



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>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires
Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement
Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules

THÈSE

Présentée à l'INPL par

Nabila BELHAJ

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Nano-émulsion naturelle de phospholipides marins, issus d'un complexe phospholipopeptidique provenant d'un procédé de valorisation de co-produits de saumon, et applications à la vectorisation de molécules faiblement biodisponibles

Soutenue publiquement le 14 Novembre 2011 devant la commission d'examen

Rapporteurs Mr P. Villeneuve
Mr M. Guichardant

Directeur de recherche au CIRAD, Montpellier
Professeur à L'INSA, Lyon

Examineurs Mme B. Delplanque
Mme E. Arab Tehrany
Mr R. Soulimani
Mr F. Denis
Mr M. Linder

HDR, chargée de recherche, Université Paris-Sud
Maître de Conférences à l'ENSAIA-INPL, Nancy
Professeur à l'Université Paul Verlaine, Metz
Responsable R&D, Laboratoires Le Stum
Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy

Thèse Confidentielle

AVANT - PROPOS

Les travaux présentés dans cette thèse ont été essentiellement menés au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) à Nancy. Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur Joël SCHER, professeur à l'INPL et directeur du LIBio, de m'avoir accueilli dans le laboratoire.

Tout d'abord, je voudrais présenter mes plus vifs remerciements à Messieurs Michel et Raymond LE STUM des Laboratoires Le Stum, pour leur accompagnement ainsi que la mise à ma disposition des moyens logistiques et financiers pour réaliser les actions de recherche entreprises dans le cadre de ce projet. Les fréquentes rencontres et échanges ont contribué de manière substantielle à faire avancer mon travail et à favoriser sa réalisation.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Pierre VILLENEUVE, directeur de recherche au CIRAD (Montpellier) et à Monsieur Michel GUICHARDANT Professeur à L'INSA (Lyon) pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteurs.

Je remercie Monsieur Michel LINDER, professeur à l'ENSAIA, qui a dirigé mes travaux de recherche pour sa disponibilité, le temps qu'il a consacré à mon travail, et pour ses conseils et idées pertinentes. Sa compétence, son esprit critique et ses larges connaissances m'ont permis d'apprendre beaucoup à ses côtés sur le plan scientifique et relationnel au sein du laboratoire.

Je remercie Monsieur Frédéric DENIS, responsable de recherche et développement au sein des Laboratoires LE STUM, pour avoir co-encadré cette thèse et pour son aide, ses conseils, ses recommandations et sa disponibilité malgré la grande distance géographique.

Je remercie Madame Bernadette DELPLANQUE, chargée de recherche-HDR, à l'université paris sud pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

Je remercie particulièrement Madame Elmira ARAB-TEHRANY, maître de conférences à l'ENSAIA, pour son aide précieuse autant sur le plan scientifique que humain. Elle a su m'épauler, me soutenir et me conseiller tout au long de cette thèse. Pour tout cela, Merci.

Je remercie Monsieur Rachid SOULIMANI, Professeur à l'université Paul Verlaine, de nous avoir ouvert les portes de son laboratoire pour effectuer les différents tests comportementaux sur l'anxiété, ainsi que pour son encouragement, ses compétences et conseils scientifiques, son amitié et sa sympathie.

Je remercie également Madame Isabelle LARTAUD et Monsieur François DUPUIS de m'avoir permis de collaborer avec eux ainsi que pour leur sympathie, pour m'avoir accompagnée tout au long des test de biodisponibilités et pour leur précieux conseils techniques et scientifiques dans l'analyse et le traitement des résultats.

Je remercie l'équipe du Centre Alexis Vautrin et particulièrement Madame Muriel BARBERI-HEYOB et Mademoiselle Denise BECHET pour leur gentillesse, sympathie, rigueur et compétences scientifiques ainsi que pour m'avoir accueillie et appris les bonnes pratique de travail dans leur laboratoire.

Merci à l'équipe physico-chimie du LIBio d'avoir été là pour tous les moments difficiles de ma thèse, pour leur sympathie et leurs conseils. Un grand merci particulier à Carole PERROUD et Carole JEANDEL pour tout. Vous êtes adorables.

Mes remerciements vont à toutes les personnes du LIBio et des différents laboratoires qui m'ont accompagnée durant ces 4 années à l'ENSAIA: Thésards, chercheurs et personnels.

Merci à Céline GLEIZES, Frédéric DESOR et Mahmoud HASAN qui ont participé à ce travail, pour leur aide et leur motivation.

Merci tout particulier à Nidal, à Leïla et à Pascale, qui m'ont aidée, soutenue, réconfortée et accompagnée. Je remercie également Smail, Behnoush, Raza, Amira, Javeed, Majid, Thibaut, Charlotte, Jennifer, Citlali, et Yéléna.

Je tiens également à remercier mes amis qui m'ont écoutée et soutenue, merci à Quentin, Jihane, Alireza, Fazel, Safaa et Layal.

Enfin, mes remerciements, ma reconnaissance et toute ma gratitude sont adressés à mes parents et à ma petite sœur Majda qui ont su me soutenir et m'encourager tout au long de mon parcours. Sans oublier Amir Hossein pour son encouragement, son aide et le réconfort qu'il a pu me transmettre.

Avec amour, à mes chers parents.

Publications

Belhaj, N., Arab-Tehrany, E., and Linder, M. **2010**. Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process biochemistry*. 45(2), pp. 187-195.

M. Linder, **N. Belhaj**, P. Sautot, E. Arab Tehrany. **2010**. From Krill to whale: An overview of marine fatty acids and lipid compositions. *OCL. Oléagineux et Corps Gras Lipides*. 17(4). 194-204.

Kabri, T., Arab Tehrany, E., **Belhaj, N.**, Linder, M. **2011**. Physico-chemical characterization of nanoemulsion in cosmetic matrix enriched in omega-3. *Journal of Nanobiotechnology*. 9(41).

Communications orales

Linder, M., **Belhaj, N.**, Arab Tehrany, E. **2011**. Valorisation and biodisponibility of polyunsaturated fatty acids. Journée Chevreul-Lipids and Brain 2, Paris, France. 28-30 Mars.

Linder, M., **Belhaj, N.**, Sautot, P., Arab Tehrany, E. **2010**. Du Krill aux baleines: un panorama des compositions en lipides et acides gras marins. Journée Chevreul-Lipides marins, Paris, France. 23-24 Mars.

Belhaj, N., Denis, F., Arab Tehrany, E., Linder, M. **2010**. Lécithines marines : intérêt dans la vectorisation de molécules biofonctionnelles. Journée Chevreul-Lipides marins, Paris, France.

Linder, M., Maherani, B., **Belhaj, N.**, Arab Tehrany, E. **2010**. Marine phospholipids: a new source of LC- PUFA carriers improving the bioavailability of bioactive drugs. The 1st Annual World Congress of Nanomedicine, China. Integrative Nanotechnology for Biomedicine. October 23-25.

Arab Tehrany, E., **Belhaj, N.**, Fanni, J., and Linder, M. **2009**. Oxidative Kinetics of salmon oil in nanoemulsion. Euro Fed Lipid, Graz, Austria, 18-21 Octobre.

Linder, M., **Belhaj, N.**, Sautot, P., Arab Tehrany, E. **2009**. Nanoemulsion carriers: Interest of marine lecithin. 4èmes Journées Internationales d'Etudes sur les Lipides Casablanca MAROC, 3-5 décembre.

Linder M., **Belhaj, N.** **2009**. Les phospholipides : applications incontournables en nutrition. Les laboratoires Le Stum. Symposium Voies d'avenir en nutrition-santé, Palais des Congrès de Lorient. 28-29 novembre.

Sautot, P., **Belhaj, N.**, Arab Tehrany, E., Linder, M. **2009**. Extraction, purification and characterization of a marine phosphatidylcholine in presence of water. GERLI, Rennes, 3 july.

Communications écrites

Belhaj, N., Denis, F., Linder, M. **2010**. Coenzyme Q10: métabolisme et biodisponibilité. Séminaire de l'école doctorale (RP2E), Nancy, 28 Janvier.

Belhaj, N., Desor, F., Paris, C., Sautot, P., Arab Tehrany, E., Linder, M. **2009**. Improving the bioavailability of Coenzyme Q10: Physicochemical and pharmacokinetic characteristics of marine lecithin nanoparticulate formulations. Australian oilseeds federation, 27-30 september.

Belhaj, N., Linder, M., Arab Tehrany, E. **2008**. Physicochemical characterization of salmon oil in water emulsion stabilized by marine lecithin. Effect of natural antioxidants and temperature on the oxidative kinetics of nanoemulsions. 5th Lipidomics Congress Compiègne, 21-23 Octobre.

ABREVIATIONS

5-HT:	5-hydroxytryptamine (Serotonin)
Å:	Ångström
AA:	Acide arachidonique
AAL:	Acide α -linoléique
ACE:	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AE:	Apport énergétique
AGMI:	Acides gras monoinsaturés
AGPI:	Acides gras polyinsaturés
AGPI-LC:	Acides gras polyinsaturés à longue chaîne
AGS:	Acides gras saturés
AL:	Acide linoléique
ANC:	Apports nutritionnels conseillés
ANOVA:	Analyse de la variance
ANSES:	Agence nationale de sécurité sanitaire
AOAC:	Association of Official Agricultural Chemists
AOCS:	American Oil Chemists' Society
AP-1:	Activateur de la protéine 1
APCI:	Ionisation chimique à pression atmosphérique
APS:	Persulfate d'ammonium
ATP:	Adénosine triphosphate
ATR:	Réflexion totale atténuée
AUC:	Aire sous la courbe
BDNF:	Brain-derived neurotrophic factor
BF:	Bras fermés
BF₃:	Trifluorure de bore
BHA:	Butylhydroxyanisole
BHT:	Butylhydroxytoluène
BO:	Bras ouverts

CaCl₂:	Chlorure de calcium
CALIPSO:	Consommations alimentaires de poissons et produits de la mer et imprégnation aux éléments traces, polluants et oméga-3
CC:	Compartiment claire
CCK:	Cholécystokinine
CCM:	Chromatographie sur couche mince
CCO:	Chambre claire/obscur
Cellules STC-1:	Cellules dérivées de tumeurs intestinales de souris transgéniques
CID:	Collision-induced dissociation
CO:	Compartiment obscur
CO₂:	Dioxyde de carbone
CoQ₁₀:	Coenzyme Q ₁₀
CoQ₉:	Coenzyme Q ₉
COX:	Cyclo-oxygénase
CPG:	Chromatographie en phase gazeuse
CPG-IFD:	Chromatographie phase gaz avec détection à ionisation de flamme
CPLP:	Complexe phospholipopeptidique
Cu₂SO₄:	Sulfate de cuivre
DAG:	Diacylglycérols
DCFH:	Dichlorofluorescéine
DCFH-DA:	2'-7' diacetate dichlorofluoresceine
DH:	Degré d'hydrolyse
DHA:	Acide docosahexaénoïque
DLS:	Dynamic Light Scattering
DMSO:	Diméthylsulfoxyde
DPA:	Acide docosapentaénoïque
DPG:	Diphosphatidylglycérol
DSC:	Calorimétrie différentielle
DTT:	Dithiothreitol
EDTA:	Acide éthylène diamine tétraacétique,
EE:	Ethyl ester
ELD:	Electrophorese Laser Doppler

ENSAIA:	École nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires
EPA:	Acide eicosapentaénoïque
ESI:	Ionisation par électronébulisation
ESM:	Ecart type lié à la moyenne
ET:	Ecart type
FAM:	Flore mésophile aérobie
FAO:	Food and Agriculture Organization
FDR:	False Discovery Rate
FID:	Détecteur à ionisation de flamme
FSC:	Taille
FTIR:	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GABA:	Acide gamma-aminobutyrique
GL:	Glycolipides
GLK:	Glycolipides du Krill
GLS:	Glycolipides du saumon
H₂O₂:	Le peroxyde d'hydrogène
H₂SO₄:	Acide sulfurique
H₃BO₃:	Acide borique
HCL:	Acide chlorhydrique
HPLC:	Chromatographie liquide à haute performance
HPLC-MS:	High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
HPMC:	Hydroxypropyl Methylcellulose
IA:	Indice d'acide
ICP-MS:	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP-OES:	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
IgE:	Immunoglobuline E
Inc:	Incomptable
IP:	Indice de peroxyde
IQR:	Interquartile range
IS:	Indice de saponification
ISO:	International Organisation for Standardization
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry

kDa:	Kilo Dalton
KI:	Iodure de potassium
KOH:	hydroxyde de potassium
L-PC:	Lysophosphatidylcholine
LC:	Chromatographie liquide
LC-MS:	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
LDL:	Low-density lipoprotein
LiBio:	Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules
LiBO₂:	Lithium metaborate
LN:	Lipides neutres
LNK:	Lipides neutres du Krill
LNS:	Lipides neutres du saumon
LOX:	Lipoxygénase
LP:	Lipide polaire
LTK:	Lipides totaux du Krill
LTQ-MS:	Linear Trap Quadrupole-Mass Spectrometer
LTS:	Lipides totaux du saumon
MA:	Maladie d'Alzheimer
MAG:	Monoacylglycérols
ME:	Mobilité électrophorétique
MET:	Microscopie électronique à transmission
MG:	Matière grasse
MH:	Maladie de Huntington
MP:	Maladie de Parkinson
MS:	Spectroscopie de masse
Na₂SO₄:	Sulfate de potassium
NAD (P) H:	Nicotiamide Adenine Dinucléotide (phosphate) réduit
NAOH:	Hydroxyde de sodium
NF EN ISO:	Norme Européenne et internationale
NH₃:	ammoniaque (gaz)
NH₄⁺:	Ion ammonium
NMID FA:	Non-Methylene-Interrupted Dienoic Fatty Acid

NO:	Oxyde nitrique
nq:	Non quantifiable
NS:	Non significatif
NT:	Azote total
OGA:	Gélose glucosée à l'oxytétracycline
OIT:	Temps d'induction oxydatif
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé
PBS:	Phosphate buffered saline
PC:	Phosphatidylcholine
PE:	Phosphatidylétnanolamine
PF:	Perte au feu
PG:	Phosphatidylglycérol
Ph.Eur:	European Pharmacopoeia
PI:	Phosphatidylinositol
PITC:	Phénylthiocyanate
PL:	Phospholipides
PLK:	Phospholipides du Krill
PLS:	Phospholipides du saumon
PLSD:	Protected least significant difference
PS:	Phosphatidylsérine
PUFA:	Polyunsaturated fatty acids
PZ:	Potentiel Zeta
ROS:	Espèces réactives à l'oxygène
SARM:	Service d'analyse des roches et des minéraux
SDS:	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE:	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLA:	Sclérose latérale amyotrophique
SOD:	Super Oxyde Dismutase
SRM:	Single reaction monitoring
SSC:	Granulosité
SVF:	Sérum de veau fœtal
TAG/TG:	Triacylglycérols

TBX:	Gélose-Agar-Terreno
TCA:	Acide trichloroacétique
TDAH:	Trouble de déficit de l'attention / hyperactivité
TEMED:	N,N,N',N'-tétraméthyl-éthane-1,2-diamine
Tf:	Température de fusion
THBQ:	Tertiobutylhydroquinone
TNFα:	Tumor necrosis factor-alpha
TSB-YE:	Bouillon Trypcase Soja + extrait de levure
U.S.EPA:	United States Environmental Protection Agency
UA:	Unité arbitraire
UCP2:	Mitochondrial uncoupling protein 2
UFC:	Unité formant colonie
USA:	United States of America
UV:	Ultra violet
VLDL:	Very low-density lipoprotein
VRBL:	La gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre
ZM:	Zone médium
ZP:	Zone périphérique

Sommaire général

1	Introduction générale	21
2	Synthèse bibliographique	27
2.1	Lipides d'origine marine	33
2.1.1	Structure et nomenclature des lipides	33
2.1.2	Lipides simples.....	33
2.1.3	Lipides complexes.....	34
2.1.4	Synthèse des acides gras polyinsaturés à partir des acides gras essentiels.....	38
2.2	Le métabolisme des acides gras	40
2.2.1	Biodisponibilité des acides gras.....	40
2.2.2	Distribution régio-spécifique des acides gras sur le glycérol	43
2.3	Oxydation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne vectorisés sous forme de triacylglycérols, phospholipides ou esters éthyliques	46
2.3.1	Les réactions d'oxydation	46
2.3.2	Comportement des AGPI-LC sous forme de phospholipides, triacylglycérols ou d'esters éthyliques face aux réactions d'oxydation	51
2.4	Sources d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne	54
2.4.1	Le plancton	54
2.4.2	Le Krill	55
2.4.3	Le poisson : source d'acides gras oméga-3	56
2.4.4	Acides gras omega-3 et santé.....	63
2.4.5	Evolution du marché des acides gras oméga-3	65
2.4.6	Teneur recommandée en AGPI-LC dans différents pays.....	71
2.4.7	Positionnement du Vectoméga® face au marché des compléments alimentaires riches en AGPI-LC	72
2.4.8	Retour sur les différents procédés d'extraction des huiles et lécithines marines	73
2.5	Les peptides d'origine marine	77
2.5.1	Propriétés des peptides issus de produits marins.....	78
2.5.2	Exemples de peptides de saumon identifiés	82
2.6	Evaluation de l'anxiété et du stress oxydant	82
2.6.1	Anxiété et modèle murin.....	82
2.6.2	Rappel sur le stress oxydant.....	85
2.7	Les lipides utilisés en tant que vecteurs	86
2.7.1	Les nano-émulsions	86
2.7.2	Vectorisation des molécules bioactives lipophiles.....	88

3	Matériels et méthodes	97
3.1	Procédé d'obtention de la lécithine de saumon.....	105
3.1.1	Matière première	105
3.1.2	Les enzymes protéolytiques utilisées	105
3.1.3	La solution alcaline	106
3.1.4	Gaz inerte	107
3.1.5	Le procédé d'extraction.....	107
3.2	Analyses physicochimiques du CPLP.....	108
3.2.1	Matière sèche	108
3.2.2	Dosage de la teneur en azote (AOAC, norme 960.52, 1997).....	108
3.2.3	Dosage des minéraux	109
3.2.4	Teneur en cendres (AOAC, norme 923.03, 1997).....	109
3.2.5	Taux d'humidité.....	109
3.2.6	Analyses microbiologiques du CPLP	110
3.2.7	Teneur en lipides totaux.....	110
3.3	Analyses physicochimiques des lipides.....	110
3.3.1	Composition en acides gras.....	111
3.3.2	Détermination des classes lipidiques	112
3.3.3	Séparation des différentes fractions lipidiques sur colonne de silice	113
3.3.4	Indice d'acide (NF EN ISO, 660, 1999)	113
3.3.5	Indice de peroxyde (AOAC, norme 965.33, 1997).....	114
3.3.6	Indice de saponification (AOAC, norme 920.160, 1997)	114
3.3.7	Réiodistribution	115
3.3.8	Suivi de l'oxydation des lipides totaux par spectroscopie infrarouge.....	118
3.4	Analyse physicochimique de la partie peptidique	119
3.4.1	Détermination de la distribution de taille des peptides.....	120
3.4.2	Détermination de la taille des peptides en SDS-PAGE	120
3.4.3	Dosage des acides aminés	121
3.4.4	Protéomique : Analyse de l'hydrolysate peptidique de saumon par nano-LC-LTQ-Orbitrap-XL	121
3.5	Etude de l'effet du CPLP et de ses composants lipidiques et peptidiques sur l'anxiété et le statut oxydant des neurones.....	123
3.5.1	Objectifs et planification des manipulations.....	123
3.5.2	Les différentes doses	124
3.5.3	Les différents régimes de traitement	125

3.5.4	Animaux et conditions d'hébergement.....	125
3.5.5	Etudes comportementales	126
3.5.6	Evaluation de l'effet du CPLP sur le statut oxydatif des neurones par cytométrie en flux	130
3.5.7	Analyses statistiques	134
3.6	Formulation d'un complément alimentaire à base de Coenzyme Q₁₀.....	134
3.6.1	Etude de la solubilité du CoQ ₁₀ dans l'huile de saumon.....	134
3.6.2	Préparation des différentes formulations contenant le CoQ ₁₀	135
3.6.3	Taille des particules, mobilité électrophorétique et indice de polydispersité	135
3.6.4	Microscopie électronique à transmission (MET).....	136
3.6.5	Mesure de la stabilité des émulsions	136
3.6.6	Biodisponibilité du CoQ ₁₀ <i>in vivo</i>	137
3.6.7	Quantification du CoQ ₁₀ dans le plasma.....	139
3.6.8	Analyses statistiques	140
3.7	Formulation d'un complément alimentaire à base de curcumine	140
3.7.1	Etude de la solubilité de la curcumine dans des huiles	140
3.7.2	Analyse thermique des huiles et de la curcumine par calorimétrie différentielle (DSC)	140
3.7.3	Détermination du temps d'induction oxydatif (OIT) par calorimétrie différentielle à balayage.....	141
3.7.4	Préparation des différentes formulations contenant la curcumine.....	141
3.7.5	Taille des particules, mobilité électrophorétique et indice de polydispersité	141
3.7.6	Mesure de la stabilité des émulsions	141
3.7.7	Evaluation de l'activité anticancéreuse de la curcumine	142
4	Résultats et discussion	145
4.1	Le procédé d'extraction par voie enzymatique	155
4.1.1	La matière première	155
4.1.2	Caractérisation de la partie lipidique du CPLP	164
4.1.3	Caractérisation de la partie peptidique du CPLP	181
4.2	Effet des fractions lipidique et peptidique du CPLP sur l'anxiété et le stress oxydant ..	188
4.2.1	Suivi pondéral des souris en fonction du régime administré	188
4.2.2	Etude comportementale : Evaluation de l'effet des traitements sur l'anxiété.....	189
4.2.3	Evaluation par cytométrie en flux du statut oxydant neuronal des souris et de l'effet cytoprotecteur des régimes administrés.....	199

4.3	Vectorisation de molécules bioactives	205
4.3.1	Formulation d'émulsions à base de la fraction lipidique du CPLP, vectrices de molécules bioactives.....	205
4.3.2	Vectorisation et biodisponibilité du coenzyme Q ₁₀	213
4.3.3	Vectorisation et effet anticancéreux de la curcumine	222
5	Conclusions et perspectives	231
6	Références bibliographiques.....	237
7	Résumé	261

1 Introduction générale

Les ressources halieutiques représentent un formidable gisement potentiel de molécules bio-fonctionnelles qui intéressent les domaines de l'agro-alimentaire, de la nutraceutique et du monde médical. Parmi ces composés, les lipides marins, riches en acides gras polyinsaturés à longue chaîne, sont principalement extraits d'espèces de poisson à faible valeur ajoutée ou de petits pélagiques. Les deux chefs de file des acides gras de la série oméga-3, à savoir les acides éicosapentaénoïque et docosahexaénoïque, sont présents en quantité importante dans les lipides de poisson dits « gras » comme l'anchois, la sardine, le hareng mais aussi le saumon. Les organisations mondiales (FAO, OMS...) s'accordent sur le fait que, dans la plupart des sociétés, la consommation en acides gras polyinsaturés à longue chaîne de type oméga-3 (AGPI-LC- ω 3) reste très faible. De nombreuses études montrent que nos besoins en acides gras de la série oméga 6 sont largement couverts par les régimes occidentaux, ce qui tend à augmenter le ratio oméga 6/oméga-3 qui devrait tendre vers 5, selon l'agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES, 2010). Aujourd'hui, ce ratio atteint des valeurs très différentes en fonction des populations, des modes de vie et des habitudes alimentaires. Pour illustrer cette évolution, une étude du Professeur Simopoulos (2011) avance des valeurs de 50 pour ce ratio en Europe et aux USA, 12 au Japon et de 1 chez les esquimaux du Groenland (Simopoulos, 2011).

De nombreuses études montrent qu'un déficit en oméga-3, notamment en EPA et DHA peut être à l'origine de problèmes de santé (stress, maladie cardiovasculaire, réponses immunitaires, maladies inflammatoires...). Ces acides gras jouent un rôle important au niveau du système nerveux central, sur le développement cognitif, l'apprentissage, la plasticité des neurones, la synaptogénèse ainsi que dans la transmission synaptique (Mazza *et al.*, 2007).

Dans le but de rééquilibrer ce ratio, les recommandations en France présentent de nouveaux apports nutritionnels conseillés (ANC) en EPA et DHA de 250 mg/jour/adulte pour chacun de ces deux AGPI-LC. Il est intéressant de noter que toutes les recommandations des organisations mondiales, en acides éicosapentaénoïque et docosahexaénoïque, dépassent en moyenne les 200 mg/jour (Bockisch, 2010).

Afin de répondre à cette demande, le marché mondial des huiles marines a connu ces dernières années, un développement de produits permettant une supplémentation en oméga-3. Estimé à plus de 700 millions de dollars avec une augmentation annuelle de 8% (Clough, 2008), où l'Australie et l'Espagne sont les leaders (Mellentin, 2008), les compléments alimentaires mis à la disposition du consommateur, sont formulés à partir d'huiles de poisson généralement extraites de petits pélagiques, de co-produits de l'industrie de sauriserie, du Krill et de micro-algues.

Depuis 10 ans, les Laboratoires Le Stum commercialisent un complément alimentaire à base d'un complexe phospholipopeptidique de têtes de saumon, extrait sans solvant organique. Ce produit permet d'apporter une fraction lipidique riche en AGPI-LC-oméga-3 estérifiés sur des phospholipides et sur des triacylglycérols, en même temps qu'une fraction peptidique constituée d'hydrolysats marins.

Cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux de recherche menés au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules sur ce complexe phospholipopeptidique, afin d'élucider les effets de synergie des différentes fractions lipidiques et peptidiques. Le complexe phospholipopeptidique, extrait à partir d'un procédé enzymatique breveté, respectueux de l'environnement utilise comme substrat les co-produits de l'industrie de filetage et plus précisément les têtes de saumon, riches en phospholipides. En effet, le saumon est largement consommé en France et dans le monde, suite aux recommandations nutritionnelles des organisations pour la santé ainsi qu'aux études scientifiques effectuées prouvant les effets des oméga-3 sur la santé. Actuellement, la production mondiale du saumon d'aquaculture (*Salmo salar*) est en pleine expansion, représentant 90% du marché du saumon d'élevage avec un million de tonnes en 2007, et plus de 50% du marché global du saumon (Jones, 2012).

Ce travail de thèse a été élaboré dans le cadre d'une bourse CIFRE en partenariat avec les Laboratoires Le Stum et l'ENSAIA. Il a pour objectif général, de mettre en évidence une double vectorisation de molécules, faiblement bio-disponibles dans une matrice nano-émulsionnée et stabilisée par des phospholipides, naturellement riches en EPA et DHA. Le Coenzyme Q₁₀ et la curcumine ont été choisis comme molécules à vectoriser par le biais de ce vecteur.

La première étape a consisté à caractériser d'un point de vue physicochimique, les différentes fractions lipidiques, polaires et neutres, en termes de composition et de régio-

distribution des AGPI-LC. Une analyse comparative des acides gras estérifiés sur les principaux phospholipides (phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine) du saumon et du Krill a été effectuée après action de la phospholipase A₂.

Les analyses de composition en acides aminés, des minéraux et des peptides par protéomique ont été réalisées afin de connaître l'influence sur l'anxiété de chacune des fractions du complexe, dans le cadre d'une étude sur modèle murin. L'effet du complexe phospholipopeptidique et ses fractions sur le statut oxydatif endogène des neurones de souris traitées, a d'autre part été mis en évidence.

Après avoir formulé des nano-émulsions stabilisées par les phospholipides du complexe phospholipopeptidique (150-220 nm), nous avons testé *in vitro* et *in vivo* leur efficacité sur la biodisponibilité des molécules testées. Différentes formulations, vectorisant le coenzyme Q₁₀, ont été introduites par voie orale chez des rats cathétérisés. La concentration plasmatique de coenzyme Q₁₀ retrouvée dans la circulation sanguine des animaux a été mesurée pour chaque formulation administrée. L'efficacité de la vectorisation sur l'activité anticancéreuse de la curcumine a été également étudiée sur une lignée de cellules cancéreuses de type MCF7.

Le présent document présente trois chapitres. La première partie regroupe une synthèse bibliographique permettant de faire un point sur l'ensemble des techniques d'extraction, les effets des AGPI-LC, les produits existants, avant de présenter le contexte du projet. Le deuxième chapitre concerne l'approche méthodologique (physicochimique, *in vitro* et *in vivo*), utilisée pour ce travail. Enfin, le dernier chapitre présente les résultats expérimentaux les plus pertinents obtenus à la fois à l'échelle scientifique et industrielle.

2 Synthèse bibliographique

Sommaire

2.1	Lipides d'origine marine	33
2.1.1	Structure et nomenclature des lipides	33
2.1.2	Lipides simples.....	33
2.1.3	Lipides complexes.....	34
2.1.3.1	Les glycérophospholipides.....	35
2.1.3.2	Les sphingolipides.....	37
2.1.4	Synthèse des acides gras polyinsaturés à partir des acides gras essentiels.....	38
2.2	Le métabolisme des acides gras	40
2.2.1	Biodisponibilité des acides gras.....	40
2.2.2	Distribution régio-spécifique des acides gras sur le glycérol	43
2.2.2.1	Régio-distribution des acides gras sur les TAG	43
2.2.2.2	Régio-distribution des acides gras sur les phospholipides	44
2.3	Oxydation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne vectorisés sous forme de triacylglycérols, phospholipides ou esters éthyliques	46
2.3.1	Les réactions d'oxydation	46
2.3.1.1	Principaux antioxydants utilisés	49
2.3.1.1.1	Les antioxydants de synthèse	49
2.3.1.1.2	Les antioxydants naturels	50
2.3.1.1.3	Méthodes de mesure du taux d'oxydation.....	50
2.3.2	Comportement des AGPI-LC sous forme de phospholipides, triacylglycérols ou d'esters éthyliques face aux réactions d'oxydation	51
2.4	Sources d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne	54
2.4.1	Le plancton	54
2.4.2	Le Krill	55
2.4.3	Le poisson : source d'acides gras oméga-3	56
2.4.3.1	Captures et consommation	56
2.4.3.2	Teneur en lipides et composition en acides gras.....	57
2.4.3.3	Effet de l'alimentation et des saisons sur la composition en acides gras des poissons	61
2.4.4	Acides gras omega-3 et santé.....	63
2.4.5	Evolution du marché des acides gras oméga-3	65
2.4.6	Teneur recommandée en AGPI-LC dans différents pays.....	71
2.4.7	Positionnement du Vectoméga® face au marché des compléments alimentaires riches en AGPI-LC	72
2.4.8	Retour sur les différents procédés d'extraction des huiles et lécithines marines	73
2.4.8.1	Méthode d'extraction des huiles.....	73

2.4.8.2	Extraction de la lécithine marine	75
2.5	Les peptides d'origine marine	77
2.5.1	Propriétés des peptides issus de produits marins	78
2.5.1.1	Activité antioxydante	78
2.5.1.2	Activité hypoallergénique	80
2.5.1.3	Propriétés anticoagulantes	80
2.5.1.4	Propriétés antihypertensives	81
2.5.1.5	Propriétés antimicrobiennes	81
2.5.1.6	Satiété et intestin	81
2.5.2	Exemples de peptides de saumon identifiés	82
2.6	Evaluation de l'anxiété et du stress oxydant	82
2.6.1	Anxiété et modèle murin	82
2.6.1.1	Modèles d'évaluation de l'anxiété	83
2.6.1.2	Le système de neurotransmission régulateur de l'anxiété	85
2.6.1.2.1	Le système GABAergique	85
2.6.1.2.2	Le système sérotoninergique	85
2.6.2	Rappel sur le stress oxydant	85
2.6.2.1	Définition du stress oxydant	85
2.6.2.2	Les sources des ROS	86
2.7	Les lipides utilisés en tant que vecteurs	86
2.7.1	Les nano-émulsions	86
2.7.1.1	Stabilité physique	87
2.7.1.2	Méthodes de préparation des émulsions	88
2.7.2	Vectorisation des molécules bioactives lipophiles	88
2.7.2.1	Le Coenzyme Q ₁₀	88
2.7.2.2	La curcumine	93
2.7.2.2.1	Propriétés antioxydantes	94
2.7.2.2.2	Les propriétés anti-cancéreuses	94
2.7.2.2.3	Les propriétés anti-hépatotoxiques des curcuminoïdes	95
2.7.2.2.4	Les propriétés anti-inflammatoires des curcuminoïdes	95
2.7.2.2.5	Les propriétés neuroprotectrices des curcuminoïdes	95

Liste des figures

Figure 2:1 Classification des lipides.....	34
Figure 2:2 Structure chimique d'un triacylglycérol (R1, R2 et R3 : Acides gras).....	34
Figure 2:3 Structure chimique des différents phospholipides	35
Figure 2:4 Structure chimique d'un PG.....	36
Figure 2:5 Structure chimique d'un DPG	36
Figure 2:6 Structure d'un plasmalogène	36
Figure 2:7 Structure chimique d'un sphingolipide	37
Figure 2:8 Structure chimique d'un céramide	37
Figure 2:9 Structure chimique d'une sphingomyéline liée à un acide gras (R).....	38
Figure 2:10 Structure chimique d'un glycolipide lié à un acide gras (R).....	38
Figure 2:11 Voies métaboliques de synthèse du DHA et de l'AA (Schmitz and Ecker, 2008).....	40
Figure 2:12 Schéma récapitulatif de la digestion des lipides	42
Figure 2:13 Cinétique d'oxydation des acides gras insaturés.....	46
Figure 2:14 Représentation schématique du mécanisme réactionnel de l'auto-oxydation des lipides (Villière and Genot, 2006)	48
Figure 2:15 Equations des réactions d'oxydation des acides gras	49
Figure 2:16 Tonnage des 10 premières espèces de poisson pêchées dans le monde (FAO, 2007).....	57
Figure 2:17 Les différentes sources actuelles d'AGPI-LC (Frost and Sullivan, 2010).....	66
Figure 2:18 Modélisation du comportement d'anxiété chez la souris.....	83
Figure 2:19 Effets anxiolytique et anxiogène de substances pharmacologiques	83
Figure 2:20 Structure chimique du coenzyme Q ₁₀	89
Figure 2:21 Structure chimique de la curcumine.....	93

Liste des tableaux

<i>Tableau 2:1 Les méthodes les plus utilisées pour identifier les acides gras estérifiés sur des TAG</i>	44
<i>Tableau 2:2 Les méthodes les plus utilisées pour identifier les acides gras estérifiés sur des phospholipides.....</i>	45
<i>Tableau 2:3 Le contenu en vitamine A, β-carotène et α-tocophérol dans l'huile extraite de la perche du Nil en fonction de sa taille (mg/100g d'huile) (Ogwok et al., 2008).....</i>	50
<i>Tableau 2:4 Méthodes classiques de l'évaluation de la qualité des huiles, des produits d'oxydation et d'autres composées lipidiques (Curtis, 2007).....</i>	51
<i>Tableau 2:5 Changement de la composition en acides gras des différentes classes lipidiques après une auto-oxydation à 25°C pendant 10 semaines (Song et al., 1997).....</i>	53
<i>Tableau 2:6 Composition en acides gras du phytoplancton et de quatre espèces différentes de micro algues (Devos et al., 2006; Linder et al., 2010).....</i>	54
<i>Tableau 2:7 : Composition en lipides de copépodes de l'Océan Antarctique (Hagen and Auel, 2001)</i>	55
<i>Tableau 2:8 Composition en acides gras de trois espèces parmi les six espèces de Krill commercialisés (Ju and Harvey, 2004).....</i>	56
<i>Tableau 2:9 Pourcentage en lipides, EPA et DHA du hareng en fonction de la période et du lieu des captures (Jensen et al., 2007; Linder et al., 2010).....</i>	58
<i>Tableau 2:10 Teneur en lipides en g/100g d'échantillon sec de trois poissons, la sardine, l'anchois et le picarel en fonction des saisons (Jensen et al., 2007; Linder et al., 2010).....</i>	58
<i>Tableau 2:11 Moyenne de la composition en quelques acides gras des poissons frais et surgelés consommés en France (mg/100g de lipides)*.....</i>	59
<i>Tableau 2:12 Pourcentage des acides gras de la famille des omega3 et le ratio n-6/n-3 des huiles de sources végétales utilisées en aquaculture (Pickova and Morkore, 2007).....</i>	61
<i>Tableau 2:13 Composition en acides gras de saumon d'origines marines différentes (%)</i>	62
<i>Tableau 2:14 Quantité d'EPA et de DHA chez quelques poissons en g/100g de poisson cru.....</i>	62
<i>Tableau 2:15 Prévention et traitements de certaines maladies par les AGPI-LC</i>	65
<i>Tableau 2:16 Compilation des produits commercialisés en concurrence avec le Vectomega®.....</i>	67
<i>Tableau 2:17 Moyenne minimale quotidienne d'EPA+DHA d'après les recommandations de différents pays (Bockisch, 2010)</i>	72
<i>Tableau 2:18 Exemple de techniques courantes d'extraction des lipides par solvants organiques</i>	74
<i>Tableau 2:19 Brevets portant sur l'extraction de l'huile de poisson (Rubio-Rodriguez et al., 2010).....</i>	74
<i>Tableau 2:20 Brevets d'extraction des phospholipides marins par solvants organique.....</i>	76
<i>Tableau 2:21 Brevets d'obtention des phospholipides par voie enzymatique</i>	77
<i>Tableau 2:22 Enzymes utilisées dans la production d'hydrolysats.....</i>	78
<i>Tableau 2:23 Quelques séquences de peptides antioxydants d'origine marine identifiées dans la littérature....</i>	79
<i>Tableau 2:24 Les peptides bioactifs les plus connus chez le saumon.....</i>	82
<i>Tableau 2:25 Différentes maladies liées à un déficit en CoQ₁₀.....</i>	90
<i>Tableau 2:26 Mode de vectorisation et biodisponibilité du CoQ₁₀.....</i>	91

2.1 Lipides d'origine marine

2.1.1 Structure et nomenclature des lipides

Les lipides sont généralement divisés en deux grands groupes ; les lipides simples et les lipides complexes (Figure 2:1). Les acides gras sont des molécules organiques composées d'une chaîne carbonée terminée par un groupement carboxylique (-COOH) et d'un groupement méthyle (-CH₃) à l'autre extrémité. Ils se caractérisent par la longueur de leur chaîne carbonée, le nombre de doubles liaisons et la position de celles-ci sur la chaîne aliphatique. On distingue ainsi les acides gras saturés (AGS) n'ayant aucune double liaison, monoinsaturés (AGMI) présentant une seule double liaison, et polyinsaturés (AGPI) présentant plusieurs doubles liaisons (2 à 6).

2.1.2 Lipides simples

Les lipides simples ou neutres sont des molécules complètement apolaires, insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques (diéthyl éther, hexane, benzène, chloroforme et méthanol). Principalement composée d'une chaîne aliphatique terminée par un groupement carboxylique, la structure de ces molécules peut présenter différentes configurations par la présence d'une ou plusieurs liaisons éthyléniques, permettant un classement en plusieurs catégories.

Parmi les AGPI, on retrouve 4 familles en fonction de la position de la première insaturation par rapport au groupement méthyle N terminal : n-7 (oméga 7), n-9 (oméga 9), n-6 (oméga 6) et n-3 (oméga-3). Ces acides gras peuvent être estérifiés sur un squelette de glycérol donnant naissance à des monoacylglycérols (MAG), des diacylglycérols (DAG) ou des triacylglycérols (TAG) (Christie, 2003).

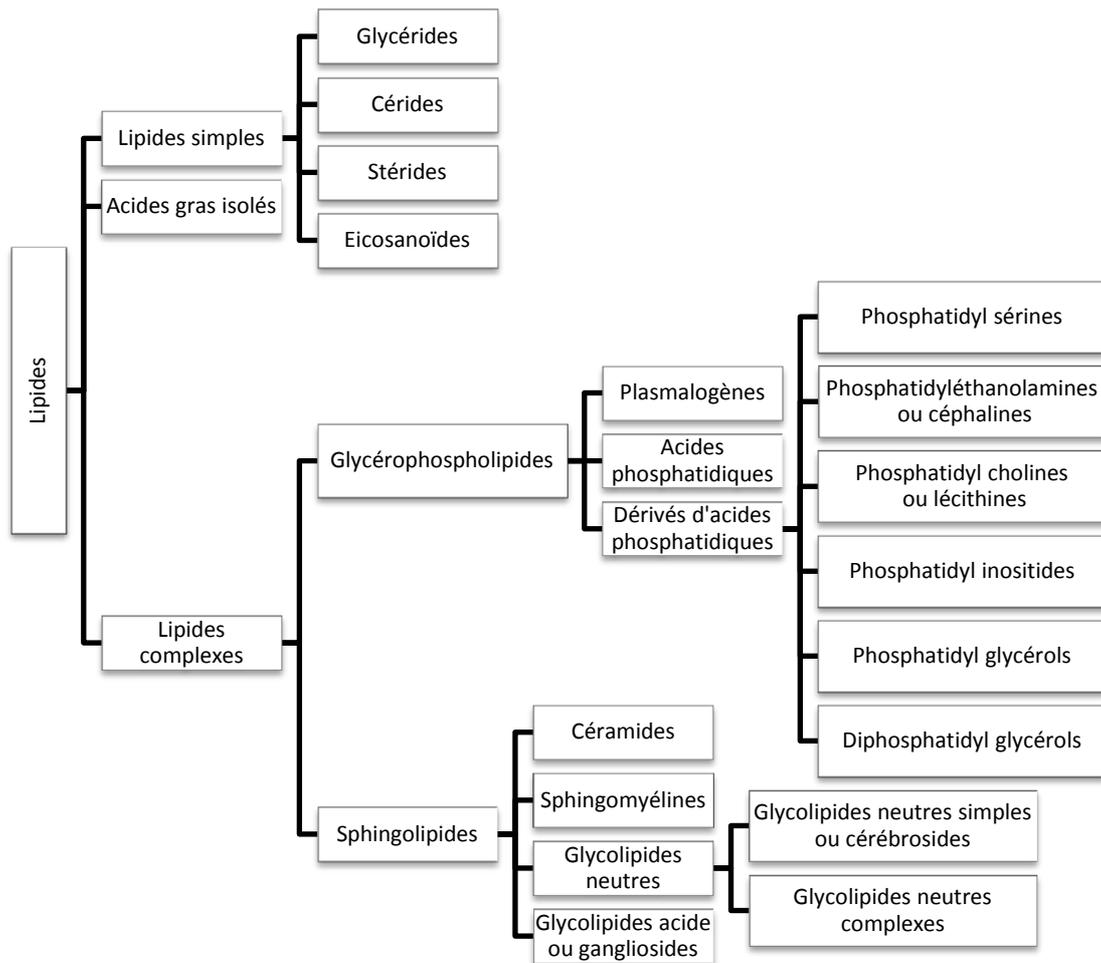


Figure 2:1 Classification des lipides

Les huiles commerciales obtenues après raffinage sont généralement composées de triacylglycérols représentés sur la Figure 2:2.

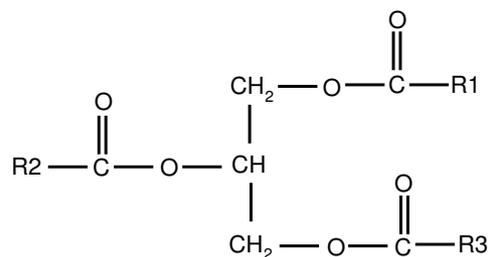


Figure 2:2 Structure chimique d'un triacylglycérol (R1, R2 et R3 : Acides gras)

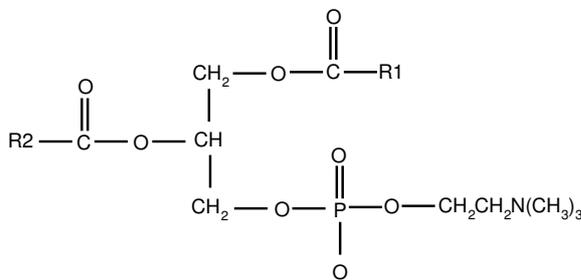
2.1.3 Lipides complexes

Les lipides complexes représentent la classe des lipides contenant le phosphore, généralement sous forme d'esters d'acide phosphorique (H₃PO₄) mais aussi parfois sous

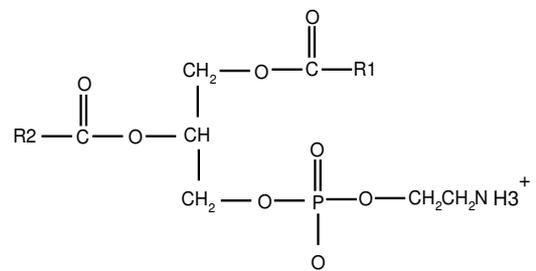
forme d'acide phosphonique (H_3PO_3) qui est très instable (Christie, 2003; Wang, 2008). Les phospholipides (PL) sont divisés en deux sous classes : les glycérophospholipides et les sphingolipides.

2.1.3.1 Les glycérophospholipides

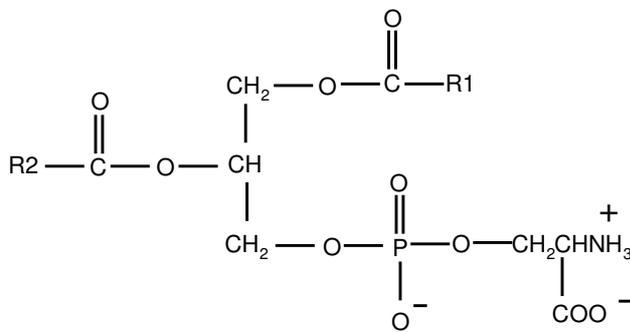
L'élément de base constituant cette sous classe de phospholipides est l'acide phosphatidique qui est constitué d'un glycérol sur lequel sont estérifiés deux acides gras et un acide phosphorique (H_3PO_4). En s'associant à un alcool de type sérine, choline, éthanolamine ou inositol, l'acide phosphatidique forme respectivement la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et le phosphatidylinositol (PI) (Figure 2:3).



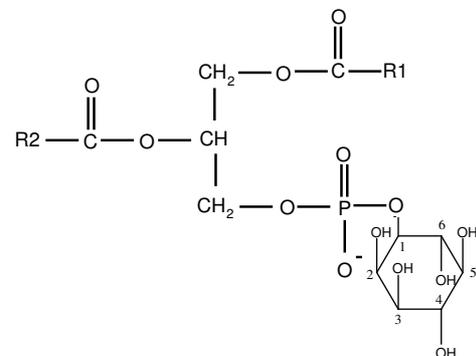
Structure chimique de la PC



Structure chimique de la PE



Structure chimique de la PS



Structure chimique du PI

Figure 2:3 Structure chimique des différents phospholipides

Le phosphatidylglycérol (PG) et le diphosphatidylglycérol (DPG) appelé aussi la cardiolipine sont composés d'une deuxième molécule de glycérol (Figure 2:4). La cardiolipine a été découverte dans les cellules cardiaques d'où son nom (Figure 2:5).

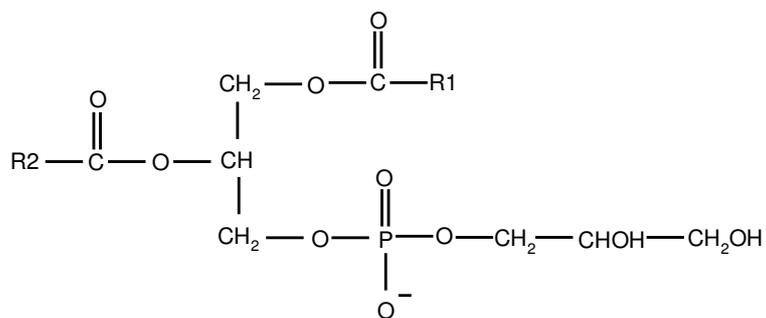


Figure 2:4 Structure chimique d'un PG

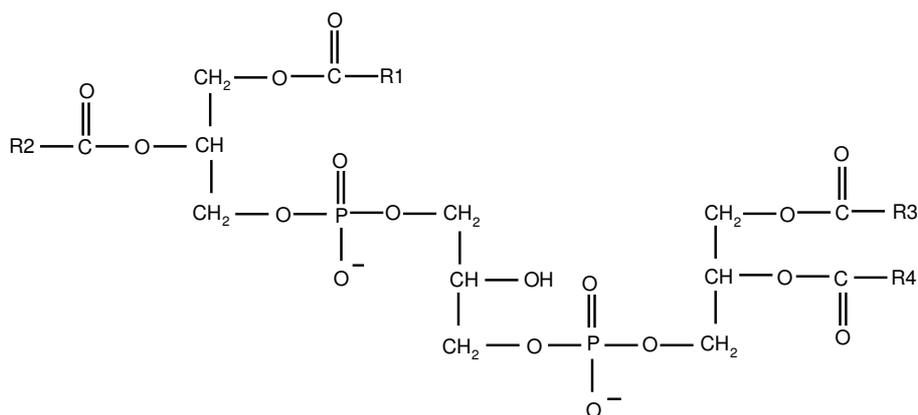


Figure 2:5 Structure chimique d'un DPG

Les plasmalogènes ou étherphospholipides (Figure 2:6) sont des dérivés des glycérophospholipides ayant la même structure que les acides phosphatidiques. L'alcool gras est lié au premier carbone du glycérol par une liaison vinyl-éther au lieu d'une liaison ester.

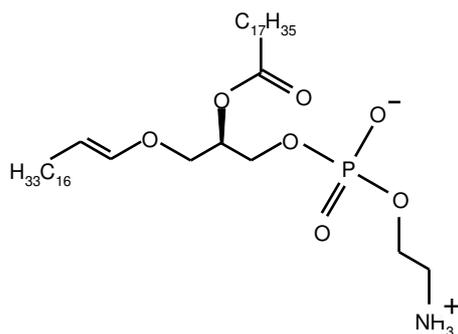


Figure 2:6 Structure d'un plasmalogène

Le groupement phosphate peut être lié à la sérine, la choline, l'éthanolamine ou l'inositol. Les plus abondants dans la nature restent les plasmalogènes avec un groupement choline ou éthanolamine.

2.1.3.2 Les sphingolipides

Les sphingolipides (Figure 2:7) sont constitués d'une sphingosine liée à un acide gras par sa fonction NH_2 . Les sphingolipides sont des lipides non essentiels pour la croissance et pour la synthèse d'énergie. Cependant, malgré leur faible digestion, les sphingolipides interagissent dans le lumen gastrique avec les stérols inhibant l'absorption du cholestérol. En plus de leur effet anti-cholestérolémiant, les sphingolipides influencent le métabolisme des triacylglycérols et présentent des effets antitumoraux au niveau de l'intestin, dont les mécanismes d'action sont encore mal connus (Nilsson, 2008).

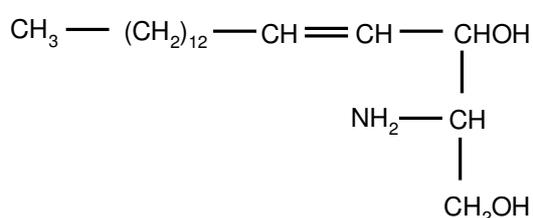


Figure 2:7 Structure chimique d'un sphingolipide

Le plus simple des sphingolipides est le céramide (Figure 2:8), dont l'acide gras lié à la fonction NH_2 de la sphingosine est soit saturé ou monoinsaturé (16 à 24 carbones).

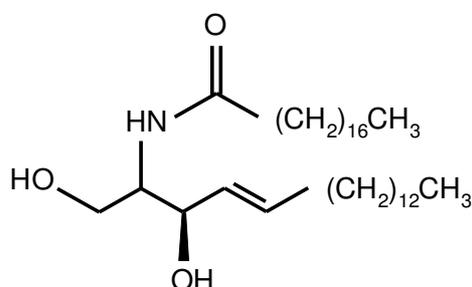


Figure 2:8 Structure chimique d'un céramide

Les sphingolipides complexes sont divisés en deux catégories : les sphingomyélines et les glycolipides. Les sphingomyélines (Figure 2:9) sont composées de sphingosine liée à un acide gras et à un groupement phosphorylcholine.

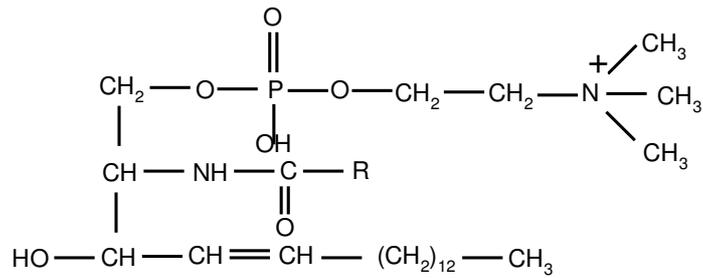


Figure 2:9 Structure chimique d'une sphingomyéline liée à un acide gras (R)

Les glycolipides (Figure 2:10) sont composés de sphingosine liée à un acide gras et à un ose.

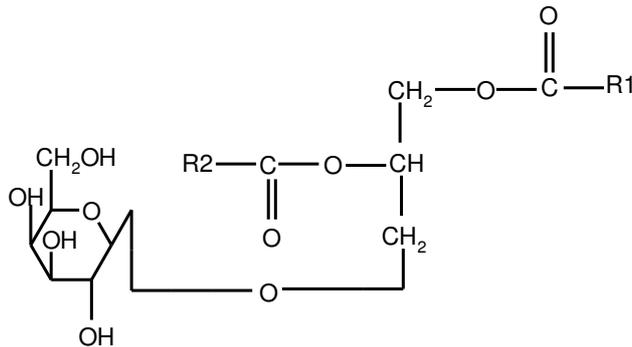


Figure 2:10 Structure chimique d'un glycolipide lié à un acide gras (R)

Les sources alimentaires principales de sphingolipides restent la viande, les produits laitiers (spécialement le lait humain), les œufs, les produits à base de soja ainsi que la farine de blé. Le poisson contient beaucoup moins de sphingolipides que la viande rouge, mais reste très riche en glycolipides. Le ratio sphingomyéline/glycolipide est compris entre 1 à 2,9 ; 5,2 à 19,2 ; 1,6 à 8,3 respectivement dans le filet de poisson, la volaille et la viande rouge (Hellgren, 2001). Dans le cas du saumon, les études menées par Hellgren en 2001 montrent une teneur de 300 $\mu\text{mol/Kg}$ en sphingolipides dont 187 $\mu\text{mol/Kg}$ de sphingomyélines et 114 $\mu\text{mol/Kg}$ de glycolipides.

2.1.4 Synthèse des acides gras polyinsaturés à partir des acides gras essentiels

Les acides gras saturés, monoinsaturés et certains acides gras polyinsaturés (familles n-7 et n-9) peuvent être synthétisés par l'organisme. Les précurseurs des acides gras des séries n-3 et n-6 (respectivement l'acide alpha-linolénique et l'acide linoléique) ne peuvent être synthétisés par l'organisme. Chez les mammifères, le caractère indispensable de ces deux acides gras a été démontré dans les années 1950-1960 (Adam *et al.*, 1958; Guesnet, 2005; Hansen *et al.*, 1958) et doivent par conséquent être apportés par l'alimentation. Ils sont

donc dits indispensables. En effet, les animaux ne possèdent que les $\Delta 5$, $\Delta 6$ et $\Delta 9$ désaturases qui sont incapables de synthétiser les précurseurs des deux familles $\omega 3$ et $\omega 6$. Contrairement au métabolisme animal, les plantes sont capables de synthétiser les acides gras des deux familles n-3 et n-6 ainsi que de les convertir d'une famille à une autre en raison de la présence des $\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases (O'Keefe, 2002). Ces deux enzymes génèrent successivement le $18:2n-6$ et le $18:3n-3$ à partir de l'acide oléique ($18:1n-9$).

Ces deux acides gras sont les précurseurs métaboliques respectifs de dérivés à longue chaîne renfermant de quatre à six insaturations et de 20 à 22 carbones, notamment l'acide arachidonique (AA) ($20:4n-6$) pour la série oméga-6, et l'acide docosahexaénoïque (DHA) ($22:6n-3$) pour la série oméga-3. Les deux voies métaboliques de synthèse donnent naissance à des AGPI-LC qui peuvent entrer en compétition car elles utilisent les mêmes enzymes de désaturation et d'élongation. Les réactions d'élongation et de désaturation ont lieu dans le foie.

La Figure 2:11 représente les deux voies métaboliques de la synthèse de l'AA et du DHA à partir des précurseurs $C18:2n-6$ et $C18:3n-3$. Les deux voies métaboliques diffèrent par une étape supplémentaire dans la synthèse du DHA qui est la β -oxydation et qui se produit dans les peroxysomes au sein des cellules hépatiques.

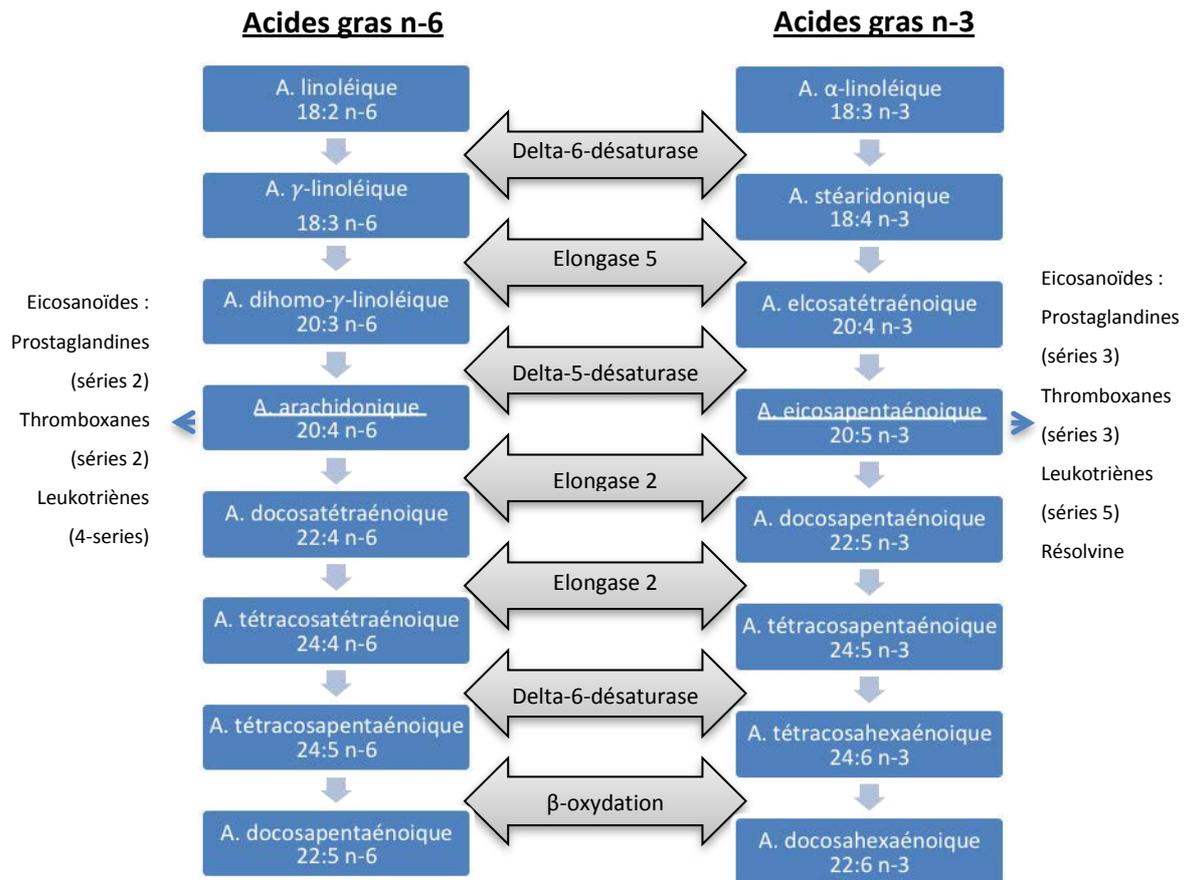


Figure 2:11 Voies métaboliques de synthèse du DHA et de l'AA (Schmitz and Ecker, 2008)

A. : Acide

En ce qui concerne les sources d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de notre alimentation courante, la consommation de produits animaux terrestres (viande, œuf) et lait maternel permet de subvenir aux besoins en AGPI-LC de la série n-6. Les besoins en AGPI-LC de la série n-3 sont généralement couverts par la consommation de poissons et d'autres produits animaux marins. Il faut noter que le taux de conversion de l'acide alpha-linolénique en AGPI-LC (EPA et DHA) reste relativement faible chez l'homme. Des études ont montré que ce taux de conversion de l'AAL en EPA, s'établit entre 0,2 et 21% (Emken *et al.*, 1998).

2.2 Le métabolisme des acides gras

2.2.1 Biodisponibilité des acides gras

L'absorption des huiles et corps gras dépend de la nature des acides gras mais aussi de leur régio-distribution sur la molécule vectrice que ce soit des triacylglycérols ou des lipides

polaires. La biodisponibilité des AGPI-LC, est en effet directement liée aux mécanismes de digestion des lipides dont la finalité est de les rendre assimilable, pour traverser la muqueuse intestinale de l'organisme. La digestion et l'absorption des lipides s'effectuent dans l'intestin grêle, où ils sont soumis à l'action des lipases pancréatiques, des phospholipases A₂ et des cholestérols estérases (Figure 2:12).

Les acides gras estérifiés en position *sn*-1 et *sn*-3 sur les TAG sont libérés par l'action de la lipase pancréatique dans le duodénum sous la forme de monoacylglycérols et d'acides gras libres. Les acides gras en positions *sn*-2 des TAG sont absorbés et distribués dans des chylomicrons (Wanasundara and Shahidi, 1997). Positionnés en *sn*-2, les acides gras sont mieux absorbés (Favé *et al.*, 2004). En ce qui concerne les phospholipides, il y a libération de lysophospholipides et des acides gras libres. Ces produits libérés sont ensuite émulsionnés avec les sels biliaires provenant de la vésicule biliaire pour produire une suspension micellaire à partir de laquelle les lipides sont absorbés à travers les membranes des cellules épithéliales. Au niveau de ces dernières, les produits de digestion sont rassemblés et intégrés dans des chylomicrons, qui sont ensuite libérés dans les petits vaisseaux lymphatiques via le canal thoracique pour atteindre la veine sous-clavière, la circulation sanguine et enfin le cœur. Les chylomicrons seront ensuite distribués dans tout l'organisme à partir du cœur.

Une partie des acides gras à courte ou moyenne chaîne (< 20 carbones) est absorbée sous leur forme non estérifiée. Ils passent directement dans le sang portal (veine porte) pour être ensuite métabolisés dans le foie. Les sels biliaires sont ensuite réabsorbés avec le cholestérol dans la partie inférieure de l'intestin grêle (iléon) (Harwood *et al.*, 2002; Røyneberg, 2005).

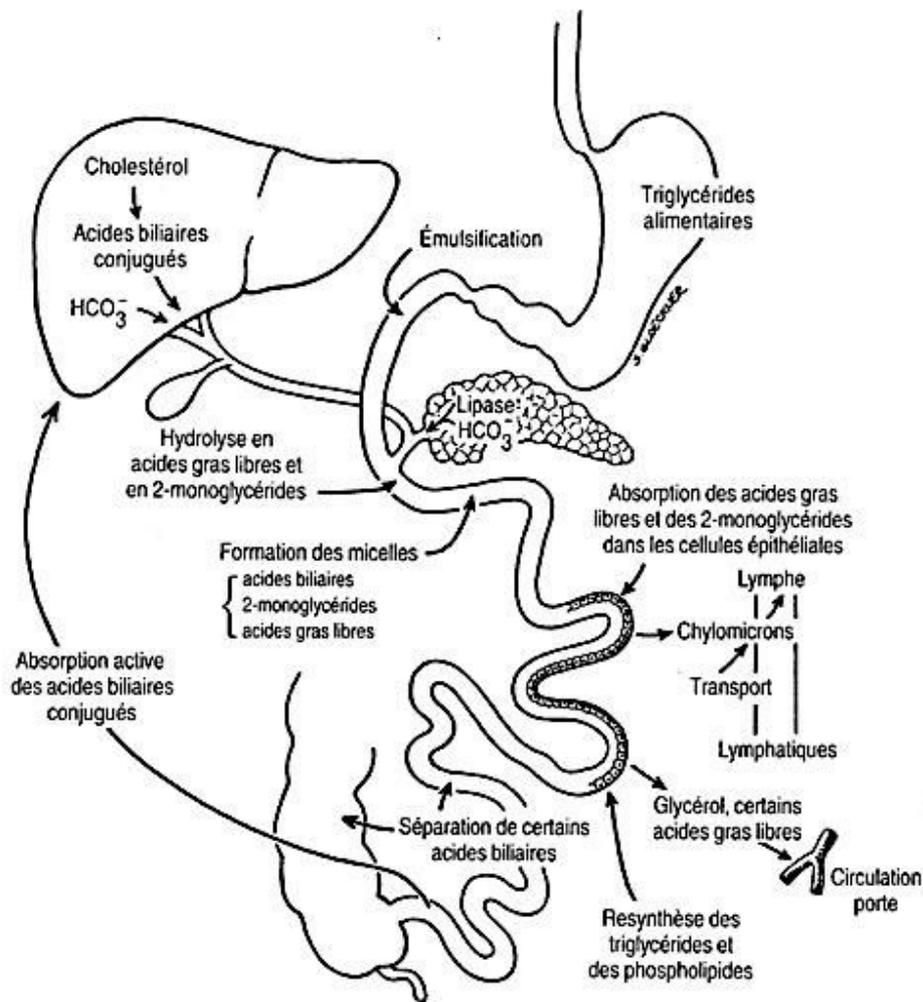


Figure 2:12 Schéma récapitulatif de la digestion des lipides

Plusieurs études ont montré que les phospholipides marins permettent une meilleure distribution des AGPI-LC oméga-3 au niveau du cerveau, comparés aux triacylglycérols (Lemaitre-Delaunay *et al.*, 1999; Wijendran *et al.*, 2002). Ceci peut être expliqué par la richesse des lipides polaires en AGPI-LC-oméga-3 ainsi que par leur comportement amphiphile qui leur confère une très bonne dispersibilité et une accessibilité envers les phospholipases (Henna Lu *et al.*, 2011). En effet, dans le tractus intestinal, l'interface lipide-eau augmentée par la présence des phospholipides facilite l'adsorption ainsi que la catalyse des lipases pancréatiques et des phospholipases (Cansell, 2010).

Une étude effectuée sur des rats afin de suivre la biodisponibilité des AGPI-LC en fonction du régime alimentaire composé de différentes huiles (soja, saumon, phoque, foie de morue), phospholipides (soja, morue, mélange marin contenant 50% d'EPA et de DHA 1:2) et esters éthyliques, a montré l'importance de la nature du vecteur d'acides gras (PL ou TAG) sur la

biodisponibilité des AGPI-LC dans des organes cibles comme le foie et le cerveau (Røyneberg, 2005). Les résultats ont montré qu'il n'y a pas de différence d'incorporation des AGPI-LC lorsqu'ils sont vectorisés sous forme de TAG, quelque soit la source administrée. Dans le foie, seules les sources marines, indépendamment du type du vecteur, permettent d'augmenter la teneur en EPA et en DHA. Au niveau du cerveau, le taux d'EPA est augmenté uniquement lors de l'administration des régimes marins, alors que le taux de DHA n'est enrichi que par l'administration des PL marins, l'huile de foie de morue et l'huile de phoque. Du fait de son encombrement stérique dû aux doubles liaisons, le DHA estérifié en position *sn-2* est protégé contre l'action des lipases gastriques. Dans ces conditions, la fraction acylglycérol résiduelle se trouve fortement enrichie en AGPI-LC (Turon *et al.*, 2004).

2.2.2 Distribution régio-spécifique des acides gras sur le glycérol

2.2.2.1 Régio-distribution des acides gras sur les TAG

Une étude épidémiologique, menée par Kromann & Green (1980) sur l'incidence de l'infarctus du myocarde chez les Inuit du Groenland, a montré un effet protecteur de la consommation d'AGPI-LC contenus dans la graisse de phoque (Kromann and Green, 1980). Les fonctions physiologiques des acides gras dépendent de leur distribution intramoléculaire. Une étude comparative concernant l'effet de la régidistribution des AGPI-LC (EPA, DHA) vectorisés par de l'huile de poisson versus graisse de phoque a été menée par Ikeda *et al.*, (1998). Les résultats de cette étude montrent qu'après 3h d'administration des huiles de phoque et de poisson, 62 et 74% de l'EPA et du DHA provenant de l'huile de poisson sont retenus parmi les TAG de la lymphe. Dans le cas de la graisse de phoque, les résultats montrent une rétention de 94 et 95% d'EPA et de DHA. Cette différence est due au fait que ces deux AGPI-LC sont retrouvés essentiellement en position *sn-1* et *sn-3* dans les triglycérides de la graisse de phoque et en position *sn-2* dans les TAG de l'huile de poisson (Ikeda *et al.*, 1998).

De nombreuses études ont montré que les AGPI-LC se positionnent généralement en *sn-2* au niveau du glycérol dans les huiles de poisson (Ando *et al.*, 1992). Ce positionnement des AGPI-LC leur procure une grande stabilité face à l'oxydation (Wijesundera *et al.*, 2008).

Il existe plusieurs méthodes permettant d'identifier les acides gras ainsi que leur régio-distribution au niveau de la molécule de glycérol (Tableau 2:1).

Tableau 2:1 Les méthodes les plus utilisées pour identifier les acides gras estérifiés sur des TAG

Méthode utilisée	Principe	Références
Méthode enzymatique d'échange d'esters	Les lipases spécifiques (sn-1/3 ou sn-2) permettent l'échange entre les esters d'acides gras et l'éthyle acétate ajouté dans le milieu réactionnel. Injection directe en CPG.	(Negishi <i>et al.</i> , 2003)
Hydrolyse enzymatique	Purification des TAG par chromatographie sur couche mince. Hydrolyse par des lipases pancréatiques (sn-1/3). Séparation par chromatographie sur couche mince. Transméthylation des acides gras. Analyse par CPG.	(Li <i>et al.</i> , 2007a; Negishi <i>et al.</i> , 2003; Yoon and Noh, 2011)
Déacylation chimique	Utilisation du bromure d'éthylmagnésium. Séparation par chromatographie sur couche mince. Transméthylation des acides gras. Analyse par CPG.	(Ikeda <i>et al.</i> , 1998; Turon <i>et al.</i> , 2002)
HPLC	Phase mobile constituée d'hexane avec 0,5% d'acétonitrile. La détection des acides gras en sn-2 s'effectue en UV à 206 nm.	(Adlof, 1995)
RMN ¹H et ¹³C	Les TAG sont solubilisés dans du chloroforme deutéré (20%). La composition en acides gras est déterminée en se basant sur la hauteur des pics retrouvés.	(Miyake <i>et al.</i> , 1998; Negishi <i>et al.</i> , 2003; Pérignon <i>et al.</i> , 2011)

D'après Negishi *et al.*, (2003), les résultats de réiodistribution obtenus par la technique d'échange d'esters sont proches de la technique de l'hydrolyse enzymatique. Turon et ses collaborateurs (2002) ont montré qu'en mettant une plus grande quantité de bromure d'éthylmagnésium, la réaction n'est plus aléatoire vis à vis des positions d'acides gras sur le glycérol car ce réactif représente une grande sélectivité pour les positions *sn-1/sn-3*.

2.2.2.2 Régio-distribution des acides gras sur les phospholipides

Il existe peu d'études récentes qui se sont intéressées à identifier la nature et la position des acides gras sur les phospholipides marins. Une étude sur l'influence d'un traitement thermique sur les phospholipides de différentes espèces de thon, menée par Aubourg et ses collaborateurs (1996), a montré une proportion importante de DHA en position *sn-2* (43%)

contre 9,3% en position *sn-1*. Cette étude fait ressortir le caractère thermolabile de la molécule de DHA qui diminue après le procédé de cuisson quelque soit sa position (39,4% en *sn-2* vs 14,7 en *sn-1*) (Aubourg *et al.*, 1996). L'effet d'un procédé de congélation à -12°C pendant trois mois, a également été étudié sur les teneurs de DHA en position *sn-1* et *sn-2* de PC de saumon d'Atlantique (Polvi *et al.*, 1991). L'analyse stéréospécifique a révélé que le DHA était majoritairement présent en grande quantité en position *sn-2* (64,2%) contrairement à la position *sn-1* (2,8%). Il ne reste plus que 42,9% de DHA en *sn-2* vs 3,9% en *sn-1* après 3 mois de conservation à -12°C, montrant l'importance du mode de conservation sous atmosphère inerte. Miyashita et ses collaborateurs (1994) ont montré que la PC d'œufs de saumon est plus stable vis à vis de l'oxydation que la PC de soja malgré une teneur plus élevée en AGPI-LC de la PC de saumon, en raison de la position importante des AGPI-LC en *sn-2* pour la PC de saumon (Miyashita *et al.*, 1994).

Yoshida et ses collaborateurs (2011) ont étudié, la composition et la régio-distribution des acides gras estérifiés sur différentes classes de phospholipides de graines végétales (Yoshida *et al.*, 2011). Contrairement aux enzymes utilisées pour l'identification des acides gras estérifiés en position *sn-1* et *sn-3* sur le glycérol des TAG, l'analyse des phospholipides s'effectue à l'aide de la phospholipase A₂ qui hydrolyse spécifiquement l'acide gras estérifié en *sn-2* sur le phospholipide, libérant un acide gras libre et un lysophospholipide (Williams *et al.*, 1995). Cette méthode sera abordée en détail dans le chapitre Matériels et Méthodes.

Le tableau (Tableau 2:2) récapitule les principales techniques utilisées pour déterminer la régio-distribution des acides gras sur les phospholipides.

Tableau 2:2 Les méthodes les plus utilisées pour identifier les acides gras estérifiés sur des phospholipides

Méthode utilisée	Principe	Références
Méthode enzymatique ; Phospholipase A₂	<p>Méthode de Griffiths <i>et al.</i>, Utilisation du tampon borate (pH=8,9)</p> <p>Méthode modifiée par Ackman <i>et al.</i>, : Utilisation du tampon Tris (pH=7,5) contenant du CaCl₂ (4mM)</p> <p>Méthode de Yoshida <i>et al.</i>, Utilisation du tampon Tris (pH=7,5) contenant du CaCl₂ (0,01mM)</p>	<p>(Griffiths <i>et al.</i>, 1985; Williams <i>et al.</i>, 1995)</p> <p>(Polvi <i>et al.</i>, 1991)</p> <p>(Yoshida and Kajimoto, 1978; Yoshida <i>et al.</i>, 2009a; Yoshida <i>et al.</i>, 2007; Yoshida <i>et al.</i>, 2011)</p>
LC-MS	Ionisation par électronébulisation (ESI) en mode négatif	(Hvattum <i>et al.</i> , 2000; Miller <i>et al.</i> , 2006; Pulfer and Murphy, 2003)

2.3 Oxydation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne vectorisés sous forme de triacylglycérols, phospholipides ou esters éthyliques

2.3.1 Les réactions d'oxydation

Les lipides d'origine marine se distinguent des autres sources de lipides animales ou végétales par leur forte teneur en AGPI-LC. La qualité de ces huiles peut être altérée, que ce soit au niveau de leur extraction, de leur stockage ou de leur transformation, par deux phénomènes distincts : l'hydrolyse et l'oxydation (Eymard, 2003). En effet, l'oxydation des huiles provoque la détérioration de ses propriétés sensorielles (rancissement, changement de la texture et de la couleur), la diminution de la valeur nutritionnelle, un risque pour la santé du consommateur, ainsi que des pertes économiques (Gramza *et al.*, 2006). En plus des saveurs désagréables engendrées, les produits d'oxydation (hydroperoxydes, hydroxydes, aldéhydes) (Figure 2:13) peuvent conduire au développement de maladies inflammatoires, à de l'athérosclérose, à l'affaiblissement des réponses immunitaires mais aussi engendrer des troubles neurodégénératifs (Henna Lu *et al.*, 2011; Spiteller, 2006).

