adipeux péri-épididymaire et le cerveau des rats ont été prélevés pour analyse, et évaluation de la biodisponibilité des PUFA dans ces compartiments.

I. 2) Analyses effectuées

Les protocoles d'analyse sont décrits en annexes expérimentales, et ne sont que rapidement cités dans ce paragraphe.

Le plasma et les hématies ont été isolés après centrifugation du sang total. La composition en acides gras des lipides circulants a été déterminée après extraction des lipides totaux plasmatiques par la méthode de Folch *et al.* (1957) [154]. Les classes de lipides ont ensuite été séparées par chromatographie sur couche mince, et les TAG, PL et EC ont été récupérés. Après transméthylation des acides gras des différentes fractions par la technique BF₃-méthanol de Morrison et Smith (1964) [345], les profils en acides gras ont été obtenus par chromatographie en phase gazeuse.

Les lipides totaux des hématies ont été extraits par la méthode de Peuchant *et al.* (1989) [389]. Les acides gras de la PE, isolée par chromatographie sur couche mince, ont été analysés en chromatographie en phase gazeuse après transméthylation, comme les lipides du plasma.

L'analyse du profil en acides gras de la PE des cellules cérébrales a été effectuée par la même méthode. L'analyse des acides gras du tissu adipeux a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse, selon la technique d'extraction et de transméthylation directe de Lepage et Roy (1984) [292].

Enfin, la concentration de la vitamine E dans le plasma a été déterminée par chromatographie en phase liquide haute performance. L'évaluation de l'oxydation des lipides a été réalisée par le dosage spectrophotométrique des TBARS – substances réagissant à l'acide thiobarbiturique (TBA) –.

Des profils en acides gras complets obtenus, seules les familles *n-6* et *n-3* sont présentées dans les graphes de ce chapitre. Ainsi, ne figurent sur les graphiques que les acides linoléique (LA), dihomog-linoléique (dihomo-GLA) et arachidonique (ARA) pour la famille *n-6*, et α -linoléique (ALA), eicosapentaénoïque (EPA), docosapentaénoïque (DPA) et docosahexaénoïque (DHA) pour la famille *n-3*. L'ensemble des profils en acides gras des différents compartiments étudiés sont présentés dans le tableau I-X, en annexe V.

Remarques :

- les valeurs présentées sont les moyennes des analyses effectuées sur chaque rat d'un groupe (trois répétitions), donc sur 10 animaux pour les groupes *n-6* et *n-3*, et sur 11 pour le groupe LC*n-3* ;
- les différences entre les régimes ont été évaluées par le test *t* de Student, et un seuil α de 5% a été choisi pour déclarer qu'une différence est significative.

I. 3) Croissance des animaux

Le poids des animaux a été suivi trois fois par semaine pendant les 42 jours de régime. A partir de ces données, une courbe de croissance moyenne a pu être établie pour chaque groupe d'animaux (*n-6*, *n-3* et LC*n-3*) (figure F-1).

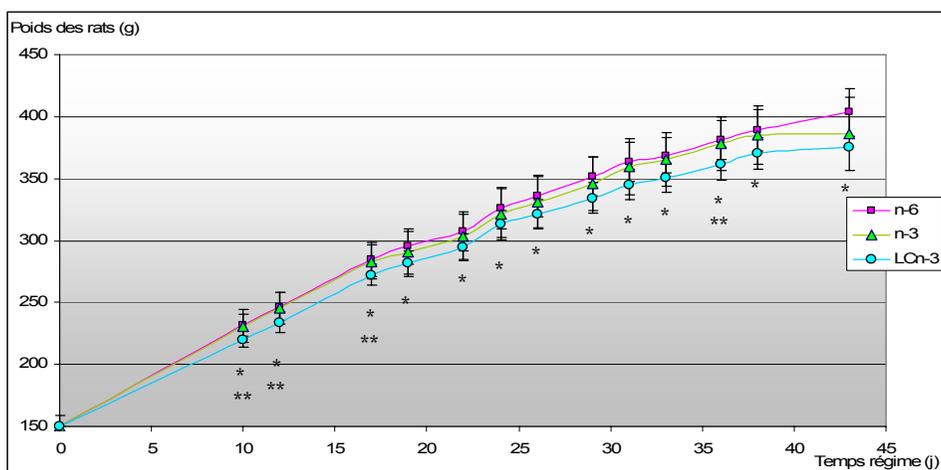


Figure F-1 : Evolution du poids des animaux des trois groupes au cours des six semaines de régime.

Les groupes *n-6* et *n-3* comprennent chacun 10 rats et le groupe LC*n-3* 11 rats.

Symboles : * : différence significative entre les groupes *n-6* et LC*n-3*, ** : différence significative entre les groupes *n-3* et LC*n-3*.

Il apparaît sur le graphique F-1 que la croissance des animaux du groupe LC*n-3* est légèrement inférieure ($p < 0,05$) à celle des animaux du groupe *n-6*. En revanche, la croissance des animaux du groupe *n-3* n'est pas significativement différente de celle des animaux du groupe *n-6*, et ne l'est qu'en quelques points avec le groupe LC*n-3*. Ceci indique qu'il existe une différence de croissance entre les animaux des différents groupes, dans l'ordre $n-6 > n-3 > LCn-3$ en terme de poids, qui n'est significative que pour les extrêmes.

Cette observation n'est pas confirmée par la littérature, des études de supplémentation en AG *n-3* n'ayant occasionné aucune différence de poids chez les rats, que ce soit dans le cas de l'ALA ou de DHA, avec des doses faibles ou élevées (200 mg ou 3,37 g/100 g de régime) [88, 398].

La pesée des organes prélevés à la fin des six semaines de régime et le rapport de ces masses à la masse corporelle totale des animaux sont présentés dans le tableau II. Les rapports organo-somatiques permettent de comparer le poids relatif des organes des animaux, afin de déceler une différence de prise de tissu adipeux, ou une éventuelle toxicité au niveau hépatique.

Tableau F-II : Masse des organes des rats, exprimée brute et rapportée à la masse corporelle totale.

Les valeurs présentées sont les moyennes des animaux d'un groupe, la valeur entre parenthèses est l'écart type.

Les valeurs suivies de lettres différentes indiquent une différence significative entre les régimes.

Abréviations : *n-6* : régime riche en acide linoléique, *n-3* : régime riche en acide α -linoléique, *LCn-3* : régime riche en acides α -linoléique, eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque.

Organe		<i>n-6</i>	<i>n-3</i>	<i>LCn-3</i>
Masse corporelle totale (g)		403,4 (18,9) ^a	391,4 (22,5) ^{a,b}	374,9 (12,8) ^b
Foie	masse (mg)	10,1 (0,8)	9,9 (0,8)	10,0 (0,9)
	masse / masse totale (mg/g)	25,1 (1,6)	25,4 (1,6)	26,7 (2,0)
Tissu adipeux	masse (mg)	9,4 (2,0)	9,1 (1,6)	8,0 (2,1)
	masse / masse totale (mg/g)	23,4 (5,0)	23,2 (3,2)	21,4 (5,3)
Cerveau	masse (mg)	2,0 (0,1)	2,0 (0,1)	1,9 (0,1)
	masse / masse totale (mg/g)	4,9 (0,2) ^b	5,0 (0,3) ^b	5,2 (0,3) ^a

Les résultats présentés dans le tableau F-II montrent que le régime *LCn-3* induit une seule différence significative avec les autres groupes, celle du rapport cerveau / masse corporelle totale, supérieur chez les animaux de ce groupe. Plus précisément, le cerveau a la même masse moyenne dans les trois groupes, mais les rats sous régime *LCn-3* ont une masse corporelle totale moins importante.

Une remarque cependant, conclure que les rats en croissance nourris avec le régime *LCn-3* développent un cerveau proportionnellement plus gros que celui des autres animaux serait ambitieux. Il est plus probable que si le poids des animaux est légèrement inférieur à celui des autres rats, leurs organes se développent normalement, ce qui est observé au niveau du cerveau et du foie.

Un point semble important à noter. La masse de tissu adipeux prélevée chez les rats du groupe *LCn-3* est en moyenne inférieure à celle des deux autres groupes (différence de 15% et 12% par rapport aux groupes *n-6* et *n-3*, respectivement, $p > 0,05$). Cette différence n'est cependant pas significative, probablement à cause de la grande disparité entre les animaux du groupe *LCn-3*. Néanmoins, cette tendance mérite d'être relevée, en particulier du fait de travaux publiés sur le lien possible entre ratio *n-6/n-3* dans l'alimentation périnatale et développement de l'obésité [10, 11].

II/ Composition en acides gras des lipides plasmatiques

La composition en acides gras des lipides plasmatiques a été mesurée, de manière à évaluer l'absorption et le métabolisme des AG *n-6* et *n-3* dans les trois groupes d'animaux, et à mettre en évidence des différences entre les régimes.

Parmi les fractions étudiées pour leur spécificité, les TAG présentent un profil en acides gras qui reflète globalement celui des lipides ingérés par les animaux [46, 55, 329]. Les PL sont, quant à eux, considérés comme des vecteurs privilégiés des LCPUFA, en particulier ARA et DHA [56, 344]. Finalement, les EC constituent des « biomarqueurs » d'intérêt pour l'ALA et l'EPA, en particulier [280, 344].

II. 1) Composition en acides gras des triacylglycérols plasmatiques

Les profils en AG $n-6$ et $n-3$ des TAG plasmatiques sont présentés dans la figure F-2.

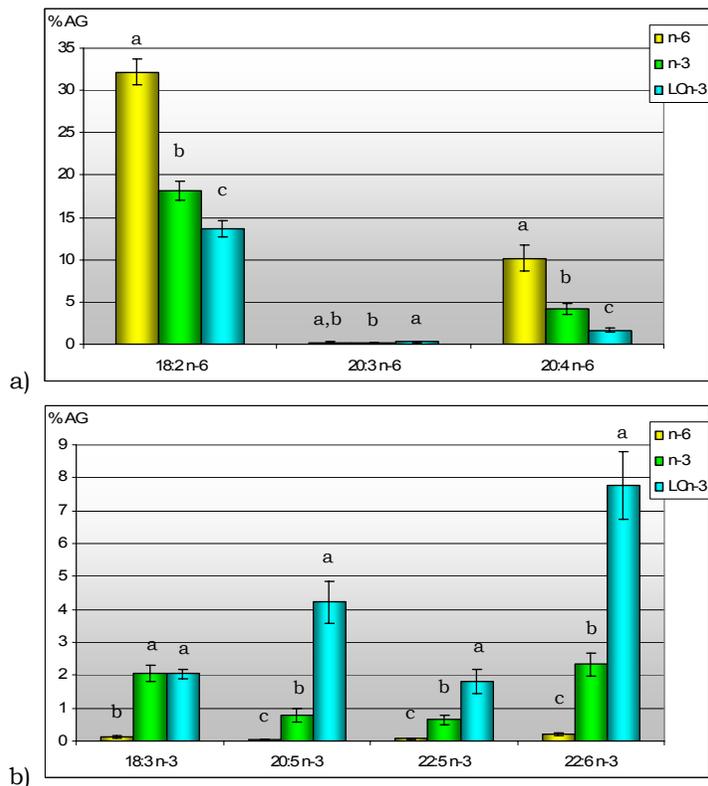


Figure F-2 : Profil en acides gras des triacylglycérols plasmatiques, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.

Abréviations : n-6 : groupe de rats sous régime riche en LA ($n = 10$), n-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA ($n = 10$), LCN-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA, EPA et DHA ($n = 11$), %AG : proportion de l'acide gras par rapport aux acides gras totaux.

a) Famille des acides gras n-6, comprenant de gauche à droite LA, dihomog-LA et ARA, b) Famille des acides gras n-3, comprenant de gauche à droite ALA, EPA, DPA et DHA.

Chaque analyse a été effectuée trois fois. Les barres portant des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes pour l'acide gras testé ($p < 0,05$).

La première conclusion qui s'impose suite à l'observation de la figure F-2 est le remplacement dans les TAG plasmatiques des AG $n-6$ par des AG $n-3$ quand le régime contient des PUFA $n-3$. En effet, le LA et l'ARA sont nettement diminués dans les régimes n-3 et LCN-3 (-60% en moyenne, $p < 0,05$), tandis que l'ALA, l'EPA, le DPA et le DHA sont augmentés ($p < 0,05$), allant jusqu'à atteindre 4% et 8% des acides gras totaux dans le cas du régime LCN-3 pour l'EPA et le DHA, respectivement. Entre les deux régimes contenant des AG $n-3$, la supplémentation en LCPUFA $n-3$ ajoute un effet non négligeable à l'apport en précurseur seul, puisque le taux d'EPA retrouvé dans les TAG circulants est multiplié par 5 entre les régimes n-3 et LCN-3, et le taux de DHA, par 3 ($p < 0,05$).

D'une manière générale, le profil en acides gras des TAG du plasma, prélevé à jeun, est fortement influencé par la composition du régime alimentaire. Cette analyse permet de confirmer la bonne absorption des acides gras d'intérêt apportés sous forme d'une matrice alimentaire complexe.

Ces résultats sont confirmés par des études précédemment publiées, dans lesquelles la supplémentation en AG $n-3$ induit chez le rat une augmentation de la proportion d'EPA et de DHA dans les TAG plasmatiques [46, 55, 329]. Cependant, les effets observés sur les AG $n-6$ sur le graphique F-2 ne sont pas confirmés par ces trois études. En effet, seuls les régimes incluant une forte supplémentation en LCPUFA $n-3$ (1,15 à 2,1 g/100g de régime) montrent une diminution du LA et de

l'ARA [46, 329], tandis que les régimes supplémentés avec une dose plus faible d'ALA (400 mg/100 g de régime) ou de LCPUFA *n-3* (1 g/100 g de régime) semblent neutres vis-à-vis des AG *n-6*.

II. 2) Composition en acides gras des phospholipides plasmatiques

Les profils moyens en AG *n-6* et *n-3* des PL plasmatiques sont présentés dans la figure F-3 ci-dessous.

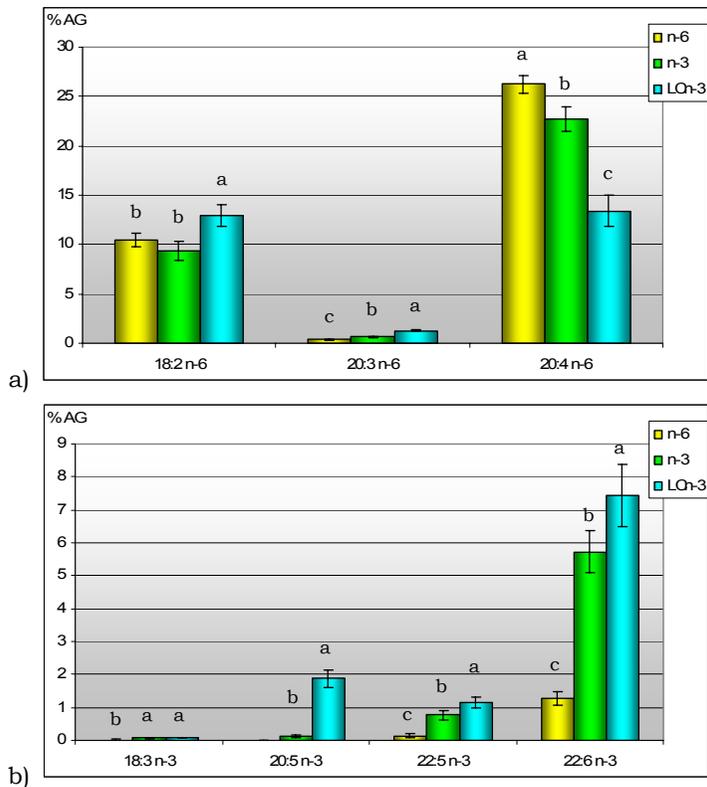


Figure F-3 : Profil en acides gras des phospholipides plasmatiques, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.

Abréviations : n-6 : groupe de rats sous régime riche en LA ($n = 10$), n-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA ($n = 10$), LCn-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA, EPA et DHA ($n = 11$), %AG : proportion de l'acide gras par rapport aux acides gras totaux.

a) Famille des acides gras n-6, comprenant de gauche à droite LA, dihomog-LA et ARA, b) Famille des acides gras n-3, comprenant de gauche à droite ALA, EPA, DPA et DHA.

Chaque analyse a été effectuée trois fois.

Les barres portant des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes pour l'acide gras testé ($p < 0,05$).

Les résultats concernant les PL plasmatiques montrent la même tendance que celle observée pour les TAG, mais de manière moins marquée. En effet, si les taux d'ARA, de DPA et de DHA sont nettement modifiés par les régimes *n-3* et LCn-3 ($\times 4$ en moyenne, $p < 0,05$), les autres acides gras sont moins influencés. Le LA n'est ainsi quasiment pas modifié par le régime *n-3*, tandis que l'ALA n'est retrouvé qu'à de très faibles proportions dans les trois groupes.

D'une manière globale, il semble que l'apport de LCPUFA permette de diminuer l'ARA de manière très importante, phénomène couplé à une augmentation de l'EPA et du DHA.

En remarque, citons l'influence du régime LCn-3 sur le LA et le dihomog-LA, qui augmente la proportion de ces acides gras de 24% et 260%, respectivement ($p < 0,05$ dans les deux cas).

Cette augmentation, concomitante à la diminution de l'ARA, suggère une inhibition de la conversion des AG *n-6*. Deux hypothèses peuvent être formulées sur l'étape précise de la conversion qui serait inhibée par le régime LCn-3 :

i) Si l'augmentation du dihomo-GLA est considérée comme importante – augmentation de 0,36% des acides gras totaux pour le groupe $n-6$ à 1,3% pour le groupe LC $n-3$ ($p < 0,05$) –, alors il peut être postulé que c'est la $\Delta 5$ -désaturation qui est inhibée ;

ii) Au contraire, si cette augmentation est considérée comme négligeable, il sera postulé que la $\Delta 6$ -désaturation est inhibée.

Les PL plasmatiques sont des vecteurs privilégiés des LCPUFA, en particulier de l'ARA et du DHA [56, 344], ce qui est confirmé par cette étude, au vu de la proportion importante de ces deux acides gras par rapport à ce qui a pu être observé dans les TAG. Concernant les précurseurs, il semble que seul le LA soit retrouvé dans les PL circulants, et non l'ALA.

Les résultats observés sont en accord avec ceux d'études similaires [219, 344], bien que la supplémentation en AG $n-3$ soit, dans la présente étude, nettement inférieure à ce qui est couramment pratiqué. En effet, l'expérience menée au cours de la thèse montre les mêmes résultats (augmentation de l'EPA et du DHA, diminution de l'ARA, et augmentation du LA) qu'une étude dans laquelle le régime alimentaire des rats contient 1,4 g de LCPUFA $n-3$ pour 100 g de régime, soit 4 fois plus que dans la présente expérience [219]. La branche ALA de l'expérience de la thèse a également conduit aux mêmes résultats que d'autres études, bien que la dose d'ALA dans les régimes y soit généralement 3 à 4 fois supérieure [219, 344].

II. 3) Composition en acides gras des esters de cholestérol plasmatiques

La composition moyenne en acides gras des EC est présentée dans la figure F-4 ci-dessous, qui illustre l'influence des trois régimes alimentaires sur le profil en acides gras des familles $n-6$ et $n-3$.

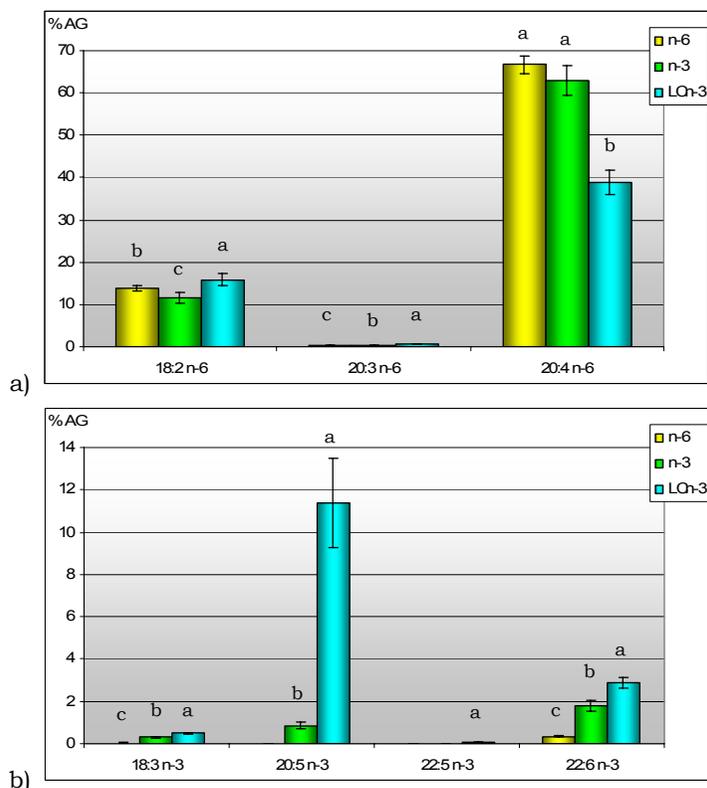


Figure F-4 : Profil en acides gras des esters de cholestérol plasmatiques, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.

Abréviations : $n-6$: groupe de rats sous régime riche en LA ($n = 10$), $n-3$: groupe de rats sous régime riche en ALA ($n = 10$), LC $n-3$: groupe de rats sous régime riche en ALA, EPA et DHA ($n = 11$), %AG : proportion de l'acide gras par rapport aux acides gras totaux.

a) Famille des acides gras $n-6$, comprenant de gauche à droite LA, dihomo-GLA et ARA, b) Famille des acides gras $n-3$, comprenant de gauche à droite ALA, EPA, DPA et DHA.

Chaque analyse a été effectuée trois fois.

Les barres portant des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes pour l'acide gras testé ($p < 0,05$).

Le profil en PUFA des EC plasmatiques est comparable à celui des PL plasmatiques. Ce résultat était attendu, puisque les EC sont formés à partir des PUFA estérifiés en position *sn*-2 de la PC des HDL – PL plasmatique majoritaire – par la LCAT [140]. Concernant la famille *n*-6, l'ARA est l'acide gras *n*-6 majoritaire, comme retrouvé dans le paragraphe précédent, et comme publié dans la littérature [280]. L'impact du régime LC*n*-3 sur l'ARA est le même que sur les PL, provoquant une diminution de cet acide gras ($p < 0,05$). Cependant, l'impact des différents régimes les uns par rapport aux autres n'est pas le même dans le cas de la famille *n*-6. En effet, seul le régime LC*n*-3 permet de diminuer l'ARA dans les EC (-40%), tandis que cet acide gras était également diminué dans les PL plasmatiques des animaux du groupe *n*-3.

Ces résultats sont en accord avec les résultats précédemment publiés, et ce, bien que cette étude ait consisté en une plus faible supplémentation en ALA et LCPUFA *n*-3 [280, 344].

Concernant la famille *n*-3, l'EPA est augmenté uniquement dans le groupe LC*n*-3, tandis que le taux de DHA est modifié par les deux régimes contenant des PUFA *n*-3, comme déjà observé dans les PL plasmatiques. Cependant, si les PL ont pu être identifiés comme étant des vecteurs privilégiés de transport du DHA, il semble que les EC transportent préférentiellement l'EPA. Cet acide gras représente en effet près de 12% des acides gras totaux dans le groupe LC*n*-3, ce qui est le taux le plus élevé d'un acide gras *n*-3 dans les lipides circulants, toutes classes confondues.

Cette observation n'a pas été observée dans les autres études [280, 344].

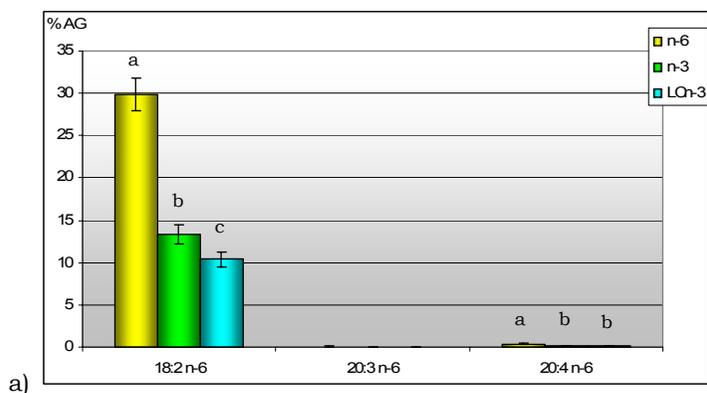
Au vu de ces résultats, une hypothèse peut être formulée, selon laquelle la LCAT pourrait estérifier préférentiellement l'EPA sur le cholestérol libre, au détriment du DHA.

III/ Biodisponibilité cellulaire

Après avoir traité dans le chapitre précédent les aspects absorption et métabolisme de la biodisponibilité des PUFA, cette partie présente les résultats concernant la modification du profil en acides gras cellulaire au niveau de trois tissus : le tissu adipeux, les membranes d'érythrocytes et les membranes des cellules cérébrales.

III. 1) Composition en acides gras du tissu adipeux

La modification par les régimes alimentaires du profil des lipides stockés dans le tissu adipeux a été évaluée, et les résultats concernant les familles d'AG *n*-6 et *n*-3 sont présentés dans la figure F-5 ci-après.



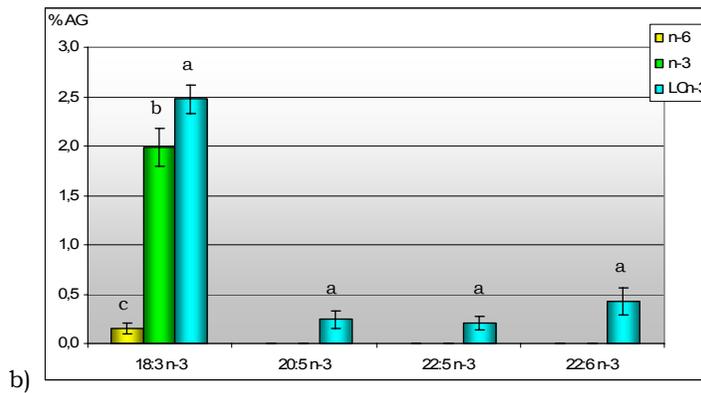


Figure F-5 : Profil en acides gras du tissu adipeux, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.

Abréviations : n-6 : groupe de rats sous régime riche en LA ($n = 10$), n-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA ($n = 10$), LCn-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA, EPA et DHA ($n = 11$), %AG : proportion de l'acide gras par rapport aux acides gras totaux.

a) Famille des acides gras n-6, comprenant de gauche à droite LA, dihomog-LA et ARA, b) Famille des acides gras n-3, comprenant de gauche à droite ALA, EPA, DPA et DHA.

Chaque analyse a été effectuée trois fois.

Les barres portant des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes pour l'acide gras testé ($p < 0,05$).

La première conclusion qui peut être faite au vu des résultats présentés sur la figure F-5 est que le tissu adipeux ne stocke pas de LCPUFA, ce qui est cohérent avec les données des publications scientifiques [50]. En effet, les PUFA majoritairement représentés sont le LA et l'ALA. Leur proportion respective semble bien corrélée avec l'apport alimentaire, puisque le régime n-6 engendre le plus fort taux de LA et le plus faible d'ALA, tandis que parmi les régimes n-3 et LCn-3 les faibles différences de composition des régimes en LA et ALA sont retrouvées dans le profil lipidique du tissu adipeux (-22% de LA et +24% d'ALA avec le régime LCn-3 par rapport au n-3, $p < 0,05$ pour les deux comparaisons).

Les résultats de cette expérience sont en accord avec l'étude de Ratnayake *et al.* (1992) [414], dans laquelle les rats étaient nourris avec un régime contenant 1,2 g d'ALA pour 100 g de régime (3 fois plus que dans cette expérience).

Au vu de ces résultats, il semble que l'apport en ALA des régimes n-3 et LCn-3 soit suffisant pour couvrir les besoins métaboliques des rats, qui semblent stocker une partie de l'ALA non utilisé, puisqu'en cas de privation d'ALA (régime n-6), cet acide gras n'est pas présent dans le tissu adipeux. Dans les deux régimes contenant des AG n-3, l'ALA n'est retrouvé que dans les TAG plasmatiques et le tissu adipeux. Ceci laisse à penser que cet acide gras, s'il n'est pas métabolisé au niveau du foie en dérivés à longue chaîne, est destiné à servir de forme de réserve d'énergie dans les adipocytes.

Il est intéressant de noter que dans le cas du régime LCn-3, les LCPUFA n-3 (EPA, DPA et DHA) sont également retrouvés dans le tissu adipeux, représentant à eux trois 0,9% des acides gras totaux. Il est très probable que ce changement soit dû à un enrichissement de la membrane des adipocytes par le régime LCn-3, augmentant la proportion de LCPUFA n-3 dans les PL membranaires. Le contenu en TAG de réserve des adipocytes étant très largement supérieur aux PL, il est logique que les LCPUFA ne soient que très peu représentés dans la phase lipidique extraite par la méthode Lepage et Roy (1984) [292].

