





UMR 7178



# Thèse

# Thèse .

*Présentée par*

**Julie LE GRANDOIS**

*Pour obtenir le grade de*

**Docteur de l'Université de Strasbourg**

*Spécialité : Chimie Analytique*

## **CARACTERISATION ET STABILITE DE SOURCES DE PHOSPHOLIPIDES POLYINSATURES A INTERETS NUTRITIONNELS**

**Soutenue le 13 novembre 2009 devant la commission d'examen**

**Pr. Eric MARCHIONI  
Dr. Françoise BINDLER  
Pr. Henri PORTUGAL  
Pr. Bruno LE BIZEC  
Pr. Jean-Marc LESSINGER  
Dr. Francesca GIUFFRIDA**

**Directeur de thèse  
Directeur de thèse  
Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Examineur  
Examineur**

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment, UMR 7178, LC4, Département des Sciences Analytiques de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC) sous la direction du Dr Françoise Bindler et du Pr Eric Marchioni et en partenariat avec le Centre de Recherche de Nestlé, Vers-Chez-les Blancs, Suisse. Ce travail a donné lieu aux publications et communications suivantes :

### **Publications :**

- Julie LE GRANDOIS, Eric Marchioni, Minjie Zhao, Francesca Giuffrida, Saïd Ennahar, Françoise Bindler. **Investigation of Natural Phosphatidylcholine Sources: Separation and Identification by LC-ESI-MS<sup>2</sup> of Molecular Species.** 2009, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14), 6014-6020.
- Julie LE GRANDOIS, Eric Marchioni, Saïd Ennahar, Francesca Giuffrida, Françoise Bindler. **Identification and kinetics of oxidized compounds from phosphatidylcholine molecular species.** Accepté dans *Food Chemistry*, doi : 10.1016/j.foodchem.2009.08.042
- Julie LE GRANDOIS, Eric Marchioni, Minjie Zhao, Francesca Giuffrida, Saïd Ennahar, Françoise Bindler. **Oxidative stability of oleic and linoleic acids in the forms of phosphatidylcholine and triacylglycerols.** Soumis à *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

### **Communications par posters:**

- Joseph CHAMIEH, Julie LE GRANDOIS, Anne BOOS, Eric MARCHIONI, Agnès HAGEGE – **Application of monolithic silica columns with different pores sizes for the separation of lecithin phospholipids.**  
HPLC 2007, 17-21 juin 2007, Gand (Belgique)
- Julie LE GRANDOIS, Saïd ENNAHAR, Laetitia FAUCONNOT, Francesca GIUFFRIDA, Frédéric DESTAILLATS, Eric MARCHIONI, Françoise BINDLER – **Purification of phosphatidylcholine and qualitative analysis of molecular species.**  
Forum Ingrédients, Santé, Beauté, Bien-être. 6-7 décembre 2007, Vannes (France)
- Julie LE GRANDOIS, Eric MARCHIONI, Saïd ENNAHAR, Francesca GIUFFRIDA, Françoise BINDLER - **Oxidation products of soy phosphatidylcholine molecular species with nutritional interest: Identification and kinetic study.**  
Euro Fed Lipids 6<sup>th</sup>, 7-10 septembre 2008, Athènes (Grèce)
- Julie LE GRANDOIS, Eric MARCHIONI, Saïd ENNAHAR, Francesca GIUFFRIDA, Françoise BINDLER- **Phosphatidylcholine molecular species investigation in krill oil, a new natural food ingredient.**  
Nutrevent, 17-18 juin 2009, Lille (France)
- Julie LE GRANDOIS, Eric MARCHIONI, Minjie ZHAO, Saïd ENNAHAR, Francesca GIUFFRIDA, Françoise BINDLER- **Phosphatidylcholine or Triacylglycerol: Which one is the most resistant to oxidation?**  
Euro Fed Lipids 7<sup>th</sup>, 18-21 octobre 2009, Graz (Autriche)



# Remerciements

C'est ici qu'il faut rassembler toute sa concentration pour n'oublier personne...  
Procédons avec méthode, après tout c'est quand même ce qu'on m'a appris pendant trois ans...

Je tiens d'abord à remercier très sincèrement Eric Marchioni et Françoise Bindler, mes deux directeurs de thèse pour m'avoir emmenée avec eux dans le monde des phospholipides et de leurs petits (oxydes). Merci pour votre soutien et pour m'avoir poussée quand il le fallait (Eric, encore une publi?). Merci à Françoise pour les longues discussions, tant scientifiques que personnelles et pour les très bons moments passés ensemble au labo et aux congrès. Merci à Eric pour sa bonne humeur et sa disponibilité.

Je remercie sincèrement les Pr. Henri Portugal, Bruno Le Bizec, Jean-Marc Lessinger et le Dr. Francesca Giuffrida d'avoir accepté de juger ce travail.