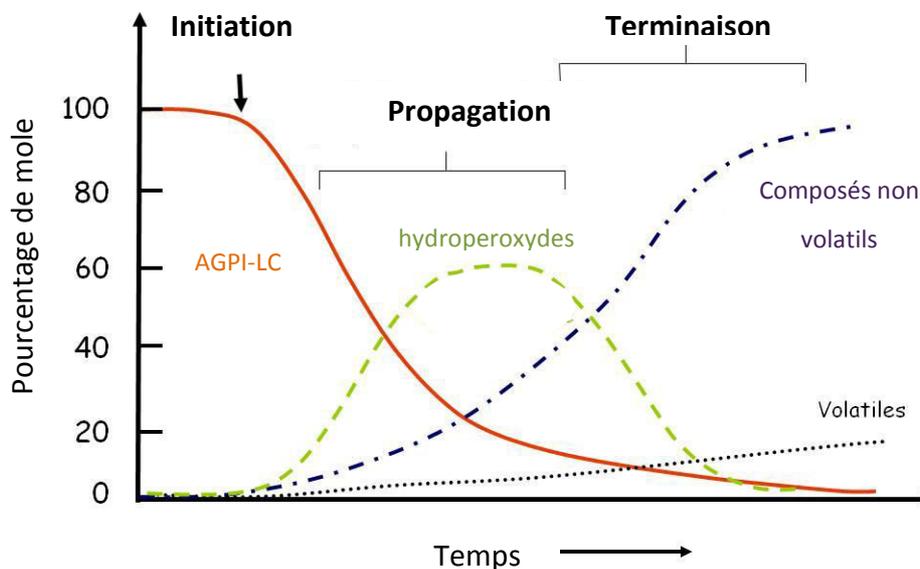


Figure 2:13 Cinétique d'oxydation des acides gras insaturés

La réaction d'oxydation produit en premier lieu des radicaux instables (radicaux libres et hydroperoxydes) qui se transforment en composés secondaires comme les aldéhydes, les cétones et les alcools responsables des saveurs désagréables (Eymard and Genot, 2003). En fonction de la composition en acides gras et du nombre d'insaturations, les lipides peuvent

être plus ou moins sensibles aux réactions d'oxydation, initiées par des facteurs intrinsèques, comme le nombre et la position des insaturations, la nature du vecteur d'acides gras (triacylglycérols, esters éthyliques, phospholipides...) et la position des acides gras sur le vecteur. D'autres facteurs comme la présence de pro-oxydants (ions métalliques, oxygène, hèmes ou enzymes) et l'utilisation d'antioxydants peuvent ralentir ou accélérer l'oxydation des lipides (Andreo *et al.*, 2003). Certains paramètres externes peuvent également provoquer l'oxydation de ces derniers (procédés mécaniques, broyage, cuisson, exposition à la lumière, présence d'oxygène) (Andreo *et al.*, 2003).

La réaction d'oxydation est une réaction radicalaire irréversible qui se déroule en trois étapes (Figure 2:14). L'initiation ou étape d'amorçage conduit grâce à l'apport d'énergie à la formation des premiers radicaux alkyles (R^\bullet) à partir des acides gras (RH) (Villière and Genot, 2006).

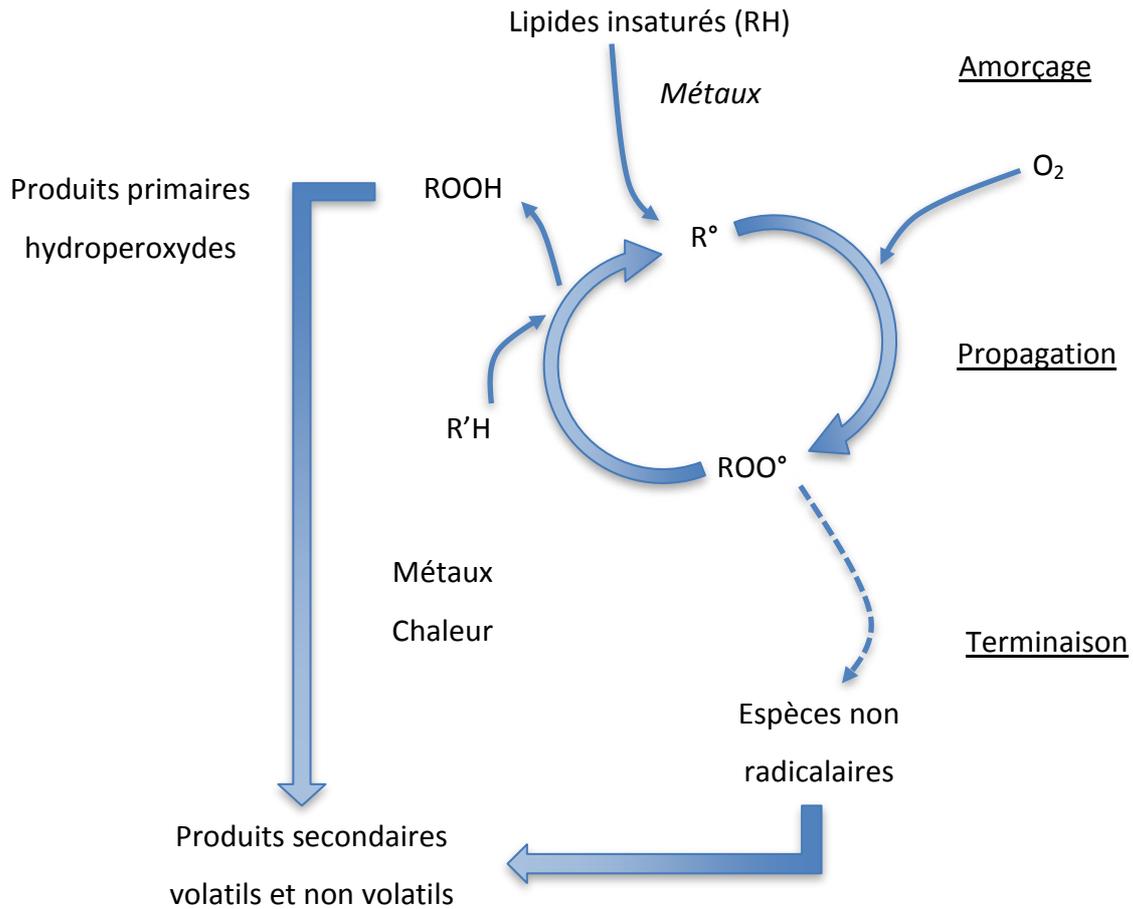


Figure 2:14 Représentation schématique du mécanisme réactionnel de l'auto-oxydation des lipides (Villière and Genot, 2006)

La deuxième étape réactionnelle est la propagation au cours de laquelle les radicaux alkyles formés lors de l'étape d'initiation réagissent avec les molécules d'oxygène pour former des radicaux peroxydes (ROO°). Ces radicaux libres néoformés (ROO°) sont capables d'enlever de nouveaux atomes d'hydrogène aux autres acides gras insaturés adjacents et de former ainsi des hydroperoxydes ($ROOH$). Ces derniers, produits primaires instables de l'oxydation, sont facilement décomposés en radicaux alcoyles qui peuvent aussi enlever un atome d'hydrogène à d'autres lipides, annonçant ainsi, une nouvelle phase de propagation oxydative. D'autre part, les hydroperoxydes se décomposent et forment des produits secondaires de l'oxydation (Eymard, 2003; Villière and Genot, 2006). Les hydroperoxydes contiennent souvent des diènes conjugués (Nawar, 1984).

Une fois que les espèces radicalaires réagissent entre elles pour former des produits non radicalaires, nous arrivons à la phase terminale de la réaction d'oxydation. Ces produits non

radicalaires formés peuvent se décomposer à leur tour et donner naissance à des produits secondaires. Les réactions d'oxydation sont détaillées dans la Figure 2:15.

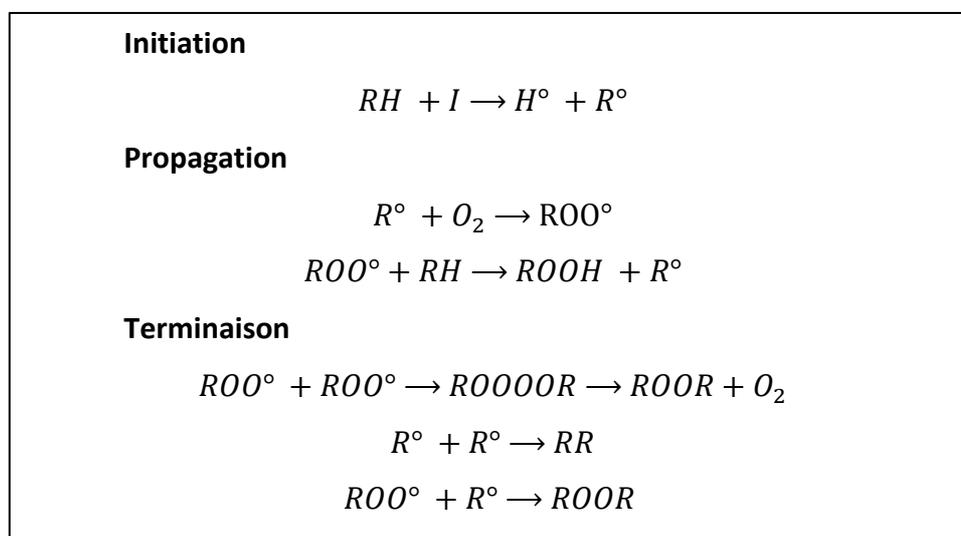


Figure 2:15 Equations des réactions d'oxydation des acides gras
ROO° : peroxydes, ROOH : hydroperoxydes, R° : radicaux alkyles, RH : acides gras

Les phénomènes d'oxydation des produits de la mer, peuvent être palliés par plusieurs méthodes (Pazos *et al.*, 2005), comme la congélation, le lavage qui permet d'éliminer les composés prooxydants, le conditionnement sous vide ou sous gaz inerte (azote), ainsi que l'addition de chélateurs de métaux (Gramza *et al.*, 2006). Cependant, l'utilisation d'antioxydants reste toujours la méthode la plus efficace pour limiter l'oxydation et le rancissement des huiles de poisson (Pazos *et al.*, 2005).

2.3.1.1 Principaux antioxydants utilisés

Un antioxydant est une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir le phénomène d'oxydation. Le mécanisme d'action général des antioxydants est basé sur une compétition entre l'antioxydant et le lipide pour céder un atome d'hydrogène au radical peroxyde. Il existe deux catégories d'antioxydants :

2.3.1.1.1 Les antioxydants de synthèse

Les principaux antioxydants synthétiques sont le BHA (butylhydroxyanisole), le BHT (butylhydroxytoluène) et le THBQ (tertiobutylhydroquinone).

Cependant, les consommateurs et les industries alimentaires préfèrent additionner à leurs produits des antioxydants naturels (Gramza *et al.*, 2006).

2.3.1.1.2 Les antioxydants naturels

Parmi les antioxydants naturels, les tocophérols ou la vitamine E sont des composés phénoliques, lipophiles prévenant la formation des radicaux libres. On les retrouve naturellement au niveau des huiles végétales comme l'huile de soja. Selon Frankel, (1996), les antioxydants apolaires sont plus efficaces que les antioxydants polaires pour les huiles (Frankel, 1996). L'acide-L-ascorbique ou vitamine C est une molécule hydrophile, largement utilisée en industrie, qui agit principalement comme réducteur d'oxygène. Sa capacité antioxygène est due à son groupement ène-diol.

Une étude effectuée par Ogwok et ses collaborateurs (2008) sur la stabilité oxydative de l'huile de perche du Nil, conservée à 65°C, a montré qu'une teneur élevée en antioxydants naturels endogène (α -tocophérol, vitamine A et β -carotène) dans l'huile offre une protection contre les processus de dégradation oxydative, et permet de prolonger sa durée de vie (Ogwok *et al.*, 2008). La quantité d'antioxydants présente au niveau des tissus de la perche diffère en fonction de son âge et de sa taille (Tableau 2:3).

Tableau 2:3 Le contenu en vitamine A, β -carotène et α -tocophérol dans l'huile extraite de la perche du Nil en fonction de sa taille (mg/100g d'huile) (Ogwok *et al.*, 2008)

pois du poisson (Kg)	Vitamine A	β -carotène	α -tocophérol
1-2	3,94 \pm 0,02	2,93 \pm 0,03	11,4 \pm 0,92
10-30	4,04 \pm 0,01	3,35 \pm 0,01	6,57 \pm 0,63
40-80	5,92 \pm 0,02	4,69 \pm 0,01	2,11 \pm 0,03

Une étude comparative récente effectuée par Wang et ses collaborateurs (2011) sur la stabilité oxydative d'un mélange d'huiles de poisson, stocké à deux températures différentes (4 et 30°C), montre un effet antioxydant de l'acide carnosique, quelque soit sa concentration (0,1, 0,2 et 0,3 mg/g d'acide carnosique), supérieur à 0,2 mg/g d' α -tocophérol. Cette molécule reste tout de même plus efficace contre l'oxydation que la vitamine E mais plus faible que le TBHQ (0,2 mg/g de TBHQ) qui est un antioxydant synthétique (Wang *et al.*, 2011).

2.3.1.1.3 Méthodes de mesure du taux d'oxydation

Le Tableau 2:4, ci-dessous, présente les méthodes classiques et usuelles permettant d'évaluer le taux d'oxydation des lipides.

Tableau 2:4 Méthodes classiques de l'évaluation de la qualité des huiles, des produits d'oxydation et d'autres composées lipidiques (Curtis, 2007)

Méthodes	Type de produit d'oxydation	Principe de la méthode	Références officielles des méthodes
Indice de peroxydes	Produit primaire	Oxydation de l'iodure de potassium par les hydroperoxydes de l'huile	AOCS Cd 8-53 AOCS Cd 8b-90 ISO 3960:2001 IUPAC 2.501
Diènes et triènes conjugués	Produit primaire	Mesure des diènes par UV, absorbance à 233 nm; triènes à 268 nm (échantillon solubilisé dans du chloroforme/méthanol 2:1)	AOCS Cd 7-58 ISO 3656:2002 IUPAC 2.206
Indice de p-Anisidine	Produit secondaire	Dosage des produits secondaires de la réaction d'oxydation (aldéhydes) dans l'huile par le réactif para-anisidine	AOCS Cd 18-90 ISO 6885:2006 IUPAC 2.501 Ph.Eur. 2.5.36
Teneur en polymères (oligomères)	Produit secondaire	Chromatographie d'exclusion stérique	AOCS Cd 22-91 Ph.Eur. 2005: 1352 Ph.Eur. 2005:2063 Ph.Eur. 2006:1250 ISO 16931:2001 IUPAC 2.508
Indice d'acide	Produit primaire	Dosage des acides gras libres des huiles par titration avec du KOH	AOCS Cd 3d-63 ISO 660: 1996 Ph.Eur. 2.5.1 IUPAC 2.201
Trans isomères	Produit primaire	FTIR : absorbance à 966 cm^{-1} des doubles liaisons <i>trans</i>	AOCS Cd 14d-96 AOCS Cd 14d-99
Insaponifiables	-	Détermination gravimétrique des composants non-saponifiables (stérols)	AOCS Ca 6b-53 Ph.Eur. 2.5.7 ISO 18609:2000
Cholestérol total	Produit secondaire	CPG-IFD : mesure des fractions non-saponifiables de l'huile	AOCS Ch 6-91 Ph.Eur. 2.4.32
Dosage du tocophérol (antioxydant)	-	LC : utilisation d'un détecteur à fluorescence	AOCS Ce 8-89 ISO 9936:2006

FTIR, Infrarouge à transformée de Fourier ; CPG-IFD, Chromatographie phase gaz avec détection à ionisation de flamme ; LC, Chromatographie liquide ; AOCS, American Oil Chemists' Society ; ISO, International Standards Organization ; IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry ; Ph.Eur., European Pharmacopoeia

2.3.2 Comportement des AGPI-LC sous forme de phospholipides, triacylglycérols ou d'esters éthyliques face aux réactions d'oxydation

Différentes études montrent que les acides gras restent protégés plus longtemps contre les réactions d'oxydation lorsqu'ils sont estérifiés sous forme de phospholipides que sous forme de triacylglycérols, voire d'esters éthyliques. King et ses collaborateurs (1992), ont travaillé sur l'influence des phospholipides extraits à partir du tassergal (*Pomatomus saltatrix*), riche

en AGPI-LC, sur l'oxydation de l'huile de saumon. Leurs résultats montrent qu'en rajoutant 2,5% et 5% de phospholipides dans l'huile de saumon, la stabilité de l'huile est augmentée durant un chauffage de 55 et 180°C en comparaison avec différents lots d'huile de saumon (brute, contenant du BHT (0,02%) ou d'autres fractions lipidiques (5%) du tassergal). Avec une teneur en DHA de 34%, les phospholipides présentent une grande stabilité face à l'oxydation en comparaison avec les lipides neutres, contenant seulement 15% de DHA (King *et al.*, 1992). Une autre étude effectuée par Boyd et ses collaborateurs (1998) a également montré l'effet protecteur des phospholipides contre l'oxydation en rajoutant 0,5% de PL à 2,5 g d'un mélange d'huiles de saumon et de menhaden. Les résultats ont montré que les phospholipides permettent de réduire la formation des composés volatils dans les deux systèmes d'huiles. Ils ont un effet chélateur synergique avec les antioxydants (Boyd *et al.*, 1998).

Song et ses collaborateurs (1997), ont étudié l'auto-oxydation du DHA sous forme de phospholipides, de triacylglycérols et d'esters éthyliques sur une période de 10 semaines à 25°C (Tableau 2:5). Les résultats montrent une diminution drastique de la teneur en DHA en fonction de la molécule vectrice. Au bout de 5 semaines de conservation, la quantité de DHA estérifié sur les phospholipides et les esters éthyliques reste toujours stable (10,0 et 9,4 mol%, respectivement) contrairement au DHA estérifié sur les triacylglycérols (0,9 mol%). Au bout de 10 semaines de stockage, seule la teneur en DHA estérifié sur les phospholipides reste élevée (Song *et al.*, 1997).

Nous avons effectué une étude en 2010 portant sur le suivi de l'oxydation de l'huile et de la lécithine de saumon riche en AGPI-LC sous leur forme brute et émulsionnée (Belhaj *et al.*, 2010).

Synthèse bibliographique

Tableau 2:5 Changement de la composition en acides gras des différentes classes lipidiques après une auto-oxydation à 25°C pendant 10 semaines (Song *et al.*, 1997)

Acides gras (mol%)	Temps initial				Après 5 semaines de stockage				Après 10 semaines de stockage			
	PL	EE	TG	Huile de palme + 20% d'huile de soja	PL	EE	TG	Huile de palme + 20% d'huile de soja	PL	EE	TG	Huile de palme + 20% d'huile de soja
16:0	32,5	41,6	41,8	41,7	32,7	41,2	60,2	41,4	35,3	47,4	61,8	40,6
16:1 (n-7)	1,7	3,2	3,2	0,2	2,6	4,3	3,8	0,4	1,3	4,9	2,1	0
18:0	11,1	4,8	5,1	4,3	10,7	5,3	9,8	4,5	10,8	6	7,4	4,2
18:1 (n-9)	27,7	22,8	22,4	35,8	28,4	22,4	20,5	35,4	26,9	25,4	25,5	36,1
18:2 (n-6)	11,4	11,4	10,6	17,2	11,5	11,7	1,9	17,4	11,9	9,7	1,8	18,2
18:3 (n-3)	0,2	0,6	0,6	0,8	0,3	0,6	0,8	0,9	0,3	0,5	0,3	0,9
20:4 (n-6)	1,3	0,4	0,9	-	1,2	0,6	0,1	-	1,2	0,6	0,3	-
20:5 (n-3)	1,5	3	3,1	-	1,1	2,6	1,9	-	1,1	1,2	0,3	-
22:5 (n-6)	0,3	0,9	0,9	-	0,1	0,9	0,1	-	0,2	0,6	0,2	-
22:5 (n-3)	1,5	0,7	0,7	-	1,4	0,7	0,1	-	1,4	0,4	0,1	-
22:6 (n-3)	10,7	10,7	10,7	-	10	9,4	0,9	-	9,6	3,5	0,3	-
n-6/n-3	0,9	0,8	0,8	22,3	1	1	0,6	20,2	1,1	2	2,4	21,5

PL (phospholipides), EE (esters éthyliques), et TG (triacylglycérols)

Les résultats obtenus par trois techniques différentes de mesure de l'oxydation (diènes conjugués, indice de polyènes et spectroscopie infrarouge), ont montré que la lécithine de saumon est plus stable face à l'oxydation comparée à l'huile de saumon. D'autre part, l'utilisation de lécithine de saumon pour ses propriétés émulsifiantes, améliore la protection de la phase lipidique (huile + lécithine) contre l'oxydation de nanoémulsions. Ces résultats sont confirmés par Liolios et ses collaborateurs (2009) qui rapportent que l'encapsulation de différents principes actifs dans des liposomes de phosphatidylcholine, est une très bonne méthode pour les protéger contre les facteurs environnementaux induisant l'oxydation (Liolios *et al.*, 2009).

2.4 Sources d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne

2.4.1 Le plancton

Les poissons représentent la principale source d'acides gras polyinsaturés à longue chaîne. Cette spécificité des ressources halieutiques provient de la forte teneur en AGPI n-3 des écosystèmes marins. Les acides gras tels que l'EPA et le DHA se retrouvent en grande quantité (40%) dans les algues unicellulaires qui constituent le premier maillon de la chaîne alimentaire (Narayan *et al.*, 2006). Le phyto et zooplancton, présents dans toutes les mers et les océans, possèdent un potentiel lipidique important en proportion, et diversifié en terme de classes lipidiques. Leur faible mobilité est compensée par une flottabilité directement lié à la densité de ces lipides, servant de réserve énergétique (TAG, ester de cires) (Tableau 2:6 et Tableau 2:7).

Tableau 2:6 Composition en acides gras du phytoplancton et de quatre espèces différentes de micro algues (Devos *et al.*, 2006; Linder *et al.*, 2010)

Acides gras	Phytoplancton	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Porphyridium cruentum</i>	<i>Cryptocodinium cohnii</i> (ATCC 30556)
14 : 0	7,41	10,1	5,9	0,5	13,98
iso 15 : 0	1,17	-	-	-	-
15 : 0	1,45	-	-	-	-
16 : 0	24,67	20,3	14,5	26,4	14,73
16 : 1 n-7	5,05	21,4	0,7	0,9	-
18 : 0	4,57	0,7	0,3	0,7	10,29
18:1n-9	4,87	1,4	0,7	0,6	1,52
18:1n-7	2,9	3,6	0,8	1,2	-
18:2n-6	1,42	0,9	2,7	8,1	-
18:3n-3	1,27	1,2	0,4	-	-
18:4n-3	2,24	6,4	0,2	-	-
20:1n-11	0,23	-	-	-	-
20:1n-9	1,56	0,2	-	-	-
20:2NMID	0,57	-	-	-	-
22:2NMID	0,11	-	-	-	-
20:4n-6	0,64	0,7	3,6	26,4	-
20:4n-3	-	-	0,6	0,1	-
20:5n-3	9,28	22,6	24,3	27,5	-
22:5n-3	0,41	0,2	2,2	-	0,38
22:6n-3	14,97	8,4	1	0,4	57,32

NMID FA: Non-Methylene-Interrupted Dienoic Fatty Acid

Les acides gras sont présentés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux

Certains acides gras spécifiques sont utilisés comme bio-marqueurs en raison de leur localisation spécifique, comme les acides gras C16:1n-7 et C20:5n-3 présents chez les diatomées ou les acides gras C18:4n-3 et C22:6n-3 retrouvés en grande proportion chez les

dinoflagellés (Alkanani *et al.*, 2007). Ils permettent aussi de suivre les mouvements du phytoplancton en fonction des courants marins.

Tableau 2:7 : Composition en lipides de copépodes de l’Océan Antarctique (Hagen and Auel, 2001)

Caractéristiques	<i>Calanoides acutus</i>	<i>Rhincalanus gigas</i>	<i>Calanus propinquus</i>	<i>Metridia gerlachei</i>	<i>Pareuchaeta antarctica</i>
Taille maximale (mm)	5	8	5	4	9
Taux maximal en lipides	51%	33%	56%	44%	45%
Forme de lipides stockés	Esters de cire	Esters de cire	Triacylglycérols	Esters de cire / Triacylglycérols	Esters de cire
Acides gras essentiels	20 :1 ; 22 :1	16 :1 ; 18 :1 ; 18 :4	22 :1 (2 isomers)	16 :1 ; 18 :1	16 :1 ; 18 :1

2.4.2 Le Krill

Le Krill de l’antarctique (*Euphausia superba*) est l’espèce la plus abondante dans les mers et les océans. Paradoxalement, cette espèce marine de Krill vivant dans les eaux de l’océan Austral est la moins exploitée dans le monde. Sa biomasse est estimée à 650 millions de tonnes (Thorpe *et al.*, 2007). *Euphausia superba* représente 30 à 90% de l’alimentation des oiseaux, poissons, calmars, phoques et baleines (150 MT /an). La composition en acides gras du Krill intéresse de plus en plus le domaine de la nutraceutique en raison de sa richesse en AGPI-LC vectorisés par des lipides polaires et neutres, ainsi que par une teneur élevée en antioxydants, notamment l’astaxanthine (Burri, 2011). Parmi les 85 espèces de Krill, seules six espèces ont un intérêt commercial dont trois d’entre elles sont présentées dans le Tableau 2:8. L’huile de Krill contient environ 40% de phospholipides représentés en majorité par la phosphatidylcholine (80%). Cependant le Krill possède un système enzymatique qui entraîne une protéolyse et une lipolyse importante suite à sa capture, rendant difficile la conservation des lipides.

Tableau 2:8 Composition en acides gras de trois espèces parmi les six espèces de Krill commercialisés (Ju and Harvey, 2004)

Acides gras	<i>Euphausia superba</i>	<i>Euphausia tricantha</i>	<i>Euphausia frigida</i>
14:00	1,2	0,6	0,9
16:00	16,2	13,4	18,0
16:1n-7	1,3	1,5	2,2
18:00	1,2	5,6	5,9
18:1n-9	5,9	17,7	15,3
18:1n-7	8,0	10,5	12,9
18:2n-6	0,6	1,8	2,2
20:1n-9	0,3	9,5	3,1
20:5n-3	31,6	6,7	10,9
22:6n-3	28,3	15,8	18,1

Les acides gras sont présentés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux

2.4.3 Le poisson : source d'acides gras oméga-3

2.4.3.1 Captures et consommation

Source de protéines et d'acides gras de la série n-3 importante, la consommation de poisson est recommandée par les autorités sanitaires pour ses effets bénéfiques sur la santé (ANSES, 2010). Les ressources en poisson proviennent des captures directes mais aussi de l'aquaculture. Les captures de pêche plafonnent depuis plusieurs années autour de 92 millions de tonnes au niveau mondial (Figure 2:16) et ne permettent de répondre à la demande (FAO, 2007). Pour pallier à la demande, l'aquaculture au niveau mondial permet de fournir 51 millions de tonnes et ne cesse d'augmenter. Le marché mondial est dominé par la Chine où 90% de la consommation provient de l'aquaculture (cyprinidés). En Europe, la production aquacole se focalise principalement sur les salmonidés (truite, saumon) mais aussi sur des espèces comme la daurade, le bar et le turbot.

Les productions aquacoles doivent leurs grandes évolutions aux recommandations nutritionnelles des organisations pour la santé, aux études scientifiques effectuées prouvant leurs effets sur la santé du consommateur, ainsi qu'à la vague médiatique des oméga-3.

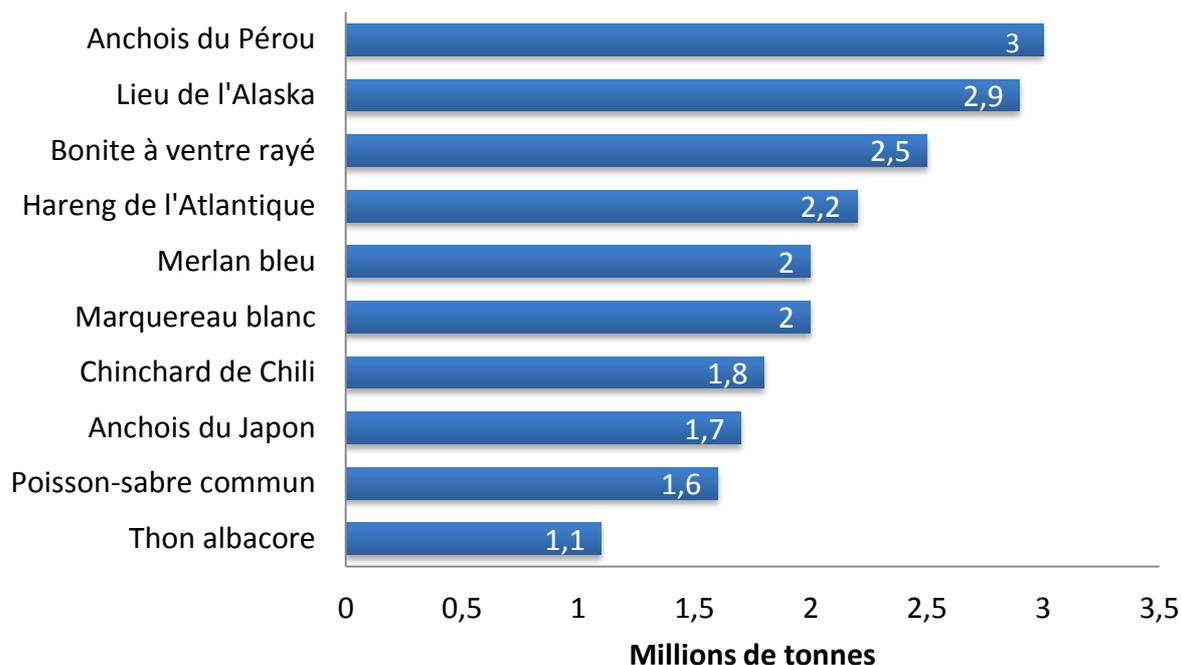


Figure 2:16 Tonnage des 10 premières espèces de poisson pêchées dans le monde (FAO, 2007)

2.4.3.2 Teneur en lipides et composition en acides gras

Il est généralement admis de classer les différentes espèces de poisson en fonction de leur teneur en lipides (Harris *et al.*, 2011). Les poissons dits « maigres » ont une teneur en lipides dans le muscle inférieure à 2 % (morue, églefin, merlan, lieu jaune) contrairement aux poissons dits « gras » qui présentent un pourcentage en lipides supérieur à 8% (sardine, maquereau, hareng). Entre ces deux catégories, il existe différentes espèces qui stockent les lipides au niveau du muscle ou du tissu adipeux périviscéral, comme le saumon (Fontagné-Dicharry and Médale, 2010).

La composition en acides gras des poissons varie en fonction des espèces, de leur taille, du sexe, de l'environnement (température/salinité), de la saison, du cycle cellulaire, mais surtout en fonction de l'alimentation (Linder, 2003; Narayan *et al.*, 2004; Pickova and Morkore, 2007).

Les tableaux suivants illustrent cette variabilité de la composition en acides gras chez une même espèce de hareng en fonction de la période et du lieu de capture (Tableau 2:9 et Tableau 2:10). La teneur en lipide du hareng peut évoluer de 4,5 à 19,9 % en fonction de la saison (Jensen *et al.*, 2007). Ces variations sont également observées chez les petits pélagiques comme la sardine et l'anchois (Zlatanov and Laskaridis, 2007).

Tableau 2:9 Pourcentage en lipides, EPA et DHA du hareng en fonction de la période et du lieu des captures (Jensen *et al.*, 2007; Linder *et al.*, 2010)

Pêche	Nombre de hareng	EPA	DHA	Lipides
Mer du nord, Est - juillet - 2001	26	6,9 ± 0,2	11,0±0,4	16,0 ± 0,9
Skagerrak - juillet - 2001	193	6,5 ± 0,1	10,0 ± 0,1	16,9 ± 0,3
Cattégat - juillet - 2001	33	6,8 ± 0,3	11,0 ± 0,5	14,0 ± 0,9
Mer du nord, Ouest - août - 2001	61	6,1 ± 0,2	10,6 ± 0,2	15,6 ± 0,5
Mer Baltique - novembre - 2001	58	6,1 ± 0,1	10,9 ± 0,1	12,7 ± 0,3
Mer Baltique - mars - 2002	56	5,1 ± 0,1	9,6 ± 0,2	9,5 ± 0,4
Mer du nord, Est - juin - 2002	39	7,0 ± 0,2	11,5 ± 0,5	12,9 ± 0,8
Mer du nord, Est - juillet - 2002	19	7,8 ± 0,4	13,8±1,3	9,6 ± 1,1
Skagerrak - juillet - 2002	157	6,4 ± 0,1	10,3 ± 0,2	14,6 ± 0,3
Cattégat - juillet - 2002	40	6,4 ± 0,1	10,0 ± 0,2	15,4 ± 0,5
Mer du nord, Ouest - septembre - 2002	57	5,8 ± 0,1	10,2 ± 0,2	10,1 ± 0,4
Mer du nord, Nord - novembre - 2002	50	5,4 ± 0,1	11,0 ± 0,4	6,5 ± 0,4
Mer du nord, Nord - février - 2003	50	4,4 ± 0,2	13,1 ± 0,6	4,5 ± 0,3
Cattégat - février - 2003	50	4,5 ± 0,1	9,5 ± 0,4	7,9 ± 0,4
Mer du nord, Nord - mai - 2003	48	11 ± 0,3	11,9 ± 0,3	6,9 ± 0,3

L'EPA, le DHA et les lipides sont présentés en pourcentage

Tableau 2:10 Teneur en lipides en g/100g d'échantillon sec de trois poissons, la sardine, l'anchois et le picarel en fonction des saisons (Jensen *et al.*, 2007; Linder *et al.*, 2010)

	Février	Avril	Juin	Août	Octobre	Décembre
Sardine (<i>Sardina pilchardus</i>)	3,88 ± 0,2	11,86 ± 0,6	11,47 ± 0,5	5,88 ± 0,2	8,46 ± 0,5	6,92 ± 0,2
Anchois (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	5,71 ± 0,4	3,41 ± 0,3	1,32 ± 0,2	0,94 ± 0,2	2,99 ± 0,3	2,85 ± 0,2
Picarel (<i>Spicara smaris</i>)	4,42 ± 0,4	4,52 ± 0,3	2,95 ± 0,2	0,93 ± 0,2	1,85 ± 0,3	3,06 ± 0,3

L'étude CALIPSO effectuée par Sirot *et al.*, (2008) représente une compilation riche et complète de la composition en acides gras des différents produits de la mer achetés et consommés par la population française. Le tableau suivant représente ces produits de la mer, qui ne sont pas nécessairement produits ou pêchés en France (Tableau 2:11) (Sirot *et al.*, 2008).

Synthèse bibliographique

Tableau 2:11 Moyenne de la composition en quelques acides gras des poissons frais et surgelés consommés en France (mg/100g de lipides)*

Poisson	n**	Lipides (g/100g)	C12:0	C14:0	C14:1 n-5	C15:0	C16:0	C16:1 n-7	C18:0	C18:1 trans	C18:1 cis n-9	C18:1 cis n-7	C18:2 n-6 (AL)	C18:3 n-6	C18:3 n-3 (AAL)	C18:4 n-3	C20:0	C20:2 n-6	C20:4 n-6 (AA)	C20:5 n-3 (EPA)	C22:5 n-3 (DPA)	C22:6 n-3 (DHA)	AGS***	AGMI***	AGPI-LC n-3***	AGPI-LC n-6***
Anchois	1	7,51	-	134	-	-	964	97	422	-	840	-	172	-	211	-	-	-	510	701	964	1365	1520	937	3241	682
Lotte	4	0,21	-	8	-	-	32	6	12	1	18	2	1	-	-	1	-	-	6	26	2	37	52	33	66	7
Roussette	4	0,55	-	-	-	-	71	5	20	-	42	1	2	-	-	1	-	-	22	113	15	66	93	70	195	23
Morue	4	0,3	-	1	-	-	45	2	10	2	19	2	1	-	-	5	-	-	7	28	4	75	57	24	112	8
Limande commune	4	0,72	-	14	-	1	119	25	27	1	83	-	3	-	1	13	5	-	28	84	22	131	174	120	250	30
Anguille	1	20,4	56	675	112	31	3525	1759	847	-	7379	-	618	-	151	296	-	-	666	432	286	716	5583	9591	1880	1285
Empereur	3	5,78	78	26	-	-	541	412	77	30	1616	106	132	3	6	667	8	-	65	471	53	742	847	2212	1940	201
Carrelet	2	0,37	-	10	-	-	60	20	12	-	22	9	1	-	1	2	4	-	14	46	6	41	97	53	97	15
Rougets	3	3,75	-	54	3	5	673	173	151	-	592	-	19	2	4	50	10	-	127	348	77	669	908	801	1147	148
Grenadier/ hoki	4	0,44	-	4	-	-	50	6	16	1	45	2	3	-	2	30	-	-	4	41	8	78	74	66	160	8
Grondin	1	0,73	-	26	-	-	194	-	68	53	66	-	10	-	-	-	49	-	-	43	-	3	336	120	46	10
Aiglefin	1	0,25	-	-	-	-	44	1	11	4	12	-	2	-	2	-	-	-	8	18	5	60	60	18	84	10
Merlu	4	0,59	-	7	-	-	89	13	21	-	73	-	3	1	1	9	11	-	10	28	19	123	130	87	180	14
Flétan	4	11,7	-	366	-	-	1832	808	295	109	1544	329	75	-	9	1296	143	-	116	969	285	1400	3041	3069	3960	191
John dory	2	0,59	-	5	-	-	93	5	27	-	57	-	2	-	2	5	2	-	10	32	8	156	129	63	203	13
Lingue	4	0,33	-	-	-	-	47	4	16	1	22	3	2	-	2	1	-	-	3	45	1	65	65	45	112	4
Maquereau	4	7,07	-	179	-	10	1198	145	327	15	1258	-	145	-	58	343	120	-	114	662	118	1404	1867	1436	2585	259
Lieu jaune	3	0,27	-	-	-	-	45	2	11	1	18	3	1	-	-	1	-	-	4	15	4	76	64	24	97	5
Moué	1	0,29	-	4	-	1	43	6	20	1	6	-	1	-	1	4	1	-	13	36	6	30	89	20	77	14
Raie	4	0,61	-	-	-	-	105	2	20	1	71	-	-	-	-	7	-	-	23	17	15	156	129	77	195	23
Lieu noir/colin	4	1,04	17	10	-	-	144	5	32	1	162	5	120	-	2	9	2	-	7	71	7	173	206	174	262	126
Saumon	4	13,5	-	640	7	8	2472	576	360	248	2204	74	577	13	174	672	105	-	81	1112	349	2164	4006	3237	4472	671

Synthèse bibliographique

Poisson	n**	Lipides (g/100g)	C12:0	C14:0	C14:1 n-5	C15:0	C16:0	C16:1 n-7	C18:0	C18:1 trans	C18:1 cis n-9	C18:1 cis n-7	C18:2 n-6 (AL)	C18:3 n-6	C18:3 n-3 (AAL)	C18:4 n-3	C20:0	C20:2 n-6	C20:4 n-6 (AA)	C20:5 n-3 (EPA)	C22:5 n-3 (DPA)	C22:6 n-3 (DHA)	AGS***	AGMI***	AGPI-LC n-3***	AGPI-LC n-6***
Sardine	4	5,72	-	179	-	11	1200	197	276	-	808	3	37	4	40	146	42	-	89	638	118	1269	1779	1081	2270	130
Rascasse	1	2,27	-	52	-	-	342	72	51	25	265	-	13	-	-	205	16	-	45	121	57	507	464	399	890	57
Bar	4	2,99	2	44	1	3	502	124	154	3	380	27	47	4	12	40	7	2	72	357	65	617	732	561	1090	125
Dorade	4	4,89	-	93	-	-	887	249	234	287	605	37	195	6	27	70	28	-	149	497	140	773	1308	1233	1507	350
Sole	4	0,4	-	6	-	-	62	12	21	-	30	7	3	-	1	-	4	-	16	14	22	72	101	52	109	19
Espadon	4	12,4	-	241	-	30	2035	488	651	37	2108	469	70	24	39	367	191	-	447	1265	343	1750	3398	3328	3764	541
Thon	4	0,73	-	6	-	1	109	10	53	-	94	1	12	1	3	4	3	-	18	35	7	131	187	113	179	31
Merlan	4	0,25	-	1	-	-	37	2	9	-	22	-	1	-	1	6	1	-	3	15	3	69	53	29	93	5

* Un tiret signifie que la valeur est en dessous de la limite de quantification (0,1g/100g de la totalité des lipides)

** Quantité d'échantillons, chaque échantillon étant composé de cinq échantillons primaires de la même espèce, représentatif des méthodes d'approvisionnement dans chaque zone (port, marché, supermarché...)

*** Les totaux d'AGS, AGMI, AGPI et AGPI-LC représentent la somme de tous les acides gras analysés (La totalité des 48 acides gras analysés n'apparaît pas dans le tableau)

2.4.3.3 Effet de l'alimentation et des saisons sur la composition en acides gras des poissons

La teneur en lipides et la nature des acides gras peuvent être modulées chez les poissons d'aquaculture en fonction de leur alimentation. L'utilisation d'aliments à haute énergie, riches en lipides, permet de limiter l'apport protéique. Dans le but d'augmenter la synthèse en EPA et DHA chez les poissons d'aquaculture, une alimentation très riche en précurseurs est utilisée, contenant principalement des huiles végétales riches en acides gras oméga-3 comme l'huile de lin, l'huile de colza et l'huile de chanvre (Pickova and Morkore, 2007) (Tableau 2:12).

Tableau 2:12 Pourcentage des acides gras de la famille des omega3 et le ratio n-6/n-3 des huiles de sources végétales utilisées en aquaculture (Pickova and Morkore, 2007)

Type d'huile	% n-3	Ration n-6/n-3
Huile de soja	8	7
Huile de lin	60	0,2
Huile de chanvre	22	2,5
Huile de colza	13	2
Huile d'olive	1	8
Huile de palme	0,5	20
Huile de coton	-	>100
Huile de maïs	1	60
Huile de tournesol	0,5	>100

Cependant, cette utilisation d'huiles végétales entraîne une modification du profil en acides gras et notamment en AGPI-LC car les poissons marins ont une capacité limitée de bioconversion des acides gras essentiels en EPA et DHA (Miller *et al.*, 2008).

Le profil d'acides gras des poissons, spécialement les acides gras estérifiés sur les triacylglycérols, reflète la composition en acides gras du régime alimentaire. La morue d'Atlantique nourrie avec de l'huile de soja contiennent plus de 18:1n-9, de 18:2n-6 et moins de 20:5n-3, de 22:5n-3 et de 22:6n-3 contrairement à une alimentation qui contient uniquement des huiles de poisson commerciales (Mørkøre, 2006).

Chez les espèces de poissons maigres, cet effet pourrait être moins prononcé car le muscle contient de très faible quantité de lipides, il est majoritairement constitué de phospholipides, qui sont plus stables et difficilement altérés par les régimes alimentaires. Cependant, les poissons gras stockent les acides gras provenant de l'alimentation pour les besoins énergétiques (Mørkøre, 2006; Zhou *et al.*, 1996).

Un régime de finition peut être apporté pour rétablir cet équilibre en alimentant les poissons avec de l'huile marine (Harris *et al.*, 2011). Ce régime peut atteindre 24 semaines dans le cas de saumon d'Atlantique. Le Tableau 2:13 présente la diversité de composition en acides gras chez différentes espèces de saumon.

Tableau 2:13 Composition en acides gras de saumon d'origines marines différentes (%)
a: (Refsgaard *et al.*, 1998) ; b: (Aursand *et al.*, 2000); c: (Peng *et al.*, 2003); d: (Nanton *et al.*, 2007)

Acides gras	<i>Salmo salar</i> Norvège (a)	Saumon d'Ecosse (b)	Saumon de Norvège (b)	<i>Salmo salar</i> anadromous (c)	Saumon d'Atlantique (d)	Saumon d'Atlantique (d)
14 :0	4,8	3,6	3,5	7,7	4,3	0,8
15 :0	0,4	-	-	-	-	-
16 :0	17,3	7,0	6,4	15,8	13,3	13,8
16 :1 n-7	6,7	6,6	4,8	8,4	-	-
18 :0	3,4	2,1	2,3	3,0	2,7	3,5
18 :1 n-9	9,3	13,4	10,8	14,3	14,8	37,0
18 :1 n-7	2,6	-	2,4	3,4	2,8	2,2
18 :2 n-6	1,5	4,4	2,8	4,3	2,8	12,2
18 :3 n-3	0,8	-	-	1,2	1,0	7,2
18 :4 n-3	2,1	-	-	1,9	1,3	0,9
20 :1 n-9	2,1	12,5	11,5	8,5	9,3	2,8
20 :4 n-6	1,3	-	-	0,4	0,6	0,5
20 :5 n-3	15,6	13,4	7,4	4,2	4,8	2,8
22 :5 n-5	2,0	1,0	3,4	1,9	2,4	0,9
22 :6 n-3	11,4	10,2	14,3	9,6	15,7	7,9

Les acides gras sont présentés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux

D'après la littérature, il semblerait que les poissons issus de l'aquaculture contiennent un pourcentage plus élevé en EPA/DHA comparés aux poissons capturés (Narayan *et al.*, 2006). Les espèces aquatiques vivant dans des eaux froides, contiennent généralement des teneurs en EPA et DHA plus importantes (Narayan *et al.*, 2004) (Tableau 2:14).

Tableau 2:14 Quantité d'EPA et de DHA chez quelques poissons en g/100g de poisson cru

Poisson	EPA (g)	DHA (g)	EPA/DHA
Morue de l'atlantique	0,06	0,12	0,50
Morue du pacifique	0,08	0,14	0,57
Maquereau d'Atlantique	0,90	1,40	0,64
Saumon d'Atlantique sauvage	0,32	1,11	0,29
Saumon d'Atlantique d'élevage	0,86	1,10	0,48
Saumon, Coho sauvage	0,43	0,66	0,65
Saumon, Coho d'élevage	0,36	0,82	0,44

2.4.4 Acides gras omega-3 et santé

Depuis le début des années 1970, les acides gras polyinsaturés plus communément appelés AGPI, font l'objet d'une attention toute particulière de la communauté scientifique en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine (Narayan *et al.*, 2006). Le point de départ, mis en exergue par une étude épidémiologique conduite par une équipe danoise (Bang and Dyerberg, 1972; Dyeberg *et al.*, 1975) a été de corrélérer une faible incidence des maladies cardio-vasculaires chez une population d'esquimaux du Groenland avec un régime alimentaire riche en poissons et mammifères marins (400 g par jour) contenant de fortes proportions des acides gras éicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA).

Ces deux molécules, chefs de file des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC), font l'objet de très nombreuses études en raison de leur fort potentiel dans la prévention de l'athérosclérose, de l'hypercholestérolémie et de l'hypertriglycéridémie plasmatique (Rambjor *et al.*, 1996; Saldeen *et al.*, 1998). La régulation du tonus vasculaire, la pression, la viscosité sanguine et l'agrégation plaquettaire sont également influencée favorablement par ces composants lipidiques (Freese and Mutanen, 1997; Ikeda *et al.*, 1994; Vognild *et al.*, 1998).

Outre leur fonction énergétique, les AGPI-LC sont des constituants importants des phospholipides membranaires des cellules de l'organisme et des précurseurs de médiateurs oxygénés (prostaglandines, thromboxanes, leucotriènes) intervenant notamment dans les processus d'inflammation et d'agrégation plaquettaire. Précurseurs des eicosanoïdes, les AGPI n-3 jouent un rôle dans les réponses immunitaires (Kelley and Bendich, 1996) et dans certaines maladies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde (Kremer, 2000), le psoriasis (Simopoulos, 1991), la néphrite glomérulaire (Donadio Jr, 2000) ou l'eczéma (Horrobin, 2000).

L'activité anti-inflammatoire des ω -3 intervient au niveau du métabolisme de l'acide arachidonique (AA) par la cyclooxygénase II où l'EPA peut entrer en compétition avec l'AA, conduisant à une augmentation du ratio DHA/AA limitant la production d'eicosanoïdes potentiellement pro-inflammatoires (Bousquet *et al.*, 2011). De plus, l'EPA intervient en inhibant l'oxygénation de l'AA, évitant ainsi la production de métabolites dérivés pro-inflammatoires de l'AA comme les prostaglandines, les thromboxanes et les leukotriènes. Le pouvoir anti-inflammatoire des ω -3 provient également des dérivés de l'EPA et surtout du

DHA tels que les résolvines et les protectines, qui inhibent la production et le transport des espèces pro-inflammatoires (Bousquet *et al.*, 2011).

D'autre part, des effets avérés semblent suggérer leur implication inhibitrice dans la genèse et la progression de certains cancers (Bougnoux, 1999; Gonzalez-Zulueta *et al.*, 1995; Saadatian *et al.*, 1999), en particulier les cancers du côlon, du sein et de la prostate.

Le DHA, retrouvé en proportion importante dans les phospholipides membranaires, les neurones et la rétine (Neuringer *et al.*, 1986), joue un rôle essentiel dans le développement et la croissance du fœtus et du nourrisson (Crawford, 2000; Gibson and Makrides, 1998; Henna Lu *et al.*, 2011).

Par ailleurs, des résultats prometteurs montrent le rôle particulier des AGPI-LC et notamment du DHA sur les pathologies liées au vieillissement (maladies neuro-dégénératives) et font l'objet de nombreuses publications (Favrelière *et al.*, 2003). En effet, il existe une association étroite entre les oméga-3 et l'anxiété. Une étude effectuée en 2002 par Silvers et Scott a montré que la consommation de poisson influence l'état de santé moral et physique du consommateur (Silvers and Scott, 2002). D'autres études épidémiologiques ont appuyé cette relation en mettant en évidence qu'un régime alimentaire riche en poisson permet de diminuer la dépression (Parker *et al.*, 2006) et l'anxiété (Ross, 2009).

Une étude récente de Vinot et ses collaborateurs (2011) a montré une diminution de l'anxiété, de l'activité locomotrice et une amélioration des performances cognitives (mémoire spatiale) chez des souris supplémentées quotidiennement pendant 5 mois par des AGPI-LC issus d'huile de poisson (Vinot *et al.*, 2011).

Plusieurs études sur des modèles murins ont lié l'anxiété au stress oxydant (Bouayed *et al.*, 2009). Ce dernier est régulé par l'équilibre redox au niveau cellulaire. Il est à l'origine de maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson, l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer ou la schizophrénie. Cependant, les oméga-3 présentant des propriétés antioxydantes, s'avèrent avoir la capacité de réguler la glutathion réductase qui est une enzyme antioxydante. Ils permettent ainsi de diminuer le nombre de protéines oxydées, les dommages subis par l'ADN par des peroxydes et certaines espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Bazan *et al.*, 2005).

Le Tableau 2:15 récapitule les études les plus citées concernant les effets physiologiques des AGPI-LC-oméga-3.

Tableau 2:15 Prévention et traitements de certaines maladies par les AGPI-LC

Maladies	Références
Cancer	(Calviello <i>et al.</i> , 2007; Chen <i>et al.</i> , 2007)
Asthme bronchique	(Kromann and Green, 1980; Reisman <i>et al.</i> , 2006; Ruxton <i>et al.</i> , 2005)
Sclérose en plaques	(Kromann and Green, 1980)
Psoriasis	(Kromann and Green, 1980; Zulfakar <i>et al.</i> , 2007)
Maladies cardiovasculaires Infarctus du myocarde	(Biscione <i>et al.</i> , 2007; Kromann and Green, 1980; Ruxton <i>et al.</i> , 2005; Zyriax and Windler, 2000)
Maladies neurologiques et mentales (dépression, schizophrénie, anxiété ...)	(Clayton <i>et al.</i> , 2007; Mazza <i>et al.</i> , 2007; Ruxton <i>et al.</i> , 2005)
Fonctions immunitaires et inflammation	(Ruxton <i>et al.</i> , 2005)
Maladies intestinales	(Diamond <i>et al.</i> , 2008; Razack and Seidner, 2007)
Autisme	(Meguid <i>et al.</i> , 2008)
Diabète	(Kromann and Green, 1980)

2.4.5 Evolution du marché des acides gras oméga-3

La consommation de produits contenant de l'EPA et du DHA a augmenté considérablement ces dernières années en raison de la sensibilisation de la population sur les bienfaits des acides gras oméga-3 sur la prévention de certaines pathologies. Le marché de ces AGPI-LC a quadruplé depuis les années 2000 et le « Global Organization for EPA and DHA » estime que 86 000 tonnes d'huile contenant ces AGPI-LC ont été consommées en 2009 (Ismail, 2010). Outre les huiles de poisson, qui constituent le plus gros segment du marché (anchois, sardine, menhaden), de nouveaux produits très riches en EPA et/ou DHA apparaissent sur le marché comme les huiles de Krill, de calmar, ou de micro-algues (Figure 2:17 et Tableau 2:16).

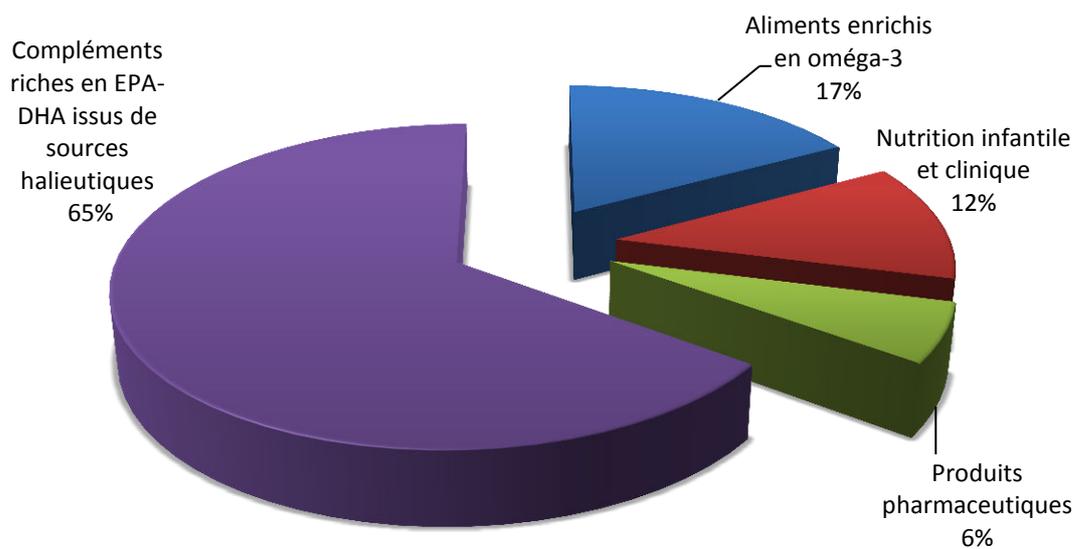


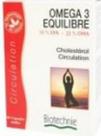
Figure 2:17 Les différentes sources actuelles d'AGPI-LC (Frost and Sullivan, 2010)

Synthèse bibliographique

Tableau 2:16 Compilation des produits commercialisés en concurrence avec le Vectomega®

Nom du produit	Emballage	Source	Nature des lipides	oméga 3 (%)	Teneur en AGPI-LC oméga3/capsule	Autres composés bioactifs
OM3 emotion		anchois, sardines	Esters éthyliques	95%	OMEGA-3 (mg) : 475 EPA (mg) : 375 DHA (mg) : 50	Vitamine E
Produits contenant uniquement des TAG						
HERBESAN®		anchois, sardines	Triglycérides	30%	OMEGA-3 (mg) : 136 EPA (mg) : 82 DHA (mg) : 54,5	Vitamine E
ELTEANS COMPLÉMENT NUTRITIONNEL		huiles de saumon, de soja-carotte et l'huile de bourrache	Triglycérides	-	-	Pas d'autres composés actifs
SELOMEGA 3		huile de poisson extrêmement raffinée	Triglycérides	60%	EPA (mg) : 150 DHA (mg) : 100	Vitamine E Sélénium
OM3memory		anchois, sardines	Triglycérides	60%	OMEGA-3 (mg) : 250 EPA (mg) : 41,7 DHA (mg) : 208,5	vitamine E CURCUMA LONGA L (mg) 27,5
OMEGA SOURCE 3		anchois et sardines	Triglycérides	65%	OMEGA-3 (mg) : 325 EPA (mg) : 150 DHA (mg) : 100	vitamine E
Oméga-3 -90%		Chaire d'anchois et de sardines	Triglycérides	90%	OMEGA-3 (mg) : 500 EPA (mg) : 350 DHA (mg) : 50	vitamine E

Synthèse bibliographique

JUVAMINE Oméga-3 Sérénité		Poissons sauvages pélagiques	Triglycérides	70%	OMEGA-3 (mg) : 350 EPA (mg) : 250 DHA (mg) : 100	vitamine E
OMEGA SUPER PLUS		Onagre (Œnothère) et poisson	Triglycérides	2,25%	EPA + DHA (mg) : 225	vitamine E
OM3flex		anchois, sardines	Triglycérides	90%	OMEGA-3 (mg) : 300 EPA (mg) : 233 DHA (mg) : 33	sulfate de zinc, vitamine E
CORVITEC		Onagre (Œnothère) et poisson	Triglycérides	-	OMEGA-3 (mg) : 200 EPA (mg) : 60 DHA (mg) : 40	Hydrolysate cartilage marin ; Vitamine C, B3, B2, B1, E ; Magnésium, Extrait de Vitis vinifera, Zinc ; Lutéine, Lycopène Sélénium
OMEGA 3 EQUILIBRE		Poisson	Triglycérides	-	OMEGA-3 (mg) : 1500 EPA (mg) : 150 DHA (mg) : 750	vitamine E
OM3vital		anchois, sardines	Triglycérides	70%	OMEGA-3 (mg) : 276 EPA (mg) : 41 DHA (mg) : 193	Vitamine B1
CARDIOM3		anchois, sardines et thons	Triglycérides	70%	OMEGA-3 (mg) : 276 EPA (mg) : 41 DHA (mg) : 193	Vitamine B1
EPA ADULTES OMEGA 3 - BIOVER		Poisson	Triglycérides	-	EPA (mg) : 165 DHA (mg) : 110	Vitamine E

Synthèse bibliographique

OMEGA-3 HUILE DE POISSON- BIOVEA		sardine, anchois, maquereau	Triglycérides	-	EPA (mg) : 180 DHA (mg) : 120	Mélange de tocophérols
Saumon		Saumon	Triglycérides	-	EPA (mg) : 50 DHA (mg) : 50	-
Oméga-3-Yves Ponroy		Chaire de poisson	Triglycérides	-	OMEGA-3 (mg) : 276	Protéines de poisson hydrolysées Vitamine E
OMÉGA PREMIUM - SUPER DIET		anchois, sardines	Triglycérides	-	OMEGA-3 (mg) : 350 EPA (mg) : 250 DHA (mg) : 100	Vitamine E
OMÉGA-3 (EPA, DHA)		Poisson de haute mer	Triglycérides	34%	OMEGA-3 (mg) : 136 EPA (mg) : 72 DHA (mg) : 32	Vitamine E
Granio + restor		poissons pêchés dans des zones océaniques	Triglycérides	60%	EPA (mg) : 158,44 DHA (mg) : 111,84	le sélénium et le magnésium
Oméga-3 - Q10 - Pranarôm		poissons marins gras et huiles végétales de colza et de rose musquée	Triglycérides	-	-	vitamine B9 Coenzyme Q10
Produits contenant des PL en plus des TAG						
OmégaKrill - Biocyte		Krill	Triglycérides Phospholipides (200 mg)	-	OMEGA-3 (mg) : 150 EPA (mg) : 75 DHA (mg) : 75	Vitamine A, E, Sodium Astaxanthine

Synthèse bibliographique

Phospholipides marins-Les oméga-3 de la vision		Krill	Triglycérides Phospholipides	-	EPA (mg) : 25 DHA (mg) : 59	Astaxanthine (37 mg)
Polaroil		Krill	Triglycérides Phospholipides	-	OMEGA-3 (mg) : 115 EPA (mg) : 57 DHA (mg) : 33	Astaxanthine > 50 ppm
Vectomega		Saumon	Triglycérides Phospholipides (80 mg)	-	OMEGA-3 (mg) : 39 EPA + DHA (mg) : 32	Hydrolysate peptidique de saumon
Molval		Protéines : Molva molva Huile de poisson des mers froides	Triglycérides	-	EPA (mg) : 28 DHA (mg) : 18	Vitamine E
VitalSea		Krill	Triglycérides Phospholipides (120 mg)	-	OMEGA-3 (mg) : 198 EPA (mg) : 45 DHA (mg) : 27	-
Oemine Krill		Krill	Triglycérides Phospholipides (200 mg)	-	OMEGA-3 (mg) : 150 EPA (mg) : 75 DHA (mg) : 45	-
Caviar phospholipides	-	Œufs de saumon sauvage	Triglycérides Phospholipides (90mg)	-	OMEGA-3 (mg) : 135 EPA (mg) : 6,7 DHA (mg) : 11,25	-
Oemine Psoriacalm		Poissons de mers froides	Triglycérides Phospholipides (76 mg)	-	OMEGA-3 (mg) : 28 DHA/EPA : 4/2	-

2.4.6 Teneur recommandée en AGPI-LC dans différents pays

Les différentes organisations mondiales (FAO, OMS) s'accordent sur le fait que dans la plupart des sociétés, la consommation en AGPI-LC-oméga-3 reste relativement faible. Actuellement, les régimes occidentaux ont atteint un ratio en acides gras oméga-6/oméga-3 de 10/1 jusqu'à 20-25/1 (Simopoulos, 2011). Le ratio $\omega 6/\omega 3$ atteint des valeurs très élevées en Europe, aux USA (50) et au Japon (12) contrairement aux premières observations de l'équipe danoise (Bang and Dyerberg, 1972) chez les Esquimaux du Groenland où l'on retrouve un ratio de 1 (Simopoulos, 2011). Les scientifiques sont unanimes concernant l'importance de réduire, dans un régime alimentaire, la quantité en AGPI-LC-oméga-6 et d'augmenter la consommation des AGPI-LC-oméga-3, à la fois pour les adultes et les nouveaux nés (Simopoulos *et al.*, 2000). Dans le but de corriger ce déficit en AGPI-LC-oméga-3, les recommandations établies prennent en compte, non seulement les quantités apportées, mais aussi la nature du régime alimentaire (Bockisch, 2010). Simopoulos *et al.*, ont montré en 2000 qu'un régime alimentaire sain correspond à une consommation importante d'EPA et de DHA couplée à une réduction de consommation des huiles végétales riches en acide linoléique et par conséquent une réduction en acide arachidonique (AA) (Simopoulos *et al.*, 2000).

Il a été défini récemment par l'agence nationale de sécurité sanitaire (ANSES-rapport d'expertise collective-Mai 2010) un besoin physiologique en acides gras totaux constituant entre 35 à 40 % de l'apport énergétique (AE). En effet, un apport en lipides inférieur à 30 % de l'AE conduit à réduire très significativement les apports en AGPI. De nouveaux apports nutritionnels conseillés (ANC) ont été établis pour l'EPA et le DHA et sont de 250 mg/jour/adulte pour chacun de ces deux AGPI-LC. Les besoins sont fonction des individus et de leur tranche d'âge mais il est intéressant de noter que toutes les recommandations en EPA et DHA, établies par les organisations mondiales, ne sont pas en dessous de 200 mg/jr en moyenne (Bockisch, 2010).

Le Tableau 2:17, ci-dessous, récapitule les différentes recommandations en EPA et DHA dans différents pays.

Tableau 2:17 Moyenne minimale quotidienne d'EPA+DHA d'après les recommandations de différents pays (Bockisch, 2010)

Pays	Année	ANC (EPA + DHA) mg/jr
France	2010	500
USA (American Heart Association)	2002	1000
USA (Scientific Advisory Committee)	2004	450
Australie/Nouvelle Zélande	2005	610 (hommes) / 410 (femmes)
Pays bas	2006	450
Allemagne	2009	300

La meilleure méthode permettant de couvrir les ANC en EPA + DHA est de consommer régulièrement du poisson tels que le saumon, le maquereau et la sardine, ou de compléter son alimentation par la prise de compléments alimentaires enrichis en acides gras de la série n-3, ou de consommer des gélules d'huile de poisson (Harris *et al.*, 2011).

Depuis quelques années, de nouveaux produits arrivent sur le marché permettant une vectorisation des AGPI-LC par des lipides polaires. C'est le cas du Krill, mais aussi des œufs de poisson. Dans ce secteur, un complexe phospholipopeptidique, a été développé à l'ENSAIA et breveté sous le nom du Vectoméga®. Il est actuellement exploité sous licence par les Laboratoires Le Stum.

2.4.7 Positionnement du Vectoméga® face au marché des compléments alimentaires riches en AGPI-LC

Le Vectoméga® est un complexe naturel de phospholipides, de triacylglycérols et de peptides marins. Cette innovation technologique est extraite sans solvant organique, par un procédé enzymatique à basse température sous atmosphère contrôlée, permettant de préserver les AGPI-LC. Le procédé, breveté, est exploité par les Laboratoires Le Stum à partir de têtes de saumon (Laboratoires Le Stum, 2005).

La technologie employée permet de valoriser à la fois les hydrolysats peptidiques, les huiles neutres riches en antioxydants naturels et en AGPI-LC, ainsi que les lipides polaires sur lesquels sont estérifiés de fortes concentrations en DHA.

La maîtrise du degré d'hydrolyse permet d'obtenir des peptides marins naturellement associés aux phospholipides et participent au bon fonctionnement du métabolisme. De plus, ils permettent une excellente digestibilité, une stabilité et une tolérance optimale au produit (pas d'éructation, d'aigreur, ni de remontées d'odeur de poisson, malheureusement typiques des huiles de poisson). Pour le consommateur, le premier effet évident est un

masquage total des odeurs après ingestion. Il n'y a aucun reflux. La présence de peptides confère d'autre part, une solubilité accrue du complexe phospholipopeptidique (Laboratoires Le Stum, 2005). Différentes études scientifiques ont été menées pour valider son efficacité. Le Vectomega® a prouvé, dans une étude *in vitro* versus une huile de poisson de référence, sa supériorité d'assimilation, de résistance à l'oxydation et d'incorporation dans les membranes cellulaires.

Une étude *in vivo* a confirmé cette biodisponibilité importante des oméga3 de Vectomega® (+300%) lorsqu'ils sont apportés sous une forme phospholipidique, comparée à une forme triglycéride (huile de poisson classique).

Les résultats d'une deuxième étude *in vivo* suggèrent un intérêt de Vectomega® chez les sujets présentant un problème d'impulsivité, une des trois caractéristiques des troubles du déficit de l'attention/hyperactivité (TDAH). Un suivi de cas réalisé pendant 2 mois sur 40 volontaires sains a montré l'effet de Vectomega® pour l'amélioration de la mémoire, la concentration, le tonus, le sommeil et la récupération physique.

2.4.8 Retour sur les différents procédés d'extraction des huiles et lécithines marines

2.4.8.1 Méthode d'extraction des huiles

Les huiles marines sont généralement extraites à partir de petits pélagiques d'eau froide contenant de fortes proportions d'EPA et de DHA comme la sardine, l'anchois, le capelan, le hareng et le menhaden dont les principaux pays producteurs sont le Japon, le Chili, le Pérou, la Norvège et les Etats-Unis. L'extraction des huiles s'effectue avec des presses hydrauliques ou à levier (Wakelyn and Wan, 2006) majoritairement sur des co-produits de filetage (foie de morue) et des espèces faiblement valorisables sur les marchés. La méthode de pressage se résume par une étape de cuisson suivie d'un pressage (FAO, 1986; Rubio-Rodriguez *et al.*, 2010). Une étape de centrifugation ou de filtration puis un lavage à l'eau permettent d'éliminer la phase aqueuse et les traces de protéines (FAO, 1986; Gbogouri, 2005). Depuis les années 30, l'extraction avec solvant a été initiée à partir des oléagineux et d'autres matériaux riches en huile (Wakelyn and Wan, 2006). Les solvants organiques ont été ensuite incriminés en raison de leurs effets négatifs sur la santé des consommateurs. L'éthanol, l'isopropanol, l'eau et le CO₂ supercritique restent les solvants les plus employés pour extraire les huiles marines en raison de leur autorisation sur le marché mais ceci reste économiquement peu rentable (Wakelyn and Wan, 1997). Les chercheurs se sont intéressés

par la suite à l'extraction des lipides par acétone, ce dernier n'étant pas interdit par l'U.S.E.P.A (United States Environmental Protection Agency) (Wakelyn and Wan, 2006). Cependant, l'extraction des lipides à l'aide de solvants organiques est généralement réservée à des fins analytiques (Tableau 2:18).

Tableau 2:18 Exemple de techniques courantes d'extraction des lipides par solvants organiques

Méthode	Température	Solvants	Références
Folch <i>et al.</i> ,	Ambiante	Chloroforme/méthanol (2 : 1 ; v/v) + lavage avec du NaCl (0,9%)	(Folch <i>et al.</i> , 1957)
Bligh & Dyer	Ambiante	Chloroforme/méthanol/eau (2 : 2 : 1,8 ; v/v/v)	(Bligh and Dyer, 1959)
Adeniyi & Bawa	Ambiante	Ether de pétrole	(Adeniyi and Bawa, 2006)
Soxhlet	50°C	Ether de pétrole	(AOAC, 1990)

A partir du 20^{ème} siècle, de nombreux brevets ont été publiés décrivant de nouvelles méthodes et appareillages d'extraction des huiles de poissons permettant d'augmenter à la fois le rendement de l'extraction et la qualité de l'huile de poisson (Rubio-Rodriguez *et al.*, 2010). Parallèlement, ces brevets utilisent plutôt les co-produits de poisson que la chair en tant que matière première (Tableau 2:19).

Tableau 2:19 Brevets portant sur l'extraction de l'huile de poisson (Rubio-Rodriguez *et al.*, 2010)

Année	Titre	Inventeur	Référence
1901	Process of extracting oil from fish or other material	E.R. Edson	US689472
1930	Process of recovering oil from fish livers and other similar materials	A.W.Owe	US1742666
1932	Fish oil extraction	S. Hiller	US1840715
1933	Method and process of extracting oil and moisture from fish press cake	W.T. Conn	US1903503
1938	Improvements in and relating to the production of fish liver	Non disponible	GB0486277
1939	Process and apparatus for the extraction of oil from fish liver	Non disponible	GB0500645
1943	Improved method of obtaining oil form fish livers	Non disponible	GB0558290
1952	Production of oil and proteins from fish	Non disponible	GB0664827
1952	Improvements in the extraction of oil from fish liver	Non disponible	GB0675661
1966	Production of pharmaceutical oil from fish oil	E. Potter	GB1026359
1967	Method of recovering fish oil	Non disponible	GB1070128
1976	Process for producing improved fish meal, and fish oil by-product	D.B. Vincent	US3959518
1982	Process for recovering meal and oil from raw fish	P. Bladh	US4344976
1987	A refined fish oil concentrate and the production process for sample	H. Breivik, B. Borretzen, et T.E. Joergensen T.	WO8703899
1987	Purified fish oil and its production	Wakabayashi, et S. Nagahama	JP62093234

Synthèse bibliographique

Année	Titre	Inventeur	Référence
1988	Production of fish liver oil containing high units of vitamins	M. Morimitsu	JP63290823
1989	Process for producing protein-rich fish meal and/or fish oil	Y. Shirakawa, Y. Minowa, T. Azumi, et J. Hisano F.	EP0301795
1990	Method for extracting oil from fish offal	Eriksson	W09008179
1995	Fish oil having decreased fish odour and a method for preparing the same	H. Konishi, I. Riverside, K. Tatsumi, et N. Sato A.	EP0665287
1996	A method for recovering fish oil having low cholesterol content from fat fish, and use of the oil in foodstuff	Oterhals	WO9608547
1998	Production of high-quality fish oil and high-quality edible extract from head of bonito	N. Koichi	JP10225275
2001	Method and plant for extracting fish oil and resulting products	P. Barrier, et J.Y. Rousseau	US6214396
2001	Process for producing edible quality refined fish oil	J.B. Crowther, B.H. Booth, et D.D. Blackwell	WO014158
2007	A process for the production of oil and protein from fish waste	J.B. Cloughley	GB2428682

L'utilisation d'outils biotechnologiques a permis de diversifier les procédés d'extraction d'huiles à partir d'écartés de poisson. Les procédés enzymatiques, utilisant des protéases gastriques et intestinales, sont largement utilisés dans les industries alimentaires et particulièrement en industrie de la viande et du poisson à des fins nutritionnelles, humaines, animales, pharmaceutiques et cosmétiques (Gbogouri, 2005). Initialement utilisée pour valoriser les fractions peptidiques, l'hydrolyse enzymatique permet également de libérer une partie lipidique à partir de la matière première. En effet, en variant les paramètres de la cinétique enzymatique par planification expérimentale, Gbogouri *et al.*, (2006) ont réussi à obtenir une phase lipidique de bonne qualité, extraite sans solvants et à basse température pour protéger les AGPI-LC de l'oxydation (Gbogouri *et al.*, 2006).

De nombreuses recherches à l'échelle laboratoire ou pilote ont étudié un nombre important de conditions opératoires (rapport enzyme/substrat, température et durée d'hydrolyse) en fonction de la nature des solutions enzymatiques (Qian *et al.*, 2011; You *et al.*, 2011).