Le profil en acides gras du tissu adipeux permet d'avoir une image de l'alimentation lipidique des animaux, hors LCPUFA. Cette information confirme les résultats observés dans le cas des TAG plasmatiques, qui indiquent que les acides gras, PUFA et LCPUFA, apportés par l'alimentation sous forme d'une matrice lipidique complexe sont bien absorbés au niveau de l'épithélium intestinal.

III. 2) Composition en acides gras des membranes érythrocytaires

La PE a été choisie afin d'évaluer la biodisponibilité des acides gras au niveau cellulaire. En effet, il a été démontré que le profil en acides gras des membranes des hématies était fortement corrélé avec le profil en acides gras des membranes des cardio-myocytes [516]. Le choix de la classe de PL a été fait en fonction de la composition en acides gras généralement retrouvée chez le rat, chez lesquels 80% des PL membranaires sont des PC ou des PE. Parmi ces deux classes, la PE est le réservoir préférentiel des LCPUFA (en particulier ARA et DHA) [50, 140]. La même technique a également été appliquée pour déterminer le profil en acides gras de la PE de la membrane des cellules cérébrales.

L'étude de la biodisponibilité cellulaire des AG $n-6$ et $n-3$ a été évaluée dans les membranes des hématies, les résultats étant illustrés dans la figure F-6.

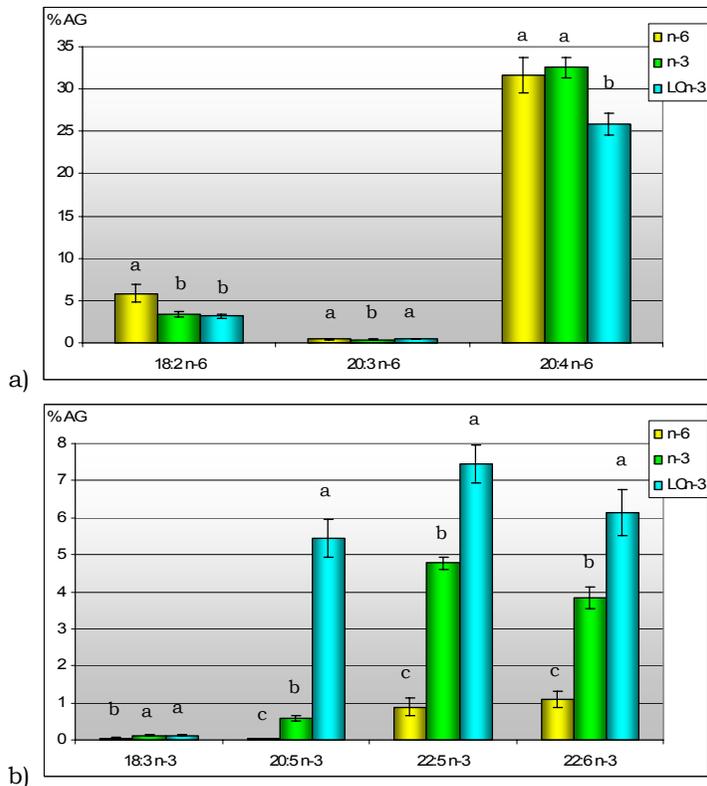


Figure F-6 : Profil en acides gras de la phosphatidyléthanolamine des érythrocytes, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.

Abréviations : n-6 : groupe de rats sous régime riche en LA ($n = 10$), n-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA ($n = 10$), LQn-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA, EPA et DHA ($n = 11$), %AG : proportion de l'acide gras par rapport aux acides gras totaux.

a) Famille des acides gras n-6, comprenant de gauche à droite LA, dihomog-LA et ARA, b) Famille des acides gras n-3, comprenant de gauche à droite ALA, EPA, DPA et DHA.

Chaque analyse a été effectuée trois fois.

Les barres portant des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes pour l'acide gras testé ($p < 0,05$).

A l'inverse des acides gras retrouvés dans le tissu adipeux, les membranes des hématies contiennent majoritairement des LCPUFA. Les deux familles d'acides gras sont représentées, avec l'ARA pour les n-6, et l'EPA, le DPA et le DHA pour les n-3.

De la même manière que dans les EC plasmatiques, seul le régime contenant des LCPUFA n-3 entraîne une diminution de la proportion d'ARA dans les membranes (-20% en moyenne, $p < 0,05$ dans les deux cas). Ceci est confirmé par d'autres études publiées, dans lesquelles la supplémentation en ALA provoque une diminution d'ARA uniquement à de fortes doses [250].

Au contraire de ce qui est observé dans les PL et les EC, le taux de LA n'est pas augmenté dans le groupe LCn-3.

Ce régime permet également d'enrichir de manière importante les PE membranaires en EPA, DPA et DHA (x18, x8 et x5 par rapport au groupe n-6, respectivement, $p < 0,05$ pour ces trois comparaisons). Le régime n-3 montre un effet semblable sur le DPA et le DHA dans la membrane des hématies, mais d'amplitude moins importante que le LCn-3. En revanche, le régime riche en précurseur n'induit qu'une faible augmentation de l'EPA, même si elle est statistiquement significative.

Il est intéressant de noter que c'est le premier compartiment dans lequel le DPA est présent en proportion non négligeable. Dans les études de Ratnayake *et al.* (1992) [414] et Morise *et al.* (2005) [344], le DPA est également largement augmenté dans les membranes cellulaires, pouvant atteindre la même proportion que le DHA [344].

Ces résultats sont confirmés par d'autres études de supplémentation en AG n-3, bien que les régimes de la présente expérience soient faiblement enrichis en acides gras d'intérêt par rapport aux doses utilisées par les autres équipes (1,4 g d'ALA ou 1,15 g de LCPUFA pour 100 g de régime, en moyenne) [225, 329, 344, 414].

De la même manière que dans les TAG ou les PL plasmatiques, il semble que la supplémentation en LCPUFA n-3 augmente l'EPA d'une manière beaucoup plus importante que le régime riche en ALA, différence qui n'est pas de cette amplitude dans le cas du DHA.

Ce phénomène a également été démontré chez l'homme [62], dans une étude à deux doses de supplémentation en LCPUFA (0,6 g et 2 g/j). La plus forte dose a engendré une augmentation supplémentaire de l'EPA par rapport à l'autre dose, ce qui n'a pas été le cas pour le DHA.

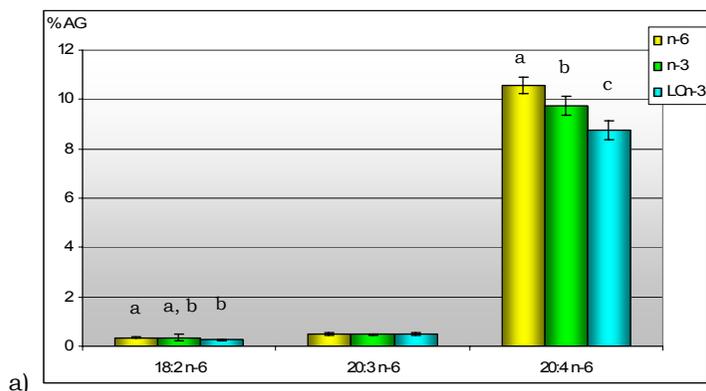
Deux remarques peuvent être formulées par rapport à ces résultats :

- i) Il semble donc que le DHA apporté par l'alimentation *via* les TAG ou les PL plasmatiques (régime LCn-3), soit rétroconverti en DPA et en EPA. Deux raisons sont envisageables : il est possible que le DHA soit converti en DPA, puis en EPA, de manière à permettre la synthèse d'eicosanoïdes, ou alors que cette rétroconversion du DHA soit due à un mécanisme de défense de la cellule, qui chercherait à se protéger de l'oxydation en diminuant le nombre d'insaturations présentes dans les PL membranaires ;
- ii) Concernant le régime n-3, l'étape limitante de la conversion de l'ALA apporté par l'alimentation serait située entre le DPA et le DHA. Ceci semble possible, sachant que cette dernière partie de la conversion nécessite une phase de translocation des acides gras dans les peroxysomes pour subir une β -oxydation partielle [65].

III. 3) Composition en acides gras de la membrane des cellules cérébrales

La composition en acides gras du cerveau est le dernier volet de cette étude de biodisponibilité des acides gras incorporés dans un produit alimentaire.

L'extraction de la PE cérébrale permet d'obtenir une image globale de la teneur en acides gras de la membrane des cellules cérébrales, que ce soit au niveau des neurones, des astrocytes, des cellules gliales, ou encore des cellules endothéliales (figure F-7).



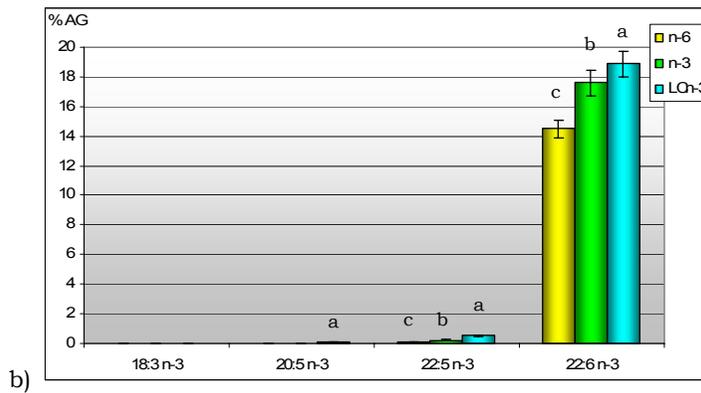


Figure F-7 : Profil en acides gras de la phosphatidyléthanolamine des cellules cérébrales, obtenu par chromatographie en phase gazeuse.

Abréviations : n-6 : groupe de rats sous régime riche en LA ($n = 10$), n-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA ($n = 10$), LCn-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA, EPA et DHA ($n = 11$), %AG : proportion de l'acide gras par rapport aux acides gras totaux.

a) Famille des acides gras n-6, comprenant de gauche à droite LA, dihomog-LA et ARA, b) Famille des acides gras n-3, comprenant de gauche à droite ALA, EPA, DPA et DHA.

Chaque analyse a été effectuée trois fois.

Les barres portant des lettres différentes indiquent une différence significative entre les groupes pour l'acide gras testé ($p < 0,05$).

La première remarque qui peut être faite suite à l'observation de la figure F-7 est la très grande spécificité du profil en acides gras cérébral. En effet, l'ARA et le DHA sont presque les seuls PUFA représentés dans les PE cérébrales, couvrant à eux deux 25 à 27% des acides gras totaux.

Comme dans le cas des PE érythrocytaires, l'effet le plus important sur l'ARA et le DHA est observé dans le groupe LCn-3 (-17% et +30%, respectivement, $p < 0,05$ pour les deux comparaisons). Ces variations sont, malgré tout, très faibles comparées aux valeurs rencontrées dans les autres analyses de l'étude.

Le régime n-3 engendre également une augmentation de la proportion de DHA dans la membrane des cellules cérébrales, et contrairement à ce qui a été observé dans le cas de la PE des hématies, ce régime permet également de diminuer l'ARA (+21% et -8%, respectivement, $p < 0,05$ dans les deux cas). Ces variations restent cependant moins importantes que celles engendrées par le régime LCn-3, ce qui renforce la pertinence de la supplémentation directe en LCPUFA n-3.

Les études de supplémentation en ALA dans lesquelles le profil en acides gras de la membrane des cellules cérébrales a été étudié montrent le même type de résultats. En effet, le premier effet observé de la supplémentation en ALA est l'augmentation du DHA (1,2 g pour 100 g de régime [88]), tandis que la dose doit être augmentée à 3,4 g pour 100 g de régime (10 fois la dose employée dans cette expérience) pour induire une diminution de l'ARA [88].

Il semble, au vu de ces résultats, que le profil en acides gras du cerveau est moins facilement modifiable par l'alimentation que celui des autres tissus analysés, ce qui est confirmé par les données bibliographiques [225]. Néanmoins, considérant les doses de PUFA n-3 mises en œuvre dans cette étude par rapport aux travaux publiés, l'amplitude des effets observés semble indiquer que le profil lipidique global des régimes n-3 et LCn-3 est favorable à un remplacement des AG n-6 par des n-3.

IV/ Evaluation du statut oxydatif

Le statut oxydatif des animaux a été évalué de deux manières, et ce, afin de vérifier que le régime hautement polyinsaturé du groupe LCn-3 n'engendre pas une augmentation de l'oxydation des lipides circulants.

La première technique utilisée consiste à évaluer l'activité antioxydante du plasma, en mesurant le taux d' α -tocophérol des animaux par chromatographie en phase liquide haute performance.

L'activité vitaminique E dans l'organisme fait intervenir les différentes formes de tocophérols et de tocotriénols, l' α -tocophérol étant la molécule la plus active (cf. chapitre « Oxydation et antioxydants »).

Sécrété par les hépatocytes et incorporé aux VLDL, l' α -tocophérol assure la protection contre l'oxydation du contenu lipidique des lipoprotéines de faible densité [61].

La deuxième technique utilisée consiste à évaluer l'oxydation des lipides circulants en mesurant le taux plasmatique de TBARs par le test au TBA.

Cette méthode est basée sur la réaction que peuvent avoir certains produits d'oxydation des lipides avec le TBA. C'est le cas en particulier du malonalaldéhyde, qui est produit lors de l'oxydation des acides gras insaturés des LDL circulantes, mais également d'autres molécules (glucides simples, protéines oxydées), ce qui constitue l'inconvénient principal de cette méthode [387]. Néanmoins, le test au TBA est simple à mettre en œuvre, c'est pourquoi il est largement répandu et a été choisi dans la présente étude.

Les corps gras ajoutés à l'ingrédient alipidique dans chacun des régimes participent à l'activité antioxydante plasmatique des animaux, car ils contiennent également des tocophérols. Exprimée en « équivalents α -tocophérol » (α -TE), la teneur en tocophérols des régimes prend en compte l'efficacité des différents tocophérols et tocotriénols. Cette valeur, obtenue également par chromatographie liquide haute performance, est illustrée dans le graphique F-8 avec le taux plasmatique d' α -tocophérol des animaux.

Après mesure de la concentration des différentes molécules en chromatographie en phase liquide haute performance, l'activité vitaminique E globale des régimes est calculée comme suit :

- 1 α -TE représente l'activité d'1 mg d' α -tocophérol
- 1 mg de β -tocophérol équivaut à 0,5 α -TE
- 1 mg de γ -tocophérol équivaut à 0,25 α -TE
- 1 mg de δ -tocophérol équivaut à 0,02 α -TE
- 1 mg d' α -tocotriénol équivaut à 0,3 α -TE
- 1 mg de β -tocotriénol équivaut à 0,05 α -TE
- 1 mg de γ -tocotriénol équivaut à 0,01 α -TE [447, 480].

La figure F-8 ci-dessous présente les résultats concernant le statut oxydatif des animaux, le taux d' α -tocophérol plasmatique des rats, l'activité vitaminique E des régimes, ainsi que la concentration plasmatique en TBARs.

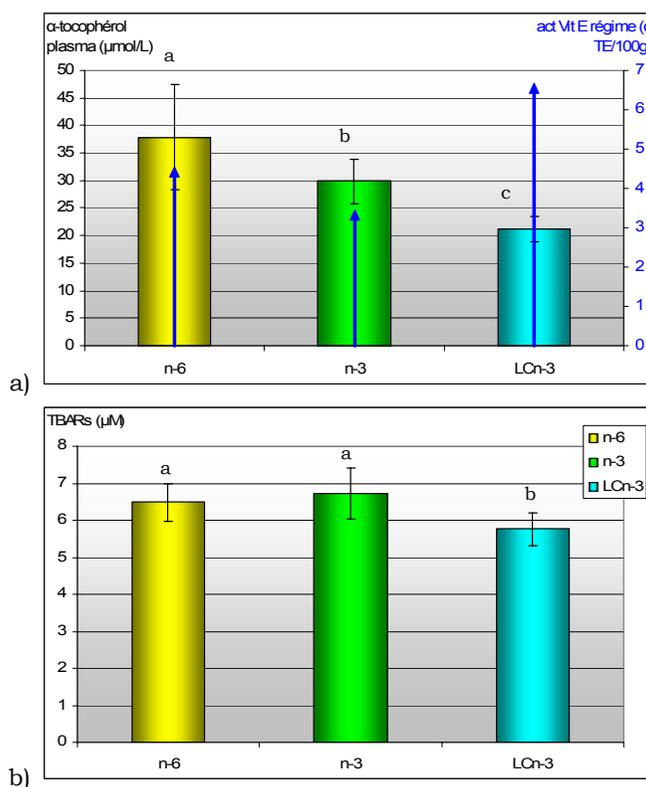


Figure F-8 : Taux plasmatique d' α -tocophérol des rats et activité vitaminique E des régimes, obtenus par chromatographie liquide haute performance (a) et taux de substances plasmatiques réagissant à l'acide thiobarbiturique, obtenu par spectrophotométrie (b).

Abréviations : act Vit E régime : activité vitaminique E du régime, TBARs : concentration plasmatique en substances réagissant à l'acide thiobarbiturique, n-6 : groupe de rats sous régime riche en LA, n-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA, LCn-3 : groupe de rats sous régime riche en ALA, EPA et DHA.

L'activité vitaminique E des produits est obtenue par chromatographie en phase liquide haute performance selon la norme NF ISO 9936 [7].

Chaque analyse a été répétée trois fois.

Les barres portant des lettres différentes sont significativement différentes pour l'acide gras testé ($p < 0,05$).

Le taux plasmatique d' α -tocophérol est significativement plus faible chez les animaux des deux groupes n-3 et LCn-3, comparativement à celui des animaux du groupe n-6 ($p < 0,05$).

Les études de Javouhey-Donzel *et al.* (1993) et de McGuire et Fritsche (1997) [225, 329] montrent également une diminution de l' α -tocophérol plasmatique consécutive à l'enrichissement du régime des rats en LCPUFA n-3 (1,2g d'EPA-DHA pour 100g de régime en moyenne). La première équipe a également mis en évidence le même ordre d'impact des PUFA n-3 que ce qui apparaît sur le graphique F-8, c'est-à-dire $n-6 > n-3 > LCn-3$ [225]. La seconde équipe a, quant à elle, montré qu'il existe une relation de dose à effet entre la supplémentation en EPA-DHA et la diminution de l' α -tocophérol plasmatique [329].

Dans cette dernière publication, le taux d' α -tocophérol mesuré dans le plasma des animaux est inférieur à ce qui a été retrouvé dans la présente étude. En effet, la concentration plasmatique en α -tocophérol de leur groupe témoin était de 12 μM (*vs.* 38 μM dans cette expérience), et celle du groupe LCn-3 était de 7,6 μM (*vs.* 21,2 μM dans le cas présent). Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer cette différence :

- i) Les animaux utilisés dans la présente étude sont des mâles, tandis que McGuire et Fritsche (1997) [329] ont étudié des femelles. Il est possible que le sexe, et donc le statut hormonal, induise une différence d'activité vitaminique E dans le plasma ;
- ii) La fraction lipidique du régime de l'étude de McGuire et Fritsche était dépourvue de tocophérols, hormis une faible présence dans l'huile de poisson. Il est possible que l'apport alimentaire d'antioxydants dans la présente expérience provoque une légère augmentation de l'activité vitaminique E du plasma des animaux ;
- iii) La résistance à l'oxydation des PUFA incorporés dans une matrice complexe type corps gras a été mise en évidence dans le chapitre « Influence de la formulation de la phase fluide sur la flaveur ». Dans les autres études publiées, les lipides d'intérêt sont simplement mélangés à l'aliment alipidique. Il est possible que cette protection supplémentaire des PUFA absorbés par les animaux induise une consommation moindre de l' α -tocophérol plasmatique afin de protéger les lipides circulants.

Une diminution du taux d' α -tocophérol retrouvé dans le plasma n'est pas forcément le signe d'une diminution de cet antioxydant dans les tissus. En effet, McGuire et Fritsche (1997) [329] ont montré qu'une supplémentation en EPA et DHA n'induit pas de diminution du taux d' α -tocophérol dans le foie des rats, tandis que Ratnayake *et al.* (1992) [414] ont montré que la supplémentation en ALA (1,2 g d'ALA pour 100 g de régime) n'induit pas de diminution dans le foie, le cœur, la rate ou le tissu adipeux des animaux.

Javouhey-Donzel *et al.* (1993) [225] ont publié des résultats un peu différents, confirmant que la supplémentation en ALA ou EPA-DHA n'induit pas de diminution du taux d' α -tocophérol dans le foie ou le cerveau des rats. En revanche, ils ont mis en évidence une baisse de 20% de cet antioxydant dans le cœur des animaux du groupe LCPUFA n-3. Cependant, la dose de supplémentation en EPA et DHA dans leur étude est presque 4 fois supérieure à la dose choisie dans l'étude présentée dans ce chapitre.

Concernant l'évaluation de l'oxydation des lipides circulants, le groupe n-3 n'entraîne pas d'augmentation de la production de TBARs ($p > 0,05$), ce qui indique que l'oxydation n'est pas amplifiée chez les animaux de ce groupe. Ce résultat est confirmé par l'étude de Ratnayake *et al.* (1992) [414].

Le cas du groupe LCn-3 est intéressant. Non seulement chez ces animaux le taux de TBARs n'est pas augmenté suite à l'enrichissement en acides gras hautement polyinsaturés dans le régime, mais il est même légèrement inférieur au taux mesuré chez les rats des groupes n-3 et n-6 (-14% et -11%, respectivement, $p < 0,05$ pour les deux comparaisons).

Il peut être considéré que cette légère différence, quoique statistiquement significative, n'est pas pour autant l'image d'une amélioration réelle du statut oxydatif des animaux. Cependant, même dans cette hypothèse, la conclusion de ces analyses est que le régime LCn-3 n'induit pas une amplification de l'oxydation des lipides circulants chez les rats.

La diminution du taux d' α -tocophérol plasmatique dans le groupe LCn-3 n'indique pas inévitablement une diminution de l'activité antioxydante du plasma. En effet, les antioxydants du corps gras inclus dans le régime de ce groupe sont à 58% du γ -tocophérol, pour seulement 22% d' α -tocophérol, tandis que dans le régime n-3, l' α -tocophérol représente plus de 50% des tocophérols et tocotriénols, proportion poussée à 97% dans le cas du régime n-6.

Ceci est dû au fait que le γ -tocophérol est un meilleur antioxydant dans les produits alimentaires, et a été ajouté à la formule LCn-3 pour protéger les lipides hautement insaturés de l'huile de poisson. Il est donc possible que le plasma des animaux de ce groupe soit enrichi en γ -tocophérol (qui a, malgré tout, une activité vitaminique de 0,25 α -TE), ce qui n'a pas été pris en compte dans la mesure du taux plasmatique d' α -tocophérol réalisée dans l'étude [447, 480]. Dans cette hypothèse, l'activité vitaminique E globale du plasma des animaux est sous-estimée, ce qui confirme les résultats du test au TBA, selon lequel l'oxydation des lipides circulants n'est pas augmentée chez ces rats.

V/ Discussion

Cette étude menée chez le rat montre qu'un corps gras est une matrice dans laquelle les acides gras sont biodisponibles. De plus, les résultats présentés dans ce chapitre montrent que le profil en LCPUFA du produit mis au point au cours de la thèse favorise la biodisponibilité de ces acides gras, comparé aux deux corps gras ne contenant que des précurseurs des familles n-6 ou n-3, que ce soit dans les lipides circulants ou au niveau cellulaire.

Les résultats observés dans les lipides plasmatiques sont cohérents avec ceux d'autres études de supplémentation, même si les doses employées sont souvent très supérieures à celles choisies dans cette étude. Deux hypothèses sont envisageables suite à ce constat :

- i) Soit la matrice du produit permet une très bonne biodisponibilité des acides gras d'intérêt ;
- ii) Soit la relation dose-effet n'est pas linéaire, et la dose choisie dans cette étude est pertinente.

Les résultats concernant la modification du profil en acides gras des lipides circulants montrent que l'enrichissement en LCPUFA n-3 se fait au détriment de l'ARA. Il est possible que cette déplétion soit due à une inhibition par les LCPUFA n-3 de la conversion des AG n-6.

Parmi les lipides plasmatiques, les EC paraissent transporter l'EPA d'une manière plus importante que le DHA. L'hypothèse selon laquelle la LCAT pourrait estérifier préférentiellement l'EPA sur le cholestérol mériterait un travail de recherche supplémentaire, car cette observation n'a pas été reportée auparavant dans la littérature.

Les résultats de cette étude concernant la biodisponibilité cellulaire des acides gras d'intérêt montre que la présence de LCPUFA n-3 dans le produit favorise leur mise en réserve au niveau des membranes érythrocytaires, aux dépens de l'ARA, et ce, d'une manière plus importante que si seul l'ALA est apporté par l'alimentation.

Des études chez l'homme de la biodisponibilité des LCPUFA n-3 ont montré le même type de résultats que ceux retrouvés dans cette étude. En effet, la supplémentation du régime alimentaire en LCPUFA n-3 a engendré une diminution du LA et de l'ARA et une augmentation de l'EPA et du DHA dans les PL plasmatiques [188, 235, 411], les PL membranaires des hématies [110, 400] et des plaquettes sanguines [62], pour des doses de 0,5 à 3 g par jour. Vericel *et al.* (1999) [502] ont montré qu'une dose de 0,18 g/j n'engendre qu'une augmentation du DHA dans la PE membranaire des plaquettes, sans que les autres acides gras ne soient affectés. Les auteurs montrent de plus que seul le taux de DHA de la PE varie, tandis que celui des autres PL membranaires ne change pas. Ceci tend à confirmer le fait que la PE constitue le réservoir principal des LCPUFA n-3 dans la cellule. Enfin, Harris *et al.* (1997) [188] ont montré que la supplémentation en EPA seul n'est pas aussi efficace que l'apport d'EPA et de DHA pour modifier le profil en acides gras des PL plasmatiques. En effet, si le régime « EPA » a engendré une augmentation de l'EPA, seul le régime « EPA+DHA » a permis de faire diminuer le LA et l'ARA, et d'augmenter le DHA.

Etant donné le rôle de l'EPA en tant qu'antagoniste de l'ARA pour la production d'eicosanoïdes, il semble que les deux LCPUFA *n-3* soient utiles, et qu'une dose supérieure à 0,2 g soit nécessaire pour obtenir le maximum d'effet.

Compte tenu des propriétés antagonistes des eicosanoïdes synthétisés à partir de l'EPA et de l'ARA [2, 3, 288], le remplacement partiel de l'ARA par de l'EPA dans les membranes cellulaires laisse à supposer que ce régime peut induire une modification du profil des métabolites produits par la LOX et la COX, tendant vers un statut anti-inflammatoire et antithrombotique [2, 3, 41, 288, 493, 510]. Il a été démontré chez l'homme que le statut hémostatique était amélioré par la supplémentation en EPA et DHA, que ce soit par une inhibition de la synthèse de composés responsables de la coagulation [160, 213, 320, 363, 403, 446] ou par l'intermédiaire des eicosanoïdes formés à partir de l'EPA [41, 493, 510].

De plus, étant donné l'influence de la composition en *n-3* et *n-6* des membranes des hématies sur la fluidité membranaire, il est très probable que la capacité des érythrocytes à se déformer soit augmentée suite à l'absorption du régime LC*n-3*, ce qui est une caractéristique essentielle de ces cellules en cas de rétrécissement de la lumière artérielle (dû à un stade avancé d'athérosclérose par exemple).

Enfin, il est possible que la consommation de ce produit alimentaire entraîne également une modification du profil des eicosanoïdes produits dans le cœur. Ceci a d'ailleurs été démontré chez des insuffisants cardiaques [516]. La diminution dans les cardio-myocytes et les cellules endothéliales cardiaques des eicosanoïdes de la série 2 issus de l'ARA, et parmi eux du TxA₂, est positive, car ce composé a été associé à la survenue d'arythmie induite par l'ischémie [352].

Il est intéressant de noter ici que seul l'apport alimentaire de LCPUFA *n-3* a permis de diminuer le taux d'ARA dans la membrane érythrocytaire, donc potentiellement dans la membrane cardio-myocytaire. Ce point, ajouté à l'augmentation supérieure des taux d'EPA et de DHA dans tous les compartiments étudiés, démontre l'intérêt de compléter le régime en LCPUFA, et non uniquement en précurseur des AG *n-3*.