Un très grand merci à Saïd Ennahar et Martine Bergaentzlé pour leurs conseils toujours avisés. Merci à Martine pour sa bonne humeur, son franc-parler et son sens de l'humour (ça va beaucoup me manquer). Merci à Saïd pour sa patience (eh oui, combien de temps as-tu passé avec moi pour réparer la chaîne HPLC ☺ ??), pour sa rigueur (j'espère en avoir gardé quelque chose) et pour les longues discussions et les fous rires qu'on a pu avoir avec Esther.

N'oublions pas non plus notre petite Mimi, sans qui cette thèse n'aurait pas été la même. Merci pour tout le travail que tu peux faire pour nous au quotidien, merci pour ta bonne humeur et les discussions autour du café. Merci aussi à Minjie, à qui je dois beaucoup, merci pour sa disponibilité et sa patience.

Je remercie le Centre de Recherche de Nestlé et le CNRS pour avoir financé cette thèse. Merci aussi aux Dr. Francesca Giuffrida et Laetitia Fauconnot pour avoir partagé cette aventure « lipidique » avec moi. Merci pour votre soutien et vos conseils.

Merci à tous les autres membres du laboratoire (et du laboratoire d'à côté) : à Thierry pour sa bonne humeur permanente, à Pierre pour ses blagues (très) nulles et à Mustafa pour sa gentillesse. Merci aux thésards : d'abord ceux pour qui la thèse est une vieille histoire : à Amandine et Diane, qui m'ont bien accueillie et aidée au début de ma thèse ; à Gildas, Omar, Eli, Céline et Erwan pour qui l'aventure n'est pas encore terminée. Merci aussi aux nombreux stagiaires qui se sont succédés au labo, plus particulièrement à Laia, Rozenn, Aline, Anne et Simon qui ont contribué à ce travail. Un merci tout particulier à Frédéric, Etienne et Elias pour la bonne ambiance qu'ils ont apportée au labo. Tous mes encouragements pour Etienne qui a décidé de se lancer dans l'aventure de la thèse. Bon courage et bon vent à toi.

Petit paragraphe spécial pour ma petite Esther, mon *demi-clown*. Un gigantesque merci à toi pour m'avoir supportée quand je râlais, pour m'avoir aidée dès que tu le pouvais, pour les interminables discussions au labo et en dehors et pour les fous rires. Cette thèse n'aurait pas été pareille sans toi. Tu pars au bord de la mer, alors je sais où passer mes vacances : La Rochelle, me voilà !

Enfin un grand merci à tous mes amis qui sont là quand je ne suis pas au labo : merci à ceux qui sont partis ou qui sont loin: Hélène, Karine, Louise et Ben. Certains ont dit que j'étais cinglée de faire une thèse, d'autres ont approuvé, mais tous étaient là quand j'en avais besoin. Merci à ceux qui sont là : Pluto (je laisserai l'anonymat pour ne pas qu'on t'appelle comme ça après), merci à Alfonso pour son rire inimitable, à Anaïs, à Elena, à David et Lina, à Irene, à Etienne, Nathalie et Mariette, à DJ pour son sourire, à Bertrand et Myriam et à tous ceux que j'oublie certainement.

Enfin (non pas parce qu'ils sont les moins méritants, mais parce qu'il faut un dernier), un énorme merci à mes parents, grands-parents, beaux-parents et à mon frère pour leur soutien permanent et pour m'avoir donné la chance de faire ce que je voulais. Merci pour tous les sacrifices que vous avez faits. Et pour finir, un énorme merci à mon Guigui, qui bien qu'étant dans la même galère que moi m'a soutenue tout au long de ses trois ans et j'espère pour très très longtemps encore. Merci d'être là pour moi chaque jour.

# Liste des abréviations

AG :	acides gras
AGPI :	acides gras polyinsaturés
ATP :	adénosine triphosphate
CDP-Choline :	cytidine diphosphate-choline
CDP-Ethanolamine :	cytidine diphosphate-éthanolamine
CLHP :	chromatographie liquide haute performance
CMP :	cytidine monophosphate
CPM :	choline phosphotransférase microsomiale
CTP :	cytidine triphosphate
DEDL :	détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DG :	diglycéride
DHA :	acide docosahexaénoïque (22:6)
EPA :	acide eicosapenténoïque (20:5)
ESI :	source d'ionisation electrospray
HDL :	lipoprotéine de haute densité
LCAT :	lécithine cholestérol acyle transférase
LDL :	lipoprotéine de basse densité
MG :	monoglycéride
PA :	acide phosphatidique
PAF :	facteur d'activation des plaquettes
PC :	phosphatidylcholine
PE :	phosphatidyléthanolamine
PI :	phosphatidylinositol
PL :	phospholipide
PS :	phosphatidylsérine
PSS1, PPS2 :	phosphatidylsérine synthase 1 ou 2
RT :	temps de rétention
SLPC :	1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
SLS :	1,3-stearoyl,2-linoleoyl-glycerol
SM :	sphingomyéline
SOPC :	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
SOPE :	1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
SOS :	1,3-stearoyl,2-oleoyl-glycerol
SPE:	extraction en phase solide
TG:	triglycérides
TIC :	courant ionique total
TMA :	triméthylamine
VLDL :	lipoprotéine de très basse densité