2.4.8.2 Extraction de la lécithine marine

Dans l'alimentation, 98% des acides gras sont apportés sous forme estérifiée essentiellement sur les TAG, le reste étant estérifié sur les phospholipides (PL) et les esters de cholestérol (Mattson and Volpenhein, 1964). La lécithine est une substance composée principalement de mélange de phospholipides, en particulier de PC et de PE avec une faible

teneur en glycérides, lipides neutres et d'autres composés liposolubles (Uddin *et al.*, 2011). Sur le plan biochimique, on dénomme souvent la phosphatidylcholine : lécithine.

La lécithine a plusieurs fonctions dans l'organisme. Elle fournit tout d'abord à l'organisme de la choline qui est un cofacteur dans la production de l'acétylcholine (hormone et neurotransmetteur intervenant dans le système nerveux central et périphérique). D'autre part il s'agit d'une source d'acides gras essentiels, notamment l'EPA et le DHA contenus dans les lécithines marines. De plus, la lécithine est un agent émulsifiant puissant dans le système digestif (Martin-Hernandez *et al.*, 2005).

Les lécithines proviennent des jaunes d'œufs, des tissus animaux et des plantes. Elles sont largement utilisées en tant que surfactant et stabilisant dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques. Les principales sources commerciales de lécithine sont issues de soja, du tournesol et du jaune d'œuf (Martin-Hernandez *et al.*, 2005). En effet, contrairement aux lécithines marines, ces lécithines commercialisées ne représentent qu'un faible intérêt pour l'organisme, en raison de l'absence en d'AGPI-LC (EPA et DHA), mais aussi à cause de leur richesse en acides gras saturés et en cholestérol notamment pour la lécithine provenant du jaune d'œuf (Uddin *et al.*, 2011).

Les techniques d'extraction des lécithines utilisent généralement des solvants organiques ou des voies enzymatiques. Plusieurs brevets ont été déposés permettant l'extraction des lécithines à l'aide de solvants organiques (Tableau 2:20).

Tableau 2:20 Brevets d'extraction des phospholipides marins par solvants organique

Année	Titre	Source	Solvants	Inventeur	Référence
2003	Products containing highly unsaturated fatty acids for use by women and their children during stages of preconception, pregnancy and lactation/post-partum	Oeufs de volailles, algues, poissons, oeufs de poissons	Friolex process Alcool	Van ELSWYK	WO 03/017945 A2
2003	Method for extracting lipid mixture containing phospholipids comprising PUFA from viscera of fish, method for preserving viscera prior to extraction, and lipid mixture extracted thereby	Viscères de poissons	Ethanol, Méthanol, Propanol	Hiratsuka <i>et al.</i> ,	US 0190392
2004	Natural Marine source Phospholipids comprising Flavonoids, polyunsaturated fatty acids and their	Krill	Acétone Ethyl Acetate/éthanol (95: 5 v/v)	Fotini Sampalis	US 04/0234587 A1

Synthèse bibliographique

Année	Titre	Source	Solvants	Inventeur	Référence
	applications				
2004	Marine lipid compositions	Marine	Acétone, CO ₂ supercritique	Leigh <i>et al.</i> ,	WO 04/047554 A1
2006	Process for the production of phospholipids	Farine de poisson	Hexane, Isohexane, Cyclohexane et acétone, CO ₂ supercritique	Schneider, M. and Lovaas, E.	WO 06/106325

Concernant la voie enzymatique, qui demeure la technique la plus respectueuse de l'environnement, peu de brevets ont été développés pour l'obtention de la lécithine marine (Tableau 2:21).

Tableau 2:21 Brevets d'obtention des phospholipides par voie enzymatique

Année	Titre	Source	Enzymes	Inventeur	Référence
2002	Procédé d'obtention d'une huile et d'un hydrolysate de protéines à partir d'une source marine de tissus protéiques et huile et hydrolysate de protéines obtenues par mise en oeuvre de ce procédé	Marine	Alcalase	Linder <i>et al.</i> ,	Fr 2002 02 01540/ 2 835 703
2006	Enzymatically synthesized marine phospholipids (Trans esterification des AGPI-LC-oméga-3 sur des phospholipides)	Marine et végétale	Enzyme TL-IM	Bruheim <i>et al.</i> ,	US 2006 0177486 A1

2.5 Les peptides d'origine marine

L'attention a été orientée, pendant plus d'une dizaine d'années, sur les effets bénéfiques des poissons et des produits halieutiques en général, en raison de leur teneur importante en AGPI-LC de la famille des oméga-3, notamment l'EPA et le DHA. Cependant ces produits constituent une autre source de molécules à activités biologiques importantes que sont notamment les peptides marins.

La recherche scientifique s'est récemment intéressée à la bioactivité des peptides issus de sources variées comme le lait, les protéines de soja, mais aussi provenant des protéines de poissons (Wang *et al.*, 2008b). En effet, les activités biologiques propres aux peptides marins ainsi que leur effet synergique avec les AGPI, ont été mis en évidence (Bouglé, 2007; Larsen *et al.*, 2011). Pour exercer leurs activités biologiques, les peptides fonctionnels doivent être libérés des protéines natives par digestion enzymatique. Le tableau suivant présente les différentes enzymes intervenant dans le processus de digestion telles que la trypsine, la chymotrypsine et la pepsine (Tableau 2:22).

Tableau 2:22 Enzymes utilisées dans la production d'hydrolysats

Enzymes utilisées pour l'hydrolyse	Matière première	Références
Papaine (50°C) Bromelaine (50°C) Flavourzyme (50°C)	Poisson « leatherjackets »	(Salampessy <i>et al.</i> , 2010)
Pepsine (37°C) Trypsine (37°C)	Crevette	(Nii <i>et al.</i> , 2008)
Alcalase Flavourzyme Protamex SM98011	Crevette, coquille Saint Jacques, huître, chaire de requin, arrêtes de maquereau, tête de maquereau, arrêtes et peau de morue, peau de carassin, arrêtes de carassin, algue rouge, algue bleue verte	(He <i>et al.</i> , 2007)
Pancréatine porcine (50°C) Contenant: trypsine, amylase, lipase	Laitance de saumon	(Wang <i>et al.</i> , 2008b)

2.5.1 Propriétés des peptides issus de produits marins

L'activité des peptides dépend de la composition et de la longueur des chaînes peptidiques qui peut être maîtrisée en fonction des conditions expérimentales, du degré d'hydrolyse et de la nature des cocktails enzymatiques utilisés (He *et al.*, 2007).

2.5.1.1 Activité antioxydante

Il est bien connu que le stress oxydant est à l'origine d'un grand nombre de maladies dont on peut citer l'athérosclérose et les maladies neurodégénératives. Ce type de maladie est non seulement lié à la peroxydation des lipides, mais aussi aux composés produits durant le dernier stade de la réaction d'oxydation (Wang *et al.*, 2008b). En effet, un excès de radicaux libres peut diminuer l'effet protecteur des enzymes comme la Super Oxyde Dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase et par conséquent causer la destruction cellulaire en provoquant une oxydation des lipides membranaires, de l'ADN et des enzymes. Pour éviter le phénomène d'oxydation, plusieurs antioxydants de natures différentes sont utilisés dont les hydrolysats peptidiques.

Un nombre important de peptides a été isolé et identifié par Chen et ses collaborateurs en 1995 qui ont démontré le pouvoir antioxydant de peptides de soja, contre la peroxydation des lipides (Chen *et al.*, 1995). Les structures primaires de ces peptides leur procurent une telle activité biologique (Tableau 2:23). Concernant les peptides de poisson, Wang et ses collaborateurs ont démontré en 2008 que la laitance de poisson composée de protamines,

peptides cationiques nucléaires riches en arginine et responsables de l'organisation de la chromatine spermatique sous une forme très condensée, présente un pouvoir antioxydant important dose dépendant (Wang *et al.*, 2008b). L'hydrolyse enzymatique de la protamine est effectuée en utilisant la pancréatine (pH 8,5 ; 50°C ; 5 h). Les résultats de cette étude montrent également que la fraction constituée de peptides à faible poids moléculaire possède l'activité anti-radicalaire la plus élevée et une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier dans la fraction peptidique active un peptide composé de Pro-Arg. Ces protéines sont utilisées dans les applications médicales en tant que transporteurs d'insuline injectable, antagoniste de l'héparine et plus récemment comme ingrédients anti-bactériens pour quelques produits alimentaires.

Tableau 2:23 Quelques séquences de peptides antioxydants d'origine marine identifiées dans la littérature

Séquence peptidique	Source	Mode d'obtention	Références
Présence d'un résidu Gly en C-terminal et motif répété : Gly-Pro-Hyp	Hydrolysats de la gélatine provenant de la peau du lieu jaune	Alcalase (Ratio enz-sub, 1:50) à pH 8,0 à 50 °C Filtration sur une membrane de 10000 Da Pronase E (ratio enz-sub 1:33) à pH 8,0 à 50 °C Filtration sur une membrane de 5000 Da collagénase (ratio enz-sub, 1:100) à pH 7,5 à 37 °C Filtration sur une membrane de 1000 Da	(Kim <i>et al.</i> , 2001)
His-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Leu	Hydrolysats de la gélatine provenant du Hoki (<i>Johnius belengerii</i>)	trypsine, chymotrypsine et pepsine, 4 h d'hydrolyse pour chaque enzyme dans les conditions optimales de digestion	(Mendis <i>et al.</i> , 2005)
Ile-Lys-Lys Phe-Lys-Lys Phe-Ile-Lys-Lys	Hydrolysats de la crevette rose (<i>Penaeus japonicus</i>)	Plusieurs protéases contenant la pepsine, et la pancréatine, à 37°C à pH 7, pendant 20 h	(Suetsuna, 2000)

L'étude de Je et ses collaborateurs (2005) montre que les peptides du poisson « lieu d'Alaska » fractionnés par procédé de filtration membranaire (1 KDa), présentent une activité antioxydante élevée. Ces peptides inhibent à 85% l'oxydation de l'acide linoléique (Je *et al.*, 2005). Ce phénomène a été également observé pour l'hydrolysats des protéines du petit lait (Pena-Ramos *et al.*, 2004). La capacité des peptides à retarder l'oxydation des lipides est reliée à la présence d'acides aminés spécifiques, notamment l'histidine et les acides aminés hydrophobes (Pena-Ramos *et al.*, 2004). Quelques acides aminés ont été identifiés dans la littérature, dont l'histidine, la proline, la tyrosine et la lysine, comme étant

abondant dans les fractions qui montrent une activité antioxydante élevée (Kawashima *et al.*, 1979; Marcuse, 1960).

D'autre part, une étude de Pei et ses collaborateurs (2010), a montré que des peptides de collagène marin, obtenus par hydrolyse enzymatique de peau de saumon, présentaient une action bénéfique sur l'apprentissage et la mémoire. En effet, des souris âgées de 20 mois, présentant des troubles de la mémoire ont été gavées par ces peptides pendant 3 mois (0,44% wt/wt). Les capacités d'apprentissage et de mémorisation des souris âgées se sont améliorées et sont devenues comparables avec celles de jeunes souris de 3 mois (Pei *et al.*, 2010).

De plus, ces peptides ont permis d'atténuer, chez les souris âgées, les dommages oxydatifs liés à l'âge, de diminuer l'apoptose des neurones, d'augmenter à la fois la densité protéique au niveau post-synaptique et la production d'une neurotrophine majeur du cerveau, la BDNF (Brain-derived neurotrophic factor).

2.5.1.2 Activité hypoallergénique

Une étude clinique sur les allergies alimentaires réalisée par Sampson (2004) sur les anti-immunoglobulines (IgE) a montré que la majorité des allergènes alimentaires identifiés comme classe une (valeur en IgE faiblement détectable), sont des glycoprotéines entre 10 et 70 kDa. Ces glycoprotéines sont relativement résistantes à la température, aux attaques acides et protéasiques. En contrepartie les peptides obtenus à partir de différentes sources de protéines alimentaires ont une activité hypoallergénique (Sampson, 2004). Nii *et al.*, ont démontré en 2008 que les peptides issus de l'hydrolyse enzymatique de crevettes d'Izumi (Japon) sont extrêmement peu allergiques envers les souris (Nii *et al.*, 2008).

2.5.1.3 Propriétés anticoagulantes

L'effet anticoagulant des hydrolysats peptidiques de poisson a été mis en évidence dans la littérature. Une étude effectuée par Rajapakse et ses collaborateurs (2005) sur l'hydrolysats protéique de la *Limanda aspera* a montré qu'il agit sur l'inhibition du facteur de coagulation XIIa et retarde l'agrégation plaquettaire.

Les enzymes utilisées dans le procédé d'hydrolyse sont des protéases: l'alcalase, la neutrase, la pepsine, la papaïne, la chymotrypsine, la trypsine. L'hydrolysats protéique est centrifugé à 12000 g pendant 10 min à 48°C, et le surnageant contenant les peptides actifs est ensuite lyophilisé (Rajapakse *et al.*, 2005).

2.5.1.4 Propriétés antihypertensives

Des tests *in vivo* sur des rats spontanément hypertensifs ont montré qu'un hydrolysate de peptides solubles de crevettes de « Izumi, Japan » diminue considérablement la pression artérielle en comparaison avec un groupe de rats témoins, (Nii *et al.*, 2008). L'hydrolyse enzymatique des crevettes a été effectuée par les enzymes classiques de la digestion notamment la pepsine et la trypsine.

L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) I en II conduit à l'augmentation de la pression artérielle. Aujourd'hui, plus de 200 types de peptides obtenus par hydrolyse enzymatique, à partir de diverses sources de protéines alimentaires, ont été identifiés en tant qu'inhibiteurs de l'ACE (He *et al.*, 2007). Cette étude sur douze produits marins différents (crevettes, coquilles Saint Jacques, huîtres, chair de requin, écarts de maquereau...), montre que le pouvoir inhibiteur de l'ACE dépend de l'enzyme utilisée et de la taille des peptides obtenus. En effet, plus les peptides sont courts, plus ils présentent un pouvoir inhibiteur important.

2.5.1.5 Propriétés antimicrobiennes

Plusieurs études récentes se sont intéressées à l'activité antimicrobienne des peptides marins. Su a isolé et identifié en 2011, un nouveau peptide, de 20 acides aminés, issu du mucus de la peau du poisson chat jaune (*Pelteobagrus fulvidraco*). Le peptide a montré un effet antibactérien contre les bactéries Gram-positives, Gram-négatives ainsi que vis à vis des champignons (Su, 2011). Une étude de Salampessy et ses collaborateurs a également démontré en 2010 l'effet antibactérien de peptides issus de l'hydrolyse enzymatique du poisson « leatherjackets » (*Meuschenia sp*) par la papaïne, la bromélaïne et la flavourzyme (50°C, 10h). Le test antibactérien a été réalisé sur *Staphylococcus aureus*, *E coli*, *Bacillus Cereus* et *Candida Albicans* (Salampessy *et al.*, 2010).

2.5.1.6 Satiété et intestin

Cudennec *et al.*, (2008) ont travaillé sur les peptides issus du merlan bleu et de crevettes grises. Les résultats de l'étude montrent que les peptides (tailles variant de 1000 à 1500 Da) ont une importante stimulation de la sécrétion de la cholécystokinine (CCK) par les cellules STC-1 (cellules dérivées de tumeurs intestinales de souris transgéniques) (Cudennec *et al.*, 2008). La CCK est une hormone qui stimule la sécrétion des enzymes de la digestion. Cette

hormone est aussi un neuropeptide qui, en l'administrant chez l'homme entraîne nausée, anxiété, et diminue relativement le désir de manger (Greenough *et al.*, 1998). Les peptides de poisson procurent une meilleure satiété que ceux du bœuf ou de poulet (Uhe *et al.*, 1992). Selon Bouglé, ceci serait dû à une hydrolyse plus lente, ainsi qu'à l'initiation à la sécrétion d'hormones digestives (Bouglé, 2007).

2.5.2 Exemples de peptides de saumon identifiés

Les effets physiologiques des hydrolysats peptidiques de saumon sont très étudiés et confirmés. Cependant, l'identification des protéines et peptides contenus dans ces hydrolysats est loin d'être achevée.

Le Tableau 2:24 présente les effets de quelques protéines et hydrolysats ayant des effets physiologiques avérés.

Tableau 2:24 Les peptides bioactifs les plus connus chez le saumon

Peptide	Identification	Effet physiologique	Référence
Calcitonine	Polypeptide, hormone composée de 32 acides aminés	Utilisée en clinique pour le traitement de la maladie de Paget, l'hypercalcémie, et l'ostéoporose postménopausique	(Fan <i>et al.</i> , 2011; Mero <i>et al.</i> , 2011; Oh <i>et al.</i> , 2011)
Hydrolysat peptidique du collagène de peau	Contient un taux élevé de protéines (91.20 ±1.03%) de faible poids moléculaire <1000	Antihypertenseurs	(Gu <i>et al.</i> , 2011)
Protamine	Protéines dérivés du sperme de saumon	Activité antioxydante	(Wang <i>et al.</i> , 2008b)
Peptide de collagène du saumon du Pacifique	Peptides de faible poids moléculaire	Effet neuroprotecteur (améliore les fonctions de mémoire et d'apprentissage)	(Pei <i>et al.</i> , 2010)

2.6 Evaluation de l'anxiété et du stress oxydant

2.6.1 Anxiété et modèle murin

L'anxiété est un état émotionnel complexe, qui combine des sentiments de peur, d'appréhension et d'inquiétude, associés à une anticipation appréhensive d'un futur danger probable (Öhman, 2000). L'état d'anxiété est lié à un danger mal défini contrairement aux émotions, comme la peur, l'angoisse ou la panique, qui sont associés à la confrontation d'un danger immédiat (Haynal and Pasini, 1984). Chez l'animal, il est difficile de détecter un état d'anxiété contrairement à un sujet humain. De nombreux modèles et tests comportementaux standardisés ont été développés en psycho-pharmacologie permettant

de mettre en évidence les effets anxiolytiques. Parmi ces tests comportementaux, on trouve le labyrinthe en croix surélevé, la chambre claire-obscur et la planche à trous (Belzung and Le Pape, 1994; Leman *et al.*, 2004; Van Gaalen and Steckler, 2000). Ces tests sont basés sur une exploration forcée dans une zone éclairée ou dans une zone élevée sans délimitation de parois, qualifiées de zones anxiogènes en raison de l'aversion des rongeurs pour les endroits lumineux et « ouverts ».

2.6.1.1 Modèles d'évaluation de l'anxiété

L'anxiété du rongeur est évaluée en se basant sur son comportement exploratoire lorsqu'il est placé dans un nouvel environnement. Cet état peut être modélisé comme étant la résultante de deux vecteurs opposés : la curiosité et la peur (Figure 2:18).

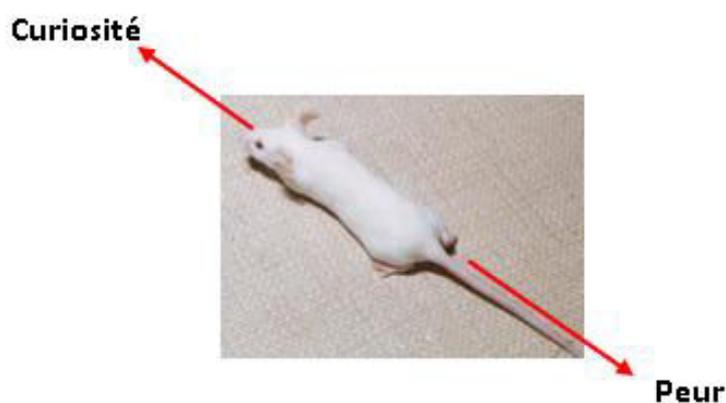


Figure 2:18 Modélisation du comportement d'anxiété chez la souris

Un produit est considéré comme étant un anxiolytique-like lorsque, face à une situation de stress, l'animal augmente ses déplacements explorateurs, à l'inverse d'un produit à activité anxiogénique qui accentue la peur de l'animal et diminue ainsi ses déplacements. L'animal préfère donc rester dans le milieu sécurisant (Figure 2:19).

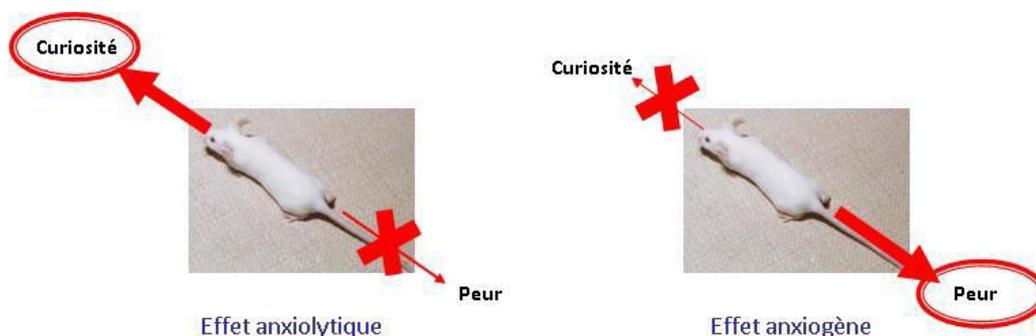


Figure 2:19 Effets anxiolytique et anxiogène de substances pharmacologiques

Pour différencier l'effet anxiolytique de l'effet stimulant d'un produit, le test de l'Openfield est mis en œuvre à la suite des trois tests cités ci-dessus. En effet, le test de l'Openfield permet d'observer la locomotion et ainsi d'écarter d'éventuels faux-positifs.

Une substance dont l'effet sur l'anxiété est démontré par l'un des trois tests précédents peut être considérée comme anxiolytique-like si elle ne modifie pas l'activité locomotrice. Les faux positifs ne présentent aucune difficulté pour aller dans les zones anxiogènes des tests d'anxiété mais une activité locomotrice élevée dans l'Openfield.

L'anxiété comporte plusieurs volets (Leman *et al.*, 2004) :

Un volet physiologique se traduisant par une activation d'origine nerveuse sympathique (accélération du rythme cardiaque, augmentation de la pression artérielle...) et hormonale.

Un volet expressif comme des vocalisations d'alarmes spécifiques, des expressions faciales, des postures défensives, des modifications du pelage ou du plumage...

Un volet comportemental avec notamment des comportements appartenant au répertoire défensif comme la fuite ou l'immobilité de la souris (freezing) et des inhibitions exploratoires.

Un volet subjectif (le ressenti de l'émotion) qui s'intègre dans le volet cognitif et qui est très souvent spécifique à l'homme.

L'anxiété est génératrice de stress. Ces deux phénomènes sont très étroitement liés et souvent superposés dans le langage commun.

Il existe trois types d'anxiété : l'anxiété « état », l'anxiété « trait » et l'anxiété pathologique (Spielberger *et al.*, 1970).

L'anxiété « état », aussi appelée anxiété situationnelle ou environnementale. Lister (1990) a défini l'anxiété « état » comme une anxiété que le sujet éprouve à un moment donné et qui augmente en présence d'un stimulus anxiogène (Lister, 1990). Elle se rapporte à une émotion passagère liée à une situation limitée dans le temps et un environnement particulier. L'anxiété « état » est caractérisée par un éveil physiologique et par la perception de sentiment d'appréhension, de crainte et de tension (Graziani, 2005).

L'anxiété « trait » ne varie pas d'un moment à un autre, elle est considérée comme étant une caractéristique stable et endogène d'un individu (Lister, 1990).

L'anxiété pathologique est, par contre, une émotion persistante, incontrôlable, excessive et inappropriée. Le comportement lié à cette anxiété est une réaction exagérée à

l'anticipation ou à la perception des menaces, qui est disproportionnée à la situation réelle (Ohl *et al.*, 2008).

2.6.1.2 Le système de neurotransmission régulateur de l'anxiété

2.6.1.2.1 Le système GABAergique

Le neuromédiateur qui contrôle majoritairement l'anxiété est l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). C'est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le cerveau humain dont l'activité est liée à la conformation allostérique de son récepteur : le complexe GABA_A (Bourin, 2004). Le niveau d'activation des récepteurs GABA_A serait le principal régulateur de l'anxiété « trait ».

2.6.1.2.2 Le système sérotoninergique

Des études bibliographiques démontrent que l'anxiété serait liée à une suractivité du système sérotoninergique central (Briley *et al.*, 1990; Kawahara *et al.*, 1993).

En effet, les neurotransmetteurs monoamines, dont la sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT), la norépinéphrine et la dopamine jouent un rôle important dans l'anxiété (Wang *et al.*, 2007b). La sérotonine est considérée comme l'un des neurotransmetteurs les plus importants impliqués dans l'anxiété avec le système GABAergique. Elle est synthétisée à partir du tryptophane, acide aminé essentiel, apporté par l'alimentation. Il a donc été démontré qu'un anxiolytique agissant via le système sérotoninergique cérébral diminue le taux de la 5-HT (Caramaschi *et al.*, 2007; Hoyer *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007b).

La noradrénaline et la dopamine seraient également impliquées dans l'anxiété, mais le lien entre les taux de neurotransmetteurs et l'anxiété n'est pas encore clairement défini (Wang *et al.*, 2007b).

2.6.2 Rappel sur le stress oxydant

2.6.2.1 Définition du stress oxydant

L'oxygène est essentiel à la survie des cellules aérobies, cependant, cette molécule peut présenter des effets toxiques via ses dérivés partiellement réduits. En effet, les espèces dérivées de l'oxygène sont beaucoup plus réactives que l'oxygène qui leur a donné naissance et sont appelées les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Pour sa survie, il est nécessaire pour la cellule de maintenir un certain équilibre redox grâce à des antioxydants endogènes et exogènes. En faible concentration, les ROS interviennent positivement dans plusieurs

processus physiologiques tels que la signalisation cellulaire, la régulation cellulaire, la réponse immunitaire et la défense contre les agents infectieux (Gomes *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007). Le stress oxydant provient dans une cellule, lorsque la production des ROS dépasse les capacités de détoxification cellulaire, le déséquilibre de la balance entre la production des ROS et la capacité antioxydante de la cellule à empêcher les lésions oxydatives.

Un stress oxydant se manifeste par l'attaque des oxyradicaux aux biomolécules en provoquant des dommages cellulaires comme un changement dans la fluidité et/ou la perméabilité membranaire, la peroxydation des lipides, l'inactivation de certaines enzymes, l'augmentation de plus de 10 fois la susceptibilité des protéines à la protéolyse, la mutation voire la dénaturation de l'ADN. Tous ces dysfonctionnements et lésions oxydatives peuvent entraîner la mort cellulaire et être impliqués dans plusieurs maladies aiguës ou chroniques comme le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives...

2.6.2.2 Les sources des ROS

Les ROS endogènes sont produites à l'intérieur des cellules, à travers une variété de processus, ou provenir directement du milieu extracellulaire. Leur production peut être due à l'exposition des cellules à des prooxydants d'origine exogène et environnementale tels que les pesticides, les toxines (métaux lourds), la fumée de cigarette, les polluants, la poussière (d'amiante, de silice), le rayonnement magnétique... La surproduction des ROS peut provenir également de la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale ou de la xanthine oxydase soit d'une stimulation excessive de la NAD(P)H oxydase.

2.7 Les lipides utilisés en tant que vecteurs

2.7.1 Les nano-émulsions

Une émulsion résulte d'une dispersion de deux liquides non ou faiblement miscibles, où la phase dispersée est présente sous forme de gouttelettes animées d'un mouvement brownien dans la phase continue. Seules les émulsions dont le diamètre des gouttelettes est de l'ordre du nanomètre sont considérées comme des nano-émulsions (Mason *et al.*, 2006). Une émulsion est un système thermodynamiquement instable, stabilisé par l'ajout de tensioactifs ou de particules amphiphiles qui se situent à l'interface des deux phases (Salager *et al.*, 2001).

Les applications des émulsions sont très largement répandues dans le domaine de l'agrochimie (Wang *et al.*, 2007a), les technologies alimentaires (McClements and Li, 2010), la cosmétique (Wu *et al.*, 2011) ainsi que dans le domaine thérapeutique pour la vectorisation et le relargage de molécules actives (Andreani *et al.*, 2011; Averina *et al.*, 2011).

2.7.1.1 Stabilité physique

La stabilité des émulsions est l'une des plus importantes propriétés qui dépend essentiellement de la nature de l'émulsifiant, de la quantité d'huile, des conditions d'homogénéisation et de la température de préparation (Sathivel *et al.*, 2009). Les surfactants utilisés jouent un rôle majeur dans la stabilité des émulsions, en diminuant la tension interfaciale des deux phases (huile et eau) tout en retardant la floculation et la coalescence de la phase dispersée (Collins-Gold *et al.*, 1990). La déstabilisation d'une émulsion s'effectue par des phénomènes migratoires et d'augmentation de taille des gouttelettes. Ces phénomènes migratoires, réversibles, font allusion au crémage et à la sédimentation. Les gouttelettes lipidiques animées d'un mouvement brownien sont soumises au champ de pesanteur terrestre. Leur densité entraînera donc un mouvement vers le bas si la goutte est plus dense que la phase continue ou vers le haut dans le cas contraire (Brochette, 1999).

Dans les phénomènes conduisant à une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques nous retrouvons des mécanismes réversibles et irréversibles, pouvant déstabiliser une émulsion (Canselier and Poux., 2001). Parmi ces derniers, nous pouvons citer :

Le phénomène de floculation, réversible, qui s'établit lorsque les forces d'attraction entre les gouttes dépassent les forces de répulsion, entraînant ainsi des agrégats.

Le mûrissement d'Ostwald :

Selon la loi de Laplace, la grande pression à la surface des petites gouttelettes leur permet de fusionner avec les grandes gouttes lipidiques qui ont une faible pression de surface (Brochette, 1999; Roland *et al.*, 2003). En effet, le mûrissement d'Ostwald, irréversible, intervient quand la phase dispersée est faiblement soluble dans la phase continue.

Les phénomènes migratoires favorisent la coalescence qui est irréversible, et entraînent un rassemblement des gouttelettes, augmentant la probabilité de contact. La coalescence dépend bien évidemment du film interfacial qui entoure les gouttelettes. Ainsi, une

concentration suffisante de l'émulsifiant permet de retarder cette phase de déstabilisation (Roland *et al.*, 2003).

2.7.1.2 Méthodes de préparation des émulsions

Il existe plusieurs méthodes de préparation des émulsions. Cependant, nous allons nous intéresser aux techniques n'utilisant pas de solvants organiques.

L'homogénéisation à haute pression est une technique qui réduit la taille des globules (<1µm), en atteignant une pression de 2000 bars. Elle permet donc de produire une émulsion uniforme, homogène et très stable dans le temps (Lee *et al.*, 2009). Contrairement à l'homogénéisation à haute pression, l'ultrasonication permet de casser les grandes gouttelettes lipidiques de manière non homogène, entraînant une distribution de taille très large. Cependant de nombreuses études utilisent ce procédé afin de produire des nano-émulsions (Puglia *et al.*, 2008). L'auto-émulsification est une technique, plus récente, qui consiste à mélanger l'huile, le tensioactif, le co-tensioactif et l'eau. L'émulsion se forme sous faible agitation. Ce type d'émulsion est très utilisé dans l'encapsulation de principes actifs (Shah *et al.*, 2007).

Les émulsions permettent de réduire les risques d'oxydation en encapsulant les AGPI-LC, et en diminuant leur contact avec l'oxygène, les métaux et d'autres molécules susceptibles d'attaquer les doubles liaisons (Ye *et al.*, 2009).

D'autre part, d'un point de vue pharmaceutique, les émulsions permettent l'incorporation des principes actifs lipophiles. L'encapsulation en émulsion augmente la disponibilité des médicaments, et réduit certains effets secondaires, en prolongeant leurs effets pharmacologiques par rapport aux formulations classiques (Hung *et al.*, 2006).

2.7.2 Vectorisation des molécules bioactives lipophiles

2.7.2.1 Le Coenzyme Q₁₀

Le coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀; 2,3-diméthoxy-5-méthyl-6-decaprenyl-1,4-benzoquinone), nommé aussi l'ubiquinone est un composé de couleur jaune, liposoluble et similaire à une vitamine. C'est une molécule ubiquitaire, retrouvée dans toutes les cellules de l'organisme humain majoritairement dans le cœur, le foie et les muscles (Balakrishnan *et al.*, 2009). Le CoQ₁₀ (Figure 2:20) a deux nomenclatures différentes : La première regroupe ce type de molécule sous le terme de Coenzyme Q_n, où n représente le nombre d'unités isoprènes

(chaîne de 5 carbones) tandis que la seconde désigne ces composés comme étant des ubiquinones n, avec n représentant le nombre de carbones totaux de la chaîne isoprénoïque.

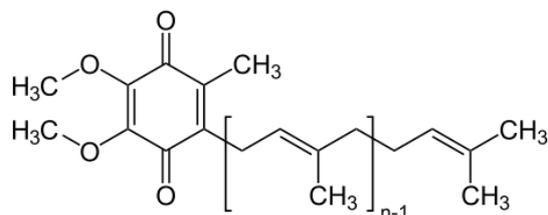


Figure 2:20 Structure chimique du coenzyme Q₁₀

Ainsi, le coenzyme Q₁₀ correspond à l'ubiquinone 50 et le coenzyme Q₀ correspond à l'ubiquinone 0, etc...

Le CoQ₁₀ est généralement localisé au niveau des mitochondries. Il joue le rôle d'un cofacteur essentiel dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriales, intervenant ainsi dans la respiration cellulaire aérobie et dans la production d'énergie cellulaire sous forme d'ATP (Bunaciu *et al.*, 2007; Zhipeng *et al.*, 2007). Il s'agit du seul composant lipidique parmi les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire. C'est une benzoquinone qui possède une longue chaîne isoprénoïque qui lui confère son caractère lipophile et par conséquent une libre mobilité à travers les membranes cellulaires et mitochondriales (Crane, 2001). Le CoQ₁₀ est un puissant antioxydant qui protège les lipoprotéines circulant dans le sang, les mitochondries ainsi que les lipides membranaires contre les phénomènes d'oxydation en balayant les radicaux libres (Aberg *et al.*, 1992; Schmelzer *et al.*, 2007). Cependant, il est possible de détecter un stress oxydant chez un individu en dosant la concentration de CoQ₁₀ dans ses lipoprotéines ainsi que dans son plasma.

La biosynthèse du CoQ₁₀ diminue dans les tissus à cause des changements dégénératifs causés par le vieillissement de l'organisme. C'est donc pour cette raison que la supplémentation alimentaire en CoQ₁₀ est devenue nécessaire pour l'organisme (Fu, 2009).

Le CoQ₁₀ a été utilisé antérieurement en tant que supplément alimentaire ou adjuvant thérapeutique pour des maladies comme le diabète héréditaire, le diabète sucré et la surdité (Suzuki *et al.*, 1998; Watts *et al.*, 2002). Une d ficiency en CoQ₁₀ peut être   la base de plusieurs pathologies liées au stress oxydant (Tableau 2:25) (Balakrishnan *et al.*, 2009).

Tableau 2:25 Différentes maladies liées à un déficit en CoQ₁₀

Pathologies impliquant le CoQ ₁₀	Références bibliographiques
Problèmes cardiovasculaires (cardiomyopathie)	(Joo, 2005) (Tiano, 2007)
Hypertension	(Joo, 2005) (Rosenfeldt, 2007)
Athérosclérose	(Joo, 2005)
Cancer de sein	(Fu, 2009)
Diabète	(Chew, 2008)
Angine pectorale	(Joo, 2005)

D'autre part, le CoQ₁₀ est récemment utilisé en formulations cosmétiques (Xia, 2010) et nutraceutiques (Udompataikul, 2009). Pardeike et ses collaborateurs (2010) ont effectué une étude comparative d'une crème cosmétique contenant une nano-émulsion de CoQ₁₀ (homogénéisée à haute pression, 2 cycles, 800 bars, 80°C) avec une crème composée des mêmes ingrédients non émulsionnés. Les résultats de cette étude montrent que les deux crèmes sont bien tolérées et ne présentent aucune irritabilité, cependant 73,9% de volontaires ont affirmé que la crème contenant la nano-émulsion était plus « hydratante » que la crème contrôle (Pardeike *et al.*, 2010).

Le CoQ₁₀ affecte l'expression de milliers de gènes humains impliqués dans la signalisation, le métabolisme et dans le transport de nutriments (Groneberg *et al.*, 2005; Schmelzer *et al.*, 2007).

Des tests *in silico* révèlent qu'une partie des gènes sensibles ou influencés par le CoQ₁₀ sont impliqués dans les voies métaboliques inflammatoires. Ces résultats ont été validés en effectuant des tests sur l'effet anti-inflammatoire du CoQ₁₀ sur des cellules de type monocytes humains et murins (Schmelzer *et al.*, 2007). Les résultats obtenus montrent que l'effet positif du CoQ₁₀ sur l'inflammation provient d'une régulation au niveau de l'expression des gènes codant pour les cytokines TNF- α et / ou de son effet antiradicalaire. Les études n'ont pas encore été extrapolées au niveau animal et humain.

En raison de son caractère lipophile et de son poids moléculaire élevé, le CoQ₁₀ est faiblement absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal (Balakrishnan *et al.*, 2009). De ce fait une administration orale de CoQ₁₀ reste la voie de supplémentation généralement utilisée. Différentes formulations ont été proposées depuis 1985 dans le but d'augmenter sa biodisponibilité (Tableau 2:26).

Synthèse bibliographique

Tableau 2:26 Mode de vectorisation et biodisponibilité du CoQ₁₀

Type de formulation	Composition huileuse	Technique	Test	Efficacité	Références
Microémulsions	Lécithine de Soja (3,9mg) D-Sorbitol (90mg) Propylène glycol (90mg) CoQ ₁₀ (216 µCi)	Sonication 40W	<i>In vivo</i> , administration en intra veineuse	Biodisponibilité élevée au niveau du cœur comparé à une formulation huileuse	(Takada <i>et al.</i> , 1985)
Microémulsions	Huile de soja (400g) Phospholipides de jaune d'œuf (48g) CoQ ₁₀ (2,4g)	Homogénéisateur à haute pression (520Kg/cm ²)	<i>In vivo</i> , administration orale chez des chiens	2 fois et demi plus efficace que les autres formulations testées	(Ozawa <i>et al.</i> , 1986)
Emulsions séchées	CoQ ₁₀ Huile	Homogénéisateur à grande vitesse (20 000 rpm pendant 5 min)	-	-	(Takeuchi <i>et al.</i> , 1992)
Formulation huileuse	Polysorbate 80 Triglycérides à moyenne chaîne d'acides gras CoQ ₁₀	-	<i>In vivo</i> , administration orale Test clinique	2 fois et demi plus efficace que les autres formulations testées	(Chopra <i>et al.</i> , 1998)
Nanoémulsions encapsulées dans un polymère	HPMC Huile Huiles essentielles CoQ ₁₀ Surfactants et co-surfactant synthétiques	Auto-émulsification	-	-	(Nazzal <i>et al.</i> , 2002)
Nanoémulsion	CoQ ₁₀ Huile Surfactant Cosurfactant	Auto-émulsification	<i>In vivo</i> , administration orale chez des rats	2 fois plus efficace que le CoQ ₁₀ administré en poudre	(Balakrishnan <i>et al.</i> , 2009)
Dispersion solide dans l'eau distillée	CoQ ₁₀ Polymer hydrophile (poloxamer 188) Ratio (1 : 30 w/w)	Vortex (2 min) Agitation 150 rpm (24h)	Pas d'administration	-	(Bhandari <i>et al.</i> , 2007)

En effet, la biodisponibilité du CoQ₁₀ dépend fortement du type de vectorisation et du mode d'administration (Fu, 2009). Il a été démontré que le CoQ₁₀ solubilisé dans des formulations huileuses sous forme de gélules molles est mieux absorbé que sous forme pulvérulente (Folkers, 1994; Singh, 2005).

Récemment, plusieurs équipes se sont intéressées aux formulations lipidiques permettant de vectoriser les molécules d'intérêt biologique comme par exemple les micro et nano-émulsions, préparées avec ou sans contrainte (auto-émulsification). Nous retrouvons donc les émulsions préparées soit par sonication, par ultraturax ou par homogénéisation à haute pression contrairement au système émulsionné sans aucune contrainte ou traitement physique ; une émulsion naturelle et spontanée (sous simple agitation magnétique). Ce dernier système de préparation des émulsions est basé essentiellement sur la composition en surfactants, sur le temps et la température d'agitation. Les auteurs estiment que les mouvements péristaltiques de l'estomac et de l'intestin permettent une agitation nécessaire pour une auto-émulsification *in vivo* (Shah *et al.*, 1994).

L'augmentation de la biodisponibilité dépend principalement de deux paramètres : La taille des gouttelettes lipidiques et le surfactant utilisé (Shah *et al.*, 1994). En effet, plus la taille des gouttelettes d'huile est petite, plus la surface de contact avec les enzymes digestives est importante. De ce fait les lipases pancréatiques hydrolysent les triglycérides et libèrent rapidement le principe actif lipophile encapsulé et/ou permettent la formation de micelles de sels biliaires enfermant le principe actif à l'intérieur (Balakrishnan *et al.*, 2009).

Le surfactant permet aux gouttelettes lipidiques d'être chargées et polarisées, ce qui conduit à une libération rapide des molécules encapsulées vers le milieu aqueux (Shah *et al.*, 1994). D'autre part, les surfactants utilisés pour stabiliser les émulsions ont un rôle important dans l'amélioration de la biodisponibilité des principes actifs. Ceci peut être lié à différents mécanismes tels que :

- Augmenter la solubilité des principes actifs encapsulés (Constantinides *et al.*, 1994)
- Augmenter la perméabilité à travers les parois épithéliales intestinales (Koga *et al.*, 2006)
- Augmenter la perméabilité au niveau des jonctions serrées de l'intestin qui représentent l'adhésion entre les cellules de l'épithélium intestinal constituant l'étanchéité de l'intestin (Koga *et al.*, 2006).

- Diminuer le mécanisme d'efflux vers la lumière intestinale d'un médicament résorbé (Eaimtrakarn *et al.*, 2002).

Il a été démontré, qu'avec des formulations de type émulsion, nous pouvons augmenter la biodisponibilité des principes actifs faiblement solubles (Jong, 2007; Kommuru *et al.*, 2001).

2.7.2.2 La curcumine

La curcumine (Figure 2:21) est un polyphénol naturel qu'on retrouve dans le rhizome de la plante herbacée tropicale *Curcuma Longa* (Kunwar *et al.*, 2006). Cette molécule de couleur jaune, est utilisée comme colorant alimentaire naturel et comme épice en alimentaire. La curcumine fait partie du mélange d'épices que nous retrouvons dans le curry (Yang *et al.*, 2007). Le *curcuma* contient plus d'une douzaine de composés phénoliques appelés curcuminoïdes, dont le principal est la curcumine (environ 50 ~ 60 %) (Edeas, 2006).

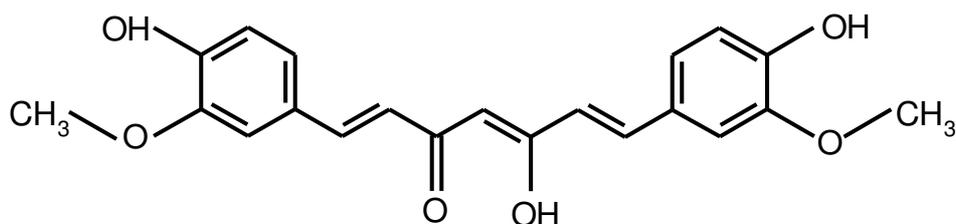


Figure 2:21 Structure chimique de la curcumine

Le curcuma est utilisé depuis des siècles en médecine traditionnelle, notamment en Inde, pour traiter toute une variété d'indispositions incluant problèmes gastro-intestinaux, inflammations, maux de tête, infections et rhumes (Edeas, 2006).

Malgré le fait que la curcumine possède plusieurs propriétés intéressantes, son utilisation clinique reste limitée en raison de sa nature hydrophobe (Li *et al.*, 2007b). La curcumine est faiblement biodisponible lorsqu'elle est administrée par voie orale. Plusieurs études s'intéressent aux différents mode de vectorisation vers des cibles privilégiées (Kunwar *et al.*, 2006). En plus de son utilisation dans les domaines alimentaire et pharmaceutique, la curcumine est très employée dans le domaine cosmétique. En effet, une étude effectuée en 2007 par Teichmann *et al.*, a montré que la pénétration de la curcumine dans le *Stratum corneum* (la couche la plus éloignée de l'épiderme) est améliorée lorsqu'elle est vectorisée sous forme de nano-émulsion (Teichmann *et al.*, 2007).

2.7.2.2.1 Propriétés antioxydantes

Les propriétés antioxydantes et antiradicalaires des curcuminoïdes proviennent de leur capacité à intervenir dans le mécanisme d'oxydoréduction et plus précisément dans le transfert d'un ou plusieurs électrons d'un atome vers un autre. Un tel processus est nécessaire pour la vie en aérobie, puisque l'oxygène est l'accepteur ultime d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire pour former de l'énergie sous forme d'ATP. Cependant, pour lutter contre les radicaux libres nocifs, notre organisme possède deux systèmes de défense antioxydants, endogène et exogène (Ak and Gülçin, 2008). Il s'est avéré que l'activité antioxydante de la curcumine est supérieure à celle de l'extrait d'écorce de pin, de l'extrait de pépins de raisin et des antioxydants synthétiques comme le butylhydroxytoluène (BHT) (Tiyaboonchai *et al.*, 2007). Plusieurs études ont été réalisées afin d'étudier l'activité antioxydante de la curcumine. Selon l'étude de Ak et Gülçin (2008), l'activité antioxydante de la curcumine est due à son transfert d'un atome d'hydrogène aux radicaux libres. En effet, une concentration de 20 mM de curcumine permet d'inhiber de 97,3% l'oxydation de l'acide linoléique en émulsion (Ak and Gülçin, 2008).

2.7.2.2.2 Les propriétés anti-cancéreuses

Il a été prouvé, *in vitro* et *in vivo*, que la curcumine a un effet antiprolifératif contre une variété de tumeurs, tels que le cancer colorectal (Li *et al.*, 2007b), pancréatique (Lan Li *et al.*, 2005), mammaire, gastrique, hépatique, ovarien, de la prostate, et leucémique (Sahu *et al.*, 2008).

En raison de sa non toxicité, jusqu'à 40 mg/Kg chez des rats, elle peut être combinée avec les autres traitements du cancer comme les agents chimio-thérapeutiques (Li *et al.*, 2007b).

En effet, des chercheurs ont suggéré que la curcumine inhibe la croissance des cellules tumorales par des moyens provoquant l'apoptose (mort cellulaire). Il semble que les gènes associés à la prolifération cellulaire et à l'apoptose pourraient avoir une action chémopréventive (Miquel *et al.*, 2002).

Une étude a été réalisée *in vivo* sur des souris ayant reçu 1% de curcumine dans leur régime alimentaire pendant 16 jours. Les souris ont été irradiées par rayons X. L'apparition de la première tumeur palpable a été retardée de 6 mois dans le groupe alimenté avec la curcumine en comparaison avec les souris témoin. D'autre part, l'examen histologique a montré une réduction de 50% de la taille des tumeurs chez les animaux nourris avec la curcumine par rapport aux contrôles (Inano *et al.*, 1999).

2.7.2.2.3 *Les propriétés anti-hépatotoxiques des curcuminoïdes*

Cette propriété des curcuminoïdes a été démontrée par des tests *in vivo*. Il s'agit d'une administration d'un composé hépatotoxique comme le tétrachlorure de carbone à des rats dans le but de provoquer des dommages hépatiques se traduisant par une augmentation dans le sang, de 2 à 3 fois, des taux d'aspartate-aminotransférase, de l'alanine-aminotransférase et de la phosphatase alcaline. L'ajout d'extrait de curcuma à la nourriture des animaux traités, que ce soit avant ou pendant l'administration de tétrachlorure de carbone, permet d'éviter ces dommages hépatiques (Deshpande *et al.*, 1998). En vue d'améliorer l'activité anti-hépatotoxique des curcuminoïdes, une étude a été effectuée en 2007 par Maiti et ses collaborateurs. Ils ont développé une nouvelle formulation complexant la curcumine avec des phospholipides pour augmenter sa biodisponibilité dans l'organisme. Le produit permet une meilleure protection du foie des rats en comparaison avec la curcumine utilisée seule en tant que contrôle (Maiti *et al.*, 2007).

2.7.2.2.4 *Les propriétés anti-inflammatoires des curcuminoïdes*

L'activité anti-inflammatoire de la curcumine est due à l'inhibition des cyclooxygénases en empêchant ainsi la formation des thromboxanes et des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (Teusher *et al.*, 2005). En 2008, une étude effectuée en 2008 par Wang *et al.*, a montré qu'en comparaison avec la curcumine seule, la curcumine en émulsion a un effet anti-inflammatoire remarqué chez des souris présentant un œdème aux oreilles (Wang *et al.*, 2008a).

2.7.2.2.5 *Les propriétés neuroprotectrices des curcuminoïdes*

La curcumine diminue la peroxydation lipidique et augmente le taux de glutathion dans le cerveau (Teusher *et al.*, 2005). Lin et ses collaborateurs (2011) ont étudié l'effet bénéfique de la curcumine sur des rats ayant subi des blessures traumatiques de la moelle épinière. Une quantité de 40 mg/Kg a été administrée en intra-péritonéale, solubilisée dans du DMSO (Dimethylsulfoxyde) pendant 6 jours. Les résultats montrent que ce traitement atténue significativement la perte de neurones (Lin *et al.*, 2011).

3 Matériels et méthodes

Sommaire

3.1	Procédé d'obtention de la lécithine de saumon	105
3.1.1	Matière première	105
3.1.2	Les enzymes protéolytiques utilisées	105
3.1.3	La solution alcaline	106
3.1.4	Gaz inerte	107
3.1.5	Le procédé d'extraction.....	107
3.1.5.1	La réaction d'hydrolyse.....	107
3.1.5.2	Inactivation enzymatique	107
3.1.5.3	Etape de filtration - centrifugation	107
3.1.5.4	Récupération du complexe phospholipopeptidique	107
3.1.5.5	Conditionnement.....	108
3.2	Analyses physicochimiques du CPLP	108
3.2.1	Matière sèche	108
3.2.2	Dosage de la teneur en azote (AOAC, norme 960.52, 1997).....	108
3.2.3	Dosage des minéraux	109
3.2.4	Teneur en cendres (AOAC, norme 923.03, 1997).....	109
3.2.5	Taux d'humidité.....	109
3.2.6	Analyses microbiologiques du CPLP	110
3.2.7	Teneur en lipides totaux.....	110
3.3	Analyses physicochimiques des lipides	110
3.3.1	Composition en acides gras.....	111
3.3.1.1	Préparation des esters méthyliques	111
3.3.1.1.1	Méthode d'estérification en présence de potasse méthanolique.....	111
3.3.1.1.2	Méthode au trifluorure de bore (BF ₃).....	111
3.3.1.1.3	Méthode de Morrison & Smith.....	111
3.3.1.2	Programme de l'analyse en CPG.....	112
3.3.2	Détermination des classes lipidiques	112
3.3.3	Séparation des différentes fractions lipidiques sur colonne de silice	113
3.3.4	Indice d'acide (NF EN ISO, 660, 1999)	113
3.3.5	Indice de peroxyde (AOAC, norme 965.33, 1997)	114
3.3.6	Indice de saponification (AOAC, norme 920.160, 1997)	114
3.3.7	Régiodistribution	115
3.3.7.1	Purification des lipides polaires	115
3.3.7.2	Séparation des PC/PE par chromatographie sur couche mince (CCM)	116
3.3.7.3	Réaction enzymatique	116

3.3.7.3.1	Chromatographie sur couche mince	117
3.3.7.4	Analyse par LC-MS	117
3.3.7.4.1	Conditions chromatographiques	117
3.3.7.4.2	Spectrométrie de masse	118
3.3.8	Suivi de l'oxydation des lipides totaux par spectroscopie infrarouge	118
3.4	Analyse physicochimique de la partie peptidique	119
3.4.1	Détermination de la distribution de taille des peptides.....	120
3.4.2	Détermination de la taille des peptides en SDS-PAGE	120
3.4.3	Dosage des acides aminés	121
3.4.4	Protéomique : Analyse de l'hydrolysat peptidique de saumon par nano-LC-LTQ-Orbitrap-XL	121
3.4.4.1	Préparation de l'échantillon	121
3.4.4.2	Spectrométrie de masse et analyse des données	122
3.4.4.2.1	Méthode de séparation par nanoLC	122
3.4.4.2.2	Méthode d'analyse LC-MS/MS.....	122
3.4.4.2.3	Méthode de traitement des données et liste d'exclusion	123
3.5	Etude de l'effet du CPLP et de ses composants lipidiques et peptidiques sur l'anxiété et le statut oxydant des neurones.....	123
3.5.1	Objectifs et planification des manipulations.....	123
3.5.2	Les différentes doses	124
3.5.3	Les différents régimes de traitement	125
3.5.4	Animaux et conditions d'hébergement.....	125
3.5.5	Etudes comportementales	126
3.5.5.1	Le labyrinthe en croix surélevé.....	126
3.5.5.1.1	Dispositif expérimental	126
3.5.5.1.2	Protocole expérimental	127
3.5.5.2	La planche à trous.....	127
3.5.5.2.1	Dispositif expérimental	127
3.5.5.2.2	Protocole expérimental	128
3.5.5.3	La chambre clair/obscur	128
3.5.5.3.1	Dispositif expérimental	128
3.5.5.3.2	Protocole expérimental	129
3.5.5.4	L'Openfield.....	129
3.5.5.4.1	Dispositif expérimental	129
3.5.5.4.2	Protocole expérimental	130
3.5.6	Evaluation de l'effet du CPLP sur le statut oxydatif des neurones par cytométrie en flux	130

3.5.6.1	Principe de la cytométrie en flux	130
3.5.6.2	Evaluation du statut oxydant des neurones	131
3.5.6.3	Evaluation de l'activité cytoprotectrice et antioxydante du CPLP et de ses différentes fractions	132
3.5.6.3.1	Protocole de l'évaluation cytoprotectrice du CPLP et de ses fractions face à l'induction d'un stress oxydant	133
3.5.6.3.1.1	Extraction du cerveau et des neurones	133
3.5.6.3.1.2	Cytométrie en flux	134
3.5.7	Analyses statistiques	134
3.6	Formulation d'un complément alimentaire à base de Coenzyme Q₁₀.....	134
3.6.1	Etude de la solubilité du CoQ ₁₀ dans l'huile de saumon.....	134
3.6.2	Préparation des différentes formulations contenant le CoQ ₁₀	135
3.6.3	Taille des particules, mobilité électrophorétique et indice de polydispersité	135
3.6.3.1	Mesure de la distribution de tailles	135
3.6.3.2	Mobilité électrophorétique	135
3.6.3.3	Indice de polydispersité	136
3.6.4	Microscopie électronique à transmission (MET).....	136
3.6.5	Mesure de la stabilité des émulsions	136
3.6.6	Biodisponibilité du CoQ ₁₀ <i>in vivo</i>	137
3.6.6.1	Modèle animal (rats Wistar)	137
3.6.6.1.1	Animaux et opération	137
3.6.6.1.2	Le protocole expérimental.....	137
3.6.6.2	Modèle animal (souris)	138
3.6.6.2.1	Préparation des formulations administrées	139
3.6.7	Quantification du CoQ ₁₀ dans le plasma.....	139
3.6.7.1	Mode opératoire	139
3.6.7.2	Conditions chromatographiques	139
3.6.8	Analyses statistiques	140
3.7	Formulation d'un complément alimentaire à base de curcumine	140
3.7.1	Etude de la solubilité de la curcumine dans des huiles	140
3.7.2	Analyse thermique des huiles et de la curcumine par calorimétrie différentielle (DSC)	140
3.7.3	Détermination du temps d'induction oxydatif (OIT) par calorimétrie différentielle à balayage.....	141
3.7.4	Préparation des différentes formulations contenant la curcumine.....	141
3.7.5	Taille des particules, mobilité électrophorétique et indice de polydispersité	141

3.7.6	Mesure de la stabilité des émulsions	141
3.7.7	Evaluation de l'activité anticancéreuse de la curcumine	142

Liste des figures

<i>Figure 3:1 Photo d'une tête de saumon avant broyage</i>	105
<i>Figure 3:2 Photo de colonnes de silice permettant de séparer les classes lipidiques</i>	115
<i>Figure 3:3 Hébergement des souris dans l'animalerie</i>	126
<i>Figure 3:4 Photo du labyrinthe en croix</i>	126
<i>Figure 3:5 Test de la planche à trous (hole board test)</i>	128
<i>Figure 3:6 Photo de la chambre claire/obscur</i>	129
<i>Figure 3:7 Le dispositif de l'Openfield</i>	130
<i>Figure 3:8 Positions de la souris dans différentes zones du dispositif de l'Openfield</i>	130
<i>Figure 3:9 Image de réponses cellulaires obtenues à partir du spectromètre en flux</i>	131
<i>Figure 3:10 Représentation schématique d'une cellule et des réactions intracellulaires conduisant à l'oxydation de DCFH en DCF, composé émetteur de fluorescence</i>	132
<i>Figure 3:11 Extraction du cerveau et dissociation des cellules du tissu conjonctif</i>	133
<i>Figure 3:12 Photo du système Xcelligence</i>	143

Liste des tableaux

<i>Tableau 3:1 Paramètres physicochimiques de l'alcalase[®]</i>	<i>106</i>
<i>Tableau 3:2 Produits et conditions de culture</i>	<i>110</i>
<i>Tableau 3:3 Fréquences des bandes (b) ou des épaulements (e) dans un spectre infra-rouge d'une huile alimentaire, avec le groupe fonctionnel, le mode de vibration et l'intensité (Guillén and Cabo, 1997)</i>	<i>119</i>

3.1 Procédé d'obtention de la lécithine de saumon

La lécithine de saumon est obtenue à partir de l'extraction enzymatique de têtes de saumon (*Salmo salar*) sans utilisation de solvants organiques. Ce procédé breveté conduit à l'obtention d'un complexe phospholipopeptidique (CPLP) constitué de phospholipides, de triacylglycérols et d'un hydrolysate peptidique.

Dans le cadre de notre étude, le CPLP est fourni par les Laboratoires Le Stum. Nous avons par ailleurs effectué deux extractions au laboratoire à échelle pilote sur 100 kg de têtes de saumon non congelées provenant d'un poissonnier local.

3.1.1 Matière première

La matière première est constituée de têtes de saumons d'aquaculture (*Salmo salar*) provenant de l'industrie de transformation de produits à base de saumon (Figure 3:1).



Figure 3:1 Photo d'une tête de saumon avant broyage

Les têtes de poisson, utilisées comme matière première dans notre procédé d'extraction, sont des co-produits provenant des étapes de filetage, conservés à basse température (+4°C) ou congelés. Le poids moyen des têtes utilisées varie entre 0,9 et 1,2 kg.

3.1.2 Les enzymes protéolytiques utilisés

Nous utilisons dans le processus d'extraction des endopeptidases d'origine bactérienne et de qualité alimentaire, conformes aux spécifications recommandées par la législation (Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires). Il s'agit de L'alcalase® 2,4L appartenant à la famille des subtilisines (EC.3.4.21.14a), protéases alcalines (Tableau 3:1). Elle est produite à partir d'une souche sélectionnée de *Bacillus licheniformis*.

Tableau 3:1 Paramètres physicochimiques de l'alcalase®

	Alcalase®
Nom générique	Substilisine Carlsberg
Type d'action	Endopeptidase
Nature du site catalytique	Sérine
pH optimal	6,5 et 8,5
Température optimale	70°C
Poids moléculaire (approximatif)	27300

3.1.3 La solution alcaline

Une solution d'hydroxyde de sodium NaOH (10 N) a été utilisée pour ajuster le pH de la solution du mélange réactionnel à la valeur optimale d'activité de la protéase.

Une fois l'enzyme introduite dans le réacteur, la diminution du pH durant l'hydrolyse enzymatique du substrat est compensée par addition de la solution d'hydroxyde de sodium (10 N) selon la méthode du pH-stat développée par Adler-Nissen (1979) (Gbogouri *et al.*, 2006; Linder *et al.*, 2005). La méthode du pH-stat consiste à maintenir le pH constant durant la réaction enzymatique par ajout d'hydroxyde de sodium. La consommation de NaOH permet de calculer le degré d'hydrolyse pendant la durée de la réaction (Adler-Nissen, 1979).

Il existe une proportionnalité entre la libération des protons et le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées. Le degré d'hydrolyse (DH) est défini comme étant le pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées (h) sur le nombre de liaisons peptidiques totales (h tot).

Il est défini selon la formule suivante :

$$DH = \frac{B \times NB}{MP \times \alpha \times h_{tot}} \times 100$$

B : Volume de NaOH ajouté (ml)

NB : Normalité de la base

α : Degré moyen de dissociation des groupes alpha aminés

MP : Masse de protéines présentes dans le milieu réactionnel (g) (NT x 6,25)

h tot : Nombre de liaisons peptidiques dans le substrat protéique (7,5 méq/g)

Le degré de dissociation est défini comme suit :

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pk-pH}}$$

pk : Représente le pK moyen des fonctions α -aminés libérées durant l'hydrolyse :

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400$$

La température étant exprimée en Kelvin

3.1.4 Gaz inerte

L'utilisation de l'azote comme gaz inerte a pour objectif de protéger la phase lipidique de l'oxydation pendant les étapes de centrifugation et de manipulations des produits.

3.1.5 Le procédé d'extraction

3.1.5.1 La réaction d'hydrolyse

Le substrat composé de têtes de poisson, maintenu à 4°C, est introduit dans le réacteur contenant au préalable de l'eau à 80°C (1 volume de substrat / 1 volume d'eau). Il est nécessaire de connaître la concentration protéique (basée sur la quantité d'azote total présent dans le substrat) et l'ajuster dans le réacteur sous agitation par addition d'eau pour obtenir une valeur voisine de 7 à 8% en poids. Cette étape facilite l'agitation dans le réacteur et augmente la surface de contact avec les protéases. Le contrôle de la réaction d'hydrolyse s'effectue par la méthode du pH-stat présentée ci-dessus.

Le procédé industriel n'est pas présenté ci-dessous pour des raisons de confidentialité.

3.1.5.2 Inactivation enzymatique

La réaction d'hydrolyse est arrêtée, 30 min après le début de la réaction par élévation de la température. L'inactivation thermique de l'enzyme s'effectue à 95°C pendant 10 min.

3.1.5.3 Etape de filtration - centrifugation

Les particules solides non hydrolysées (os de têtes) sont éliminées par filtration sur tamis en inox. La phase liquide du mélange réactionnel est ensuite centrifugée à 80°C pour éviter une séparation de phase du mélange. La centrifugation de la phase liquide permet de séparer l'huile de saumon, l'hydrolysate peptidique soluble et le CPLP.

3.1.5.4 Récupération du complexe phospholipopeptidique

Le CPLP est récupéré après centrifugation et débouage sous atmosphère inerte avant d'être conditionné sous azote dans des barquettes et congelé à -20°C.

3.1.5.5 Conditionnement

Une fois lyophilisé, le CPLP est ensuite conditionné dans des poches, en polyamide et polyéthylène, sous vide puis stocké à -20°C pour ralentir les phénomènes d'oxydation.

L'huile de saumon est re-centrifugée à 10 000 rpm pendant 25 min à 4°C sous azote puis conditionnée dans des bouteilles brunes sous azote à -20°C.

3.2 Analyses physicochimiques du CPLP

3.2.1 Matière sèche

Le pourcentage de matière sèche contenu dans l'hydrolysate enzymatique est déterminé après lyophilisation. L'échantillon est pesé avant et après lyophilisation. Les résultats, calculés sur trois répétitions, sont exprimés en g/100 g de CPLP.

3.2.2 Dosage de la teneur en azote (AOAC, norme 960.52, 1997)

La teneur en azote du CPLP est déterminée par la méthode de Kjeldahl. La teneur en azote total est dosée dans le CPLP lyophilisé ainsi que dans la fraction soluble de ce dernier. L'azote non protéique est mesuré dans l'hydrolysate peptidique en précipitant au préalable les protéines avec de l'acide trichloroacétique TCA (15%). La méthode de Kjeldahl est constituée de deux étapes distinctes :

La minéralisation de l'échantillon : elle consiste à la transformation de l'azote organique en azote minéral, sous forme de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La réaction se déroule à pH acide en présence de catalyseur porté à 400°C pendant 3h. A une prise d'échantillon de 0,5 g (échantillon solide) ou 1 mL (échantillon liquide) on ajoute 0,5 g de catalyseur, 2 mL de H_2SO_4 (95%) et 1 mL de H_2O_2 à 110 volumes.

La distillation du minéralisat : Après refroidissement, la solution d'ammonium NH_4^+ formée est ensuite dosée automatiquement avec un appareil de type Vapodest 4S Gerhardt. Une fois les matras placés dans le distillateur, 2 mL d'eau distillée et 2,5 mL de lessive de soude (36% v/v) sont ajoutés à l'échantillon pour neutralisation et obtenir de l'ammoniaque (NH_3). Ce dernier est entraîné au cours de la distillation par la vapeur d'eau, puis est récupéré dans un compartiment contenant de l'acide borique en excès. Le borate d'ammonium formé est ensuite titré par une solution d'acide sulfurique (0,01 N) par colorimétrie en utilisant un mélange de rouge de méthyle et de bromocrésol comme indicateurs. Le volume de H_2SO_4 versé permet de calculer la concentration massique d'azote pour 100 g de produit en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Taux d'azote (\%)} = \frac{(V - V_0) \times N \times 14 \times 100}{M}$$

V : Volume de H₂SO₄ nécessaire pour la titration de l'échantillon en mL

V₀ : Volume de H₂SO₄ nécessaire pour la titration du témoin en mL

N : Normalité de la solution de H₂SO₄

M : masse de l'échantillon en g

Le taux de protéines est calculé en multipliant la teneur en azote total par le facteur 6,25.

3.2.3 Dosage des minéraux

La détermination des minéraux contenus dans le CPLP a été réalisée par spectrométrie d'absorption atomique à partir des cendres, au service d'analyse des roches et des minéraux (SARM) selon le protocole de Carignan et ses collaborateurs (2001). Brièvement, 300 mg de CPLP lyophilisé sont mélangés avec 900 mg de LiBO₂ ultra pure et sont placés dans un four automatique à 980°C pendant 60 min. Un échantillon contenant uniquement du LiBO₂ est analysé dans les mêmes conditions comme contrôle. Après refroidissement des échantillons à température ambiante, ils sont solubilisés dans un mélange de HNO₃ (1 M), de H₂O (0,5% v/v) et de glycérol (10% v/v) jusqu'à obtention d'un facteur de dilution de l'échantillon de 333. Les minéraux et les éléments de traces sont mesurés respectivement en utilisant le Spectromètre d'Emission Optique Couplé à un Plasma Inductif (ICP-OES) et la technique d'injection de flux couplée au Spectromètre de Masse Couplé à un Plasma Inductif (ICP-MS). Les résultats sont présentés en pourcentage (Carignan *et al.*, 2001).

3.2.4 Teneur en cendres (AOAC, norme 923.03, 1997)

Une masse exacte de CPLP (quelques milligrammes) a été déposée dans des creusets en porcelaine et puis incinérée pendant 12h dans un four à moufle (540°C) jusqu'à minéralisation complète. Le pourcentage de cendre est calculé en pesant les creusets et selon le calcul suivant :

$$\text{Pourcentage de cendres} = \frac{\text{Masse de cendre}}{\text{Masse initiale de l'échantillon}} \times 100$$

3.2.5 Taux d'humidité

Le taux d'humidité est mesuré en pesant une masse exacte de CPLP dans des cristallisoirs introduits dans une étuve maintenue à 103°C jusqu'à poids constant.

Une fois le poids stabilisé, la masse des cristallisoirs est relevée et le taux d'humidité calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'humidité} = \frac{\text{Masse de l'échantillon humide} - \text{masse de l'échantillon sec}}{\text{masse de l'échantillon humide}} \times 100$$

3.2.6 Analyses microbiologiques du CPLP

Les analyses microbiologiques du complexe phospholipopeptidique ont été effectuées par énumération de la flore aérobie mésophile, de *Escherichia coli*, des coliformes, des levures et moisissure (Tableau 3:2).

Tableau 3:2 Produits et conditions de culture

Espèce	Milieu de culture	Fournisseur	Température d'incubation	Temps d'incubation	Normes
Flore aérobie mésophile	Bouillon Trypcase Soja + extrait de levure (TSB-YE)	Biokar Diagnostics + Biomerieux	30°C	72h	Norme interne
<i>Escherichia coli</i>	Gélose-Agar-Terreno (TBX)	Biokar Diagnostics	44°C	24h	NF ISO 16649-2 Avril 2001
Coliformes	La gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL)	Biokar Diagnostics	30°C	24h	NF ISO 4832 Avril 2004
Levures et moisissures	Gélose glucosée à l'oxytétracycline (OGA)	Biokar Diagnostics	25°C	5 jours	Norme interne

3.2.7 Teneur en lipides totaux

Les lipides totaux de saumon sont extraits à partir du CPLP lyophilisé par la méthode de Folch *et al.*, (1957) modifiée par Christie (1982), méthode spécialement adaptée pour les produits anhydres. Un échantillon de CPLP (100 g) est mélangé à un mélange de chloroforme/méthanol (2 : 1 v/v ; 300 mL) pendant 30 min sous agitation et sous azote. Le mélange est ensuite filtré sous vide à travers un verre frité (porosité n°4) et recueilli dans une fiole à vide (Christie, 1982). Le gâteau protéique est lavé avec 500 mL de chloroforme/méthanol (2 : 1) pour éviter toute perte de lipide dans le CPLP. Le solvant est ensuite éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide à 50°C (Laborota 4000-Heidolph). Le vide est cassé sous atmosphère inerte pour éviter toute oxydation des échantillons. Le taux de lipides totaux est déterminé en pesant la quantité de lipide récupérée après extraction et évaporation.

3.3 Analyses physicochimiques des lipides

Les lipides extraits à partir du CPLP sont composés d'un mélange de lipides neutres (huile de saumon) et de lipides polaires (lécithine de saumon) que nous allons nommer « lipides totaux ». Les lipides totaux ainsi que l'huile de saumon obtenue par extraction enzymatique sont analysés à l'aide des techniques suivantes :

3.3.1 Composition en acides gras

Nous avons testé au début de la thèse trois méthodes différentes pour analyser les acides gras de l'huile et de la lécithine de saumon par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

3.3.1.1 Préparation des esters méthyliques

3.3.1.1.1 Méthode d'estérification en présence de potasse méthanolique

Un échantillon de 100 mg de lipides est pesé dans un tube à vis en verre auquel 200 µL de d'Hydroxyde de potassium en solution méthanolique (1,29 g de KOH dans 10 mL de méthanol) et 5 mL d'hexane sont ajoutés sous azote. Le mélange est vortexé pendant 1 min et le surnageant est récupéré après 30 min de décantation, concentré et injecté en CPG (Ackman, 1998). Cette méthode est rapide, mais ne tient pas compte de la présence d'acides gras libres.

3.3.1.1.2 Méthode au trifluorure de bore (BF_3)

Les esters méthyliques d'acides gras sont préparés à l'aide du réactif BF_3 /méthanol à 8% (Ackman, 1998). Un échantillon de 100 mg de lipides est pesé dans un tube à vis auquel on y ajoute 1,5 mL d'hexane et 1,5 mL de BF_3 /méthanol à 8%. Le tube est fermé sous azote, vortexé et chauffé à 100°C pendant 1h dans un bain sec. La réaction d'estérification arrêtée, les tubes sont refroidis sous l'eau. Un mL d'hexane et 2 mL d'eau distillée sont rajoutés au mélange réactionnel. On récupère après centrifugation (4500 rpm, 10 min, 20°C) le surnageant dans un autre tube, toujours sous azote pour empêcher l'oxydation. La phase inférieure est relavée deux fois avec 1 mL d'hexane. L'ensemble des phases supérieures collectées, contenant les esters méthyliques, est évaporé complètement sous azote et re-solubilisé dans de l'hexane à raison de 100 mg d'esters méthyliques par mL d'hexane. Les esters méthyliques sont ensuite injectés dans la colonne de CPG.

3.3.1.1.3 Méthode de Morrison & Smith

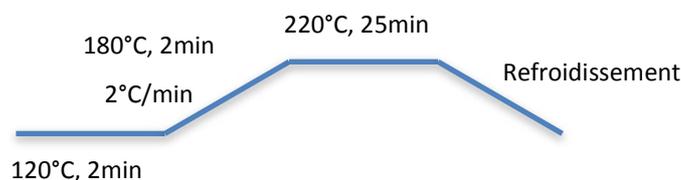
Les esters méthyliques d'acides gras sont préparés en accord avec la méthode de Morrison & Smith (1964). Pour une prise d'échantillon variant de 2 à 20 mg on ajoute 1 mL de BF_3 /méthanol (14%) et 1 mL de toluène. Le tube est bien vortexé et mis sous azote pendant 45 min à 100°C.

Les esters méthyliques d'acides gras sont extraits en ajoutant 1mL de cyclohexane et lavés avec 1mL d'eau distillée. Après l'étape de centrifugation (4500 rpm, 10 min, 20°C), le surnageant est récupéré puis injecté dans la colonne de CPG (Morrison and Smith, 1964).

Cette technique peut être avantageuse dans le cas où nous ne pouvons pas utiliser 100 mg d'échantillon lipidique. Avec une masse d'échantillon de 2 mg au minimum, de bonnes résolutions sont obtenues au niveau des chromatogrammes.

3.3.1.2 Programme de l'analyse en CPG

Les esters méthyliques sont analysés par une CPG de type CG-2010 Plus, Shimadzu, équipée d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire de 60m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne dont l'épaisseur du film (quartz fondu) est de 0,20 μm . La température du four est fixée à 200°C. Le détecteur et l'injecteur sont à une température de 250°C. Les échantillons sont séparés sur la colonne en utilisant l'hélium comme gaz vecteur avec un débit de 0,79 ml/min. L'échantillon est injecté en mode split. Le programme de température utilisé lors de l'analyse est représenté schématiquement :



L'intégration des pics se fait sur le logiciel de CPG, GC solution (Shimadzu). L'identification des pics d'acides gras sur le chromatogramme est réalisée à l'aide de deux standards d'acides gras de source animale (PUFA1) et marine (PUFA2) (Sigma Aldrich). Le pourcentage moyen de chaque pic est calculé à partir de trois répétitions.

3.3.2 Détermination des classes lipidiques

L'analyse des classes lipidiques de l'huile et de la lécithine de saumon a été réalisée par chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) à l'aide d'un Iatroscan[®] MKV (Chromarods-III, Iatroscan Laboratory Inc, Tokyo, Japan). Les échantillons sont déposés sur les chromarods à l'aide d'un capillaire de 1 μL à partir d'une solution de 10 mg de lipide par mL d'un mélange de chloroforme/méthanol (2 : 1). Le cadre métallique de 10 chromarods est ensuite déposé dans une cuve en verre contenant le mélange approprié de solvants :

Pour séparer les lipides neutres des lipides polaires, nous utilisons un mélange hexane, diéthyl éther et acide formique (80 : 20 : 0,2 ; v/v).