Comparativement à une alimentation excédentaire en acides gras de la famille *n-6*, l'enrichissement d'un produit en PUFA de la famille *n-3* permet non seulement d'augmenter les apports en ces acides gras importants, mais également de favoriser la conversion de l'ALA en EPA et DHA. Il est important de noter que le ratio *n-6/n-3* des deux régimes *n-3* est favorable à cette conversion, et donc, que l'enrichissement des lipides plasmatiques et membranaires en LCPUFA *n-3* n'est pas uniquement dû à l'apport alimentaire quantitatif de PUFA *n-3*, mais également au profil lipidique global du régime, puisque le ratio *n-6/n-3* est inférieur à 5 dans les deux cas (4,4 pour *n-3*, et 2,8 pour LC*n-3*) [515].

L'ensemble des conclusions de cette étude conduite sur ce modèle animal confirme la pertinence de l'enrichissement d'un produit alimentaire en EPA et en DHA pour participer au rééquilibrage des apports lipidiques de la population française. En effet, les PUFA inclus dans la matrice alimentaire sont biodisponibles, et n'induisent pas d'augmentation du statut oxydatif. L'apport d'ALA est également intéressant au vu de l'impact du régime *n-3* par rapport à un régime ne contenant pas d'ALA.

Ce travail est original, puisqu'il a consisté à étudier la biodisponibilité de nutriments inclus dans une matrice complexe, et non juste ajoutés au régime normal par addition d'une huile, comme couramment réalisé [46, 55, 56, 88, 219, 225, 280, 329, 344, 398, 414, 515]. Dans ces études, les huiles d'intérêt sont ajoutées à d'autres sources de lipides, de manière à assurer l'apport global en lipides des animaux. Il n'est donc pas garanti que la biodisponibilité des PUFA démontrée dans ce cas soit reproduite si les huiles sont associées à d'autres sources d'acides gras. Dans la présente étude, ce n'est pas seulement la disponibilité des PUFA qui a été étudiée, mais l'efficacité d'un aliment entier comme vecteur de ces nutriments d'intérêt.

L'étape suivante, après cette étude de biodisponibilité, est la réalisation d'une étude clinique visant à démontrer l'impact positif de ce corps gras sur des facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires.

Paramétrage de l'étude clinique

PARAMETRAGE DE L'ETUDE CLINIQUE

L'objectif principal de la thèse est de mettre au point un produit alimentaire type corps gras, possédant un profil en acides gras susceptible de participer au rééquilibrage du régime alimentaire des français, avec comme cible la prévention des pathologies cardio-vasculaires.

Après la mise au point du profil en acides gras du produit par rapport à la synthèse bibliographique sur le rôle des lipides alimentaires sur le développement des maladies cardio-vasculaires, le chapitre « Formulation et Physico-chimie » a concerné la mise au point du produit, que ce soit en terme de texture, de flaveur, ou encore de stabilité à l'oxydation. La partie précédente a présenté les résultats d'une étude de biodisponibilité menée chez l'animal, démontrant l'intérêt de ce produit pour enrichir les lipides circulants et les tissus en AG *n*-3, et en particulier en EPA et DHA.

Cette dernière partie présente le paramétrage d'une étude clinique, destinée à mettre en évidence l'effet de ce produit alimentaire sur des marqueurs physiologiques associés au développement des maladies cardio-vasculaires. Le but de cette étude est de montrer qu'un produit alimentaire, de par son profil en acides gras, en particulier son taux d'EPA et de DHA, permet d'améliorer certains de ces facteurs de risque, et donc de participer à la prévention des accidents cardio-vasculaires.

I/ Introduction

La cascade d'événements conduisant à l'accident cardio-vasculaire fatal peut être représentée comme suit, en prenant en compte la contribution d'une alimentation déséquilibrée et l'ensemble des facteurs de risque, modifiables ou non.

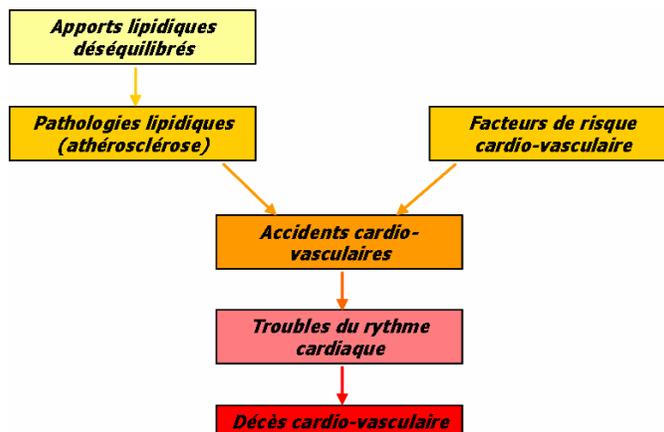


Figure F-9 : Représentation schématique de l'enchaînement d'événements menant à l'accident cardio-vasculaire fatal.

Les facteurs de risque des accidents cardio-vasculaires ont été présentés dans le chapitre « Lipides : métabolisme et pathologies ». Reconnus par plusieurs sociétés de cardiologie ou instances médicales internationales, ils sont rapidement rappelés ci-dessous :

⌘ Facteurs de risque modifiables

- Syndrome métabolique : surpoids, associé à deux facteurs parmi les quatre suivants : [12, 25, 113, 128, 243, 356]
 - TAGp élevés ou traitement [106, 113, 134, 160, 262, 356, 430, 473, 535],
 - HDL-cholestérol bas ou traitement [49, 106, 113, 155, 160, 356, 430, 440, 473, 535],
 - glycémie élevée ou diabète type 2 [52, 113, 160, 356, 487, 535],
 - pression artérielle élevée [113, 124, 129, 243, 315, 356, 487, 535] ;
- ii) Hyperlipidémie LDL [106, 113, 124, 160, 226, 356, 430, 535] ;
- iii) Etat pro-coagulant [35, 160, 193, 213, 244, 320, 356, 491] ;

- iv) Tabagisme [113, 143, 356, 487, 535] ;
- v) Sédentarité [113, 267, 356, 367, 535] ;
- vi) Apports lipidiques déséquilibrés : excès de SFA, déficit en AG *n-3* [113, 356, 535].

∅ Facteurs de risque non modifiables

- Antécédents familiaux [158, 319, 356] ;
- Age [113, 356, 487, 535] ;
- Sexe [113, 356, 487, 535].

∅ Autres marqueurs impliqués

- Rythme cardiaque irrégulier ou trop rapide [243, 247, 277, 384, 426, 481] ;
- Inflammation poussée [160, 227, 316, 356, 416] ;
- Phénotype apoE ε4 [107, 136, 362, 497].

II/ Facteurs cible

Parmi ces facteurs de risque, le produit alimentaire mis au point au cours de la thèse peut intervenir à plusieurs niveaux, comme l'ont montré les études de supplémentation en LCPUFA *n-3* réalisées au cours des 30 dernières années. L'impact de ces acides gras sur le développement des pathologies cardio-vasculaires a été détaillé dans la synthèse bibliographique (*cf.* chapitre « Lipides : Métabolisme et pathologies »).

Premièrement, ce corps gras participe au rééquilibrage des apports lipidiques, puisque le ratio *n-6/n-3*, l'apport en ALA, en EPA et en DHA, ainsi que le taux de SFA sont maîtrisés [239, 260, 287, 356]. De plus, ce produit apporte des antioxydants, sous forme de vitamine E (α- et γ-tocophérol entre autres), apport qui a montré chez le rat son utilité dans la prévention de l'oxydation des lipides circulants.

Deuxièmement, le produit alimentaire devrait agir au niveau des critères du syndrome métabolique, en diminuant la concentration en TAGp [110, 166, 167, 171, 174, 311, 343, 400, 411, 439, 461, 462, 464, 490], en augmentant le HDL-cholestérol [110, 122, 174, 311, 343, 369, 411, 461, 462, 464] et éventuellement en diminuant la pression artérielle systolique [110, 127, 311, 341, 400, 490, 502].

Troisièmement, un effet devrait être observé sur le rythme cardiaque, sous forme d'une baisse de la fréquence cardiaque de base, et éventuellement d'une régularisation du rythme avec élimination des petits accidents arythmiques [47, 90-93, 110, 242, 341].

Quatrièmement, une action devrait être visible au niveau des facteurs de coagulation, sous forme d'une diminution de la concentration plasmatique en fibrinogène et en PAI-1 [3, 41, 62, 160, 213, 320, 363, 403, 446, 478, 493, 510].

Et enfin, le produit alimentaire devrait engendrer une diminution du statut inflammatoire, qui serait visible au niveau des cytokines inflammatoires, avec diminution des concentrations en TNF-α, IL-1β, IL-6 et IL-8 [2, 3, 84, 115, 138, 224, 288, 291].

III/ Marqueurs physiologiques

Le design de cette étude clinique ainsi que le choix des paramètres physiologiques à mesurer en fonction des effets escomptés sont issus d'une réunion du comité scientifique de la thèse. Celui-ci comprenait différents experts issus du monde de la recherche scientifique ou médicale. Les marqueurs biologiques à mesurer lors de l'étude, choisis lors de cette rencontre, sont présentés ci-dessous.

Concernant la structure de l'alimentation, il est nécessaire de faire remplir aux sujets des questionnaires alimentaires, ainsi que de les faire suivre par un diététicien de manière à évaluer de façon pertinente leurs apports lipidiques, et ce, à l'aide de questions simples, concernant par exemple la consommation en SFA ou en poisson.

En complément de ces mesures, l'analyse du profil en acides gras des cellules jugales et/ou d'érythrocytes permet d'avoir une image instantanée de la consommation en acides gras des sujets,

puisque le profil membranaire des acides gras, comme l'a montré l'étude chez le rat, est un bon indicateur des apports lipidiques.

Concernant les critères du syndrome métabolique, il est utile de réaliser des prises de sang avec mesure des lipides sanguins (TAGp, HDL- et LDL-cholestérol), ainsi que de l'insuline. L'utilisation d'un MAPA (monitoring ambulatoire de pression artérielle) permet d'évaluer sur 24 heures la pression artérielle et la fréquence cardiaque. Cette technique a deux avantages. D'une part, elle permet de mesurer ces deux paramètres en s'affranchissant de l'effet « blouse blanche », qui augmente artificiellement les mesures effectuées par un médecin dans un environnement hospitalier sous l'effet du stress du patient. D'autre part, la mesure sur 24 heures permet d'évaluer les variations de pression artérielle et de fréquence cardiaque lors de l'alternance effort / repos, et nyctémérale.

Liée au syndrome métabolique, la mesure des taux d'adiponectine, de leptine et d'angiotensinogène, molécules à potentiel hypotenseur semble intéressante. En effet, elle peut donner des informations complémentaires sur l'activité physiologique du tissu adipeux, de par l'analyse de la production d'hormones permettant la communication avec le cerveau [139, 323].

Enfin, la mesure de la concentration plasmatique de fibrinogène et de PAI-1 plasmatiques permet d'évaluer le statut « coagulant » des sujets, tandis que l'analyse de la CRP ultrasensible (C-reactive protein) et de l'IL-6 permet d'évaluer leur statut inflammatoire.

IV/ Design de l'étude

Les critères d'inclusion dans l'étude sont les suivants : des patients de sexe masculin, d'âge compris entre 40 et 60 ans, et en surpoids (IMC compris entre 25 et 29,5). L'élimination volontaire des femmes est principalement due aux perturbations hormonales provoquées par la ménopause, qui survient dans cette tranche d'âge. Le choix de l'âge et de la fourchette d'IMC est motivé par le besoin d'éviter les personnes ayant déjà développé une pathologie cardio-vasculaire, mais également de se concentrer sur des personnes « borderline », en léger risque.

Le besoin de recruter des consommateurs habituels de corps gras situe l'étude dans une région dans laquelle ce type de produit fait partie de l'alimentation « normale ». L'étude serait donc monocentrique (un seul centre d'analyses) du fait de cette exigence géographique.

Le mode de calcul du nombre de patients nécessaires est basé sur l'effet principal escompté de l'étude. Ici, le critère principal est la fréquence cardiaque de base. L'effet espéré est une diminution de 5 battements par minute, sur une moyenne de 70, soit une amélioration de 7%. Le nombre de sujets nécessaire pour qu'un effet de cette amplitude soit significatif est de 30 personnes par groupe. En prenant en compte une marge de sécurité et la présence d'un groupe témoin, ceci conduit au recrutement de 100 à 120 personnes au total.

Le design choisi pour l'étude est le suivant :

- ✓ un mois de mise en route après les recommandations d'un diététicien, de manière à stabiliser le poids des sujets et à vérifier le bon suivi du régime assigné (« run in »),
- ✓ 8 semaines de régime contenant le corps gras test A ou le témoin B,
- ✓ un ou deux mois de retour à l'état basal (phase de « wash out »),
- ✓ 8 semaines de régime avec l'autre corps gras.

Cette organisation en « crossover » induit que chaque sujet soit son propre témoin, ce qui permet de s'affranchir des variations interindividuelles de réponse à un régime alimentaire.

La période de transition entre les deux versants de l'étude est indispensable pour éliminer tout effet éventuel du premier régime, avant de commencer le second.

L'étude nécessite d'être au minimum en simple aveugle pour que les patients ne soient pas informés de la composition du corps gras qu'ils consomment, et ainsi éviter un éventuel effet placebo.

Le produit testé dans l'étude est le corps gras (A) mis au point au cours de la thèse, et le témoin serait un corps gras type St Hubert Oméga3 (B), donc ayant le même taux de SFA. La dose imposée aux

sujets est de 30 g par jour, soit une portion moyenne de corps gras, équivalant à 0,7 g d'EPA+DHA par jour dans le cas du produit test, supplémenté en huile de poisson.

V/ Conclusion

Le but de l'étude est d'évaluer l'impact du corps gras d'intérêt sur la fréquence cardiaque de base, ce critère étant considéré comme le paramètre principal de l'étude. Un chiffre pour illustrer l'importance de ce facteur : 10 battements de cœur supplémentaires par minute augmenteraient le risque d'infarctus de 14% [243].

Outre ce critère, la mission de l'étude est double. D'une part, elle doit prouver la biodisponibilité des acides gras d'intérêt dans les membranes cellulaires (jugales et érythrocytaires), résultats qui sont attendus étant donné les conclusions de l'étude chez le rat. D'autre part, elle doit démontrer que le produit alimentaire montre des effets spécifiques du DHA, comme une diminution de la fréquence cardiaque et de la pression artérielle [127, 311, 341, 400, 490, 502].

Cette volonté de se concentrer sur le DHA est issue des constatations selon lesquelles l'organisme humain parvient à synthétiser de l'EPA à partir de l'ALA, mais très peu de DHA [41, 66-68, 102, 185, 333, 341, 411]. En conséquence, si les effets du DHA sont observés chez les patients, ils pourront être imputés au profil lipidique du produit, et pas uniquement à une conversion *in situ* du précurseur.

Ce *focus* sur les LCPUFA est destiné à différencier le produit alimentaire mis au point, en mettant en avant un effet bénéfique supplémentaire par rapport aux produits concurrents.

G. Conclusions – Perspectives

*« Toute science crée une nouvelle ignorance. »
[H. Michaux]*

CONCLUSIONS - PERSPECTIVES

Le sujet de cette thèse était de mettre au point un corps gras alimentaire type margarine possédant un profil en acides gras susceptible de participer au rééquilibrage des apports lipidiques des français, avec comme cible la prévention des pathologies cardio-vasculaires. Au cours de l'étude, différents verrous technologiques sont apparus concernant la formulation du produit, vecteur des nutriments d'intérêt.

Le premier était un problème de texture, trop souple par rapport à la cible imposée par l'entreprise. Cette problématique a donné lieu à un travail sur la nature des graisses concrètes mises en œuvre et leurs interactions. Il est apparu que ces différentes matières premières ne sont pas toutes compatibles pour établir le réseau cristallin indispensable à la tenue du produit, et que le profil en acides gras global ne peut permettre de prédire le profil de fonte d'une matrice complexe de ce type.

Le second était un problème de flaveur, puisque l'addition d'huile de poisson dans la formule a fortement dégradé les qualités organoleptiques du produit. Il semble que deux réactions différentes soient à l'origine du dégagement des composés volatils désagréables, la peroxydation lipidique, d'une part, et une réaction avec l'eau de type conversion rétro-aldol, d'autre part. Trois pistes d'amélioration ont permis de limiter l'ampleur de ces réactions, aboutissant à un produit acceptable en dégustation pendant une durée de trois semaines. Ainsi, la prévention de l'oxydation par la supplémentation en antioxydants de nature et de dose ajustées, la modification du procédé de fabrication pour incorporer l'huile de poisson dans le produit précristallisé, et l'addition d'un ingrédient d'origine laitière ont été étudiées.

Enfin, une variante de microencapsulation a été mise au point afin d'assurer la vectorisation et la protection de l'huile de poisson et d'allonger la durée de vie du produit. Dérivée de la technologie des liposomes, elle permet d'isoler un composé hydrophobe, constitué ici par l'huile de poisson, et de l'incorporer dans une matrice de même polarité. L'utilisation de ces vésicules dans un produit alimentaire est rendue possible par l'absence de solvant organique dans le procédé de fabrication original mis au point.

Suite à la mise au point de la formulation du produit, la biodisponibilité des nutriments d'intérêt dans cette matrice complexe a été testée et confirmée chez le rat, chez lequel une modification du profil en acides gras des lipides circulants et des membranes cellulaires a été observée. En effet, il est apparu que les acides gras *n-3* présents dans le produit, et en particulier les dérivés à longue chaîne, ont permis le remplacement partiel de l'acide arachidonique par de l'EPA et du DHA, ce qui est susceptible de modifier le profil des métabolites synthétisés, et de l'orienter vers un statut moins favorable au développement des pathologies cardio-vasculaires.

Le déroulement de l'étude et l'analyse des résultats ont mis en lumière certaines limites de ce travail. En effet, l'impact du procédé de fabrication sur la cristallisation des matières grasses et l'établissement du réseau cristallin n'a pas été pris en compte dans l'étude de la texture du produit. De plus, il aurait été intéressant d'utiliser les données de calorimétrie différentielle pour obtenir le profil de fonte des formules en terme de taux de solide afin d'affiner les comparaisons entre les produits et de les situer par rapport à la cible de l'entreprise. L'information aurait ainsi été complémentaire de celle fournie par la pénétrométrie. Enfin, l'impact de l'addition de matière grasse laitière dans la formule et l'influence de l'incorporation de l'huile de poisson en fin de fabrication n'ont pas été étudiés, l'analyse étant concentrée sur la mise au point de la phase concrète du produit, antérieurement à ces modifications dues à l'étude sur la flaveur.

L'étude des composés volatils générés lors du contact entre l'huile de poisson et l'eau aurait mérité une répétition des expériences de lavage afin de préciser l'ampleur du dégagement en fonction de la qualité de l'eau. Concernant le produit fini, l'utilisation d'une autre méthode d'extraction des

molécules volatiles aurait peut-être pu permettre de poursuivre l'analyse en chromatographie en phase gazeuse jusqu'à la fin de l'étude, même si des réserves ont été émises vis-à-vis de ces techniques. Enfin, l'analyse en chromatographie des ingrédients seuls aurait pu fournir une confirmation intéressante des hypothèses concernant l'impact des arômes ou des antioxydants sur le dégagement de certains pics.

Concernant la technologie des liposomes inverses, outre la confirmation de la pertinence de ce vecteur pour protéger la qualité de l'huile de poisson, d'une part, et la flaveur du produit, d'autre part, il semble que l'utilisation d'un plan d'expérience pour l'optimisation des paramètres de fabrication aurait été utile, de par la puissance et la précision de cet outil.

Dernière partie du travail, l'étude de la biodisponibilité chez le rat a montré des limites.

En effet, il aurait été intéressant de pouvoir expliquer la différence de poids observée chez les animaux du test. Une des pistes envisageables aurait pu être de mesurer la concentration en marqueurs d'adiposité, comme la leptine, afin de vérifier l'hypothèse d'un développement moindre du tissu adipeux chez les rats du groupe test.

Deuxième point, l'analyse du profil en acides gras du tissu adipeux aurait pu être divisée en deux branches, l'une consacrée à l'étude de la membrane des adipocytes, et l'autre au contenu lipidique de ces cellules. Ceci aurait pu être effectué par séparation des phospholipides et des triacylglycérols en chromatographie sur couche mince, puis analyse des deux classes de lipides séparément. Cette distinction aurait probablement confirmé que l'augmentation de la concentration des acides gras *n-3* à longue chaîne est due à un enrichissement de la membrane des adipocytes, et non à une mise en réserve de ces composés hautement insaturés.

Troisième point, il aurait été intéressant de doubler l'évaluation de l'oxydation des lipides circulants par une autre méthode afin de confirmer les résultats obtenus avec le test à l'acide thiobarbiturique (oxydabilité des LDL *in vitro*, par exemple).

Enfin, dernier point, la mesure de la concentration plasmatique en α -tocophérol aurait pu également concerner les autres formes de la vitamine E. Ceci aurait permis d'évaluer l'activité vitaminique E globale du plasma des animaux, ce qui aurait peut-être pu confirmer l'hypothèse selon laquelle l'activité antioxydante du plasma n'est pas réellement diminuée chez ces animaux, mais que le ratio des différentes formes de la vitamine E a évolué suite au régime test, avec notamment une augmentation du γ -tocophérol.

Malgré ces limites, le travail effectué a permis de répondre d'une manière globale à la problématique de la thèse. Cependant, des interrogations subsistent, et chacune des quatre études menées offre des possibilités d'approfondissement.

En effet, concernant la texture du produit, il serait intéressant d'étudier l'établissement du réseau cristallin selon la matrice utilisée. L'impact du procédé de fabrication sur la texture, en particulier l'impact du travail mécanique lors de la cristallisation, pourrait également être un sujet de travail.

Concernant la flaveur du produit, l'identification des composés générés devrait être le premier point de la suite du travail. Il semble également intéressant d'approfondir l'étude des deux réactions à l'origine du développement des composés volatils indésirables pour confirmer l'hypothèse d'une conversion rétro-aldol des composés secondaires de l'oxydation des lipides. L'identification de la fraction du lait qui permet de diminuer le dégagement des molécules volatiles est un autre axe envisageable, ainsi que l'étude des mécanismes impliqués, que ce soit une interaction avec ces composés ou une inhibition des réactions.

Concernant la technologie de microencapsulation, la caractérisation des liposomes inverses et de leur procédé de fabrication doit être poursuivie, ainsi que l'étude approfondie des bicouches phospholipidiques inversées et des mécanismes permettant la formation des vésicules lors de l'agitation. D'autre part, les différentes classes de phospholipides pourraient être testées en tant qu'encapsulant, ainsi que l'association de plusieurs d'entre elles.

Dernier thème abordé au cours de la thèse, deux résultats observés dans l'étude de biodisponibilité chez le rat mériteraient un approfondissement. Ce sont l'estérification préférentielle de l'EPA sur le cholestérol lors de la synthèse des esters de cholestérol par la lécithine-cholestérol acyl transférase,

d'une part, et l'impact du profil lipidique du régime sur la croissance des animaux et le développement de leur tissu adipeux, d'autre part.

Afin de répondre à la problématique posée au début de la thèse, la réalisation de l'étude clinique dont les paramètres ont été présentés est indispensable. En effet, il est nécessaire que les résultats de l'étude de biodisponibilité soient confirmés chez l'homme, et seul un impact sur les marqueurs physiologiques choisis pourra prouver que ce corps gras est un vecteur intéressant de nutriments d'intérêt, en particulier dans l'optique de prévention des maladies cardio-vasculaires.

La poursuite du travail dans le cadre industriel ouvre également des possibilités d'approfondissement dans les différents domaines abordés au cours de la thèse. Ainsi, l'interestérification pourrait être envisagée comme moyen de diminuer le taux d'acides gras saturés du produit, tout en le maintenant dans la cible de texture de l'entreprise.

Concernant la technologie des liposomes inverses, il semble intéressant de mettre au point un test de perméabilité, afin de s'assurer du maintien de la protection de l'huile de poisson dans le temps, et d'évaluer le gain organoleptique engendré au cours de la vie du produit. La mise au point de la formulation de la membrane des vésicules est également une piste à poursuivre, en privilégiant la piste des texturants, ainsi que l'association de plusieurs molécules.

La mise au point d'un procédé de fabrication des liposomes inverses à l'échelle pilote, puis industrielle, figure parmi les perspectives les plus intéressantes de ce travail. Elle permettra d'envisager la production en usine du corps gras alimentaire mis au point, ainsi que sa mise sur le marché. Le procédé actuel de fabrication des corps gras dans l'entreprise devra être modifié, afin de permettre l'incorporation de ces vésicules en fin de ligne, après les étapes de refroidissement et de malaxage.

Sous cette forme, il pourra être envisagé de tester à nouveau la biodisponibilité des acides gras d'intérêt chez le rat. Il est en effet possible que cette vectorisation induise une modification de la disponibilité des nutriments, ce qui permettrait, en cas d'amélioration, d'envisager l'utilisation de cette technique pour apporter d'autres principes actifs, moins bien absorbés sous forme libre.

Dans le marché actuel de l'agroalimentaire, la mise au point des produits n'est pas la seule difficulté, la communication et la crédibilité étant tout aussi importantes pour permettre le succès commercial d'une formule.

La présentation des différentes générations de corps gras « non beurre » a montré que l'enrichissement en acides gras polyinsaturés à longue chaîne concerne la troisième génération, et que ce type de produits manque dans la gamme de l'entreprise St Hubert. La communication, axée sur la prévention d'une pathologie, devra permettre une distinction claire avec les produits concurrents, dont la dose d'EPA et de DHA est largement inférieure. L'affichage d'une nouvelle allégation santé sera indispensable, ce qui implique l'acceptation par l'AFSSA d'un dossier scientifique étayé. En effet, la nouvelle réglementation européenne prévoit une liste positive d'allégations utilisables, l'emploi de toute autre phrase nécessitant le dépôt d'un dossier de demande [419].

Outre ce point réglementaire, plusieurs réserves existent concernant l'acheteur final, qui devront être prises en compte pour mettre au point le discours associé à ce produit.

Comme abordé dans l'introduction, les consommateurs deviennent de plus en plus méfiants vis-à-vis des messages liés à la fonctionnalité positive d'un aliment. Noyés sous les informations de toute sorte, certains tendent même à rejeter ces produits. En réponse, certaines entreprises axent maintenant leur communication sur la « non fonctionnalité », ce qui est visible dans certaines publicités, dans lesquelles l'accent est mis sur le goût, tout en dénonçant les messages nutritionnels des autres produits (« Ce yaourt ne te rendra ni plus beau, ni plus intelligent, il est juste bon », yaourt à boire Velouté Fruix XL, de Danone). La seconde réaction observée est le retour à la « cuisine de grand-mère », avec des aliments simples et sans additif (La Laitière, Bonne Maman). Un spot pour un fromage illustre ces tendances en mettant en scène un consommateur qui, perdu dans les messages nutritionnels, n'achète que ce fromage pour la simplicité de sa liste d'ingrédients (« Non, il n'y a pas d'alpha 12 dans cette huile-là », camembert Président, Lactalis).

Si la quantité de messages perturbe les consommateurs, il semble que la force relative des allégations sur un même sujet ne soit pas plus évidente. En effet, des tests ont montré que pour un consommateur la différence est mince, voire inexistante, entre les allégations « participe au bon

fonctionnement du système cardio-vasculaire » et « permet de diminuer le développement des maladies cardio-vasculaires ».

Au vu de ces remarques, il semble nécessaire que le produit mis au point au cours de la thèse soit porté par un discours clair, crédible, qui permette de le différencier des produits existants. Néanmoins, le message ne doit pas être alarmiste ou moralisateur, puisque les acheteurs attendent d'un aliment qu'il reste un aliment, et non qu'il devienne un médicament.

D'un point de vue plus personnel enfin, je voudrais conclure ce travail par les quelques remarques suivantes :

Faire une thèse sous convention CIFRE est une expérience très enrichissante. En effet, il est très formateur d'être au contact d'un produit alimentaire réel, d'un procédé de fabrication, et des contraintes du monde industriel. Le fait de chercher à répondre à une problématique telle que celle-ci, dont le but est de déboucher sur la mise sur le marché d'un produit alimentaire ou sur la mise en place d'une nouvelle technologie, donne au travail une dimension concrète, différente de la recherche scientifique pure, ce qui est très motivant.

Quelquefois, avoir de tels impératifs peut être frustrant d'un point de vue scientifique pur, car le respect des délais et la nécessité de produire des résultats rapidement utilisables par l'entreprise ne permet pas forcément d'aller au bout de la démarche de recherche... La compréhension fine des phénomènes mis en évidence n'est pas toujours possible, et la frustration peut venir du sentiment d'effleurer des découvertes intéressantes sans pouvoir les finaliser jusqu'à satisfaction de l'esprit.