Dans le but de séparer la fraction polaire, un mélange chloroforme, méthanol et ammoniac (65 : 35 : 5 ; v/v) est utilisé comme solvant polaire de migration.

Le Iatroscan® permet d'effectuer simultanément 10 répétitions indépendantes sur un échantillon. Il est d'autre part possible de quantifier chaque classe de lipides polaires. Après une migration dans le mélange de solvants apolaires (hexane, diéthyl éther, acide formique), les chromarods subissent un brûlage partiel pour éliminer les lipides neutres qui ont migrés. Les rods sont introduits à nouveau dans un mélange de solvants polaires permettant la migration des lipides polaires (Phosphatidylcholine (PC), phosphatidylétanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI)...).

La détection s'effectue à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme (flux d'air (200 mL/min) et d'hydrogène (160 mL/min) avec une vitesse de brûlage de 30 s/rod).

3.3.3 Séparation des différentes fractions lipidiques sur colonne de silice

Les différentes fractions lipidiques sont séparées sur colonne de silice en fonction de leurs affinités par rapport aux solvants d'élution utilisés (Sautot *et al.*, 2011). La silice (60 Å) est activée pendant 30 min à l'étuve avant d'être introduite dans une colonne en verre (50 cm de longueur, 3 cm de diamètre). La colonne est remplie de silice préalablement mise en suspension dans le premier éluant; hexane/diéthyl éther (80 : 20). L'excès de solvant est élué en veillant à ce que la colonne ne sèche pas. Un échantillon de 5 g de lipides est solubilisé dans un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1) puis déposé au-dessus de la colonne de silice. La première fraction, composée de lipides neutres (LN) est récupérée avec 100 mL d'hexane/diéthyl éther (80 : 20). Les glycolipides (GL) sont ensuite élués avec 100 mL d'acétone, et enfin les phospholipides (PL) sont récupérés par gradient de chloroforme/méthanol (2:1/ 1:1 / 0:1). Les solvants sont ensuite éliminés à l'aide de l'évaporateur rotatif sous vide à 50°C. Le vide est cassé à l'azote pour éviter l'oxydation des échantillons. Les différentes fractions sont ensuite analysées par CPG.

3.3.4 Indice d'acide (NF EN ISO, 660, 1999)

L'indice d'acide (IA) est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaires pour neutraliser l'acidité libre d'un gramme de matière grasse. Il donne une évaluation de la quantité d'acides gras libres contenu dans la matière grasse. Dans un erlenmeyer de 150 ml, on ajoute 50 ml d'éthanol et quelques gouttes de phénolphaléine (1 g/L). Le mélange est chauffé dans un bain d'eau à 60°C. On titre ensuite avec KOH (0,5 N) jusqu'à obtenir une coloration rose. On introduit 5 g d'huile dans une solution d'éthanol neutralisé, on titre sous agitation magnétique avec KOH (0,5 N) jusqu'à ce que le mélange

devienne rose. Un essai à blanc est effectué sans huile. L'indice d'acide se détermine comme suit :

$$IA = \frac{(V - V_0) \times N \times 56,1}{M}$$

V₀ : Volume de KOH versé pour titrer le blanc (mL)

V : Volume de KOH nécessaire à la neutralisation des acides gras libres (mL)

N : Normalité de KOH

M : Masse de l'échantillon

A partir de l'indice d'acide, nous pouvons calculer l'acidité qui représente le pourcentage d'acides gras libres exprimé en pourcentage d'acide oléique (masse molaire 282 g).

$$\text{Acidité (\% acide oléique)} = \frac{IA \times 282}{56,1} \times 100 = \frac{IA}{1,99}$$

3.3.5 Indice de peroxyde (AOAC, norme 965.33, 1997)

L'indice de peroxyde (IP) correspond à la quantité d'oxygène actif du peroxyde contenu dans 1 kg de matière grasse. Il s'agit d'une réaction entre une solution d'iodure de potassium et la matière grasse dissoute dans le chloroforme, l'iode libéré en milieu acide sera titré par une solution de thiosulfate de sodium.

Un mélange acide acétique - chloroforme (3-2, v/v ; 30 mL) est additionné à un échantillon de 1 à 5 g afin de solubiliser la matière grasse. On ajoute 0,5 mL d'une solution de KI saturée (1 g/mL d'eau distillée). Après agitation (1 min) et repos à l'abri de la lumière, 30 mL d'eau distillée sont ajoutés ainsi que quelques gouttes d'empois d'amidon. L'iode libéré est titré sous agitation (vigoureuse) avec la solution de thiosulfate de sodium 0,02 N. Un essai à blanc est effectué sans matière grasse. Le résultat est exprimé comme suit :

$$IP = \frac{(V - V_0) \times N \times 1000}{M}$$

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

V : Volume de thiosulfate de sodium nécessaire à la neutralisation des acides gras libres (mL)

N : Normalité de thiosulfate de sodium

M : Masse de l'échantillon

3.3.6 Indice de saponification (AOAC, norme 920.160, 1997)

L'indice de saponification représente la masse de KOH en mg nécessaire pour neutraliser en premier lieu l'acidité libre et saponifier à chaud les esters de 1 g de lipide.

L'indice de saponification (IS) est un indicateur de la quantité d'acides gras totaux contenus dans une huile. Dans un erlenmeyer, 50 mL de KOH (40 g/L d'éthanol) sont additionnés à 1-5

g de matière grasse portée à ébullition pendant 30 min. Parallèlement, un test témoin est effectué en titrant 50 mL de KOH par HCl 0,5 N en présence de phénolphtaléine. Une fois refroidis, les échantillons de matière grasse portés à ébullition sont titrés par HCl après avoir rajouté de la phénolphtaléine. L'indice de saponification est calculé selon l'équation suivante :

$$IS = \frac{(V_0 - V) \times 56,1 \times N}{M}$$

V₀ : Volume de HCl versé pour titrer le blanc (mL)

V : Volume de HCl nécessaire au dosage du KOH restant (mL)

N : Normalité de HCl

M : Masse de l'échantillon

3.3.7 Régiodistribution

Nous avons déterminé la nature des acides gras positionnés en *sn*-1 et en *sn*-2 au niveau de deux classes de phospholipides ; PC et PE de la lécithine de saumon (*Salmo salar*). Cette étude a été menée en comparaison avec les PC et PE du Krill (*Euphausia superba*).

3.3.7.1 Purification des lipides polaires

La lécithine marine provient de l'hydrolyse enzymatique des têtes de saumon suivie d'une purification en utilisant la méthode de Folch *et al.* (1957). L'huile de Krill provient de capsules d'un complément alimentaire vendu en pharmacie (Oémine Krill, NKO) (Figure 3:2). Les lipides polaires sont purifiés, à partir des échantillons de lécithine de saumon et d'huile de Krill, sur une colonne de silice selon la méthode détaillée dans le paragraphe (1.3.5 Séparation des différentes fractions lipidiques sur couche de silice) (Sautot *et al.*, 2011).



Figure 3:2 Photo de colonnes de silice permettant de séparer les classes lipidiques

3.3.7.2 Séparation des PC/PE par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les deux classes lipidiques (PC et PE) ont été séparées à partir des lipides polaires en utilisant une plaque de silice (20 cm × 20 cm × 2 mm ; Silicagel 60, Merck, Allemagne), préalablement activée. La CCM est une technique de séparation unidimensionnelle et semi-préparative, permettant de séparer et de récupérer les phospholipides en utilisant des solvants d'élution spécifiques. Dans notre cas, nous allons séparer et récupérer les différents lipides polaires en utilisant un solvant d'élution polaire (chloroforme, méthanol et ammoniacque ; 65 : 35 : 5 ; v/v/v).

Les phospholipides récupérés à partir de la purification sur colonne de silice (100 mg), sont préalablement dissous dans un mélange de chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v). Ils sont ensuite déposés, à l'aide d'une micro-seringue, sous un flux d'azote sur la plaque de silice. Après migration, la plaque de silice est séchée sous azote et les différentes fractions de phospholipides séparées sont révélées à l'aide de la 2,7 dichlorofluorescéine, préparée dans une solution d'éthanol (0,5%), sous une lampe UV (270 nm). Les fractions PC et PE ont été identifiées à l'aide des standards suivants :

- Phosphatidyléthanolamine de cerveau caprin (Sigma)
- Phosphatidylcholine de jaune d'œuf (Sigma)

La silice correspondant aux bandes identifiées comme PC et PE est grattée et lavée 3 fois par 10 mL d'un mélange de solvants chloroforme/méthanol (2 :1, v/v). Après une centrifugation à 2500 g pendant 15 min, on réunit les fractions organiques que l'on évapore sous azote pour récupérer les deux phospholipides (PC et PE).

3.3.7.3 Réaction enzymatique

La répartition des acides gras estérifiés sur les phospholipides, isolés préalablement par CCM est déterminée en utilisant la phospholipase A₂ (*Naja Mossambica*), en accord avec le protocole établi par l'équipe de Yoshida et ses collaborateurs (Yoshida *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2009a; Yoshida *et al.*, 2009b). Après avoir récupéré les phospholipides séparés par CCM dans un erlenmeyer à vis de 20 mL, on évapore le chloroforme/méthanol (2:1 v/v) sous azote. Un aliquot de 3 à 7 mg de phospholipide (PC ou PE) est suspendu dans 0,5 mL de tampon phosphate (0,2 M ; pH = 7,5) contenant 0,01 M de CaCl₂. A cette suspension, 5 mg de phospholipase A₂ et 10 mL de diéthyl éther sont rajoutés. Le milieu réactionnel est incubé à 28°C pendant 8h sous agitation (350 rpm) et sous azote. La réaction enzymatique est

quasi-complète (98%) après cette durée d'incubation. Ceci a été vérifié par des expériences préliminaires effectuées sur des standards de phospholipides (1-palmitoyl-2-oleoyl L-3-phosphatidylcholine) (Yoshida *et al.*, 2001). Une fois la réaction terminée, le diéthyl éther est évaporé sous azote puis l'échantillon est resolubilisé dans du chloroforme/méthanol (2:1 v/v) sous azote.

3.3.7.3.1 Chromatographie sur couche mince

L'échantillon est ensuite déposé sur CCM pour séparer les fractions d'acides gras libres et de lysophospholipides. L'acide docosahexaénoïque (DHA ; sigma) libre est utilisé en tant que standard pour récupérer la bande d'acides gras libres. On fait migrer les fractions lipidiques sur la CCM dans un mélange de chloroforme/méthanol/eau distillée (65:25:4 v/v/v). Après migration, la plaque de silice est séchée sous azote et les deux fractions séparées sont révélées à l'aide de la 2,7 dichlorofluorescéine, préparée dans une solution d'éthanol (0,5%), sous une lampe UV (270 nm). Les bandes de silice correspondant aux acides gras libres et aux lysophospholipides sont grattées dans des falcons puis lavées avec du chloroforme/méthanol (2:1 v/v) deux fois puis une fois avec de l'hexane/diéthyl éther (80:20 v/v). Après chaque lavage, la silice est centrifugée (15 minutes à 2500 g) pour récupérer le surnageant qui est ensuite évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les échantillons sont finalement repris, à partir des ballons, dans des tubes à vis pour l'analyse des acides gras dans un petit volume de chloroforme/méthanol (2:1 v/v) qui sera évaporé par la suite sous flux d'azote.

Les acides gras ont été analysés par la méthode de Morrison & Smith (Morrison and Smith, 1964) (Voir le paragraphe 1.3.1.1).

3.3.7.4 Analyse par LC-MS

3.3.7.4.1 Conditions chromatographiques

Le système HPLC Surveyor a été utilisé. Les phospholipides (PC/PE) sont séparés sur une colonne LiChrospher[®] 100 Diol, 250 X 2.0 mm (5 µm) (Merck, Germany) selon la méthode décrite par Hvattum et ses collaborateurs (Hvattum *et al.*, 2000). La phase mobile utilisée pour la séparation des différentes fractions de phospholipides est constituée de chloroforme (phase mobile A) et de méthanol avec 0,1% (v/v) d'acide formique, d'ammoniaque (permettant d'ajuster le pH à 5,3 env. 0,05% v/v) et 0,05% (v/v) de triéthylamine (phase

mobile B). La séparation a été effectuée en utilisant un gradient des deux phases mobiles à différents pourcentages :

- 95% phase mobile A et 5% phase mobile B (11 min)
- 70% phase mobile A et 30% phase mobile B (3 min)
- 20% phase mobile A et 80% phase mobile B (4 min)
- 95% phase mobile A et 5% phase mobile B (7 min)

Le débit est fixé à 0,2 mL/min et la température dans la colonne à 30°C.

3.3.7.4.2 Spectrométrie de masse

Le système HPLC-MS est constitué d'une chaîne LC Surveyor et d'un spectromètre de masse à trappe ionique linéaire LTQ-MS (Thermo Electron Corporation, USA). L'ionisation est réalisée en mode électrospray ESI négatif. La température du capillaire MS est réglée à 230°C ; un voltage de -5 kV est appliqué sur l'aiguille de la sonde. Les débits de gaz source sheath, auxiliary et sweep sont réglés respectivement à 40, 5, 5 (unité arbitraire). Le voltage du capillaire était fixé à -36 V et celui du tube lens à -132 V.

Les données sont traitées avec le logiciel Xcalibur (version 2.1). La fragmentation des espèces est réalisée par application, dans la trappe, d'une énergie de collision normalisée de 35%.

Le réglage MS a été optimisé en utilisant des composés standards en solution. Le Full scan présente la distribution de masses entre 500 et 2000 m/z.

3.3.8 Suivi de l'oxydation des lipides totaux par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est une méthode d'analyse rapide et fiable, permettant de caractériser les différents échantillons d'huiles en donnant des informations d'une part, sur la structure et les groupements fonctionnels des lipides et d'autre part sur la présence éventuelle d'impuretés (Shahidi and Wanasundara, 2002). Cette technique repose, en effet, sur le principe de mesure des vibrations des liaisons moléculaires qui résultent de l'exposition de l'échantillon à un rayonnement électromagnétique infrarouge. En traversant l'échantillon, le faisceau conduit à une élongation ou à une déformation des molécules qui se traduisent par un phénomène de vibration. Lorsque la fréquence d'oscillation d'une liaison atomique est égale à celle de l'onde émise à partir de la source, les liaisons moléculaires absorbent cette énergie ce qui conduit à l'apparition de bandes spectrales. Ainsi les différentes bandes ou épaulements d'un spectre infrarouge d'huiles alimentaires ont été identifiés et classés (Tableau 3:3).

Tableau 3:3 Fréquences des bandes (b) ou des épaulements (e) dans un spectre infra-rouge d'une huile alimentaire, avec le groupe fonctionnel, le mode de vibration et l'intensité (Guillén and Cabo, 1997)

Numéro	Fréquence (cm ⁻¹)	Groupe fonctionnel	Mode de vibration	Intensité
1	3468 (b)	-C=O (ester)	Harmonique	Faible
2	3025 (e)	=C-H (trans-)	Elongation	Très faible
3	3006 (b)	=C-H (cis-)	Elongation	Moyenne
4	2953 (e)	-C-H (CH ₃)	Elongation (antisymétrique)	Moyenne
5	2924 (b)	-C-H (CH ₂)	Elongation (antisymétrique)	Très forte
6	2853 (b)	-C-H (CH ₂)	Elongation (symétrique)	Très forte
7	2730 (b)	-C=O (ester)	Résonance Fermi	Très faible
8	2677 (b)	-C=O (ester)	Résonance Fermi	Très faible
9	1746 (b)	-C=O (ester)	Elongation	Très forte
10	1711 (e)	-C=O (acid)	Elongation	Très faible
11	1654 (b)	-C=C- (cis-)	Elongation	Très faible
12	1648 (b)	-C=C- (cis-)	Elongation	Très faible
13	1465 (b)	-C-H (CH ₂ , CH ₃)	Déformation (cisaillement)	Moyenne
14	1418 (b)	=C-H (cis-)	Déformation (rotation plane)	Faible
15	1400 (b)		Déformation	Faible
16	1377 (b)	-C-H (CH ₃)	Déformation (symétrique)	Moyenne
17	1319 (b,e)		Déformation	Très faible
18	1238 (b)	-C-O, -CH ₂ -	Elongation, déformation	Moyenne
19	1163 (b)	-C-O, -CH ₂ -	Elongation, déformation	Forte
20	1118 (b)	-C-O	Elongation	Moyenne
21	1097 (b)	-C-O	Elongation	Moyenne
22	1033 (e)	-C-O	Elongation	Très faible
23	968 (b)	-HC=CH- (trans-)	Déformation hors du plan	Faible
24	914 (b)	-HC=CH- (trans-)	Déformation hors du plan	Très faible
25	723 (b)	-(CH ₂) _n -, -HC=CH- (cis-)	Déformation (rotation plane)	Moyenne

Une quantité de 40 µL des différents échantillons est déposée à température ambiante dans une cellule optique, A537-L11 ATR (Réflexion Totale Atténuée), du spectromètre Tensor 27 mid-FTIR Brüker (Brüker, Karlsruhe, Allemagne) qui est équipé d'un détecteur de type DTGS (Mercure-Cadmium-Tellure, Bruker, Karlsruhe, Allemagne). Pour chaque mesure, 256 scans ont été effectués à la fois pour la référence qui est l'air et l'échantillon. Le spectre obtenu varie entre 4000 et 700 cm⁻¹ avec une résolution spectrale de 2 cm⁻¹. Le diaphragme est réglé à 4 mm et la vitesse de balayage à 10 kHz.

Le CO₂ atmosphérique influence parfois l'allure du spectre, dans ce cas, on effectue une correction qui permet d'ignorer la présence de CO₂. Le traitement ultérieur des résultats obtenus est effectué par le logiciel OPUS (Brüker, Wissembourg, France).

3.4 Analyse physicochimique de la partie peptidique

Après extraction de la partie lipidique avec la méthode de Folch *et al.*, (1957), la partie peptidique est donc récupérée puis séchée sous hotte aspirante pendant une nuit afin

d'éliminer les résidus de solvant. Les peptides sont ensuite caractérisés par différentes techniques physicochimiques.

3.4.1 Détermination de la distribution de taille des peptides

La distribution de taille des peptides de l'hydrolysate protéique des têtes de saumon est déterminée par diffusion statique de la lumière en utilisant un granulomètre Malvern Mastersizer S (Malvern Instruments Ltd, UK). L'appareil comporte un laser de type He/Ne (Puissance = 5 mW ; Longueur d'onde = 632,8 nm). Le principe de l'appareil est de définir la taille des particules en se basant sur l'intensité lumineuse diffusée par les particules et récupérée par 42 photodiodes localisées à différents angles.

Plus la taille de la particule est grande, plus la lumière déviée est importante et plus l'angle de déviation est petit. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel d'acquisition et de traitement Malvern (Sizer Sv2.17). L'échantillon est solubilisé dans l'eau ultra pure à raison de 0,5%. La répartition de la taille est mesurée en fonction de la distribution volumique des particules.

3.4.2 Détermination de la taille des peptides en SDS-PAGE

Nous avons utilisé l'électrophorèse de protéines en tampon tricine dans le but de déterminer le poids moléculaire des peptides constituant le CPLP selon le protocole décrit par Schägger (2006). Le Tris HCl (1 M, pH = 8,45) et le Tris Tricine (1 M, pH = 8,25) ont été utilisés pour la préparation des différents tampons. Les gels de concentration et de séparation à 40% d'acrylamide sont préparés et coulés sur les plaques en verre. Le champ électrique appliqué est de 30 V quand l'échantillon est dans le gel de concentration, 190 V quand l'échantillon atteint le gel de séparation et 230 V en fin de migration (Schägger, 2006).

Le CPLP est préparé à 0,5% dans l'eau distillée, puis centrifugé pendant 5 min à 10 000 rpm. 10 µL de surnageant de CPLP sont mélangés avec 10 µL de tampon de dénaturation. Le mélange est chauffé à 98°C pendant 10 min. L'échantillon est déposé entre 10 et 25 µL selon la concentration de l'échantillon en protéine. Nous avons testé 4 lots différents de CPLP (Lot 190110, Lot 2006, Lot 9173 et un Lot de 2007). Pour la révélation des bandes, les gels sont placés 15 min dans le tampon de fixation (250 mL d'isopropanol, 100 mL d'acide acétique et 650 mL d'eau), jusqu'à palissement du bleu de bromophénol et ensuite dans le tampon de coloration (100 mL d'acide acétique, 900 mL d'eau et 60 mg de bleu de Coomassie) pendant

une nuit. Les gels sont décolorés dans une solution contenant 100 mL d'acide acétique et 900 mL d'eau.

3.4.3 Dosage des acides aminés

Les acides aminés du CPLP ont été déterminés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse équipée d'une colonne de type PTC RP-18 de longueur 22 cm, et 2,1 mm de diamètre interne (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Un échantillon d'hydrolysate peptidique (0,8 g/L) a été solubilisé dans de l'eau osmosée et filtrée sur un filtre Milipore (0,22 µm). Les échantillons sont hydrolysés sous vide à 150°C pendant 60 minutes dans une station Pico-Tag (Waters, Milford, MA, USA) en présence de HCl 6 N à 1% de phénol. Ils sont ensuite repris dans de l'eau ultra pure et dérivés automatiquement selon la méthode d'Edman grâce à un auto dérivatiseur-analyseur-420 a (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Les dérivés d'acides aminés sous forme de phényl-isothiocyanates (PITC) sont séparés par un tampon A (acétate de sodium 45 mM à pH 5,9) et un tampon B (30% acétate de sodium 105 mM, pH 4,6 ; 70% acétonitrile) sous gradient d'élution. La détection est fixée à 254 nm et la durée totale de l'analyse est de 31 minutes. L'acquisition et l'exploitation des résultats sont réalisées en utilisant le logiciel Model 600 Data Analysis System (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Cette analyse a été réalisée dans le laboratoire Sciences et Techniques Biologiques de l'université Henri Poincaré.

3.4.4 Protéomique : Analyse de l'hydrolysate peptidique de saumon par nano-LC-LTQ-Orbitrap-XL

Les analyses de protéomique ont été réalisées en partenariat avec le laboratoire Innova Protéomic.

3.4.4.1 Préparation de l'échantillon

Une fraction du lyophilisat (10 mg) est reprise par 1 mL d'eau ultrapure (milliQ, Millipore). Après une incubation de 15 min à température ambiante et sous agitation (vortex), l'échantillon est centrifugé à 15000 g pendant 10 min à température ambiante. Un culot important est présent. La concentration en peptide/protéine du surnageant est estimée par dosage BCA (Bicinchoninic Assay, Sigma-Aldrich). L'échantillon est conservé à 4°C.

3.4.4.2 Spectrométrie de masse et analyse des données

L'échantillon peptidique est analysé par nanoLC-LTQ-Orbitrap-XL : nanoLC Ultimate 3000 (Dionex) couplée à un spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap-XL (Thermo Scientific). L'analyse des données brutes est effectuée sur le logiciel Proteome Discoverer 1.2 (Thermo Scientific) et les moteurs de recherche : Mascot (version 2.2.07, Matrix Sciences) et Peaks Studio (version 4.5, BSI).

3.4.4.2.1 Méthode de séparation par nanoLC

Appareil utilisé : nanoLC Ultimate 3000 (Dionex)

Pré-colonne : C18 PepMap300, 5 μm , 300 \AA / 300 μm i.d. x 5 mm

Colonne : C18 PepMap100, 3 μm , 100 \AA / 75 μm i.d. x 150 mm

Gradient : Solvant A : eau / acide formique (100/0,05 ; v/v) / Solvant B : acétonitrile / acide formique (100/0,05 ; v/v)

Etape 1 : 0 – 60 min : 2% - 25% de B

Etape 2 : 60 – 85 min : 25% - 50% de B

Etape 3 : 85 – 105 min : 50% - 90% de B

Etape 4 : 105 – 120 min : 90% de B

Etape 5 : 120 – 127 min : 90% - 2% de B

Etape 6 : 127 – 140 min : 2% de B

Débit : 250 nL/min ; Température : 30°C

Détection UV : 214 nm

Volume d'échantillon injecté : 10 μL

3.4.4.2.2 Méthode d'analyse LC-MS/MS

L'acquisition des spectres de masse avec le système Orbitrap est effectué avec la résolution de 60000 (à la masse 400 m/z). Les dix peptides (au maximum) les plus intenses sont automatiquement sélectionnés pour une analyse en parallèle par CID (MS/MS, Collision-Induced Dissociation) dans la trappe d'ions linéaire (LTQ). L'ionisation de type Electrospray (ESI) est réalisée avec une tension de 1,5 kV dans la source nanoelectrospray (couplage direct nanoLC/trappe d'ion). La température du tube de transfert d'ions est réglée à 200°C. Un scan MS dans l'Orbitrap nécessite l'accumulation de 1000000 ions tandis que les scans MS et MS/MS dans la trappe LTQ nécessite l'accumulation de 10000 ions. Le seuil de déclenchement de la fragmentation MS/MS (LTQ) est fixé à 2000 (délai d'activation de 30

ms), afin d'éviter une fragmentation trop précoce au cours de l'élution des peptides. Les peptides sélectionnés sont exclus de manière dynamique durant 60 s avec une tolérance de masse de ± 10 ppm. Le temps d'analyse maximal est fixé à 500 ms et 300 ms pour respectivement les scans MS et MS/MS. Dans la première analyse (injection 35_01_01), les précurseurs monochargés sont rejetés et la gamme de masse prise en charge s'établit à 300-2000 m/z. Dans la deuxième analyse (injection 35_01_02), les précurseurs monochargés ne sont pas rejetés et la gamme de masse prise en charge s'établit à 100-2000 m/z.

3.4.4.2.3 Méthode de traitement des données et liste d'exclusion

Le logiciel Proteome Discoverer (version 1.2.0.208, Thermo Scientific) permet d'exporter les données brutes (format raw) en format exploitable par les moteurs de recherche Mascot et Peaks Studio (format mgf).

1^{ère} analyse : Elle est dédiée à l'identification de protéines (gamme de masse des précurseurs : 350-10000 m/z).

2^{ème} analyse : Elle est dédiée à la caractérisation qualitative de l'échantillon (gamme de masse des précurseurs : 100-10000 m/z).

Les logiciels Mascot et Peaks Studio ont été utilisés pour l'identification des protéines à partir des séquences peptidiques retenues.

3.5 Etude de l'effet du CPLP et de ses composants lipidiques et peptidiques sur l'anxiété et le statut oxydant des neurones

3.5.1 Objectifs et planification des manipulations

L'objectif de cette étude est d'évaluer en premier lieu l'effet anxiolytique du CPLP et de ses différentes fractions lipidiques et peptidiques sur le modèle animal, souris (n = 10). Il s'agit en second lieu d'évaluer le statut oxydatif des neurones (*in vitro*) chez les mêmes souris alimentées. L'étude *in vivo* est basée sur la réalisation de tests comportementaux à J0, J7 et J14. Un test différent est réalisé à J0, J7 et J14 pour évaluer l'effet du traitement sur l'anxiété et ceci afin d'éviter tout phénomène d'accoutumance de l'animal, qui risquerait de biaiser les résultats. Durant cette période de 14 jours les animaux sont gavés quotidiennement selon le régime de gavage qui leur est associé. En effet, 14 jours de traitements chez la souris correspondent à 3 à 6 mois de traitement chez l'homme. L'étude *in vitro* se réalise en deux temps ; l'évaluation du niveau oxydatif endogène des neurones chez les souris témoins et

traitées. En second temps, les neurones sont exposés à un stress oxydant croissant causé par addition de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) considéré comme un neurotoxique. L'ajout d'une concentration croissante de ce dernier permet d'évaluer à la fois, la capacité de résistance des cellules et la présence ou non d'une cytoprotection apportée par les différents traitements.

Les traitements sont effectués à deux doses différentes afin de mettre en évidence un effet-dose dépendant du traitement.

3.5.2 Les différentes doses

Le choix de la dose de CPLP à administrer a été déterminé par des études cliniques ayant précédé la mise en production du Vectomega[®]. Cette dose est celle à partir de laquelle des effets significatifs sur la concentration, la mémoire, le sommeil, le tonus et l'impulsivité ont été observés. Ainsi nous avons testé deux doses différentes:

Dose 1 : la dose simple (10 mg/kg/Jr), celle prescrite dans le cadre de l'utilisation du Vectomega[®].

Dose 2 : le double de la dose prescrite, dose à laquelle l'étude épidémiologique, à l'origine du projet, a montré des effets sur l'anxiété, les symptômes des personnes atteintes d'hyperactivité (TDAH) et de tremblements (MP).

Calcul des deux doses :

Dose 1 : Le calcul de la dose administrée se base sur sa consommation journalière de CPLP par une personne de poids moyen (60 kg). Ainsi, 10 mg/kg/Jr représentent l'équivalent de 123 mg/kg chez la souris. Cette dose est calculée à partir d'un coefficient de 12,3 (Food and Drug Administration, 2005) soit $600 \times 12,3 = 7380$ mg/60 kg de souris soit 123 mg/kg de souris. Le volume d'administration par kilo de souris est de 10 mL. De manière générale, les souris pèsent 40 g, de ce fait il leur sera administré en moyenne 0,4 ml de solution. Ainsi la solution de gavage de CPLP sera composée de 123mg de CPLP/kg/10 mL d'eau distillée, la solution de gavage de lipides, constitutifs à 70% du CPLP, sera composée de 36,9 mg de lipides/kg/10 ml d'eau distillée. La solution de gavage d'hydrolysate, constitutif à 30% du CPLP sera composée de 86,1 mg de lipides/kg/10 mL d'eau distillée.

Dose 2 : Les calculs sont identiques, nous avons doublé les doses des trois solutions, soit : 246 mg de CPLP/kg/10 mL d'eau distillée, 73,8 mg de lipides/kg/10 mL d'eau distillée et 172,2 mg d'hydrolysate/kg/10 mL d'eau distillée.

3.5.3 Les différents régimes de traitement

Le but des manipulations étant de mettre en évidence la fraction du CPLP qui aurait un effet anxiolytique. Les souris sont alimentées avec différents régimes :

Régime 1 : phase lipidique (contenant 80% de phospholipides et 20% de triacylglycérols)

Régime 2 : hydrolysate peptidique (protéines, peptides et acides aminés)

Régime 3 : le complexe phospholipopeptidique

Régime 4 : le témoin eau (phase continue de tous les régimes)

Les régimes 1, 2 et 3 seront solubilisés (pour les régimes 2 et 3) ou émulsionnés par sonication (2 min à 40 KHz : 1s marche, 1s arrêt) (régime 1) dans une phase continue aqueuse.

3.5.4 Animaux et conditions d'hébergement

Les souris utilisées pour réaliser ces manipulations sont des souris Swiss Albinos mâles de souche OF1, âgées de 9 semaines à la réception. Le choix du sexe des souris utilisées se justifie par l'absence de cycles hormonaux qui pourraient biaiser les résultats de l'étude sur l'anxiété. Elles proviennent du centre d'élevage français Charles River. Les souris sont placées dès réception dans des cages standard individuelles, la période d'acclimatation dure une semaine. Durant cette période, les souris ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. Pendant toute la durée des manipulations l'animalerie est gardée à température constante ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) et exposée à un cycle de lumière/obscurité de 12h/12h (Figure 3:3). Les tests ont lieu dans une pièce d'expérimentation et sont en accord avec les directives du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/809/EEC).



Figure 3:3 Hébergement des souris dans l'animalerie

3.5.5 Etudes comportementales

3.5.5.1 Le labyrinthe en croix surélevé

Ce test présente un caractère contraignant et anxiogène, imposé à la souris qui ne peut s'y soustraire. On induit une exploration forcée dans laquelle l'animal va expérimenter des comportements d'anxiété liés à la nouveauté du milieu et à la présence du vide (Belzung and Le Pape, 1994; Lister, 1990). Les molécules utilisées dans ce test peuvent conduire soit à une aggravation du comportement d'anxiété, ce qui met en évidence un caractère anxiogène du traitement, soit une réduction voir une inhibition des comportements d'anxiété, ce qui traduit un caractère anxiolytique du traitement.

3.5.5.1.1 Dispositif expérimental

Le labyrinthe est fabriqué en PVC noir (Figure 3:4). Il est élevé à une hauteur de 50 cm et comprend deux bras « ouverts » (30 x 5 cm) et deux bras « fermés » (30 x 5 x 15 cm), les bras de même type se faisant face et étant tous reliés par une plateforme centrale (5 x 5 cm).

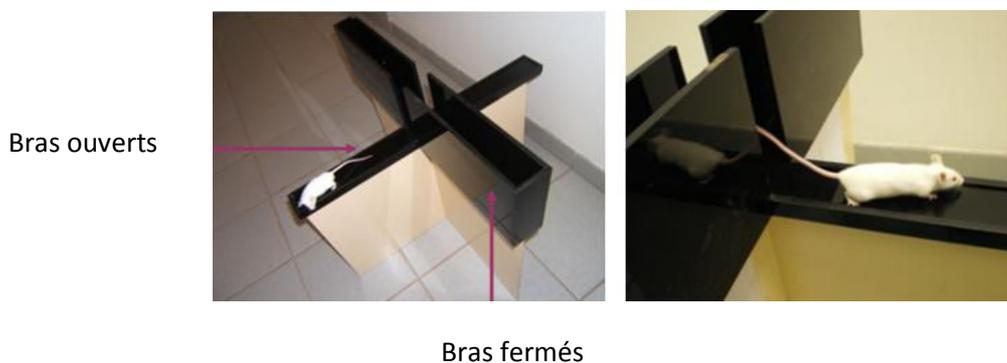


Figure 3:4 Photo du labyrinthe en croix

3.5.5.1.2 *Protocole expérimental*

Ce test est réalisé à J0. L'animal est placé sur la plateforme centrale, la tête dirigée vers les bras fermés. On compte:

- Le nombre total d'entrées dans les bras ouverts (milieu anxiogène)
- Le nombre total d'entrées dans les bras fermés (milieu sécurisant)
- Le temps de latence qui représente la durée au bout de laquelle l'animal entre pour la première fois dans les bras ouverts
- Le temps cumulé passé dans les bras ouverts pendant 3 minutes.

Les résultats sont exprimés en nombre d'entrées dans les bras fermés, en temps de latence, en pourcentage d'entrée dans les bras ouverts et en pourcentage de temps passé dans les bras ouverts. Une entrée est comptée quand les 4 pattes de l'animal ont franchi le seuil du bras. A J14 le gavage sera effectué une heure avant la réalisation du test.

Plus le temps de latence et le nombre de tentatives sont élevés, plus la souris est anxieuse. Inversement, plus le pourcentage de temps cumulé passé et le pourcentage d'entrée dans les bras ouverts sont élevés, moins les souris sont anxieuses. Le nombre d'entrées dans les bras fermés est un indicateur secondaire de l'activité locomotrice.

3.5.5.2 La planche à trous

Le test de la planche à trous permet d'évaluer le potentiel anxiolytique d'une molécule à l'aide de ses zones anxiogènes qui sont la présence d'un milieu inconnu, l'absence de parois et la hauteur de la planche (Van Gaalen and Steckler, 2000). L'anxiété est inversement proportionnelle aux nombres de trous explorés. Toutefois une étude de Bilkei-Gorzo & Gyertyan (1996) précise que cette relation n'est valable que dans le cas d'un éclairage modéré. Dans le cas d'un éclairage important l'exploration des trous ne représente plus la capacité exploratrice de l'animal mais un moyen d'échapper au milieu aversif auquel il est confronté (Bilkei-Gorzo and Gyertyan, 1996).

3.5.5.2.1 *Dispositif expérimental*

Le test est constitué d'une planche en bois carrée de 45 x 45 cm, percée de 16 trous de 3 cm de diamètre (Figure 3:5). Cette planche est maintenue à 1 m dessus du sol et le test est réalisé sous lumière rouge de faible intensité.



Figure 3:5 Test de la planche à trous (hole board test)

3.5.5.2.2 *Protocole expérimental*

Le test dure 3 min en totalité. La souris est placée au centre de la planche et le comportement explorateur naturel de la souris est évalué en comptant le nombre de trous explorés, le temps passé dans la zone périphérique, médium et centrale. Un trou est dit « exploré » lorsque les deux yeux de l'animal ne sont plus visibles.

3.5.5.3 **La chambre clair/obscur**

Le test de la chambre clair/obscur est un test classique de comportement basé sur la tendance naturelle des souris à fuir une exposition à la lumière et à s'échapper d'un environnement nouveau lorsqu'il y est introduit de force (Misslin *et al.*, 1989).

3.5.5.3.1 *Dispositif expérimental*

La chambre claire/obscur (CCO) est composée de deux compartiments, un clair (CC) et un obscur (CO) (ratio de surface 3/2), divisé en 15 carrés de 9 x 9 cm (Figure 3:6). Le CO (27 x 18 x 29 cm) est éclairé par une lumière faible rouge (80 - 90 lux) et divisé en six carrés. Le CC (27 x 27 x 29 cm) est éclairé par une lumière blanche (390-400 lux) et divisé en neuf carrés. Les deux compartiments sont reliés par une porte de 7 cm sur 7 cm. Le test a été mené en accord avec les directives du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/809/EEC).

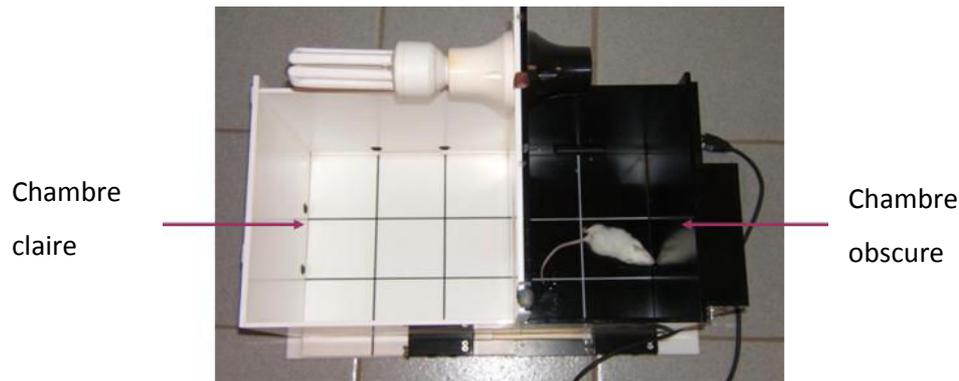


Figure 3:6 Photo de la chambre claire/obscur

3.5.5.3.2 Protocole expérimental

Ce test est réalisé à J14. L'animal est placé, tout d'abord, dans le compartiment éclairé, la tête orientée vers la porte en direction du compartiment sombre pendant 3 minutes. Le temps cumulé passé dans le compartiment clair, le nombre d'entrées dans le compartiment clair et le temps de latence sont enregistrés après sa première entrée dans le compartiment sombre. Plus le temps de latence et le nombre de tentatives sont élevés, plus la souris est anxieuse. Inversement, plus le pourcentage de temps cumulé passé et le pourcentage d'entrée dans la chambre claire sont élevés, moins les souris sont anxieuses.

3.5.5.4 L'Openfield

Les effets d'une substance sur l'anxiété de l'animal sont validés et considérés comme anxiolytiques s'ils ne produisent pas de modification de l'activité motrice générale (Wang *et al.*, 2007b). Le test de l'Openfield peut évaluer toutes modifications de la motricité des souris. Ce test est basé sur la tendance naturelle des animaux à explorer et à adopter une position préventive face à d'éventuels dangers. L'animal a donc tendance à passer plus de temps le long des parois avec lesquelles il reste en contact par le biais de ses vibrisses.

3.5.5.4.1 Dispositif expérimental

L'Openfield est un espace circulaire constitué d'un plateau blanc quadrillé de 36 cases délimitant une zone périphérique, médium et centrale et d'une paroi circulaire noire qui cache l'observateur de la vue de l'animal. L'éclairage est homogène en tout point de l'Openfield (Figure 3:7).

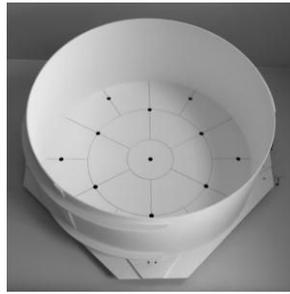


Figure 3:7 Le dispositif de l'Openfield

3.5.5.4.2 Protocole expérimental

L'animal est placé en périphérie, la tête vers la paroi, il peut explorer librement l'espace circulaire. Le nombre de redressements et le nombre total de cases parcourues (zone périphérique, médium et centrale (Figure 3:8) sont évalués pendant 5 minutes.

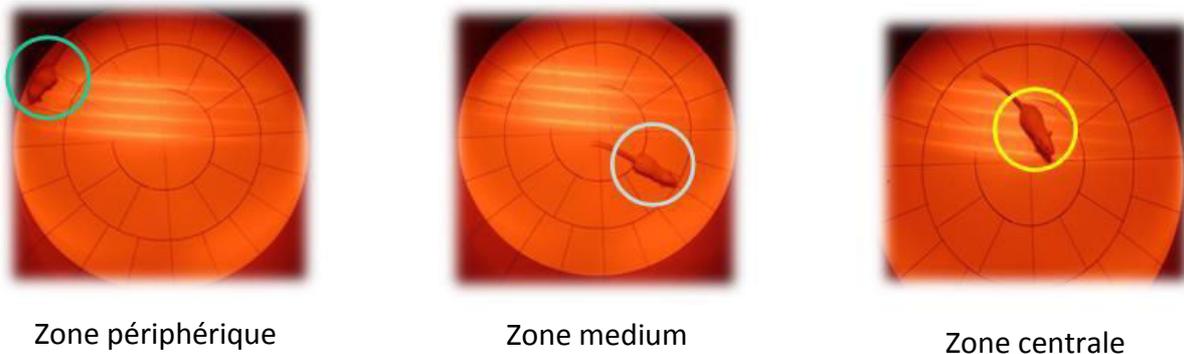


Figure 3:8 Positions de la souris dans différentes zones du dispositif de l'Openfield

Après chacun des tests décrits ci-dessus, le dispositif est nettoyé avec une solution d'éthanol (10%) pour éliminer toutes traces de passage des animaux précédents.

Afin d'évaluer le potentiel anxiolytique des différentes fractions, des souris (n=3) gavées avec du valium (anxiolytique de référence) ont été confrontées aux mêmes tests. Leur comportement sera comparé à celui des autres souris traitées afin de valider ou non le caractère anxiolytique de l'un des régimes.

3.5.6 Evaluation de l'effet du CPLP sur le statut oxydatif des neurones par cytométrie en flux

3.5.6.1 Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet d'étudier certaines caractéristiques de particules isolées (cellules, bactéries, noyaux, mitochondries, chloroplastes, chromosomes,

etc...)). Les cellules sont injectées, après séparation, au centre d'une veine liquide indépendante et adoptent une position en file indienne. Le flux tombe à l'air libre et rencontre un faisceau laser à 488 nm qui irradie toutes les cellules à raison de 1000 cellules par seconde. Lors de leur irradiation les cellules diffusent une partie de la lumière reçue et émettent une ou plusieurs lumières de fluorescence selon les sondes fluorescentes qu'elles portent. Les signaux lumineux captés après passage sur filtres optiques sont convertis en signaux numériques et mémorisés dans un ordinateur en termes de données individuelles. Il permet le groupement en sous population homogène des cellules à partir d'une population hétérogène en quantifiant la taille (par le biais de la lumière réfléchie), la granulosité (par le biais de la lumière réfractée) et l'intensité de fluorescence. Chaque cellule est caractérisée par un point selon les valeurs obtenues de SSC (granulosité) et de FSC (taille), rapportées dans un graphique afin de dégager les différentes sous-populations de cellules détectées (Figure 3:9).

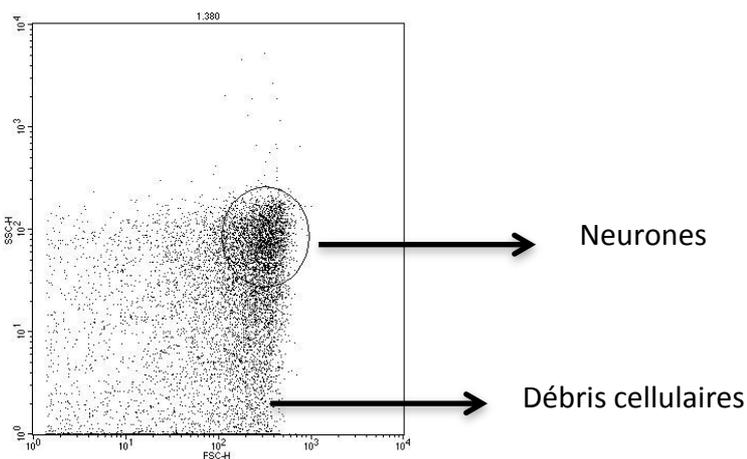


Figure 3:9 Image de réponses cellulaires obtenues à partir du spectromètre en flux

3.5.6.2 Evaluation du statut oxydant des neurones

La cytofluorométrie permet d'analyser la fluorescence qu'émet chaque cellule irradiée en cytométrie de flux. Cette fluorescence est utilisée comme quantificateur proportionnel des espèces réactives d'oxygène (ROS) présentes dans les cellules analysées et permet d'évaluer leur l'état oxydatif.

La sonde DCFH-DA (2'-7' diacetate dichlorofluoresceine) est une molécule non polaire traversant les membranes cellulaires, qui a été utilisée dans cette étude pour évaluer le statut oxydatif des neurones.

Une fois dans le cytosol, le DCFH-DA est hydrolysé par une estérase en DCFH (dichlorofluorescéine), qui est une molécule polaire et non fluorescente (Figure 3:10). Etant oxydé par les ROS intracellulaires en DCF (2'-7' dichlorofluorescéine), le DCFH libère une substance fortement fluorescente. La cytométrie de flux nous permet donc d'évaluer la fluorescence émise à 530 nm par les neurones suite à l'excitation (488 nm) et ainsi estimer la teneur en ROS.

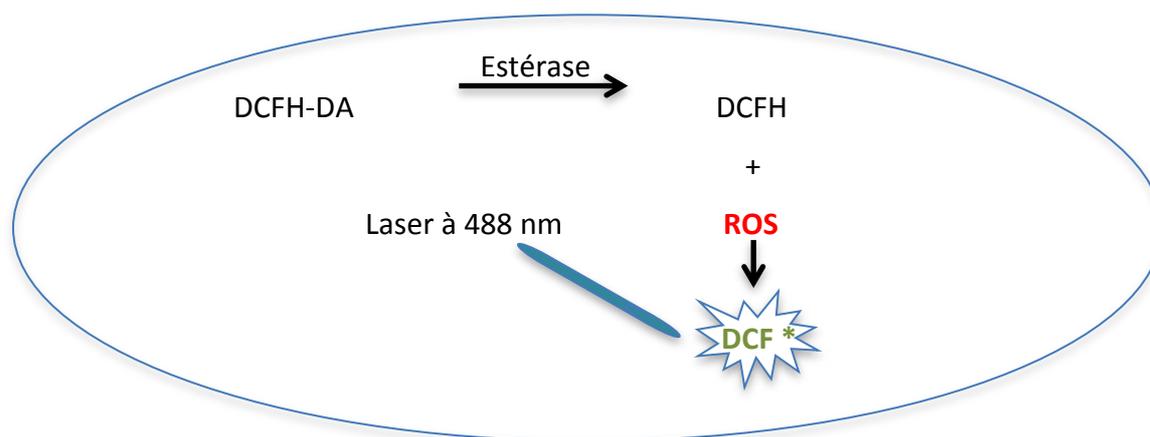


Figure 3:10 Représentation schématique d'une cellule et des réactions intracellulaires conduisant à l'oxydation de DCFH en DCF, composé émetteur de fluorescence

3.5.6.3 Evaluation de l'activité cytoprotectrice et antioxydante du CPLP et de ses différentes fractions

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été choisi pour induire le stress oxydant dans un milieu extracellulaire. Pour évaluer l'activité cytoprotectrice et antioxydante des différents produits de gavage, le statut redox intracellulaire des neurones de souris témoins (sans H_2O_2) a été comparé avec des neurones mis en contact avec du H_2O_2 provenant également de souris témoin et de souris ayant reçues les différents traitements. Les neurones sans stress oxydant permettent d'évaluer le niveau endogène des ROS présents naturellement dans les cellules. Les neurones témoins avec stress oxydant permettent, à leur tour, d'évaluer l'augmentation des ROS induite par du H_2O_2 . Les neurones de souris traitées puis soumis au stress oxydant par du H_2O_2 conduisent à l'évaluation du potentiel cytoprotecteur du traitement vis-à-vis de l'attaque pro-oxydante des ROS induites par le H_2O_2 .

3.5.6.3.1 Protocole de l'évaluation cytoprotectrice du CPLP et de ses fractions face à l'induction d'un stress oxydant

3.5.6.3.1.1 Extraction du cerveau et des neurones

Une fois les tests comportementaux effectués à J14, la souris est anesthésiée avec de l'halothane puis sacrifiée par décapitation. Le cerveau est extrait après ouverture de la boîte crânienne et dégagement des structures solides. Il est ensuite introduit dans un eppendorf contenant 0,5 mL de tampon PBS. Un potter (broyeur manuel) ayant la forme de l'eppendorf est utilisé pour une déstructuration grossière et préliminaire du cerveau (Figure 3:11). Afin de dissocier les cellules neuronales (cellules gliales et neurones) du tissu conjonctif, 0,2% de collagénase est ensuite ajouté, l'eppendorf est incubé à température ambiante pendant 30 min.

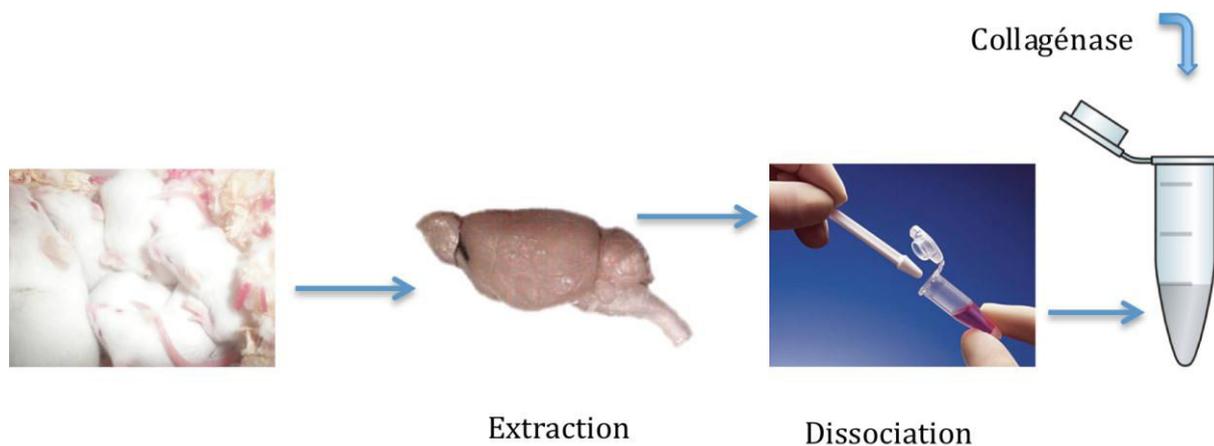


Figure 3:11 Extraction du cerveau et dissociation des cellules du tissu conjonctif

Après digestion, le surnageant contenant la collagénase est éliminé. Le tampon est ajouté avant étape de filtration sur microfiltre (\varnothing 30 μ m). Le filtrat est lavé deux fois avec 2 ml du tampon (1x PBS + EDTA 2mM + 0.5% BSA) par deux centrifugations successives.

Le culot obtenu est ensuite remis en suspension dans 80 μ l de tampon, 20 μ l de microbilles CD90.2 y sont ajoutées. Ces microbilles métalliques (*Miltenyi Biotech*) possèdent en surface des anticorps monoclonaux spécifiques d'un type de cellules (les neurones dans notre cas). L'ensemble est incubé à 4-8°C pendant 15 minutes. Durant cette période, dite de labellisation (ou marquage), les neurones se fixent spécifiquement aux microbilles. La solution est ensuite lavée avec du tampon, par deux centrifugations successives, et remise en suspension dans 500 μ l de tampon.

La séparation magnétique des cellules est effectuée selon la procédure MINIMACS MS colonne : la solution passe à travers une colonne (préalablement humidifiée par passage de 500 µl de tampon) soumise à un champ magnétique et contenant elle-même des billes magnétiques. Les microbilles et les neurones sont retenus dans la colonne tandis que les cellules gliales passent à travers. Les neurones sont éluées, après interruption du champ magnétique, par application d'une pression manuelle à l'aide d'un poussoir.

3.5.6.3.1.2 Cytométrie en flux

Une fois les neurones purifiés, ils sont lavés deux fois avec 1 ml de tampon par deux centrifugations successives. 5 µl de la sonde DCFH-DA et 1 ml de tampon sont ajoutés au culot obtenu après centrifugation. Les eppendorfs sont incubés à l'étuve à 37°C pendant 15 min. En fonction de la concentration désirée, 5 µl de H₂O₂ sont ajoutés dans les différentes solutions qui sont incubées une deuxième fois à 37°C pendant 15 min. La solution est finalement introduite dans le cytomètre (FACScan, Becton Dickinson).

3.5.7 Analyses statistiques

Les données sont représentées par leur moyenne \pm ESM ou médiane (IQR). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Statview 4.5 et le seuil de significativité est fixé à $p < 0,05$. L'analyse des statistiques paramétriques a été menée par analyse de la variance (ANOVA) suivi du test PLSD de Fisher lorsque le nombre de groupes comparés est supérieur à deux. L'analyse statistique non paramétrique a été réalisée par le test de Kruskal-Wallis suivi du test Mann-Whitney.

3.6 Formulation d'un complément alimentaire à base de Coenzyme Q₁₀

3.6.1 Etude de la solubilité du CoQ₁₀ dans l'huile de saumon

Le test de solubilité a été effectué à 37°C. Un excès de CoQ₁₀ est ajouté à 1 mL d'huile sous agitation (500 rpm) pendant 24h à 37°C (Nepal *et al.*, 2010; Thanatuksorn, 2009). Le mélange est ensuite centrifugé à 2000 g pendant 5 min pour précipiter le CoQ₁₀ non solubilisé. 5 µL de surnageant sont dilués dans 25 mL d'hexane, la densité optique est relevée à 270 nm et 37°C en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible (UV-1605 Shimadzu). Un aliquot de 5 µL d'huile de saumon diluée dans l'hexane est utilisé comme blanc. Le maximum de solubilité de CoQ₁₀ est calculé à la fois en utilisant une gamme étalon et le coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 13,368 \text{ mol/L/cm}$).

3.6.2 Préparation des différentes formulations contenant le CoQ₁₀

L'émulsion préparée contient 30% de phase huileuse et 70% d'eau. Dans les 30% de la phase huileuse, on retrouve 7% de lécithine de saumon et 23% d'huile de saumon ainsi que 545,5 mg de CoQ₁₀. Les composés sont mélangés à une température de 55°C. Après avoir été bien vortexée, l'émulsion est mise sous agitation pendant 2h. La taille des gouttelettes d'émulsion est diminuée par sonication pendant 2 min (1s marche, 1s arrêt à 40 KHz). La procédure de sonication est réalisée sous azote, dans un bain de la glace pour éviter respectivement l'oxydation et le réchauffement de l'émulsion. Les émulsions sont ensuite homogénéisées à haute pression (Emulsiflex-C3-Sodexim S.A, France-1500 bars/5 cycles). La formulation huileuse est composée des mêmes proportions d'huile de saumon, de lécithine et de CoQ₁₀ que l'émulsion sans rajout d'eau distillée. La formulation Pharma Nord (Formulation à 6% de CoQ₁₀ dissout dans l'huile de soja (30 mg/ 0,5 g) est utilisée en tant que témoin (Fu *et al.*, 2009). Nous avons également préparé deux produits témoins ; la formulation huileuse sans CoQ₁₀ et de l'eau distillée.

3.6.3 Taille des particules, mobilité électrophorétique et indice de polydispersité

Pour réaliser ces mesures, l'échantillon a été dilué 1 : 2000 fois sous faible agitation (5 min) pour ne pas déstructurer les gouttelettes lipidiques. Cependant l'échantillon doit être à température ambiante puisque les mesures sont effectuées à 25°C. Les indices d'absorption et de réfraction sont fixés respectivement à 0,01 et 1,471 (Belhaj *et al.*, 2010).

3.6.3.1 Mesure de la distribution de tailles

La taille des gouttelettes des émulsions correspondant au diamètre moyen des nano-émulsions est mesurée par la diffusion dynamique de la lumière (angle de diffusion de 173°) à l'aide du Zetasizer Nano ZS (HPPS 5001, Malvern Instruments, Angleterre). Cet appareil permet de mesurer une gamme de taille variant de 0,6 nm à 6 µm. Il est équipé d'un faisceau laser de type He/Ne (puissance 4 mW) avec une longueur d'onde de 633 nm, d'un détecteur photodiode à avalanche, d'un photomultiplicateur et d'un corrélateur.

3.6.3.2 Mobilité électrophorétique

Les mesures de mobilité électrophorétique des particules ont été réalisées grâce au même appareillage (Zetasizer nano ZS). L'appareil applique un champ électrique entre les deux électrodes de la cellule de mesure (Electrophorèse Laser Doppler (ELD)) ce qui provoque une migration des particules vers l'une des électrodes en fonction de leurs charges. La vitesse

des particules est ainsi évaluée par mesure de fluctuation ce qui permet d'obtenir la mobilité électrophorétique en appliquant la théorie de Smoluchowski modifiée par Henry (Hunter, 1986) selon l'équation :

$$\mu E = v / E$$

v : Vitesse des particules ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

E : Champ électrique appliqué par unité de longueur ($\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$)

μE : Mobilité électrophorétique ($\mu\text{m}\cdot\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{V}^{-1}$)

3.6.3.3 Indice de polydispersité

L'indice de polydispersité permet de connaître le taux de polydispersité et par conséquent l'homogénéité des particules. Il est défini comme le rapport de l'écart type sur le diamètre moyen. Plus l'indice de polydispersité est proche de 0, plus la solution est monodisperse.

3.6.4 Microscopie électronique à transmission (MET)

Les manipulations ont été effectuées au Service Commun de Microscopie Electronique de l'Université Henri Poincaré de Nancy. Les émulsions ont été observées avec un microscope électronique à transmission de type Philips CM20 à 200 kV, les images ont été enregistrées à l'aide de la caméra Olympus TEM CCD. L'échantillon est préparé selon le protocole de Colas *et al.* (2007). Brièvement, l'échantillon est dilué au dixième avec de l'eau distillée pour diminuer la concentration en gouttelettes lipidiques. Un volume « v » d'une solution de molybdate d'ammonium (2%) est ajouté à un même volume d'émulsion diluée pour augmenter le contraste de la phase aqueuse. Après 3 min de repos à température ambiante, la solution est déposée sur la grille. Après 5 min de contact avec la grille, l'excès de solution est enlevé avec du papier absorbant avant d'examiner la grille au microscope (Colas *et al.*, 2007).

3.6.5 Mesure de la stabilité des émulsions

La stabilité des émulsions est déterminée en mesurant la taille et la mobilité électrophorétique des émulsions stockées à température ambiante. La température de stockage est définie de telle sorte que l'on soit au-dessus de la température de cristallisation du CoQ₁₀ pour éviter son relargage à partir des gouttelettes lipidiques (Balakrishnan *et al.*, 2009).

3.6.6 Biodisponibilité du CoQ₁₀ *in vivo*

3.6.6.1 Modèle animal (rats Wistar)

Les expérimentations animales ont été effectuées dans le but de comparer la biodisponibilité du CoQ₁₀ en fonction des différentes formulations de vectorisation. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Mme Isabelle LARTAUD et Mr François DUPUIS du Laboratoire de Pharmacologie Cardiovasculaire à la Faculté de Pharmacie de Nancy.

3.6.6.1.1 Animaux et opération

Les expérimentations ont été réalisées sur des rats males âgés de 3 mois et pesant 400 g en moyenne (Wistars ; Rj/Han: Wi; Janvier, Le Genest-Saint-Isles, France). Les animaux sont maintenus à une température de 22°C, exposés à 12h de lumière par jour et ont libre accès à l'eau (Aqua-clear®, Culligan, Northbrook, USA) ainsi qu'aux croquettes (standard rat chow, A04, Safe, Villemoisson-Epinay sur Orge, France). Toutes les expérimentations ont été effectuées en accord avec les directives de la communauté européenne (86/609/CEE) du bien-être animal (permit n° 54-5 (IL), 54-105 (FD)).

Les rats ont été cathétérisés au niveau de l'aorte abdominale via l'artère fémorale droite. La canule en polyéthylène (0,58 mm ID, Merck Biotrol, Chenevières, France) a été introduite chez l'animal anesthésié (2% d'isoflurane dans l'oxygène). La canule est ensuite remplie d'eau physiologique stérile (0,15 mol/L de NaCl), puis est passée sous la peau du dos jusqu'aux omoplates. Toutes les interventions chirurgicales ont été pratiquées dans des conditions aseptiques. L'animal est maintenu à 37°C durant toute la chirurgie avec un coussin chauffant (sonde rectale). Après l'opération, les rats sont placés dans des cages individuelles et du paracétamol est ajouté dans leurs biberons d'eau (1 mg.mL⁻¹, *i.e.* 60 mg.kg⁻¹.jr⁻¹). Les animaux se rétablissent de l'opération pendant 24h et sont privés de nourriture à la fin de la période de récupération pendant toute la nuit.

3.6.6.1.2 Le protocole expérimental

Le jour suivant l'opération, les canules sont purgées et remplies avec de l'eau physiologique héparinée (5 IU.mL⁻¹). Les rats sont randomisés en 5 groupes (n = 10/ groupe) afin de tester différentes émulsions et formulations huileuses (huile + lécithine) : Emulsion CoQ₁₀, formulation huileuse CoQ₁₀, Pharma Nord, témoin eau, témoin formulation huileuse de saumon. Les formulations sont administrées, en dose unique, à chaque groupe de rats par

voie orale à raison de $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de CoQ_{10} . Les doses de formulations témoins administrées sont égales à celles contenant le CoQ_{10} .

- Emulsion CoQ_{10} : $3,66 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$
- Formulation huileuse CoQ_{10} : $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$
- Pharma Nord : $1,2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$
- Témoin eau : $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$
- Témoin formulation huileuse: $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$

Les échantillons de sang (0,5 mL) ont été collectés à partir de la canule dans des eppendorfs héparinés juste avant le gavage oral et après 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 et 48h d'administration. Les échantillons de sang sont ensuite immédiatement centrifugés pendant 10 min à 10 000 rpm et le plasma est récupéré et congelé rapidement à -80°C en attendant de quantifier la concentration de CoQ_{10} par spectrométrie de masse.

Deux heures après le gavage, nous avons attribué à chaque rat trois croquettes. Durant les expériences, les animaux ont été surveillés afin de détecter les différents signes de souffrance tels qu'une perte excessive de poids, une faible mobilité de la patte droite, signes d'hypoxie tissulaire. En cas de problème, les animaux sont sacrifiés avec une injection en intra péritonéale de pentobarbitone de sodium ($250 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

3.6.6.2 Modèle animal (souris)

L'étude de la biodisponibilité du CoQ_{10} a été effectuée en collaboration avec le Professeur Rachid SOULIMANI et Mr Frédéric DESOR du Laboratoire de Neurotoxicologie Alimentaire où les manipulations ont été effectuées.

Les souris males de souche OF1 (30-35 g Janvier Le Genest-Saint-Isles, France) ont été acclimatées ($22-25^{\circ}\text{C}$; 12h de cycle lumière/noir) pendant une semaine au sein du laboratoire. Nous avons formé 6 groupes de 24 souris d'une façon randomisée ($n = 4$).

Les formulations tests ont été administrées par voie orale (1000 mg/Kg), une souris a été sacrifiée par temps de prélèvement de sang. Des prélèvements de $300 \mu\text{L}$ de sang ont été effectués à T_0 puis après 1, 2, 4, 8, 12 et 24h. Les tests sont effectués en accord avec les directives du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/809/EEC). Les échantillons de sang ont, ensuite, été immédiatement centrifugés pendant 10 min à 10 000 rpm et le plasma a été récupéré et congelé rapidement à -80°C en attendant de quantifier la concentration du CoQ_{10} par spectrométrie de masse.

3.6.6.2.1 Préparation des formulations administrées

- **Pharma Nord** : 6% de CoQ₁₀ dissout dans l'huile de soja (30 mg/ 0,5 g).
- **Formulation huileuse + CoQ₁₀** : 6% de CoQ₁₀ dissout dans les lipides totaux (30 mg/ 0,5 g).
- **Dispersion carboxymethyl cellulose + CoQ₁₀** : 30 mg de CoQ₁₀ / mL de dispersion (5% de carboxymethyl cellulose)
- **Emulsion CoQ₁₀** : 30 mg de CoQ₁₀ /mL d'émulsion, 40% de lipides totaux 60% d'eau distillée
- **Témoin formulation huileuse** : Lipides totaux
- **Témoin eau**

3.6.7 Quantification du CoQ₁₀ dans le plasma

La quantification LC-MS du CoQ₁₀ a été effectuée par étalonnage interne selon la méthode décrite par Hansen *et al.*, (2004). La gamme étalon contient des concentrations en CoQ₁₀ allant de 5 à 50 ng/mL. Le CoQ₉ (étalon interne) est ajouté à une concentration de 50 ng/mL (Hansen *et al.*, 2004).

3.6.7.1 Mode opératoire

Les solutions stocks utilisées pour ce dosage sont, la 1,4-benzoquinone dans du méthanol (0,4 mg.mL⁻¹) et la solution de CoQ₉ (standard interne) dans le 1-propanol (1 ng.µL⁻¹). Les échantillons de plasma sont décongelés à température ambiante. Un mélange de 50 µL de 1,4-benzoquinone et 50 µL de CoQ₉ est additionné aux différents échantillons de plasma (50 µL). Les éppendorfs sont vortexés et laissés au repos 15 min à température ambiante. Puis 1 mL de 1-propanol est ajouté au mélange qui est ensuite vortexé vigoureusement pendant 10s puis centrifugé à 10 000 rpm pendant 30 min. 1 mL de surnageant est récupéré dans un vial pour HPLC-MS et complété par 300 µL de méthanol pour obtenir la composition de la phase mobile.

3.6.7.2 Conditions chromatographiques

Le système HPLC-MS est constitué d'une chaîne LC Surveyor et d'un spectromètre de masse à trappe ionique linéaire LTQ-MS (Thermo Electron Corporation, USA). La phase mobile est constituée de 2-propanol/méthanol (1:4), le débit étant de 0,2 mL.min⁻¹.

Le spectromètre de masse LTQ est équipé d'une interface d'ionisation à pression atmosphérique opérant en mode APCI négatif (Ionisation Chimique à Pression

Atmosphérique). La température de vaporisation est de 350°C. La température du capillaire MS est de 200°C. Une décharge de -6 kV est appliquée sur l'aiguille APCI. Les débits de gaz source sheath, auxilliary et sweep sont réglés respectivement à 25, 5, 0 (unité arbitraire). Le voltage du capillaire était fixé à -30 V et le tube lens à -148 V. Le CoQ₁₀ et le CoQ₉ ont été suivis en utilisant respectivement une SRM (single reaction monitoring) (863 → 848) et une SRM (795 → 780). Les données sont traitées avec le logiciel Xcalibur (version 2.1).

3.6.8 Analyses statistiques

Les résultats sont représentés par la moyenne et l'écart type à la moyenne (SEM). Les différences entre les groupes ont été déterminées en utilisant un test post-hoc de Bonferroni. Les différences significatives entre les paramètres pharmacocinétiques (aire sous la courbe (AUC), la concentration maximale (C_{max}), le temps correspondant à la concentration maximale (T_{max}) et le temps de demi vie (T_{1/2}), ont été déterminés par une ANOVA à sens unique suivi du test post-hoc de Bonferroni. L'hypothèse nulle est rejetée à un niveau de probabilité de p<0,05.

3.7 Formulation d'un complément alimentaire à base de curcumine

3.7.1 Etude de la solubilité de la curcumine dans des huiles

Un excès de curcumine est solubilisé dans 1 mL d'huile sous agitation (500 tr/min) à 37°C pendant 24 h. Le mélange est ensuite centrifugé (2000 g) pendant 10 min pour précipiter la curcumine non solubilisée. 1 mL de surnageant est dilué dans 9 mL de méthanol, la densité optique est relevée à 425 nm à 37°C en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible (UV-1605 Shimadzu). Une solution de 1 mL d'huile sans curcumine diluée dans 9 mL de méthanol est utilisée comme témoin. Le maximum de solubilité de curcumine est calculé en utilisant une gamme étalon.

3.7.2 Analyse thermique des huiles et de la curcumine par calorimétrie différentielle (DSC)

L'analyse thermique différentielle consiste à mesurer une différence de température entre l'échantillon étudié et un échantillon de référence. Le profil thermique obtenu reflète les changements d'état du produit analysé et les variations d'énergie associées à ces changements. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un calorimètre différentiel. L'appareil est étalonné au préalable en mesurant la température de fusion et l'enthalpie de L'indium (T_f : 156,6 °C, H : 28,45 J/g). Pour chaque essai, deux capsules en aluminium sont placées dans

l'appareil calorimètre à balayage différentiel (Netzsch), l'une contenant l'échantillon à analyser et l'autre vide servant de référence. Environ 8 à 10 mg de l'échantillon, exactement pesée, sont placée dans le calorimètre. Les paramètres thermiques des échantillons d'huiles sont obtenus en variant la température de -60 à +60°C à 5°C/min sous d'azote (Gbogouri, 2005). Pour la curcumine la température varie de -50 à +200°C à 5°C/min sous azote.

3.7.3 Détermination du temps d'induction oxydatif (OIT) par calorimétrie différentielle à balayage

La stabilité à l'oxydation des huiles sans et avec la curcumine a été déterminée par un calorimètre à balayage différentiel (Netzsch). Des échantillons de 10 à 12 mg ont été pesés dans des capsules en aluminium. Une capsule vide, en aluminium est utilisée comme référence. La température isotherme utilisée est de 110°C et l'oxygène pur a été injecté aux échantillons avec un débit de 50 ml/min (Arain *et al.*, 2009).

3.7.4 Préparation des différentes formulations contenant la curcumine

Dans le cadre de ce travail, une émulsion marine (huile et lécithine de saumon) et végétale (huile et lécithine de colza) ont été préparées afin d'étudier l'influence de la nature de l'huile sur la vectorisation. Les émulsions contiennent 10% de phase huileuse et 90% d'eau. Dans les 10% de la phase huileuse, on retrouve 2,33% de lécithine et 7,66% d'huile ainsi que la curcumine, 0,33 mg/mL pour l'huile de saumon et 0,18 mg/mL pour l'huile de colza (concentration maximale de solubilité). Les composés sont mélangés à une température de 55-60°C, vortexés puis homogénéisés par sonication (2 min à 40 KHz : 1s marche, 1s arrêt) dans un bain de glace. La formulation est homogénéisée à haute pression (Emulsiflex-C3-Sodexim S.A, France-1500 bars/5 cycles). Les émulsions sont ensuite récupérées dans des petits pots de 40 mL et conservées à l'obscurité à 20°C.

3.7.5 Taille des particules, mobilité électrophorétique et indice de polydispersité

La méthode utilisée est la même que celle citée dans le paragraphe 3.5.3.

3.7.6 Mesure de la stabilité des émulsions

La méthode utilisée est la même que celle citée dans le paragraphe 3.5.5.

3.7.7 Evaluation de l'activité anticancéreuse de la curcumine

Protocole :

La culture cellulaire nécessite des conditions stériles (hottes à flux laminaire, matériels et produits stériles à usage unique...) afin d'éviter toute contamination bactérienne ou fongique. Le milieu de culture RPMI 1640 est un milieu nutritif isotonique utilisé pour la culture de cellules humaines normales et de leucocytes néoplasiques. Ce milieu est préparé dans du RPMI 1640 sans rouge de phénol, avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) apportant un certain nombre d'éléments nécessaires à la croissance cellulaire, de la pénicilline/streptomycine 10000 U (1%) et de la L-Glutamine (1%). L'objectif de cette expérimentation *in vitro* est de tester l'effet de l'encapsulation de la curcumine dans une émulsion, sur son activité anti-cancéreuse. Les cellules utilisées sont des cellules tumorales mammaires adhérentes de type MCF7. Les cellules sont repiquées une fois par semaine pour éviter leur décollement de la surface de la boîte du fait de leur croissance rapide. Un tapis cellulaire confluent est formé entre 7 et 8 jours d'incubation. Pour pouvoir effectuer des tests sur les cellules MCF7, ces dernières sont décollées de leur boîte de culture en rajoutant de la trypsine et réensemencées à des concentrations désirées sur une plaque à 96 puits. Pour une boîte T75 : Après avoir sorti la boîte de l'incubateur (37°C ; 5% CO₂), le milieu de culture est vidé et le tapis cellulaire est rincé deux fois avec 10 mL de tampon phosphate (PBS), puis 2 mL de trypsine sont rajoutés dans la boîte. Après 5min d'incubation, le tapis cellulaire décollé est re-suspendu dans 10 mL de RPMI puis centrifugé (10 min à 1500 tr/min). Les cellules sont récupérées, suspendues dans 10 mL de RPMI et comptées au microscope optique en utilisant l'hématimètre de Thomas. La plaque estensemencée à raison de 10⁴ cellules/puits. Nous avons testé les concentrations 0,22 et 0,43 µM de curcumine. Pour atteindre ces concentrations dans les puits, les émulsions sont diluées dans du RPMI. Les émulsions, la curcumine et l'éthanol ont été testés séparément en tant que témoin.

Appareillage :

Pour déterminer l'activité anti-cancéreuse de la curcumine, nous avons utilisé le système Xcelligence (Roche, Mannheim, Allemagne) dont le principe est de suivre en directe la prolifération cellulaire en mesurant l'indice ou l'impédance cellulaire (Figure 3:12).



Figure 3:12 Photo du système Xcelligence

L'appareil prend des mesures de l'indice cellulaire toutes les 15 min (modulable selon le type d'utilisation). Nous utilisons des plaques appropriées pour le système, il s'agit de plaques à 96 puits parsemés d'électrodes d'or tout au fond du puits (80% de la surface). Cette plaque se fixe sur un support appelé analyseur électronique qui est incubé à l'étuve (37°C ; 5% CO₂) et qui transfère à l'ordinateur les valeurs d'indice cellulaire relevées. La manipulation se déroule par étapes programmées sur le logiciel « RTCA1.2.1 » :

Etape 1 : On dépose 50 µL de RPMI et on incube la plaque pendant 1 min pour mesurer le bruit de fond.

Etape 2 : On ensemence les puits avec 150 µL de suspension cellulaire pour obtenir 10⁴ cellules/puit. La plaque est ensuite déposée sur le support et la mesure est lancée après 20 min d'incubation. Cette étape dure 24h pour atteindre un indice cellulaire de 0,5 au minimum.

Etape 3 : Une fois la valeur de l'indice cellulaire atteint 0,5, les cellules sont mises en contact pendant 48h avec les différentes solutions à tester (20 µL) : curcumine seule dans l'éthanol (0,22 et 0,43 µM) ; curcumine dans l'émulsion à base d'huile et de lécithine de colza (0,22 et 0,43 µM) ; curcumine dans l'émulsion à base d'huile et de lécithine de saumon (0,22 et 0,43 µM). Les émulsions seules (mêmes volumes que les émulsions vecteurs de curcumine) et l'éthanol sont utilisés comme témoins.

4 Résultats et discussion

Sommaire

4.1	Le procédé d'extraction par voie enzymatique	155
4.1.1	La matière première	155
4.1.1.1	Séchage par étuvage sous vide	159
4.1.1.2	Séchage par enrobage et étuvage	160
4.1.1.3	Caractérisation globale du CPLP	160
4.1.2	Caractérisation de la partie lipidique du CPLP.....	164
4.1.2.1	Les classes lipidiques	164
4.1.2.2	Composition en acides gras	166
4.1.2.3	Régiodistribution des acides gras sur les phospholipides majeurs du CPLP extraits de têtes de saumon (<i>Salmo salar</i>) comparés à ceux du Krill	167
4.1.2.3.1	Composition en acides gras des fractions lipidiques totales du saumon et du Krill	168
4.1.2.3.2	Composition en acides gras de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyl-éthanolamine extraites à partir du CPLP de têtes de saumon et de l'huile totale de Krill	169
4.1.2.3.3	Régiodistribution des acides gras pour la PC et la PE de la fraction lipidique du CPLP de saumon et de l'huile de Krill.....	171
4.1.2.3.3.1	Par méthode enzymatique	171
4.1.2.3.3.2	Détermination des espèces moléculaires par spectrométrie de masse	174
4.1.2.4	Suivi de l'oxydation de la partie lipidique du CPLP en fonction du temps et du mode de conservation	179
4.1.3	Caractérisation de la partie peptidique du CPLP	181
4.1.3.1	Composition physicochimique des hydrolysats protéiques du CPLP.....	181
4.1.3.2	Détermination de la taille des peptides en SDS-PAGE.....	182
4.1.3.3	Identification des acides aminés.....	183
4.1.3.4	Protéomique	185
4.2	Effet des fractions lipidique et peptidique du CPLP sur l'anxiété et le stress oxydant ..	188
4.2.1	Suivi pondéral des souris en fonction du régime administré	188
4.2.2	Etude comportementale : Evaluation de l'effet des traitements sur l'anxiété.....	189
4.2.2.1	Evolution des variables permettant de détecter un effet anxiolytique.....	189
4.2.2.2	Tests comportementaux.....	190
4.2.2.2.1	Dose aiguë à J0.....	190
4.2.2.2.1.1	Labyrinthe en croix surélevé	190
4.2.2.2.1.2	L'Openfield.....	192
4.2.2.2.2	Après sept jours de traitement	194
4.2.2.2.2.1	La planche à trous.....	194
4.2.2.2.2.2	Openfield	195
4.2.2.2.3	Dose sub-chronique à J 14	196

4.2.2.3.1	La chambre claire-obscur (CCO).....	196
4.2.2.3.2	L'Openfield.....	198
4.2.3	Evaluation par cytométrie en flux du statut oxydant neuronal des souris et de l'effet cytoprotecteur des régimes administrés.....	199
4.2.3.1	Evaluation du niveau endogène de ROS des neurones à J14	199
4.2.3.2	Evaluation de l'activité cytoprotectrice des traitements face à une attaque prooxydante <i>in vitro</i>	200
4.3	Vectorisation de molécules bioactives	205
4.3.1	Formulation d'émulsions à base de la fraction lipidique du CPLP, vectrices de molécules bioactives.....	205
4.3.1.1	Caractérisation de l'huile extraite par voie enzymatique à partir de têtes de saumon	205
4.3.1.2	Caractérisation physicochimique de l'huile et de la lécithine de colza	208
4.3.1.3	Taille des émulsions.....	210
4.3.1.4	Stabilité des émulsions en fonction du temps.....	212
4.3.2	Vectorisation et biodisponibilité du coenzyme Q ₁₀	213
4.3.2.1	Test de solubilité du CoQ ₁₀ dans l'huile de saumon	213
4.3.2.2	Stabilité des émulsions	214
4.3.2.3	Pharmacocinétique et biodisponibilité du CoQ ₁₀	215
4.3.2.3.1	Etude sur modèle souris	215
4.3.2.3.2	Etude sur modèle rat	218
4.3.3	Vectorisation et effet anticancéreux de la curcumine	222
4.3.3.1	Test de solubilité de la curcumine dans l'huile de saumon et l'huile de colza	222
4.3.3.2	Détermination du temps d'induction oxydatif (OIT) par calorimétrie différentielle à balayage	223
4.3.3.3	Stabilité des émulsions	225
4.3.3.4	Effet de la vectorisation sur l'activité anticancéreuse de la curcumine	226

Liste des figures

Figure 4:1 : Têtes de saumon (<i>Salmo salar</i>) utilisées comme substrat dans le procédé d'extraction enzymatique du complexe phospholipopeptidique	156
Figure 4:2 : Procédé d'extraction de l'huile de saumon et obtention d'hydrolysats protéiques.	157
Figure 4:3 : Cinétique d'hydrolyse de têtes de saumon en présence d'Alcalase® 2,4L.....	158
Figure 4:4 : CPLP obtenu après hydrolyse enzymatique de têtes de saumon (<i>Salmo salar</i>) et séparation par centrifugation.....	158
Figure 4:5 Evolution des teneurs en lipides totaux et en lipides neutres de différents lots de production. LN : lipides neutres ; MG : matière grasse (lipides totaux).....	161
Figure 4:6 Teneur en lipides totaux et en DHA dans la fraction polaire de lots cryobroyés.	162
Figure 4:7 : Classes lipidiques du CPLP extrait par voie enzymatique à partir de têtes de saumon (<i>Salmo salar</i>). TAG : Triacylglycérols, LP : Lipides polaires.....	165
Figure 4:8 : Fraction polaire des lipides totaux du CPLP : Phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI), lysophosphatidylcholine (L-PC)	165
Figure 4:9 Identification de la phosphatidylcholine	175
Figure 4:10 Récapitulatif des étapes d'identification de la PC	176
Figure 4:11 Etapes d'identification de la PE par LC-MS.....	177
Figure 4:12 Identification de la PE.....	178
Figure 4:13 Evolution en fonction du temps des lipides totaux du CPLP par spectroscopie infrarouge (FTIR)	180
Figure 4:14 Suivi de l'évolution des doubles liaisons cis aux alentours de 3010 cm^{-1} des lipides totaux du CPLP (—*) comparé à l'huile de saumon (—□—)	181
Figure 4:15 Distribution de taille des particules de CPLP solubilisé dans l'eau distillée	182
Figure 4:16 : Photo du gel d'électrophorèse obtenu	183
Figure 4:17 Profil de cytoprotection des traitements lipides et hydrolysats (n=8) à la dose 2 à J14	202
Figure 4:18 Fraction de triacylglycérols de l'huile de saumon extraite par hydrolyse enzymatique de têtes de saumon (<i>Salmo salar</i>).....	207
Figure 4:19 Fraction de triacylglycérols de l'huile de colza	209
Figure 4:20 Classes lipidiques de la lécithine de colza.....	209
Figure 4:21 Photo de microscopie électronique à transmission représentant les gouttelettes lipidiques de l'émulsion vectrice (30% d'huile de saumon)	212
Figure 4:22 Courbe de calibration du CoQ ₁₀ solubilisé dans de l'huile de saumon à 270 nm (n=3)	214
Figure 4:23 Photographie au microscopie électronique à transmission représentant le CoQ ₁₀ solubilisé dans les gouttelettes lipidiques d'une émulsion riche en AGPI-LC.....	215
Figure 4:24 Biodisponibilité du CoQ ₁₀ administré sous différentes formulations chez les souris :	217
Figure 4:25 Biodisponibilité du CoQ ₁₀ vectorisé sous trois formulations différentes chez les rats	219
Figure 4:26 Présentation des aires sous les courbes de biodisponibilités obtenues pour les différentes formulations (* : P<0.05 vs Lécithine, † : P<0.05 vs Lécithine+CoQ ₁₀ , § : P<0.05 vs Pharma Nord)	220

Résultats et discussion

<i>Figure 4:27 Présentation de la concentration plasmatique maximale en CoQ₁₀ pour les différents types de traitements (* : P<0.05 vs Lécithine, † : P<0.05 vs Lécithine+CoQ₁₀, § : P<0.05 vs Pharma Nord).....</i>	<i>220</i>
<i>Figure 4:28 Présentation du temps maximal correspondant à la concentration plasmatique maximale de CoQ₁₀ (* : P<0.05 vs Lécithine, † : P<0.05 vs Lécithine+CoQ₁₀, § : P<0.05 vs Pharma Nord).....</i>	<i>221</i>
<i>Figure 4:29 Temps de demi-vie du CoQ₁₀ dans le plasma en fonction des formulations (* : P<0.05 vs Lécithine, † : P<0.05 vs Lécithine+CoQ₁₀, § : P<0.05 vs Pharma Nord).....</i>	<i>222</i>
<i>Figure 4:30 Courbe étalon de la curcumine dans du méthanol à 425 nm.....</i>	<i>222</i>
<i>Figure 4:31 Cinétique de prolifération cellulaire des cellules cancéreuses mammaires (MCF7) en fonction de la vectorisation de curcumine sous forme nanoémulsionnée, formulée à partir de fractions lipidiques marine et végétale à différentes concentrations.....</i>	<i>228</i>

Liste des tableaux

Tableau 4:1 : Composition physico-chimique des têtes de saumon (<i>Salmo salar</i>) et des filets de saumon.	156
Tableau 4:2 Analyses microbiologiques des CPLP séchés par étuvage et lyophilisation	160
Tableau 4:3 Analyses physicochimiques du CPLP produit à l'échelle industrielle.....	161
Tableau 4:4 Comparaison de la composition en minéraux du complexe phospholipidique extrait à partir du procédé pilote (100 kg) et industriel (voir section matériels et méthodes).....	163
Tableau 4:5 Composition en acides gras des différentes classes lipidiques des lipides totaux du CPLP extraits de têtes de saumon par voie enzymatique (n=3).....	166
Tableau 4:6 : Composition en acides gras des fractions lipidiques provenant de l'huile totale de Krill (<i>Oemine Krill</i>) (n=3).....	168
Tableau 4:7 Composition en acides gras des deux classes lipidiques PC et PE de la fraction lipidique du CPLP et de l'huile de Krill (%) (n=3).....	170
Tableau 4:8 Composition en acides gras estérifiés sur la PC et la PE du CPLP de têtes de saumon (n=3).....	172
Tableau 4:9 Composition en acides gras de la PC et de la PE de l'huile de Krill (n=3).....	173
Tableau 4:10 Espèces moléculaires des PC et PE provenant du saumon et du Krill (n=3).....	179
Tableau:4:11 Teneur en azote total de l'hydrolysate peptidique et du CPLP obtenus après hydrolyse enzymatique des têtes de saumon	182
Tableau 4:12 Composition en acides aminés de différentes fractions peptidiques provenant de l'hydrolyse enzymatique des têtes de saumon	183
Tableau:4:13 Comparaison de la composition en acides aminés de l'hydrolysate soluble de tête de saumon (co-produit) avec celui de Gbogouri (2006).....	184
Tableau 4:14 Récapitulatif de l'ensemble des protéines identifiées dans NCBI nr_Chordata avec le moteur de recherche Mascot.....	186
Tableau 4:15 Récapitulatif de l'ensemble des protéines identifiées dans NCBI nr_Chordata avec le module InChorus combinant les moteurs de recherche Peaks DB et Mascot	187
Tableau 4:16 Médianes et interquartiles relatifs au suivi pondéral des souris traitées et des souris contrôles (n=10) pendant 14 jours de traitement avec la dose 1	188
Tableau 4:17 Médianes et interquartiles relatifs au suivi pondéral des souris traitées et des souris contrôles (n=10) pendant 14 jours de traitement avec la dose 2	189
Tableau 4:18 Evolution des variables liées à la diminution de l'anxiété	190
Tableau 4:19 Evolution des variables liées à la diminution de l'anxiété	190
Tableau 4:20 Moyenne et écart à la moyenne des variables évaluant l'anxiété grâce au test du labyrinthe en croix chez des souris traitées et sur le groupe contrôle (n=10) par la dose 1 à J0.....	191
Tableau 4:21 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'anxiété par le test du labyrinthe en croix à la dose 2 à J0.....	192
Tableau 4:22 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice avec le test de l'Openfield à la dose 1 à J0	193

Résultats et discussion

Tableau 4:23 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice en utilisant le test de l'Openfield à la dose 2 à J0.....	193
Tableau 4:24 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'anxiété avec le test de la planche à trous à la dose 1 à J7.....	194
Tableau 4:25 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'anxiété à l'aide du test de la planche à trous à la dose 2 à J7.....	195
Tableau 4:26 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice par le test de l'Openfield a la dose 1 à J7.....	195
Tableau 4:27 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice par le test de l'Openfield a la dose 2 à J7.....	196
Tableau 4:28 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et des contrôles (n=10) des variables évaluant l'anxiété dans la chambre claire-obscur à la dose 1 à J14.....	197
Tableau 4:29 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'anxiété dans la chambre claire-obscur à la dose 2 à J14.....	198
Tableau 4:30 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice dans le test de l'Openfield a la dose 1 à J14.....	198
Tableau 4:31 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice par le test de l'Openfield à la dose 2 à J14.....	199
Tableau 4:32 Valeurs de la fluorescence cellulaire des neurones des souris traitées à la dose 1 pendant 14 jours et celles des contrôles (n=8), relatives au niveau de ROS endogènes des neurones.....	199
Tableau 4:33 Valeurs de la fluorescence cellulaire des neurones des souris traitées et des contrôles (n=8), relatives au niveau de ROS endogènes des neurones après 14 jours de traitement avec une double dose.....	200
Tableau 4:34 Moyennes et écarts à la moyenne des valeurs de fluorescence (UA) des neurones des souris traitées et celles des contrôles (n=8) après 14 jours de traitement par la dose 1.....	201
Tableau 4:35 Moyennes et écarts à la moyenne des valeurs de fluorescence (UA) des neurones des souris traitées et contrôles (n=8) ayant subi des attaques oxydatives par ajout de H ₂ O ₂ , après 14 jours de traitement avec la dose 2.....	201
Tableau 4:36 : Récapitulatif général des significativités des résultats obtenus suite aux études effectuées in vivo et in vitro.....	203
Tableau 4:37 Différentes compositions en acides gras des huiles de saumon (<i>Salmo salar</i>) (Pratoomyot et al., 2011) (n=3).....	206
Tableau 4:38 Analyse chimique de l'huile de saumon.....	207
Tableau 4:39 Composition en acides gras de l'huile et de la lécithine de colza (n=3).....	208
Tableau 4:40 Analyse chimique de l'huile de colza.....	210
Tableau 4:41 Mesure de la taille, de la mobilité électrophorétique et de l'indice de polydispersité des gouttelettes lipidiques d'une émulsion à base d'huile et de lécithine de saumon vs huile et lécithine de colza (n=5).....	211

Résultats et discussion

<i>Tableau 4:42 Evolution de la moyenne des paramètres physiques des gouttelettes lipidiques des émulsions vectrices (marine et végétale) en fonction du temps (n=5).....</i>	<i>212</i>
<i>Tableau 4:43 Paramètres physiques des gouttelettes lipidiques de l'émulsion riche en AGPI-LC contenant du CoQ₁₀ en fonction du temps (n=5).....</i>	<i>214</i>
<i>Tableau 4:44 Solubilité maximale de la curcumine dans l'huile de saumon et l'huile de colza</i>	<i>223</i>
<i>Tableau 4:45 Temps d'induction à l'oxydation d'huiles de saumon et de colza formulées avec différentes concentrations de curcumine</i>	<i>225</i>
<i>Tableau 4:46 Evolution de la moyenne des paramètres physiques des gouttelettes lipidiques de l'émulsion formulée à partir d'huile et lécithine de saumon en fonction du temps (n=5)</i>	<i>226</i>
<i>Tableau 4:47 Evolution de la moyenne des paramètres physiques des gouttelettes lipidiques de l'émulsion formulée à partir d'huile et lécithine de colza en fonction du temps (n=5).....</i>	<i>226</i>

4.1 Le procédé d'extraction par voie enzymatique

Les industries de la filière halieutique génèrent de grosses quantités de co-produits généralement utilisés pour l'extraction des huiles et farines de poisson destinées à l'aquaculture (Bhaskar *et al.*, 2008; Nilsang *et al.*, 2005). Ces co-produits représentent une source protéique et lipidique importante, valorisable sur le plan nutritionnel compte tenu de la forte proportion en acides gras à longue chaîne et de la présence de peptides à activité fonctionnelle.

Les Laboratoires Le Stum utilisent un procédé enzymatique permettant d'obtenir un complexe phospholipopeptidique à partir de tête de saumon (*Salmo salar*). Ce procédé, conduit à température modérée sous atmosphère inerte, permet d'extraire rapidement (en moins de 2 heures) différentes classes de lipides avec des rendements proches des extractions par solvant (Brevet FR 2.835.703, 2002). L'action de protéases spécifiques aboutit rapidement à une destructuration des tissus protéiques qui conduit à l'obtention de fractions lipidiques et protéiques (hydrolysats peptidiques) séparées ensuite par une étape de centrifugation. Ce procédé permet aussi d'obtenir un mélange de fractions protéiques « lourdes » émulsionnées avec un mélange de lipides complexes.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé un complexe phospholipidique fourni par les laboratoires Le Stum sous la forme humide ou lyophilisée après cryobroyage provenant d'un procédé industriel. Nous avons d'autre part effectué des extractions à l'échelle pilote au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules permettant de conduire des études de biodisponibilité et comportementales sur animaux.

4.1.1 La matière première

Les têtes de saumon d'aquaculture (*Salmo salar*) ont été choisies en raison de la forte teneur en huile riche en AGPI et du tonnage important de co-produits générés sur les lignes de transformation (Figure 4:1). Il faut souligner que les co-produits de saumon utilisés font l'objet de la même attention que les filets après opération de filetage au niveau de leur prélèvement, les conditions de leur conservation et la maîtrise de leur qualité microbiologique.



Figure 4:1 : Têtes de saumon (*Salmo salar*) utilisées comme substrat dans le procédé d'extraction enzymatique du complexe phospholipopeptidique

La composition physicochimique des têtes de saumon est nécessaire afin de bien maîtriser le procédé d'hydrolyse (Tableau 4:1). En effet, la concentration en protéines (basée sur la quantité d'azote total présent dans le substrat) est ajustée par addition d'eau dans le réacteur pour obtenir une valeur voisine de 7 à 8% en poids. Cette étape facilite l'agitation dans le réacteur et augmente la surface de contact avec les protéases. Il est aussi intéressant de noter la forte teneur en huile dans les têtes de poisson en raison d'une concentration en lipides élevée dans les chairs au niveau supérieur de la tête.

Tableau 4:1 : Composition physico-chimique des têtes de saumon (*Salmo salar*) et des filets de saumon.

(%)	Têtes	Filets (pour comparaison)
Lipides totaux	21,5 ± 0,3	13,5 ± 1,5
Matière sèche	68,5 ± 0,5	36,8 ± 0,5
Protéines (NT x 6,25)	13,2 ± 0,3	18,1 ± 0,5
cendres	3,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1

Les résultats obtenus sont en accord avec les données d'une étude récente (Usyodus *et al.*, 2011) qui a montré que le filet de saumon (*Salmo salar*) contient une teneur en lipides totaux de 13,1% ± 2,4. En effet, parmi les différents poissons étudiés (Morue, hareng, saumon, carpe, truite, lieu noir, sole, tilapia et requin (*Pangasius*)), le filet de saumon contient le pourcentage le plus élevé en lipides totaux. Il faut d'autre part noter que les co-produits de saumon, et notamment les têtes, représentent un potentiel en huile supérieur au filet (21,5%) en accord avec les résultats obtenus par (Gbogouri, 2005).

Les différentes étapes du procédé d'extraction sont résumées sur la Figure 4:2 et ont fait l'objet d'un dépôt de brevet.

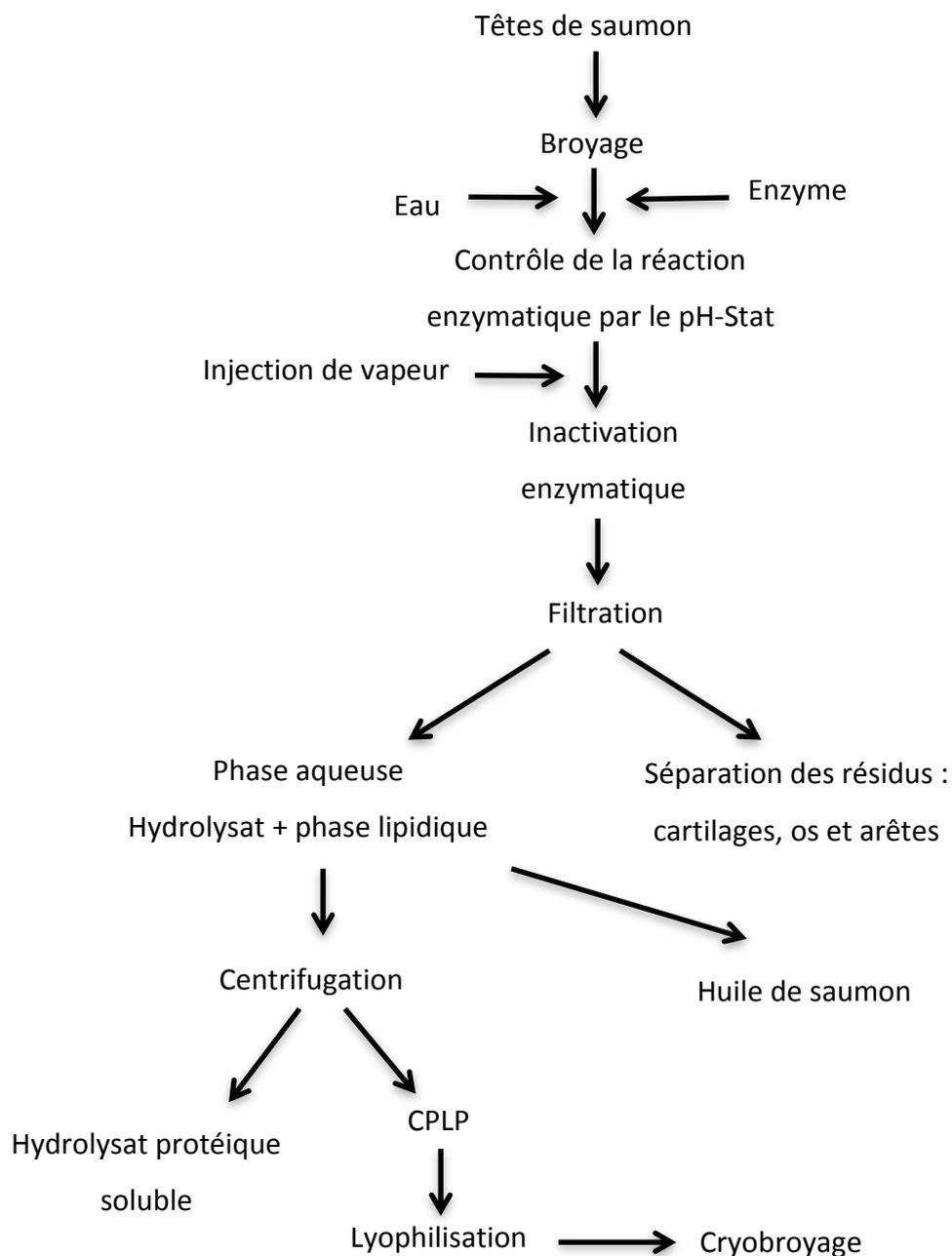


Figure 4:2 : Procédé d'extraction de l'huile de saumon et obtention d'hydrolysats protéiques.

La réaction d'hydrolyse effectuée à l'échelle pilote nous a permis de mettre en évidence la cinétique d'hydrolyse, pendant 50 min de réaction, en calculant le degré d'hydrolyse avec la méthode du pH-stat (Figure 4:3). Le contrôle du degré d'hydrolyse (DH) est effectué selon la méthode de Adler-Nissen (1979), afin de limiter le DH entre 7 et 8% pour ne pas risquer de

développer une amertume qui serait un obstacle à l'utilisation de ces bases protéiques en formulation alimentaire (Adler-Nissen, 1979). En effet, le phénomène d'amertume est principalement lié à la libération de peptides hydrophobes lors du clivage des liaisons peptidiques par les protéases (Adler-Nissen, 1984).

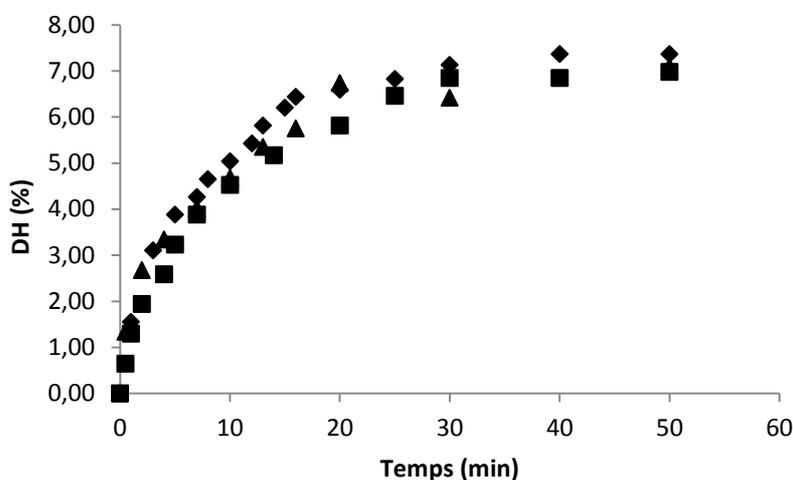


Figure 4:3 : Cinétique d'hydrolyse de têtes de saumon en présence d'Alcalase® 2,4L

A l'échelle pilote, le CPLP est récupéré par centrifugation à 10 000 rpm pendant 25 min (Figure 4:4). Pour éviter les phénomènes d'oxydation, la centrifugation et la récupération du CPLP sont effectuées sous azote. Cette opération est difficilement réalisable à l'échelle industrielle en raison de la configuration de la centrifugeuse. Cependant les réactions d'oxydation sont limitées en raison de l'addition d'antioxydants et d'une congélation immédiate du CPLP.



Figure 4:4 : CPLP obtenu après hydrolyse enzymatique de têtes de saumon (*Salmo salar*) et séparation par centrifugation

Le produit congelé subit ensuite une étape de lyophilisation puis un cryo-broyage permettant d'obtenir la granulométrie désirée dans le procédé de fabrication du Vectoméga[®]. Un des objectifs de ce travail a été de trouver un procédé moins coûteux permettant de remplacer l'étape de lyophilisation.

Deux procédés ont été proposés pour remplacer l'étape de lyophilisation ; le séchage par étuvage sous vide ou le séchage par enrobage puis étuvage.

4.1.1.1 Séchage par étuvage sous vide

Ce procédé de séchage a été testé à l'échelle pilote en utilisant une étuve thermostatée sous vide. L'eau contenue dans l'échantillon est piégée dans un dispositif contenant du CaCl_2 et relié à l'étuve. Les essais ont été conduits sur le lot de production n° 9256. Un échantillon a été traité par lyophilisation permettant de comparer les résultats obtenus. Deux températures de séchage, 50 et 70°C ont été utilisées sur une durée de 48h. La température à l'intérieure de l'étuve est relevée toutes les 5 min à l'aide d'une sonde et permet de suivre l'évolution du séchage. Les teneurs en lipides totaux des différentes poudres de CPLP après séchage sont respectivement de 24,05%, 19,75% et 15,41% pour le CPLP lyophilisé, le CPLP séché à 50°C et le CPLP séché à 70°C. L'analyse des classes lipidiques par Iatroscan a révélé que dans les lipides totaux du CPLP lyophilisé, nous retrouvons 40% de lipides polaires et 60% de lipides neutres. Le pourcentage des lipides polaires évolue dans les échantillons de CPLP séchés en atteignant 53% et 61%, respectivement pour le séchage à 70°C et à 50°C montrant une détérioration progressive des AGPI-LC à 70°C sous vide. Pour s'assurer que le procédé de séchage permet d'obtenir une poudre de CPLP parfaitement sèche comme dans le cas de la lyophilisation, le taux d'humidité dans les échantillons séchés a été déterminé. Les résultats confirment bien que le CPLP est parfaitement sec à 99,9% indépendamment de la température de séchage. Néanmoins, plusieurs essais de séchage sous vide ont montré des développements microbiens contrairement au procédé de lyophilisation. Ce point important a été élucidé en effectuant des analyses microbiologiques sur les CPLP obtenus par les deux types de procédés de séchage.

Les résultats obtenus sont malheureusement peu satisfaisants (Tableau 4:2) et sont dus essentiellement à une légère contamination préalable du CPLP extrait qui s'est amplifiée lors du procédé de séchage. Cette technique a été abandonnée en raison du risque possible de développement de contamination.

Tableau 4:2 Analyses microbiologiques des CPLP séchés par étuvage et lyophilisation

Flores recherchées	Dénombrement (UFC/g)		
	lyophilisé	50 °C	70 °C
Coliformes	< 10	> 3 10 ⁴	3,1 10 ²
<i>Escherichia. coli</i>	< 10	1,5 10 ⁴	< 10
FAM	Inc	Inc	Inc
Levures et moisissures	<10	< 10	< 10

Inc : incomptable soit > 10⁴ UFC/g

4.1.1.2 Séchage par enrobage et étuvage

Un procédé de séchage par enrobage et étuvage a été proposé par la société où s'effectue la production du CPLP. Ce procédé est globalement basé sur un enrobage du CPLP à l'état humide par un additif suivi d'un séchage par étuvage. Les paramètres utilisés dans ce procédé restent cependant confidentiels. Deux échantillons d'un lot séché par enrobage provenant de la même production (n°9259) ont été analysés et comparés.

Un premier échantillon composé uniquement de CPLP enrobé et séché contient 15,32% de lipides totaux dont 50% de lipides polaires et 50% de lipides neutres. Dans le but d'augmenter la teneur en lipides totaux, un deuxième échantillon de CPLP enrichi en huile de saumon, enrobé et séché, a été analysé. Les résultats d'extraction des lipides totaux conduisent à une teneur de 17,75%, soit un enrichissement de 2,43% en huile totale. Cet enrichissement augmente la teneur en lipides neutres dans le CPLP qui atteint 70,18%. D'autre part, il n'existe aucune variation des pourcentages d'EPA et de DHA pour les lipides totaux (EPA : 7,5% et DHA 17%) et concernant les lipides polaires (EPA : 8,2% et DHA 37,8%). L'indice de peroxyde (1,98 < 5) montre que ce procédé est une alternative à la lyophilisation mais demande à être développé pour de forts tonnages.

4.1.1.3 Caractérisation globale du CPLP

La production de CPLP par les Laboratoires Le Stum a été contrôlée tout au long de cette étude sur les plans physicochimique et microbiologique, permettant d'optimiser au mieux le procédé d'extraction de ce complexe phospholipopeptidique. Des analyses de routine permettant de suivre la teneur en lipides polaires, la teneur en EPA et en DHA ainsi que le niveau d'oxydation ont été régulièrement effectuées, permettant d'avoir une traçabilité à l'échelle industrielle. Le Tableau 4:3 représente les caractéristiques du CPLP produit à l'échelle industrielle.

Tableau 4:3 Analyses physicochimiques du CPLP produit à l'échelle industrielle

Paramètres physicochimiques	Complexe phospholipopeptidique
Matière sèche	31%
Azote total	13,1 g d' N _T /100 g de CPLP
Indice de peroxyde	Entre 5 et 7 méq d'O ₂ /Kg de lipides
Cendres	3,2 g/100 g de CPLP

La valeur acceptable de l'indice de peroxyde est de 5 méq d'O₂/Kg de lipides

Les pourcentages en lipides totaux et en lipides neutres des CPLP produits pendant ces trois dernières années ont diminué respectivement de 50 à 30% et de 65 à 12%, suite aux améliorations apportées au procédé d'extraction du CPLP. La Figure 4:5 présente les teneurs en lipides neutres et polaires en fonction de différentes productions. De meilleurs réglages sur le procédé de séparation ont permis de limiter la teneur en lipides neutres, augmentant ainsi la teneur en DHA, majoritairement présent sur les lipides polaires.

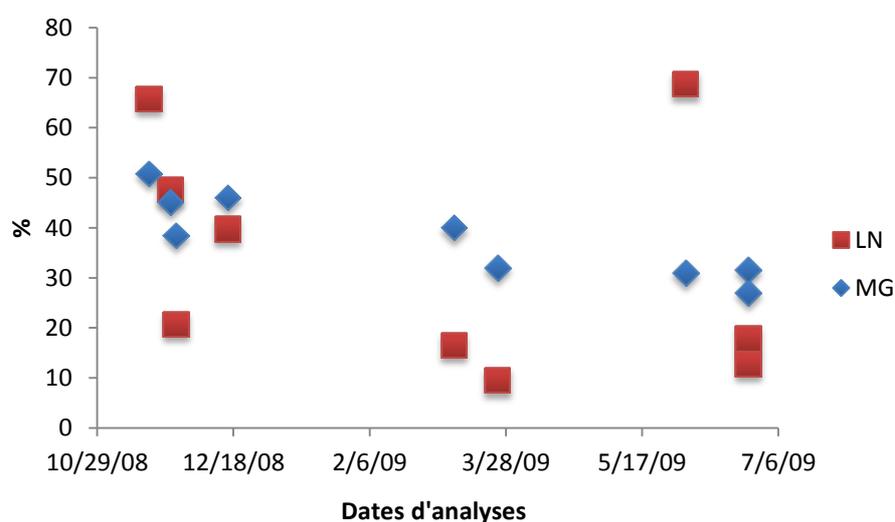


Figure 4:5 Evolution des teneurs en lipides totaux et en lipides neutres de différents lots de production. LN : lipides neutres ; MG : matière grasse (lipides totaux)

Une augmentation en lipides polaires (80,84%) est observée dans les dernières productions industrielles augmentant ainsi la teneur en DHA dans les lipides totaux du CPLP (19,78%) dont 33,3% sont positionnés sur les phospholipides (Figure 4:6).

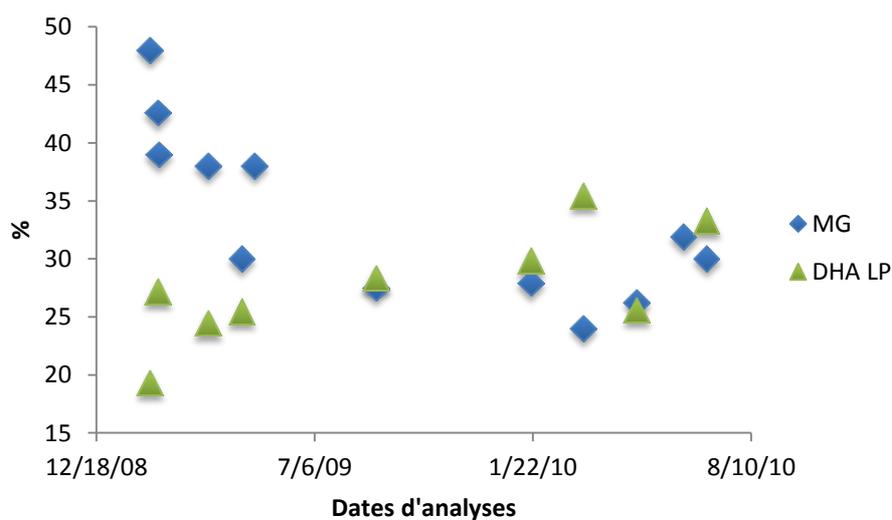


Figure 4:6 Teneur en lipides totaux et en DHA dans la fraction polaire de lots cryobroyés.
LP : lipides polaires ; MG : matière grasse

Nous avons évalué d'autre part la teneur en minéraux dans le CPLP industriel et dans l'extrait obtenu à l'échelle pilote (Tableau 4:4). Le CPLP commercialisé contient des traces de chrome, de cuivre, de strontium, de rubidium et de zinc mais essentiellement du magnésium (0,05 et 0,09%), du calcium (0,29 et 0,47%), du sodium (1,1 et 0,77%), du potassium (0,42 et 0,25%) et du phosphate (1,92 et 1,32%) respectivement dans le CPLP extrait à l'échelle industrielle et par un procédé pilote.

En fonction de l'origine des têtes de saumon, nous remarquons une différence dans la composition des éléments chimiques dans les deux CPLP extraits à l'échelle pilote et industrielle. Le CPLP obtenu à l'échelle pilote comporte en plus de tous les éléments retrouvés dans le CPLP industriel, du fer et très peu de manganèse. Il est cependant déficient en chrome.

Il est important de remarquer que les analyses effectuées sur le CPLP ne présentent pas de contamination en métaux lourds (mercure, cadmium, plomb), s'accumulant généralement chez les poissons prédateurs (thon, espadon, requin...).

D'après le rapport intitulé « Effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé » (2001 ; Assemblée Nationale, 2979), ces seuils de consommation sont fixés en France, pour les poissons les plus consommés, à 0,2 mg/kg de plomb ; 0,05 mg/kg de cadmium et 0,5 mg/kg de mercure. Il existe cependant une tolérance concernant les compléments alimentaires mis sur le marché selon le document établi par la commission européenne du 2

Résultats et discussion

juillet 2008 (CE, N°629/2008). Les teneurs maximales pour le plomb, le cadmium et le mercure ont été fixées respectivement à 3 mg/kg, 1 mg/kg et 0,1 mg/kg. Plusieurs études ont indiqués que la concentration en minéraux dans les poissons dépend non seulement de leur alimentation et de leur environnement mais aussi de leur physiologie et de leur anatomie (Aubourg *et al.*, 2007).

Tableau 4:4 Comparaison de la composition en minéraux du complexe phospholipidique extrait à partir du procédé pilote (100 kg) et industriel (voir section matériels et méthodes)

Eléments	Unité	CPLP pilote	CPLP Laboratoires Le Stum	Eléments	Unité	CPLP pilote	CPLP Laboratoires Le Stum
As	ppm	< 1,1	< 1,1	Rb	ppm	0,547 ± 0,05	0,713 ± 0,07
Ba	ppm	< 2	< 2	Sb	ppm	< 0,1	< 0,1
Be	ppm	< 0,45	< 0,45	Sm	ppm	< 0,01	< 0,01
Bi	ppm	< 0,09	< 0,09	Sn	ppm	< 0,3	< 0,3
Cd	ppm	< 0,1	< 0,1	Sr	ppm	34,21 ± 3,42	16,53 ± 1,65
Ce	ppm	< 0,12	< 0,12	Ta	ppm	< 0,01	< 0,01
Co	ppm	< 0,2	< 0,2	Tb	ppm	< 0,005	< 0,005
Cr	ppm	< 3	3,307 ± 0,33	Th	ppm	< 0,03	< 0,03
Cs	ppm	< 0,05	< 0,05	Tm	ppm	< 0,001	< 0,001
Cu	ppm	11,7 ± 1,17	6,009 ± 0,6	U	ppm	< 0,04	< 0,04
Dy	ppm	< 0,009	< 0,009	V	ppm	< 0,75	< 0,75
Er	ppm	< 0,005	< 0,005	W	ppm	< 0,1	< 0,1
Eu	ppm	< 0,004	< 0,004	Y	ppm	< 0,15	< 0,15
Ga	ppm	< 0,16	< 0,16	Yb	ppm	< 0,004	< 0,004
Gd	ppm	< 0,01	< 0,01	Zn	ppm	266,3 ± 26,63	297,8 ± 29,78
Ge	ppm	< 0,1	< 0,1	Zr	ppm	< 1	< 1
Hf	ppm	< 0,026	< 0,026	Si	%	< 0,02	< 0,02
Ho	ppm	< 0,002	< 0,002	Al	%	< 0,02	< 0,02
In	ppm	< 0,07	< 0,07	Fe	%	0,021 ± 0,003	< 0,03
La	ppm	< 0,06	< 0,06	Mn	%	0,0007 ± 0,00007	< 0,0005
Lu	ppm	< 0,002	< 0,002	Mg	%	0,092 ± 0,009	0,052 ± 0,005
Mo	ppm	< 0,3	< 0,3	Ca	%	0,47 ± 0,07	0,29 ± 0,044
Nb	ppm	< 0,06	< 0,06	Na	%	0,77 ± 0,11	1,1 ± 0,16
Nd	ppm	< 0,04	< 0,04	K	%	0,25 ± 0,042	0,42 ± 0,063
Ni	ppm	< 4	< 4	Ti	%	< 0,03	< 0,03
Pb	ppm	< 0,6	< 0,6	P	%	1,32 ± 0,13	1,92
Pr	ppm	< 0,01	< 0,01	ppm : µg/g de produit ; % : g/100g de produit			

La mesure de la perte au feu (PF ≈ 95%) a été effectuée dans le cadre de cette étude pour vérifier que nous avons bien dosé la totalité des éléments des échantillons. Le total des

éléments dosés ainsi que la PF est d'environ 100%. La concentration en mercure est inférieure au seuil de détection.

4.1.2 Caractérisation de la partie lipidique du CPLP

Le procédé d'extraction enzymatique des lipides à partir des têtes de saumon conduit à la valorisation d'une huile riche en AGPI-LC, extraite à basse température sans solvant, et représentant entre 14 et 17% de la quantité de substrat initial. D'autre part, le complexe phospholipopeptidique contient une proportion de lipides neutres et polaires que nous allons étudier plus en détail.

4.1.2.1 Les classes lipidiques

Après extraction de la phase lipidique par la méthode de Folch *et al.*, (1957) à partir du complexe phospholipopeptidique lyophilisé, les différentes classes lipidiques sont quantifiées par chromatographie sur couche mince couplée à une détection par ionisation de flamme. Les résultats de la migration dans le solvant apolaire (hexane/diéthyl éther (80 : 20 v/v)) révèlent la présence de deux pics distincts qui correspondent aux lipides polaires et aux lipides neutres (Figure 4:7). Il faut noter à ce propos que le principe actif du complément nutraceutique Vectoméga[®] est composé de différentes fractions lipidiques permettant de vectoriser les AGPI-LC aussi bien sous la forme triglycéridique que sous la forme phospholipidique. Les lipides polaires constituent 65% des lipides totaux du CPLP et ont la propriété de contenir une forte proportion de DHA en position *sn*-2, qui joue un rôle important dans la structuration et la stabilisation d'émulsions et de liposomes (Henna Lu *et al.*, 2011).

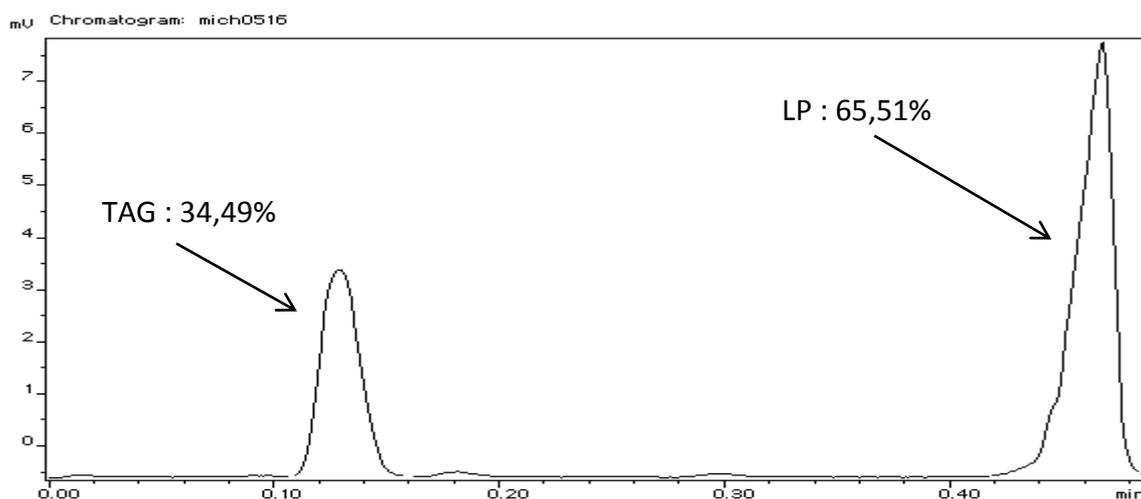


Figure 4:7 : Classes lipidiques du CPLP extrait par voie enzymatique à partir de têtes de saumon (*Salmo salar*). TAG : Triacylgcérols, LP : Lipides polaires

Une deuxième migration dans le solvant polaire (chloroforme/méthanol/ammoniaque 65 : 35 : 5 v/v/v) permet de différencier les différents phospholipides présents dans les lipides polaires. Dans les lipides totaux de la tête de saumon (Figure 4:8), la phosphatidylcholine (PC) (28,11%) est le phospholipide majoritaire suivi de la phosphatidyléthanolamine (PE) (13,53%). Ces résultats sont en accord avec une étude effectuée sur le saumon (*Salmo salar*) qui montre que les fractions de PC et de PE sont majoritaires (Miller *et al.*, 2006).

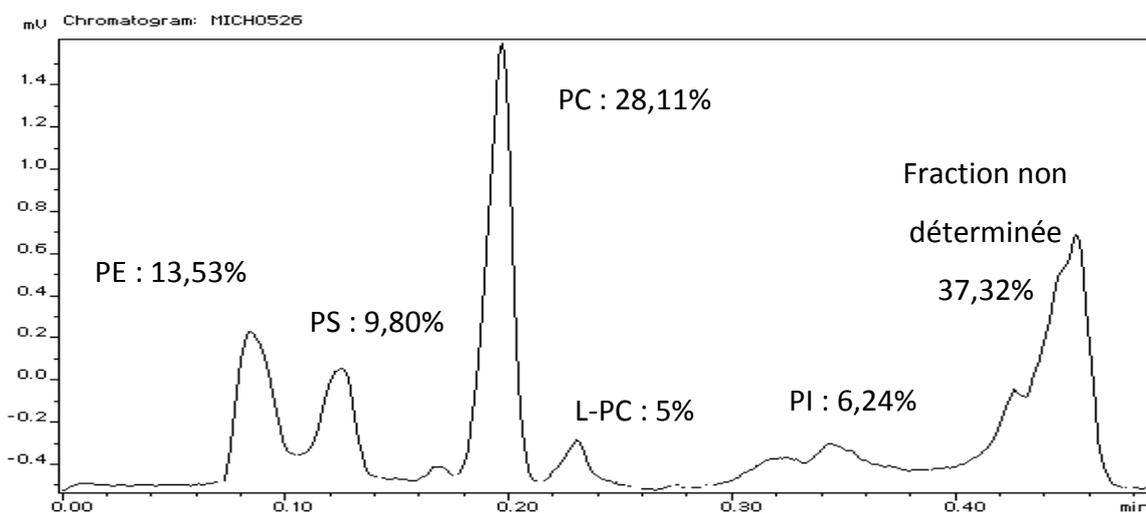


Figure 4:8 : Fraction polaire des lipides totaux du CPLP : Phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylsérine (PS), phosphatidylinositol (PI), lysophosphatidylcholine (L-PC)

4.1.2.2 Composition en acides gras

La composition en acides gras a été déterminée par CPG (n=3) sur les lipides totaux ainsi que sur les fractions de lipides neutres, de phospholipides et de glycolipides après séparation sur colonne de silice. Ces compositions en acides gras sont présentées dans le Tableau 4:5. Les premières observations mettent en évidence la fraction des acides gras polyinsaturés qui est majoritaire dans toutes les classes lipidiques du CPLP. Cependant le pourcentage en AGPI le plus élevé est retrouvé dans la fraction phospholipidique (62,24%) suivi de la fraction des glycolipides (55,04%), des lipides totaux (49,65%) et enfin des lipides neutres (44,43%). Le pourcentage en acides gras saturés reste relativement constant dans toutes les fractions et varie de 22 à 27% contrairement au pourcentage en AGMI qui est inversement proportionnel à celui des AGPI. Le plus faible pourcentage en AGMI est observé pour les phospholipides. Le DHA est l'acide gras majoritaire dans toutes les fractions lipidiques sauf pour les lipides neutres où nous retrouvons une concentration élevée en acide palmitique avec 15,54%. La teneur en EPA est par contre peu variable dans les différentes fractions lipidiques, sauf pour les glycolipides avec 6,97%.

Tableau 4:5 Composition en acides gras des différentes classes lipidiques des lipides totaux du CPLP extraits de têtes de saumon par voie enzymatique (n=3)

Acides gras	LTS		PLS		LNS		GLS	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
C12	-	-	-	-	-	-	-	-
C14	3,54	0,00	0,68	0,01	5,01	0,04	1,99	0,01
Iso C15	0,08	0,00	0,00	0,00	0,15	0,01	0,03	0,00
Ante iso C15	-	-	-	-	-	-	-	-
C15	0,24	0,02	0,10	0,00	0,33	0,00	0,23	0,00
C15 : 1	0,27	0,01	2,12	0,02	0,05	0,00	1,09	0,02
Iso C16	-	-	-	-	-	-	-	-
C16	17,04	0,04	12,08	0,05	15,54	0,15	20,07	0,18
C16 : 1w7	0,31	0,00	0,23	0,00	0,41	0,01	0,30	0,00
C16 : 1w9	4,10	0,05	1,28	0,00	5,72	0,03	2,38	0,01
C16 : 2w6	-	-	-	-	-	-	-	-
C16 : 3w3	0,42	0,02	1,76	0,10	0,29	0,04	1,37	0,10
C16 : 4w3	0,33	0,00	0,06	0,01	0,56	0,00	0,10	0,01
C18	3,96	0,00	9,59	0,01	3,32	0,02	4,95	0,03
C18 :1w9	16,49	0,02	8,15	0,00	19,48	0,18	9,07	0,02
C18 : 1w7	2,66	0,06	2,89	0,00	2,95	0,00	3,84	0,00
C18 : 1w5	-	-	-	-	-	-	-	-
C18 : 2w6	4,39	0,00	1,87	0,07	6,35	0,04	2,66	0,13
C18 : 3w4	2,77	0,00	1,35	0,07	3,72	0,37	1,39	0,00
C18 : 3w3	1,45	0,00	0,67	0,00	1,88	0,20	1,27	0,01

Résultats et discussion

Acides gras	LTS		PLS		LNS		GLS	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
C20 : 1w9	0,93	0,00	0,11	0,00	1,50	0,01	0,25	0,00
C20 : 1w7	0,69	0,00	0,47	0,00	1,05	0,00	0,69	0,01
C20 : 2w6	2,11	0,10	0,33	0,08	3,02	0,00	0,51	0,19
C20 : 4w6	1,50	0,00	5,24	0,00	0,76	0,00	2,18	0,01
C20 : 3w3	0,96	0,00	0,56	0,00	1,28	0,00	0,69	0,00
C20 : 5w3 EPA	10,53	0,02	8,99	0,07	10,10	0,09	6,96	0,00
C21 : 5w3	1,06	0,00	0,66	0,02	0,58	0,00	5,61	0,06
C22 : 4w6	0,30	0,00	0,11	0,00	0,43	0,00	0,10	0,00
C22 : 5w6	0,33	0,00	0,51	0,00	0,29	0,00	0,39	0,00
C22 : 5w3	3,10	0,01	3,49	0,00	3,27	0,02	2,57	0,00
C22 : 6w3 DHA	20,34	0,00	36,57	0,15	11,83	0,08	29,19	0,26
AGS	24,87		22,47		24,37		27,29	
AGMI	25,48		15,28		31,2		17,66	
AGPI	49,64		62,24		44,42		55,03	

LTS : lipides totaux du saumon, PLS : phospholipides du saumon, LNS : lipides neutres du saumon, GLS : glycolipides du saumon ; AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés, ET : écart type. Les acides gras sont présentés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux.

Les lipides totaux du CPLP montrent une teneur en DHA de 20,34%. Cette valeur est bien supérieure à la concentration du DHA dans le filet en raison de la présence de phospholipides dans la tête. On peut noter une variabilité dans la teneur en AGPI-LC en fonction des données de la littérature. En effet, Kahveci et Xu (2011) enrichissent de l'huile de saumon brute (DHA : 8,11% ; EPA : 5,46%) par voie enzymatique à l'aide d'une lipase (*Candida rugosa*) pour obtenir une concentration maximale de 10% pour l'EPA et de 23% pour le DHA (Kahveci and Xu, 2011). D'autre part, l'étude de Blanchet *et al.*, (2005) sur le saumon d'Atlantique (*Salmo salar*) met en évidence une teneur de 15,2% en DHA et 7,9% pour l'EPA (Blanchet *et al.*, 2005).

4.1.2.3 Répartition des acides gras sur les phospholipides majeurs du CPLP extraits de têtes de saumon (*Salmo salar*) comparés à ceux du Krill

Parmi les différents produits retrouvés sur le marché des compléments alimentaires riches en AGPI, peu de produits présentent une vectorisation des acides éicosapentaénoïque et docosahexaénoïque estérifiés sur des lipides polaires. Outre les œufs de poisson et les phospholipides de calamar, représentant une faible part de ce marché, l'huile de Krill, en revanche, présente la particularité d'être riche en AGPI-LC vectorisés par des phospholipides. L'émergence de l'huile de Krill par rapport aux autres compléments alimentaires pendant ces dix dernières années est liée à sa teneur en phospholipides ainsi

qu'à sa forte concentration en antioxydants (Henna Lu *et al.*, 2011; Winther *et al.*, 2011). Nous avons pour cette raison effectué une étude comparative de deux fractions lipidiques en se focalisant sur la régio-distribution des acides gras sur la position *sn-2*, en raison de la biodisponibilité accrue des acides gras estérifiés sur cette position.

4.1.2.3.1 Composition en acides gras des fractions lipidiques totales du saumon et du Krill

La composition en acides gras des fractions lipidique du CPLP a été présentée dans le Tableau 4:5. La composition de l'huile de Krill extraite de capsules molles de la marque Oémine Krill, achetées dans le commerce, est présentée dans le Tableau 4:6. La fraction phospholipidique du Krill (53,98%) est majoritaire par rapport à la fraction triglycéridique, mais reste légèrement inférieure à celle provenant du CPLP issu de têtes de saumon. La proportion en AGS domine pour les lipides neutres (41,10%) contrairement au saumon (27%), suivi des lipides totaux (38,53%) et enfin des glycolipides (34,37%). Dans cette dernière fraction, on retrouve la même proportion d'AGPI-LC (34,76%). Contrairement à ce que nous avons obtenu pour le saumon, les pourcentages en DHA sont faibles dans toutes les fractions lipidiques, avec un maximum de DHA retrouvé sur les phospholipides (15,84%).

Tableau 4:6 : Composition en acides gras des fractions lipidiques provenant de l'huile totale de Krill (Oémine Krill) (n=3)

Acides gras	LTK		PLK		LNK		GLK	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
C12	0,25	0,01	0,00	0,00	0,37	0,00	0,18	0,00
C14	12,05	0,02	2,16	0,00	16,36	0,01	8,35	0,00
Iso C15	0,23	0,00	0,07	0,00	0,30	0,00	0,21	0,01
Ante iso C15	0,08	0,00	0,02	0,00	0,16	0,00	0,09	0,00
C15	0,11	0,02	0,00	0,00	0,19	0,00	0,09	0,00
C15 : 1	0,38	0,04	0,27	0,00	0,47	0,00	0,42	0,02
Iso C16	0,10	0,00	0,07	0,00	0,12	0,00	0,12	0,00
C16	24,24	0,13	28,23	0,01	22,02	0,00	23,66	0,00
C16 : 1w7	0,56	0,00	0,43	0,00	0,60	0,00	0,60	0,00
C16 : 1w9	8,62	0,02	1,35	0,01	11,90	0,03	9,49	0,07
C16 : 2w6	0,33	0,00	0,16	0,00	0,40	0,00	0,34	0,02
C16 : 3w3	0,14	0,00	0,09	0,00	0,16	0,00	0,17	0,00
C16 : 4w3	0,61	0,00	0,10	0,00	0,82	0,00	0,56	0,01
C18	1,43	0,02	1,21	0,00	1,55	0,01	1,63	0,00
C18 :1w9	12,53	0,00	4,97	0,00	15,80	0,04	11,33	0,01
C18 : 1w7	6,38	0,14	4,80	0,00	7,14	0,01	6,15	0,00
C18 : 1w5	0,18	0,00	0,15	0,00	0,17	0,01	0,17	0,01
C18 : 2w6	2,49	0,12	1,45	0,00	2,67	0,01	2,37	0,00
C18 : 3w4	0,80	0,21	0,40	0,00	0,85	0,00	0,48	0,00

Résultats et discussion

Acides gras	LTK		PLK		LNK		GLK	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
C18 : 3w3	1,28	0,12	1,34	0,00	1,22	0,00	1,32	0,00
C20 : 1w9	2,86	0,01	2,10	0,00	3,20	0,00	2,56	0,00
C20 : 1w7	0,12	0,00	0,13	0,00	0,14	0,00	0,11	0,00
C20 : 2w6	0,57	0,06	1,14	0,00	0,34	0,07	1,56	0,00
C20 : 4w6	0,27	0,00	0,34	0,00	0,22	0,00	0,43	0,00
C20 : 3w3	0,24	0,00	0,38	0,00	0,18	0,00	0,25	0,00
C20 : 5w3 EPA	14,82	0,01	31,09	0,01	8,16	0,03	16,18	0,00
C21 : 5w3	0,05	0,04	0,19	0,04	0,03	0,00	1,17	0,00
C22 : 4w6	-	-	-	-	-	-	-	-
C22 : 5w6	0,40	0,01	0,79	0,00	0,25	0,00	0,30	0,04
C22 : 5w3	0,31	0,01	0,62	0,00	0,18	0,00	0,23	0,00
C22 : 6w3 DHA	7,43	0,06	15,83	0,03	3,90	0,02	9,36	0,01
AGS	38,52		31,79		41,09		34,36	
AGMI	31,65		14,22		39,46		30,87	
AGPI	29,81		53,98		19,44		34,76	

LTK : lipides totaux du Krill, PLK : phospholipides du Krill, LNK : lipides neutres du Krill, GLK : glycolipides du Krill ; AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés, ET : écart type. Les acides gras sont présentés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux.

Ce pourcentage reste très inférieur à la valeur retrouvée dans les phospholipides de saumon (36,58%). Il faut noter que l'huile de Krill contient plus d'EPA que l'huile de saumon dans toutes les fractions prise séparément. L'extraction d'huile du Krill totale par solvants organiques conduit à un pourcentage en DHA variant de 10 à 16% ; la teneur étant comprise entre 16 et 19% pour l'EPA (Martin, 2007). Dans notre étude, le pourcentage d'EPA pour le Krill varie entre 8,16% pour les lipides neutres et 31,10% pour les lipides polaires, alors que ces pourcentages varient de 6,97% pour les glycolipides à 10,54% pour les lipides totaux.

4.1.2.3.2 Composition en acides gras de la phosphatidylcholine et de la phosphatidyléthanolamine extraites à partir du CPLP de têtes de saumon et de l'huile totale de Krill

Les différentes classes de phospholipides ont été séparées par chromatographie sur couche mince avant d'être purifiées. Nous nous sommes intéressés aux deux espèces majoritaires représentées par la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine pour la fraction lipidique du CPLP et l'huile totale de Krill. Contrairement aux nombreux travaux effectués sur la régio-distribution des acides gras sur les triacylglycérols, peu d'études se sont intéressées aux phospholipides marins.

Le Tableau 4:7 montre la composition en acides gras de la PC et PE du CPLP de saumon comparé à l'huile totale de Krill. Les compositions en acides gras de la fraction PC des deux

Résultats et discussion

échantillons montrent que le saumon et le Krill sont riches en AGPI-LC, avec une proportion en AGS plus importante pour le Krill. La différence fondamentale entre ces deux sources d'AGPI-LC vectorisés par des lipides polaires réside dans la proportion de DHA plus élevée pour la PC de saumon (24,77%) comparé à la PC de Krill (12,87%). Inversement, la concentration en EPA de 29,76% pour la PC-Krill est beaucoup plus importante que pour la PC-saumon (8,12%). Le pourcentage en DHA au niveau de la PC-saumon est très proche de celui retrouvé dans le cadre d'une étude effectuée par Sautot *et al.*, (2011). Pour ce qui est de la fraction PE, les deux classes, PE-Krill et PE-saumon sont très différentes dans leurs compositions en acides gras. En effet, la PE-saumon contient 63,88% d'AGPI, ce qui est supérieur au pourcentage d'AGPI dans les deux PC et dans la PE-Krill (36,79%). Le pourcentage en DHA est plus élevé pour les PE par rapport aux PC, il atteint 37,83% pour la PE-saumon et 20,55% pour la PE-Krill.

Tableau 4:7 Composition en acides gras des deux classes lipidiques PC et PE de la fraction lipidique du CPLP et de l'huile de Krill (%) (n=3)

Acides gras	Saumon				Krill			
	PCS		PES		PCK		PEK	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
C12	-	-	-	-	0,82	0,01	1,05	0,03
C14	0,65	0,09	0,72	0,00	2,52	0,05	4,33	0,07
Iso C15	0,20	0,28	0,00	0,00	-	-	-	-
Ante iso C15	-	-	-	-	-	-	0,25	0,12
C15	0,90	1,13	0,10	0,00	-	-	-	-
C15 : 1	1,38	1,48	3,20	0,02	0,39	0,00	0,6	0,06
Iso C16	-	-	-	-	-	-	0,16	0,02
C16	8,17	6,12	11,78	0,03	29,48	0,29	38,79	0,08
C16 : 1w7	5,75	7,75	0,21	0,00	0,56	0,01	0,49	0,01
C16 : 1w9	2,83	2,45	1,38	0,01	1,33	0,03	0,86	0,05
C16 : 2w6	-	-	-	-	0,18	0,01	0,22	0,02
C16 : 3w3	1,06	1,19	3,05	0,07	-	-	-	-
C16 : 4w3	2,79	1,8	0,11	0,00	-	-	-	-
C18	15,54	1,43	4,91	0,02	1,53	0,08	2,55	0,00
C18 :1w9	8,67	1,00	9,11	0,08	5,69	0,12	3,53	0,08
C18 : 1w7	2,20	0,40	3,89	0,12	5,06	0,08	9,38	0,04
C18 : 1w5	-	-	-	-	0,13	0,03	0,24	0,00
C18 : 2w6	1,58	0,00	2,35	0,01	1,61	0,06	1,04	0,03
C18 : 3w4	1,04	0,04	1,55	0,05	0,55	0,11	0,43	0,04
C18 : 3w3	0,42	0,02	0,80	0,01	1,33	0,10	0,61	0,02
C20 : 1w9	0,03	0,04	0,09	0,00	2,22	0,12	0,32	0,03

Résultats et discussion

Acides gras	Saumon				Krill			
	PCS		PES		PCK		PEK	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
C20 : 1w7	0,47	0,21	0,67	0,01	-	-	0,61	0,11
C20 : 2w6	1,43	1,01	0,31	0,06	1,56	0,13	0,34	0,03
C20 : 4w6	7,88	0,42	3,23	0,00	0,32	0,08	0,42	0,00
C20 : 3w3	0,34	0,13	0,68	0,01	0,33	0,00	-	-
C20 : 5w3 EPA	8,11	0,57	9,22	0,07	29,76	0,42	12,22	0,14
C21 : 5w3	0,36	0,08	0,35	0,01	0,22	0,01	0,11	0,00
C22 : 4w6	0,07	0,00	0,14	0,00	-	-	-	-
C22 : 5w6	0,49	0,19	0,53	0,01	0,86	0,02	0,25	0,04
C22 : 5w3	2,74	0,14	3,67	0,00	0,57	0,09	0,56	0,00
C22 : 6w3 DHA	24,76	1,14	37,83	0,04	12,87	0,00	20,55	0,06
AGS	25,48		17,53		34,37		47,14	
AGMI	21,38		18,59		15,40		16,06	
AGPI	53,13		63,87		50,22		36,78	

PCS : phosphatidylcholine de saumon, PES : Phosphatidyléthanolamine de saumon, PCK : phosphatidylcholine de Krill, PEK : Phosphatidyléthanolamine de Krill, ET : écart type, AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés. Les acides gras sont présentés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux.

Les fortes proportions en AGPI-LC retrouvées sur les fractions phospholipidiques montrent l'importance de ces lipides polaires dans l'apport en AGPI et plus particulièrement en DHA et en EPA. Ces différences de répartition sur les lipides polaires du DHA et de l'EPA suggèrent un rôle différent de ces lipides au niveau du métabolisme cellulaire.

La répartition au niveau des phospholipides de thon Albacore a été conduite en 1996 par l'équipe du professeur Aubourg, montrant des concentrations élevées en AGPI-LC en position *sn*-2 sur les phospholipides avec 47,3% pour le DHA et 9,3% pour l'EPA (Aubourg *et al.*, 1996). Polvi *et al.*, ont identifié en (1991) la position des acides gras au niveau de la PC de saumon dans le but de suivre sa stabilité face au phénomène de congélation (Polvi *et al.*, 1991).

4.1.2.3.3 Répartition des acides gras pour la PC et la PE de la fraction lipidique du CPLP de saumon et de l'huile de Krill

4.1.2.3.3.1 Par méthode enzymatique

L'hydrolyse enzymatique de la liaison ester en position *sn*-2 par la phospholipase A₂ permet d'identifier la composition en acides gras des fractions PC et PE appartenant au Krill et au saumon. Les lysophospholipides ont également été récupérés, parallèlement aux acides gras libres, et analysés pour déterminer leur composition en acides gras. Ainsi les résultats de

cette étude (Tableau 4:8) montrent que, de manière générale, plus de 50% des AGPI sont positionnés en *sn-2* au niveau de la PC et de la PE de saumon. Les AGS sont d'autre part, préférentiellement positionnés en *sn-1* avec 53,49% dans la PC-saumon et 44,05% dans la PE-saumon. Nous retrouvons la quasi-totalité des acides gras qui nous intéressent, notamment l'EPA et le DHA, au niveau des deux classes PE et PC de saumon. Ces résultats sont partiellement en accord avec une étude effectuée par Al Sayed Mahmoud *et al.*, (2007) sur les œufs de saumon et de truite arc-en-ciel qui a montré que le DHA est majoritairement retrouvé estérifié en position *sn-2* sur la totalité des phospholipides. Le pourcentage d'EPA retrouvé en *sn-2* est respectivement de 21,62% et 12,64%, sur les phospholipides de saumon et de truite arc-en-ciel (Al Sayed Mahmoud, 2007). Une étude portant sur les phospholipides de thon, a montré que le DHA et l'EPA sont positionnés, respectivement à 43 et 10% en *sn-2* (Aubourg *et al.*, 1996).

Tableau 4:8 Composition en acides gras estérifiés sur la PC et la PE du CPLP de têtes de saumon (n=3)

Acides gras	PC Saumon				PE Saumon			
	<i>sn-1</i> PCS		<i>sn-2</i> PCS		<i>sn-1</i> PES		<i>sn-2</i> PES	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
C12	-	-	-	-	-	-	-	-
C14	2,37	0,08	1,28	0,08	2,11	0,04	0,94	0,03
Iso C15	0,18	0,01	0,13	0,00	0,13	0,00	0,04	0,00
Ante iso C15	-	-	-	-	-	-	-	-
C15	0,21	0,04	0,21	0,01	0,22	0,02	0,11	0,00
C15 : 1	0,37	0,27	0,20	0,05	0,10	0,00	0,10	0,02
Iso C16	-	-	-	-	-	-	-	-
C16	29,97	2,34	16,08	1,53	26,12	3,08	11,58	0,15
C16 : 1w7	0,20	0,02	0,30	0,03	0,26	0,02	0,20	0,01
C16 : 1w9	0,57	0,02	1,12	0,00	1,12	0,13	1,00	0,01
C16 : 2w6	-	-	-	-	-	-	-	-
C16 : 3w3	0,10	0,04	0,20	0,01	0,11	0,00	0,07	0,00
C16 : 4w3	0,93	0,03	3,88	0,50	0,41	0,03	0,04	0,00
C18	20,73	0,46	10,84	0,55	15,44	2,25	6,27	0,72
C18 :1w9	19,16	0,52	13,41	1,33	30,53	9,95	9,94	0,23
C18 : 1w7	1,16	0,03	1,25	0,02	1,93	0,15	2,87	0,04
C18 : 1w5	-	-	-	-	-	-	-	-
C18 : 2w6	3,44	0,29	3,19	0,24	8,73	0,02	1,86	0,14
C18 : 3w4	0,79	0,08	0,87	0,00	1,63	0,02	0,54	0,03
C18 : 3w3	0,67	0,06	0,79	0,00	2,92	0,03	0,42	0,00
C20 : 1w9	0,64	0,06	0,15	0,00	0,21	0,01	0,08	0,01
C20 : 1w7	0,50	0,41	0,35	0,03	0,40	0,01	0,37	0,02
C20 : 2w6	0,73	0,04	0,55	0,02	1,48	0,06	0,15	0,02

Résultats et discussion

Acides gras	PC Saumon				PE Saumon			
	sn-1 PCS		sn-2 PCS		sn-1 PES		sn-2 PES	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
C20 : 4w6	0,71	0,03	8,18	0,47	0,34	0,00	3,90	0,18
C20 : 3w3	0,10	0,02	0,27	0,03	0,24	0,01	0,36	0,02
C20 : 5w3 EPA	2,23	0,52	8,37	0,73	1,52	0,05	9,87	0,40
C21 : 5w3	7,44	0,34	0,37	0,00	0,90	0,00	0,10	0,00
C22 : 4w6	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00
C22 : 5w6	0,42	0,03	0,41	0,01	0,16	0,00	0,55	0,04
C22 : 5w3	0,69	0,09	3,01	0,03	0,39	0,01	3,43	0,18
C22 : 6w3 DHA	5,58	0,46	24,40	1,42	2,50	0,33	45,03	1,43
AGS	53,49		28,57		44,04		18,97	
AGMI	22,61		16,82		34,57		14,58	
AGPI	23,90		54,60		21,38		66,44	

PCS : phosphatidylcholine de saumon, PES : phosphatidyléthanolamine de saumon, sn-1 : acide gras en position sn-1 du glycérol, sn-2 : acide gras en position sn-2 du glycérol, ET : écart type, AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés. Les acides gras sont présentés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux.

Le Tableau 4:9 ci-dessous représente les résultats obtenus après hydrolyse enzymatique des fractions PC et PE provenant du Krill. La proportion d'acides gras saturés en position sn-2 est quasiment identique à celle estérifiée en sn-1, ce qui est très différent des résultats obtenus dans le cas du saumon. Cependant le pourcentage d'EPA et de DHA reste très important en position sn-2. Il est intéressant de comparer les pourcentages en EPA et DHA retrouvés en sn-2 dans les PC et PE du Krill, avec les PC et PE du saumon. En effet, le pourcentage de DHA dans le Krill est plus élevé dans la PE (16,32%) par rapport à la PC (11,94%). Ceci est également retrouvé dans le cas du saumon où le DHA atteint environ 45% dans la PE et 24% dans la PC.

Tableau 4:9 Composition en acides gras de la PC et de la PE de l'huile de Krill (n=3)

Acides gras	PC Krill				PE Krill			
	sn-1 PCK		sn-2 PCK		sn-1 PEK		sn-2 PEK	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
C12	0,22	0,01	0,41	0,03	0,63	0,16	0,33	0,05
C14	1,73	0,17	1,72	0,68	2,94	0,01	5,04	0,60
Iso C15	-	-	-	-	0,12	0,00	0,11	0,01
Ante iso C15	-	-	-	-	0,06	0,00	0,08	0,00
C15	0,20	0,08	0,30	0,09	0,65	0,69	0,38	0,27
C15 : 1	-	-	-	-	0,23	0,05	0,42	0,02
Iso C16	-	-	-	-	0,16	0,00	0,11	0,01
C16	20,53	2,45	26,04	2,31	19,97	3,34	33,38	3,68
C16 : 1w7	0,23	0,05	0,33	0,00	0,19	0,03	0,41	0,04
C16 : 1w9	1,40	0,09	0,34	0,05	1,67	0,74	6,11	1,02
C16 : 2w6	0,13	0,01	0,21	0,02	4,22	0,59	0,07	0,01

Résultats et discussion

Acides gras	PC Krill				PE Krill			
	sn-1 PCK		sn-2 PCK		sn-1 PEK		sn-2 PEK	
	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET	moyenne	ET
C16 : 3w3	-	-	-	-	0,06	0,04	0,14	0,00
C16 : 4w3	-	-	-	-	6,21	1,99	0,56	0,48
C18	11,44	1,75	7,85	1,18	9,74	1,23	7,00	1,43
C18 : 1w9	49,68	2,73	23,21	3,47	20,19	4,76	8,66	1,36
C18 : 1w7	5,95	0,4	3,94	0,50	1,92	0,78	2,50	0,34
C18 : 1w5	0,35	0,32	0,23	0,06	0,45	0,14	0,07	0,01
C18 : 2w6	2,25	0,39	12,66	1,99	6,01	0,34	3,18	0,88
C18 : 3w4	1,98	0,35	0,30	0,01	3,36	0,61	1,56	0,46
C18 : 3w3	0,28	0,00	0,51	0,10	3,33	0,46	2,28	0,18
C20 : 1w9	0,14	0,00	0,39	0,02	0,68	0,02	0,37	0,03
C20 : 1w7	-	-	-	-	1,07	0,04	1,10	0,31
C20 : 2w6	0,25	0,01	0,45	0,02	3,66	0,36	0,89	0,19
C20 : 4w6	0,15	0,03	0,41	0,06	1,71	0,73	0,24	0,00
C20 : 3w3	0,04	0,00	0,14	0,00	0,87	0,00	0,47	0,04
C20 : 5w3 EPA	1,18	0,00	7,87	1,13	2,63	0,05	6,94	1,08
C21 : 5w3	0,23	0,03	0,16	0,02	0,41	0,01	0,53	0,08
C22 : 4w6	-	-	-	-	-	-	-	-
C22 : 5w6	0	0	0,19	0,00	0,13	0,01	0,21	0,03
C22 : 5w3	0,16	0,00	0,32	0,03	1,11	0,08	0,41	0,01
C22 : 6w3 DHA	1,39	0,00	11,93	0,30	5,49	0,08	16,31	1,09
AGS	34,13		36,33		34,31		46,45	
AGMI	57,78		28,47		26,44		19,67	
AGPI	8,08		35,20		39,25		33,87	

PCK : phosphatidylcholine de Krill, PEK : phosphatidyléthanolamine de Krill, sn-1 : acide gras en position sn-1 du glycérol, sn-2 : acide gras en position sn-2 du glycérol, ET : écart type, AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras monoinsaturés, AGPI : acides gras polyinsaturés. Les acides gras sont présentés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux.