Malgré tout, la grande variété des thèmes de recherche abordés au cours d'une thèse CIFRE, qui permet souvent d'étudier une problématique de manière globale, offre la possibilité de réaliser une étude multidisciplinaire très formatrice. Les points de science fondamentale laissés en suspens sont autant de futurs axes de recherche pour le laboratoire, et pourront fournir autant de thèmes de recherche intéressants pour de futurs doctorants.

H. Références bibliographiques

REFERENCES

- [1] Abd El-Aal M.H., Khalil M.K.M., Rahma E.H. - Apricot kernel oil : characterization, chemical composition and utilization in some baked products - *Food Chemistry*, 1986; 19: 287-98.
- [2] Abeywardena M.Y., Head R.J. - Long chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function - *Cardiovascular Research*, 2001; 52: 361-71.
- [3] Abeywardena M.Y., McLennan P.L., Charnock J.S. - Differential effects of dietary fish oil on myocardial prostaglandin I₂ and thromboxane A₂ production - *The American Journal of Physiology*, 1992; 260: H379-85.
- [4] Abou-Gharbia H.A., Shehata A.A.Y., Shahidi F. - Effect of processing on oxidative stability and lipid classes of sesame oil - *Food Research International*, 2000; 33: 331-40.
- [5] Ackman R.G. - Fatty acids - in Ackman R.G. (ed) - *Marine Biogenic Lipids, Fats and Oils* - 1989, CRC Press Boca, Raton, FL, pp. 103-37.
- [6] AFNOR - Corps gras d'origine animale et végétale. Détermination de l'indice de peroxyde - Juin 2005, AFNOR, Paris, Norme française NF EN ISO 3960.
- [7] AFNOR - Corps gras d'origine animale et végétale. Détermination des teneurs en tocophérols et en tocotriénols par chromatographie en phase liquide à haute performance - Octobre 2006, AFNOR, Paris, Norme française NF ISO 9936.
- [8] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments - Acides gras de la famille oméga 3 et système cardiovasculaire : intérêt nutritionnel et allégations - 2004, Table ronde « Oméga 3 et santé », Entretiens de Bichat, Paris, France, pp. 1-12.
- [9] Agnihotri S.A., Mallikarjuna N.N., Aminabhavi T.M. - Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery - *Journal of Controlled Release*, 2004; 100: 5-28.
- [10] Ailhaud G., Guesnet P. - Fatty acid composition of fats is an early determinant of childhood obesity : a short review and an opinion - *Obesity Reviews*, 2004; 5(1): 21-6.
- [11] Ailhaud G., Massiera F., Weill P., Legrand P., Alessandri J.M., Guesnet P. - Temporal changes in dietary fats : role of *n*-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity - *Progress in Lipid Research*, 2006; 45(3): 203-36.
- [12] Aizawa Y., Watanabe H., Aizawa Y., Fukunaga H., Watanabe S. - Excess accumulation of risk factors in ischemic heart disease - *Japan Heart Journal*, 2004; 45: 733-8.
- [13] Ajayi I.A., Dawodu F.A., Adebowale K.O., Oderinde R.A. - Chemical composition of *Pentaclethra macrophylla* seeds and seed oil grown in Nigeria - *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 2002; 79: 183-5.
- [14] Alais C., Linden G. - Lait et produits laitiers - in Alais C., Linden G. (ed) - *Biochimie Alimentaire* - 1991, 2nd edition, Masson, Paris, pp. 160-188.
- [15] Alais C., Linden G. - Lipides - in Alais C., Linden G. (ed) - *Biochimie Alimentaire* - 1991, 2nd edition, Masson, Paris, pp. 55-73.
- [16] Alasalvar C., Quantick P.C., Grigor J.M. - Aroma compounds of fresh and stored mackerel - in Shahidi F., Cadwallader K.R. (eds) - *Flavor and lipid chemistry of seafoods* - 1997, ACS Symposium Series 674, Washington, pp. 39-54.
- [17] Alasalvar C., Shahidi F., Ohshima T., Wanasundara U., Yurttas H.C., Liyanapathirana C.M., Rodrigues F.B. - Turkish Tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). 2. Lipid characteristics and oxidative stability - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003; 51: 3797-805.
- [18] Albert C.M., Campos H., Stampfer M.J., Ridker P.M., Manson J.E., Willett W.C., Ma J. - Blood levels of long chain *n*-3 fatty acids and the risk of sudden death - *The New England Journal of Medicine*, 2002; 346: 1113-8.
- [19] Albert C.M., Hennekens C.H., O'Donnell C.J., Ajani U.A., Carey V.J., Willett W.C., Ruskin J.N., Manson J.E. - Fish consumption and risk of sudden cardiac death - *JAMA*, 1998; 279(1): 23-8.
- [20] Alpaslan M., Boydak E., Hayta M., Gerçek S., Simsek M. - Effect of row space and irrigation on seed composition of Turkish sesame (*Sesamum indicum* L.) - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001; 78(9): 933-5.

- [21] Alsarra I.A., Neau S.H., Howard M.A. - Effects of preparative parameters on the properties of chitosan hydrogel beads containing *Candida rugosa* lipase - *Biomaterials*, 2004; 25: 2645-55.
- [22] Amate L., Gil A., Ramirez M. - Dietary long chain polyunsaturated fatty acids from different sources affect fat and fatty acid excretions in rats - *The Journal of Nutrition*, 2001; 131: 3216-21.
- [23] Amate L., Gil A., Ramirez M. - Feeding infant piglets formula with long chain polyunsaturated fatty acids as triacylglycerols or phospholipids influences the distribution of these fatty acids in plasma lipoprotein fractions - *The Journal of Nutrition*, 2001; 131: 1250-5.
- [24] Amate L., Ramirez M., Gil A. - Positional analysis of triglycerides and phospholipids rich in long chain polyunsaturated fatty acids - *Lipids*, 1999; 34(8): 865-71.
- [25] Anand S.S., Yi Q., Gerstein H., Lonn E., Jacobs R., Vuksan V., Teo K., Davis B., Montague P., Yusuf S. - Relationship of metabolic syndrome and fibrinolytic dysfunction to cardiovascular disease - *Circulation*, 2003; 108: 420-5.
- [26] Anker M., Berntsen J., Hermansson A.M., Stading M. - Improved water vapor barrier of whey protein films by addition of an acetylated monoglyceride - *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2002; 3: 81-92.
- [27] Anwar F., Bhangar M.I., Nasir M.K.A., Ismail S. - Analytical characterization of *Salicornia bigelovii* seed oil cultivated in Pakistan - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50: 4210-4.
- [28] Atta M.B. - Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile - *Food Chemistry*, 2003; 83: 63-8.
- [29] Ayerza R. - Oil content and fatty acid composition of chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1995; 72(9): 1079-81.
- [30] Baer D.J., Judd J.T., Kris-Etherton P.M., Zhao G., Emken E.A. - Stearic acid absorption and its metabolizable energy value are minimally lower than those of other fatty acids in healthy men fed mixed diets - *The Journal of Nutrition*, 2003; 133: 4129-34.
- [31] Ballantyne C.M., Herd J.A., Stein E.A., Ferlic L.L., Dunn J.K., Gotto A.M., Marian A.J. - Apolipoprotein E genotypes and response of plasma lipids and progression-regression of coronary atherosclerosis to lipid-lowering drug therapy - *Journal of the American College of Cardiology*, 2000; 36(5): 1572-8.
- [32] Bandelier J., Chunhieng T., Olle M., Montet D. - Original study of the biochemical and oil composition of the Cambodia nut *Iringia malayana* - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50: 1478-82.
- [33] Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. - Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids - *Journal of Molecular Biology*, 1965; 13(1): 238-52.
- [34] Bardet J. - Infarctus du myocarde - in Godeau P. (ed) - *Traité de Médecine*, Tome 1 - 2004, 4th edition, Flammarion Médecine Sciences, Paris, 3208 p.
- [35] Barghash N.A., Elewa S.M., Hamdi E.A., Barghash A.A., El Dine R. - Role of plasma homocysteine and lipoprotein(a) in coronary artery disease - *British Journal of Biomedical Science*, 2004; 61(2): 78-83.
- [36] Barnadas-Rodriguez R., Sabes M. - Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer - *International Journal of Pharmaceutics*, 2001; 213: 175-86.
- [37] Bartkowiak A. - Effect of the ionic strength on properties of binary alginate-oligochitosan microcapsules - *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002; 204: 117-24.
- [38] Bartkowiak A., Hunkeler D. - Carragenan-oligochitosan microcapsules : Optimization of the formation process - *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 2001; 21: 285-98.
- [39] Bayer AG - Injizierbare liposomale Arzneizubereitungen - Hamann H.J., Serno P., Herboth M., Kurka P., EU 0 700 679, 1999.
- [40] Bayer Aktiengesellschaft - Injectable liposomal pharmaceutical preparations - Hamann H.J., Serno P., Herboth M., Kurka P., US 5 653 998, 1997.
- [41] Benistant C., Achard F., Marcelon G., Lagarde M. - Platelet inhibitory functions of aortic endothelial cells. Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids - *Atherosclerosis*, 1993; 104: 27-35.
- [42] Bennett Clark S., Derksen A., Small D.M. - Plasma clearance of emulsified triolein in conscious rats : effects of phosphatidylcholine species, cholesterol content and emulsion surface physical state - *Experimental Physiology*, 1991; 76: 39-52.
- [43] Bereau D., Benjelloun-Mlayah B., Banoub J., Bravo R. - FA and unsaponifiable composition of five Amazonian palm kernel oils - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2003; 80(1): 49-53.

- [44] Berger J., Reist M., Mayer J.M., Felt O., Gurny R. - Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications - *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2004; 57: 35-52.
- [45] Betageri G.V., Kulkarni S.B. - Preparation of liposomes - in Arshady R. (ed) - *Microspheres, Microcapsules & Liposomes. Volume 1 : Preparation & Chemical Applications* - 1999, Citus Book, London, pp. 489-522.
- [46] Bhattacharya A., Sun D., Rahman M., Fernandes G. - Different ratios of eicosapentaenoic and docosahexaenoic ω 3 fatty acids in commercial fish oils differentially alter pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages from C57BL/6 female mice - *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2007; 18: 23-30.
- [47] Billman G.E., Kang J.X., Leaf A. - Prevention of ischemia-induced cardiac sudden death by *n*-3 polyunsaturated fatty acids in dogs - *Lipids*, 1997; 32(11): 1161-8.
- [48] Billman G.E., Kang J.X., Leaf A. - Prevention of sudden cardiac death by dietary pure ω 3 polyunsaturated fatty acids in dogs - *Circulation*, 1999; 99: 2452-7.
- [49] Boden W.E. - High-density lipoprotein cholesterol as an independent risk factor in cardiovascular disease : assessing the data from Framingham to the Veterans Affairs high-density lipoprotein intervention trial - *The American Journal of Cardiology*, 2000; 86(suppl): 19L-22L.
- [50] Body D.R. - The lipid composition of adipose tissue - *Progress in Lipid Research*, 1988; 27(1): 39-60.
- [51] Bonanome A., Grundy S.M. - Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels - *The New England Journal of Medicine*, 1988; 318: 1244-8.
- [52] Bonora E., Formentini G., Calcaterra F., Lombardi S., Marini F., Zenari L., Saggiani F., Poli M., Perbellini S., Raffaelli A., Cacciatori V., Santi L., Targher G., Bonadonna R., Muggeo M. - HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects - *Diabetes Care*, 2002; 25(7): 1135-41.
- [53] Boskou D. - Olive oil - in Gunstone F.D. (ed) - *Vegetable Oils in Food Technology, Composition, Properties and Uses* - 2002, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 244-77.
- [54] Bottino N.R., Vandenburg G.A., Reiser R. - Resistance of certain long chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis - *Lipids*, 1967; 2: 489-93.
- [55] Bouziane M., Belleville J., Prost J. - Hepatic storage and transport of *n*-3 and *n*-6 polyunsaturated fatty acids by very-low-density lipoproteins in growing rats fed low- or adequate-protein diets with sunflower, soybean, coconut, and salmon oils - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1997; 65(3): 750-60.
- [56] Bouziane M., Prost J., Belleville J. - Changes in serum and lipoprotein fatty acids of growing rats fed protein-deficient diets with low or adequate linolenic acid concentrations - *The Journal of Nutrition*, 1992; 122: 2037-46.
- [57] Brenna J.T. - Efficiency of conversion of α -linolenic acid to long chain *n*-3 fatty acids in man - *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2002; 5: 127-32.
- [58] Brockerhoff H., Ackman R.G., Hoyle R.J. - Specific distribution of fatty acids in marine lipids - *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1963; 100: 9-12.
- [59] Brody T. - Digestion and Absorption - in Brody T. (ed) - *Nutritional Biochemistry* - 1999, 2nd edition, Academic Press, San Diego, pp. 57-132.
- [60] Brody T. - Lipids - in Brody T. (ed) - *Nutritional Biochemistry* - 1999, 2nd edition, Academic Press, San Diego, pp. 311-78.
- [61] Brody T. - Vitamins - in Brody T. (ed) - *Nutritional Biochemistry* - 1999, 2nd edition, Academic Press, San Diego, pp. 491-692.
- [62] Brown A.J., Roberts D.C.K. - Fish and fish oil intake : effect on haematological variables related to cardiovascular disease - *Thrombosis Research*, 1991; 64: 169-78.
- [63] Bruni R., Medici A., Guerrini A., Scalia S., Poli F., Muzzoli M., Sacchetti G. - Wild *Amaranthus caudatus* seed oil, a nutraceutical resource from Ecuadorian flora - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49: 5455-60.
- [64] Buche M.C. - Note d'information n°2005-14. Les allégations nutritionnelles et de santé relatives aux propriétés des acides gras Oméga 3 - 2005, Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, France, pp. 1-8.
- [65] Burdge G.C. - Metabolism of α -linolenic acid in humans - *Leukotrienes, Prostaglandins and Essential Fatty Acids*, 2006; 75: 161-8.

- [66] Burdge G.C., Finnegan Y.E., Minihane A.M., Williams C.M., Wootton S.A. - Effect of altered dietary *n*-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [¹³C]α-linolenic acid to longer chain fatty acids and partitioning towards β-oxidation in older men - *British Journal of Nutrition*, 2003; 90: 311-21.
- [67] Burdge G.C., Jones A.E., Wootton S.A. - Eicosapentaenoic and docosapentaenoic acids are the principal products of α-linolenic acid metabolism in young men - *British Journal of Nutrition*, 2002; 88: 355-63.
- [68] Burdge G.C., Wootton S.A. - Conversion of α-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women - *British Journal of Nutrition*, 2002; 88: 411-20.
- [69] Burr M.L., Gilbert J.F., Holliday R.M., Elwood P.C., Fehily A.M., Rogers S., Sweetnam P.M., Deadman N.M. - Effects of changes in fat, fish and fiber intakes on death and myocardial reinfarction : diet and reinfarction trial (DART) - *The Lancet*, 1989; 2(8666): 757-61.
- [70] Bustos R., Romo L., Yanez K., Diaz G., Romo C. - Oxidative stability of carotenoid pigments and polyunsaturated fatty acids in microparticulate diets containing krill oil for nutrition of marine fish larvae - *Journal of Food Engineering*, 2003; 56: 289-93.
- [71] Caballero B. - Fats - in Caballero B. (ed) - *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Volume 4 - 2003, Academic Press, Elsevier Science, London, pp. 2261-96.
- [72] Caballero B. - Fatty acids - in Caballero B. (ed) - *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. Volume 4 - 2003, Academic Press, Elsevier Science, London, pp. 2297-330.
- [73] Caballero M.J., Obach A., Rosenlund G., Montero D., Gisvold M., Izquierdo M.S. - Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* - *Aquaculture*, 2002; 214: 253-71.
- [74] Cahu C., Salen P., de Lorgeril M. - Farmed and wild fish in the prevention of cardiovascular diseases : Assessing possible differences in lipid nutritional values - *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2004; 14(1): 34-41.
- [75] Canapi E.C., Agustin Y.T.V., Moro E.A., Pedrosa E. Jr, Bendano M.L.J. - Coconut oil - in Hui Y.D. (ed) - *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. Edible Oil and Fat Products : Oil and Oilseeds - 1996, 5th edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 97-124.
- [76] Cao X., Ito Y. - Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography - *Journal of Chromatography*, 2003; 1021: 117-24.
- [77] Cargill Incorporated - Phospholipid-based removal of sterols from fats and oils - Kodali D.R., WO 98/33875, 1998.
- [78] Cargill Incorporated - Removal of sterols from fats and oils - Kodali D.R., US 6 303 803, 2001.
- [79] Carlier H., Bernard A., Caselli C. - Digestion and absorption of polyunsaturated fatty acids - *Reproduction, Nutrition, Development*, 1991; 31: 475-500.
- [80] Carnielli V.P., Verlato G., Pederzini F., Luijendijk I., Boerlage A., Pedrotti D., Sauer P.J.J. - Intestinal absorption of long chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1998; 67: 97-103.
- [81] Carriere F., Renou C., Lopez V., de Caro J., Ferrato F., Lengsfeld H., de Caro A., Laugier R., Verger R. - The specific activities of human digestive lipases measured from the *in vivo* and *in vitro* lipolysis of test meals - *Gastroenterology*, 2000; 119(4): 949-60.
- [82] Cascone M.G., Maltinti S. - Hydrogels based on chitosan and dextran as potential drug delivery systems - *Journal of Material Science : Materials in Medicine*, 1999; 10: 301-7.
- [83] Cascone M.G., Maltinti S., Barbani N., Laus M. - Effect of chitosan and dextran on the properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels - *Journal of Material Science : Materials in Medicine*, 1999; 10: 431-5.
- [84] Caughey G.E., Mantzioris E., Gibson R.A., Cleland L.G., James M.J. - The effect on human tumor necrosis factor α and interleukin 1 β production of diets enriched in *n*-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1996; 63(1): 116-22.
- [85] Cejas J.R., Almansa E., Tejera N., Jerez S., Bolanos A., Lorenzo A. - Effect of dietary supplementation with shrimp on skin pigmentation and lipid composition of red porgy (*Pagrus pagrus*) alevins - *Aquaculture*, 2003; 218: 457-69.
- [86] Chan L.W., Lim L.T., Heng P.W.S. - Microencapsulation of oils using sodium alginate - *Journal of Microencapsulation*, 2000; 17(6): 757-66.
- [87] Chandy T., Rao G.H.R., Wilson R.F., Das G.S. - Delivery of LMW heparin via surface coated chitosan/PEG-alginate microspheres prevents thrombosis - *Drug Delivery*, 2002; 9(2): 87-96.

- [88] Cheon S.H., Huh M.H., Lee Y.B., Park J.S., Sohn H.S., Chung C.W. - Effect of dietary linoleate/ α -linolenate balance on the brain lipid composition, reproductive outcome and behavior of rats during their prenatal and postnatal development - *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000; 64(11): 2290-7.
- [89] Chernik G.G. - Phase equilibria in phospholipid-water systems - *Advances in Colloid and Interface Science*, 1995, 61: 65-129.
- [90] Christensen J.H., Christensen M.S., Dyerberg J., Schmidt E.B. - Heart rate variability and fatty acid content of blood cell membranes : a dose-response study with *n-3* fatty acids - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999; 70: 331-7.
- [91] Christensen J.H., Gustenhoff P., Korup E., Aaroe J., Toft E., Moller T., Rasmussen K., Dyerberg J. - Effect of fish oil on heart rate variability in survivors of myocardial infarction : a double blind randomised controlled trial - *BMJ*, 1996; 312: 677-8.
- [92] Christensen J.H., Korup E., Aaroe J., Toft E., Moller J., Rasmussen J., Schmidt E.B. - Fish consumption, *n-3* fatty acids in cell membranes, and heart rate variability in survivors of myocardial infarction with left ventricular dysfunction - *The American Journal of Cardiology*, 1997; 79: 1670-3.
- [93] Christensen J.H., Skou H.A., Fog L., Hansen V.E., Vesterlund T., Dyerberg J., Toft E., Schmidt E.B. - Marine *n-3* fatty acids, wine intake, and heart rate variability in patients referred for coronary angiography - *Circulation*, 2001; 103: 651-7.
- [94] Christensen M.S., Hoy C.E., Becker C.C., Redgrave T.G. - Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids : dependence on intramolecular triacylglycerol structure - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1995; 61: 56-61.
- [95] Christensen M.S., Mortimer B.C., Hoy C.E., Redgrave T.G. - Clearance of chylomicrons following fish oil and seal oil feeding - *Nutrition Research*, 1995; 15(3): 359-68.
- [96] Christopoulou E., Lazaraki M., Komaitis M., Kaselimis K. - Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils - *Food Chemistry*, 2004; 84: 463-74.
- [97] Chung C.H., Yee Y.J., Kim D.H., Kim H.K., Chung D.S. - Changes of lipid, protein, RNA and fatty acid composition in developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds - *Plant Science*, 1995; 109: 237-43.
- [98] Cillard J., Cillard P. - Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations - *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 2006; 13(1): 24-9.
- [99] Clarke R., Frost C., Collins R., Appleby P., Peto R. - Dietary lipids and blood cholesterol : quantitative meta-analysis of metabolic ward studies - *BMJ*, 1997; 314: 112-7.
- [100] Coates W., Ayerza R. - Commercial production of chia in north-western Argentina - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998; 75(10): 1417-20.
- [101] Collet-Ribbing C. - La santé des français et leurs consommations alimentaires - in Martin A. (ed) - *Apports Nutritionnels Conseillés pour la Population Française* - 2001, 3rd edition, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 397-432.
- [102] Combe N., Delplanque B., Tanguy S., Boue-Vaysse C., Mendy F., Le Roy B., Fenart E. - Composition en acide α -linoléique des esters de cholestérol plasmatiques : un marqueur de consommation chez l'homme - *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 2002; 9(4): 245-8.
- [103] Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique de France - NOR : MESP9830253V. Avis du 14 avril 1998 du Conseil supérieur d'hygiène publique de France relatif à l'emploi de chitosan, fibre extraite de la carapace des crevettes et des crabes en alimentation humaine (section de l'alimentation et de la nutrition) - 1998, Direction Générale de la Santé, France, 1 p.
- [104] Conseil Supérieur de l'Hygiène Publique de France - NOR : MESP9830614V. Avis du 7 juillet 1998 du Conseil supérieur d'hygiène publique de France relatif à l'emploi d'huile de perilla en alimentation humaine (section de l'alimentation et de la nutrition) - 1998, Direction Générale de la Santé, France, 1 p.
- [105] Cossut J., Defrenne B., Desmedt C., Ferroul S., Garnet S., Humbert S., Roelstraete L., Vanuxeem M., Vidal D. - *Les Corps Gras : entre Tradition et Modernité* - 2002, Rapport de DESS, Institut Agro-Alimentaire de Lille, 111 p.
- [106] Cullen P. - Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor - *The American Journal of Cardiology*, 2000; 86: 943-9.
- [107] Cumming A.M., Robertson F.W. - Polymorphism at the apoprotein-E locus in relation to risk of coronary disease - *Clinical Genetics*, 1984; 25(4): 310-3.

- [108] Dabadie H., Peuchant E., Bernard M., LeRuyet P., Mendy F. - Moderate intake of myristic acid in *sn*-2 position has beneficial lipidic effects and enhances DHA of cholesteryl esters in an interventional study - *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2005; 16: 375-82.
- [109] Dagenais G.R., Yi Q., Mann J.F.E., Bosch J., Pogue J., Yusuf S. - Prognostic impact of body weight and abdominal obesity in women and men with cardiovascular disease - *American Heart Journal*, 2005; 149: 54-60.
- [110] Dallongeville J., Yarnell J., Ducimetiere P., Arveiler D., Ferrieres J., Montaye M., Luc G., Evans A., Bingham A., Hass B., Ruidavets J.B., Amouyel P. - Fish consumption is associated with lower heart rates - *Circulation*, 2003; 108: 820-5.
- [111] Das U.N. - The Brain-lipid-heart connection - *Nutrition*, 2001; 17(3): 260-3.
- [112] Daviglus M.L., Stamler J., Orenca A.J., Dyer A.R., Liu K., Greenland P., Walsh M.K., Morris D., Shekelle R.B. - Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction - *The New England Journal of Medicine*, 1997; 336(15): 1046-53.
- [113] de Backer G., Ambrosioni E., Borch-Johnsen K., Brotons C., Cifkova R., Dallongeville J., Ebrahim S., Faergeman O., Graham I., Mancia G., Cats V.M., Orth-Gomer K., Perk J., Pyorala K., Rodicio J.L., Sans S., Sansoy V., Sechtem U., Silber S., Thomsen T., Wood D. - European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts) - *Atherosclerosis*, 2004; 173: 381-91.
- [114] de Caterina R., Bernini W., Carluccio M.A., Liao J.K., Libby P. - Structural requirements for inhibition of cytokine-induced endothelial activation by unsaturated fatty acids - *Journal of Lipid Research*, 1998; 39: 1062-70.
- [115] de Caterina R., Cybulski M.I., Clinton S.K., Gimbrone M.A. Jr, Libby P. - The ω 3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells - *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1994; 14: 1829-36.
- [116] de Caterina R., Liao J.K., Libby P. - Fatty acid modulation of endothelial activation - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 71(suppl): 213S-23S.
- [117] de Lorgeril M., Salen P., Martin J.L., Monjaud I., Delaye J., Mamelle N. - Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction - *Circulation*, 1999; 99: 779-85.
- [118] de Melo M.L.S., Narain N., Bora P.S. - Characterization of some nutritional constituents of melon (*Cucumis melo* hybrid AF-522) seeds - *Food Chemistry*, 2000; 68: 411-4.
- [119] Dehove R.A., Soroste A., Yedikardachian C. - Additifs alimentaires : antioxygènes, conservateurs, émulsifiants, épaississants, divers - in Dehove R.A., Soroste A., Yedikardachian C. - Lamy Dehove. Réglementation des Produits, Qualité, Répression des Fraudes - 2006, Lamy S.A., étude 254-60.
- [120] Dehove R.A., Soroste A., Yedikardachian C. - Additifs nutritionnels - in Dehove R.A., Soroste A., Yedikardachian C. - Lamy Dehove. Réglementation des Produits, Qualité, Répression des Fraudes - 2006, Lamy S.A., étude 250-200-35.
- [121] Dehove R.A., Soroste A., Yedikardachian C. - Denrées alimentaires animales et d'origine animale - in Dehove R.A., Soroste A., Yedikardachian C. - Lamy Dehove. Réglementation des Produits, Qualité, Répression des Fraudes - 2006, Lamy S.A., étude 364-5.
- [122] Demke D.M., Peters G.R., Linet O.I., Metzler C.M., Klott K.A. - Effects of a fish oil concentrate in patients with hypercholesterolemia - *Atherosclerosis*, 1988; 70(1-2): 73-80.
- [123] Deshpande S.S., Deshpande U.S., Salunkhe D.K. - Sesame oil - in Hui Y.D. (ed) - *Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Edible Oil and Fat Products: Oil and Oilseeds* - 1996, 5th edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 457-96.
- [124] Despres J.P., Lemieux I., Dagenais G.R., Cantin B., Lamarche B. - HDL-cholesterol as a marker of coronary heart disease risk : the Quebec cardiovascular study - *Atherosclerosis*, 2000; 153: 263-72.
- [125] Destailats F., Jean-Denis J.B., Arul J., Wolff R.L., Angers P. - FA composition and regiospecific analysis of *Acer saccharum* (sugar maple tree) and *Acer saccharinum* (silver maple tree) seed oils - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2002; 79(11): 1091-4.
- [126] Diaz-Rojas E.I., Pacheco-Aguilar R., Lizardi J., Arguelles-Monal W., Valdez M.A., Rinaudo M., Goycoolea F.M. - Linseed pectin : gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil - *Food Hydrocolloids*, 2004; 18: 293-304.