4.1.2.3.3.2 Détermination des espèces moléculaires par spectrométrie de masse

Les espèces moléculaires de la PC et de la PE ont été identifiées par HPLC couplée à la MS. La détection des espèces moléculaires s'effectue en mode négatif. Pour la PC, l'acide formique ajouté dans la phase mobile va se greffer à la molécule en formant ainsi l'adduit anionique [PC+formiate]⁻. Dans le mode d'acquisition MS, seules les classes lipidiques de type PC sont détectées grâce au formiate [M+45]⁻. Les masses les plus importantes en termes d'intensité sont fragmentées. Au niveau du mode d'acquisition MS², les complexes PC-Formiate perdent une m/z de 60 (groupement méthyle de la choline et le contre-ion formiate) (Figure 4:9), ce qui nous permet de confirmer qu'il s'agit bien de classes lipidiques de type PC.

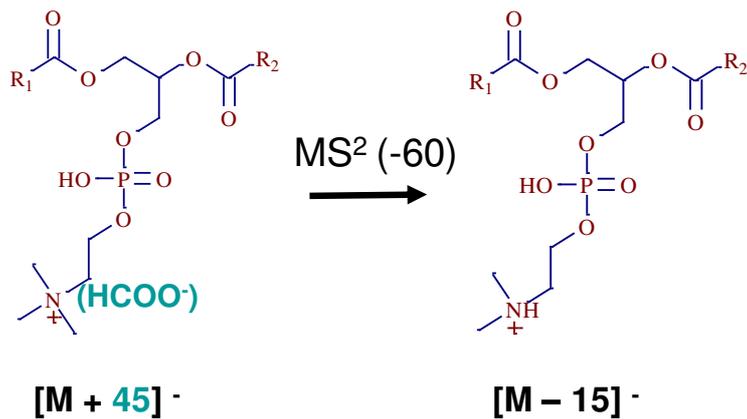


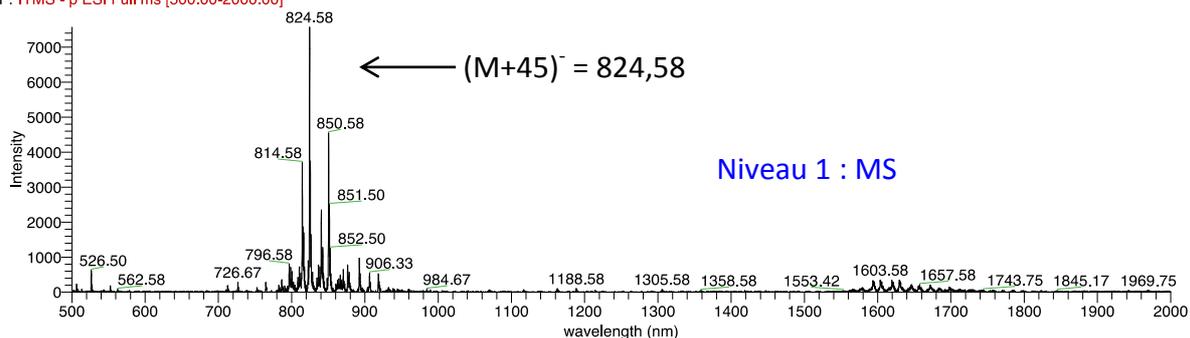
Figure 4:9 Identification de la phosphatidylcholine

Tous les ions passent au niveau d'acquisition MS^3 sous condition de perte d'une m/z de 60 ce qui permet de reconnaître les espèces moléculaires d'acides gras qui constituent chaque PC. Les fragments anioniques obtenus correspondent aux acides gras libres et aux Lyso-PC (Figure 4:10).

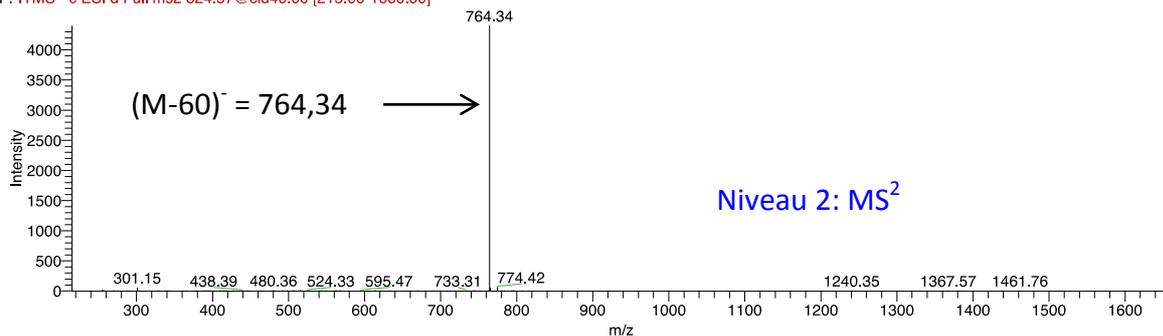
Les acides gras libres et les lyso-PC sont identifiés à partir d'une base de données établie préalablement, qui comporte les masses de tous les acides gras et des lyso-PC.

Résultats et discussion

Krill-PC-5gL-mode_profile-S2 #1154-1257 RT: 6.93-7.56 AV: 43 SB: 37 6.66-6.86 , 7.69-7.97 NL: 7.57E3
F: ITMS - p ESI Full ms [500.00-2000.00]



Krill-PC-5gL-mode_profile-S2 #1154-1258 RT: 6.94-7.45 AV: 4 SB: 1 6.66-6.86 , 7.69-7.97 NL: 4.39E3
F: ITMS - c ESI d Full ms2 824.57@cid40.00 [215.00-1660.00]



Krill-PC-5gL-mode_profile-S2 #1154-1258 RT: 6.94-7.46 AV: 3 SB: 1 6.66-6.86 , 7.69-7.97 NL: 2.26E2
F: ITMS - c ESI d Full ms3 824.47@cid40.00 764.32@cid40.00 [200.00-1540.00]

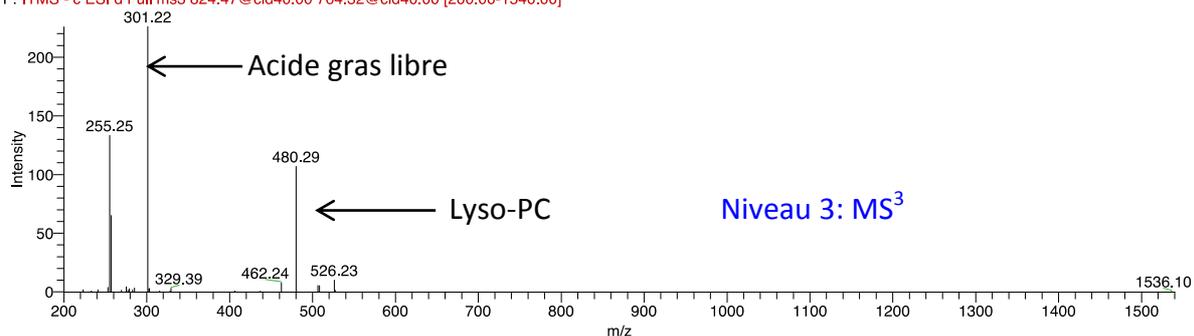


Figure 4:10 Récapitulatif des étapes d'identification de la PC

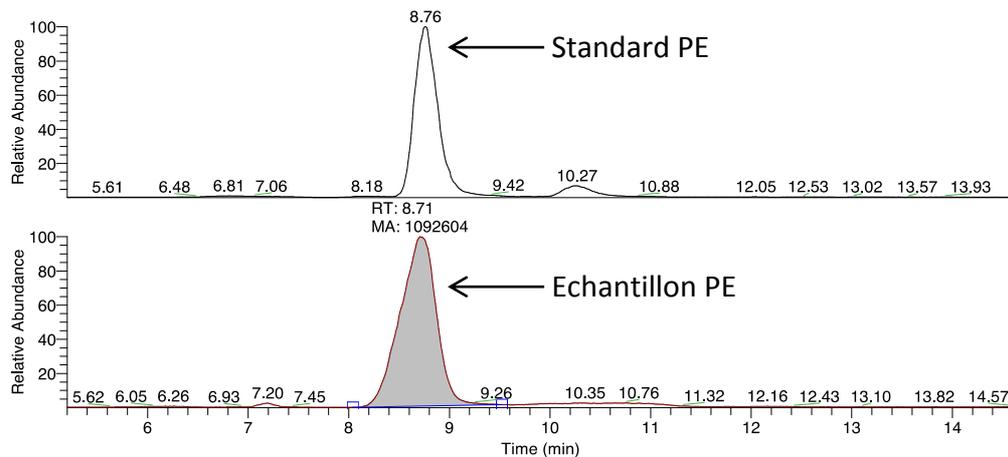
D'autre part, l'identification de la PE se base essentiellement sur les standards de PE. En effet, le temps de rétention des standards permet de déterminer le pic approprié à la PE puis le mode d'acquisition « MS full scan » permet de faire ressortir les différentes masses de PE existantes (Figure 4:11).

Résultats et discussion

Krill-PE-5gL-mode_profile-S2

11/4/2010 6:34:14 PM

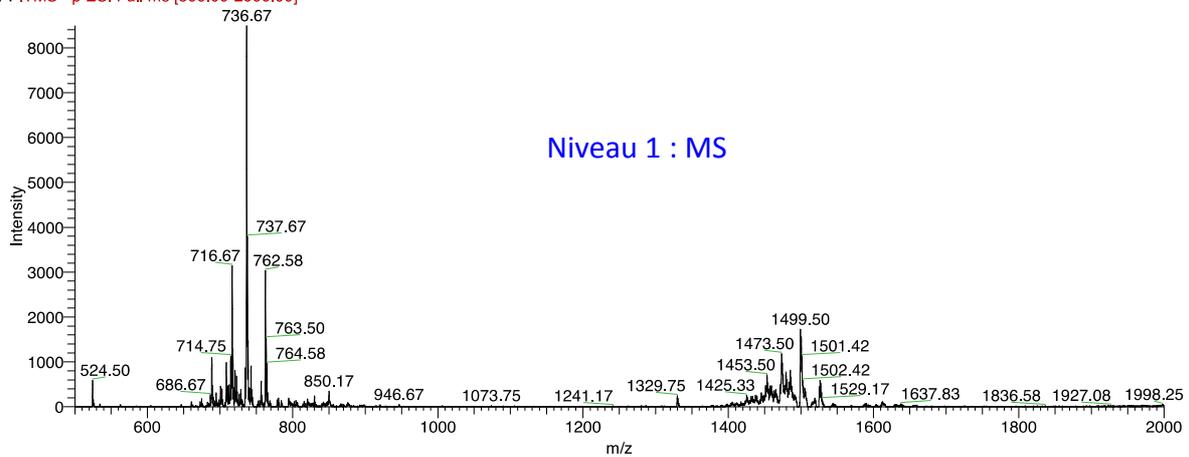
RT: 5.20 - 14.61 SM: 15B



NL: 7.72E4
m/z= 738.00-739.00 F:
ITMS - c ESI Full ms
[500.00-2000.00] MS
std-pe-5gl-s3

NL: 4.38E4
m/z= 716.00-717.00 F:
ITMS - p ESI Full ms
[500.00-2000.00] MS
Krill-PE-5gL-
mode_profile-S2

Krill-PE-5gL-mode_profile-S2 #1409-1561 RT: 8.23-9.05 AV: 76 SB: 56 7.91-8.21, 9.11-9.41 NL: 8.49E3
F: ITMS - p ESI Full ms [500.00-2000.00]



Krill-PE-5gL-mode_profile-S2 #1408-1561 RT: 8.48-8.83 AV: 2 NL: 5.70E3
F: ITMS - c ESI d Full ms2 716.51@cid40.00 [185.00-1445.00]

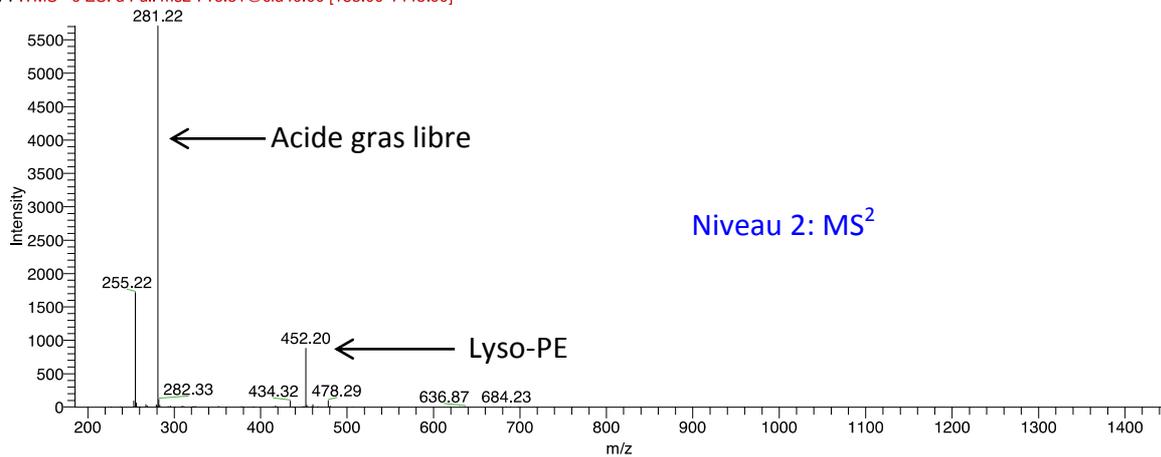


Figure 4:11 Etapes d'identification de la PE par LC-MS

La fragmentation des PE $[M-H]^-$ (Figure 4:12) donne naissance à des ions correspondant à des acides gras et des lyso-PE. Contrairement à l'identification de la PC, nous n'avons pas

d'étape de détermination de la classe PE. La reconnaissance de la PE passe exclusivement par l'identification des masses $[M-H]^-$ des fragments d'ions provenant de PE.

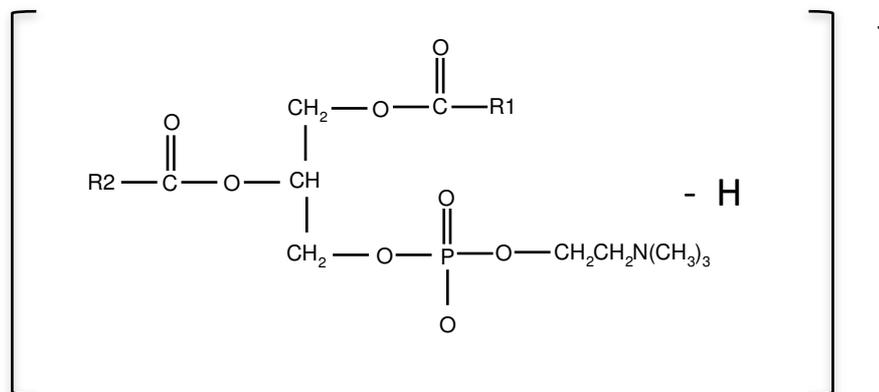


Figure 4:12 Identification de la PE

Les acides gras libres et les lyso-PE sont identifiés à partir d'une base de données établie préalablement, qui comporte les masses $[M-H]^-$ de tous les acides gras et des lyso-PE.

Les résultats obtenus des acides gras des PC et PE sont représentés dans le tableau suivant (Tableau 4:10). Concernant la PC de saumon, les espèces retrouvées sont comparées avec celles obtenus par Sautot *et al.*, (2011), qui mettent en évidence la présence de 20 espèces de PC. Dans notre échantillon, 5 espèces de PC-saumon sont identifiées avec des espèces majoritaires composées de PC-16:0 / 22:6 (19,18%) suivie de la PC-22:6 / 22:6 (14%) (Sautot *et al.*, 2011). Des études menées par Miller *et al.*, (2006) sur les phospholipides extraits de filet de saumon (*Salmo salar*), ainsi que par Winther *et al.*, (2011) sur la phosphatidylcholine de Krill mettent en évidence de nombreuses espèces moléculaires similaires à nos résultats. Les travaux de Winther *et al.*, (2011) ont mis en évidence la présence de 58 espèces moléculaires de PC de Krill dont certaines caractéristiques du plancton (Winther *et al.*, 2011). Miller *et al.*, (2006) ont détecté 12 espèces de PC et 13 espèces de PE pour le saumon (Miller *et al.*, 2006).

Résultats et discussion

Tableau 4:10 Espèces moléculaires des PC et PE provenant du saumon et du Krill (n=3)

Sources de phospholipides	Classe des phospholipides	masse	Espèces moléculaires	%	sn-2	sn-1
CPLP de saumon	PC	806,5	16:0 / 22:6	19,18	22:6	16:0
			18:1 / 20:5	6,81	18:1	20:5
		832,5	18:1 / 22:6	49	22:6	18:1
		852,5	20:5 / 22:6	11	22:6	20:5
		878,5	22:6 / 22:6	14	22:6	22:6
	PE	701,5	18:1 / 15:1	6	15:1	18:1
		715,5	16:1 / 18:1	2,7	16:1	18:1
			17:1 / 17:1	2,3	17:1	17:1
		717,5	18:1 / 16:0	6,5	16:0	18:1
		729,5	18:1 / 17:1	7	17:1	18:1
		737,5	20:5 / 16:0	10	20:5	16:0
		763,5	22:6 / 16:0	26,4	22:6	16:0
			18:1 / 20:5	15,04	20:5	18:1
		789,5	22:6 / 18:1	16	22:6	18:1
791,5		22:6 / 18:0	11,5	18:0	22:6	
Oemine Krill	PC	732,5	16:0 / 16:1	0,85	16:0	16:1
			14:0 / 18:1	0,65	14:0	18:1
		752,5	20:5 / 14:0	5	20:5	14:0
		754,5	16:0 / 18:4	4,5	16:0	18:4
		780,5	16:0 / 20:5	31	20:5	16:0
		792,5	15:0 / 22:6	2,62	22:6	15:0
			20:5 / 17:1	1,48	20:5	17:1
		806,5	16:0 / 22:6	12	22:6	16:0
			20:5 / 18:1	8,12	20:5	18:1
		818,5	17:1 / 22:6	3	22:6	17:1
		826,5	20:5 / 20:5	5	20:5	20:5
		832,5	18:1 / 22:6	5,5	22:6	18:1
	852,5	20:5 / 22:6	11	20:5	22:6	
	864,5	22:6 / 21:6	3,5	22:6	21:6	
	878,5	22:6 / 22:6	6	22:6	22:6	
	PE	689,5	18:1 / 14:0	0,88	14:0	18:1
			16:0 / 16:1	1,12	16:0	16:1
		717,5	18:1 / 16:0	6	16:0	18:1
737,5		20:5 / 16:0	20,5	20:5	16:0	
763,5		16:0 / 22:6	19,9	22:6	16:0	
		18:1 / 20:5	13,5	20:5	18:1	
775,5	22:6 / 17:1	8	22:6	17:1		
789,5	18:1 / 22:6	16	22:6	18:1		
835,5	22:6 / 22:6	7	22:6	22:6		
869,5	18:1 / 28:8	3	28:8	18:1		
889,5	28:8 / 20:5	4	28:8	20:5		

4.1.2.4 Suivi de l'oxydation de la partie lipidique du CPLP en fonction du temps et du mode de conservation

Cette étude nous a permis d'évaluer la résistance des lipides totaux du CPLP face à l'oxydation en comparaison avec l'huile de saumon (co-produit de l'extraction du CPLP). Les

conditions de stockage sont choisies de manière à accélérer le processus d'oxydation des échantillons sur 45 jours de stockage à 30°C. Les échantillons ont donc été stockés sous air et sous atmosphère inerte (azote). Le suivi de l'oxydation a été effectué par spectroscopie infrarouge en se basant sur l'évolution de la bande 3010 cm^{-1} qui correspond aux doubles liaisons éthyléniques (Guillen and Cabo, 2000) (Figure 4:13).

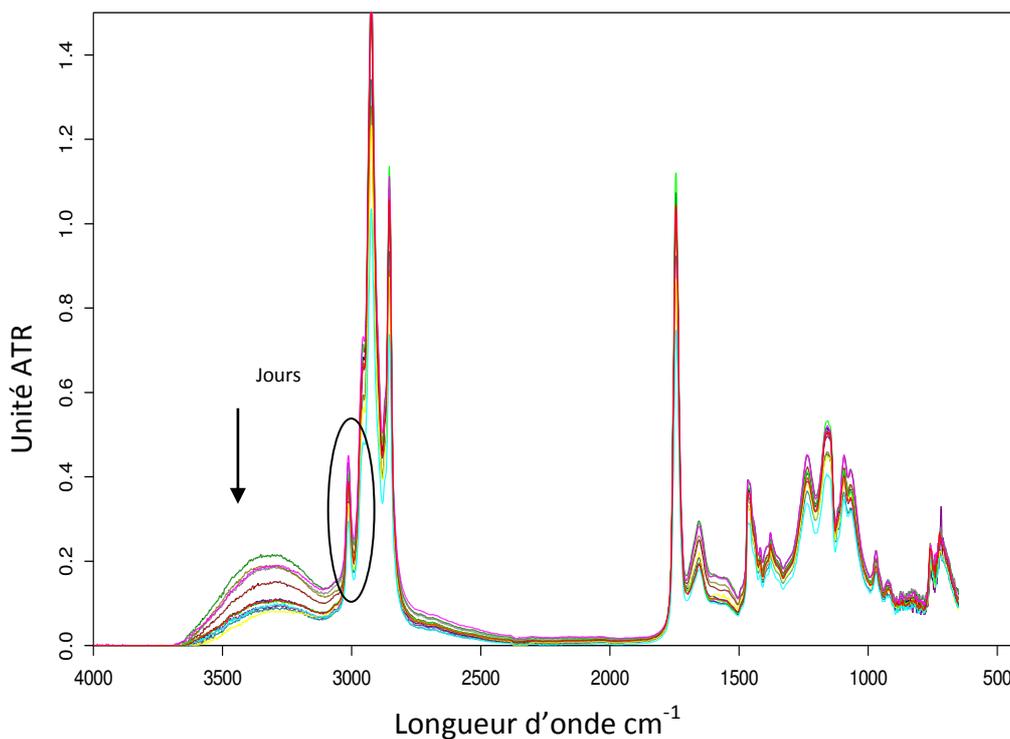


Figure 4:13 Evolution en fonction du temps des lipides totaux du CPLP par spectroscopie infrarouge (FTIR)

Les pics du spectre au niveau de 3010 cm^{-1} ont été présentés dans la Figure 4:14. Les résultats obtenus montrent que quelque soit le conditionnement, les lipides totaux sont plus stables face aux phénomènes d'oxydation en comparaison avec l'huile de saumon qui commence à se déstabiliser au bout de 30 jours de stockage sous air. D'autre part, l'huile de saumon reste également très stable sous azote. Il est très important de noter qu'il n'y a pas eu d'ajout d'antioxydant dans les échantillons testés et leur stabilité est due en partie à leurs antioxydants intrinsèques (tocophérol et astaxanthine). Ces résultats obtenus ont été confirmés par d'autres techniques permettant d'évaluer l'oxydation des lipides comme le dosage des diènes conjugués par spectrophotométrie et le calcul de l'indice de polyènes (EPA+DHA/C16) en fonction du temps (Belhaj *et al.*, 2010). Les résultats de cette étude

montrent une stabilité accrue des lipides totaux contenant des lipides polaires, naturellement riches en AGPI-LC.

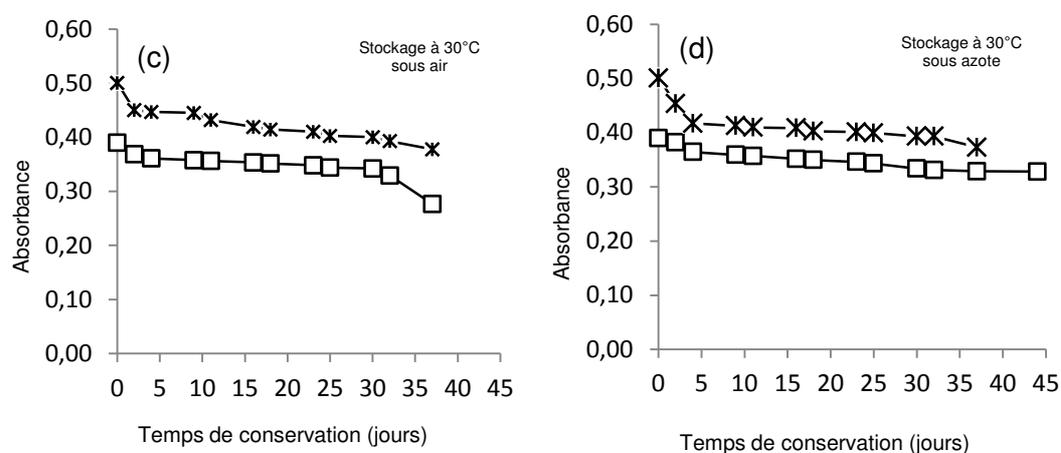


Figure 4:14 Suivi de l'évolution des doubles liaisons *cis* aux alentours de 3010 cm^{-1} des lipides totaux du CPLP (—x—) comparé à l'huile de saumon (—□—)

4.1.3 Caractérisation de la partie peptidique du CPLP

L'hydrolyse enzymatique des protéines des têtes de saumon permet l'obtention d'un hydrolysate peptidique avec des propriétés fonctionnelles intéressantes sur le plan industriel, notamment en ce qui concerne la solubilité (Chalamaiah *et al.*, 2010; Kristinsson and Rasco, 2000). Il est en effet intéressant de constater que la fraction d'hydrolysats peptidiques présente une solubilisation instantanée après étape de centrifugation permettant d'éliminer la fraction lipidique et le CPLP. L'hydrolysate protéique soluble obtenu comme co-produit de l'extraction du CPLP contient une grande quantité d'azote total de 11,86 g d'azote/100g de poudre. Des résultats similaires sur des hydrolysats de saumon ont été obtenus par Gbogouri *et al.*, (2006). Le CPLP contient une fraction protéique plus dense liée fortement à une fraction lipidique composée principalement de lipides polaires.

4.1.3.1 Composition physicochimique des hydrolysats protéiques du CPLP

Le CPLP contient une teneur en azote totale de 13,1 g d'azote/100 g et 3,5 % d'azote non protéique (précipité au TCA à 15%). Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par Gbogouri (2005) qui a retrouvé une teneur équivalente de 82,3% en protéines (x 6,25) dans l'hydrolysate de têtes de saumon (Gbogouri, 2005). Le CPLP solubilisé dans de l'eau, conduit à une teneur en protéines solubles de 32,33% en raison de son degré d'hydrolyse peu élevé (DH < 12%) (Tableau:4:11).

Tableau:4:11 Teneur en azote total de l'hydrolysate peptidique et du CPLP obtenus après hydrolyse enzymatique des têtes de saumon

	g de NT/100g de poudre		équivalent protéique (%)	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET
Azote total CPLP	13,10	0,18	81,88	1,31
Azote non protéique précipité au TCA à 15%	3,50	0,06	-	-
Azote total (partie soluble dans l'eau distillée)	5,17	0,12	32,33	0,87
Azote total de l'hydrolysate protéique soluble (co-produit)	11,86	0,24	-	-

NT : azote total

Dans le but de déterminer la granulométrie de la fraction « lourde » du CPLP, nous avons analysé la distribution de taille des particules solubilisées dans l'eau distillée à 0,5%. Sur 12 répétitions, nous avons obtenu une distribution de taille variant de 16 à 59 µm avec une taille moyenne de 90 µm (Figure 4:15).

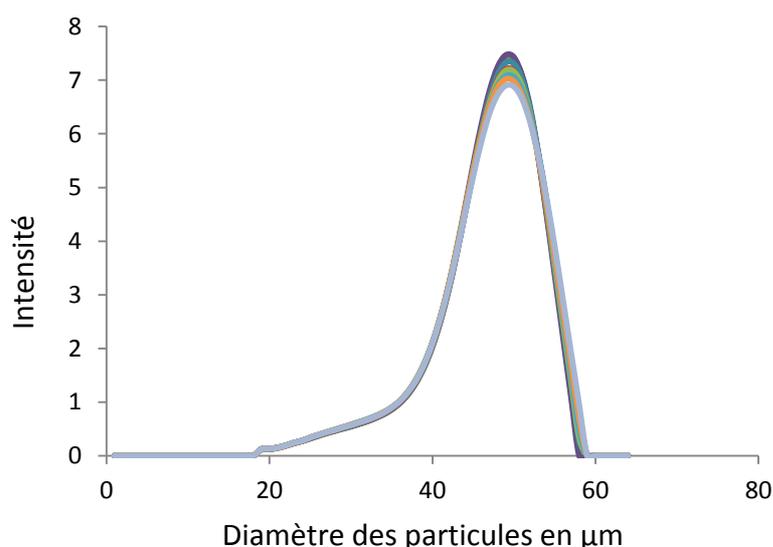


Figure 4:15 Distribution de taille des particules de CPLP solubilisé dans l'eau distillée

4.1.3.2 Détermination de la taille des peptides en SDS-PAGE

Nous nous sommes ensuite intéressés à la détermination, par SDS-PAGE, de la taille des peptides solubles issus de l'hydrolyse peptidique (CPLP) solubilisé dans l'eau distillée à 0,5%, puis centrifugé. Des marqueurs de taille variant de 7 à 175 kDa ont été utilisés pour identifier la taille des peptides solubles. Les résultats obtenus (Tableau 4:15) montrent que la majorité des peptides de la partie soluble ont une taille inférieure à 7 kDa.

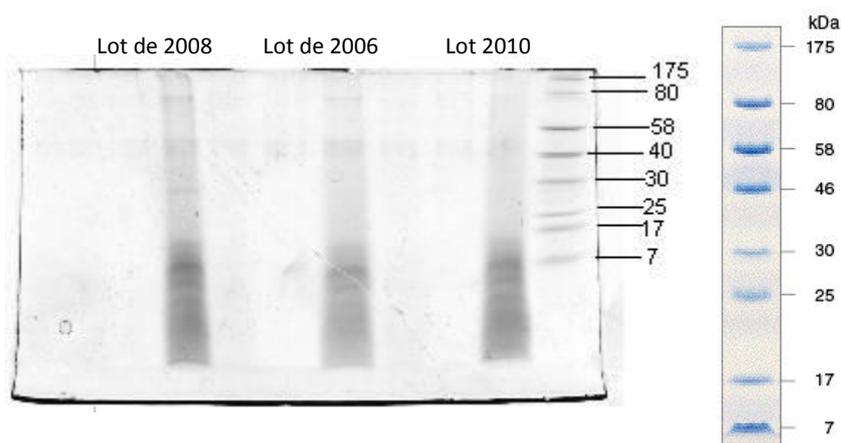


Figure 4:16 : Photo du gel d'électrophorèse obtenu

4.1.3.3 Identification des acides aminés

Les compositions en acides aminés des protéines du CPLP total, du CPLP soluble à 0,5% dans l'eau distillée, du culot obtenu après centrifugation du CPLP solubilisé et de l'hydrolysats soluble (co-produit de l'hydrolyse enzymatique) sont présentées dans le Tableau 4:12.

Tableau 4:12 Composition en acides aminés de différentes fractions peptidiques provenant de l'hydrolyse enzymatique des têtes de saumon

Acides aminés	CPLP total		Hydrolysats co-produit		CPLP soluble		CPLP culot	
	nmole/mg	%	nmole/mg	%	nmole/mg	%	nmole/mg	%
ASN	606,49	11,44	341,44	8,5	656,52	11,41	197,02	13,22
GLU	713,83	13,47	418,17	10,41	782,82	13,6	185,69	12,46
SER	290,26	5,48	152,63	3,8	286,47	4,98	89,75	6,02
GLY	822,5	15,52	747,58	18,6	1156,45	20,09	154,8	10,39
HIS	nq	nq	22,93	0,57	nq	nq	nq	nq
ARG	369,15	6,96	243,9	6,07	382,04	6,64	94,84	6,36
THR	324,2	6,12	260,78	6,49	343,31	5,97	94,6	6,35
ALA	578,68	10,92	427,64	10,64	620,02	10,77	117,13	7,86
PRO	367,39	6,93	295,16	7,35	498,99	8,67	68,8	4,62
TYR	92,43	1,74	80,95	2,01	64,45	1,12	44,02	2,95
VAL	175,77	3,32	167,62	4,17	147,45	2,56	78,29	5,25
MET	106,07	2	124,4	3,1	89,07	1,55	45,44	3,05
ILE	162,29	3,06	238,42	5,93	188,44	3,27	88,23	5,92
LEU	280,66	5,29	188,79	4,7	228,21	3,97	102,32	6,86
PHE	144,35	2,72	109,29	2,72	99,99	1,74	61,34	4,12
LYS	266,45	5,03	198,77	4,95	210,9	3,66	68,26	4,58

nq : non quantifiable

Les quatre fractions d'hydrolysats issus du procédé enzymatique présentent approximativement la même composition en acides aminés, à l'exception de l'hydrolysat (co-produit) qui contient de l'histidine, en plus des autres acides aminés. La comparaison des acides aminés obtenus correspond à la composition classique des hydrolysats de saumon. En effet, une étude effectuée par Pei et ses collaborateurs (2010) sur des peptides isolés à partir du saumon kéta (*Oncorhynchus keta*), a montré que sa composition en acides aminés est très proche de celle du CPLP (Pei *et al.*, 2010). Le saumon kéta comporte en plus du CPLP de l'acide aspartique et de l'hydroxyproline. Les propriétés des peptides marins dépendent essentiellement de leur composition en acides aminés. Comme indiqué dans la partie bibliographique, certains acides aminés comme l'arginine, la proline, l'histidine, la tyrosine et la lysine présentent une activité antioxydante dont les mécanismes d'action restent peu connus (Kawashima *et al.*, 1979). Le Tableau:4:13 présente les hydrolysats peptidiques issus de deux productions différentes, une production récente de 2011 et une production antérieure de 2006 effectuée pendant l'optimisation de la réaction d'hydrolyse enzymatique de têtes de saumon. Cette comparaison met en évidence le fait que la composition en acides aminés est très proche en termes de pourcentages. Toutefois, nous retrouvons en faible concentration, en plus des acides aminés communs, la cystéine et le tryptophane dans l'hydrolyse des têtes de saumon de 2006.

Tableau:4:13 Comparaison de la composition en acides aminés de l'hydrolysat soluble de tête de saumon (co-produit) avec celui de Gbogouri (2006)

Acides aminés	Hydrolysat (co-produit) 2011		Hydrolysat (co-produit) 2006	
	nmole/mg	%	nmole/mg	%
ASX	341,44	8,5	838	14,56
GLX	418,17	10,41	790,6	13,74
SER	152,63	3,8	287,8	5
GLY	747,58	18,6	848,6	14,75
HIS	22,93	0,57	127	2,21
ARG	243,9	6,07	299,6	5,21
THR	260,78	6,49	253,3	4,4
ALA	427,64	10,64	553,1	9,61
PRO	295,16	7,35	257,5	4,47
TYR	80,95	2,01	146,8	2,55
VAL	167,62	4,17	258,8	4,5
MET	124,4	3,1	118,7	2,06
CYS	nq	nq	68,6	1,19

Résultats et discussion

Acides aminés	Hydrolysats (co-produit) 2011		Hydrolysats (co-produit) 2006	
	ILE	238,42	5,93	191,6
LEU	188,79	4,7	363,6	6,32
PHE	109,29	2,72	171	2,97
LYS	198,77	4,95	178	3,09
TRP	nq	nq	1,7	0,03

nq : non quantifiable

4.1.3.4 Protéomique

L'étude de la protéomique d'un matériel biologique permet, non seulement de suivre le développement au niveau moléculaire des espèces étudiées, mais aussi de mieux comprendre les mécanismes d'action des médicaments employés dans le traitement des maladies actuelles et répandues comme le cancer et les maladies neurodégénératives (Forné *et al.*, 2010). Dans le but d'identifier les séquences peptidiques porteuses d'une éventuelle activité physiologique dans l'hydrolysats de saumon, deux analyses ont été effectuées. Une analyse qualitative consistant en une première injection de 10 µL (1,5 mg/mL) d'hydrolysats peptidique en spectrométrie de masse LTQ-Orbitrap, nous a permis de faire un screening des peptides entre 100-10000 m/z. La distribution qualitative des peptides en fonction de leurs masses analysées par le logiciel Peaks 5.3, nous a révélé la présence de 15998 peptides avec une masse moyenne de 1139 Da. Cependant, le nombre de peptides retrouvés est très élevé et empêche l'aboutissement de l'analyse par les logiciels de détection. L'analyse des spectres a été effectuée par le module De novo du logiciel Peaks.

Une deuxième analyse de l'hydrolysats est effectuée dans les mêmes conditions de volume et de concentration d'hydrolysats injecté. Cependant l'intervalle de la masse/charge est fixé entre 350 et 10000. Cette analyse permet donc de détecter 6991 composés. L'identification de protéines, à l'origine de ces peptides détectés, est réalisée dans un premier temps à l'aide du moteur de recherche Mascot contre la base de données NCBIInr_Chordata (NCBIInr 326, 01/06/2011, chordata = 1377435 seq). Le score d'une protéine représente le seuil de significativité établi pour qu'une protéine soit retenue et par conséquent identifiée. La moyenne des scores de degré de confiance pour chaque acide aminé proposé permet de filtrer les peptides présentant un score inférieur à la limite fixée. Ainsi, une protéine est identifiée si elle possède au moins un peptide dont le score est supérieur au seuil de

Résultats et discussion

signification (score >59, p<0.04). Une analyse du taux de faux positif est réalisée en parallèle (FDR, False Discovery Rate). Ainsi, ces critères d'identification assurent la pertinence des résultats obtenus. Les résultats de l'identification des protéines sont récapitulés dans le Tableau 4:14 ci-dessous, qui présente 27 protéines natives reconnues dans le CPLP et par conséquent dans la tête de saumon.

Tableau 4:14 Récapitulatif de l'ensemble des protéines identifiées dans NCBIInr_Chordata avec le moteur de recherche Mascot

Groupe de protéines	Description	Score (%)	Masse
1	collagen 1a1 [Oncorhynchus mykiss]	516	137032
2	collagen a3 (I) [Oncorhynchus mykiss]	144	137672
3	myosin regulatory light chain 2 [Salmo salar]	130	18983
4	type I collagen alpha 2 chain [Oncorhynchus keta]	123	125883
5	collagen alpha-2 (I) chain precursor [Oncorhynchus mykiss]	123	126908
6	actin, alpha cardiac muscle 1 [Xenopus laevis]	116	41989
7	RecName: Full=Actin, cytoplasmic	116	41678
8	type I collagen alpha 2 chain [Oncorhynchus keta]	114	126367
9	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase [Oncorhynchus mykiss]	107	36251
10	PREDICTED: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1-like isoform 1 [Ailuropoda melanoleuca]	100	109950
11	collagen 1a [Salmo salar]	96	34995
12	PREDICTED: POTE ankyrin domain family member I isoform 1 [Pan troglodytes]	95	121142
13	sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1A [Makaira nigricans]	95	108710
14	PREDICTED: similar to calcium-transporting ATPase [Monodelphis domestica]	95	116130
15	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 [Xenopus laevis]	91	109403
16	myosin heavy chain [Oncorhynchus keta]	83	222016
17	myosin, heavy polypeptide 2, fast muscle specific [Danio rerio]	83	221742
18	myosin heavy chain fast skeletal type 3 [Hypophthalmichthys molitrix]	81	221713
19	fast skeletal myosin heavy chain isoform mMYH-11 [Oryzias latipes]	81	221614
20	sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase Mt-SERCA2 [Molgula tectiformis]	76	109966
21	glycogen phosphorylase, muscle form [Salmo salar]	74	97423
22	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Dicentrarchus labrax]	72	35870
23	enolase 3-2 [Salmo salar]	72	47257
24	myosin light chain 1-1 [Salmo salar]	67	20988
25	Troponin C, skeletal muscle [Salmo salar]	66	18227
26	RecName: Full=Collagen alpha-2 (I) chain	65	127567
27	Nucleoside diphosphate kinase A [Salmo salar]	60	17081

PREDICTED : Similaire à la protéine identifiée ; cependant la détection de la masse de cette protéine prouve bien son existence dans le CPLP

Généralement, un certain nombre de protéines homologues sont susceptibles de partager les mêmes peptides identifiés. Ces protéines redondantes sont automatiquement

regroupées et ne sont donc pas initialement affichées dans le tableau de résultats. Les protéines au sein d'un groupe sont classées en fonction de leur score puis en fonction de leur couverture de séquence par celles des peptides identifiés. La protéine en tête d'un groupe devient la protéine référence (master protein) et est affichée par défaut dans le tableau de résultats. La taxonomie reliée à la protéine identifiée ne correspond pas forcément au saumon (*Salmo salar*) mais à d'autres espèces contenant une protéine homologue avec une légère différence. D'autre part, les résultats obtenus sont également analysés par deux modules différents du logiciel Peaks Studio ; Peaks DB et inChorus 3.5. Le tableau de résultats d'identification effectué par le module Peaks DB n'est pas présenté car il faudra retenir l'analyse InChorus (ci-après) qui combine avantageusement les résultats d'identification de Peaks DB et de Mascot. En effet, InChorus utilise un modèle probabiliste afin de combiner les résultats d'identification de peptides de plusieurs moteurs de recherche, en l'occurrence dans cette analyse : Mascot 2.2.07 et Peaks DB. Les résultats de cette analyse combinée sont représentés dans le Tableau 4:15 retrouvé ci-dessous.

Tableau 4:15 Récapitulatif de l'ensemble des protéines identifiées dans NCBIInr_Chordata avec le module InChorus combinant les moteurs de recherche Peaks DB et Mascot

Groupe de protéines	Description	Score (%)	Masse
1	Collagen 1a1 [Oncorhynchus mykiss]	99,21	137117
2	Fast myotomal muscle actin [Salmo salar]	99,17	41932
3	Collagen alpha-2(I) chain precursor [Oncorhynchus mykiss]	99,14	126985
4	Type I collagen alpha 2 chain [Oncorhynchus keta]	99,13	126443
5	Myosin heavy chain [Oncorhynchus keta]	99,05	222153
6	Creatine kinase-2 [Salmo salar]	98,87	39470
7	Collagen a 3(I) [Oncorhynchus mykiss]	98,84	137758
8	Collagen 1a [Salmo salar]	98,69	35016
9	PREDICTED: sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1-like isoform 2 [Ailuropoda melanoleuca]	98,47	109208
10	Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase [Oncorhynchus mykiss]	97,89	7035481
11	Myosin regulatory light chain 2 [Salmo salar]	97,79	18996
12	Glycogen phosphorylase, muscle form [Salmo salar]	97,67	97485
13	Nucleoside diphosphate kinase A [Salmo salar]	84,25	17092
14	Troponin C, skeletal muscle [Salmo salar]	81,75	18239
15	Enolase 3-1 [Salmo salar]	81,6	47246
16	Hemoglobin subunit beta [Salmo salar]	70,85	16124
17	Parvalbumin beta-1 [Salmo salar]	66,48	11901
18	Unnamed protein product [Oikopleura dioica]	65,23	140061
19	Histone cluster 2, H2ab [Danio rerio]	59,52	13631
20	Hemoglobin subunit beta-1 [Salmo salar]	61,73	16016

Résultats et discussion

Groupe de protéines	Description	Score (%)	Masse
21	Unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	61,63	351956
22	Adenylate kinase [Salmo salar]	61,61	21288
23	Myosin, light polypeptide 3-1 [Salmo salar]	58,05	21001
24	Alpha-globin [Salmo salar]	55,94	15142
25	Collagen type I alpha 3 chain [Dicentrarchus labrax]	51,66	137004
26	L-lactate dehydrogenase A chain [Salmo salar]	50,9	36327

4.2 Effet des fractions lipidique et peptidique du CPLP sur l'anxiété et le stress oxydant

4.2.1 Suivi pondéral des souris en fonction du régime administré

Durant la période de traitement, les souris ont été pesées à J0, J4, J8 et J12 dans le but de suivre l'effet des produits administrés (lipides totaux du CPLP, hydrolysate du CPLP et du complexe total), à deux doses différentes, sur le poids des animaux. La distribution des données relatives au poids des animaux est non paramétrique, ce qui nous amène à utiliser le test de Kruskal Wallis pour analyser les données. Le test de Mann-Withney est ensuite utilisé pour comparer, deux à deux, les différents groupes.

Dose 1 : Le test de Kruskal Wallis révèle qu'aucun traitement n'affecte le poids des souris à J0, J4, J8 et J12 comparé aux contrôles (Tableau 4:16).

Tableau 4:16 Médianes et interquartiles relatifs au suivi pondéral des souris traitées et des souris contrôles (n=10) pendant 14 jours de traitement avec la dose 1

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysate	Lipides	Complexe
Poids J0 (g)	36,9 (35,3 – 38,4)	37,1 (36,0 – 38,2)	37,6 (35,8 – 39,2)	37,1 (36,0 – 39,0)
Poids J4 (g)	38,6 (37,0 – 39,3)	38,3 (37,3 – 39,4)	39,1 (37,5 – 39,6)	39,3 (37,6 – 40,7)
Poids J8 (g)	39,1 (38,2 – 40,1)	38,9 (38,4 – 39,6)	39,4 (37,7 – 41,3)	39,5 (39,0 – 41,0)
Poids J12 (g)	39,1 (38,1 – 39,8)	39,1 (38,4 – 40,2)	39,7 (38,5 – 40,7)	39,8 (38,2 – 41,7)

Dose 2 : Le test de Kruskal Wallis effectué a montré que les traitements ont un effet significatif à J0 ($H = 8,666$; $p = 0,0341$) et à J4 ($H = 11,926$; $p = 0,0076$), à l'inverse de J8 ($H = 5,289$ et $p = 0,1512$), et J12 ($H = 4,076$; $p = 0,2533$). Quelque soit le produit administré, le

test de Mann-Whitney réalisé à *posteriori* ne montre pas d'effet significatif à J0. Cependant, à J4, le test de Mann-Whitney permet, de mettre en évidence le fait que l'hydrolysate et les lipides aient un effet de retardement de la prise de poids des souris jusqu'à J4 (Tableau 4:17). Dans la littérature, l'hydrolysate peptidique présente un effet de satiété qui peut expliquer le retardement de la prise de poids (Greenough *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'effet de retardement de la prise de poids dans le cas du régime lipidique reste non expliqué.

Tableau 4:17 Médianes et interquartiles relatifs au suivi pondéral des souris traitées et des souris contrôles (n=10) pendant 14 jours de traitement avec la dose 2

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysate	Lipides	Complexe
Poids J0 (g)	38,7 (37,0 – 40,3)	37,5 (36,1 – 38,9)	37,8 (37,2 – 39,6)	39,8 (40,0 – 42,5)
Poids J4 (g)	40,9 (39,7 – 42,1)	37,55 ** (36,7 – 38,9)	37,7 * (36,7 – 39,6)	39,8 (39,3 – 41,)
Poids J8 (g)	40,6 (39,5 – 42,3)	38,6 (36 – 40,5)	38,7 (38,0 - 41,2)	40,2 (39,1 – 40,7)
Poids J12 (g)	40,5 (39,5 – 42,0)	39,9 (39,1 – 40,4)	39,2 (38,2 – 41,5)	41,3 (40,0 - 42,1)

4.2.2 Etude comportementale : Evaluation de l'effet des traitements sur l'anxiété.

4.2.2.1 Evolution des variables permettant de détecter un effet anxiolytique

L'effet anxiolytique-like d'un produit est mis en évidence par l'évaluation de variables qui permettent de discriminer l'anxiété dans des tests comportementaux. Les tableaux ci-dessous, présentent les variables que nous avons utilisées ainsi que leur évolution dans le cas d'une diminution de l'anxiété. Afin de valider les différents tests, un groupe de souris (n=8) a été traité avec un anxiolytique de référence, le diazépam (1,5 mg/kg per os) (Tableau 4:18 et Tableau 4:19).

Tableau 4:18 Evolution des variables liées à la diminution de l'anxiété

		Latence	Tentatives	% Entrées	% Temps cumulé
Labyrinthe en croix	L'anxiété diminue quand...	Diminution	Diminution	Augmentation	Augmentation
Chambre claire-obscur	L'anxiété diminue quand...	Diminution	Diminution	Augmentation	Augmentation

Latence : temps en seconde au bout duquel la souris entre pour la première fois dans un bras ouvert ; *Tentatives* : nombre de tentatives d'entrée de la souris dans les zones anxiogènes ; *% Entrées* : pourcentage du nombre d'entrées effectuées par la souris dans les zones anxiogènes ; *% Temps cumulé* : pourcentage des temps cumulés durant lesquels la souris se trouve dans les zones anxiogènes ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Tableau 4:19 Evolution des variables liées à la diminution de l'anxiété

Planche à trous	Temps cumulé dans la zone périphérique (ZP)	Temps cumulé dans la zone médium	Nombre de trous explorés
L'anxiété diminue quand...	Augmentation	Diminution au profit de ZP	Augmentation

4.2.2.2 Tests comportementaux

4.2.2.2.1 Dose aiguë à J0

4.2.2.2.1.1 Labyrinthe en croix surélevé

En plus des quatre variables utilisées dans l'étude de l'anxiété (Tableau 1:3), le nombre d'entrées dans les bras fermés (BF) est également noté comme indicateur indirect de l'activité locomotrice.

Dose 1 : Une ANOVA à 1 facteur réalisée pour traiter les résultats obtenus, révèle un effet significatif des traitements sur le temps de latence, les tentatives et le temps cumulé passé sur les bras ouverts (BO). Le test à *posteriori* de Fischer est, par conséquent, réalisé et révèle que les lipides ($p = 0,0292$) ont un effet mais, peu significatif sur le nombre de tentatives d'entrée de la souris dans les BO (Tableau 4:20).

Tableau 4:20 Moyenne et écart à la moyenne des variables évaluant l'anxiété grâce au test du labyrinthe en croix chez des souris traitées et sur le groupe contrôle (n=10) par la dose 1 à J0

Variables	Groupes				
	Contrôle	Hydrolysate	Lipides	Complexe	Diazépam
Latence (s)	135,9 ± 18,8	118,5 ± 18,1	140 ± 19,3	121,9 ± 20,6	60,1 ± 6,4 **
Tentatives	6,9 ± 1,2	4,8 ± 1,1	3,9 ± 0,8 *	5,5 ± 0,9	0,5 ± 0,2 ***
Entrées BF	7,6 ± 0,7	7,1 ± 0,7	6,7 ± 1,3	8,3 ± 0,9	9,9 ± 0,9
% Entrées BO	10,7 ± 5,6	18,2 ± 6,0	16,0 ± 5,8	16,1 ± 4,3	27,0 ± 1,2
% Temps cumulé BO	6,7 ± 4,7	13,6 ± 4,9	9,3 ± 4,2	10,9 ± 3,4	29,1 ± 5,7 **

Latence : temps en seconde au bout duquel la souris entre pour la première fois dans un bras ouvert ; *Tentatives* : nombre de tentatives d'entrée dans les bras ouverts effectuées par la souris ; *Entrées BF* : nombre de fois que la souris entre dans un bras fermé ; *% Entrées BO* : pourcentage du nombre d'entrées effectuées par la souris dans les bras ouverts par rapport aux nombres d'entrées dans les bras fermés ; *% Temps cumulé BO* : pourcentage des temps cumulés durant lesquels la souris se trouve dans les bras ouverts par rapport au temps passé dans les bras fermés ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Nous pouvons donc conclure qu'une dose unique de CPLP (dose 1) ne diminue pas significativement l'anxiété chez les souris quelque soit le traitement administré.

Dose 2 : L'ANOVA à 1 facteur révèle que les traitements ont un effet significatif sur le temps de latence, sur les tentatives, sur le pourcentage d'entrées dans les BO et sur le pourcentage de temps cumulé passé dans les BO. Ces résultats nous ont permis d'effectuer le test à *posteriori* de Fischer qui révèle d'une part que l'hydrolysate réduit significativement le temps de latence des animaux ($p = 0,0093$) suivi en deuxième position par les lipides totaux du CPLP ($p = 0,0479$). De plus, l'hydrolysate et le complexe réduisent significativement le nombre de tentatives d'entrée dans les bras ouvert (respectivement $p = 0,0025$; $p = 0,0057$), alors qu'avec l'hydrolysate, les lipides augmentent significativement le pourcentage d'entrées dans les BO (respectivement $p = 0,0046$; $p = 0,0060$), et le pourcentage de temps cumulé passé dans les BO (respectivement $p = 0,0477$; $p = 0,0322$). Il est également à noter qu'aucun des traitements ne présente un effet significatif sur le nombre d'entrées dans les BF.

Le Tableau 4:21 suivant récapitule la moyenne et l'écart standard à la moyenne des variables citées ci-dessus et la significativité des résultats. Pour tous les groupes nous avons utilisé un effectif de $n=10$ sauf pour le diazépam ($n = 8$).

Tableau 4:21 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l’anxiété par le test du labyrinthe en croix à la dose 2 à J0

Variables	Groupes				
	Contrôle	Hydrolysats	Lipides	Complexe	Diazépam
Latence (s)	156,1 ± 13,3	94,3 ± 17,0 **	109,9 ± 19,1 *	135,9 ± 19,8	44,6 ± 3,6 ***
Tentatives	13,3 ± 1,3	8,0 ± 0,8 **	10,1 ± 1,1	8,5 ± 1,6 **	1,4 ± 0,6 ***
Entrées BF	5,2 ± 0,8	5,6 ± 0,7	7,1 ± 0,8	5,3 ± 0,7	9,5 ± 0,8 **
% Entrées BO	4,9 ± 2,2	24,1 ± 5,0 **	23,5 ± 4,5 **	13,9 ± 6,5 **	25,3 ± 2,9
% Temps cumulé BO	2,6 ± 1,4	13,4 ± 3,4 *	14,3 ± 4,5 *	11,4 ± 5,6	23,0 ± 5,5 **

Latence : temps en seconde au bout duquel la souris entre pour la première fois dans un bras ouvert ; *Tentatives* : nombre de tentatives d’entrée dans les bras ouverts effectuées par la souris ; *Entrées BF* : nombre de fois que la souris entre dans un bras fermé ; *% Entrées BO* : pourcentage du nombre d’entrées effectuées par la souris dans les bras ouverts par rapport aux nombres d’entrées dans les bras fermés ; *% Temps cumulé BO* : pourcentage des temps cumulés durant lesquels la souris se trouve dans les bras ouverts par rapport au temps passé dans les bras fermés ; *p < 0,05 ; **p < 0,01 ; ***p < 0,001

En conclusion partielle, nous remarquons qu’en aigüe à double dose les traitements agissent dans le sens d’une diminution de l’anxiété et particulièrement l’hydrolysats. Cependant, l’hydrolysats peptidique de têtes de saumon ne semble pas agir sur l’activité locomotrice, qui doit être confirmé par l’Openfield.

4.2.2.2.1.2 L’Openfield

Dans ce test, les deux variables principales étudiées pour évaluer l’activité locomotrice sont: le nombre de locomotion totale (cases centrales + cases médium + cases périphériques) et le nombre de redressement.

Dose 1 : Le test statistique, de type ANOVA à 1 facteur, ne révèle aucune différence significative entre les groupes traités et le groupe contrôle, que ce soit au niveau du nombre de locomotions ou d’explorations verticales des souris. Les résultats de ce test permettant d’évaluer l’effet stimulant du CPLP sont montrés dans le Tableau 4:22.

Tableau 4:22 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice avec le test de l'Openfield à la dose 1 à J0

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysate	Lipides	Complexe
Locomotions totales	168,1 ± 9,5	187,8 ± 11,4	195,8 ± 17,1	176,1 ± 8,0
Redressements	19,5 ± 3,1	23,3 ± 2,2	20,0 ± 4,4	20,3 ± 2,0

Locomotions totales : somme des cases périphériques, médium et centrales traversées par l'animal ;
Redressements : nombres de fois où l'animal se redresse sur ses pattes arrières réalisant une exploration verticale

Les traitements à la dose 1, en exposition aiguë, n'ont pas d'effets sur l'activité locomotrice des animaux traités et sur les contrôles.

Dose 2 : En doublant la dose de produits administrés aux souris, le test statistique effectué (ANOVA, 1 facteur) ne fait ressortir aucun effet significatif pour les deux variables que sont la locomotion totale et le redressement de l'animal dans le dispositif de l'Openfield. La moyenne et l'écart standard à la moyenne des variables ainsi que la significativité des résultats, sont récapitulés dans le Tableau 4:23.

Tableau 4:23 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice en utilisant le test de l'Openfield à la dose 2 à J0

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysate	Lipides	Complexe
Locomotions totales	121,7 ± 8,7	159 ± 12,4	143,1 ± 10,4	122,4 ± 19,1
Redressements	17,3 ± 3,5	28,7 ± 3,8	27,1 ± 5,0	19,6 ± 3,8

Locomotions totales : somme des cases périphériques, médium et centrales traversées par l'animal ;
Redressements : nombres de fois où l'animal se redresse sur ses pattes arrières réalisant une exploration verticale.

Comme pour la dose 1, nous pouvons conclure que les traitements à double dose, en exposition aiguë ne semblent pas agir sur l'activité locomotrice des animaux traités. En se basant sur les résultats significatifs obtenus dans le labyrinthe en croix surélevé, nous pouvons donc avancer que les 3 traitements possèdent un caractère anxiolytique-like dans ces conditions.

4.2.2.2.2 Après sept jours de traitement

4.2.2.2.2.1 La planche à trous

Nous allons étudier 3 variables dans ce test ; le temps cumulé passé dans les zones périphérique (zone aversive), médium ainsi que le nombre de trous explorés par la tête de l'animal.

Dose 1 : Nous avons remarqué un effet significatif de l'hydrolysate peptidique sur le temps passé dans la zone périphérique ($p = 0,0080$) et médium ($p = 0,0028$), alors que les lipides influencent significativement le temps passé dans la zone médium ($p = 0,0368$) et relativement (présence de tendance) le nombre d'explorations des trous par rapport au groupe témoin ($p = 0,0582$). La moyenne des résultats obtenus pour chaque variable ainsi que l'écart standard à la moyenne et la significativité sont représentés dans le Tableau 4:24.

Tableau 4:24 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'anxiété avec le test de la planche à trous à la dose 1 à J7

Variables	Groupes				
	Contrôle	Hydrolysate	Lipides	Complexe	Diazépam
Temps passé en ZP (s)	48,9 ± 12,2	86,2 ± 9,7 **	53,7 ± 5,2	64,6 ± 11,4	84,9 ± 12,2 *
Temps passé en ZM (s)	111,5 ± 7,6	70,40 ± 9,2 **	83,6 ± 10,1 *	95,3 ± 10,9	83,6 ± 10,1 *
Nombre de trous explorés	13,5 ± 2,0	14,1 ± 2,4	21,2 ± 4,3	20,6 ± 2,4	25,0 ± 2,6 **

*Temps passé en ZP : temps passé cumulé dans la zone périphérique ; Temps passé en ZM : temps passé cumulé dans la zone médium ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$*

Sur les deux variables discriminant l'anxiété, nous remarquons que l'hydrolysate peptidique n'augmente significativement qu'une seule d'entre elles : le temps cumulé dans la zone périphérique (ZP). Celle-ci est liée à une diminution du temps passé au niveau de la zone médium, comparé aux contrôles. Pour les lipides, il ne ressort qu'un effet de tendance au niveau de la diminution du temps cumulé dans la zone médium.

Dose 2 : Les résultats obtenus ne montrent aucun effet significatif sur la variable d'exploration des trous quelque soit le traitement administré. Ces résultats sont en accord avec celui obtenu pour le traitement avec le diazépam. Le test de l'ANOVA montre d'autre part, un effet significatif des produits sur le temps cumulé dans la zone périphérique. L'effet très significatif des résultats est également ressorti avec le test à *posteriori* de Fischer complexe : $p = 0,0087$; hydrolysate : $p = 0,0061$; lipides : $p < 0,0001$). Cependant, nous remarquons que pour la variable « temps cumulé dans la zone médium », seul le CPLP ne

présente aucun effet significatif (hydrolysats : $p = 0,0037$ et lipides : $p = 0,0001$). Le tableau ci-dessous récapitule les résultats obtenus ainsi que leurs significativités sur les différentes variables du test de la planche à trous (Tableau 4:25).

Tableau 4:25 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'anxiété à l'aide du test de la planche à trous à la dose 2 à J7

Variables	Groupes				
	Contrôle	Hydrolysats	Lipides	Complexe	Diazépam
Temps passé en ZP (s)	29,8 ± 7,1	64,1 ± 10,7 **	81,1 ± 6,6 ***	62,5 ± 10,0 **	83,7 ± 6,7 ***
Temps passé en ZM (s)	129,1 ± 7,1	97 ± 8,8 **	84,2 ± 6,0 ***	130,4 ± 30,0	83,4 ± 7,5 **
Nombre de trous explorés	18,9 ± 3,3	20,4 ± 3,6	15,9 ± 2,7	17,4 ± 3,1	25 ± 2,6

*Temps passé en ZP : temps passé cumulé dans la zone périphérique ; Temps passé en ZM : temps passé cumulé dans la zone médium ; Temps passé en ZC : temps passé cumulé dans la zone centrale ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$*

Les résultats obtenus pour la variable relative au temps passé dans la zone périphérique permettent d'envisager un effet sur l'anxiété de tous les traitements administrés.

4.2.2.2.2 Openfield

Dose 1 : Le test statistique, de type ANOVA à 1 facteur, ne révèle aucune différence significative entre les groupes traités et le groupe contrôle, que ce soit au niveau du nombre de locomotions ou d'explorations verticales des souris.

Les résultats de ce test permettant d'évaluer l'effet stimulant des produits administrés sont montrés dans le Tableau 4:26.

Tableau 4:26 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice par le test de l'Openfield a la dose 1 à J7

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysats	Lipides	Complexe
Locomotions totales	129,2 ± 11,9	145,2 ± 11,1	156,8 ± 14,0	144,6 ± 11,7
Redressements	16,2 ± 2,9	22,5 ± 1,7	17,5 ± 3,1	18,7 ± 1,3

Locomotions totales : somme des cases périphériques, médium et centrales traversées par l'animal ; Redressements : nombres de fois où l'animal se redresse sur ses pattes arrières réalisant une exploration verticale

Les traitements à la dose 1, après 7 jours de traitement, n'ont aucune action sur l'activité locomotrice des animaux traités et sur les contrôles.

Dose 2 : Le test statistique effectué (ANOVA, 1 facteur) ne fait pas ressortir d'effets significatifs pour les deux variables que sont la locomotion totale et le redressement de l'animal dans le dispositif de l'Openfield. La moyenne et l'écart standard à la moyenne des variables ainsi que la significativité des résultats, sont récapitulés dans le Tableau 4:27.

Tableau 4:27 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice par le test de l'Openfield a la dose 2 à J7

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysat	Lipides	Complexe
Locomotions totales	200,8 ± 65,3	169,4 ± 10,6	166,1 ± 13,5	151,7 ± 8,8
Redressements	20,3 ± 3,4	23,9 ± 2,7	24,5 ± 2,7	21,9 ± 1,7

Locomotions totales : somme des cases périphériques, médium et centrales traversées par l'animal ;
Redressements : nombres de fois où l'animal se redresse sur ses pattes arrières réalisant une exploration verticale

Comme pour la dose 1, nous pouvons conclure qu'après 7 jours de traitement à double dose, les produits à l'essai ne semblent pas influencer l'activité locomotrice des animaux traités comparés aux contrôles. Ces résultats combinés à ceux obtenus dans le test de la planche à trous (significatifs), permettent de dégager un effet anxiolytique-like des produits à l'étude.

4.2.2.2.3 Dose sub-chronique à J 14

4.2.2.2.3.1 La chambre claire-obscur (CCO)

Les variables étudiées lors de ce test sont : le temps de latence de première sortie, le nombre de tentatives de sorties dans la partie éclairée, le nombre de sorties et le temps cumulé passé dans la partie éclairée.

Dose 1 :

Le test de l'ANOVA à 1 facteur, met en évidence un effet significatif des traitements, ce qui nous permet d'effectuer à *posteriori* le test de Fischer. Ce dernier nous indique, en comparant les groupes traités entre eux, que tous les traitements ont des effets significativement différents sur le temps de latence (complexe : $p = 0,0058$; hydrolysat : $p = 0,0079$; lipides : $p = 0,009$), les tentatives d'entrée dans chambre claire (complexe : $p <$

Résultats et discussion

0,0001; hydrolysate : $p = 0,0003$; lipides : $p < 0,0001$), le temps d'entrée dans la chambre claire contrôle (complexe : $p = 0,0064$; hydrolysate : $p = 0,0281$; lipides : $p = 0,0145$) et le temps cumulé passé dans la chambre claire comparé au groupe témoin (complexe : $p = 0,0107$; hydrolysate : $p = 0,0146$; lipides : $p=0,0053$). Les résultats et leur significativité sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 4:28).

Tableau 4:28 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et des contrôles (n=10) des variables évaluant l'anxiété dans la chambre claire-obscur à la dose 1 à J14

Variables	Groupes				
	Contrôle	Hydrolysate	Lipides	Complexe	Diazépam
Latence (s)	71,3 ± 18,8	32,1 ± 8,1 **	32,8 ± 4,9 **	30,5 ± 5,0 **	12,8 ± 2,3 ***
Tentatives	5,3 ± 0,6	2,6 ± 0,7 ***	2,2 ± 0,4 ***	1,4 ± 0,3 ***	0,8 ± 0,3 ***
Entrées CC	3,2 ± 0,6	5,9 ± 0,7 *	6,2 ± 0,7 *	6,6 ± 0,8 **	6,6 ± 1,5 **
% Temps cumulé CC	21,9 ± 4,5	49,2 ± 7,2 *	53,4 ± 6,9 **	50,5 ± 4,1 **	56,8 ± 14,9 **

Latence : temps en seconde au bout duquel la souris entre pour la première fois dans le compartiment éclairé ; Tentatives : nombre de tentatives d'entrée la partie éclairée ; Entrées CC : nombre de fois que la souris est entrée dans le compartiment éclairé ; % Temps cumulé CC : pourcentage des temps cumulés durant lesquels la souris était dans le compartiment éclairé par rapport au temps passé dans le compartiment obscur ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Après une exposition de 14 jours à la dose 1, nous observons que tous les traitements permettent de réduire significativement l'anxiété des souris traitées.

Dose 2 : Contrairement à la dose 1 après 14 jours de traitement, les effets précédemment obtenus après 7 jours de traitement à double dose ont disparu au bout de 14 jours de traitement. En effet pour tous les produits, le test statistique réalisé ne montre aucun effet significatif sur les variables relatives au test de la chambre claire obscure. Le tableau suivant présente les résultats obtenus (moyenne, écart standard à la moyenne) en étudiant les différentes variables du test utilisé (Tableau 4:29)

Tableau 4:29 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'anxiété dans la chambre claire-obscur à la dose 2 à J14

Variables	Groupes				
	Contrôle	Hydrolysat	Lipides	Complexe	Diazépam
Latence (s)	67,2 ± 22,1	53,0 ± 13,8	52,1 ± 13,2	59,4 ± 19,9	13,8 ± 2,3
Tentatives	1,4 ± 0,5	1,2 ± 0,5	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,6	0,6 ± 0,3
Entrées CC	5,5 ± 1,4	4,6 ± 0,8	5,3 ± 0,8	4,1 ± 0,8	5,5 ± 0,8
% Temps cumulé CC	39,5 ± 7,5	38,7 ± 5,5	44,4 ± 6,3	33,5 ± 7,7	50,5 ± 6,1

Latence : temps en seconde au bout duquel la souris entre pour la première fois dans le compartiment éclairé ; *Tentatives* : nombre de tentatives d'entrée la partie éclairée ; *Entrées CC* : nombre de fois que la souris est entrée dans le compartiment éclairé ; *% Temps cumulé CC* : pourcentage des temps cumulés durant lesquels la souris était dans le compartiment éclairé par rapport au temps passé dans le compartiment obscur.

En conclusion, les traitements administrés à double dose n'ont aucun effet significatif sur la diminution de l'anxiété chez les animaux.

4.2.2.2.3.2 L'Openfield

Dose 1 : Il n'apparaît aucune différence significative entre les groupes traités et le groupe contrôle, que ce soit au niveau du nombre de locomotions ou d'explorations verticales des souris (Tableau 4:30).

Tableau 4:30 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice dans le test de l'Openfield à la dose 1 à J14

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysat	Lipides	Complexe
Locomotions totales	123,6 ± 13,7	148,7 ± 17,8	141,6 ± 16,8	151,3 ± 11,2
Redressements	12,0 ± 2,5	19,4 ± 3,7	17,3 ± 3,6	18,6 ± 2,2

Locomotions totales : somme des cases périphériques, médium et centrales traversées par l'animal ; *Redressements* : nombre de fois où l'animal se redresse sur ses pattes arrières réalisant une exploration verticale

A J14 (dose 1), les traitements n'ont pas d'effet sur l'activité locomotrice des animaux traités. Ainsi, en tenant compte des résultats significatifs précédents, nous pouvons affirmer que les 3 traitements possèdent un caractère anxiolytique-like dans ces conditions.

Dose 2 :

Le test statistique effectué (ANOVA, 1 facteur) ne fait ressortir aucun effet significatif pour les deux variables que sont la locomotion totale et le redressement de l'animal dans le dispositif de l'Openfield. La moyenne et l'écart standard à la moyenne des variables ainsi que la significativité des résultats, sont récapitulés dans le Tableau 4:31.

Tableau 4:31 Moyenne et écart à la moyenne des animaux traités et contrôles (n=10) des variables évaluant l'activité locomotrice par le test de l'Openfield à la dose 2 à J14

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysate	Lipides	Complexe
Locomotions totales	142,0 ± 18,7	133,1 ± 12,8	156,1 ± 16,9	142,0 ± 7,8
Redressements	24,3 ± 4,6	19,78 ± 3,5	25,6 ± 3,2	21,8 ± 4,0

Locomotions totales : somme des cases périphériques, médium et centrales traversées par l'animal ;
Redressements : nombres de fois où l'animal se redresse sur ses pattes arrières réalisant une exploration verticale

Les traitements en dose 2, à J14 ne montrent pas d'effet sur l'activité locomotrice des animaux traités et contrôles.

4.2.3 Evaluation par cytométrie en flux du statut oxydant neuronal des souris et de l'effet cytoprotecteur des régimes administrés

La fluorescence est mesurée en cytométrie pour 8 000 neurones, exprimée en unité arbitraire. Nous l'avons ramené à la fluorescence par cellule pour effectuer l'analyse statistique.

4.2.3.1 Evaluation du niveau endogène de ROS des neurones à J14

Le statut redox endogène est évalué au niveau des cellules neuronales issues des cerveaux de souris contrôles versus celles provenant des souris traitées avec les 3 régimes pendant 14 jours. La variabilité de la fluorescence est relative aux paramétrages effectués au niveau du cytomètre de flux avant chaque utilisation.

Dose 1 : Le test statistique effectué (ANOVA à 1 facteur) nous indique que le niveau endogène de ROS des neurones de souris traitées, ne présente pas de différence significative, comparé aux neurones de souris contrôles. La moyenne et l'écart type de la fluorescence pour chaque groupe (n = 8) sont présentés dans le Tableau 4:32.

Tableau 4:32 Valeurs de la fluorescence cellulaire des neurones des souris traitées à la dose 1 pendant 14 jours et celles des contrôles (n=8), relatives au niveau de ROS endogènes des neurones

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysate	Lipides	Complexe
Fluorescence (UA)	1,5 ± 0,2	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,2

Durant 14 jours, la consommation quotidienne des 3 traitements à simple dose ne permet pas de diminuer significativement le niveau endogène de ROS dans les neurones des souris traitées.

Dose 2 :

Les résultats obtenus à double dose, ont été analysés statistiquement par une ANOVA à 1 facteur et révèlent, contrairement à la dose 1, un effet des traitements sur le niveau endogène des ROS chez les souris traitées par rapport aux souris contrôles. Le test à *posteriori* de Fischer nous indique que l'hydrolysate peptidique permet de baisser significativement le niveau de ROS endogènes des neurones des souris traitées ($p = 0,0070$). D'autre part, les lipides totaux présentent une tendance pour une diminution significative du niveau de ROS ($p = 0,054$).

Pour cette évaluation, la moyenne et l'écart type de la fluorescence pour chaque groupe ($n = 8$) est rappelée dans le Tableau 4:33.

Tableau 4:33 Valeurs de la fluorescence cellulaire des neurones des souris traitées et des contrôles (n=8), relatives au niveau de ROS endogènes des neurones après 14 jours de traitement avec une double dose

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysate	Lipides	Complexe
Fluorescence (UA)	47,2 ± 4,3	37,2 ± 1,3 **	40,4 ± 1,2 t	41,0 ± 1,3

0,05 < t : Tendance < 0,06 ; **p < 0,01

En conclusion partielle, nous avons montré qu'un traitement de 14 jours à l'hydrolysate protéique du CPLP permet de diminuer significativement le niveau de ROS endogènes des neurones. Le même effet est observé en tendance dans le cas du traitement par les lipides totaux du CPLP.

4.2.3.2 Evaluation de l'activité cytoprotectrice des traitements face à une attaque prooxydante *in vitro*

Les neurones des quatre groupes de souris traitées pendant 14 jours, aux deux doses ont subi une attaque oxydative liée à un ajout dans le milieu extracellulaire de concentrations croissantes de peroxyde d'hydrogène. L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité de résistance des neurones face à cette attaque. Cette capacité de cytoprotection est révélée lorsque la cellule attaquée maintient un niveau de ROS inférieur à celui des cellules contrôles.

Résultats et discussion

Dose 1 : Les résultats présentés dans le Tableau 4:34 ne montrent pas d'effet significatif, après traitement statistique (ANOVA à 1 facteur), entre les neurones contrôles et ceux de souris ayant reçu les traitements quelque soit la concentration de H₂O₂ ajoutée.

Tableau 4:34 Moyennes et écarts à la moyenne des valeurs de fluorescence (UA) des neurones des souris traitées et celles des contrôles (n=8) après 14 jours de traitement par la dose 1

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysats	Lipides	Complexe
[H ₂ O ₂]=1/10	1,57 ± 0,41	0,93 ± 0,08	1,43 ± 0,33	0,93 ± 0,22
[H ₂ O ₂]=1/8	1,15 ± 0,23	1,33 ± 0,38	1,11 ± 0,30	1,02 ± 0,15
[H ₂ O ₂]=1/4	1,33 ± 0,21	1,02 ± 0,23	1,12 ± 0,22	1,17 ± 0,27
[H ₂ O ₂]=1/3	1,10 ± 0,23	0,98 ± 0,12	1,09 ± 0,22	1,01 ± 0,13
[H ₂ O ₂]=1/2	1,05 ± 2,1	1,16 ± 0,18	0,89 ± 0,09	1,13 ± 0,17

En conclusion partielle, nous relevons que les 14 jours de traitements ne permettent pas de prévenir de l'accumulation des ROS intracellulaires, engendrée par l'ajout croissant de H₂O₂.

Dose 2 :

Comme pour la dose 1, nous ne remarquons pas d'effet de cytoprotection des neurones contre l'attaque croissante de H₂O₂ (Tableau 4:35). En effet, le test de l'ANOVA à 1 facteur ne permet pas de dégager une différence significative entre les neurones des souris contrôles et celle des souris traitées quelque soit la concentration de H₂O₂ ajoutée.

Tableau 4:35 Moyennes et écarts à la moyenne des valeurs de fluorescence (UA) des neurones des souris traitées et contrôles (n=8) ayant subi des attaques oxydatives par ajout de H₂O₂, après 14 jours de traitement avec la dose 2

Variables	Groupes			
	Contrôle	Hydrolysats	Lipides	Complexe
[H ₂ O ₂]=1/10	68,0 ± 5,8	55,3 ± 4,9	60,6 ± 4,1	59,9 ± 3,9
[H ₂ O ₂]=1/8	69,0 ± 5,9	57,2 ± 4,1	60,8 ± 2,3	65,2 ± 6,4
[H ₂ O ₂]=1/4	72,6 ± 7,1	59,8 ± 5,0	61,9 ± 3,0	59,0 ± 2,0
[H ₂ O ₂]=1/3	74,8 ± 5,9	63,3 ± 4,6	68,0 ± 5,0	62,8 ± 4,6
[H ₂ O ₂]=1/2	77,4 ± 6,7	64,2 ± 3,6	71,8 ± 4,3	63,4 ± 4,0

Dans le but de dégager un « profil de cytoprotection » à partir des résultats obtenus après 14 jours de traitement par la dose 2, nous avons tracé des courbes de régression, ce qui semble pertinent pour les groupes contrôle, lipides et hydrolysats du fait de leur tendance linéaire dans ces conditions (Figure 4:17).

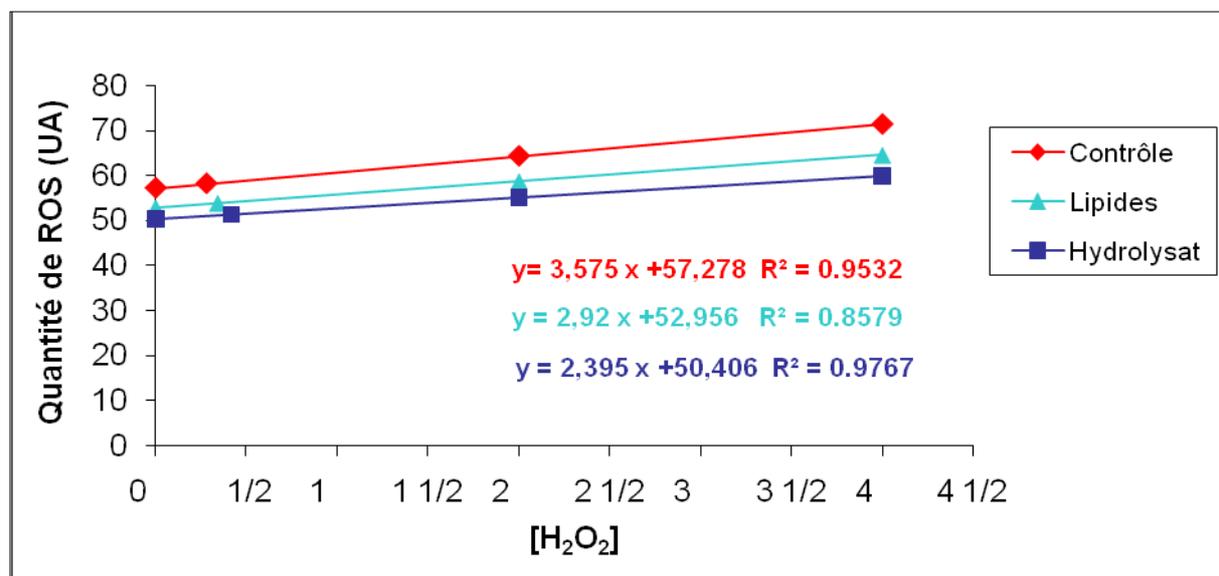


Figure 4:17 Profil de cytoprotection des traitements lipides et hydrolysats (n=8) à la dose 2 à J14

D'après les résultats obtenus, les 14 jours de traitement à la dose 2 ne permettent pas de réduire significativement la quantité de ROS engendrés par l'attaque prooxydante du H₂O₂. Toutefois, l'évolution du nombre de ROS intracellulaires au cours de l'exposition croissante de H₂O₂ permet de dégager un « profil de cytoprotection » des traitements : hydrolysats et lipides en tenant compte des courbes de régression (Figure 4:17). En effet, malgré l'absence de significativité, en chaque point de concentration en H₂O₂, ces deux traitements agissent en faveur d'une diminution de l'accumulation des ROS par rapport au groupe contrôle.

Le tableau ci-dessous, regroupe les résultats obtenus dans cette étude comportementale en plus de l'évaluation du statut endogène des ROS au niveau neuronal, ainsi que l'effet cytoprotecteur des produits administrés composés de CPLP total, son hydrolysats peptidique et des lipides totaux (Tableau 4:36).

Tableau 4:36 : Récapitulatif général des significativités des résultats obtenus suite aux études effectuées *in vivo* et *in vitro*

Dose	Tests	Groupes			
		Hydrolysate	Lipides	Complexe	Diazépam
Dose 1	J0 : Labyrinthe croix (aigüe)	NS	NS	NS	** (+)
	J7 : Planche à trous	* (+)	* (-)	NS	*
	J14 : CCO (sub-chronique)	** (-)	**	** (+)	***
	J14 : Cytométrie (ROS endogènes)	NS	NS	NS	-
	J14 : Cytométrie (cytoprotection)	NS	NS	NS	-
Dose 2	J0 : Labyrinthe croix (aigüe)	**	* (+)	*	***
	J7 : Planche à trous	* (+)	** (-)	* (+)	***
	J14 : CCO (subchronique)	NS	NS	NS	NS
	J14 : Cytométrie (ROS endogènes)	**	t	NS	-
	J14 : Cytométrie (cytoprotection)	NS	NS	NS	-

Les étoiles de significativités répertoriées dans ce tableau pour chaque test et chaque groupe ont été obtenues en faisant la moyenne des significativités des variables discriminantes de chaque test. *NS* : non significatif ; **p* < 0,05 ; ***p* < 0,01 ; ****p* < 0,001.

Les résultats *in vivo* ont permis de mettre en évidence un effet anxiolytique-like du CPLP et de ses composants lipidiques et peptidiques avec un effet dose dépendant. Nous avons remarqué que chaque produit testé présente une cinétique particulière, indépendamment des cinétiques des autres produits (Tableau 4:36). En effet, à la dose 1, dans le cas de l'hydrolysate et des lipides, l'effet apparait à partir de J7 et se poursuit jusqu'à J14, par opposition au complexe dont l'effet est moins progressif et apparait de manière surprenante à J14, avec une significativité qui dépasse celle des deux autres traitements (lipides et hydrolysate).

D'autre part, dans le cas d'une administration de la double dose, jusqu'à J7, tous les traitements sont significatifs et anxiolytiques. Cet effet disparaît à J14 pour tous les produits testés. Dans ce cas, nous pouvons supposer l'apparition d'une habitude de la dose administrée quotidiennement c'est-à-dire qu'une tolérance s'installe, à partir du 7^{ème} jour de traitement. Les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec deux études récentes (Ferraz *et al.*, 2011; Vinot *et al.*, 2011) qui ont montré, sur des modèles murins, que l'effet d'une complémentation en ω -3 pendant 3 et 5 mois a permis de diminuer significativement l'anxiété. Une troisième étude épidémiologique menée en juillet 2011 par Kiecolt-Glaser *et al.*, sur 68 adultes volontaires, a démontré que les sujets ayant reçu pendant 12 semaines un complément quotidien en ω -3 présentaient une diminution de 14% de leur anxiété (Kiecolt-Glaser *et al.*, 2011). La corticostérone est une hormone généralement reliée à un comportement anxieux, à forte concentration (Lorivel *et al.*, 2010). Ferraz *et al.*, ont démontré en 2011 que la complémentation en ω -3 permettait de réduire significativement la concentration sanguine de cette hormone, diminuant ainsi l'anxiété liée à un stress exogène (Ferraz *et al.*, 2011). D'autre part, du fait de la présence de doubles liaisons, les AGPI-LC-n-3 augmentent la fluidité membranaire facilitant ainsi les transports transmembranaires (Yehuda *et al.*, 1998), ce qui favoriserait la sécrétion de sérotonine et de dopamine au niveau de la membrane synaptique (Ferraz *et al.*, 2011). Ces deux neurotransmetteurs sont en effet étroitement liés à la gestion des troubles anxieux, ce qui pourrait également expliquer l'effet anxiolytique de ces ω -3. Aucune étude n'a permis, actuellement, de relier la consommation d'hydrolysats peptidiques de poisson au phénomène de l'anxiété. Il est donc intéressant de mettre en avant, par le biais des résultats obtenus, l'effet anxiolytique des hydrolysats peptidiques de poisson et surtout à double dose en aigüe.

La forme vectorisée du complexe est un atout en faveur d'une activité biologique du fait de sa capacité à traverser les membranes qui pourrait en partie expliquer son action dans les mécanismes cellulaires liés à la diminution de l'anxiété.

Les résultats obtenus *in vitro* ont montré une capacité de prévention de l'hydrolysats peptidique et des lipides face à l'accumulation de ROS endogènes dans les neurones, en sub-chronique et à double dose. Ces résultats sont donc en accord avec les différentes études qui ont mis en exergue les propriétés antioxydantes des hydrolysats protéiques marins (Je *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008b). Concernant l'activité antioxydante de la partie lipidique du

complexe, certains auteurs dont Davis, *et al.*, (2008) proposent un mécanisme d'action par lequel les acides gras activeraient une protéine membranaire de la mitochondrie, la protéine découplante UCP2, dont l'une des fonctions serait de maîtriser la production de ROS mitochondriaux, par action sur le transfert d'ions H⁺ dans la chaîne respiratoire (Davis *et al.*, 2008). Toutefois cette théorie est controversée par d'autres auteurs vis à vis du rôle de l'UCP2 et de ses conditions métaboliques de fonctionnement. D'autre part, l'effet antioxydant de la fraction lipidique totale du CPLP pourrait provenir tout simplement des antioxydants endogènes de la tête de saumon comme l'astaxanthine et les tocophérols. Pour appuyer cette hypothèse, une étude menée par Mattei *et al.*, (2011) a montré que l'astaxanthine, mélangée à l'huile de poisson, présentait de meilleurs résultats sur l'équilibre de la balance redox cellulaire, comparée à son utilisation seule (Mattei *et al.*, 2011). L'étude de Bouayed *et al.*, (2008) a démontré une relation entre l'anxiété et le niveau de ROS des granulocytes. En effet, il a démontré qu'un comportement anxieux entraînait une augmentation du statut oxydatif cellulaire, et par conséquent une augmentation des ROS (Bouayed *et al.*, 2008). Toutefois dans notre cas, malgré l'obtention de résultats significatifs sur la diminution du niveau des ROS *in vitro* à J14, l'absence d'effet anxiolytique des traitements hydrolysats et lipides *in vivo* à J14 ne nous permet pas d'établir une telle relation. Des études complémentaires à celles-ci portant sur les cellules périphériques (cellules sanguines) permettraient d'apporter plus d'informations sur l'impact des traitements au niveau du système immunitaire.

4.3 Vectorisation de molécules bioactives

4.3.1 Formulation d'émulsions à base de la fraction lipidique du CPLP, vectrices de molécules bioactives

Deux molécules lipophiles faiblement biodisponibles, le coenzyme Q₁₀ et la curcumine, ont été vectorisées sous forme d'émulsions formulées à l'aide de lipides d'origine marine (fraction lipidique du CPLP) et végétale (huile et lécithine de colza).

4.3.1.1 Caractérisation de l'huile extraite par voie enzymatique à partir de têtes de saumon

La fraction lipidique est obtenue à partir du CPLP issu de l'extraction enzymatique de têtes de saumon. Le Tableau 4:37, ci-dessous, représente la composition complète en acides gras contenus dans l'huile de têtes de saumon comparée avec l'huile de filet de saumon (*Salmo*

Résultats et discussion

salar). Les différentes compositions en acides gras des huiles de saumon de différentes origines sont très proches notamment pour l'EPA et le DHA qui sont respectivement de 4 et 5%. Une étude portant sur l'extraction de l'huile à partir des têtes de saumon, a montré que l'huile contenait 8,4% de DHA et 6,1% d'EPA (Mbatia *et al.*, 2010). Du fait de leur richesse en EPA et en DHA, les huiles de saumon ont un rapport n-6/n-3 très faible.

Tableau 4:37 Différentes compositions en acides gras des huiles de saumon (*Salmo salar*) (Pratoomyot *et al.*, 2011) (n=3)

Acides gras	Huile de têtes de saumon	Huile du filet (<i>Salmo salar</i>) a	Huile du filet (<i>Salmo salar</i>) b
C12	-	-	-
C14	5,01 ± 0,00	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,2
Iso C15	0,15 ± 0,00	-	-
Ante iso C15	-	-	-
C15	0,33 ± 0,00	-	-
C15 : 1	0,06 ± 0,00	-	-
Iso C16	-	10,5 ± 0,4	11,1 ± 0,3
C16	15,54 ± 0,10	-	-
C16 : 1w7	0,41 ± 0,00	-	-
C16 : 1w9	5,73 ± 0,00	-	-
C16 : 2w6	-	-	-
C16 : 3w3	0,33 ± 0,00	-	-
C16 : 4w3	0,56 ± 0,00	-	-
C18	3,32 ± 0,00	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1
C18 : 1w9	19,55 ± 0,20	35,4 ± 1,0	34,2 ± 1,2
C18 : 1w7	2,95 ± 0,00	3,1 ± 0,2	3,3 ± 0,2
C18 : 1w5	-	-	-
C18 : 2w6	6,35 ± 0,00	12,1 ± 0,5	12,5 ± 0,5
C18 : 3w4	3,72 ± 0,30	-	-
C18 : 3w3	1,89 ± 0,20	4,0 ± 0,2	4,3 ± 0,3
C18 : 4w3	-	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0
C20 : 1w9	1,50 ± 0,00	5,3 ± 0,2	3,8 ± 0,2
C20 : 1w7	1,05 ± 0,00	-	-
C20 : 2w6	3,03 ± 0,00	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1
C20 : 4w6	0,88 ± 0,00	-	-
C20 : 3w3	1,33 ± 0,00	-	-
C20 : 3w6	-	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1
C20 : 4w3	-	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1
C20 : 4w6	-	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1
C20 : 5w3 EPA	10,10 ± 0,1	3,8 ± 0,3	4,9 ± 0,5
C21 : 5w3	0,66 ± 0,0	-	-
C22 : 1w11	-	3,7 ± 0,3	2,0 ± 0,1
C22 : 4w6	0,43 ± 0,00	-	-
C22 : 5w6	0,30 ± 0,00	-	-
C22 : 5w3	3,30 ± 0,00	-	-
C22 : 6w3 DHA	11,83 ± 0,10	5,2 ± 0,9	5,8 ± 0,5
AGS	24,43	16,8 ± 0,5	17,4 ± 0,6

Résultats et discussion

Acides gras	Huile de têtes de saumon	Huile du filet (<i>Salmo salar</i>) a	Huile du filet (<i>Salmo salar</i>) b
AGMI	31,20	52,6 ± 1,5	48,3 ± 1,2
AGPI	44,42	30,5 ± 1,4	34,3 ± 0,8

a : Nourrit avec des protéines végétales, y compris la farine de tournesol, le gluten de maïs, du concentré de protéines de soja et de féverole ; b : Similaire au régime « a » en plus du gluten de blé. Les acides gras sont présentés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux.

Une analyse des classes lipidiques a été effectuée sur l'huile de saumon par latroscan pour vérifier sa pureté en triacylglycérols. Les résultats de cette migration dans un mélange hexane/diéthyl éther (80 : 20 v/v) révèlent la présence d'un seul pic correspondant aux TAG (Figure 4:18).

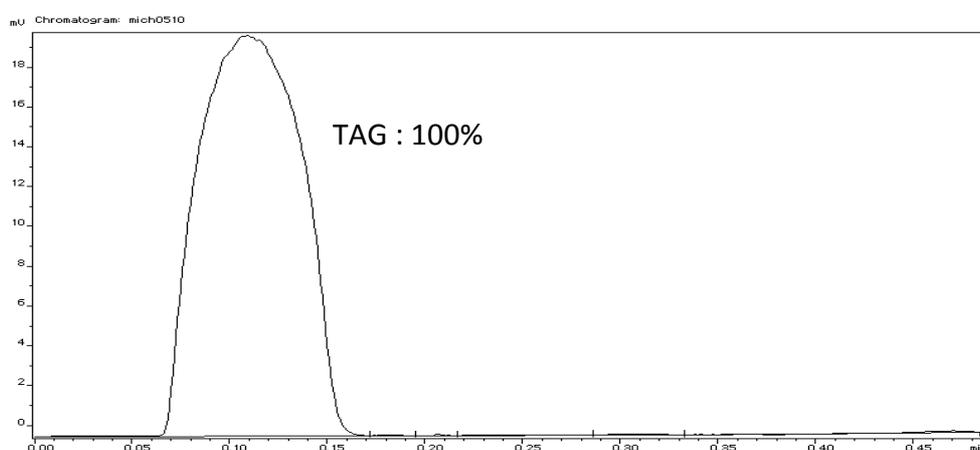


Figure 4:18 Fraction de triacylglycérols de l'huile de saumon extraite par hydrolyse enzymatique de têtes de saumon (*Salmo salar*)

L'analyse chimique de l'huile de saumon est présentée dans le Tableau 4:38. Les valeurs d'indice d'acide, de peroxyde et de saponification sont en accord avec celles présentées par Gbogouri (2005). Etant inférieur à 6 méq d'O₂/Kg d'huile, l'indice de peroxyde de l'huile de saumon montre que les différentes étapes du procédé d'extraction n'engendrent pas de réaction d'oxydation. La valeur de l'indice d'acide retrouvé montre que l'huile ne contient pas d'acides gras libres.

Tableau 4:38 Analyse chimique de l'huile de saumon

	Huile de saumon
Indice d'acide (mg KOH / g huile)	0,41 ± 0,02
Indice de peroxyde (méq d'O ₂ / kg huile)	1,95 ± 0,06
Indice de saponification (mg KOH / g huile)	191,39 ± 2,37

L'analyse thermique différentielle de l'huile de saumon révèle la présence de deux pics de

fusion à -18,8°C et à -8,2°C et un pic de cristallisation à -19,9°C. L'huile totale extraite à partir du CPLP a été caractérisée dans la première partie des résultats.

4.3.1.2 Caractérisation physicochimique de l'huile et de la lécithine de colza

L'analyse de la composition en acides gras de l'huile de colza révèle une proportion majeure en acide oléique (63,03%), acide alpha-linolénique (9,22%) et palmitique (4,54%) (Tableau 4:39).

Tableau 4:39 Composition en acides gras de l'huile et de la lécithine de colza (n=3)

Acides gras	Huile de colza	Lécithine de colza
C12	nd	nd
C13	nd	0,18±0,01
C14	0,05±0,00	0,07±0,00
C15	0,02±0,00	0,07±0,00
C16	4,54±0,00	7,65±0,02
C17	0,05±0,00	nd
C18	1,46±0,00	1,46±0,01
C20	nd	0,34±0,00
C21	nd	nd
C22	0,30±0,00	0,29±0,01
C24	0,10±0,00	0,28±0,22
AGS	6,51	10,34
C14.1	nd	nd
C16:1	0,25±0,00	0,29±0,00
C17:1	0,07±0,00	0,08±0,00
C18:1n9t	nd	0,19±0,00
C18:1n9c	63,03±0,06	53,75±0,23
C20:1n11c	1,21±0,01	0,68±0,01
C22:1n9c	0,17±0,01	0,16±0,00
C24:1n9c	0,11±0,00	0,09±0,00
AGMI	64,83	55,20
C18:2n6t	nd	nd
C18:2n6c	18,60±0,01	27,95±0,06
C18:4n3	0,53±0,00	nd
C18:3n3	9,22±0,03	6,24±0,05
C20:2n6	0,25±0,02	0,17±0,02
C20:3n6	nd	nd
C20:3n3	nd	nd
C20:4n6	0,02±0,00	0,04±0,00
AGPI	28,64	34,45
n-3/n-6	0,53	0,22

Les acides gras sont présentés en pourcentage par rapport aux acides gras totaux.

Il est très intéressant de noter que dans les échantillons de colza, il y a peu d'acides gras saturés (6 et 10%) comparé à l'huile de saumon où les acides gras saturés représentent 20% des acides gras totaux. Cependant, en comparaison avec la composition en acides gras des échantillons de saumon (huile et lécithine), décrite précédemment, ces derniers sont plus riches en EPA et DHA contrairement aux échantillons de colza.

L'huile de colza également analysée par Iatroscan, est composée de 100% de triacylglycérols (Figure 4:19).

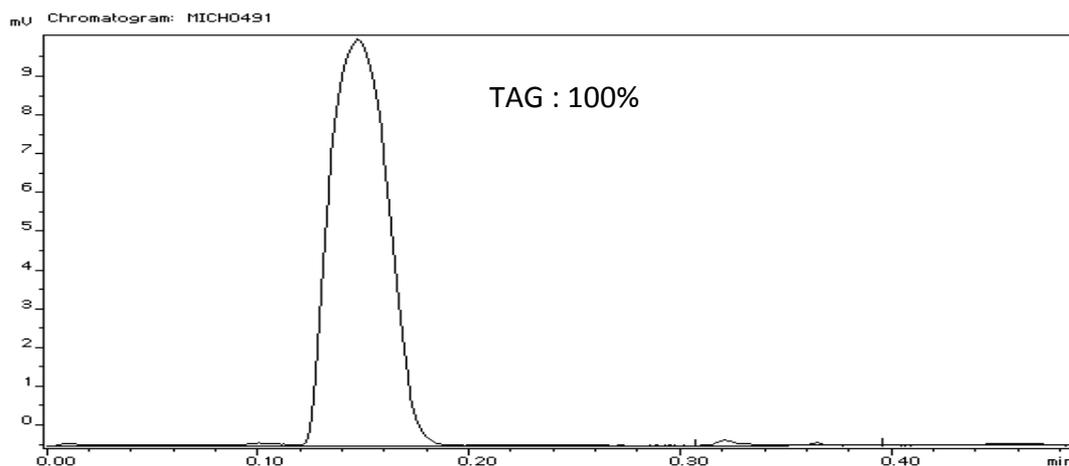


Figure 4:19 Fraction de triacylglycérols de l'huile de colza

La lécithine de colza, utilisée en tant que surfactant dans l'émulsion végétale est composée de 74,8% de lipides polaires contrairement à la lécithine marine (65,5%) (Figure 4:20).

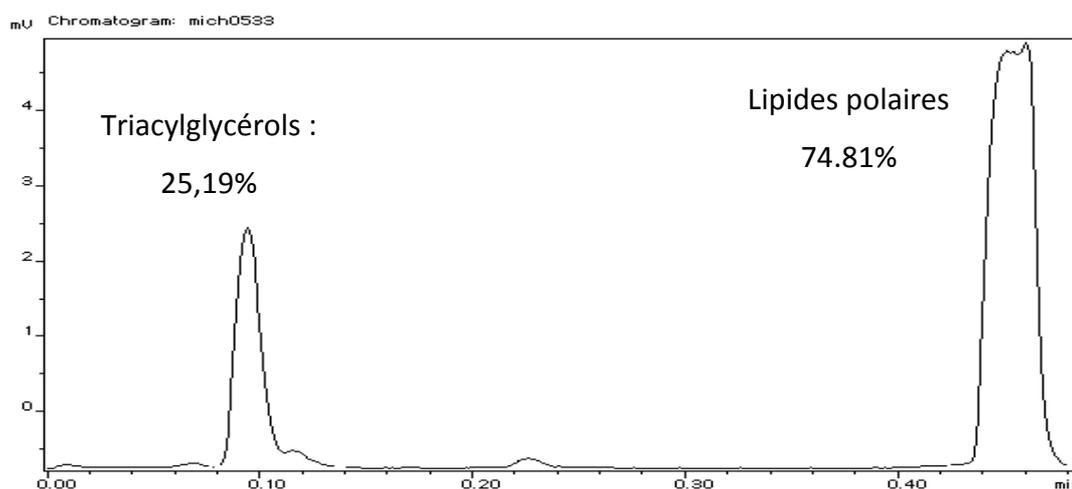


Figure 4:20 Classes lipidiques de la lécithine de colza

Les lipides polaires de la lécithine de colza, séparés dans un solvant polaire, sont composés de 13,89% de PE et de 11,69% de PC. Les pourcentages des deux fractions retrouvées dans la lécithine de colza sont plus faibles en comparaison avec la lécithine marine.

D'autre part, les résultats des indices d'acide et de saponification de l'huile de colza ne dépassent pas les valeurs maximales requises (respectivement 4 et 182-193) (Guillemin, 2006). La valeur obtenue pour l'indice d'acide est très faible et montre que l'huile de colza ne contient pas d'acide gras libre et l'indice de peroxyde reste très inférieure à 6 méq d'O₂/Kg d'huile. (Tableau 4:40).

Tableau 4:40 Analyse chimique de l'huile de colza

	Huile de colza
Indice d'acide (mg KOH / g huile)	0,8 ± 0,03
Indice de peroxyde (méq d'O ₂ / kg huile)	2,02 ± 0,02
Indice de saponification (mg KOH / g huile)	185,95 ± 2,86

L'analyse thermique différentielle de l'huile de colza révèle un seul pic de fusion détecté à -17,6°C ainsi qu'un pic de cristallisation à -55,5°C. En effet, en comparaison avec l'huile de saumon, nous retrouvons que le pic de fusion est proche de celui de l'huile de colza contrairement au pic de cristallisation qui est complètement différent.

4.3.1.3 Taille des émulsions

L'émulsion marine utilisée pour la vectorisation du CoQ₁₀ est composée de 30% de phase huileuse (huile et de lécithine de saumon). Dans l'étude de la vectorisation de la curcumine, nous avons formulé des émulsions marine et végétale à 10% de phase huileuse. Les lécithines représentent 7% de la phase huileuse dans les deux types d'émulsions.

La mesure de la taille des émulsions a été effectuée consécutivement à l'étape de préparation. Compte tenu du mode de préparation retenu (homogénéisation à haute pression), la taille des émulsions oscille autour de 160 nanomètres. Nous remarquons dans le Tableau 4:41 que la teneur en phase huileuse marine de 10 ou 30%, n'influence pas la taille moyenne des gouttelettes lipidiques, respectivement de 169 et 164 nm. La taille moyenne des gouttelettes lipidiques de l'émulsion végétale est de 226,07 nm. En effet, la taille des émulsions dépend de la nature de l'huile utilisée et du ratio huile/surfactant (Balakrishnan *et al.*, 2009). Roland et ses collaborateurs (2003) ont montré qu'en diminuant

la concentration en surfactant dans une émulsion, la taille des gouttelettes lipidiques augmentait (Roland *et al.*, 2003).

D'autre part, les faibles indices de polydispersité des émulsions montrent que la population des gouttelettes est monodisperse. La mesure de mobilité électrophorétique permet de mettre en évidence les répulsions électrostatiques entre les gouttelettes d'huile, qui influencent la coalescence et la stabilité des émulsions (Cambiella *et al.*, 2007). Dans cette étude, nous avons tenu compte des valeurs de mobilité électrophorétique (ME) à la place du potentiel zêta (PZ), car l'équation de conversion de la ME en PZ n'est valable que dans le cas des particules solides (Cambiella *et al.*, 2007; Nespolo *et al.*, 2001). A la surface des gouttelettes, les charges dépendent en effet, de la nature de l'émulsifiant, de sa concentration, du pH et de la salinité du milieu (Cambiella *et al.*, 2007).

Les valeurs de ME obtenues montrent que les gouttelettes dispersées sont chargées négativement, du fait de la charge des lécithines qui se positionnent à l'interface eau-huile. En effet, au pH physiologique, tous les phospholipides des lécithines sont chargés négativement à l'exception de la PC et de la PE qui sont neutres (Chansiri *et al.*, 1999; Hung *et al.*, 2007).

Tableau 4:41 Mesure de la taille, de la mobilité électrophorétique et de l'indice de polydispersité des gouttelettes lipidiques d'une émulsion à base d'huile et de lécithine de saumon vs huile et lécithine de colza (n=5)

	Saumon (30%)		Saumon (10%)		Colza (10%)	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
Taille (nm)	164,94	1,34	169,70	0,73	226,07	2,06
Indice de polydispersité	0,12	0,01	0,16	0,01	0,17	0,01
Mobilité électrophorétique (µmcm/Vs)	-4,06	0,07	-3,16	0,02	-3,60	0,06

Les résultats de taille obtenus par diffusion dynamique de lumière, sont confirmés par microscopie électronique à transmission où nous pouvons visualiser la distribution de taille des gouttelettes lipidiques (Figure 4:21).

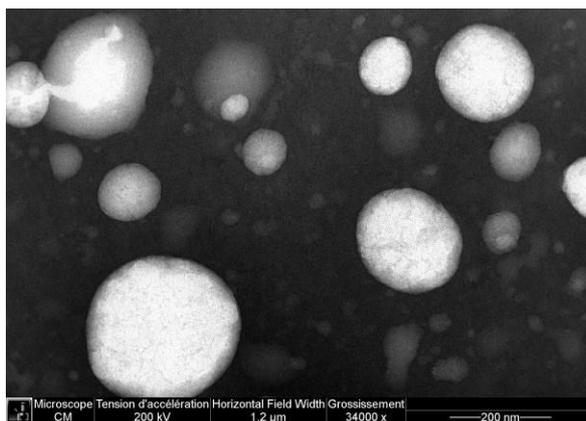


Figure 4:21 Photo de microscopie électronique à transmission représentant les gouttelettes lipidiques de l'émulsion vectrice (30% d'huile de saumon)

4.3.1.4 Stabilité des émulsions en fonction du temps

La stabilité physique des émulsions, stockées à température ambiante, a été suivie en fonction du temps pendant 30 jours.

Les mesures de taille, de la mobilité électrophorétique et de l'indice de polydispersité montrent globalement une grande stabilité pour les trois types d'émulsions (Tableau 4:42).

En effet, la valeur de potentiel zéta (valeur convertie à partir de la mobilité électrophorétique) aux alentours de -45 mV, indique que les nano-suspensions sont stabilisées par les répulsions électrostatiques. Cette valeur de PZ doit être supérieure ou égale à ± 30 mV d'après (Müller *et al.*, 2001).

Tableau 4:42 Evolution de la moyenne des paramètres physiques des gouttelettes lipidiques des émulsions vectrices (marine et végétale) en fonction du temps (n=5)

Saumon (30%)			Saumon (10%)			Colza (10%)		
Taille en nm								
Jours	Moyenne	ET	Jours	Moyenne	ET	Jours	Moyenne	ET
0	164,94	1,34	0	169,7	0,73	0	226,07	2,06
5	164,77	1,35	7	174,2	1,42	7	224	3,16
12	166,27	0,96	14	172,57	1,1	14	228,8	0,98
20	165,1	1,15	22	168,07	0,84	22	227,87	4,1
30	169,03	0,42	30	168,87	0,06	30	225,47	2,89
Indice de polydispersité								
0	0,12	0,01	0	0,16	0,01	0	0,17	0,01
5	0,14	0,01	7	0,17	0,01	7	0,17	0,01
12	0,12	0,01	14	0,17	0,03	14	0,17	0,01
20	0,13	0,02	22	0,18	0,01	22	0,17	0,01
30	0,13	0,01	30	0,16	0,01	30	0,17	0,01

Saumon (30%)			Saumon (10%)			Colza (10%)		
Mobilité électrophorétique ($\mu\text{mcm/Vs}$)								
0	-4,06	0,07	0	-3,16	0,02	0	-3,6	0,06
5	-3,73	0,07	7	-4,04	0,08	7	-3,34	0,05
12	-4,08	0,1	14	-3,96	0,04	14	-3,4	0,03
20	-3,83	0,04	22	-4,72	0,14	22	-3,44	0,07
30	-3,39	0,05	30	-3,7	0,02	30	-3,54	0,08

4.3.2 Vectorisation et biodisponibilité du coenzyme Q₁₀

De manière générale, les huiles améliorent le transport des molécules lipophiles dans le système lymphatique intestinal en augmentant leur absorption à travers le tractus gastro-intestinal (Gursoy, 2004). La solubilité des principes actifs hydrophobes dans la fraction lipidique, entraîne une meilleure efficacité d'encapsulation (Nepal *et al.*, 2010).

4.3.2.1 Test de solubilité du CoQ₁₀ dans l'huile de saumon

Afin de réaliser le test de solubilité, l'huile contenant le CoQ₁₀ doit être monophasique à la température ambiante (Kommuru *et al.*, 2001). Peu de formulations à base de CoQ₁₀ existent sur le marché des compléments alimentaires, en raison des problèmes de solubilité dans les vecteurs lipidiques (Balakrishnan *et al.*, 2009). Pour pouvoir vectoriser le CoQ₁₀ à l'aide de l'émulsion riche en AGPI-LC, nous avons tout d'abord testé la solubilité maximale de ce composé dans l'huile de saumon. Le test de solubilité est effectué uniquement dans l'huile de saumon et non pas dans la phase huileuse complète (huile + lécithine). Les travaux de Shafiq (2007) ont montré que, bien que le surfactant améliore considérablement la solubilité du CoQ₁₀, il peut se produire une précipitation de ce dernier dans le tractus gastro-intestinal, diminuant ainsi sa biodisponibilité (Shafiq *et al.*, 2007). La Figure 4:22 représente la courbe de calibration du CoQ₁₀, à une longueur d'onde de 240 nm et à 37°C. Ces résultats permettent d'estimer à $81,3 \pm 0,1$ mg/mL d'huile, le maximum de solubilité du CoQ₁₀ dans l'huile de saumon.

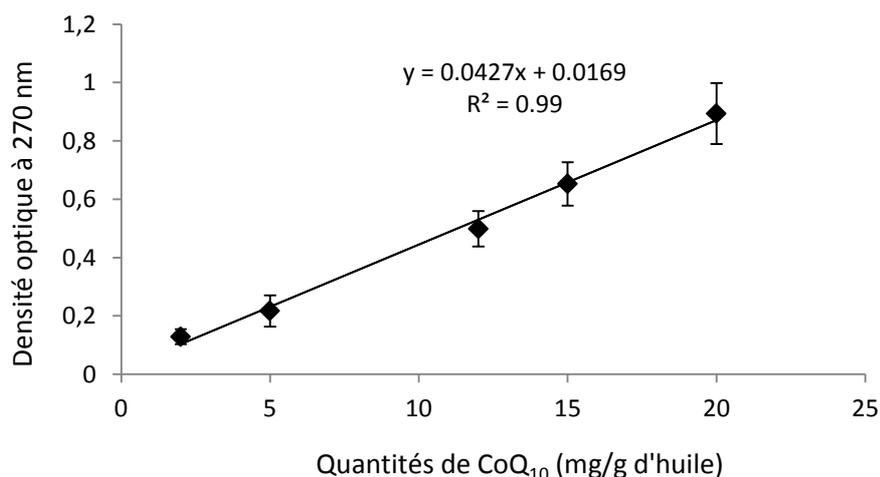


Figure 4:22 Courbe de calibration du CoQ₁₀ solubilisé dans de l'huile de saumon à 270 nm (n=3)

Il a été démontré que la solubilité du CoQ₁₀ dépend à la fois de la température et de la nature des acides gras (Thanatuksorn, 2009). En effet, dans l'huile de noix de coco et l'huile d'olive, la solubilité maximale du CoQ₁₀ est respectivement de 205 mg/mL et 140 mg/mL. Ces résultats montrent que la longueur des chaînes d'acides gras et le nombre d'insaturations influencent la solubilité du CoQ₁₀ (Kommuru *et al.*, 2001).

4.3.2.2 Stabilité des émulsions

En reprenant le protocole d'une étude menée par Balakrishnan *et al.*, (2009), nous avons effectué un test de stabilité à température ambiante (25°C) car à faible température il se produit une précipitation du CoQ₁₀ (Balakrishnan *et al.*, 2009).

En comparaison avec l'émulsion riche en AGPI-LC à 30%, nous remarquons que le fait d'ajouter du CoQ₁₀ ne modifie pas significativement la taille, la mobilité électrophorétique et l'indice de polydispersité des gouttelettes lipidiques (Tableau 4:43).

Tableau 4:43 Paramètres physiques des gouttelettes lipidiques de l'émulsion riche en AGPI-LC contenant du CoQ₁₀ en fonction du temps (n=5)

Jours	Taille (nm)		Mobilité électrophorétique (μmcm/Vs)		Indice de polydispersité	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
0	167,08	1,07	-3,89	0,13	0,12	0,02
5	169,3	1,25	-3,91	0,04	0,12	0,02
12	166,93	1,42	-4,27	0,16	0,12	0
20	167	0,2	-3,59	0,11	0,11	0,02
30	170,37	1,22	-3,98	0,08	0,12	0,02

Les résultats de tailles obtenus par DLS sont confirmés par microscopie électronique à transmission (Figure 4:23) où on peut observer que la présence du CoQ₁₀ n'influence pas la morphologie des gouttelettes lipidiques.

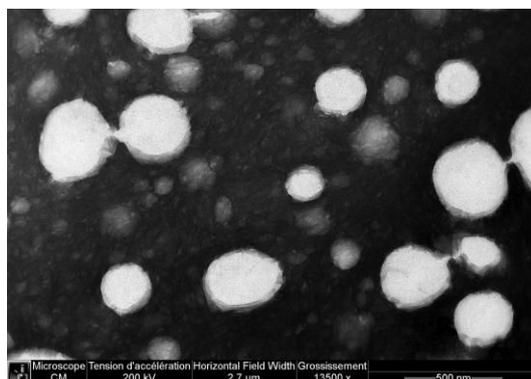


Figure 4:23 Photographie au microscopie électronique à transmission représentant le CoQ₁₀ solubilisé dans les gouttelettes lipidiques d'une émulsion riche en AGPI-LC

4.3.2.3 Pharmacocinétique et biodisponibilité du CoQ₁₀

En raison de sa faible solubilité, la biodisponibilité du CoQ₁₀ est limitée (Balakrishnan *et al.*, 2009). Pour remédier à ce problème plusieurs études se sont intéressées aux nano émulsions en tant que systèmes permettant d'améliorer la biodisponibilité du CoQ₁₀. L'étude que nous avons effectuée consiste à comparer l'efficacité de différentes formulations de CoQ₁₀ sur le comportement de modèles murins. Une formulation du commerce « Pharma Nord » a été choisie pour estimer l'efficacité des vecteurs présentant des AGPI-LC. La formulation Pharma Nord se présente sous forme de gélules molles contenant 30 mg de CoQ₁₀ par gélule (0,5 g) solubilisé dans de l'huile de soja. A température ambiante, le CoQ₁₀ se présente sous la forme cristallisée et n'est pas totalement solubilisé dans l'huile de soja. Cette étude avait pour objectif de comparer l'efficacité de deux formulations à améliorer la biodisponibilité du CoQ₁₀. De plus, au travers de cette étude, il était également possible d'évaluer la pertinence d'une émulsion préparée au préalable comparée à une auto-émulsion qui se réalise *in situ* lors du processus normal de digestion.

4.3.2.3.1 Etude sur modèle souris

Le dysfonctionnement mitochondrial, conduisant à l'apoptose cellulaire, est impliqué dans les mécanismes du stress oxydant cellulaire, mais aussi dans plusieurs maladies

neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Mancuso *et al.*, 2006). En effet, la chaîne de transport mitochondriale représente le site majeur de la production des ROS par le biais des enzymes intervenant dans la synthèse de l'ATP (Mancuso *et al.*, 2009). De ce fait, l'accumulation de ROS, non gérée par les défenses cellulaires, peut entraîner le catabolisme des lipides, protéines et acides nucléiques. Plusieurs études ont démontré le rôle du CoQ₁₀ en tant qu'agent neuroprotecteur contre les effets délétères des ROS, ainsi que leurs effets sur l'apoptose cellulaire. Hyson et ses collaborateurs (2010) ont montré que dans le cas de la maladie de Huntington (MH), un traitement avec une dose de 2400 mg/jour pendant 12 semaines, améliorerait la santé des patients (Hyson *et al.*, 2010). La maladie de Huntington est en effet une maladie héréditaire, autosomique, se développant chez des individus âgés entre 40 et 50 ans, avec des symptômes détectables entre 15 et 25 ans. Elle se traduit par une dégénérescence neuronale, affectant les fonctions motrices et cognitives, et aboutissant ainsi à une démence. Ces fortes doses de CoQ₁₀ (jusqu'à 2400 mg) sont bien tolérées et ne présente aucun danger pour la santé des patients atteint de la MP (Shults *et al.*, 2004). Une étude récente en 2008 a par ailleurs montré que le CoQ₁₀ est déficient dans le cerveau de patients parkinsoniens (Hargreaves *et al.*, 2008). Dans ce contexte, nous avons étudié la biodisponibilité du CoQ₁₀ administré en forte concentration (1000 mg/kg) chez des souris. Il est à noter que ces doses restent tout de même non toxiques pour les souris. En effet, une dose allant jusqu'à 20 g de CoQ₁₀/kg reste non toxique chez la souris et le rat (Fu *et al.*, 2009). D'autre part, un sujet humain est capable de tolérer jusqu'à 3g/jour de CoQ₁₀ pendant 2 mois (Shults *et al.*, 2004).

Parallèlement à la vectorisation de la molécule sous forme émulsionnée et sous forme huileuse (Huile de saumon, lécithine de saumon et CoQ₁₀), nous avons également testé une forme gélifiée, où le CoQ₁₀ est dispersé dans de la carboxyméthyl cellulose. Deux groupes témoins ont été testés simultanément (témoin eau et témoin lécithine).

Les résultats de l'analyse du CoQ₁₀ au niveau du plasma des souris sacrifiées à T0, 1, 2, 4, 8, 12 et 24h après le traitement à dose aiguë, sont présentés ci-dessous (Figure 4:24).

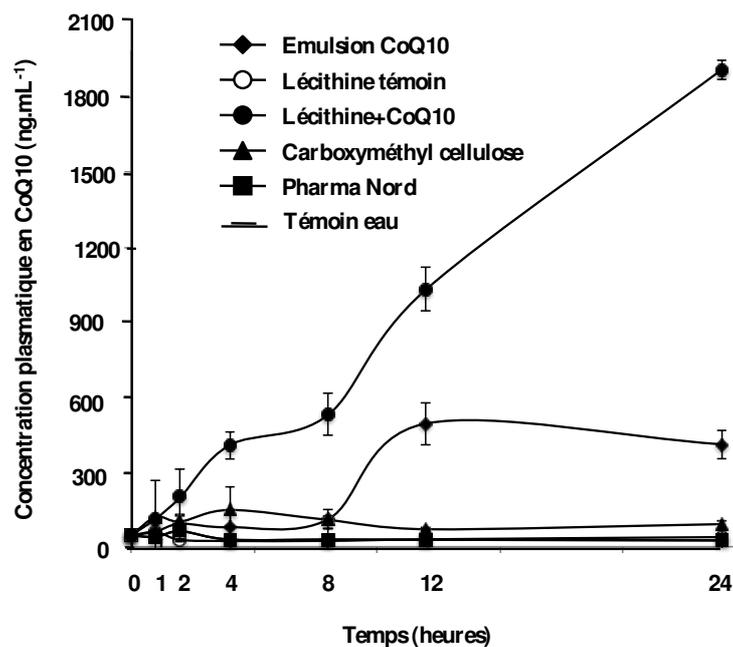


Figure 4:24 Biodisponibilité du CoQ₁₀ administré sous différentes formulations chez les souris :

Pharma Nord : 6% de CoQ₁₀ dissout dans l'huile de soja (30 mg/ 0,5g) ; **Formulation huileuse + CoQ₁₀** : 6% de CoQ₁₀ dissout dans les lipides totaux (30 mg/ 0,5g) ; **Dispersion carboxyméthyl cellulose + CoQ₁₀** : 30 mg de CoQ₁₀ / mL de dispersion (5% de carboxyméthyl cellulose) ; **Emulsion CoQ₁₀** : 30 mg de CoQ₁₀ /mL d'émulsion, 40% de lipides totaux, 60% d'eau distillée

Nous avons utilisé le test de Kruskal Wallis pour analyser les données. Les différents groupes ont été ensuite comparés, deux à deux à l'aide du test de Mann-Whitney. Parmi toutes les formulations testées en dose aiguë, seules la formulation huileuse et l'émulsion permettent de retrouver significativement le CoQ₁₀ dans la circulation sanguine. En effet, dans le cas de l'émulsion, la concentration en CoQ₁₀ augmente encore 8h après administration, contrairement à la formulation huileuse où la concentration sanguine de CoQ₁₀ commence à augmenter de manière exponentielle juste après son administration par voie orale. Les résultats obtenus ne suivent pas un modèle pharmacocinétique classique, composé des quatre phases : absorption, distribution, métabolisme et élimination de la substance active (Miles, 2007). Dans le cas de la formulation huileuse (lécithine et CoQ₁₀) la cinétique enregistrée semble correspondre uniquement à la phase d'absorption. Cela pourrait s'expliquer par un métabolisme plus lent lié à l'émulsification endogène de la fraction lipidique.

D'autre part, Miles (2007) rapporte, à partir de plusieurs études, que dans certains cas, il peut y avoir apparition d'un second pic 24h après l'administration du produit. Ce pic serait dû en effet à une redistribution entérohépatique, où le CoQ₁₀ pourrait être ré-administré au

niveau de l'intestin par le biais de la bile, puis réabsorbé à travers la paroi intestinale (Miles, 2007). Dans le cas de la formulation de type émulsion, nous remarquons une diminution de la concentration plasmatique du CoQ₁₀, 24h après le gavage, il s'agit probablement du début de la phase de distribution. A partir de l'étude réalisée, les deux formulations (1 g/Kg) permettent d'améliorer la biodisponibilité du CoQ₁₀ par rapport à la formulation de référence. Il est intéressant de noter que la formulation huileuse augmente la biodisponibilité du CoQ₁₀, jusqu'à 38 fois comparé à la formulation commerciale de référence.

4.3.2.3.2 Etude sur modèle rat

La supplémentation quotidienne en CoQ₁₀ chez l'homme, par le biais de compléments alimentaires, varie de 30 à 90 mg/jour. Pour répondre à cette attente, nous avons réalisé une deuxième étude permettant un apport de 60 mg/Kg en accord avec plusieurs travaux évaluant la biodisponibilité du CoQ₁₀ en utilisant différentes formulations (Balakrishnan *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2010).

Trois formulations ont été testées chez le rat en dose aigüe (60 mg/Kg) : la formulation huileuse (huile de saumon + lécithine de saumon + CoQ₁₀), l'émulsion et la formulation galénique de référence (Pharma Nord). Deux groupes témoins (lécithine de saumon + eau) ont également été étudiés pour comparer et éliminer l'effet de l'eau et de la lécithine.

Les résultats obtenus sont en accord avec les profils pharmacocinétiques correspondants à une administration orale d'un principe actif. En effet, le taux de CoQ₁₀ dans le plasma, commence à augmenter après l'administration des trois formulations testées (émulsion, formulation huileuse et Pharma Nord), correspondant à la phase d'absorption. Cette phase commence à partir de l'administration des formulations jusqu'au T_{max} correspondant à la concentration maximale (C_{max}) atteinte (Miles, 2007). Durant la phase d'absorption, le CoQ₁₀, par l'intermédiaire des chylomicrons, traverse les cellules intestinales pénétrant ainsi dans la circulation systémique. L'absorption du CoQ₁₀ à travers la muqueuse intestinale met en œuvre les mécanismes de diffusion active et passive (Palamakula, 2005). En effet, le maximum d'absorption du CoQ₁₀ s'effectue au niveau du duodénum et du colon, l'iléon et enfin le jéjunum (Palamakula, 2005). A partir de C_{max}, il s'agit de la phase de distribution, où le CoQ₁₀ est incorporé avec les lipoprotéines dans les cellules hépatiques. Le CoQ₁₀ est ensuite libéré dans le sang, généralement associé aux VLDL et LDL.

Les résultats montrent que la formulation émulsionnée permet une meilleure biodisponibilité du CoQ₁₀ suivie de la formulation commerciale (Pharma Nord) et de la lécithine (Figure 4:25). Les profils pharmacocinétiques obtenus dans le cas de ces dernières formulations ne présentent pas de différences significatives.

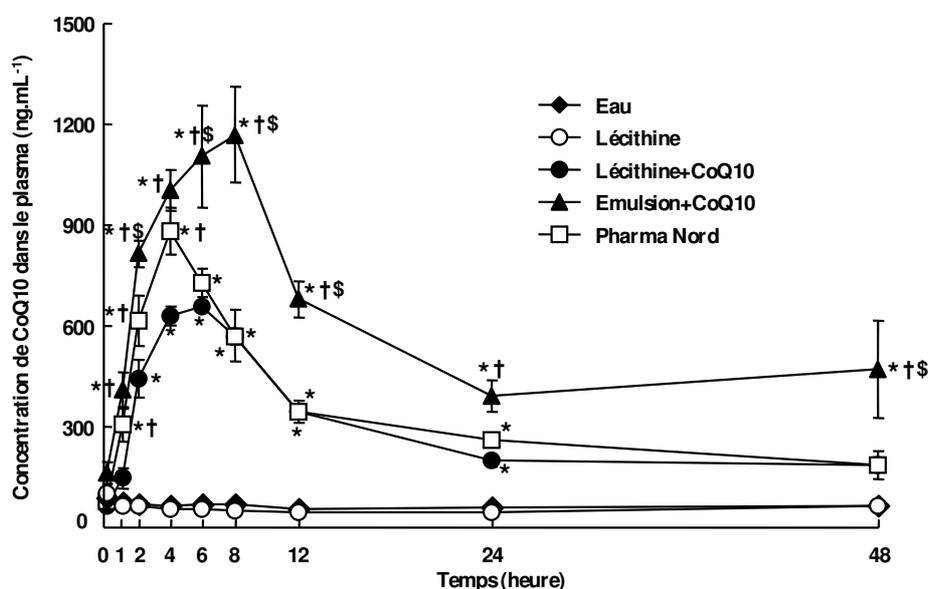


Figure 4:25 Biodisponibilité du CoQ₁₀ vectorisé sous trois formulations différentes chez les rats
 (* : P<0.05 vs Lécithine, † : P<0.05 vs Lécithine+CoQ₁₀, \$: P<0.05 vs Pharma Nord)

Les acides gras polyinsaturés retrouvés dans la formulation huileuse ainsi que dans l'émulsion ont un effet concentration dépendant important sur les membranes biologiques, augmentant leur fluidité. Une fois en contact avec les membranes des cellules intestinales, les AGPI-LC y sont intégrés, permettant ainsi une meilleure absorption du principe actif (Onuki, 2008). En effet, l'administration de l'insuline à l'aide de lipides fonctionnels, notamment l'EPA et le DHA, améliore son absorption à travers la muqueuse intestinale (Onuki, 2008).

La quantification de la biodisponibilité se fait à partir d'une forme galénique de référence, représentée par Pharma Nord dans notre cas. Pour comparer l'efficacité des formulations testées, nous avons déterminé l'aire sous la courbe (ASC ou AUC : Area Under Curve) qui représente la quantité du principe actif disponible au niveau sanguin en fonction du temps (Figure 4:26). Les valeurs des aires sous les courbes confirment l'efficacité de l'émulsion qui présente une concentration plasmatique de 261145 ng h/mL, deux fois supérieure à l'AUC de la formulation huileuse (12791 ng h/mL).

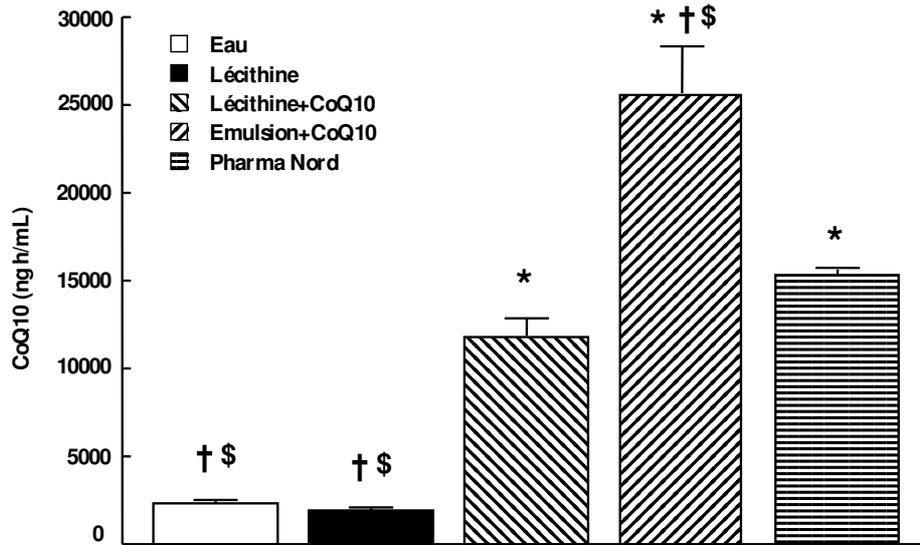


Figure 4:26 Présentation des aires sous les courbes de biodisponibilités obtenues pour les différentes formulations (* : $P < 0.05$ vs Lécithine, † : $P < 0.05$ vs Lécithine+CoQ₁₀, \$: $P < 0.05$ vs Pharma Nord)

L'AUC obtenue, après administration de la formulation Pharma Nord, est relativement plus élevée (15380 ng h/mL) par rapport à la formulation huileuse.

Les concentrations plasmatiques maximales de CoQ₁₀ atteintes (C_{max}) dans le cas d'une supplémentation en formulation huileuse, en émulsion et en formulation commerciale, sont respectivement de 659,29 ; 1217,43 et 877 ng/mL (Figure 4:27).

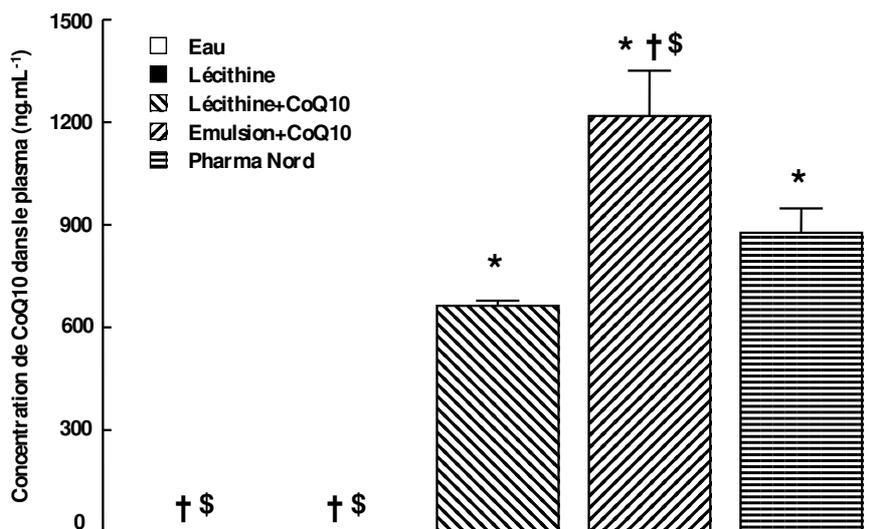


Figure 4:27 Présentation de la concentration plasmatique maximale en CoQ₁₀ pour les différents types de traitements (* : $P < 0.05$ vs Lécithine, † : $P < 0.05$ vs Lécithine+CoQ₁₀, \$: $P < 0.05$ vs Pharma Nord)

Généralement, le temps maximal correspondant à la concentration maximale de CoQ₁₀ varie entre 6 et 8h en fonction de la dose administrée (Miles, 2007). Dans notre cas, le T_{max} varie de 4 à 6h (Figure 4:28). Pour la formulation commerciale de référence, la C_{max} est atteinte 4h après le gavage, précédée par la formulation huileuse (5h et 30 min) puis par l'émulsion (6h).

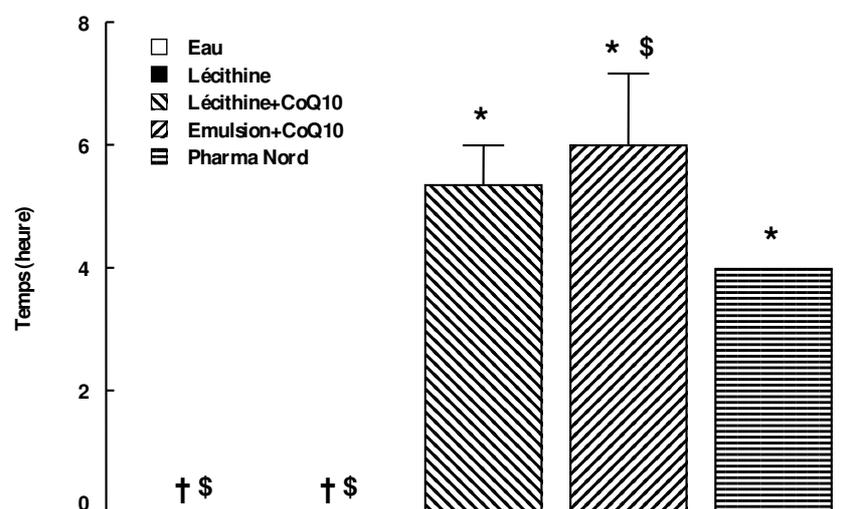


Figure 4:28 Présentation du temps maximal correspondant à la concentration plasmatique maximale de CoQ₁₀ (* : P<0.05 vs Lécithine, † : P<0.05 vs Lécithine+CoQ₁₀, \$: P<0.05 vs Pharma Nord)

Le CoQ₁₀ vectorisé par la formulation Pharma Nord, est rapidement absorbé pour atteindre sa concentration maximale plasmatique 4h après le traitement. Si on considère le temps de demi-vie du CoQ₁₀ dans le plasma, il est inversement proportionnel au T_{max} (Figure 4:29). En effet, en pharmacologie, la demi-vie désigne par extension le temps nécessaire pour que la quantité d'une substance contenue dans un système biologique soit diminuée de la moitié de sa valeur initiale. L'émulsion permet un temps de demi-vie de 13h qui est très proche de celui lié à l'administration de la formulation huileuse, contrairement à la formulation commerciale (8h). Avec les deux formulations développées au LIBio, le CoQ₁₀ est présent plus longtemps dans l'organisme, permettant d'espacer les prises de ce principe actif.

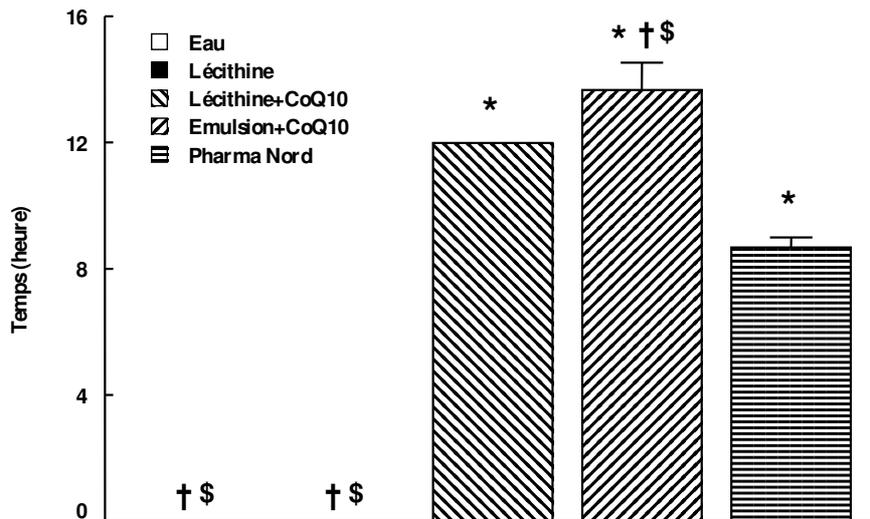


Figure 4:29 Temps de demi-vie du CoQ₁₀ dans le plasma en fonction des formulations (* : P<0.05 vs Lécithine, † : P<0.05 vs Lécithine+CoQ₁₀, \$: P<0.05 vs Pharma Nord)

4.3.3 Vectorisation et effet anticancéreux de la curcumine

4.3.3.1 Test de solubilité de la curcumine dans l'huile de saumon et l'huile de colza

Le log de P de la curcumine est de 2,5 ce qui explique sa faible solubilité à la fois dans l'huile et dans l'eau et par conséquent sa faible biodisponibilité. Pour augmenter la biodisponibilité de la curcumine, nous allons la vectoriser dans des nanoémulsions formulées à partir d'huile de saumon et de colza. Pour les mêmes raisons citées dans le cas du CoQ₁₀, nous avons tout d'abord évalué la solubilité de la curcumine dans ces deux huiles complètement différentes. La courbe d'étalonnage de la curcumine dans le méthanol, à 425 nm, a été utilisée pour déterminer la concentration maximale de solubilité dans l'huile de saumon et l'huile de colza.

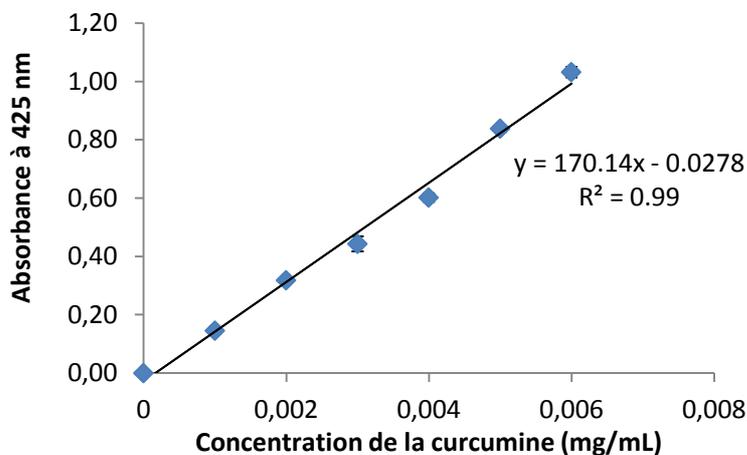


Figure 4:30 Courbe étalon de la curcumine dans du méthanol à 425 nm

Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 4:44. En se basant sur la nature des acides gras composant l'huile de saumon et l'huile de colza, nous remarquons que ces dernières contiennent respectivement 20,53 et 6,51% d'acides gras saturés, 49,49 et 64,83% d'acides gras monoinsaturés et 29,98 et 28,64% d'acides gras polyinsaturés. En effet le fait qu'il y ait plus d'acides gras saturés dans l'huile de saumon explique que la curcumine soit plus soluble dans celle-ci plutôt que dans l'huile de colza.

Tableau 4:44 Solubilité maximale de la curcumine dans l'huile de saumon et l'huile de colza

Curcumine	Huile de saumon	Huile de colza
Solubilité (mg /ml)	0,33 ± 0,07	0,18 ± 0,05

4.3.3.2 Détermination du temps d'induction oxydatif (OIT) par calorimétrie différentielle à balayage

Dans le but d'évaluer l'effet protecteur de la curcumine sur les phénomènes d'oxydation des huiles utilisées dans la formulation des émulsions, nous avons analysé le temps d'induction oxydatif des différents mélanges à l'aide de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC). La curcumine inhibe la peroxydation lipidique et neutralise les radicaux libres et hydroxyles en diminuant la génération des radicaux NO (oxyde nitrique) mais cela de manière dose dépendante (Edeas, 2006).

Nous avons tout d'abord déterminé les propriétés thermiques de la curcumine qui révèlent la présence d'un pic de fusion à 180°C, conformément aux caractéristiques présentées par Sigma Aldrich.

L'analyse des différents thermogrammes de l'huile de saumon montre, que la curcumine peut agir, en fonction de la dose, en tant qu'antioxydant ou pro-oxydant (Tableau 4:45). Respectivement à des concentrations de 50 et 100 µg/ml, la curcumine joue son rôle d'antioxydant, en augmentant l'OIT de 54 min pour l'huile de saumon brute à 61,2 et 64,2 min. A partir de 150 µg de curcumine/ml le temps d'induction diminue (50,9 min) présentant un comportement pro-oxydant.

On remarque d'autre part, que l'OIT de l'huile de saumon brute (54 min) ne varie pas de manière significative en ajoutant 330 µg/ml de curcumine (54,6 min). Cependant, comparé à l'huile brute dont la pente de thermo-oxydation débute à partir 63 min, celle du mélange curcumine-huile (330 µg/ml) débute à 40 min. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la

pente soit très faible mais tout de même précoce ce qui confirme qu'à cette concentration de 330 µg/mL la curcumine reste pro-oxydante.

Parallèlement, nous avons effectué le test de l'OIT sur l'huile de colza (Tableau 4:45) avec différentes concentrations de curcumine. Pour la concentration maximale de solubilité de la curcumine (180 µg/mL), le résultat obtenu montre un comportement pro-oxydant de la curcumine (143,3 min) comparé à l'huile de colza brute (275,1 min). Nous avons donc nettement diminué la concentration de la curcumine (25 µg/mL) pour pouvoir observer son effet protecteur sur l'huile de colza. Le résultat est plus intéressant lorsque l'on rajoute une concentration de 180 µg/mL de curcumine car le temps d'induction augmente jusqu'à 193,3 min. Cependant, l'effet pro-oxydant de la curcumine est toujours observé. Bien qu'il existe plusieurs études sur l'effet antioxydant de la curcumine, nous avons trouvé très peu d'études sur son effet pro-oxydant (Huo *et al.*, 2009). Nous avons émis l'hypothèse de l'influence de la présence d'antioxydants naturels endogènes dans l'huile de colza qui agiraient en synergie avec la curcumine ajoutée. Cela se traduirait par une diminution du temps d'induction dans le mélange huile de colza-curcumine.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons éliminé tous les antioxydants de l'huile de colza en la purifiant sur colonne de silice sous vide. L'huile obtenue a été ensuite analysée par DSC en absence et en présence de curcumine (Tableau 4:45). L'OIT de l'huile brute purifiée augmente (310,1 min) en comparaison avec l'huile de colza brute (275,1 min) expliquant en partie l'action des antioxydants de l'huile.

En rajoutant des concentrations de 25 µg/ml et 15 µg/mL de curcumine dans l'huile de colza purifiée, les OIT relevés sont, respectivement, de 274,8 min et 276,8 min. Il n'y a donc pas d'influence significative entre les deux concentrations utilisées. Par ailleurs, ces résultats d'OIT sont plus élevés que ceux obtenus dans le cas de l'huile de colza brute.

Pour conclure cette discussion, l'effet pro-oxydant de la curcumine dans l'huile de colza est présent, mais quelque peu atténué par l'étape de purification de l'huile. Les antioxydants de l'huile auraient eux même un effet pro-oxydant dans les conditions opératoires choisies (110°C). L'OIT est en effet une technique permettant d'évaluer la stabilité oxydative des huiles sur une longue période. D'autre part, nous émettons l'hypothèse que la curcumine ne supporterait pas la température de 110°C. Nous avons envisagé, comme perspective de cette étude, d'utiliser d'autres méthodes pour évaluer l'effet antioxydant des concentrations

de solubilisation maximale de la curcumine à température ambiante, telles que l'infrarouge et l'indice de polyènes.

Tableau 4:45 Temps d'induction à l'oxydation d'huiles de saumon et de colza formulées avec différentes concentrations de curcumine

Huile	Concentration en curcumine	Temps d'induction à l'oxydation
Huile de saumon	-	54 min (pente débute à 63 min)
Huile de saumon	50 µg/ml	61,2 min
Huile de saumon	100 µg/ml	64,2 min
Huile de saumon	150 µg/ml	50,9 min
Huile de saumon	330 µg/ml	54,6 min (pente débute à 63 min)
Huile de colza	-	275,1 min
Huile de colza	25 µg/mL	193,3 min
Huile de colza	180 µg/ml	143,3 min
Huile de colza purifiée	-	310,1 min
Huile de colza purifiée	25 µg/ml	274,8 min
Huile de colza purifiée	15 µg/mL	276,8 min

4.3.3.3 Stabilité des émulsions

Le diamètre hydraulique moyen et la mobilité électrophorétique des gouttelettes lipidiques sont mesurés immédiatement après la préparation des émulsions (T0). En raison de la stabilité accrue des émulsions, la taille et la mobilité ont été mesurées une fois par semaine. En effet, les résultats de taille, de mobilité électrophorétique et l'indice de polydispersité montrent que les émulsions sont très stables pendant 30 jours de stockage à température ambiante. La taille des gouttelettes varie de 161,92 à 163,97 nm pour l'émulsion de saumon contenant la curcumine (Tableau 4:46).

Nous remarquons par contre que pour l'émulsion végétale à base d'huile et de lécithine de colza, la taille des émulsions est plus importante et varie de 205 à 211 nm pour l'émulsion vectrice de curcumine (Tableau 4:47).

Comme dans le cas des émulsions témoins, l'émulsion végétale est composée de gouttelettes de taille plus élevée que l'émulsion d'origine marine. Cette faible différence de taille est probablement due à la composition en acides gras et en classes lipidiques des lécithines utilisées. En effet, nous retrouvons plus de PC dans la lécithine de saumon (28,11%) que celle de colza (11,69%) alors que le pourcentage de PE est très proche (13,53% et 13,89% respectivement pour la lécithine de saumon et de colza). Le pourcentage de PC pourrait, en plus de la nature des acides gras, être responsable de cette différence.

La mobilité électrophorétique montre également que l'émulsion reste stable durant la période de stockage. En effet, plus la valeur absolue de la mobilité électrophorétique des

gouttelettes est élevée, plus elles vont avoir tendance à moins coalescer. L'indice de polydispersité ne dépasse pas la valeur de 0,17. Cette valeur montre une grande stabilité des émulsions et ne laisse pas apparaître différentes populations de taille de gouttelettes lipidiques en fonction du temps.

Tableau 4:46 Evolution de la moyenne des paramètres physiques des gouttelettes lipidiques de l'émulsion formulée à partir d'huile et lécithine de saumon en fonction du temps (n=5)

Jours	Saumon (10%)					
	Taille (nm)		Mobilité électrophorétique ($\mu\text{mcm/Vs}$)		Indice de polydispersité	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
0	161,92	1,33	-3,37	0,07	0,14	0,01
7	163,27	2,11	-3,98	0,1	0,15	0,01
14	162,3	0,87	-4,11	0,03	0,16	0,01
22	159,33	2,46	-3,58	0,07	0,16	0,02
30	162,03	1,01	-3,78	0,06	0,15	0,02

Tableau 4:47 Evolution de la moyenne des paramètres physiques des gouttelettes lipidiques de l'émulsion formulée à partir d'huile et lécithine de colza en fonction du temps (n=5)

Jours	Colza (10%)					
	Taille (nm)		Mobilité électrophorétique ($\mu\text{mcm/Vs}$)		Indice de polydispersité	
	Moyenne	ET	Moyenne	ET	Moyenne	ET
0	205,7	0,96	-3,23	0,03	0,14	0,01
7	210,53	2,07	-3,37	0,02	0,15	0,01
14	212,67	1,25	-3,4	0,03	0,16	0,01
22	209,07	2,05	-3,54	0,06	0,16	0,03
30	211,47	0,74	-3,44	0,03	0,16	0,02

4.3.3.4 Effet de la vectorisation sur l'activité anticancéreuse de la curcumine

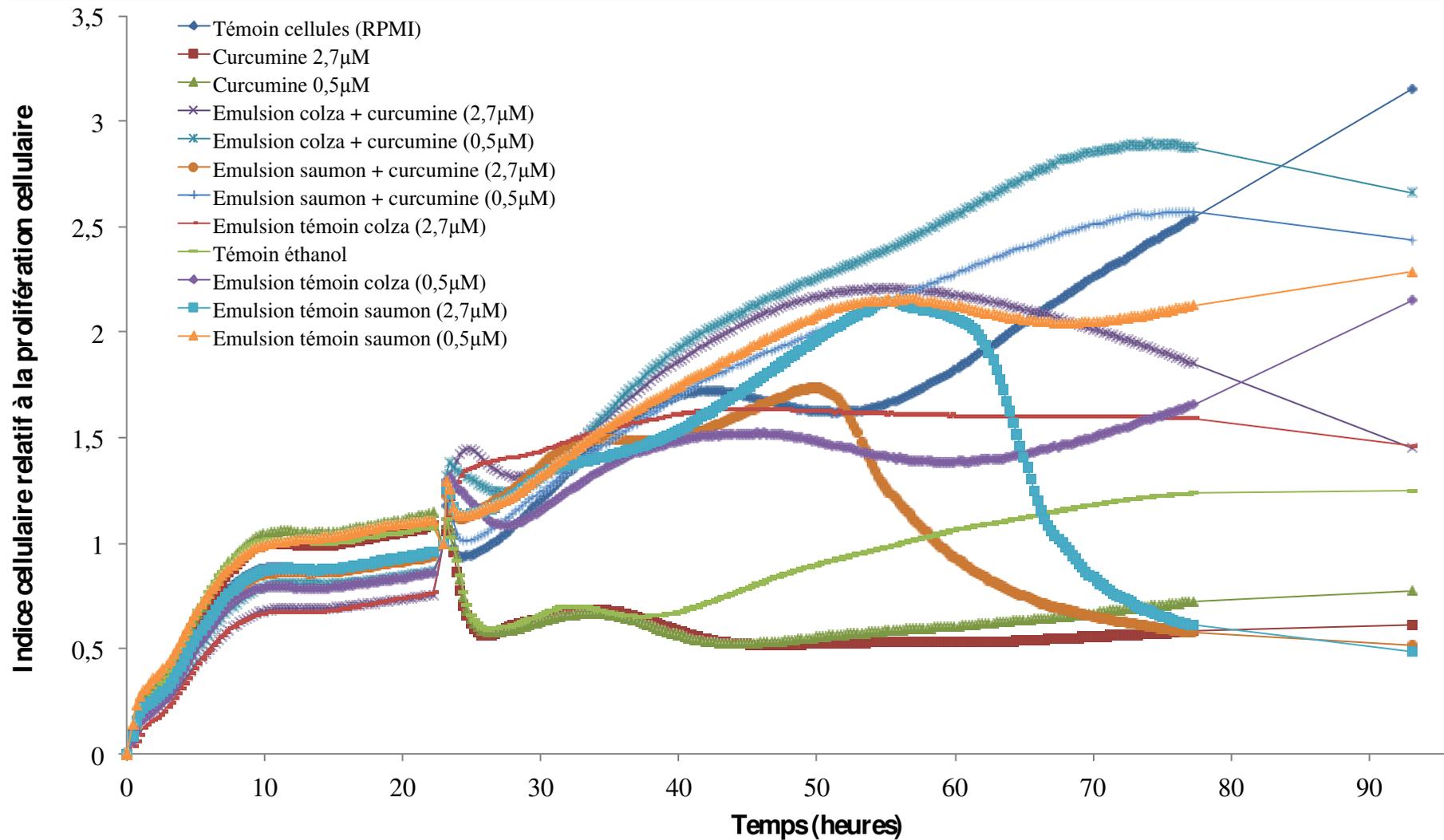
Les cinétiques de croissance cellulaire sont mesurées au cours de 77h de contact des traitements élaborés, avec les cellules MCF7 (Figure 4:31). Après 22,5 h d'incubation, les différentes formulations de curcumine ont été mises en contact avec les cellules. Une normalisation des indices cellulaires afin de comparer les effets des traitements appliqués a été effectuée. Il apparaît que la cinétique de croissance des cellules cancéreuses (MCF7) est exponentielle jusqu'à 39h d'incubation, avant de s'infléchir et faire apparaître un plateau entre 39 et 55h d'incubation. La croissance cellulaire reprend après 55h avec la même vitesse que la première phase exponentielle. De manière générale, les différents traitements appliqués aux cellules influencent leur cinétique de croissance.