- [127] Dokholyan R.S., Albert C.M., Appel L.J., Cook N.R., Whelton P.K., Hennekens C.H. - A trial of ω -3 fatty acids for prevention of hypertension - *The American Journal of Cardiology*, 2004; 93: 1041-3.
- [128] Domanski M., Proschan M. - The metabolic syndrome - *Journal of the American College of Cardiology*, 2004; 43(8): 1396-8.
- [129] Dorschel C.A. - Characterization of the TAG of peanut oil by electrospray LC-MS-MS - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2002; 79(8): 749-53.
- [130] Dosanjh B.S., Higgs D.A., McKenzie D.J., Randall D.J., Eales J.G., Rowshandeli N., Rowshandeli M., Deacon G. - Influence of dietary blends of menhaden oil and canola oil on growth, muscle lipid composition, and thyroidal status of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in sea water - *Fish Physiology and Biochemistry*, 1998; 19: 123-34.
- [131] Dotson K.D., Jerrell J.P., Picciano M.F., Perkins E.G. - High-performance liquid chromatography of human milk triacylglycerols and gas chromatography of component fatty acids - *Lipids*, 1992; 27: 933-9.
- [132] Dunford N.T., Zhang M. - Pressurized solvent extraction of wheat germ oil - *Food Research International*, 2003; 36: 905-9.
- [133] Dzondo-Gadet M., Nzikou J.M., Etoumoungo A., Linder M., Desobry S. - Encapsulation and storage of safou pulp oil in 6-DE maltodextrins - *Process Biochemistry*, 2005; 40: 265-71.
- [134] Eberly L.E., Stamler J., Neaton J.D., Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group - Relation of triglyceride levels, fasting and nonfasting, to fatal and nonfatal coronary heart disease - *Archives of Internal Medicine*, 2003; 163(9): 1077-83.
- [135] Ehnholm C., Lukka M., Kuusi T., Nikkila E., Utermann G. - Apolipoprotein E polymorphism in the Finnish population : gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations - *Journal of Lipid Research*, 1986; 27: 227-35.
- [136] Eichner J.E., Kuller L.H., Orchard T.J., Grandits G.A., McCallum L.M., Ferrell R.E., Neaton J.D. - Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease - *The American Journal of Cardiology*, 1993; 71(2): 160-5.
- [137] El-Adawy T.A., Taha K.M. - Characteristics and composition of watermelon, pumpkin, and paprika seed oils and flours - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49: 1253-9.
- [138] Endres S., Ghorbani R., Kelley V.E., Georgilis K., Lonnemann G., Van der Meer J.W.M., Cannon J.G., Rogers T.S., Klempner M.S., Weber P.C., Schaefer E.J., Wolff S.M., Dinarello C.A. - The effect of dietary supplementation with *n*-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells - *The New England Journal of Medicine*, 1989; 320(5): 265-71.
- [139] Engeli S., Negrel R., Sharma A.M. - Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system - *Hypertension*, 2000; 35: 1270-7.
- [140] Entressangles B. - Propriétés biochimiques et nutritionnelles - in Karleskind A. (ed) - *Manuel des Corps Gras*. Volume 1 - 1992, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 531-655.
- [141] Eritsland J., Arnesen H., Gronseth K., Fjeld N.B., Abdelnoor M. - Effect of dietary supplementation with *n*-3 fatty acids on coronary artery bypass graft patency - *The American Journal of Cardiology*, 1996; 77: 31-6.
- [142] Eromosele C.O., Eromosele I.C. - Fatty acid compositions of seed oils of *Haemastaphis barteri* and *Ximenia Americana* - *Bioresource Technology*, 2002; 82: 303-4.
- [143] Ezzati M., Lopez A.D. - Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000 - *Lancet*, 2003; 362: 847-52.
- [144] Faraji H., Lindsay R.C. - Antioxidant protection of bulk fish oils by dispersed sugars and polyhydric alcohols - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005; 53: 736-44.
- [145] Faraji H., Lindsay R.C. - Characterization of the antioxidant activity of sugars and polyhydric alcohols in fish oil emulsions - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004; 52: 7164-71.
- [146] Faur L., Platon J.F., Zwobada F. - Transformation des corps gras à des fins alimentaires - in Karleskind A. (ed) - *Manuel des Corps Gras*. Volume 2 - 1992, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 883-1014.
- [147] Favaro-Trindade C.S., Grosso C.R.F. - Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile - *Journal of Microencapsulation*, 2002; 19(4): 485-94.
- [148] Fave G., Coste T.C., Armand M. - Physicochemical properties of lipids : new strategies to manage fatty acid bioavailability - *Cellular and Molecular Biology*, 2004; 50(7): 815-31.

- [149] Fernandes-Hervas M.J., Fell J.T. - Pectin/chitosan mixtures as coatings for colon-specific drug delivery : an *in vitro* evaluation - International Journal of Pharmaceutics, 1998; 169: 115-9.
- [150] Ferreira Almeida P., Almeida A.J. - Cross-linked alginate-gelatine beads : a new matrix for controlled release of pindolol - Journal of Controlled Release, 2004; 97: 431-9.
- [151] Finnegan Y.E., Minihihane A.M., Leigh-Firbank E.C., Kew S., Meijer G.W., Muggli R., Calder P.C., Williams C.M. - Plant and marine derived *n*-3 polyunsaturated fatty acids have differential effects on fasting and postprandial blood lipid concentrations and on the susceptibility of LDL to oxidative modification in moderately hyperlipidemic subjects - The American Journal of Clinical Nutrition, 2003; 77: 783-95.
- [152] Fitzgerald R.J., Murray B.A., Walsh D.J. - Hypotensive peptides from milk proteins - The Journal of Nutrition, 2004; 134: 980S-8S.
- [153] Floreto E.A.T., Prince D.L., Brown P.B., Bayer R.C. - The biochemical profiles of shell-diseased American lobsters, *Homarus americanus* Milne Edwards - Aquaculture, 2000; 188: 247-62.
- [154] Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues - Journal of Biological Chemistry, 1957; 226: 497-509.
- [155] Franceschini G. - Epidemiologic evidence for high-density lipoprotein cholesterol as a risk factor for coronary artery disease - The American Journal of Cardiology, 2001; 88(suppl): 9N-13N.
- [156] Freiberg S., Zhu X.X. - Polymer microspheres for controlled drug release - International Journal of Pharmaceutics, 2004; 282: 1-18.
- [157] Frenoux J.M.R., Prost E.D., Belleville J.L., Prost J.L. - A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats - The Journal of Nutrition, 2001; 131: 39-45.
- [158] Friedlander Y., Arbogast P., Schwartz S.M., Marcovina S.M., Austin M.A., Rosendaal F.R., Reiner A.P., Psaty B.M., Siscovick D.S. - Family history as a risk factor for early onset myocardial infarction in young women - Atherosclerosis, 2001; 156(1): 201-7.
- [159] Frisco-Findus AG - New surfactants - Carlson T., EU 0 182 934, 1986.
- [160] Frishman W.H. - Biologic markers as predictors of cardiovascular disease - The American Journal of Medicine, 1998; 104(6A): 18S-27S.
- [161] Gandhi V.M., Cherian K.M., Mulky M.J. - Toxicological studies on ratanjyot oil - Food and Chemical Toxicology, 1995; 33(1): 39-42.
- [162] Garcia-Lopez P.M., Muzquiz M., Ruiz-Lopez M.A., Zamora-Natera J.F., Burbano C., Pedrosa M.M., Cuadrado C., Garzon-de la Mora P. - Chemical composition and fatty acid profile of several Mexican wild lupins - Journal of Food Composition and Analysis, 2001; 14: 645-51.
- [163] Genta I., Perugini P., Conti B., Pavanetto F. - A multiple emulsion method to entrap a lipophilic compound into chitosan microspheres - International Journal of Pharmaceutics, 1997; 152: 237-46.
- [164] Gioielli L.A., Pitombo R.N.M., Pinheiro A.M., Balbo A.M.T.M. - Water relations in freeze-dried powdered shortenings from babassu fat - Journal of Food Engineering, 1998; 37: 411-21.
- [165] Girard B., Durance T. - Headspace volatiles of sockeye and pink salmon as affected by retort process - Journal of Food Science, 2000; 65(1): 34-9.
- [166] GISSI-Prevenzione - Administration de compléments alimentaires à base d'acides gras polyinsaturés *n*-3 et de vitamine E après un infarctus du myocarde : résultats de l'essai GISSI-Prevenzione - The Lancet, 1999; 354: 447-55.
- [167] GISSI-Prevenzione - Early protection against sudden death by *n*-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction. Time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico (GISSI)-Prevenzione - Circulation, 2002; 105: 1897-903.
- [168] Glomset J.A. - Plasma lecithin : cholesterol acyltransferase - in Nelson G.J. (ed) - Blood Lipids and Lipoproteins : Quantitation, Composition and Metabolism - 1972, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, pp. 745-88.
- [169] Goffman F.D., Bohme T. - Relationship between fatty acid profile and vitamin E content in maize hybrids (*Zea mays* L.) - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001; 49: 4990-4.
- [170] Gonzalez-Felix M., Gatlin D.M. III, Lawrence A.L., Perez-Velazquez M. - Effect of dietary phospholipids on essential fatty acid requirements and tissue lipid composition of *Litopenaeus vannamei* juveniles - Aquaculture, 2002; 207: 151-67.

- [171] Goodfellow J., Bellamy M.F., Ramsey M.W., Jones C.J.H., Lewis M.J. - Dietary supplementation with marine ω -3 fatty acids improves systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia - *Journal of the American College of Cardiology*, 2000; 35(2): 265-70.
- [172] Gouin S. - Microencapsulation : industrial appraisal of existing technologies and trends - *Trends in Food Science & Technology*, 2004; 15: 330-47.
- [173] Graille J. - Préface - in Graille J. (ed) - *Lipides et Corps Gras Alimentaires* - 2003, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. III-VI.
- [174] Grimsgaard S., Bonna K.H., Hansen J.B., Nordoy A. - Highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in humans have similar triacylglycerol-lowering effects but divergent effects on serum fatty acids - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1997; 66: 649-59.
- [175] Grundy S.M. - Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for lowering plasma cholesterol - *The New England Journal of Medicine*, 1986; 314(12): 745-8.
- [176] Grundy S.M., Denke M.A. - Dietary influences on serum lipids and lipoproteins - *Journal of Lipid Research*, 1990; 31: 1149-72.
- [177] Guil J.L., Torija M.E., Gimenez J.J., Rodriguez I. - Identification of fatty acids in edible wild plants by gas chromatography - *Journal of Chromatography A*, 1996; 719: 229-35.
- [178] Guinda A., Dobarganes M.C., Ruiz-Mendez M.V., Mancha M. - Chemical and physical properties of a sunflower oil with high levels of oleic and palmitic acids - *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2003; 105: 130-7.
- [179] Gunstone F.D. - Fatty acid production for human consumption - *Inform*, 2005; 16(12): 736-7.
- [180] Gunstone F.D. - Chemical properties related to unsaturated centres - in Gunstone F.D. (ed) - *The Chemistry of Oils and Fats, Sources, Composition, Properties and Uses* - 2004, Blackwell Publishing, Oxford, pp. 146-88.
- [181] Gunstone F.D. - Physical properties - in Gunstone F.D. (ed) - *The Chemistry of Oils and Fats. Sources, Compositions, Properties and Uses* - 2004, Blackwell Publishing, Oxford, pp. 124-45.
- [182] Gunstone F.D. - Structure of fatty acids and lipids - in Gunstone F.D. (ed) - *The Chemistry of Oils and Fats. Sources, Compositions, Properties and Uses* - 2004, Blackwell Publishing, Oxford, pp. 50-75.
- [183] Gupta M.K. - Sunflower oil - in Gunstone F.D. (ed) - *Vegetable Oils in Food Technology, Composition, Properties and Uses* - 2002, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 128-56.
- [184] Haahr A.M., Bredie W.L.P., Stahnke L.H., Jensen B., Refsgaard H.H.F. - Flavour release of aldehydes and diacetyl in oil/water systems - *Food Chemistry*, 2000; 71: 355-62.
- [185] Hansen J.B., Grimsgaard S., Nilsen H., Nordoy A., Bonna K.H. - Effects of highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on fatty acid absorption, incorporation into serum phospholipids and postprandial triglyceridemia - *Lipids*, 1998; 33(2): 131-8.
- [186] Harris W.S. - Fish oils and plasma lipids and lipoprotein metabolism in humans : a critical review - *Journal of Lipid Research*, 1989; 30: 785-807.
- [187] Harris W.S. - *n*-3 Fatty acids and serum lipoproteins : human studies - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1997; 65(suppl): 1645S-54S.
- [188] Harris W.S., Rambjor G.S., Windsor S.L., Diederich D. - *n*-3 Fatty acids and urinary excretion of nitric oxide metabolites in humans - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1997; 65: 459-64.
- [189] Hartvigsen K., Lund P., Hansen L.F., Holmer G. - Dynamic headspace gas chromatography/mass spectrometry characterization of volatiles produced in fish oil enriched mayonnaise during storage - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000; 48: 4858-67.
- [190] Hayes K.C., Khosla P. - Dietary fatty acid thresholds and cholesterolemia - *The FASEB Journal*, 1992; 6: 2600-7.
- [191] Hegsted D.M., McGandy R.B., Myers M.L., Stare F.J. - Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1965; 17(5): 281-95.
- [192] Heiler C., Schieberle P. - Model studies on the precursors and formation of the metallic smelling (E,Z)-2,6-nonadienol during the manufacture and storage of buttermilk - *International Dairy Journal*, 1997; 7(10): 667-74.
- [193] Heinrich J., Balleisen L., Schulte H., Assmann G., Van de Loo J. - Fibrinogen and factor VII in the prediction of coronary risk. Results from the PROCAM study in healthy men - *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1994; 14(1): 54-9.

- [194] Heinzelmann K., Franke K. - Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability - *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 1999; 12: 223-9.
- [195] Heinzelmann K., Franke K., Velasco J., Marquez-Ruiz G. - Microencapsulation of fish oil by freeze-drying techniques and influence of process parameters on oxidative stability during storage - *European Food Research and Technology*, 2000; 211: 234-9.
- [196] Herreman I. - Marché européen des margarines et des matières grasses à tartiner - *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 2005; 12(5-6): 393-4.
- [197] Heuer B., Yaniv Z., Ravina I. - Effect of late salinization of chia (*Salvia hispanica*), stock (*Matthiola tricuspidata*) and evening primrose (*Oenothera biennis*) on their oil content and quality - *Industrial Crops and Products*, 2002; 15: 163-7.
- [198] Hirsch M. - Saisine n° 2003-SA-0100. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation de l'emploi de l'huile de lin, nature ou en mélange, dans l'alimentation courante ainsi que son intérêt nutritionnel en matière d'apport d'acide α -linoléique - 2003, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, France, pp. 1-3.
- [199] Hirsch M. - Saisine n° 2003-SA-0396. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation de l'emploi de l'huile de lin, nature ou en mélange, dans l'alimentation courante ainsi que son intérêt nutritionnel en matière d'apport d'acide α -linoléique - 2003, Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments, France, pp. 1-5.
- [200] Hirsch M. - Saisine n° 2004-SA-0409. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation de l'emploi de l'huile de lin, nature ou en mélange, dans l'alimentation courante ainsi que son intérêt nutritionnel en matière d'apport d'acide α -linoléique - 2006, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, France, pp. 1-8.
- [201] Hogan S.A., McNamee B.F., O'Riordan E.D., O'Sullivan M. - Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate/carbohydrate blends - *International Dairy Journal*, 2001; 11: 137-44.
- [202] Hogan S.A., McNamee B.F., O'Riordan E.D., O'Sullivan M. - Microencapsulating properties of sodium caseinate - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49: 1934-8.
- [203] Hogan S.A., O'Riordan E.D., O'Sullivan M. - Microencapsulation and oxidative stability of spray-dried fish oil emulsions - *Journal of Microencapsulation*, 2003; 20(5): 675-88.
- [204] Hole S., Hole M., Taylor K.D.A. - Methods of extraction composition and stability of vitamin A and other components in dogfish (*Squalus acanthias*) liver oil - *Food Chemistry*, 1996; 55(3): 215-20.
- [205] Hope M.J., Bally M.B., Webb G., Cullis P.R. - Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential - *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985; 812(1): 55-65.
- [206] Horrobin D.F., Huang Y.S. - The role of linoleic acid and its metabolites in the lowering of plasma cholesterol and the prevention of cardiovascular disease - *International Journal of Cardiology*, 1987; 17: 241-55.
- [207] Howard B.V., Gidding S.S., Liu K. - Association of apolipoprotein E phenotype with plasma lipoproteins in African-American and white young adults. The CARDIA study : Coronary Artery Risk Development in Young Adults - *American Journal of Epidemiology*, 1998; 148(9): 859-68.
- [208] Hsieh T.C.Y., Williams S.S., Vejaphan W., Meyers S.P. - Characterization of volatile components of menhaden fish (*Brevoortia tyrannus*) oil - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1989; 66(1): 114-7.
- [209] Hu F.B., Stampfer M.J., Manson J.E., Rimm E., Colditz G.A., Rosner B.A., Hennekens C.H., Willett W.C. - Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women - *The New England Journal of Medicine*, 1997; 337(21): 1491-9.
- [210] Hu F.B., Stampfer M.J., Manson J.E., Rimm E.B., Wolk A., Colditz G.A., Hennekens C.H., Willett W.C. - Dietary intake of α -linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1999; 69: 890-7.
- [211] Hu Y., Jiang X., Ding Y., Ge H., Yuan Y., Yang C. - Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles - *Biomaterials*, 2002; 23: 3193-201.
- [212] Huang X., Brazel C.S. - On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems - *Journal of Controlled Release*, 2001; 73: 121-36.
- [213] Huber K., Christ G., Wojta J., Gulba D. - Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 in cardiovascular disease. Status report 2001 - *Thrombosis Research*, 2001; 103: S7-S19.
- [214] Hugué M.L., Dellacherie E. - Calcium alginate beads coated with chitosan : Effect of the structure of encapsulated materials on their release - *Process Biochemistry*, 1996; 31(8): 745-51.

- [215] Hunter B.J., Roberts D.C.K. - Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health - Nutrition research, 2000; 20(7): 1047-58.
- [216] Hunter J.E. - Studies on effects of dietary fatty acids as related to their position on triglycerides - Lipids, 2001; 36: 655-68.
- [217] Hunter K.A., Crosbie L.C., Weir A., Miller G.J., Dutta-Roy A.K. - A residential study comparing the effects of diets rich in stearic acid, oleic acid, and linoleic acid on fasting blood lipids, hemostatic variables and platelets in young healthy men - Journal of Nutritional Biochemistry, 2000; 11: 408-16.
- [218] Hvattum E., Rosjo C., Gjoen T., Rosenlund G., Ruyter B. - Effect of soybean oil and fish oil on individual molecular species of Atlantic salmon head kidney phospholipids determined by normal-phase liquid chromatography coupled to negative ion electrospray tandem mass spectrometry - Journal of Chromatography B, 2000; 748: 137-49.
- [219] Hwang D.H., Boudreau M., Chanmugam P. - Dietary linolenic acid and longer-chain *n*-3 fatty acids : comparison of effects on arachidonic acid metabolism in rats - The Journal of Nutrition, 1988; 118(4): 427-37.
- [220] Indu M., Ghafoorunissa - *n*-3 fatty acids in Indian diets. Comparison of the effects of precursor (α -linolenic acid) vs. product (long chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids) - Nutrition Research, 1992; 12: 569-82.
- [221] Jackson R.L., Kashyap M.L., Barnhart R.L., Allen C., Hogg E., Glueck C.J. - Influence of polyunsaturated and saturated fats on plasma lipids and lipoproteins in man - The American Journal of Clinical Nutrition, 1984; 39(4): 589-97.
- [222] Jacobsen C., Meyer A.S. - Oxidation mechanisms in real food emulsions : oil-water partition coefficients of selected volatile off-flavor compounds in mayonnaise - Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und - Forschung, 1999; 208: 317-27.
- [223] Jahaniaval F., Kakuda Y., Marcone M.F. - Fatty acid and triacylglycerol compositions of seed oils of five *Amaranthus* accessions and their comparison to other oils - Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000; 77(8): 847-52.
- [224] James M.J., Gibson R.A., Cleland L.G. - Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production - The American Journal of Clinical Nutrition, 2000; 71(suppl): 343S-8S.
- [225] Javouhey-Donzel A., Guenot L., Maupoil V., Rochette L., Rocquelin G. - Rat vitamin E status and heart lipid peroxidation : effect of dietary α -linolenic and marine *n*-3 fatty acids - Lipids, 1993; 28(7): 651-5.
- [226] Jeppesen J., Hein H.O., Suadicani P., Gyntelberg F. - Relation of high TG-low HDL cholesterol and LDL cholesterol to the incidence of ischemic heart disease - Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 1997; 17: 1114-20.
- [227] Jialal I., Devaraj S. - Role of C-reactive protein in the assessment of cardiovascular risk - The American Journal of Cardiology, 2003; 91: 200-2.
- [228] Jizomoto H., Kanaoka E., Sugita K., Hirano K. - Gelatin-acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract - Pharmaceutical Research, 1993; 10(8): 1115-22.
- [229] Joensen H., Grahl-Nielsen O. - The redfish species *Sebastes viviparus*, *Sebastes marinus* and *Sebastes mentella* have different composition of their tissue fatty acids - Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2001; 129: 73-85.
- [230] Jones L.A., King C.C. - Cottonseed oil - in Hui Y.D. (ed) - Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Edible Oil and Fat Products : Oil and Oilseeds - 1996, 5th edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 159-240.
- [231] Josephson D.B., Lindsay R.C. - Retro-aldol degradations of unsaturated aldehydes : Role in the formation of c4-heptenal from t2,c6-nonadienal in fish, oyster and other flavors - Journal of the American Oil Chemists' Society, 1987; 64(1): 132-8.
- [232] Jouzel B., Pennarun A.L., Prost C., Renard D., Poncelet D., Demaimay M. - Encapsulation of a lipid precursor, the eicosapentaenoic acid, to study the development of the *Crassostrea gigas* oyster flavours - Journal of Microencapsulation, 2003; 20(1): 35-46.
- [233] Judd J.T., Baer D.J., Clevidence B.A., Muesing R.A., Chen S.C., Weststrate J.A., Meijer G.W., Wittes J., Lichtenstein A.H., Vilella-Bach M., Schaefer E.J. - Effects of margarine compared with those of butter on blood lipid profiles related to cardiovascular disease risk factors in normolipemic adults fed controlled diets - The American Journal of Clinical Nutrition, 1998; 68: 768-77.

- [234] Judde A. - Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ? - *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 2004; 11(6): 414-8.
- [235] Kahl P.E., Schimke E., Hildebrandt R., Beitz J., Schimke I., Beitz H., Mrochen H., Mest H.J. - The influence of cod-liver oil diet on various lipid metabolism parameters, the thromboxane formation capacity, platelet function and the serum MDA level in patients suffering from myocardial infarction - *Cor et Vasa*, 1987; 19(3): 199-208.
- [236] Kaijser A., Dutta P., Savage G. - Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand - *Food Chemistry*, 2000; 71: 67-70.
- [237] Kakuda Y., Jahaniaval F., Marcone M.F., Montevirgen L., Montevirgen Q., Umali J. - Characterization of pili nut (*Canarium ovatum*) oil : fatty acid and triacylglycerol composition and physicochemical properties - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2000; 77(9): 991-6.
- [238] Kallio H., Yang B., Peippo P., Tahvonen R., Pan R. - Triacylglycerols, glycerophospholipids, tocopherols and tocotrienols in berries and seeds of two subspecies (ssp. *sinensis* and *mongolica*) of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50: 3004-9.
- [239] Kalonji E., Dumas C., Berta J.L. - Acides gras de la famille oméga 3 et système cardiovasculaire : intérêt nutritionnel et allégations - Rapport de Juin 2003, AFSSA, 135 p.
- [240] Kamei M., Ohgaki S., Kanbe T., Niiya I., Mizutani H., Matsui-Yuasa I., Otani S., Morita S. - Effects of highly hydrogenated soybean oil and cholesterol on plasma, liver cholesterol, and fecal steroids in rats - *Lipids*, 1995; 30(6): 533-9.
- [241] Kaneka Corporation - Stable solution of reduced coenzyme Q - Fujii K., Kawabe T., Hosoe K., Hidaka T., EU 1 386 905, 2004.
- [242] Kang J.X., Leaf A. - Effects of long chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat myocytes - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1994; 91: 9886-90.
- [243] Kannel W.B. - Risk stratification in hypertension : new insights from the Framingham Study - *American Journal of Hypertension*, 2000; 13(1 part 2): 3S-10S.
- [244] Kannel W.B., Wolf P.A., Castelli W.P., d'Agostino R.B. - Fibrinogen and risk of cardiovascular disease. The Framingham Study - *JAMA*, 1987; 258(9): 1183-6.
- [245] Karahadian C., Fowler K.P., Cox D.H. - Comparison of chemical composition of striped bass (*Morone saxatilis*) from three Chesapeake Bay tributaries with those of two aquaculture hybrid striped bass types - *Food Chemistry*, 1995; 54(4): 409-18.
- [246] Karahadian C., Lindsay R.C. - Evaluation of compounds contributing characterizing fishy flavors in fish oils - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1989; 66(7): 953-60.
- [247] Karjalainen J., Reunanen A., Ristola P., Vitasalo M. - QT interval as a cardiac risk factor in a middle aged population - *Heart*, 1997; 77: 543-8.
- [248] Keys A., Anderson J.T., Grande F. - Serum cholesterol response to changes in the diet. IV. Particular saturated fatty acids in the diet - *Metabolism*, 1965; 14(7): 776-87.
- [249] Khosla P., Sundram K. - Effects of dietary fatty acid composition on plasma cholesterol - *Progress in lipid research*, 1996; 35(2): 93-132.
- [250] Kinsella J.E., Broughton K.S., Whelan J.W. - Dietary unsaturated fatty acids : interactions and possible needs in relation to eicosanoid synthesis - *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1990; 1(3): 123-41.
- [251] Kitts D.D., Jones P.J.H. - Dietary fats : discriminative partitioning for energy and synthesis of triacylglycerides - *Food Research International*, 1996; 29(1): 57-69.
- [252] Klere J., Barsacq J.C., Uzzan A., Karleskind A., Hochard J.M. - Généralités - in Karleskind A. (ed) - *Manuel des Corps Gras*. Volume 1 - 1992, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp.1-64.
- [253] Ko J.A., Park H.J., Hwang S.J., Park J.B., Lee J.S. - Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery - *International Journal of Pharmaceutics*, 2002; 249: 165-74.
- [254] Kochhar S.P. - Sesame, rice-bran and flaxseed oils - in Gunstone F.D. (ed) - *Vegetable Oils in Food Technology, Composition, Properties and Uses* - 2002, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 297-326.
- [255] Kolanowski W., Laufenberg G., Kunz B. - Fish oil stabilisation by microencapsulation with modified cellulose - *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2004; 55(4): 333-43.

- [256] Kolanowski W., Swiderski F., Lis E., Berger S. - Enrichment of spreadable fats with polyunsaturated fatty acids ω -3 using fish oil - *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2001; 52: 469-76.
- [257] Kontush A., Finckh B., Karten B., Kohlschutter A., Beisiegel U. - Antioxidant and prooxidant activity of α -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein - *Journal of Lipid Research*, 1996; 37: 1436-48.
- [258] Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. - Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt - *International Dairy Journal*, 2003; 13: 3-13.
- [259] Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. - The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria - *International Dairy Journal*, 2004; 14: 737-43.
- [260] Krauss R.M., Eckel R.H., Howard B., Appel L.J., Daniels S.R., Deckelbaum R.J., Erdman J.W., Bazzarre T.L. - AHA dietary guidelines. Revision 2000 : A statement for healthcare professionals from the nutrition committee of the American Heart Association - *Stroke*, 2000; 31: 2751-66.
- [261] Kris-Etherton P., Harris W.S., Appel L.J. - Fish consumption, fish oil, ω -3 fatty acids and cardiovascular disease - *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2003; 23: e20-e31.
- [262] Kris-Etherton P.M., Hecker K.D., Binkoski A.E. - Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health - *Nutrition Reviews*, 2004; 62(11): 414-26.
- [263] Kris-Etherton P.M., Shaffer Taylor D., Yu-Poth S., Huth P., Moriarty K., Fishell V., Hargrove R.L., Zhao G., Etherton T.D. - Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 71(suppl): 179S-88S.
- [264] Kris-Etherton P.M., Yu S. - Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins : human studies - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1997; 65(suppl): 1628S-44S.
- [265] Kromhout D., Bosschieter E.B., de Lezenne Courander C. - The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease - *The New England Journal of Medicine*, 1985; 312(19): 1205-9.
- [266] Kromhout D., Feskens E.J., Bowles C.H. - The protective effect of a small amount of fish on coronary heart disease mortality in an elderly population - *International Journal of Epidemiology*, 1995; 24(2): 340-5.
- [267] Kruger H.S., Venter C.S., Vorster H.H. - Physical inactivity as a risk factor for cardiovascular disease in communities undergoing rural to urban transition : the THUSA study - *Cardiovascular Journal of South Africa*, 2003; 14(1): 16-23.
- [268] Kubow S. - The influence of positional distribution of fatty acids in native, interesterified and structure-specific lipids on lipoprotein metabolism and atherogenesis - *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1996; 7: 530-41.
- [269] Kunieda H., Akimaru M., Ushio N., Nakamura K. - Reverse vesicles : counter structure of biological membranes - *Journal of Colloid and Interface Science*, 1993; 156: 446-53.
- [270] Kunieda H., Kanei N., Uemoto A., Tobita I. - Structure of reverse vesicles in a sucrose monoalkanoate system - *Langmuir*, 1994; 10: 4006-11.
- [271] Kunieda H., Makino S., Ushio N. - Anionic reversed vesicles (Letter to the editor) - *Journal of Colloid and Interface Science*, 1991; 147(1): 286-8.
- [272] Kunieda H., Nakamura K., Evans D.F. - Formation of reversed vesicles (Letter to the editor) - *Journal of the American Chemical Society*, 1991; 113(3): 1051-2.
- [273] Kunieda H., Nakamura K., Infante M.R., Solans C. - Reversed vesicles from biocompatible surfactants - *Advanced Materials*, 1992; 4(4): 291-3.
- [274] Kunieda H., Nakamura K., Olsson U., Lindman B. - Spontaneous formation of reverse vesicles - *The Journal of Physical Chemistry*, 1993; 97(37): 9525-31.
- [275] Kunieda H., Shigeta K., Suzuki M. - Phase behavior and formation of reverse vesicles in long-polyoxyethylene-chain nonionic surfactant systems - *Langmuir*, 1999; 15: 3118-22.
- [276] Kunieda H., Yamagata M. - Conditions to produce reversed vesicles (Notes) - *Journal of Colloid and Interface Science*, 1992; 150(1): 277-80.
- [277] La Rovere M.T., Bigger Jr J.T., Marcus F.I., Mortara A., Schwartz P.J. - Baroreflex sensitivity and heart rate variability in prediction of total cardiac mortality after myocardial infarction - *The Lancet*, 1998; 351: 478-84.

- [278] Lamprecht A., Schafer U., Lehr C.M. - Influences of process parameters on preparation of microparticle used as a carrier system for ω -3 unsaturated fatty acid ethyl esters used in supplementary nutrition - *Journal of Microencapsulation*, 2001; 18(3): 347-57.
- [279] Lanari D., Poli B.M., Ballestrazzi R., Lupi P., D'Agaro E., Mecatti M. - The effects of dietary fat and NFE levels on growing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Growth rate, body and fillet composition, carcass traits and nutrient retention efficiency - *Aquaculture*, 1999; 179: 351-64.
- [280] Larking P.W., Sutherland W.H.F. - Lecithin-cholesterol acyl transferase activity in the serum of rats fed saturated and unsaturated fats - *Atherosclerosis*, 1977; 26(2): 225-32.
- [281] Lasic D.D. - The mechanism of vesicle formation - *The Biochemical Journal*, 1988; 256: 1-11.
- [282] Lasic D.D. (ed) - *Liposomes : from Physics to Applications* - 1993, Elsevier, Amsterdam, 515 p.
- [283] Lasserre M., Mendy F., Spielmann D., Jacotot B. - Effects of different dietary intake of essential fatty acids on C20:3 ω 6 and C20:4 ω 6 serum levels in human adults - *Lipids*, 1985; 20(4): 227-33.
- [284] Laureles L.R., Rodriguez F.M., Reano C.E., Santos G.A., Laurena A.C., Tecson Mendoza E.M. - Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of the oil of coconut (*Cocos nucifera* L.) hybrids and their parentals - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50: 1581-6.
- [285] Leaf A., Kang J.X., Xiao Y.F., Billman G.E. - Clinical prevention of sudden cardiac death by *n*-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by *n*-3 fish oils - *Circulation*, 2003; 107: 2646-52.
- [286] Lee D.S., Noh B.S., Bae S.Y., Kim K. - Characterization of fatty acids composition in vegetable oils by gas chromatography and chemometrics - *Analytica Chimica Acta*, 1998; 358: 163-75.
- [287] Legrand P., Bourre J.M., Descomps B., Durand G., Renaud S. - Lipides - in Martin A. (ed) - *Apports Nutritionnels Conseillés pour la Population Française* - 2001, 3rd edition, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 63-82.
- [288] Lehr H.A., Hubner C., Finckh B., Nolte D., Beisiegel U., Kohlschutter A., Messmer K. - Dietary fish oil reduces leukocyte/endothelium interaction following systemic administration of oxidatively modified low density lipoprotein - *Circulation*, 1991; 84: 1725-31.
- [289] Leifert W.R., Jahangiri A., Saint D.A., McMurchie E.J. - Effects of dietary *n*-3 fatty acids on contractility, Na⁺ and K⁺ currents in a rat cardiomyocyte model of arrhythmia - *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2000; 11: 382-92.
- [290] Lemaitre-Delaunay D., Pachiardi C., Laville M., Pousin J., Armstrong M., Lagarde M. - Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [¹³C]DHA in phosphatidylcholine - *Journal of Lipid Research*, 1999; 40: 1867-74.
- [291] Lennie T.A., Chung M.L., Habash D.L., Moser D.K. - Dietary fat intake and proinflammatory cytokine levels in patients with heart failure - *Journal of Cardiac Failure*, 2005; 11(8): 613-8.
- [292] Lepage G., Roy C.C. - Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification - *Journal of Lipid Research*, 1984; 25(12): 1391-6.
- [293] Let M.B., Jacobsen C., Meyer A.S. - Ascorbyl palmitate, γ -tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007; 55(6): 2369-75.
- [294] Let M.B., Jacobsen C., Meyer A.S. - Sensory stability and oxidation of fish oil enriched milk is affected by milk storage temperature and oil quality - *International Dairy Journal*, 2005; 15: 173-82.
- [295] Lewington S., Clarke R., Qizilbash N., Peto R., Collins R. - Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality : a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies - *Lancet*, 2002; 360: 1903-13.
- [296] Li S., Wang X., Zhang X., Yang R., Zhang H., Zhu L., Hou X. - Studies on alginate-chitosan microcapsules and renal arterial embolization in rabbits - *Journal of Controlled Release*, 2002; 84: 87-98.
- [297] Lin S.W. - Palm oil - in Gunstone F.D. (ed) - *Vegetable Oils in Food Technology, Composition, Properties and Uses* - 2002, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 59-97.
- [298] Linder M., Fanni J., Parmentier M. - Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases - *Marine Biotechnology*, 2005; 7(1): 70-6.
- [299] Linssen J.P.H., Kielman G.M., Cozijnsen J.L., Pilnik W. - Comparison of chufa and olive oils - *Food Chemistry*, 1988; 28: 279-85.
- [300] Lipp M., Anklam E. - Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate. Part A : Compositional data - *Food Chemistry*, 1998; 62(1): 73-97.

- [301] Liu L., Howe P., Zhou Y.F., Xu Z.Q., Howart C., Zhang R. - Fatty acids and β -carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties - *Journal of Chromatography A*, 2000; 893: 207-13.
- [302] Liu L.S., Fishman M.L., Kost J., Hicks K.B. - Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route - *Biomaterials*, 2003; 24: 3333-43.
- [303] Longvah T., Deosthale Y.G., Kumar P.U. - Nutritional and short term toxicological evaluation of perilla seed oil - *Food Chemistry*, 2000; 70: 13-6.
- [304] Lopes Gonçalves de Brito Amorim M.J., Medeiros Ferreira J.P. - Microparticles for delivering therapeutic peptides and proteins to the lumen of the small intestine - *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2001; 52: 39-44.
- [305] L'Oreal - Compositions and methods for controlling deposition of water-insoluble ingredients - Cannell D.W., Nguyen N., Mathur H., Espino C., WO 00/33798, 2000.
- [306] L'Oreal - Compositions and methods for controlling deposition of water-insoluble ingredients - Cannell D.W., Nguyen N., Mathur H., Espino C., US 6 524 614, 2003.
- [307] L'Oreal S.A. - Aqueous carrier systems for lipophilic ingredients - Nguyen N.V., Cannell D.W., US 6 440 456, 2002.
- [308] L'Oreal S.A. - Aqueous carrier systems for lipophilic ingredients - Nguyen N.V., Cannell D.W., WO 00/74644, 2000.
- [309] L'Oreal S.A. - Aqueous carrier systems for water-insoluble materials - Cannell D.W., Mathur H., Nguyen N.V., Espino C., Swanborough M., Kanji M., Orr C., Patel L., WO 98/56333, 1998.
- [310] Lorin A., Flore C., Thomas A., Brasseur R. - Les liposomes : description, fabrication et applications - *Biotechnology Agronomy Society Environment*, 2004; 8(3): 163-76.
- [311] Lungershausen Y.K., Abbey M., Nestel P.J., Howe P.R.C. - Reduction of blood pressure and plasma triglycerides by ω -3 fatty acids in treated hypertensives - *Journal of Hypertension*, 1994; 12(9): 1041-5.
- [312] Luostarinen R., Wallin R., Saldeen T. - Dietary (*n*-3) fatty acids increase superoxide dismutase activity and decrease thromboxane production in the rat heart - *Nutrition Research*, 1997; 17(1): 163-75.
- [313] Luzia L.A., Sampaio G.R., Castellucci C.M.N., Torres E.A.F.S. - The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish - *Food Chemistry*, 2003; 83: 93-7.
- [314] Macchia A., Levantesi G., Franzosi M.G., Geraci E., Maggioni A.P., Marfisi R.M., Nicolosi G.L., Schweiger C., Tavazzi L., Tognoni G., Valagussa F., Marchioli R. and on behalf of the GISSI-Prevenzione Investigators - Left ventricular systolic dysfunction, total mortality, and sudden death in patients with myocardial infarction treated with *n*-3 polyunsaturated fatty acids - *European Journal of Heart Failure*, 2005; 7(5): 904-9.
- [315] MacMahon S., Peto R., Cutler J., Collins R., Sorlie P., Neaton J., Abbott R., Godwin J., Dyer A., Stamler J. - Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1 : Prolonged differences in blood pressure, prospective observational studies corrected for the regression dilution bias - *The Lancet*, 1990; 335: 765-74.
- [316] Madsen T., Skou H.A., Hansen V.E., Fog L., Christensen J.H., Toft E., Schmidt E.B. - C-reactive protein, dietary *n*-3 fatty acids, and the extent of coronary artery disease - *The American Journal of Cardiology*, 2001; 88: 1139-42.
- [317] Maharaj I., Nairn J.G., Campbell J.B. - Simple rapid method for the preparation of enteric-coated microspheres - *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1984; 73(1): 39-42.
- [318] Mannina L., Dugo G., Salvo F., Cicero L., Ansanelli G., Calcagni C., Segre A. - Study of the cultivar-composition relationship in Sicilian olive oils by GC, NMR, and statistical methods - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003; 51: 120-7.
- [319] Marenberg M.E., Risch N., Berkman L.F., Floderus B., de Faire U. - Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins - *The New England Journal of Medicine*, 1994; 330(15): 1041-6.
- [320] Maresca G., Di Blasio A., Marchioli R., Di Minno G. - Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction. An update - *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2000; 19: 1368-77.
- [321] Marini F., Balestrieri F., Bucci R., Magri A.L., Marini D. - Supervised pattern recognition to discriminate the geographical origin of rice bran oils : a first study - *Microchemical Journal*, 2003; 74: 239-48.
- [322] Marion D., Doublier J.L. - Agents émulsifiants - in Multon J.J. (ed) - *Additifs & Auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires* - 1992, Collection Sciences & Techniques Agroalimentaires, Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 415-58.

- [323] Massiera F., Bloch-Faure M., Ceiler D., Murakami K., Fukamizu A., Gasc J.M., Quignard-Boulangé A., Negrel R., Ailhaud G., Seydoux J., Meneton P., Teboul M. - Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation - *FASEB*, 2001; 15: 2727-9.
- [324] Matthan N.R., Jordan H., Chung M., Lichtenstein A.H., Lathrop D.A., Lau J. - A systematic review and meta-analysis of the impact of ω -3 fatty acids on selected arrhythmia outcomes in animal models - *Metabolism*, 2005; 54(12): 1557-65.
- [325] Mattson F.H., Grundy S.M. - Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man - *Journal of Lipid Research*, 1985; 26: 194-202.
- [326] Mauer L.J., Smith D.E., Labuza T.P. - Water vapor permeability, mechanical, and structural properties of edible β -casein films - *International Dairy Journal*, 2000; 10: 353-8.
- [327] Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R. - Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure - *Biochimica et Biophysica Acta*, 1986; 858(1): 161-8.
- [328] Mayer L.D., Hope M.J., Cullis P.R., Janoff A.S. - Solute distributions and trapping efficiencies observed in freeze-thawed multilamellar vesicles - *Biochimica et Biophysica Acta*, 1985; 817(1): 193-6.
- [329] McGuire S.O., Fritsche K.L. - The effect of dietary menhaden fish oil on α -tocopherol status in rodents is both concentration and tissue dependent - *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1997; 8: 518-26.
- [330] McLennan P. - Relative effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on cardiac arrhythmias in rats - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1993; 57: 207-12.
- [331] McLennan P., Howe P., Abeywardena M., Muggli R., Raederstorff D., Mano M., Rayner T., Head R. - The cardiovascular protective role of docosahexaenoic acid - *European Journal of Pharmacology*, 1996; 300: 83-9.
- [332] McLennan P.L., Abeywardena M.Y., Charnock J.S. - Dietary fish oil prevents ventricular fibrillation following coronary artery occlusion and reperfusion - *American Heart Journal*, 1988; 116: 709-17.
- [333] Mest H.J., Heinroth I., Block H.U., Forster W. - The Influence of linseed oil diet on fatty acid pattern in phospholipids and thromboxane formation in platelets in man - *Klinische Wochenschrift*, 1983; 61: 187-91.
- [334] Miceli A., de Leo P. - Extraction, characterization and utilization of artichoke seed oil - *Bioresource Technology*, 1996; 57: 301-2.
- [335] Milo C., Grosch W. - Detection of odor defects in boiled cod and trout by gas chromatography-olfactometry of headspace samples - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995; 43: 459-62.
- [336] Mofidi N., Aghai-Moghadam M., Sarbolouki M.N. - Mass preparation and characterization of alginate microspheres - *Process biochemistry*, 2000; 35: 885-8.
- [337] Mohamed A., Bhardwaj H., Hamama A., Webber C. III - Chemical composition of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil - *Industrial Crops and Products*, 1995; 4: 157-65.
- [338] Molero Gomez A., Martinez de la Ossa E. - Quality of borage seed oil extracted by liquid and supercritical carbon dioxide - *Chemical Engineering Journal*, 2002; 88: 103-9.
- [339] Moreau R.A. - Corn oil - in Gunstone F.D. (ed) - *Vegetable Oils in Food Technology, Composition, Properties and Uses* - 2002, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 278-96.
- [340] Moreno A.O., Dorantes L., Galindez J., Guzman R.I. - Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and physical and chemical properties of avocado (*Persea Americana* Mill.) oil - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003; 51: 2216-21.
- [341] Mori T.A., Bao D.Q., Burke V., Puddey I.B., Beilin L.J. - Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans - *Hypertension*, 1999; 34: 253-60.
- [342] Mori T.A., Puddey I.B., Burke V., Croft K.D., Dunstan D.W., Rivera J.H., Beilin L.J. - Effect of ω 3 fatty acids on oxidative stress in humans : GC-MS measurement of urinary F2-isoprostane excretion - *Redox Report*, 2000; 5(1): 45-6.
- [343] Mori T.A., Watts G.F., Burke V., Hilme E., Puddey I.B., Beilin L.J. - Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on vascular reactivity of the forearm microcirculation in hyperlipidemic, overweight men - *Circulation*, 2000; 102: 1264-9.
- [344] Morise A., Hermier D., Combe N., Legrand P., Mourot J., Fenart E., Weill P. - Effet de la dose d'acide α -linoléique alimentaire sur le métabolisme lipidique - *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 2005; 12(5-6): 400-6.
- [345] Morrison W.R., Smith L.M. - Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol - *Journal of Lipid Research*, 1964; 5: 600-8.

- [346] Mortimer B.C., Kenrick M.A., Holthouse D.J., Stick R.V., Redgrave T.G. - Plasma clearance of model lipoproteins containing saturated and polyunsaturated monoacylglycerols injected intravenously in the rat - *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992; 1127: 67-73.
- [347] Moussaoui N., Cansell M., Denizot A. - Marinosomes, marine lipid-based liposomes : physical characterization and potential application in cosmetics - *International Journal of Pharmaceutics*, 2002; 242: 361-5.
- [348] Munjeri O., Collett J.H., Fell J.T. - Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery : the role of chitosan in modifying drug release - *Journal of Controlled Release*, 1997; 46: 273-8.
- [349] Nabisco Brands Inc. - Liposome composition for the stabilization of oxidizable substances - Haynes L.C., Levine H., Finley J.W., US 5 015 483, 1991.
- [350] Nabisco Inc. - Method and liposome composition for the stabilization of oxidizable substances - Haynes L.C., Levine H., Finley J.W., US 5 139 803, 1992.
- [351] Naczki M., Williams J., Brennan K., Liyanapathirana C., Shahidi F. - Compositional characteristics of green crab (*Carcinus maenas*) - *Food Chemistry*, 2004; 88: 429-34.
- [352] Nair S.S.D., Leitch J.W., Falconer J., Garg M.L. - Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (*n-3*) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action - *The Journal of Nutrition*, 1997; 127: 383-93.
- [353] Nakamura K., Uemoto A., Imae T., Solans C., Kunieda H. - Stability and size control of reverse vesicles - *Journal of Colloid and Interface Science*, 1995; 170: 367-73.
- [354] Nakayama M., Fukuda N., Watanabe Y., Soma M., Hu W.Y., Kishioka H., Satoh C., Kubo A., Kanmatsuse K. - Low dose of eicosapentaenoic acid inhibits the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats through suppression of transforming growth factor- β - *Journal of Hypertension*, 1999; 17: 1421-30.
- [355] Namani T., Ishikawa T., Morigaki K., Walde P. - Vesicles from docosahexaenoic acid - *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 2007; 54: 118-23.
- [356] National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) - Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III) : Final report - *Circulation*, 2002; 106: 3143-421.
- [357] Naudet M., Soulier J., Farines M. - Principaux constituants chimiques des corps gras - in Karleskind A. (ed) - *Manuel des Corps Gras. Volume 1* - 1992, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 65-115.
- [358] Naudin-Rousselle P. - L'athérosclérose - *Le Généraliste*, 2006; 2357: 1-7.
- [359] Negre-Salvayre A., Salvayre R. - Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : Implication en physiopathologie vasculaire - *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 2005; 12(5-6): 433-8.
- [360] Nettles Cutter C. - Opportunities for bio-based packaging technologies to improve the quality and safety of fresh and further processed muscle foods - *Meat Science*, 2006; 74: 131-42.
- [361] Neve J. - Antioxydants alimentaires : vitamines, oligoéléments et non-nutriments - in Roberfroid M.B. (ed) - *Aliments Fonctionnels* - 2002, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 281-314.
- [362] Nieminen M.S., Mattila K.J., Aalto-Setälä K., Kuusi T., Kontula K., Kauppinen-Makelin R., Ehnholm C., Jauhiainen M., Valle M., Taskinen M.R. - Lipoproteins and their genetic variation in subjects with and without angiographically verified coronary artery disease - *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 1992; 12(1): 58-69.
- [363] Nieuwdorp M., Stroes E.S.G., Meijers J.C.M., Buller H. - Hypercoagulability in the metabolic syndrome - *Current Opinion in Pharmacology*, 2005; 5: 155-9.
- [364] Nokhodchi A., Farid Djavad - Microencapsulation of paracetamol by various emulsion techniques using cellulose acetate phthalate - *Pharmaceutical Technology*, 2002; 06: 54-60.
- [365] Noor Lida H.M.D., Sundram K., Siew W.L., Aminah A., Mamot S. - TAG composition and solid fat content of palm oil, sunflower oil, and palm kernel olein blends before and after chemical interesterification - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2002; 79(11): 1137-44.
- [366] O'Brien R.D. - Cottonseed oil - in Gunstone F.D. (ed) - *Vegetable Oils in Food Technology, Composition, Properties and Uses* - 2002, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 203-30.
- [367] Oguma Y., Shinoda-Tagawa T. - Physical activity decreases cardiovascular disease risk in women. Review and meta-analysis - *American Journal of Preventive Medicine*, 2004; 26(5): 407-18.

- [368] Ohshima T. - Quel avenir pour les antioxydants naturels ? - in Graille J. (ed.) - Lipides et Corps Gras Alimentaires - 2003, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 379-402.
- [369] Okuda N., Ueshima H., Okayama A., Saitoh S., Nakagawa H., Rodriguez B.L., Sakata K., Choudhury S.R., Curb J.D., Stamler J. and for the INTERLIPID Research Group - Relation of long chain *n*-3 polyunsaturated fatty acid intake to serum high density lipoprotein cholesterol among Japanese men in Japan and Japanese-American men in Hawaii : the INTERLIPID study - *Atherosclerosis*, 2005; 178(2): 371-9.
- [370] Okuda Y., Kawashima K., Sawada T., Tsurumaru K., Asano M., Suzuki S., Soma M., Nakajima T., Yamashita K. - Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells - *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997; 232: 487-91.
- [371] Ollivier D., Artaud J., Pinatel C., Durbec J.P., Guerere M. - Triacylglycerol and fatty acid compositions of French virgin olive oils, characterization by chemometrics - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003; 51: 5723-31.
- [372] Ollivon M., Perron R., Naudet M., Lalanne P. - Propriétés physiques des corps gras - in Karleskind A. (ed) - Manuel des Corps Gras. Volume 1 - 1992, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 433-523.
- [373] Oneda F., Re M.I. - The effect of formulation variables on the dissolution and physical properties of spray-dried microspheres containing organic salts - *Powder Technology*, 2003; 130: 377-84.
- [374] Oomah B.D., Busson M., Godfrey D.V., Drover J.C.G. - Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil - *Food Chemistry*, 2002; 76: 33-43.
- [375] Oomah B.D., Ladet S., Godfrey D.V., Liang J., Girard B. - Characteristics of raspberry (*Rubus idaeus* L.) seed oil - *Food Chemistry*, 2000; 69: 187-93.
- [376] Oomen C.M., Ocke M.C., Feskens E.J.M., Kok F.J., Kromhout D. - α -linolenic acid intake is not beneficially associated with 10-y risk of coronary artery disease incidence : the Zutphen Elderly Study - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001; 74: 457-63.
- [377] Oomen C.M., Ocke M.C., Feskens E.J.M., van Erp-Baart M.A.J., Kok F.J., Kromhout D. - Association between *trans* fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study : a prospective population-based study - *The Lancet*, 2001; 357: 746-51.
- [378] Orban E., di Lena G., Ricelli A., Paoletti F., Casini I., Gambelli L., Caproni R. - Quality characteristics of sharpnose sea bream (*Diplodus puntazzo*) from different intensive rearing systems - *Food Chemistry*, 2000; 70: 27-32.
- [379] Orthoefer F.T. - Rice bran oil - in Hui Y.D. (ed) - Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Edible Oil and Fat Products : Oil and Oilseeds - 1996, 5th edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 393-410.
- [380] Palmieri G.F., Bonacucina G., di Martino P., Martelli S. - Gastro-resistant microspheres containing ketoprofen - *Journal of Microencapsulation*, 2002; 19(1): 111-9.
- [381] Panfili G., Cinquata L., Fratianni A., Cubadda R. - Extraction of wheat germ oil by supercritical CO₂ : Oil and defatted cake characterization - *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2003; 80(2): 157-61.
- [382] Pantzaris T.P., Basiron Y. - The lauric oils - in Gunstone F.D. (ed) - Vegetable Oils in Food Technology, Composition, Properties and Uses - 2002, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 157-202.
- [383] Parker T.D., Adams D.A., Zhou K., Harris M., Yu L. - Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils - *Journal of Food Science*, 2003; 68(4): 1240-3.
- [384] Pater C., Compagnone D., Luszick J., Verboom N. - Effect of Omacor on HRV parameters in patients with recent uncomplicated myocardial infarction. A randomised, parallel group, double-blind, placebo-controlled trial : study design - *Current Controlled Trials in Cardiovascular Medicine*, 2003; 4: 2-9.
- [385] Pedroza-Islas R., Macias-Bravo S., Vernon-Carter E.J. - Oil thermo-oxidative stability and surface oil determination of biopolymer microcapsules - *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica*, 2002; 1: 37-44.
- [386] Pekiner B., Pennock J.F. - Use of antioxidants during preparation of α -tocopherol enriched liposomes - *Nutrition Research*, 1995; 15(6): 795-802.
- [387] Perrin J.L. - Analyse des corps gras : Détermination de l'altération - in Karleskind A. (ed) - Manuel des Corps Gras. Volume 2 - 1992, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 1198-218.
- [388] Perrin J.L. - Evolution des corps gras au cours de leurs utilisations alimentaires - in Karleskind A. (ed) - Manuel des Corps Gras. Volume 2 - 1992, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 1015-32.
- [389] Peuchant E., Wolff R., Salles C., Jensen R. - One-step extraction of human erythrocyte lipids allowing rapid determination of fatty acid composition - *Analytical Biochemistry*, 1989; 181: 341-4.

- [390] Pharmacia & Upjohn Aktiebolag - A pharmaceutical carrier system containing defined lipids - Nyqvist H., Ragnarsson G., Tingvall P., EU 0 636 020, 1999.
- [391] Pharmos Corporation - Solid fat nanoemulsions as drug delivery vehicles - Amselem S., Friedman D., EU 0 702 552, 2000.
- [392] Phleger C.F., Nelson M.M., Mooney B.D., Nichols P.D. - Interannual and between species comparison of the lipids, fatty acids and sterols of Antarctic krill from the US AMLR Elephant Island survey area - Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 2002; 131: 733-47.
- [393] Piska I., Zarubova M., Louzecky T., Karami H., Filip V. - Properties and cristallization of fat blends - Journal of Food Engineering, 2006; 77: 433-8.
- [394] Poisson J.P., Narce M. - Corps gras alimentaires : aspects chimiques et biochimiques - in Graille J. (ed) - Lipides et Corps Gras Alimentaires - 2003, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 1-50.
- [395] Pokorny J. - Problèmes de stabilité des produits alimentaires liés à la présence de lipides - in Graille J. (ed) - Lipides et Corps Gras Alimentaires - 2003, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 51-81.
- [396] Poncelet D., Babak V., Dulieu C., Picot A. - A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation - Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects, 1999; 155: 171-6.
- [397] Pore J. (ed) - Emulsions, Microémulsions, Emulsions Multiples - 1992, Editions Techniques des Industries des Corps Gras, Neuilly, 270 p.
- [398] Poumes-Ballihaut C., Langelier B., Houlier F., Alessandri J.M., Durand G., Latge C., Guesnet P. - Comparative bioavailability of dietary α -linolenic and docosahexaenoic acids in the growing rat - Lipids, 2001; 36(8): 793-800.
- [399] Prior E. - Usage des corps gras dans les différents secteurs de la technologie alimentaire - in Graille J. (ed) - Lipides et Corps Gras Alimentaires - 2003, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 157-88.
- [400] Prisco D., Paniccia R., Bandinelli B., Filippini M., Francalanci I., Giusti B., Giurlani L., Gensini G.F., Abbate R., Neri Serneri G.G. - Effect of medium-term supplementation with a moderate dose of n -3 polyunsaturated fatty acids on blood pressure in mild hypertensive patients - Thrombosis Research, 1998; 91: 105-12.
- [401] Prost C., Serot T., Demaimay M. - Identification of the most potent odorants in wild and farmed cooked turbot (*Scophthalmus maximus* L.) - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998; 46: 3214-9.
- [402] Przybylski R., Mag T. - Canola / Rapeseed oil - in Gunstone F.D. (ed) - Vegetable Oils in Food Technology, Composition, Properties and Uses - 2002, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 98-127.
- [403] Radack K., Deck C., Huster G. - The comparative effects of n -3 and n -6 polyunsaturated fatty acids on plasma fibrinogen levels : a controlled clinical trial in hypertriglyceridemic subjects - Journal of the American College of Nutrition, 1990; 9(4): 352-7.
- [404] Raghuvveer K.G., Hammond E.G. - The influence of glyceride structure on the rate of autoxidation - Journal of the American Oil Chemists' Society, 1967; 44: 239-43.
- [405] Raitt M.H., Connor W.E., Morris C., Kron J., Halperin B., Chugh S.S., McClelland J., Cook J., MacMurdy K., Swenson R., Connor S.L., Gerhard G., Kraemer D.F., Oseran D., Marchant C., Calhoun D., Shnyder R., McAnulty J. - Fish oil supplementation and risk of ventricular tachycardia and ventricular fibrillation in patients with implantable defibrillators. A randomised controlled trial - JAMA, 2005; 293: 2884-91.
- [406] Rajanaidu N., Kushari A., Rafii A., Mohd Din A., Paizura I., Jalani B.S. - Oil palm breeding and genetic resources - in Yusof B., Jalani B.S., Chan K.W. (eds) - Advances in Oil Palm Research - 2000, Malaysian Palm Oil Board, Malaysia, pp. 171-224.
- [407] Rallidis L.S., Paschos G., Liakos G.K., Velissaridou H., Anastasiadis G., Zampelas A. - Dietary α -linolenic acid decreases C-reactive protein, serum amyloid A and interleukin-6 in dyslipidemic patients - Atherosclerosis, 2003; 167: 237-42.
- [408] Rallidis L.S., Paschos G., Papaioannou M.L., Liakos G.K., Panagiotakos D.B., Anastasiadis G., Zampelas A. - The effect of diet enriched with α -linolenic acid on soluble cellular adhesion molecules in dyslipidemic patients - Atherosclerosis, 2004; 174: 127-32.
- [409] Ramadan M.F., Morsel J.T. - Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.) - Food Chemistry, 2003; 82: 339-45.
- [410] Ramadan M.F., Morsel J.T. - Phospholipid composition of niger (*Guizotia abyssinica* cass.) seed oil - Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 2003; 36: 273-6.
- [411] Rambjor G.S., Walen A.I., Windsor S.L., Harris W.S. - Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans - Lipids, 1996; 31: S45-9.