L'éthanol seul, testé en tant que témoin, diminue l'impédance cellulaire jusqu'à 38h de contact, puis nous remarquons une augmentation de celle-ci jusqu'à la fin du traitement. L'effet de la curcumine, solubilisée dans l'éthanol, à 0,5 et 2,7 μM est aperçu après 38h de contact où l'indice cellulaire reste faible et constant, contrairement à l'éthanol seul. Au bout de 55h de contact, nous remarquons, cependant, une légère croissance cellulaire chez les cellules traitées avec la plus faible dose de curcumine.

Les deux émulsions témoins à base de lipides de colza et de saumon présentent un effet concentration dépendant sur les cellules cancéreuses MCF7. En effet, la concentration en émulsion témoin, permettant de vectoriser 0,5 μM de curcumine, a un effet positif sur la croissance cellulaire, plus prononcé dans le cas de l'émulsion formulée à partir de lipides marins. Une concentration en émulsion témoin, formulée à partir de lipides végétaux permettant de vectoriser 2,7 μM de curcumine, n'entraîne pas de croissance cellulaire. Cette dernière reste constante en fonction du temps, contrairement à l'émulsion marine, qui conduit à une mort cellulaire se traduisant par une chute de l'indice cellulaire après 62h de contact.

Avec une concentration de 0,5 μM de curcumine, la prolifération cellulaire s'accélère avec les deux émulsions végétale et marine, comparées à la cinétique de croissance des témoins (cellules et émulsions). Les émulsions, vectorisant 2,7 μM de curcumine, présentent une augmentation de la croissance cellulaire, plus prononcée dans le cas de l'émulsion végétale, avant de voir apparaître une chute de l'indice cellulaire à partir 50h pour l'émulsion marine, et de 55h pour l'émulsion végétale.

Figure 4:31 Cinétique de prolifération cellulaire des cellules cancéreuses mammaires (MCF7) en fonction de la vectorisation de curcumine sous forme nanoémulsionnée, formulée à partir de fractions lipidiques marine et végétale à différentes concentrations.



L'émulsion à base d'huile et de lécithine de saumon semble avoir un effet inhibiteur sur la cinétique de croissance des cellules MCF7 mais moins important que celui de la curcumine seule. En tenant compte de l'effet de l'éthanol, nous ne pouvons pas comparer l'efficacité de la vectorisation par rapport à la molécule solubilisée dans ce solvant. Nous allons donc en perspective changer le solvant de solubilisation pour faire ressortir l'effet réel de la curcumine seule pour les deux concentrations (0,5 et 2,7 μM). Il est cependant intéressant de noter que les lipides d'origine marine permettent de réduire le développement des cellules cancéreuses. Ce phénomène pourrait s'expliquer notamment par les effets inhibiteurs des AGPI-

LC (EPA et DHA) sur la cyclo-oxygénase (COX) réduisant ainsi le taux de prostaglandines tout en favorisant l'activité de la lipo-oxygénase (LOX). Une augmentation de la production des acides hydroxy-eicosatriénoïques et des leukotriènes B4 retarderait ainsi le processus d'invasion des cellules cancéreuses (Narayan *et al.*, 2006). Une étude expérimentale *in vivo* a montré que le DHA est plus efficace que l'EPA pour inhiber les facteurs de transcription activateurs de la protéine 1 (AP-1) impliquée dans le développement du cancer (Narayan *et al.*, 2006).

5 Conclusions et perspectives

L'objectif de ce travail portait sur l'étude d'un complexe phospholipopeptidique extrait par voie enzymatique à partir de têtes de saumon. Ce procédé breveté, respectueux de l'environnement et non drastique, permet au Laboratoire Le Stum de commercialiser un produit intégrant une forme lyophilisée du CPLP, qui se démarque des produits généralement trouvés sur le marché des compléments alimentaires. La maîtrise des conditions d'extraction conduit à l'obtention d'une huile de saumon principalement composée d'une fraction triglycéridique riche en acides gras polyinsaturés à longue chaîne. Cette huile présente des qualités intéressantes de par la présence d'antioxydant naturel (astaxanthine) mais aussi en raison d'une proportion d'acide docosahexaénoïque supérieure à celle de l'acide eicosapentaénoïque, ratio qui est différent par exemple dans l'huile de Krill. Outre l'huile de saumon, l'extraction sans solvant organique permet de récupérer après étape de centrifugation une fraction d'hydrolysats peptidiques dont la taille peut être maîtrisée par le contrôle de la cinétique d'hydrolyse (maîtrise du degré d'hydrolyse). Ces deux premières fractions, déjà étudiées au LIBio à l'échelle pilote, n'ont pas fait l'objet d'études approfondies au cours de ce travail.

Les recherches se sont focalisées sur les différentes fractions lipidiques et peptidiques du CPLP qui semblent donner des résultats contre l'hyperactivité. La mise en évidence de l'effet anxiolytique a été démontrée par l'utilisation d'une batterie de tests comportementaux sur un modèle murin. Pour cela, il a été nécessaire de caractériser d'un point de vue physicochimique la fraction lipidique. Sa composition en lipides totaux a été optimisée sur le plan industriel à 30% et présente 65,5% de lipides polaires. Cette fraction lipidique est fortement concentrée en EPA (10,5%) et en DHA (20,3%), estérifiés majoritairement sur les lipides polaires avec des teneurs respectives de 9% et de 36,5%. Une étude comparative avec un produit à base d'huile de Krill a permis de mettre en évidence certaines différences significatives avec les lipides polaires issus de saumon. La comparaison des phospholipides notamment de PC et de PE, provenant du CPLP avec ceux provenant du Krill, nous a permis de mettre en évidence la forte teneur en DHA par rapport à l'EPA de la PC et de la PE de têtes de saumon, respectivement de 24,76% et 37,83%. Contrairement aux phospholipides de têtes de saumon, les phospholipides du Krill comportent majoritairement de l'EPA avec des teneurs de 29,7% et 12,2%, respectivement dans la PC et la PE. Les résultats de répartition montrent que ces AGPI-LC des deux produits analysés, CPLP et Krill, sont majoritairement positionnés en *sn*-2. Cette position est plus favorable à la protection contre

l'hydrolyse par les lipases et augmente fortement la biodisponibilité de ces acides gras. Ces deux produits, riches en EPA et DHA estérifiés sur des phospholipides en proportions différentes, pourraient avoir des potentialités différentes dans la prévention de maladies cardiovasculaires (rôle accru de l'EPA) et des maladies neurodégénératives (rôle prépondérant du DHA).

Une caractéristique majeure du CPLP est la présence d'hydrolysats peptidiques permettant une excellente digestibilité sans éructation ni remontée d'odeur de poisson, typique des huiles de poisson. Avec une teneur en peptides de 82%, la composition de l'hydrolysate met en exergue la présence d'acides aminés présentant un pouvoir antioxydant comme l'arginine, la proline, l'histidine, la tyrosine et la lysine. Les études de protéomique nous ont permis d'identifier les protéines natives de têtes de saumon. La cartographie de toutes les séquences des peptides formés après l'hydrolyse enzymatique des têtes de saumon nous laisse en perspective une étude d'identification des propriétés fonctionnelles de chacune de ces séquences par consultation des bases de données avant étape de purification.

L'association de la fraction lipidique riche en phospholipides et en AGPI-LC associée à la fraction peptidique fait de ce complexe, un principe actif quasiment unique aujourd'hui sur le marché des compléments alimentaires.

L'analyse des minéraux du CPLP n'a révélé aucune trace de métaux lourds dangereux pour la santé du consommateur, ni pouvant influencer les tests comportementaux effectués *in vivo*. Afin d'étudier les effets à l'origine de la diminution de l'anxiété, le niveau du statut oxydatif des ROS endogènes des neurones du système nerveux central a été évalué après 14 jours de traitement. Les résultats *in vitro* obtenus décrivent un pouvoir antioxydant des composants peptidiques et des lipides du CPLP administrés pendant 14 jours à double dose. Beaucoup d'études animalières et cliniques ont porté sur les effets comportementaux d'une déficience ou d'une complémentation en AGPI. Toutefois, les mécanismes d'action de ces acides gras aux propriétés anxiolytiques-like restent encore méconnus. Il en va de même pour les hydrolysats peptidiques marins et leur vectorisation sous la forme d'un CPLP, pour lesquels aucune étude ne mentionne un effet sur l'anxiété.

Du fait de leurs fonctions et de leurs intérêts biologiques, les lipides totaux du CPLP ont été utilisés pour vectoriser et augmenter la biodisponibilité de molécules hydrophobes peu disponibles. Cette étape de travail, a donné naissance à deux formulations différentes et efficaces, permettant d'augmenter la biodisponibilité du CoQ₁₀ chez des souris et des rats. La

première formulation huileuse s'inscrit dans le cadre d'une prévention thérapeutique dans le cas de certaines maladies liées au stress oxydant et au dysfonctionnement mitochondrial impliquant le CoQ₁₀. Dans ce cas, une supplémentation avec une forte dose est recommandée parallèlement au traitement. D'autre part, une formulation nano-émulsionnée à base de CoQ₁₀ et de lipides totaux riches en phospholipides et en oméga-3, améliore la biodisponibilité de ce dernier par rapport à une formulation commerciale permettant ainsi une supplémentation journalière à des doses classiques.

Durant ce travail, la biodisponibilité de la curcumine a également été étudiée dans le but d'accentuer son effet anticancéreux sur des cellules malignes mammaires de type MCF7. Les résultats de cette étude nous ont révélé l'efficacité de la formulation émulsionnée en diminuant la prolifération cellulaire. Cependant, l'émulsion à bases d'ingrédients marins présente un effet précoce sur la chute de la prolifération cellulaire par rapport à l'émulsion à base de lipides d'origine végétale. D'autre part, l'effet de la curcumine seule est masqué par la présence d'éthanol en raison de son caractère insoluble mis à part en phase organique.

De par sa composition physicochimique, le complexe phospholipopeptidique présente un potentiel important dans le domaine de la supplémentation en acide gras de la série oméga-3 ainsi que dans le domaine thérapeutique, compte tenu de son effet anxiolytique-like. Du fait de son effet antioxydant endogène sur les neurones, le CPLP pourrait intervenir dans la prévention de maladies neurodégénératives liées à un stress oxydant comme la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer...

Il découle de ces travaux réalisés, un certain nombre de perspectives intéressantes pour la compréhension des mécanismes d'action et l'identification des molécules d'intérêt présentes dans le CPLP. Certaines perspectives concerneront l'étude approfondie des différentes séquences de peptides actifs retrouvées dans l'hydrolysate afin d'enrichir les données de la littérature. Il serait également intéressant de déterminer dans ce mélange de peptides et d'acides aminés, celui à l'origine de cet effet anxiolytique-like, par l'intermédiaire de tests comportementaux et des études des mécanismes d'actions possibles. D'autre part, un protocole est en cours de développement, pour déterminer la position des acides gras au niveau des phospholipides, notamment par spectrométrie de masse.

L'activité anticancéreuse déterminée par analyse de la prolifération cellulaire *in situ* sera poursuivie, en testant différentes concentrations de curcumine pour faire ressortir plus clairement l'effet du vecteur.

Ce travail donnera lieu à quatre publications scientifiques à partir des résultats obtenus :

- Regiospecific distribution of fatty acids in salmon head and Krill phospholipids using phospholipase A₂ and a new methodology implementing mass spectrometry.
- Improving bioavailability of CoQ₁₀ using nanoemulsions based on polyunsaturated fatty acids from salmon head lecithin.
- Anxiolytic effect of salmon head phospholipopeptidic complex: effect of lipid and hydrolyzate fraction.
- Comparing effects on breast cancer cells (MCF7) between curcumine and curcumine encapsulated by marine nanoemulsion.

6 Références bibliographiques

- Agricultural Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Nutrient Data Laboratory.
- Aberg, F., Appelkvist, E.L., Dallner, G., Ernster, L., (1992). Distribution and redox state of ubiquinones in rat and human tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 295(2), 230-234.
- Ackman, R., (1998). Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of the fatty acids of fish oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(4), 541-545.
- Adam, D.J.D., Hansen, A.E., Wiese, H.F., (1958). Essential fatty acids in infant nutrition II : effect of linoleic acid on caloric intake. *The Journal of Nutrition* 66, 555-564.
- Adeniyi, O.D., Bawa, A.A., (2006). Mackerel (*Scomber Scrombrus*) Oil Extraction and Evaluation as Raw Materials for Industrial Utilization. *Leonardo Journal of Sciences* (8), 33-42
- Adler-Nissen, J., (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 27(6), 1256-1262.
- Adler-Nissen, J., (1984). Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology* 34(3), 215-222.
- Adlof, R.O., (1995). Analysis of triacylglycerol positional isomers by silver ion high performance liquid chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography* 18(2), 105-107.
- Ak, T., Gülçin, I., (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chemico-Biological Interactions* 174(1), 27-37.
- Al Sayed Mahmoud, K., (2007). Extraction, fractionnement et caractérisation des lipides polyinsaturés d'oeuf de la truite arc-en-ciel. INPL-Nancy, Nancy.
- Alkanani, T., Parrish, C.C., Thompson, R.J., McKenzie, C.H., (2007). Role of fatty acids in cultured mussels, *Mytilus edulis*, grown in Notre Dame Bay, Newfoundland. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 348(1-2), 33-45.
- Ando, Y., Nishimura, K., Aoyanagi, N., Takagi, T., (1992). Stereospecific analysis of fish oil triacyl-sn-glycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69(5), 417-424.
- Andreani, T., Doktorovová, S., Lopes, C.M., Souto, E.B., (2011). Nanobiotechnology approaches for targeted delivery of pharmaceuticals and cosmetics ingredients. *International Journal of Nanotechnology* 8(1-2), 66-83.
- Andreo, A.I., Doval, M.M., Romero, A.M., Judis, M.A., (2003). Influence of heating time and oxygen availability on lipid oxidation in meat emulsions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105(5), 207-213.
- AOAC, (1990). *Official Methods of Analysis*, Washington DC.
- Arain, S., Sherazi, S.T.H., Bhangar, M.I., Talpur, F.N., Mahesar, S.A., (2009). Oxidative stability assessment of *Bauhinia purpurea* seed oil in comparison to two conventional vegetable oils by differential scanning calorimetry and Rancimat methods. *Thermochimica Acta* 484(1-2), 1-3.
- Aubourg, S.P., Losada, V., Prego, R., (2007). Distribution of lipids and trace minerals in different muscle sites of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*). *International Journal of Food Science and Technology* 42(12), 1456-1464.
- Aubourg, S.P., Medina, I., Pérez-Martin, R., (1996). Polyunsaturated fatty acids in tuna phospholipids: Distribution in the sn-2 location and changes during cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44(2), 585-589.

- Aursand, M., Mabon, F., Martin, G., (2000). Characterization of farmed and wild salmon (*Salmo salar*) by a combined use of compositional and isotopic analyses. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77(6), 659-666.
- Averina, E.S., Müller, R.H., Popov, D.V., Radnaeva, L.D., (2011). Physical and chemical stability of nanostructured lipid drug carriers (NLC) based on natural lipids from Baikal region (Siberia, Russia). *Pharmazie* 66(5), 348-356.
- Balakrishnan, P., Lee, B.-J., Oh, D.H., Kim, J.O., Lee, Y.-I., Kim, D.-D., Jee, J.-P., Lee, Y.-B., Woo, J.S., Yong, C.S., Choi, H.-G., (2009). Enhanced oral bioavailability of Coenzyme Q10 by self-emulsifying drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* 374(1-2), 66-72.
- Bang, H.O., Dyerberg, J., (1972). Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic West Coast Eskimos *Acta Medica Scandinavica* 192(1-6), 85-94.
- Bazan, N.G., Marcheselli, V.L., Cole-Edwards, K., (2005). Brain response to injury and neurodegeneration: Endogenous neuroprotective signaling, pp. 137-147.
- Belhaj, N., Arab-Tehrany, E., Linder, M., (2010). Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochemistry* 45(2), 187-195.
- Belzung, C., Le Pape, G., (1994). Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for measurement of anxiety. *Physiology and Behavior* 56(3), 623-628.
- Bhandari, K.H., Newa, M., Kim, J.A., Yoo, B.K., Woo, J.S., Lyoo, W.S., Lim, H.T., Choi, H.G., Yong, C.S., (2007). Preparation, Characterization and Evaluation of Coenzyme Q10 Binary Solid Dispersions for Enhanced Solubility and Dissolution. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 30(6), 1171-1176.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R.G., (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology* 99(2), 335-343.
- Bilkei-Gorzo, A., Gyertyan, I., (1996). Some doubts about the basic concept of hole-board test. *Neurobiology* 4(4), 405-415.
- Biscione, F., Pignalberi, C., Totteri, A., Messina, F., Altamura, G., (2007). Cardiovascular effects of omega-3 free fatty acids. *Current Vascular Pharmacology* 5(2), 163-172.
- Blanchet, C., Lucas, M., Julien, P., Morin, R., Gingras, S., Dewailly, A., (2005). Fatty acid composition of wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids* 40(5), 529-531.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37(8), 911-917.
- Bockisch, M., (2010). Fish oil - from the bad and the ugly to the precious and good. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112(9), 948-960.
- Bouayed, J., Rammal, H., Soulimani, R., (2009). Oxidative stress and anxiety Relationship and cellular pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2(2).
- Bouayed, J., Rammal, H., Younos, C., Dicko, A., Soulimani, R., (2008). Characterization and bio-evaluation of polyphenols from some plum varieties and new fields for their use in health and diet. *Caractérisation et bioévaluation des polyphénols: Nouveaux domaines d'application en santé et nutrition* 6(2), 71-74.
- Bouglé, D., (2007). Functional peptides from the sea. *Peptides fonctionnels marins* 5(SUPPL. 1), HS22-HS26.
- Bougnoux, P., (1999). n-3 Polyunsaturated fatty acids and cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2(2), 121-126.

- Bourin, M., (2004). *Pharmacologie du récepteur GABAA*, Paris.
- Bousquet, M.L., Calon, F.d.r., Cicchetti, F., (2011). Impact of omega-3 fatty acids in Parkinson's disease. *Ageing Research Reviews* 10(4), 453-463.
- Boyd, L.C., Nwosu, V.C., Young, C.L., MacMillian, L., (1998). Monitoring lipid oxidation and antioxidant effects of phospholipids by headspace gas chromatographic analyses of rancimat trapped volatiles. *Journal of Food Lipids* 5(4), 269-282.
- Briley, M., Chopin, P., Moret, C., (1990). Effect of serotonergic lesion on 'anxious' behaviour measured in the elevated plus-maze test in the rat. *Psychopharmacology* 101(2), 187-189.
- Brochette, P., (1999). Emulsification : Elaboration et étude des émulsions. *Techniques de l'ingénieur : Agroalimentaire* 3(J2150), 18p.
- Bunaciu, A.A., Aboul-Enein, H.Y., Fleschin, û., (2007). FT-IR spectrophotometric analysis of coenzyme Q10 (CoQ10) and its pharmaceutical formulations. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 37(1), 59-65.
- Burri, L., (2011). Omega-3 fatty acids from Superba™ krill oil show increased bioavailability compared to triglyceride omega-3s, *The power of omega-3 phospholipids*, 2 ed. Agro Food Industry Hi-Tech, pp. 10-12
- Calviello, G., Serini, S., Piccioni, E., (2007). n-3 polyunsaturated fatty acids and the prevention of colorectal cancer: Molecular mechanisms involved. *Current Medicinal Chemistry* 14(29), 3059-3069.
- Cambiella, Å., Benito, J.M., Pazos, C., Coca, J., (2007). Interfacial properties of oil-in-water emulsions designed to be used as metalworking fluids. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 305(1-3), 112-119.
- Canselier, J.P., Poux, P., (2001). Procédés d'émulsification : Mécanismes de formation des émulsions. *Techniques de l'ingénieur : Agroalimentaire* 3(J2152), 14p.
- Cansell, M., (2010). Marine phospholipids as dietary carriers of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technology* 22(10), 223-226.
- Caramaschi, D., de Boer, S.F., Koolhaas, J.M., (2007). Differential role of the 5-HT1A receptor in aggressive and non-aggressive mice: An across-strain comparison. *Physiology & Behavior* 90(4), 590-601.
- Carignan, J., Hild, P., Mevelle, G., Morel, J., Yeghicheyan, D., (2001). Routine Analyses of Trace Elements in Geological Samples using Flow Injection and Low Pressure On-Line Liquid Chromatography Coupled to ICP-MS: A Study of Geochemical Reference Materials BR, DR-N, UB-N, AN-G and GH. *Geostandards Newsletter* 25(2-3), 187-198.
- Chalamaiah, M., Rao, G.N., Rao, D.G., Jyothirmayi, T., (2010). Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chemistry* 120(3), 652-657.
- Chansiri, G., Lyons, R.T., Patel, M.V., Hem, S.L., (1999). Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88(4), 454-458.
- Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean B-conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43(3), 574-578.
- Chen, Y.Q., Edwards, I.J., Kridel, S.J., Thornburg, T., Berquin, I.M., (2007). Dietary fat-gene interactions in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews* 26(3-4), 535-551.
- Chew, G.T., (2008). Hemodynamic effects of fenofibrate and coenzyme Q10 in type 2 diabetic subjects with left ventricular diastolic dysfunction. *Diabetes Care* 31(8), 1502-1509.

- Choi, C.H., Kim, S.H., Shanmugam, S., Baskaran, R., Park, J.S., Yong, C.S., Choi, H.G., Yoo, B.K., Han, K., (2010). Relative bioavailability of coenzyme Q10 in emulsion and liposome formulations. *Biomolecules and Therapeutics* 18(1), 99-105.
- Chopra, R.K., Goldman, R., Sinatra, S.T., Bhagavan, H.N., (1998). *Relative bioavailability of coenzyme Q10 formulations in human subjects*. Hogrefe & Huber, Bern, SUISSE.
- Christie, W., (2003). Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids, in: Associates, P.B. (Ed.), *Third Edition*. The Oily Press, England.
- Christie, W.W., (1982). *Lipid analysis*, Toronto.
- Clayton, E.H., Hanstock, T.L., Garg, M.L., Hazell, P.L., (2007). Long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of psychiatric illnesses in children and adolescents. *Acta Neuropsychiatrica* 19(2), 92-103.
- Clough, P., (2008). Marketing omega-3 products as nutraceuticals. *Nutrition and Health* 19(3), 233-234.
- Colas, J.-C., Shi, W., Rao, V.S.N.M., Omri, A., Mozafari, M.R., Singh, H., (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron* 38(8), 841-847.
- Collins-Gold, L.C., Lyons, R.T., Bartholow, L.C., (1990). Parenteral emulsions for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 5(3), 189-208.
- Constantinides, P.P., Scalart, J.P., Lancaster, C., Marcello, J., Marks, G., Ellens, H., Smith, P.L., (1994). Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water-in-oil microemulsions incorporating medium-chain glycerides. *Pharmaceutical Research* 11(10), 1385-1390.
- Crane, F.L., (2001). Biochemical functions of coenzyme Q10. *Journal of the American College of Nutrition* 20(6), 591-598.
- Crawford, M.A., (2000). Placental delivery of arachidonic and docosahexaenoic acids: Implications for the lipid nutrition of preterm infants. *American Journal of Clinical Nutrition* 71(1 SUPPL.), 275S-284S.
- Cudennec, B., Ravallec-Plé, R., Courois, E., Fouchereau-Peron, M., (2008). Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry* 111(4), 970-975.
- Curtis, J.M., (2007). Analysis of oils and concentrates, in: Breivik, H. (Ed.), *Long-Chain Omega-3 Specialty Oils*. The Oily Press, Norway.
- Davis, L.M., Rho, J.M., Sullivan, P.G., (2008). UCP-mediated free fatty acid uncoupling of isolated cortical mitochondria from fasted animals: Correlations to dietary modulations. *Epilepsia* 49, 117-119.
- Deshpande, U.R., Gadre, S.G., Raste, A.S., Pillai, D., Bhide, S.V., Samuel, A.M., (1998). Protective effect of turmeric (*Curcuma longa* L.) extract on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 36(6), 573-577.
- Devos, M., Poisson, L., Ergon, F., Pencreac'h, G., (2006). Enzymatic hydrolysis of phospholipids from *Isochrysis galbana* for docosahexaenoic acid enrichment. *Enzyme and Microbial Technology* 39(4), 548-554.
- Diamond, I.R., Sterescu, A., Pencharz, P.B., Wales, P.W., (2008). The rationale for the use of parenteral omega-3 lipids in children with short bowel syndrome and liver disease. *Pediatric Surgery International* 24(7), 773-778.
- Donadio Jr, J.V., (2000). Use of fish oil to treat patients with immunoglobulin A nephropathy. *American Journal of Clinical Nutrition* 71(1 SUPPL.), 373S-375S.

- Dyeberg, J., Bang, H., Hjorne, N., (1975). Fatty Acid Composition of the Plasma Lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr*, 958- 966.
- Eaimtrakarn, S., Rama Prasad, Y.V., Ohno, T., Konishi, T., Yoshikawa, Y., Shibata, N., Takada, K., (2002). Absorption enhancing effect of Labrasol on the intestinal absorption of insulin in rats. *Journal of Drug Targeting* 10(3), 255-260.
- Edeas, M., (2006). la curcumine. *Phytotherapie* 4(5), 230-233.
- Emken, E., Adlof, R., Duval, S., Nelson, G., (1998). Effect of dietary arachidonic acid on metabolism of deuterated linoleic acid by adult male subjects. *Lipids* 33(5), 471-480.
- Eymard, S., (2003). Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés, Nantes.
- Eymard, S., Genot, C., (2003). A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105(9), 497-501.
- Fan, Y., Li, X., Zhou, Y., Fan, C., Wang, X., Huang, Y., Liu, Y., (2011). Improved intestinal delivery of salmon calcitonin by water-in-oil microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*.
- FAO, (2007). Situation mondiale des pêches et de l'aquaculture. Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO.
- FAO, F.T.P., (1986). The production of fish meal and oil. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS* 142.
- Favé, G., Coste, T.C., Armand, M., (2004). Physicochemical properties of lipids: new strategies to manage fatty acid bioavailability. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 50(7), 815-831.
- Favrelière, S., Perault, M.C., Huguet, F., De Javel, D., Bertrand, N., Piriou, A., Durand, G., (2003). DHA-enriched phospholipid diets modulate age-related alterations in rat hippocampus. *Neurobiology of Aging* 24(2), 233-243.
- Ferraz, A.C., Delattre, A.M., Almendra, R.G., Sonagli, M., Borges, C., Araujo, P., Andersen, M.L., Tufik, S., Lima, M.M.S., (2011). Chronic w-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. *Behavioural Brain Research* 219(1), 116-122.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* 226(1), 497-509.
- Folkers, K., (1994). A one year bioavailability study of Coenzyme Q10 with 3 months withdrawal period. *Molecular Aspects of Medicine* 15(SUPPL.), S281-S285.
- Fontagné-Dicharry, S., Médale, F., (2010). Les lipides des poissons d'aquaculture et leurs facteurs de variation. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 17(4).
- Food and Drug Administration, U.S.D.o.H.a.H.S.C.f.D.E.a.R.C., (2005). Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers.
- Forné, I., Abiàn, J., Cerdà, J., (2010). Fish proteome analysis: Model organisms and non-sequenced species. *Proteomics* 10(4), 858-872.
- Frankel, E.N., (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry* 57(1), 51-55.

- Freese, R., Mutanen, M., (1997). Alpha-Linolenic acid and marine long-chain n-3 fatty acids differ only slightly in their effects on hemostatic factors in healthy subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 66(3), 591-598.
- Frost, Sullivan, (2010). Global Overview of the Marine and Algal Oil EPA and DHA Omega-3 Ingredients Market, in: Chicago (Ed.), *Global Organization for EPA and DHA Omega-3 (GOED)*.
- Fu, X., (2009). Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of Bio-Quinone- γ Q10 in mice and rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 53(1), 1-5.
- Fu, X., Ji, R., Dam, J., (2009). *Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of Bio-Quinone Q10 in mice and rats*. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS.
- Gbogouri, G.A., (2005). Co-valorisation des protéines et des lipides riches en lécithine et en acides gras polyinsaturés oméga-3 à partir de têtes de saumon (*Salmo Salar*) par hydrolyse enzymatique, Nancy.
- Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., (2006). Analysis of lipids extracted from salmon (*Salmo salar*) heads by commercial proteolytic enzymes. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108(9), 766-775.
- Gibson, R.A., Makrides, M., (1998). The role of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) in neonatal nutrition. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* 87(10), 1017-1022.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65(2-3), 45-80.
- Gonzalez-Zulueta, M., Bender, C.M., Yang, A.S., Nguyen, T., Beart, R.W., Van Tornout, J.M., Jones, P.A., (1995). Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Research* 55(20), 4531-4535.
- Gramza, A., Khokhar, S., Yoko, S., Gliszczynska-Swiglo, A., Hes, M., Korczak, J., (2006). Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108(4), 351-362.
- Graziani, P., (2005). *Anxiété et troubles anxieux*, Paris.
- Greenough, A., Cole, G., Lewis, J., Lockton, A., Blundell, J., (1998). Untangling the effects of hunger, anxiety, and nausea on energy intake during intravenous cholecystokinin octapeptide (CCK-8) infusion. *Physiology and Behavior* 65(2), 303-310.
- Griffiths, G., Stobart, A.K., Stymne, S., (1985). The acylation of sn-glycerol 3-phosphate and the metabolism of phosphatidate in microsomal preparations from the developing cotyledons of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed. *Biochemical Journal* 230(2), 379-388.
- Groneberg, D.A., Kindermann, B., Althammer, M., Klapper, M., Vormann, J., Littarru, G.P., Döring, F., (2005). Coenzyme Q10 affects expression of genes involved in cell signalling, metabolism and transport in human CaCo-2 cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37(6), 1208-1218.
- Gu, R.Z., Li, C.Y., Liu, W.Y., Yi, W.X., Cai, M.Y., (2011). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin. *Food Research International* 44(5), 1536-1540.
- Guesnet, P., (2005). Physiological functions of polyunsaturated fatty acids | Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 12(5-6), 333-343.

- Guillemin, S., (2006). Extraction aqueuse d'huile de colza assistée par hydrolyse enzymatique : optimisation de la réaction, caractérisation de l'émulsion et étude de procédés de déstabilisation., *Thèse*, ENSAIA-INPL Nancy.
- Guillen, M.D., Cabo, N., (2000). Some of the most significant changes in the Fourier transform infrared spectra of edible oils under oxidative conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80(14), 2028-2036.
- Guillén, M.D., Cabo, N., (1997). Infrared spectroscopy in the study of edible oils and fats. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75(1), 1-11.
- Gursoy, R.N., (2004). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 58(3), 173-182.
- Hagen, W., Auel, H., (2001). Seasonal adaptations and the role of lipids in oceanic zooplankton. *Zoology* 104(3-4), 313-326.
- Hansen, A.E., Haggard, M.E., Boelsche, A.N., Adam, D.J.D., Wiese, H.F., (1958). Essential fatty acids in infant nutrition III: clinical manifestations of linoleic acid deficiency. *The Journal of Nutrition* 66, 565-576.
- Hansen, G., Christensen, P., Tüchsen, E., Lund, T., (2004). Sensitive and selective analysis of coenzyme Q10 in human serum by negative APCI LC-MS. *Analyst* 129(1), 45-50.
- Hargreaves, I.P., Lane, A., Sleiman, P.M.A., (2008). The coenzyme Q10 status of the brain regions of Parkinson's disease patients. *Neuroscience Letters* 447(1), 17-19.
- Harris, K., Fleming, J., Kris-Etherton, P., (2011). Challenges in estimating omega-3 fatty acid content of seafood from US nutrient databases: A salmon case study. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Harwood, J.L., Gurr, M.I., Frayn, K.N., (2002). *Lipid Biochemistry, An Introduction*, 5 ed. Blackwell Science Ltd, USA.
- Haynal, A., Pasini, W., (1984). *Abrégée de Médecine psychosomatique* (2 ed), masson. Paris.
- He, H.L., Chen, X.L., Wu, H., Sun, C.Y., Zhang, Y.Z., Zhou, B.C., (2007). High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresource Technology* 98(18), 3499-3505.
- Hellgren, L.I., (2001). Occurrence of bioactive sphingolipids in meat and fish products. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103(10), 661-667.
- Henna Lu, F.S., Nielsen, N.S., Timm-Heinrich, M., Jacobsen, C., (2011). Oxidative stability of marine phospholipids in the liposomal form and their applications. *Lipids* 46(1), 3-23.
- Horrobin, D.F., (2000). Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *American Journal of Clinical Nutrition* 71(1 SUPPL.), 367S-372S.
- Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G.R., (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 71(4), 533-554.
- Hung, C.-F., Fang, C.-L., Liao, M.-H., Fang, J.-Y., (2007). The effect of oil components on the physicochemical properties and drug delivery of emulsions: Tocol emulsion versus lipid emulsion. *International Journal of Pharmaceutics* 335(1-2), 193-202.
- Hung, C.F., Chen, J.K., Liao, M.H., Lo, H.M., Fang, J.Y., (2006). Development and evaluation of emulsion-liposome blends for resveratrol delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 6(9-10), 2950-2958.
- Hunter, R.J., (1986). Transport properties of suspensions, *Foundations of Colloid Science*, pp. 449-536.

- Huo, H.M., Zhang, L.Y., Jiang, J.G., Zhu, X., (2009). Curcumine inhibits proliferation of breast cancer MCF-7 cells and the related oxidative stress mechanism. *Chinese Journal of Cancer Biotherapy* 16(5), 490-493.
- Hvattum, E., Rosjo, C., Gjoen, T., Rosenlund, G., Ruyter, B., (2000). 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: Biomedical Sciences and Applications* 748(1), 137-149.
- Hyson, H.C., Kieburtz, K., Shoulson, I., McDermott, M., Ravina, B., De Blicke, E.A., Cudkovicz, M.E., Ferrante, R.J., (2010). Safety and tolerability of high-dosage coenzyme Q10 in Huntington's disease and healthy subjects. *Movement Disorders* 25(12), 1924-1928.
- Ikeda, I., Wakamatsu, K., Inayoshi, A., Imaizumi, K., Sugano, M., Yazawa, K., (1994). alpha-Linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids affect lipid metabolism differently in rats. *Journal of Nutrition* 124(10), 1898-1906.
- Ikeda, I., Yoshida, H., Tomooka, M., Yosef, A., Imaizumi, K., Tsuji, H., Seto, A., (1998). Effects of long-term feeding of marine oils with different positional distribution of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on lipid metabolism, eicosanoid production, and platelet aggregation in hypercholesterolemic rats. *Lipids* 33(9), 897-904.
- Inano, H., Onoda, M., Inafuku, N., Kubota, M., Kamada, Y., Osawa, T., Kobayashi, H., Wakabayashi, K., (1999). Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with gamma-rays, pp. 1011 - 1018.
- Ismail, A., (2010). Marine lipids overview: Markets, regulation, and the value chain. *OCLE - Oleagineux Corps Gras Lipides* 17(4), 205-208.
- Je, J.-Y., Park, P.-J., Kim, S.-K., (2005). *Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (Theragra chalcogramma) frame protein hydrolysate*. Elsevier, Kidlington, ROYAUME-UNI.
- Jensen, K.N., Jacobsen, C., Nielsen, H.H., (2007). Fatty acid composition of herring (*Clupea harengus* L.): Influence of time and place of catch on n-3 PUFA content. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(4), 710-718.
- Jones, M., (2012). FAO, ©, Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées. *Salmo salar*. Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO.
- Jong, S.W., (2007). Formulation and biopharmaceutical evaluation of silymarin using SMEDDS. *Archives of Pharmacal Research* 30(1), 82-89.
- Joo, J.S., (2005). Coenzyme Q-10 and Cardiovascular Health: To Take or Not to Take ,À That is the Question. *Nutrition Bytes* 10(2).
- Ju, S.J., Harvey, H.R., (2004). Lipids as markers of nutritional condition and diet in the Antarctic krill *Euphausia superba* and *Euphausia crystallorophias* during austral winter. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 51(17-19), 2199-2214.
- Kahveci, D., Xu, X., (2011). Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry* 129(4), 1552-1558.
- Kawahara, H., Yoshida, M., Yokoo, H., Nishi, M., Tanaka, M., (1993). Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. *Neuroscience Letters* 162(1-2), 81-84.

- Kawashima, K., Itoh, H., Miyoshi, M., Chibata, I., (1979). Antioxidant properties of branched-chain amino acid derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 27(8), 1912-1916.
- Kelley, D.S., Bendich, A., (1996). Essential nutrients and immunologic functions. *American Journal of Clinical Nutrition* 63(6), 994S-996S.
- Kiecolt-Glaser, J.K., Belury, M.A., Andridge, R., Malarkey, W.B., Glaser, R., (2011). Omega-3 supplementation lowers inflammation and anxiety in medical students: A randomized controlled trial. *Brain, Behavior, and Immunity*.
- Kim, S.K., Kim, Y.T., Byun, H.G., Nam, K.S., Joo, D.S., Shahidi, F., (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(4), 1984-1989.
- King, M.F., Boyd, L.C., Sheldon, B.W., (1992). Effects of phospholipids on lipid oxidation of a salmon oil model system. *Journal of the American Oil Chemists Society* 69(3), 237-242.
- Koga, K., Kusawake, Y., Ito, Y., Sugioka, N., Shibata, N., Takada, K., (2006). Enhancing mechanism of Labrasol on intestinal membrane permeability of the hydrophilic drug gentamicin sulfate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 64(1), 82-91.
- Kommuru, T.R., Gurley, B., Khan, M.A., Reddy, I.K., (2001). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: Formulation development and bioavailability assessment. *International Journal of Pharmaceutics* 212(2), 233-246.
- Kremer, J.M., (2000). n-3 Fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *American Journal of Clinical Nutrition* 71(1 SUPPL.), 349S-351S.
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A., (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40(1), 43-81.
- Kromann, N., Green, A., (1980). Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Medica Scandinavica* 208(5), 401-406.
- Kunwar, A., Barik, A., Pandey, R., Priyadarsini, K.I., (2006). Transport of liposomal and albumin loaded curcumin to living cells: An absorption and fluorescence spectroscopic study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1760(10), 1513-1520.
- Laboratoires Le Stum, L.d.i.d., (2005). Questions réponses autour d'une innovation technologique: Le Vectomega®. *Nutri-Thema: Phospholipides et oméga 3* 2 ème partie(7).
- Lan Li, Braiteh, F.S., Kurzrock, R., (2005). Liposome-encapsulated curcumin, pp. 1322-1331.
- Larsen, R., Eilertsen, K.E., Elvevoll, E.O., (2011). Health benefits of marine foods and ingredients. *Biotechnology Advances* 29(5), 508-518.
- Lee, S.H., Lefèvre, T., Subirade, M., Paquin, P., (2009). Effects of ultra-high pressure homogenization on the properties and structure of interfacial protein layer in whey protein-stabilized emulsion. *Food Chemistry* 113(1), 191-195.
- Lemaitre-Delaunay, D., Pachauidi, C., Laville, M., Pousin, J., Armstrong, M., Lagarde, M., (1999). Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [¹³C]DHA in phosphatidylcholine. *Journal of Lipid Research* 40(10), 1867-1874.

- Leman, S., Le Guisquet, A., Belzung, C., (2004). *Anxiété, anxiolytique et troubles cognitifs*. Elsevier, Paris.
- Li, J.F., Chen, B.H., Lu, Y.F., (2007a). Positional characteristics of triacylglycerol in soft-shelled turtle oil and its effects on lipid metabolism in hamsters fed a high fat diet. *Food Chemistry* 100(2), 781-787.
- Li, L., Ahmed, B., Mehta, K., Kurzrock, R., (2007b). Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer, pp. 1276-1282.
- Lin, M.S., Lee, Y.H., Chiu, W.T., Hung, K.S., (2011). Curcumin provides neuroprotection after spinal cord injury. *Journal of Surgical Research* 166(2), 280-289.
- Linder, M., (2003). *Les acides gras polyinsaturés: Des sources aux procédés d'extraction pour une meilleure maîtrise nutritionnelle*, Nancy.
- Linder, M., Belhaj, N., Sautot, P., Tehrani, E.A., (2010). From krill to whale: An overview of marine fatty acids and lipid compositions. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 17(4), 194-204.
- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M., (2005). Proteolytic Extraction of Salmon Oil and PUFA Concentration by Lipases. *Marine Biotechnology* 7(1), 70-76.
- Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, I., (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry* 112(1), 77-83.
- Lister, R.G., (1990). Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology and Therapeutics* 46(3), 321-340.
- Lorivel, T., Gras, M., Hilber, P., (2010). Effects of corticosterone synthesis inhibitor metyrapone on anxiety-related behaviors in Lurcher mutant mice. *Physiology and Behavior* 101(2), 309-314.
- Maiti, K., Mukherjee, K., Gantait, A., Saha, B.P., Mukherjee, P.K., (2007). Curcumin-phospholipid complex: Preparation, therapeutic evaluation and pharmacokinetic study in rats. *International Journal of Pharmaceutics* 330(1-2), 155-163.
- Mancuso, M., Coppede, F., Migliore, L., Siciliano, G., Murri, L., (2006). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 10(1), 59-73.
- Mancuso, M., Orsucci, D., Calsolaro, V., Choub, A., Siciliano, G., (2009). Coenzyme Q10 and neurological diseases. *Pharmaceuticals* 2(3), 134-149.
- Marcuse, R., (1960). Antioxidative effect of amino-acids. *Nature* 186(4728), 886-887.
- Martin, A., (2007). Antarctic krill. *Le krill antarctique* 5(SUPPL. 1), HS6-HS13.
- Martin-Hernandez, C., Bénet, S., Marvin-Guy, L.F., (2005). Characterization and quantification of proteins in lecithins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(22), 8607-8613.
- Mason, T.G., Wilking, J.N., Meleson, K., Chang, C.B., Graves, S.M., (2006). Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics Condensed Matter* 18(41), R635-R666.
- Mattei, R., Polotow, T.G., Vardaris, C.V., Guerra, B.A., Leite, J.R., Otton, R., Barros, M.P., (2011). Astaxanthin limits fish oil-related oxidative insult in the anterior forebrain of Wistar rats: Putative anxiolytic effects? *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 99(3), 349-355.
- Mattson, F.H., Volpenhein, R.A., (1964). THE DIGESTION AND ABSORPTION OF TRIGLYCERIDES. *The Journal of biological chemistry* 239, 2772-2777.

- Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, L., Bria, P., Mazza, S., (2007). Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 31(1), 12-26.
- Mbatia, B., Adlercreutz, D., Adlercreutz, P., Mahadhy, A., Mulaa, F., Mattiasson, B., (2010). Enzymatic oil extraction and positional analysis of ω -3 fatty acids in Nile perch and salmon heads. *Process Biochemistry* 45(5), 815-819.
- McClements, D.J., Li, Y., (2010). Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science* 159(2), 213-228.
- Meguid, N.A., Atta, H.M., Gouda, A.S., Khalil, R.O., (2008). Role of polyunsaturated fatty acids in the management of Egyptian children with autism. *Clinical Biochemistry* 41(13), 1044-1048.
- Mellentini, J., (2008). End of the line for omega-3? *Dairy Industries International* 73(9), 16-17.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K., (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(3), 581-587.
- Mero, A., Schiavon, M., Veronese, F.M., Pasut, G., (2011). A new method to increase selectivity of transglutaminase mediated PEGylation of salmon calcitonin and human growth hormone. *Journal of Controlled Release*.
- Miles, M.V., (2007). The uptake and distribution of coenzyme Q(10). *Mitochondrion* 7(Supplement 1), S72-S77.
- Miller, M.R., Nichols, P.D., Barnes, J., Davies, N.W., Peacock, E.J., Carter, C.G., (2006). Regiospecificity profiles of storage and membrane lipids from the gill and muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) grown at elevated temperature. *Lipids* 41(9), 865-876.
- Miller, M.R., Nichols, P.D., Carter, C.G., (2008). N-3 Oil sources for use in aquaculture alternatives to the unsustainable harvest of wild fish. *Nutrition Research Reviews* 21(2), 85-96.
- Miquel, J., Bernd, A., Sempere, J.M., Diaz-Alperi, J., Ramirez, A., (2002). The curcuma antioxidants: Pharmacological effects and prospects for future clinical use. A review. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 34(1), 37-46.
- Misslin, R., Belzung, C., Vogel, E., (1989). *Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents*. Elsevier, Amsterdam, PAYS-BAS.
- Miyake, Y., Yokomizo, K., Matsuzaki, N., (1998). Determination of unsaturated fatty acid composition by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(9), 1091-1094.
- Miyashita, K., Nara, E., Ota, T., (1994). *Comparative study on the oxidative stability of phosphatidylcholines from salmon egg and soybean in an aqueous solution*. Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry, Tokyo, JAPON.
- Mørkøre, T., (2006). Relevance of dietary oil source for contraction and quality of pre-rigor filleted Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 251(1), 56-65.
- Morrison, W.R., Smith, L.M., (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *Journal of Lipid Research* 5(4), 600-608.
- Müller, R.H., Jacobs, C., Kayser, O., (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47(1), 3-19.

- Nanton, D.A., Vegusdal, A., Rørå, A.M.B., Ruyter, B., Baeverfjord, G., Torstensen, B.E., (2007). Muscle lipid storage pattern, composition, and adipocyte distribution in different parts of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed fish oil and vegetable oil. *Aquaculture* 265(1-4), 230-243.
- Narayan, B., Miyashita, K., Hosakawa, M., (2004). Comparative evaluation of fatty acid composition of different Sargassum (Fucales, Phaeophyta) species harvested from temperate and tropical waters. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 13(4), 53-70.
- Narayan, B., Miyashita, K., Hosakawa, M., (2006). Physiological effects of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) - A review. *Food Reviews International* 22(3), 291-307.
- Nawar, W.W., (1984). Chemical changes in lipids produced by thermal processing. *Journal of Chemical Education* 61(4), 299-302.
- Nazzal, S., Smalyukh, I.I., Lavrentovich, O.D., Khan, M.A., (2002). Preparation and in vitro characterization of a eutectic based semisolid self-nanoemulsified drug delivery system (SNEDDS) of ubiquinone: mechanism and progress of emulsion formation. *International Journal of Pharmaceutics* 235(1-2), 247-265.
- Negishi, S., Arai, Y., Shirasawa, S., Arimoto, S., Nagasawa, T., Kouzui, H., Tsuchiya, K., (2003). Analysis of regiospecific distribution of FA of TAG using the lipase-catalyzed ester-exchange. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society* 80(4), 353-356.
- Nepal, P.R., Han, H.K., Choi, H.K., (2010). Preparation and in vitro-in vivo evaluation of Witepsol® H35 based self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) of coenzyme Q10. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 39(4), 224-232.
- Nespolo, S.A., Bevan, M.A., Chan, D.Y.C., Grieser, F., Stevens, G.W., (2001). Hydrodynamic and Electrokinetic Properties of Decane Droplets in Aqueous Sodium Dodecyl Sulfate Solutions. *Langmuir* 17(23), 7210-7218.
- Neuringer, M., Connor, W.E., Lin, D.S., (1986). Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal ω 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(11), 4021-4025.
- Nii, Y., Fukuta, K., Yoshimoto, R., Sakai, K., Ogawa, T., (2008). Determination of antihypertensive peptides from an izumi shrimp hydrolysate. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72(3), 861-864.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., Assavanig, A., (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering* 70(4), 571-578.
- Nilsson, A., (2008). Sphingolipids, in: Gunstone, F.D. (Ed.), *Phospholipid Technology and Applications*. The Oily Press, Bridgwater, pp. 169-194.
- O'Keefe, S.F., (2002). Nomenclature and Classification of Lipids, in: Akoh, C.C., Min, D.B. (Eds.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 2nd ed. Marcel Dekker, New York.
- Ogwok, P., Muyonga, J.H., Sserunjogi, M.L., (2008). Fatty acid profile and stability of oil from the belly flaps of Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry* 108(1), 103-109.
- Oh, D.H., Chun, K.H., Jeon, S.O., Kang, J.W., Lee, S., (2011). Enhanced transbuccal salmon calcitonin (sCT) delivery: Effect of chemical enhancers and electrical assistance on in vitro sCT buccal permeation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.

- Ohl, F., Arndt, S.S., van der Staay, F.J., (2008). Pathological anxiety in animals. *The Veterinary Journal* 175(1), 18-26.
- Öhman, A., (2000). Anxiety, in: Fink, G. (Ed.), *Encyclopedia of stress*. Academic press, USA, pp. 226-231.
- Onuki, Y., (2008). Specific effect of polyunsaturated fatty acids on the cholesterol-poor membrane domain in a model membrane. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 56(8), 1103-1109.
- Ozawa, Y., Mizushima, Y., Koyama, I., (1986). Intestinal absorption enhancement of coenzyme Q10 with a lipid microsphere. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 36(4), 689-690.
- Palamakula, A., (2005). Regional permeability of coenzyme Q10 in isolated rat gastrointestinal tracts. *Pharmazie* 60(3), 212-214.
- Pardeike, J., Schwabe, K., Müller, R.H., (2010). Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q10 cream and the in vivo skin hydration effect. *International Journal of Pharmaceutics* 396(1-2), 166-173.
- Parker, G., Parker, I., Brotchie, H., Stuart, S., (2006). Interpersonal psychotherapy for depression? The need to define its ecological niche. *Journal of Affective Disorders* 95(1-3), 1-11.
- Pazos, M., Gallardo, J.M., Torres, J.L., Medina, I., (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry* 92(3), 547-557.
- Pei, X., Yang, R., Zhang, Z., Gao, L., Wang, J., Xu, Y., Zhao, M., Han, X., Liu, Z., Li, Y., (2010). Marine collagen peptide isolated from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) skin facilitates learning and memory in aged C57BL/6J mice. *Food Chemistry* 118(2), 333-340.
- Pena-Ramos, E.A., Xiong, Y.L., Arteaga, G.E., (2004). Fractionation and characterisation for antioxidant activity of hydrolysed whey protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(14), 1908-1918.
- Peng, J., Larondelle, Y., Pham, D., Ackman, R.G., Rollin, X., (2003). Polyunsaturated fatty acid profiles of whole body phospholipids and triacylglycerols in anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 134(2), 335-348.
- Pérignon, M., Lecomte, J., Pina, M., Renault, A., Simonneau-Deve, C., Villeneuve, P., (2011). Evaluation of *Rhizopus oryzae* Lipase for the Determination of Regiodistribution in Triacylglycerols with Medium Chain Fatty Acids. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1-8.
- Pickova, J., Morkore, T., (2007). Alternate oils in fish feeds. *European Journal of Lipid Science and Technology* 109(3), 256-263.
- Polvi, S.M., Ackman, R.G., Lall, S.P., Saunders, R.L., (1991). Stability of Lipids and oméga-3 fatty acids during frozen storage of atlantic salmon *Journal of Food Processing and Preservation* 15(3), 167-181.
- Pratoomyot, J., Bendiksen, E.Ö., Campbell, P.J., Jauncey, K.J., Bell, J.G., Tocher, D.R., (2011). Effects of different blends of protein sources as alternatives to dietary fishmeal on growth performance and body lipid composition of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 316(1-4), 44-52.
- Puglia, C., Blasi, P., Rizza, L., Schoubben, A., Bonina, F., Rossi, C., Ricci, M., (2008). Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: An in vitro and in vivo investigation. *International Journal of Pharmaceutics* 357(1-2), 295-304.

- Pulfer, M., Murphy, R.C., (2003). Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews* 22(5), 332-364.
- Qian, J., Zhang, H., Liao, Q., (2011). The properties and kinetics of enzymatic reaction in the process of the enzymatic extraction of fish oil. *Journal of Food Science and Technology* 48(3), 280-284.
- Rajapakse, N., Jung, W.K., Mendis, E., Moon, S.H., Kim, S.K., (2005). A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIIa and platelet aggregation. *Life Sciences* 76(22), 2607-2619.
- Rambjor, G., W-len, A., Windsor, S., Harris, W., (1996). Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans. *Lipids* 31(1), S45-S49.
- Razack, R., Seidner, D.L., (2007). Nutrition in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology* 23(4), 400-405.
- Refsgaard, H.H.F., Brockhoff, P.B., Jensen, B., (1998). Sensory and Chemical Changes in Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) during Frozen Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(9), 3473-3479.
- Reisman, J., Schachter, H.M., Dales, R.E., Tran, K., Kourad, K., Barnes, D., Sampson, M., Morrison, A., Gaboury, I., Blackman, J., (2006). Treating asthma with omega-3 fatty acids: Where is the evidence? A systematic review. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6.
- Roland, I., Piel, G., Delattre, L., Evrard, B., (2003). Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. *International Journal of Pharmaceutics* 263(1-2), 85-94.
- Rosenfeldt, F.L., (2007). Coenzyme Q10 in the treatment of hypertension: A meta-analysis of the clinical trials. *Journal of Human Hypertension* 21(4), 297-306.
- Ross, B.M., (2009). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and anxiety disorders. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 81(5-6), 309-312.
- Røyneberg, A., (2005). The impact of different dietary sources of marine polyunsaturated fatty acids on the fatty acid composition of rat brain, liver and red blood cells, *Master thesis for the degree in Experimental and Human Physiology*, Bergen.
- Rubio-Rodriguez, N., Beltran, S., Jaime, I., de Diego, S.M., Sanz, M.T., Carballido, J.R., (2010). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 11(1), 1-12.
- Ruxton, C.H.S., Calder, P.C., Reed, S.C., Simpson, M.J.A., (2005). The impact of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. *Nutrition Research Reviews* 18(1), 113-129.
- Saadatian, M., Goudable, J., Riboli, E., (1999). Lipides et cancer. *OCL - Oleagineux Corps Gras Lipides* 6(3), 242-252.
- Sahu, A., Bora, U., Kasoju, N., Goswami, P., (2008). Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly(ethylene glycol)-palmitate nanocarrier for curcumin delivery to cancer cells. *Acta Biomaterialia* 4(6), 1752-1761.
- Salager, J., Anton, R., Aubry, J., (2001). Formulation des émulsions par la méthode du HLD. *Techniques de l'ingénieur : Agroalimentaire* 3(J2158), 15p.
- Salampeyy, J., Phillips, M., Seneweera, S., Kailasapathy, K., (2010). Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuschenia* sp.) insoluble proteins. *Food Chemistry* 120(2), 556-560.

- Saldeen, T., Wallin, R., Marklinder, I., (1998). *Effects of a small dose of stable fish oil substituted for margarine in bread on plasma phospholipid fatty acids and serum triglycerides*. Elsevier, New York, NY, ETATS-UNIS.
- Sampson, H.A., (2004). Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113(5), 805-819.
- Sathivel, S., Yin, H., Bechtel, P.J., King, J.M., (2009). Physical and nutritional properties of catfish roe spray dried protein powder and its application in an emulsion system. *Journal of Food Engineering* 95(1), 76-81.
- Sautot, P., Tarek, M., Stébé, M.-J., Paris, C., Arab-Tehrany, E., Linder, M., (2011). Structural, hydration, and phase transition properties of phosphatidylcholine from salmon heads. *European Journal of Lipid Science and Technology*, n/a-n/a.
- Schägger, H., (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1(1), 16-22.
- Schmelzer, C., Lorenz, G., Rimbach, G., Döring, F., (2007). Influence of Coenzyme Q10 on release of pro-inflammatory chemokines in the human monocytic cell line THP-1. *BioFactors* 31(3-4), 211-217.
- Schmitz, G., Ecker, J., (2008). The opposing effects of n,à3 and n,à6 fatty acids. *Progress in Lipid Research* 47(2), 147-155.
- Shafiq, S., Shakeel, F., Talegaonkar, S., Ahmad, F.J., Khar, R.K., Ali, M., (2007). Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66(2), 227-243.
- Shah, N.H., Carvajal, M.T., Patel, C.I., Infeld, M.H., Malick, A.W., (1994). Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) with polyglycolized glycerides for improving in vitro dissolution and oral absorption of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 106(1), 15-23.
- Shah, R.B., Zidan, A.S., Funck, T., Tawakkul, M.A., Nguyenpho, A., Khan, M.A., (2007). Quality by design: Characterization of self-nano-emulsified drug delivery systems (SNEDDs) using ultrasonic resonator technology. *International Journal of Pharmaceutics* 341(1-2), 189-194.
- Shahidi, F., Wanasundara, P., (2002). Extraction and analysis of lipids, in: C, A., D, M. (Eds.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and biotechnology*, pp. 133-168.
- Shults, C.W., Beal, M.F., Song, D., Fontaine, D., (2004). Pilot trial of high dosages of coenzyme Q10 in patients with Parkinson's disease. *Experimental Neurology* 188(2), 491-494.
- Silvers, K.M., Scott, K.M., (2002). Fish consumption and self-reported physical and mental health status. *Public Health Nutrition* 5(3), 427-431.
- Simopoulos, A.P., (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *American Journal of Clinical Nutrition* 54(3), 438-463.
- Simopoulos, A.P., (2011). Evolutionary Aspects of Diet: The Omega-6/Omega-3 Ratio and the Brain. *Molecular Neurobiology*, 1-13.
- Simopoulos, A.P., Leaf, A., Salem Jr, N., (2000). Workshop statement on the essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 63(3), 119-121.
- Singh, R.B., (2005). Effect on absorption and oxidative stress of different oral Coenzyme Q 10 dosages and intake strategy in healthy men. *BioFactors* 25(1-4), 219-224.
- Sirot, V., Oseredczuk, M., Bemrah-Aouachria, N., Volatier, J.L., Leblanc, J.C., (2008). Lipid and fatty acid composition of fish and seafood consumed in France: CALIPSO study. *Journal of Food Composition and Analysis* 21(1), 8-16.

- Song, J.H., Inoue, Y., Miyazawa, T., (1997). Oxidative Stability of Docosahexaenoic Acid-containing Oils in the Form of Phospholipids, Triacylglycerols, and Ethyl Esters. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 61(12), 2085-2088.
- Spielberger, C., Gorsuch, R., Lushene, R., (1970). *The State-trait Anxiety Inventory (STAI)* Consulting Psychologists Press, Palo Alto, CA.
- Spiteller, G., (2006). Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radical Biology and Medicine* 41(3), 362-387.
- Su, Y., (2011). Isolation and identification of pelteobagrins, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 158(2), 149-154.
- Suetsuna, K., (2000). Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. *Marine Biotechnology* 2(1), 5-10.
- Suzuki, S., Hinokio, Y., Ohtomo, M., Hirai, M., Hirai, A., Chiba, M., Kasuga, S., Satoh, Y., Akai, H., Toyota, T., (1998). The effects of coenzyme Q10 treatment on maternally inherited diabetes mellitus and deafness, and mitochondrial DNA 3243 (A to G) mutation. *Diabetologia* 41(5), 584-588.
- Takada, M., Yuzuriha, T., Katayama, K., Yamato, C., Koyama, N., (1985). Targeting of coenzyme Q10 solubilized with soy lecithin to heart of guinea pigs. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 31(1), 115-120.
- Takeuchi, H., Sasaki, H., Niwa, T., Hino, T., Kawashima, Y., Uesugi, K., Ozawa, H., (1992). Improvement of photostability of ubiquinol in the formulation of a novel powdered dosage form termed redispersible dry emulsion. *International Journal of Pharmaceutics* 86(1), 25-33.
- Teichmann, A., Heuschkel, S., Jacobi, U., Presse, G., Neubert, R.H.H., Sterry, W., Lademann, J., (2007). Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67(3), 699-706.
- Teusher, E., Anton, R., Lobstein, A., (2005). *Plantes aromatiques : Epices, aromates, condiments, et huiles essentielles*.
- Thanatukorn, P., (2009). Improvement of the oral bioavailability of coenzyme Q10 by emulsification with fats and emulsifiers used in the food industry. *LWT - Food Science and Technology* 42(1), 385-390.
- Thorpe, S.E., Murphy, E.J., Watkins, J.L., (2007). Circumpolar connections between Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana) populations: Investigating the roles of ocean and sea ice transport. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 54(5), 792-810.
- Tiano, L., (2007). Effect of coenzyme Q10 administration on endothelial function and extracellular superoxide dismutase in patients with ischaemic heart disease: A double-blind, randomized controlled study. *European Heart Journal* 28(18), 2249-2255.
- Tiyaboonchai, W., Tungpradit, W., Plianbangchang, P., (2007). Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 337(1-2), 299-306.
- Turon, F., Bachain, P., Caro, Y., Pina, M., Graille, J., (2002). A direct method for regiospecific analysis of TAG using CE±-MAG. *Lipids* 37(8), 817-821.

- Turon, F., Villeneuve, P., Pina, M., (2004). Improvement of fish oils nutritional quality. Amélioration de la qualité nutritionnelle des huiles de poissons 11(2), 146-149.
- Uddin, M.S., Kishimura, H., Chun, B.S., (2011). Isolation and Characterization of Lecithin from Squid (*Todarodes pacificus*) Viscera Deoiled by Supercritical Carbon Dioxide Extraction. Journal of Food Science 76(2), 350-354.
- Udompataikul, M., (2009). An oral nutraceutical containing antioxidants, minerals and glycosaminoglycans improves skin roughness and fine wrinkles. International Journal of Cosmetic Science 31(6), 427-435.
- Uhe, A.M., Collier, G.R., O'Dea, K., (1992). A comparison of the effects of beef, chicken and fish protein on satiety and amino acid profiles in lean male subjects. Journal of Nutrition 122(3), 467-472.
- Usyduş, Z., Szlinder-Richert, J., Adamczyk, M., Szatkowska, U., (2011). Marine and farmed fish in the Polish market: Comparison of the nutritional value. Food Chemistry 126(1), 78-84.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry and Cell Biology 39(1), 44-84.
- Van Gaalen, M.M., Steckler, T., (2000). Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. Behavioural Brain Research 115(1), 95-106.
- Villière, A., Genot, C., (2006). Physico-chemical and olfatometric analysis of lipid oxidation in oil-in-water emulsions. Oleagineux Corps Gras 13(2-3), 152-159.
- Vinot, N., Jouin, M., Lhomme-Duchadeuil, A., Guesnet, P., Alessandri, J.M., Aujard, F., Pifferi, F., (2011). Omega-3 fatty acids from fish oil lower anxiety, improve cognitive functions and reduce spontaneous locomotor activity in a non-human primate. PLoS ONE 6(6).
- Vognild, E., Elvevoll, E., Brox, J., Olsen, R., Barstad, H., Aursand, M., Osterud, B., (1998). Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acid composition, platelet membrane fluidity, platelet responses, and serum lipids in healthy humans. Lipids 33(4), 427-436.
- Wakelyn, P.J., Wan, P.J., (1997). *Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils*. Amer Oil Chemists Society.
- Wakelyn, P.J., Wan, P.J., (2006). Solvent extraction to obtain edible oil products, in: Akoh, C.C. (Ed.), *Handbook of Functional Lipids*.
- Wanasundara, U.N., Shahidi, F., (1997). Structural Characteristics of Marine Lipids and Preparation of w3 Concentrates, *Flavor and Lipid Chemistry of Seafoods*. American Chemical Society, pp. 240-254.
- Wang, H., Liu, F., Yang, L., Zu, Y., Qu, S., Zhang, Y., (2011). Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. Food Chemistry 128(1), 93-99.
- Wang, L., Li, X., Zhang, G., Dong, J., Eastoe, J., (2007a). Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. Journal of Colloid and Interface Science 314(1), 230-235.
- Wang, Q., Yang, X., Zhang, B., Wang, K., (2007b). The anxiolytic effect of cinnabar involves changes of serotonin levels. European Journal of Pharmacology 565(1-3), 132-137.
- Wang, T., (2008). Chemical structure and biological function, in: Gunstone, F.D. (Ed.), *Phospholipid Technology and Applications*. The Oily Press, Bridgwater, pp. 1-16.
- Wang, X., Jiang, Y., Wang, Y.-W., Huang, M.-T., Ho, C.-T., Huang, Q., (2008a). Enhancing anti-inflammation activity of curcumin through O/W nanoemulsions. Food Chemistry 108(2), 419-424.

- Wang, Y., Zhu, F., Han, F., Wang, H., (2008b). PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDATIVE PEPTIDES FROM SALMON PROTAMINE HYDROLYSATE. *Journal of Food Biochemistry* 32(5), 654-671.
- Watts, G.F., Playford, D.A., Croft, K.D., Ward, N.C., Mori, T.A., Burke, V., (2002). Coenzyme Q10 improves endothelial dysfunction of the brachial artery in Type II diabetes mellitus. *Diabetologia* 45(3), 420-426.
- Wijendran, V., Huang, M.C., Diau, G.Y., Boehm, G., Nathanielsz, P.W., Brenna, J.T., (2002). Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates. *Pediatric Research* 51(3), 265-272.
- Wijesundera, C., Ceccato, C., Watkins, P., Fagan, P., Fraser, B., Thienthong, N., Perlmutter, P., (2008). Docosahexaenoic acid is more stable to oxidation when located at the sn-2 position of triacylglycerol compared to sn-1(3). *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* 85(6), 543-548.
- Williams, J.P., Khan, M.U., Wong, D., (1995). A simple technique for the analysis of positional distribution of fatty acids on di- and triacylglycerols using lipase and phospholipase A2. *Journal of Lipid Research* 36(6), 1407-1412.
- Winther, B., Hoem, N., Berge, K., Reubsæet, L., (2011). Elucidation of phosphatidylcholine composition in krill oil extracted from *Euphausia superba*. *Lipids* 46(1), 25-36.
- Wu, Y., Sun, Y., Chen, H.D., Gao, X.H., (2011). Nanotechnology for topical application in cosmetic dermatology. *Journal of Applied Cosmetology* 29(1), 3-15.
- Xia, Q., (2010). Preparation and characterization of coenzyme Q10-loaded Nanostructured Lipid Carriers as delivery systems for cosmetic component. *Nanotechnology 2010: Bio Sensors, Instruments, Medical, Environment and Energy - Technical Proceedings of the 2010 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2010* 3, 498-501.
- Yang, K.-Y., Lin, L.-C., Tseng, T.-Y., Wang, S.-C., Tsai, T.-H., (2007). Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* 853(1-2), 183-189.
- Ye, A., Cui, J., Taneja, A., Zhu, X., Singh, H., (2009). Evaluation of processed cheese fortified with fish oil emulsion. *Food Research International* 42(8), 1093-1098.
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., Mostofsky, D.I., (1998). Modulation of learning and neuronal membrane composition in the rat by essential fatty acid preparation: Time-course analysis. *Neurochemical Research* 23(5), 627-634.
- Yoon, S.H., Noh, S., (2011). Positional distribution of fatty acids in perilla (*Perilla frutescens* L.) oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* 88(1), 157-158.
- Yoshida, H., Abe, S., Hirakawa, Y., Takagi, S., (2001). Roasting effects on fatty acid distributions of triacylglycerols and phospholipids in sesame (*Sesamum indicum*) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81(7), 620-626.
- Yoshida, H., Kajimoto, G., (1978). Fatty acid distribution in glycolipids and phospholipids in cotyledons of germinating soybeans. *Agricultural and Biological Chemistry* 42(7), 1323-1330.
- Yoshida, H., Saiki, M., Yoshida, N., Tomiyama, Y., Mizushima, Y., (2009a). Fatty acid distribution in triacylglycerols and phospholipids of broad beans (*Vicia faba*). *Food Chemistry* 112(4), 924-928.

- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Tanaka, M., Mizushina, Y., (2007). Distribution of fatty acids in triacylglycerols and phospholipids from peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87(14), 2709-2714.
- Yoshida, H., Tomiyama, Y., Yoshida, N., Mizushina, Y., (2009b). Regiospecific distribution of fatty acids in triacylglycerols and phospholipids from broad beans (*Vicia faba*). *European Journal of Lipid Science and Technology* 111(4), 386-391.
- Yoshida, H., Yoshida, N., Tomiyama, Y., Mizushina, Y., (2011). Composition and regiodistribution of fatty acids in triacylglycerols and phospholipids from red and black rices. *Cereal Chemistry* 88(1), 31-35.
- You, J.Y., Peng, C., Liu, X., Ji, X.J., Lu, J., Tong, Q., Wei, P., Cong, L., Li, Z., Huang, H., (2011). Enzymatic hydrolysis and extraction of arachidonic acid rich lipids from *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology* 102(10), 6088-6094.
- Zhipeng, W., Mingkai, L., Shuyu, C., Min, J., Jingru, M., Xue, M., Yumei, W., Xiaoxing, L., (2007). Toxicity of coenzyme Q10: A report of 90-day repeated dose toxicity study in rats. *Journal of Toxicological Sciences* 32(5), 505-514.
- Zhou, S., Ackman, R.G., Morrison, C., (1996). Adipocytes and lipid distribution in the muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53(2), 326-332.
- Zlatanov, S., Laskaridis, K., (2007). Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish-sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicara smaris*). *Food Chemistry* 103(3), 725-728.
- Zulfakar, M.H., Edwards, M., Heard, C.M., (2007). Is there a role for topically delivered eicosapentaenoic acid in the treatment of psoriasis? *European Journal of Dermatology* 17(4), 284-291.
- Zyriax, B.C., Windler, E., (2000). Dietary fat in the prevention of cardiovascular disease - A review. *European Journal of Lipid Science and Technology* 102(5), 355-365.

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Michel GUICHARDANT, Professeur, INSA, Villeurbanne

Monsieur Pierre VILLENEUVE, Directeur de Recherche, CIRAD, Montpellier

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Madame BELHAJ Nabila

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

« **Confidentielle** »

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Intitulé du doctorat : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 03 novembre 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT

Pour le Président par délégation
Le Directeur Général des Services
de l'INPL,

J.Y. RIVIERE



7 Résumé

Titre : Nano-émulsion naturelle de phospholipides marins, issus d'un complexe phospholipopeptidique provenant d'un procédé de valorisation de co-produits de saumon, et applications à la vectorisation de molécules faiblement biodisponibles

Résumé : Les bienfaits des acides gras oméga-3, essentiellement l'EPA (C20:5n-3) et le DHA (C22:6n-3) sont bien élucidés dans la littérature. Ils jouent en effet, un rôle essentiel dans la prévention de nombreuses maladies neurodégénératives et cardiovasculaires. Ces acides gras polyinsaturés à longue chaîne sont majoritairement retrouvés dans des sources d'origines marines. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés d'une part à l'effet du complexe phospholipopeptidique provenant de l'hydrolyse enzymatique des têtes de saumon, sur l'anxiété et le stress oxydant dans le cadre d'une étude comportementale effectuée sur un modèle murin. D'autre part, nous avons mis en place une approche de double vectorisation, sous formes de nanoémulsions, visant à augmenter la biodisponibilité de deux molécules hydrophobes et bioactives (coenzyme Q₁₀ et curcumine) en utilisant les lipides totaux (phospholipides et triacylglycérols) du complexe phospholipopeptidique riche en EPA et en DHA. Les résultats de ce travail ont montré que le CPLP, sa fraction lipidique et peptidique ont un effet anxiolytique à une dose de 600 mg de CPLP/jour pendant 14 jours de traitement. Il a également été démontré dans cette étude que l'hydrolysate peptidique du CPLP diminue significativement, à double dose, le stress oxydant en baissant le niveau endogène des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les neurones. D'autre part, pour une utilisation thérapeutique, la biodisponibilité du CoQ₁₀ vectorisé à forte dose est améliorée jusqu'à 38 fois par la formulation huileuse composée de lipides polaires du CPLP. Concernant la supplémentation classique en CoQ₁₀ en tant que complément alimentaire, la formulation émulsionnée présente une meilleure disponibilité à dose aiguë, avec une concentration plasmatique deux fois plus élevée que la formulation de référence. Malgré une activité anticancéreuse reconnue pour la curcumine, sa faible solubilité diminue sa biodisponibilité et limite de ce fait son utilisation. La formulation nanoémulsionnée de curcumine contribue à inhiber la prolifération de cellules cancéreuses (MCF7).

Mots clés : Complexe phospholipopeptidique, nanoémulsions, Anxiété, Stress oxydant, Vectorisation, Coenzyme Q₁₀, Curcumine, Biodisponibilité, Effet anticancéreux.

Abstract: The benefits of omega 3 fatty acids, mainly EPA (C20:5n-3) and DHA (C22:6n-3) are well understood in the literature. They indeed play an essential role in the prevention of many neurodegenerative and cardiovascular diseases. These polyunsaturated fatty acids are mostly found in marine sources. In this context, we were interested on the effects of phospholipopeptidic complex from the enzymatic hydrolysis of salmon heads on anxiety and oxidative stress using a behavioural study (mouse model). On the other hand, we have developed a double vectorization operating nanoemulsions, to increase the bioavailability of two hydrophobic and bioactive molecules (conenzyme Q₁₀ and curcumine) by total lipids (phospholipids and triacylglycerols) from the phospholipopeptidic complex rich in EPA and DHA. The results of this study showed that the CPLP, its lipid and peptide fractions have an anxiolytic effect at a dose of 600 mg of CPLP / day for 14 days of treatment. It was also demonstrated that the peptide's hydrolyzate ingested at double dose decreases significantly the oxidative stress by lowering the endogenous level of reactive oxygen species (ROS) in neurons. For therapeutic uses, the bioavailability of CoQ₁₀ increased up to 38 times compared to referential formulation when vectorized at high dose in the oily formulation composed of CPLP's total lipids. Regarding conventional CoQ₁₀ supplementation as a dietary supplement, the emulsified formulation has a better availability at single dose, with plasma concentrations two times higher than the reference formulation. Although the anti-cancer activity of curcumine is highlighted, its low solubility and hence its low bioavailability, are factors limiting its use. The formulation of nanoemulsified curcumine allows a significant reduction in the proliferation of cancer cells (MCF7).

Keywords: Phospholipopeptidic complex, Nanoemulsions, Anxiety, Oxidative stress, Vectorisation, Coenzyme Q₁₀, Curcumine, Bioavailability, Anticancer effect.