- [412] Ramirez M., Amate L., Gil A. - Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources - *Early Human Development*, 2001; 65(suppl): S95-S101.
- [413] Ranalli A., Pollastri L., Contento S., di Loreto G., Iannucci E., Lucera L., Russi F. - Acylglycerol and fatty acid components of pulp, seed and whole olive fruit oils : Their use to characterize fruit variety by chemometrics - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50: 3775-9.
- [414] Ratnayake W.M.N., Behrens W.A., Fischer P.W.F., L'Abbe M.R., Mongeau R., Beare-Rogers J.L. - Chemical and nutritional studies of flaxseed (variety Linott) in rats - *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1992; 3(5): 232-40.
- [415] Ratnayake W.M.N., Daun J.K. - Chemical composition of canola and rapeseed oils - in Gunstone F.D. (ed.) - *Rapeseed and Canola Oil : Production, Processing, Properties and Uses* - 2004, Blackwell Publishing, Oxford, pp. 37-78.
- [416] Rebuzzi A.G., Quaranta G., Liuzzo G., Caligiuri G., Lanza G.A., Gallimore J.R., Grillo R.L., Cianflone D., Biasucci L.M., Maseri A. - Incremental prognostic value of serum levels of troponin T and C-reactive protein on admission in patients with unstable angina pectoris - *The American Journal of Cardiology*, 1998; 82: 715-9.
- [417] Redden P.R., Huang Y.S., Lin X., Horrobin D.F. - Separation and quantification of the triacylglycerols in evening primrose and borage oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography - *Journal of Chromatography*, 1995; 694: 381-9.
- [418] Redgrave T.G., Kodali D.R., Small D.M. - The effect of triacyl-*sn*-glycerol structure on the metabolism of chylomicrons and triacylglycerol-rich emulsions in the rat - *The Journal of Biological Chemistry*, 1988; 263(11): 5118-23.
- [419] Règlement n°1924/2006 - Rectificatif au règlement (CE) n°1924/2006, du 30/12/2006, concernant les allégations nutritionnelles et de santé sur les denrées alimentaires - 18 Janvier 2007, Editions du Journal Officiel de l'Union Européenne, Paris, L12/3-18.
- [420] Remache A. - Le rein dans l'HTA - *Médecine du Maghreb*, 2001; 92: 1-6.
- [421] Remunan-Lopez C., Bodmeier R. - Effect of formulation and process variables on the formation of chitosan-gelatin coacervates - *International Journal of Pharmaceutics*, 1996; 135: 63-72.
- [422] Remunan-Lopez C., Lorenzo-Lamosa M.L., Vila-Jato J.L., Alonso M.J. - Development of new chitosan-cellulose multicore microparticles for controlled drug delivery - *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 1998; 45: 49-56.
- [423] Rezanka T., Rezankova H. - Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis - *Analytica Chimica Acta*, 1999; 398: 253-61.
- [424] Ribeiro A.J., Neufeld R.J., Arnaud P., Chaumeil J.C. - Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres - *International Journal of Pharmaceutics*, 1999; 187: 115-23.
- [425] Richard J., Benoit J.P. - Microencapsulation - in - *Techniques de l'Ingénieur. Traité Génie des Procédés* - J 2 210, pp. 1-10.
- [426] Robbins J., Clark Nelson J., Rautaharju P.M., Gottdiener J.S. - The association between the length of the QT interval and mortality in the cardiovascular health study - *The American Journal of Medicine*, 2003; 115: 689-94.
- [427] Roberfroid M.B. - Aliments fonctionnels : définitions, concepts et stratégies - in Roberfroid M.B. (ed) - *Aliments Fonctionnels* - 2002, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 1-17.
- [428] Robin J.H., Regost C., Arzel J., Kaushik S.J. - Fatty acid profile of fish following a change in dietary fatty acid source : model of fatty acid composition with a dilution hypothesis - *Aquaculture*, 2003; 225: 283-93.
- [429] Robles Medina A., Molina Grima E., Gimenez Gimenez A., Ibanez Gonzalez M.J. - Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids - *Biotechnology Advances*, 1998; 16(3): 517-80.
- [430] Roche H.M., Gibney M.J. - Effect of long chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 71(suppl): 232S-7S.
- [431] Rodriguez B.L., Sharp D.S., Abbott R.D., Burchfield C.M., Masaki K., Chyou P.H., Huang B., Yano K., Curb J.D. - Fish intake may limit the increase in risk of coronary heart disease morbidity and mortality among heavy smokers - *Circulation*, 1996; 94: 952-6.
- [432] Ros E., Nunez I., Perez-Heras A., Serra M., Gilabert R., Casals E., Deulofeu R. - A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects - *Circulation*, 2004; 109: 1609-14.

- [433] Rosenson R.S. - Viscosity and ischemic heart disease - *Journal of Vascular Medicine and Biology*, 1993; 4(4): 206-12.
- [434] Rosenson R.S., Shott S., Tangney C.C. - Hypertriglyceridemia is associated with an elevated blood viscosity
Rosenson : Triglycerides and blood viscosity - *Atherosclerosis*, 2002; 161: 433-9.
- [435] Ruiz-Gutierrez V., Perez-Espinosa A., Vasquez C.M., Santa-Maria C. - Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic sunflower oils) on lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver - *British Journal of Nutrition*, 1999; 82: 233-41.
- [436] Saikusa T., Kitta K., Ohkawa Y., Fujii Y., Kouzai S., Mori Y. - Edible properties of *Cuphea* seed oil - *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2001; 48(3): 210-3.
- [437] Saint Ruth H., Attwood D., Ktistis G., Taylors C.J. - Phase studies and particle size analysis of oil-in-water phospholipid microemulsions - *International Journal of Pharmaceutics*, 1995; 116: 253-61.
- [438] Sala-Vila A., Castellote A.I., Campoy C., Rivero M., Rodriguez-Palmero M., Lopez-Sabater M.C. - The source of long chain PUFA in formula supplements does not affect the fatty acid composition of plasma lipids in full-term infants - *The Journal of Nutrition*, 2004; 134(4): 868-73.
- [439] Saldeen T., Wallin R., Marklinder I. - Effects of a small dose of stable fish oil substituted for margarine in bread on plasma phospholipids fatty acids and serum triglycerides - *Nutrition Research*, 1998; 18(9): 1483-92.
- [440] Salonen J.T., Salonen R., Seppanen K., Rauramaa R., Tuomilehto J. - HDL, HDL₂, and HDL₃ subfractions, and the risk of acute myocardial infarction. A prospective population study in eastern Finnish men - *Circulation*, 1991; 84(1): 129-39.
- [441] Sanders T.A.B. - Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe - *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 71(suppl): 176S-8S.
- [442] Sanders T.H. - Groundnut (peanut) oil - in Gunstone F.D. (ed) - *Vegetable Oils in Food Technology, Composition, Properties and Uses - 2002*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 231-43.
- [443] Sanderson P., Finnegan Y.E., Williams C.M., Calder P.C., Burdge G.C., Wootton S.A., Griffin B.A., Millward D.J., Pegge N.C., Bemelmans W.J.E. - UK food standards agency α -linolenic acid workshop report - *British Journal of Nutrition*, 2002; 88: 573-9.
- [444] Satue M.T., Lopez M.C. - Sex-linked differences in fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver oil - *Food Chemistry*, 1996; 57(3): 359-63.
- [445] Savanovitch C. (ed) - *Situation et Evolution des Apports Alimentaires de la Population en France, 1997-2003 - 2005*, Institut de Veille Sanitaire, France, pp. 1-100.
- [446] Schmidt E.B., Varming K., Ernst E., Madsen P., Dyerberg J. - Dose-response studies on the effect of *n*-3 polyunsaturated fatty acids on lipids and haemostasis - *Thrombosis and Haemostasis*, 1990; 63(1): 1-5.
- [447] Schuep W. - Analyse des vitamines dans les aliments - in Bourgeois C (ed) - *Les vitamines dans les industries agroalimentaires - 2003*, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 103-46.
- [448] Senanayake S.P.J.N., Shahidi F. - Chemical and stability characteristics of structured lipids from borage (*Borago officinalis* L.) and evening primrose (*Oenothera biennis* L.) oils - *Journal of Food Science*, 2002; 67(6): 2038-45.
- [449] Sharma A.M. - Obesity and cardiovascular risk - *Growth Hormone & IGF Research*, 2003; 13: S10-7.
- [450] Sheikh-Eldin M., de Silva S.S., Anderson T.A., Gooley G. - Comparison of fatty acid composition of muscle, liver, mature oocytes, and diets of wild and captive Macquarie perch, *Macquaria australasica*, broodfish - *Aquaculture*, 1996; 144: 201-16.
- [451] Shi X.Y., Tan T.W. - Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D2 - *Biomaterials*, 2002; 23: 4469-73.
- [452] Shigeta Y., Imakana H., Yonezawa S., Oku N., Baba N., Makino T. - Suppressed permeation of linoleic acid in a liposomal formulation through reconstructed skin tissue - *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2004; 27(6): 879-82.
- [453] Shiota M., Konishi H., Tatsumi K. - Oxidative stability of fish oil blended with butter - *Journal of Dairy Science*, 1999; 82: 1877-81.
- [454] Shirai N., Terayama M., Takeda H. - Effect of season on the fatty acid composition and free amino acid content of the sardine *Sardinops melanostictus* - *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2002; 131: 387-93.

- [455] Shore V.G., Shore B. - The apolipoproteins : their structure and functional roles in human-serum lipoproteins - in Nelson G.J. (ed) - Blood Lipids and Lipoproteins : Quantitation, Composition and Metabolism - 1972, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, pp. 789-824.
- [456] Shu X.Z., Zhu K.J. - The release behavior of brilliant blue from calcium-alginate gel beads coated by chitosan : the preparation method effect - European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2002; 53: 193-201.
- [457] Shukla V.K.S., Dutta P.C., Artz W.E. - Camelina oil and its unusual cholesterol content - Journal of the American Oil Chemists' Society, 2002; 79(10): 965-9.
- [458] Sidhu K.S. - Health benefits and potential risks related to consumption of fish and fish oil - Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2003; 38: 336-44.
- [459] Silva J.P.S., Ferreira J.P.M. - Effect of drug properties on the release from CAP microspheres prepared by a solvent evaporation technique - Journal of Microencapsulation, 1999; 16(1): 95-103.
- [460] Simmonds W.J. - Fat absorption and chylomicron formation - in Nelson G.J. (ed) - Blood Lipids and Lipoproteins : Quantitation, Composition and Metabolism - 1972, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, pp. 705-44.
- [461] Singer P., Wirth M. - Can *n*-3 PUFA reduce cardiac arrhythmias ? Results of a clinical trial - Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 2004; 71: 153-9.
- [462] Singer P., Wirth M., Berger I., Voigt S., Gerike U., Godicke W., Koberle U., Heine H. - Influence on serum lipids, lipoproteins and blood pressure of mackerel and herring diet in patients with type IV and V hyperlipoproteinemia - Atherosclerosis, 1985; 56(1): 111-8.
- [463] Singh R.B., Dubnov G., Niaz M.A., Ghosh S., Singh R., Rastogi S.S., Manor O., Pella D., Berry E.M. - Effect of an Indo-Mediterranean diet on progression of coronary artery disease in high risk patients (Indo-Mediterranean Diet Heart Study) : a randomised single-blind trial - Lancet, 2002; 360: 1455-61.
- [464] Singh R.B., Niaz M.A., Sharma J.P., Kumar R., Rastogi V., Moshiri M. - Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction : the Indian Experiment of Infarct Survival-4 - Cardiovascular Drugs and Therapy, 1997; 11: 485-91.
- [465] Singh R.B., Rastogi S.S., Verma R., Laxmi B., Singh R., Ghosh S., Niaz M.A. - Randomised controlled trial of cardioprotective diet in patients with recent acute myocardial infarction : results of one year follow up - BMJ, 1992; 304: 1015-9.
- [466] Sipes E.F., Szuhaj B.F. - Soybean oil - in Hui Y.D. (ed) - Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Edible Oil and Fat Products : Oil and Oilseeds - 1996, 5th edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 497-602.
- [467] Siscovick D.S., Raghunathan T.E., King I., Weimann S., Bovbjerg V.E., Kushi L., Cobb L.A., Copass M.K., Psaty B.M., Lemaitre R., Retzlaff B., Knopp R.H. - Dietary intake of long chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest - The American Journal of Clinical Nutrition, 2000; 71(1): 208-12.
- [468] Small D.M., Craven B.M. - Handbook of Lipid Research 4. The Physical Chemistry of Lipids : from Alkanes to Phospholipids - 1986, Plenum Press, New York, NY, 672 p.
- [469] Solis-Fuentes J.A., Duran-de-Bazua M.C. - Mango seed uses : thermal behaviour of mango seed almond fat and its mixture with cocoa butter - Bioresource Technology, 2004; 92: 71-8.
- [470] Sorlie P.D., Garcia-Palmieri M.R., Costas R. Jr, Havlik R.J. - Hematocrit and risk of coronary heart disease : the Puerto Rico Health Program - American Heart Journal, 1981; 101(4): 456-61.
- [471] Southgate P.C., Lou D.C. - Improving the *n*-3 HUFA composition of Artemia using microcapsules containing marine oils - Aquaculture, 1995; 134: 91-9.
- [472] Sovova H., Zarevucka M., Vacek M., Stransky K. - Solubility of two vegetable oils in supercritical CO₂ - Journal of Supercritical Fluids, 2001; 20: 15-28.
- [473] Sprecher D.L., Watkins T.R., Behar S., Brown W.V., Rubins H.B., Schaefer E.J. - Importance of high-density lipoprotein cholesterol and triglyceride levels in coronary heart disease - The American Journal of Cardiology, 2003; 91: 575-80.
- [474] Sriamornsak P., Puttipipatkachorn S., Prakongpan S. - Calcium pectinate gel coated pellets as an alternative carrier to calcium pectinate beads - International Journal of Pharmaceutics, 1997; 156: 189-94.
- [475] Steffens W. - Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritional value of freshwater fish for humans - Aquaculture, 1997; 151: 97-119.

- [476] Strecker L.R., Bieber M.A., Maza A., Grossberger T., Doskoczynski W.J. - Corn oil - in Hui Y.D. (ed) - Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Edible Oil and Fat Products : Oil and Oilseeds - 1996, 5th edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 125-58.
- [477] Sugano M., Hirahara F. - Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Japan - The American Journal of Clinical Nutrition, 2000; 71(suppl): 189S-96S.
- [478] Swann P.G., Venton D.L., Le Breton G.C. - Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are antagonists at the thromboxane A₂/ prostaglandin H₂ receptor in human platelets - FEBS Letters, 1989; 243(2): 244-6.
- [479] Szoka F. Jr, Papahadjopoulos D. - Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation - Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978; 75(9): 4194-8.
- [480] Tafazoli S., Wright J.S., O'Brien P.J. - Prooxidant and antioxidant activity of vitamin E analogues and troglitazone - Chemical Research in Toxicology, 2005; 18(10): 1567-74.
- [481] Task Force of the European Society of Cardiology - Heart rate variability : standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use - Circulation, 1996; 93: 1043-65.
- [482] Terano T., Shiina T., Yamamoto K., Ban T., Hirai A., Tamura Y., Saito Y., Kitagawa M. - Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit DNA synthesis through inhibiting cdk2 kinase in vascular smooth muscle cells - Annals of the New York Academy of Sciences, 1997; 811: 369-77.
- [483] Terumo Corporation - Liposomes - Aoyagi J., Yamamoto Y., Akaike T., Nozaki Y., EU 0 160 286, 1985.
- [484] Terumo Kabushiki Kaisha - Hemoglobin-containing liposomes and process for preparing the same - Suzuki K., Miyauchi Y., EU 0 170 247, 1984.
- [485] Terumo Kabushiki Kaisha - Hemoglobin-encapsulating liposome and method for making the same - Okamoto T., Goto H., EU 0 615 747, 1994.
- [486] Terumo Kabushiki Kaisha - Process for preparing liposomes - Suzuki K., Sakaguchi K., EU 0 357 773, 1990.
- [487] The SCORE Project Group - Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe : the SCORE project - The European Heart Journal, 2003; 24: 987-1003.
- [488] Tholstrup T., Sandstrom B., Bysted A., Holmer G. - Effect of 6 dietary fatty acids on the postprandial lipid profile, plasma fatty acids, lipoprotein lipase, and cholesterol ester transfer activities in healthy young men - The American Journal of Clinical Nutrition, 2001; 73: 198-208.
- [489] Thomasson H.J., Boldingh J. - The biological value of oils and fats. II. The growth-retarding substance in rapeseed oil - The Journal of Nutrition, 1955; 56(4): 469-75.
- [490] Torres I.C., Mira L., Ornelas C.P., Melim A. - Study of the effects of dietary fish intake on serum lipids and lipoproteins in two populations with different dietary habits - British Journal of Nutrition, 2000; 83: 371-9.
- [491] Tribouilloy C., Peltier M., Colas L., Senni M., Ganry O., Rey J.L., Lesbre J.P. - Fibrinogen is an independent marker for thoracic aortic atherosclerosis - The American Journal of Cardiology, 1998; 81: 321-6.
- [492] Tsamouris G., Hatziantoniou S., Demetzos C. - Lipid analysis of Greek walnut oil (*Juglans regia* L.) - Zeitschrift für Naturforschung, 2002; 57c: 51-6.
- [493] Uauy R., Valenzuela A. - Marine oils : The health benefits of *n*-3 fatty acids - Nutrition, 2000; 16(7/8): 680-4.
- [494] Ucciani E., Debal A. - Propriétés chimiques des corps gras - in Karleskind A. (ed) - Manuel des Corps Gras. Volume 1 - 1992, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 318-432.
- [495] Udayasekhara Rao P. - Nutrient composition of some less-familiar oil seeds - Food Chemistry, 1994; 50: 379-82.
- [496] United Biscuits (UK) Limited - Fat based food products - Hammond E.W., Hicks R.M., Elsheshtawy S., EU 0 455 386, 1993.
- [497] Utermann G., Hardewig A., Zimmer F. - Apolipoprotein E phenotypes in patients with myocardial infarction - Human Genetics, 1984; 65(3): 237-41.
- [498] Vaisey-Genser M., Carr R.A., Morris D.H. - Margarine - in Caballero B. (ed) - Encyclopedia of Food Science and Nutrition. Volume 6 - 2003, Academic Press, Elsevier Science, London, pp. 3704-25.
- [499] Venkateshwarlu G., Let M.B., Meyer A.S., Jacobsen C. - Chemical and olfactometric characterization of volatile flavor compounds in a fish oil enriched milk emulsion - Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004; 52: 311-7.

- [500] Venkateshwarlu G., Let M.B., Meyer A.S., Jacobsen C. - Modeling the sensory impact of defined combinations of volatile lipid oxidation products on fishy and metallic off-flavors - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004; 52: 1635-41.
- [501] Venkatraman J.T., Angkeow P., Satsangi N., Fernandes G. - Effects of dietary *n*-6 and *n*-3 lipids on antioxidant defense system in livers of exercised rats - *Journal of the American College of Nutrition*, 1998; 17(6): 586-94.
- [502] Vericel E., Calzada C., Chapuy P., Lagarde M. - The influence of low intake of *n*-3 fatty acids on platelets in elderly people - *Atherosclerosis*, 1999; 147: 187-92.
- [503] Vermorel M., Pitz P., Tappy L., Laville M. - Energie - in Martin A. (ed) - *Apports Nutritionnels Conseillés pour la Population Française* - 2001, 3rd edition, Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 17-36.
- [504] Volatier J.L. (ed) - *Enquête INCA (Individuelle et Nationale sur les Consommations Alimentaires)* - 2000, Editions Tec & Doc, Paris, 158 p.
- [505] Wallace J.M.W., McCabe A.J., Robson P.J., Keogh M.K., Murray C.A., Kelly P.M., Marquez-Ruiz G., McGlynn H., Gilmore W.S., Strain J.J. - Bioavailability of *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in food enriched with microencapsulated fish oil - *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2000; 44: 157-62.
- [506] Wang T. - Soybean oil - in Gunstone F.D. (ed) - *Vegetable Oils in Food Technology, Composition, Properties and Uses* - 2002, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 18-58.
- [507] Wang Y.P., Tang J.S., Chu C.Q., Tian J. - A preliminary study on the introduction and cultivation of *Crambe abyssinica* in China, an oil plant for industrial uses - *Industrial Crops and Products*, 2000; 12: 47-52.
- [508] Watanabe Y., Fang X., Adachi S., Fukami H., Matsuno R. - Oxidation of 6-O-arachidonyl L-ascorbate microencapsulated with a polysaccharide by spray-drying - *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 2004; 37: 395-400.
- [509] Weber C., Erl W., Pietsch A., Danesch U., Weber P.C. - Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor- α - *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995; 15: 622-8.
- [510] Weber P.C. - Clinical studies on the effects of *n*-3 fatty acids on cells and eicosanoids in the cardiovascular system - *Journal of Internal Medicine*, 1989; 225(1 suppl.): 61-8.
- [511] Wendland E., Farmer A., Glasziou P., Neil A. - Effect of α -linolenic acid on cardiovascular risk markers : a systematic review - *Heart*, 2006; 92(2): 166-9.
- [512] Werner A., Havinga R., Kuipers F., Verkade H.J. - Treatment of EFA deficiency with dietary triglycerides or phospholipids in a murine model of extrahepatic cholestasis - *American Journal of Physiology : Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2004; 286(5): G822-32.
- [513] Whelton S.P., He J., Whelton P.K., Muntner P. - Meta-analysis of observational studies on fish intake and coronary heart disease - *The American Journal of Cardiology*, 2004; 93: 1119-23.
- [514] WHO/FAO - 1993 Report. Fats and oils in human nutrition - 1993, Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome, pp. 49-55.
- [515] Wiesenfeld P.W., Babu U.S., Collins T.F.X., Sprando R., O'Donnell M.W., Flynn T.J., Black T., Olejnik N. - Flaxseed increased α -linolenic and eicosapentaenoic acid and decreased arachidonic acid in serum and tissues of rat dams and offspring - *Food and Chemical Toxicology*, 2003; 41: 841-55.
- [516] Wiharris S., Sands S.A., Windsor S., Ali H.A., Stevens T.L., Magalski A., Porter C.B., Borkon A.M. - Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients. Correlation with erythrocytes and response to supplementation - *Circulation*, 2004; 110: 1645-9.
- [517] Wijendran V., Hayes K.C. - Dietary *n*-6 and *n*-3 fatty acid balance and cardiovascular health - *Annual Review of Nutrition*, 2004; 24: 597-615.
- [518] Wijendran V., Huang M.C., Diao G.Y., Boehm G., Nathanielsz P.W., Brenna J.T. - Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates - *Pediatric Research*, 2002; 51(3): 265-72.
- [519] Wilkinson P., Leach C., Ah-Sing E.E., Hussain N., Miller G.J., Millward D.J., Griffin B.A. - Influence of α -linolenic acid and fish oil on markers of cardiovascular risk in subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype - *Atherosclerosis*, 2005; 181(1): 115-24.
- [520] Wong T.W., Lee H.Y., Chan L.W., Heng P.W.S. - Drug release properties of pectinate microspheres prepared by emulsification method - *International Journal of Pharmaceutics*, 2002; 242: 233-7.

- [521] Wood R., Kubena K., O'Brien B., Tseng S., Martin G. - Effect of butter, mono and polyunsaturated fatty acid-enriched butter, *trans* fatty acid margarine, and zero *trans* fatty acid margarine on serum lipids and lipoproteins in healthy men - *Journal of Lipid Research*, 1993; 34: 1-11.
- [522] Wu P.C., Huang Y.B., Chang J.I., Tsai M.J., Tsai Y.H. - Preparation and evaluation of sustained release microspheres of potassium chloride prepared with ethylcellulose - *International Journal of Pharmaceutics*, 2003; 260: 115-21.
- [523] Xiao Y.F., Kang J.X., Morgan J.P., Leaf A. - Blocking effects of polyunsaturated fatty acids on Na⁺ channels of neonatal rat ventricular myocytes - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1995; 92: 11000-4.
- [524] Xiao Y.F., Wright S.N., Wang G.K., Morgan J.P., Leaf A. - Fatty acids suppress voltage-gated Na⁺ currents in HEK293t cells transfected with the α -subunit of the human cardiac Na⁺ channel - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1998; 95: 2680-5.
- [525] Yaizu Suisankagaku Industry Co Ltd - Highly unsaturated fatty acid-feeding composition - Kazuaki K., Takuo N., 2003-003190, 2003.
- [526] Yamada T., Onishi H., Machida Y. - Sustained release ketoprofen microparticles with ethylcellulose and carboxymethylethylcellulose - *Journal of Controlled Release*, 2001; 75: 271-82.
- [527] Yang B., Kallio H.P. - Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different origins - *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 49: 1939-47.
- [528] YEI-Sebaiy L.A., El-Mahdy A.R. - Lipid changes during germination of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum*) - *Food Chemistry*, 1983; 10: 309-19.
- [529] Yokoyama M. - Drug targeting with nano-sized carrier systems - *Journal of Artificial Organs*, 2005; 8: 77-84.
- [530] Youdim K.A., Martin A., Joseph J.A. - Essential fatty acids and the brain : possible health implications - *International Journal of Developmental Neuroscience*, 2000; 18: 383-99.
- [531] Young C.T. - Peanut oil - in Hui Y.D. (ed) - *Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Edible Oil and Fat Products : Oil and Oilseeds* - 1996, 5th edition, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp. 377-92.
- [532] Younis Y.M.H., Ghirmay S., Al-Shihry S.S. - African *Cucurbita pepo* L. : Properties of seed and variability in fatty acid composition of seed oil - *Phytochemistry*, 2000; 54: 71-5.
- [533] Yousfi M., Nedjmi B., Bellal R., Ben Bertal D., Palla G. - Fatty acids and sterols of *Pistacia atlantica* fruit oil - Letters to the Editor, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2002; 79(10): 1049-50.
- [534] Yuan J.M., Ross R.K., Gao Y.T., Yu M.C. - Fish and shellfish consumption in relation to death from myocardial infarction among men in Shanghai, China - *American Journal of Epidemiology*, 2001; 154(9): 809-16.
- [535] Yusuf S., Hawken S., Ounpuu S., Dans T., Avezum A., Lanas F., McQueen M., Budaj A., Pais P., Varigos J., Lisheng L., on behalf of the INTERHEART Study Investigators - Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study) : case-control study - *Lancet*, 2004; 363: 937-52.
- [536] Zhao G., Etherton T.D., Martin K.R., West S.G., Gillies P.J., Kris-Etherton P.M. - Dietary α -linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women - *The Journal of Nutrition*, 2004; 134: 2991-7.
- [537] Zhou M.X., Holmes M.G., Robards K., Helliwell S. - Fatty acid composition of lipids of Australian oats - *Journal of Cereal Science*, 1998; 28: 311-9.
- [538] <<http://med.tn.tudelft.nl/~hadley/nanoscience/week4/assemble.gif>> date de dernière consultation : 22/08/07.
- [539] <<http://www.anatomie-humaine.com/Innervation-cardiaque.html>> date de dernière consultation : 22/08/07.
- [540] <<http://www.caducee.net/DossierSpecialises/cardiologie/risque-atherogene.asp>> date de dernière consultation : 22/08/07.
- [541] <<http://www.ednes.com/ecg/index.htm>> date de dernière consultation : 22/08/07.
- [542] <<http://www.food.gov.uk/science/research/researchinfo/nutritionresearch/dietandcardiovasc/n02programme/n02projilist/n02015/n02016/>> date de dernière consultation : 22/08/07.
- [543] <<http://www.nsf.asso.fr/spip.php?article1069>> date de dernière consultation : 22/08/07.

- [544] <<http://www.sante.gouv.fr/htm/actu/nutri2000/nutri022.htm>> date de dernière consultation : 22/08/07.
- [545] <<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/01MPF.htm>> date de dernière consultation : 22/08/07.
- [546] <<http://www.uvp5.univ-paris5.fr/CAMPUS-NUTRITION/cycle1/default.asp?frame=sommaire>> date de dernière consultation : 22/08/07.

I. Annexes

ANNEXES EXPERIMENTALES

I/ Extraction et transméthylation des acides gras

✓ **But**

Les techniques présentées dans ce paragraphe permettent d'extraire les lipides totaux d'un échantillon afin de réaliser par la suite une analyse chromatographique sur couche mince, et de méthyler les acides gras avant analyse en chromatographie en phase gazeuse.

✓ **Protocole**

Les différents protocoles utilisés sont décrits ci-dessous. Les techniques de Folch *et al.* (1957) [154] et Peuchant *et al.* (1989) [389] permettent l'extraction des lipides totaux, tandis que celle de Lepage et Roy (1984) [292] permet l'extraction et la transméthylation en une seule étape des lipides totaux d'un échantillon. Enfin, la transméthylation d'acides gras de classes de lipides récupérées après chromatographie sur couche mince est réalisée par la technique BF₃-méthanol de Morrison et Smith (1964) [345].

Toutes ces techniques ont été publiées, leurs protocoles ne seront donc que rapidement décrits.

I. 1) Extraction par la technique de Folch *et al.* (1957) [154]

Pour une masse d'échantillon de 1 mg, 6,7 mL de méthanol puis 13,3 mL de chloroforme sont ajoutés, ainsi que 0,21 mL d'une solution de chloroforme à 1% m/v de BHT (butylhydroxytoluène).

L'échantillon est ensuite placé sous agitation pendant une heure.

A la fin de cette période, 4,2 mL de chlorure de potassium (0,8% m/v) sont ajoutés, le mélange est homogénéisé pendant 5 minutes, puis est centrifugé à 800 g pendant 5 minutes (centrifugeuse modèle CR 412, Jouan).

La phase aqueuse est remplacée par le même volume de solution de Folch (chloroforme / méthanol / chlorure de potassium en 3/48/47), et l'échantillon est à nouveau centrifugé, dans les mêmes conditions.

La phase supérieure est éliminée, tandis que la phase organique est filtrée sur papier pasteur dans un ballon, le tube initial étant rincé plusieurs fois avec le solvant de départ (chloroforme / méthanol en 2/1).

L'échantillon est ensuite séché à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le culot est suspendu dans le solvant de départ (1 à 2 mL), puis filtré sur papier Whatman dans un tube stocké par la suite à 4°C sous azote.

I. 2) Extraction par la technique de Peuchant *et al.* (1989) [389]

Préalablement à l'extraction des lipides, les hématies sont récupérées par centrifugation du sang des animaux à 800 g pendant 30 minutes (centrifugeuse modèle CR 412, Jouan). La phase surnageante obtenue est constituée de plasma, tandis que le culot contient les érythrocytes.

Pour un échantillon de 0,4 g d'hématies, 8 mL d'isopropanol sont ajoutés, avant homogénéisation à l'aide d'une turbine type Ultraturrax.

La solution obtenue est ensuite mélangée pendant 10 minutes, puis filtrée sur papier pasteur au dessus d'un ballon. Le tube d'origine est rincé plusieurs fois à l'isopropanol.

La solution est séchée à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Le culot est suspendu dans un mélange de solvant constitué de chloroforme et de méthanol en ratio 2/1, puis filtré sur papier Whatman dans un tube stocké à 4°C sous azote.

I. 3) Extraction et transméthylation par la technique de Lepage et Roy (1984) [292]

Un échantillon de 20 mg est placé dans un tube, dans lequel sont ajoutés 2 mL d'un mélange méthanol / isoctane (4/1). Le tube est ensuite placé dans de la glace, sous agitation, pour permettre l'addition lente de 0,2 mL d'acétylchlorure (réaction exothermique).

Ce mélange est ensuite placé une heure à 100°C, afin de permettre la transméthylation des acides gras, puis est refroidi sur glace.

Un volume de 5 mL de carbonate de sodium est ajouté sous agitation (le tube étant toujours placé dans la glace), ce qui provoque le dégagement de dioxyde de carbone.

Le tube est homogénéisé à l'aide d'un vortex pendant quelques secondes, puis centrifugé à 800 g pendant 5 minutes (modèle CR 412, Jouan). La phase supérieure est récupérée, et est injectée rapidement en chromatographie en phase gazeuse (de manière à éviter toute dégradation des esters méthyliques d'acides gras).

I. 4) Transméthylation par la technique BF₃-méthanol de Morrison et Smith (1964) [345]

Après extraction des lipides d'un échantillon, les esters méthyliques des acides gras sont obtenus par transméthylation de 500 µL de solution lipidique avec 1 mL de solution méthanolique de trifluorure de Bore (BF₃, 14% m/v dans du méthanol), réalisée à 100°C pendant 20 minutes.

Après refroidissement du tube sur glace, les esters sont ensuite extraits par ajout dans le tube d'1 mL de soude et de 2 mL d'hexane, centrifugation à 800 g pendant 5 minutes (modèle CR 412, Jouan), et récupération de la phase supérieure.

La phase inférieure subit cette étape d'extraction deux fois supplémentaires.

Les trois phases récupérées sont ensuite mélangées, séchées par évaporation du solvant, et suspendues dans 2 mL d'hexane avant d'être stockées à 4°C sous azote.

Remarque : cette technique permet de stocker les esters méthyliques d'acides gras obtenus, au contraire de la technique présentée dans le paragraphe précédent.

II/ Techniques chromatographiques

Les techniques de chromatographie permettent la séparation de composés en fonction d'un critère donné. Plus précisément, la chromatographie sur couche mince ou sur rod permettent la séparation des différentes classes de lipides, tandis que la chromatographie en phase gazeuse permet d'obtenir le profil en acides gras d'un échantillon.

L'utilisation d'un injecteur espace de tête dans cette dernière technique permet par ailleurs de séparer les composés volatils présents dans l'atmosphère située au dessus d'un échantillon.

Enfin, la chromatographie en phase liquide haute performance permet dans cette étude le dosage de la vitamine E.

II. 1) Analyse du profil en acides gras par chromatographie en phase gazeuse

✓ **But**

Cette technique permet une séparation des substances chimiques, qui repose sur les différences de comportement entre une phase mobile (échantillon / solvant / gaz) et une phase stationnaire (colonne). Dans le cas des matières grasses, cette analyse permet de séparer les acides gras présents dans l'échantillon, et d'évaluer leur proportion respective de manière qualitative ou quantitative.

✓ **Principe**

L'injection de l'échantillon dans une colonne permet la séparation des acides gras en fonction de leur structure. En effet, la longueur et le nombre d'insaturations de la chaîne carbonée déterminent le temps de rétention de chaque acide gras, qui est repéré à la sortie de la colonne par un détecteur à ionisation de flamme.

✓ **Protocole**

Les acides gras d'un échantillon sont transformés en esters méthyliques par l'une des techniques présentées précédemment, et 1 μ L d'échantillon est injecté dans le chromatographe :

- pour les profils en acides gras des lipides sanguins des rats, ainsi que les profils de la PE érythrocytaire et cérébrale : type Trace GC Ultra, Thermo Electron Corp., équipé d'une colonne capillaire BPX70 60 m (longueur) * 0,22 mm (diamètre interne) * 0,25 μ m (épaisseur), SGE Ltd ;
- pour les profils en acides gras des huiles et graisses utilisées dans la formulation, ainsi que pour les produits finis : type Périchrom 2000, équipé d'une colonne 25 m (longueur) * 0,25 mm (diamètre interne) * 0,5 mm (diamètre externe), BPX70 SGE, Australia Pty Ltd.

Les programmes de température utilisés sont les suivants : de 150°C à 200°C à 1,5°C/min, 30 min à 200°C, de 200°C à 235°C à 10°C/min dans le premier cas, 1 min à 120°C, de 120 à 220°C à 3°C/min, 20 min à 220°C dans le second.

La montée en température permet d'obtenir une séparation plus efficace des différents esters d'acides gras, dont le caractère volatil est fortement déterminé par la structure.

Le gaz utilisé comme porteur de la phase mobile est l'azote.

✓ **Résultats**

Le chromatogramme obtenu représente l'intensité de détection des esters méthyliques d'acides gras à la sortie de la colonne, en fonction de leur temps de rétention. L'intensité de la détection est représentée par l'amplitude du pic concerné, en unité arbitraire.

Par comparaison du chromatogramme avec un profil constitué d'acides gras connus, il est possible d'identifier les composés constituant l'échantillon. La proportion relative de chacun est évaluée par la proportion que représente l'aire de chaque pic par rapport à la somme des aires de tous les pics du profil.

L'utilisation de standards de composition massique connue permet d'éliminer l'éventuel biais induit par le détecteur à ionisation de flamme. En effet, il est possible que celui-ci émette un signal d'amplitude différente en fonction de la nature de l'acide gras qu'il détecte. Dans ce cas, la proportion des acides gras dans l'échantillon peut être sous- ou surestimée.

Cependant, dans le cadre de cette thèse, seul le profil en acides gras exprimé en proportion de l'aire totale des pics est utilisé afin de comparer les produits.

II. 2) Analyse des composés volatils par chromatographie en phase gazeuse

✓ **But**

De la même manière que dans la technique précédente, les composés volatils présents dans un échantillon peuvent être séparés par chromatographie en phase gazeuse, l'appareillage ne différant que par la structure de l'injecteur, dit « espace de tête ».

✓ **Principe**

La séparation des composés volatils d'un échantillon est effectuée sur une colonne dans laquelle les molécules sont retenues pendant un délai qui est fonction de leur structure. A la sortie de la colonne, un détecteur à ionisation de flamme permet d'obtenir un chromatogramme, comparable à celui décrit dans le paragraphe précédent.

La particularité de cette technique réside dans la méthode conduisant au dégagement des molécules volatiles. En effet, ne sont injectés dans la colonne que les composés présents dans l'espace de tête présent au-dessus d'un échantillon, après équilibrage air / produit dans une enceinte chauffée.

✓ **Protocole**

Une masse de 4 g de corps gras est introduite dans un flacon en verre, fermé puis scellé. L'échantillon est incubé à une température de 90°C pendant 15 minutes, puis 5 μ L de l'espace de tête sont injectés dans l'appareillage (chromatographe en phase gazeuse modèle PR2100, Périchrom Sarl, colonne capillaire pour solvants, modèle Factor Four VF-23ms de 30 m*0,25 mm, DF = 0,25, Varian).

Le programme de température utilisé est le suivant : maintien à 40°C pendant 10 minutes, puis rampe de 40 à 180°C à une vitesse de 10°C par minute, et plateau à 180°C pendant 1 minute.

Le gaz porteur de la phase mobile est l'azote.

✓ **Résultats**

Le chromatogramme obtenu permet, comme dans le cas de la technique précédente, d'évaluer la composition du mélange de molécules volatiles par mesure de l'aire d'un pic, rapportée à la somme des aires totales.

L'identification des composés séparés nécessite une analyse supplémentaire, qui n'a pas été réalisée au cours de la thèse par manque du matériel nécessaire disponible sur place. Il s'agit de la spectrométrie de masse, effectuée par un appareillage couplé au chromatographe.

II. 3) Séparation des classes de lipides par chromatographie sur couche mince

✓ **But**

Le but de cette technique (et de la technique suivante) est de séparer les différentes classes de lipides afin de pouvoir analyser le profil en acides gras des classes d'intérêt.

✓ **Principe**

Le principe de cette technique est basé sur la différence de comportement des classes de lipides lors de la migration dans un solvant d'élution, sur une plaque de silice.

✓ **Protocole**

L'échantillon contenant les lipides totaux, dissous dans un solvant (ex. chloroforme / méthanol en 2/1) est déposé à l'aide d'une pipette pasteur à 3 cm du bord inférieur d'une plaque de verre recouverte d'un gel de silice (gel de silice Kieselgel 60H, Merck, dimensions de la plaque : 20 cm * 20 cm). Le solvant s'évapore rapidement, ne laissant au niveau du dépôt que les lipides totaux.

La plaque est ensuite placée verticalement dans une cuve contenant une hauteur d'environ 2 cm de solvant d'élution (chloroforme / méthanol / eau / acide acétique en 65/45/3/1). La migration s'effectue en 45 minutes à température ambiante.

Après la migration, les différentes classes de lipides sont révélées à l'aide d'un réactif spécifique des lipides (solution de méthanol à 0,5% m/v de dichlorofluorescéine). Après pulvérisation du réactif et séchage de la plaque, la révélation sous ultraviolets permet de visualiser les zones où se trouvent les classes de lipides.

✓ **Résultat**

L'identification des différentes classes de lipides est faite par rapport à des standards purifiés ayant migré dans les mêmes conditions.

La classe de lipides d'intérêt peut ensuite être récupérée par grattage de la silice dans la zone concernée, puis analysée après transméthylation des acides gras par la méthode de Morrison et Smith (1964) [345].

II. 4) Séparation des classes de lipides en chromatographie sur rod, Iatroscan®

✓ **Principe**

Le principe de cette technique est le même que celui de la chromatographie sur couche mince, c'est-à-dire la séparation des différentes classes de lipides.

Cependant, si la chromatographie sur couche mince permet surtout de récupérer une classe particulière de lipides afin d'en évaluer le profil en acides gras par la suite, la chromatographie sur rod permet d'évaluer la composition d'un échantillon, en terme de proportion de chacune des classes de lipides.

Dans cette technique, la plaque de silice est remplacée par un rod, c'est-à-dire une baguette de quartz de 1 mm de diamètre, recouverte par une fine pellicule de silice.

La migration des lipides se fait dans deux cuves différentes, l'une pour la migration des lipides non polaires (TAG), l'autre pour la migration des lipides polaires (PL et glycolipides).

✓ **Protocole**

De la même manière que pour la technique précédente, l'échantillon est déposé au bas du rod à l'aide d'une pipette fine, les lipides totaux seuls restant après évaporation du solvant.

Remarque : les rods sont montés par 10 sur un cadre métallique, ce qui permet d'effectuer le même dépôt plusieurs fois, ainsi que des standards, dans la même expérience.

Après séchage à 103°C pendant une minute, puis saturation en humidité (10 minutes dans une enceinte saturée en chlorure de sodium), le cadre est placé dans la première cuve contenant un solvant d'élution spécifique des lipides non polaires (hexane / éther diéthylique / acide formique en 70/30/0,2).

Après migration (20 minutes à température ambiante), le cadre est placé dans l'appareillage (modèle MK-5, IATRON) pour analyse des classes de lipides séparées par la migration, à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme.

La même analyse est répétée sur un autre rod après la migration dans le deuxième solvant d'élution, cette fois spécifique des lipides polaires (chloroforme / méthanol / eau / ammoniac en 65/35/5/0,28).

✓ **Résultats**

L'analyse des rods permet d'obtenir un profil sur lequel figurent des pics représentant les différentes classes de lipides, l'aire d'un pic étant corrélée à la quantité de composé considéré détectée par l'appareil. La proportion des différentes classes de lipides contenues dans l'échantillon est évaluée de manière relative, par rapport à la somme des aires de tous les pics, comme dans les techniques de chromatographies en phase gazeuse.

L'analyse du rod après la première migration permet d'évaluer la proportion de lipides non polaires (ayant migré) et polaires (restés au niveau du dépôt) dans l'échantillon. L'analyse après la deuxième migration permet de séparer les différents lipides polaires, et ainsi d'avoir une image globale de la composition de l'échantillon.

II. 5) Analyse de l' α -tocophérol par chromatographie liquide haute performance

✓ **But**

Le but de cette technique est d'estimer la concentration en vitamine E dans le plasma des rats.

✓ **Principe**

Cette analyse est réalisée par chromatographie en phase liquide haute performance. Dans ce cas, la phase mobile est constituée d'un mélange de solvants organiques.

De la même manière que la chromatographie en phase gazeuse, la nature de la colonne et les conditions d'analyse permettent la séparation de l' α -tocophérol. En sortie de colonne, un détecteur électrochimique produit une réaction d'oxydo-réduction spécifique. Celle-ci génère un courant dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en α -tocophérol dans l'échantillon.

✓ **Protocole**

Un échantillon de 50 μ L de plasma des animaux est additionné de 60 μ L d'une solution de BHT à 100 mg/mL (protection contre l'oxydation) et de 60 μ L de standard δ -tocophérol (15 μ g/mL). Après agitation au vortex, 500 μ L d'hexane sont ajoutés, et la solution résultante est centrifugée à 700 g pendant 5 minutes (modèle CR 412, Jouan).

La phase supérieure est prélevée, et l'hexane est évaporé sous azote. Le culot restant (contenant les lipides plasmatiques) est dissous dans 100 μ L de méthanol / éthanol (105/95), et un échantillon de 10 μ L est injecté dans l'appareillage (chromatographe Spectra System P1000, Thermo Finnigan, équipé d'une colonne Thermo Hypersil 125 m de longueur * 4 mm de diamètre).

La phase mobile est constituée d'un mélange méthanol / éthanol (95/5) additionné de formate d'ammonium à 2 g/L.

Remarque :

Dans le cas de la mesure de l'activité vitaminique E globale des produits alimentaires utilisés dans l'étude de biodisponibilité, les différentes formes de la vitamine E ont été dosées par chromatographie liquide haute performance selon la norme NF ISO 9936 [7]. Ces analyses ayant été réalisées par un laboratoire extérieur (ITERG-Analyses) et ne concernant que ces trois produits, le principe de la norme ne sera pas détaillé dans ce chapitre.

III/ Estimation de l'oxydation

III. 1) Oxydation dans le produit fini : Indice de peroxyde (NF EN ISO 3960)

✓ **But**

Cette mesure permet de donner une image de l'altération de l'huile, dans les premiers stades de la réaction d'oxydation des lipides.

✓ **Principe**

L'indice de peroxyde permet d'évaluer la quantité de peroxydes présents dans un échantillon (ces composés étant les produits primaires de l'oxydation des lipides), et correspond à la quantité d'oxygène actif du peroxyde contenu dans une certaine masse de produit, capable d'être libéré dans les conditions de l'expérience.

✓ **Protocole**

La mesure de l'IP est effectuée dans le laboratoire de l'entreprise St Hubert selon la norme NF EN ISO 3960 [6].

Une masse de 1 g d'échantillon est dissoute dans un mélange chloroforme / acide acétique (2/3). Un millilitre de solution de iodure de potassium est ensuite ajouté, puis la solution est placée à l'abri de la lumière pendant 5 min.

L'iode libéré est titré avec une solution de thiosulfate de sodium (0,01 N), en utilisant de l'empois d'amidon comme indicateur coloré.

Un témoin (blanc), ne contenant pas de corps gras, est titré de la même manière, et sert de référence.

✓ **Résultat**

L'indice de peroxyde en microgramme d'oxygène actif par gramme de corps gras se détermine comme suit :

$$IP = \frac{(V - V_0)}{m} * N$$

Avec V : volume de thiosulfate de sodium nécessaire pour titrer le blanc (mL)

V_0 : volume de thiosulfate de sodium nécessaire pour titrer l'essai (mL)

N : normalité de la solution de thiosulfate de sodium (mol H^+ /L)

m : masse de l'échantillon (g)

III. 2) Oxydation dans l'organisme : Mesure des TBARs par spectrophotométrie

✓ **But**

Le but de cette méthode est d'estimer l'oxydation des lipides plasmatiques des rats par dosage de substances issues de cette réaction.

✓ **Principe**

Le principe de cette méthode est basé sur la réaction que peuvent avoir certains produits d'oxydation des lipides avec l'acide thiobarbiturique (TBA), en formant un pigment rouge dont un des maximums d'absorbance est situé à 532 nm. C'est le cas en particulier du malonalaldéhyde, qui est produit lors de l'oxydation d'acides gras insaturés, ce qui est pertinent dans le cadre de l'étude d'animaux nourris avec un régime enrichi en PUFA.

✓ **Protocole**

Un échantillon de 150 μ L de plasma est additionné de 15 μ L de BHT (protection contre l'oxydation) et de 30 μ L de soude (6 M). Cette solution est chauffée pendant 30 minutes à 60°C, puis 75 μ L d'acide perchlorique à 35% m/v sont ajoutés (solution A).

Extemporaneément, un mélange (B) est préparé, contenant 5 mL d'une solution d'acide trichloroacétique à 15% m/v dans de l'acide chlorhydrique, 5 mL d'une solution de TBA à 0,375% m/v dans de l'acide chlorhydrique et 5 mL d'acide chlorhydrique 0,2 N.

Un millilitre de mélange B est ajouté à la solution A, et le tout est chauffé pendant 30 minutes à 100°C.

Après refroidissement à température ambiante, 1,5 mL de butanol est ajouté, et la solution est centrifugée à 1500 g pendant 15 minutes (modèle CR 412, Jouan).

Le surnageant, contenant les TBARS, est enfin analysé en spectrophotométrie à 532 et 572 nm, contre un témoin « blanc » préparé sans plasma (spectrophotomètre UV Lambda Bio 20, Perkin Elmer).

✓ **Résultat**

La concentration en TBARS est déterminée à l'issue de l'analyse spectrophotométrique par la formule suivante :

$$TBARS = \left(\frac{DO_{532nm} - DO_{572nm}}{15400} \right) * \left(\frac{V_B}{V_E} \right)$$

Avec : DO_x : absorbance à la longueur d'onde x

V_B : volume de butanol exact ajouté (L)

V_E : volume de la prise d'essai (L)

IV/ Analyse de la texture des corps gras

IV. 1) Calorimétrie différentielle à balayage

✓ **But**

Cette technique, utilisée dans la thèse pour l'étude des matières grasses, permet d'évaluer la fusion et la cristallisation des différentes fractions d'un échantillon, que ce soit en terme d'énergie impliquée ou de température à laquelle les changements d'état se produisent.

✓ **Principe**

L'analyse par calorimétrie différentielle à balayage permet d'étudier les transformations physiques propres de l'échantillon, ainsi que ses réactions avec le milieu extérieur, les changements d'état étant associés à une libération ou à une absorption d'énergie.

Un dispositif à thermocouples mesure la différence de température entre l'échantillon et un témoin. Parce que l'analyse soustrait au flux d'énergie dégagé par l'échantillon celui d'un point de référence (témoin), elle est dite différentielle.

En soumettant l'échantillon à une variation contrôlée de température il est possible d'enregistrer les températures de changement d'état, la quantité d'énergie nécessaire pour faire varier la température de l'échantillon sans changement d'état, et la quantité d'énergie nécessaire pour les changements d'état.

Dans le cas des matières grasses, une réaction endothermique correspond à une fusion et une réaction exothermique à une cristallisation.

✓ **Protocole**

Une masse d'échantillon comprise entre 5 et 10 mg est introduite dans l'une des deux chambres de l'appareil (calorimètre différentiel à balayage, modèle PYRIS 1, Perkin Elmer), la seconde chambre laissée vide constituant le témoin.

Dans le cadre de cette étude, le balayage de température s'effectue comme suit : après refroidissement de l'échantillon à -50°C et stabilisation pendant 3 minutes, la température est augmentée de -50 à $+100^{\circ}\text{C}$ à une vitesse de 5°C par minute. La température de 100°C est finalement maintenue 3 minutes.

✓ **Résultats**

Les résultats sont exprimés sous forme d'un thermogramme reliant la température de l'échantillon à la variation d'enthalpie (énergie libérée ou absorbée).

IV. 2) Pénétrométrie

✓ **But**

La pénétrométrie est utilisée pour caractériser la texture des corps gras produits.

✓ Principe

Cette technique consiste à étudier la résistance opposée par un corps gras à la pénétration d'un mobile de géométrie connue, à vitesse constante, jusqu'à une profondeur définie.

✓ Protocole

L'appareillage est de type TAXT2i (Stable MicroSystems). L'analyse s'effectue sur le produit fini, en barquette complète de 250 g, à 6°C afin de simuler la température moyenne du réfrigérateur d'un consommateur.

Un cône (angle de 60° par rapport à l'horizontale) pénètre dans le produit à une vitesse de 2 mm/s, jusqu'à une profondeur de 20 mm, puis est retiré à la même vitesse.

La résistance opposée par le produit est mesurée par la force nécessaire à l'exécution du protocole, à partir du moment où le cône entre en contact avec la surface du produit.

✓ Résultats

Le graphe obtenu représente la force nécessaire pour exécuter le protocole (g), en fonction du temps (s) (figure I-1).

Trois caractéristiques de la texture du produit sont calculées à partir de ce profil, la dureté, la résistance, et l'adhérence :

- i) La dureté est mesurée par la force maximale nécessaire pour que le cône pénètre le produit, et est exprimée en grammes (F_{max}) ;
- ii) La résistance est évaluée par l'aire du pic positif généré par la pénétration du cône, et est exprimée en grammes*seconde (A_1) ;
- iii) Enfin, l'adhérence, qui représente le caractère collant du produit, est associée à la force nécessaire pour retirer le cône du produit. Elle est évaluée par l'aire du pic négatif, généré par le retrait du mobile, et est également exprimée en grammes*seconde (A_2).

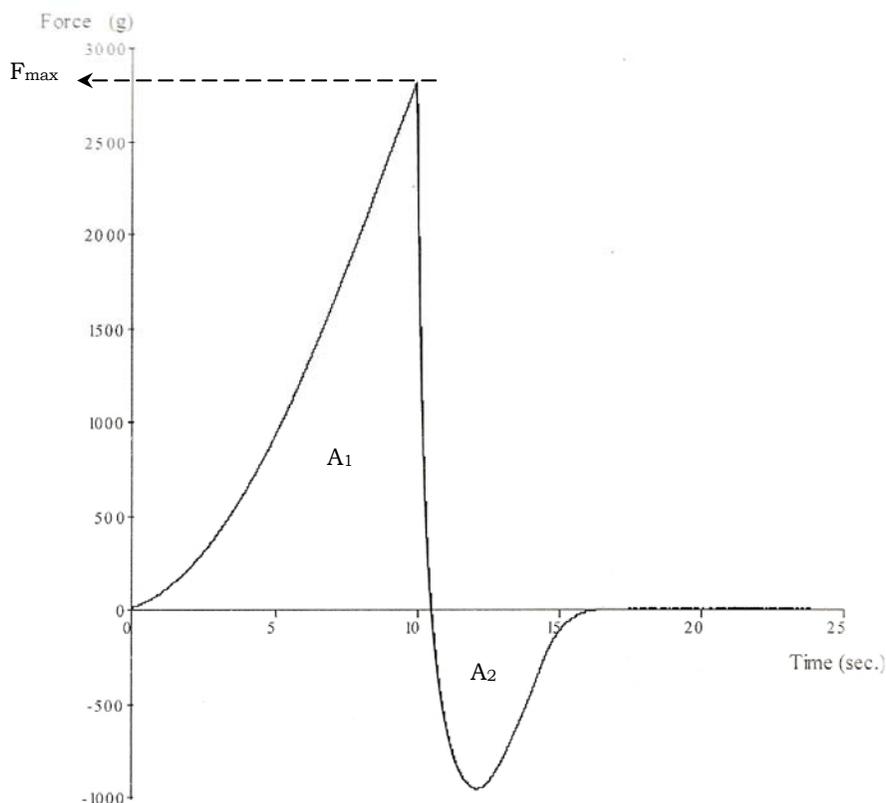


Figure I-1 : Graphe obtenu par analyse de pénétrométrie.

F_{max} : force maximale, représente la dureté, A_1 : aire représentant la résistance du produit, A_2 : aire représentant l'adhérence du produit.

REMERCIEMENTS PARTICULIERS

Les analyses concernant l'étude de biodisponibilité ayant été réalisées à l'ITERG-Nutrition, Talence, je tiens à remercier Laurence FONSECA, Leslie COUEDELO, Sabrina SERRANO et Carole VAYSSE pour leur aide technique.

Le suivi de l'oxydation des produits finis a été effectuée au laboratoire de l'usine St Hubert. Je remercie Jacqueline DOYEN, Pascale GROSS et les techniciennes pour avoir consacré du temps à mes nombreux essais.

L'analyse de pénétration des produits finis a été effectuée par David BARRET, de l'équipe R&D St Hubert, et l'analyse en chromatographie sur rod de la lécithine de soja a été réalisée par Michel LINDER, du LSGA. Je les en remercie donc tous les deux pour leur aide.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Denis PONCELET, Professeur, ENITIAA, Nantes

Monsieur Alain GRYNBERG, Directeur de Recherche, Université Paris Sud 11, Chatenay-Malabry

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame DUBOIS Virginie

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Etablissement et stabilisation d'une formulation lipidique équilibrée
nutritionnellement : résolution des problèmes de texture et de flaveur, et validation
nutritionnelle sur modèle animal"**

en vue de l'obtention du titre de :

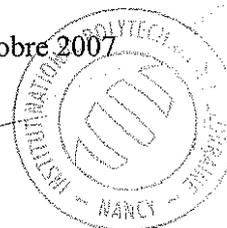
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 03 octobre 2007

Le Président de l'IN.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDOEUVRE CEDEX