# Table des matières

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>11</b>
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>15</b>
<b>CONTEXTE DE L'ETUDE.....</b>	<b>15</b>
<b>1. BIOCHIMIE DES PHOSPHOLIPIDES.....</b>	<b>16</b>
1.1 Structures et classification.....	16
1.1.1 Glycérophospholipides .....	16
1.1.2 Phosphosphingolipides .....	18
1.2 Biosynthèse des glycérophospholipides.....	18
1.2.1 Phosphatidylcholines .....	18
1.2.2 Phosphatidyléthanolamines .....	20
1.2.3 Phosphatidylsérines .....	20
1.2.4 Phosphatidylinositols et phosphatidylglycérols .....	21
1.3 Rôle des phospholipides dans la signalisation cellulaire .....	23
<b>2. LES PHOSPHOLIPIDES ET L'ALIMENTATION .....</b>	<b>26</b>
2.1 Sources .....	26
2.2 Mécanismes d'absorption des phospholipides alimentaires (Cas de la phosphatidylcholine).....	29
2.3 Intérêts nutritionnels des lécithines .....	31
2.3.1 Rôle des phospholipides dans la prévention du risque cardiovasculaire .....	31
2.3.2 Rôle des phospholipides dans la prévention du diabète .....	34
2.3.3 Rôle des phospholipides au niveau du cerveau et du système nerveux.....	34
2.3.4 Rôle des phospholipides dans la prévention des pathologies du foie .....	35
2.3.5 Effet protecteur des phospholipides sur la muqueuse gastro-intestinale .....	35
2.3.6 Vectorisation des acides gras par les phospholipides.....	36
2.4 Intérêts technologiques.....	37
<b>3. OXYDATION DES PHOSPHOLIPIDES.....</b>	<b>40</b>
3.1 Oxydation des acides gras .....	40
3.1.1 Mécanismes d'oxydation des acides gras .....	40
3.1.2 Produits d'oxydation des acides gras.....	44
3.2 Influence des phospholipides sur l'oxydabilité d'un système lipidique .....	51
3.2.1 Effet pro-oxydant.....	51
3.2.2 Effet anti-oxydant .....	52
<b>4. METHODES D'ANALYSE DES PHOSPHOLIPIDES .....</b>	<b>53</b>
4.1 Extraction .....	53
4.1.1 Extraction des phospholipides en deux étapes .....	53
4.1.2 Extraction des phospholipides en une étape .....	53
4.2 Analyses chromatographiques des phospholipides .....	54
4.2.1 Chromatographie planaire .....	54
4.2.2 Chromatographie gazeuse.....	54
4.2.3 Chromatographie liquide .....	55
<b>CHAPITRE 2 : .....</b>	<b>59</b>
<b>CARACTERISATION DE SOURCES DE PHOSPHOLIPIDES POLYINSATURES .....</b>	<b>59</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>60</b>
<b>PARTIE A : .....</b>	<b>63</b>
<b>EXTRACTION ET ANALYSE DES PHOSPHOLIPIDES ET DETERMINATION DES PROFILS D'ACIDES GRAS .....</b>	<b>63</b>
<b>1. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>64</b>
1.1 Extraction des lipides totaux et analyse des phospholipides .....	64
1.1.1 Matrices alimentaires et substances de références .....	64

1.1.2 Préparation des échantillons .....	64
1.1.3 Protocole d'extraction des lipides totaux .....	65
1.1.4 Méthodes chromatographiques .....	66
<b>1.2 Détermination de la répartition des acides gras entre les phospholipides et les triglycérides .....</b>	<b>67</b>
1.2.1 Matériels et réactifs .....	67
1.2.2 Extraction en phase solide .....	68
1.2.3 Transestérification .....	69
1.2.4 Chromatographie en phase gazeuse .....	69
1.2.5 Analyse des résultats .....	70
<b>2. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>71</b>
2.1 <i>Extraction des lipides totaux et analyse des phospholipides .....</i>	<i>71</i>
2.1.1 Préparation des échantillons .....	71
2.1.2 Identification des familles de phospholipides .....	72
2.1.3 Détermination du nombre optimal d'extractions .....	74
2.2 <i>Détermination de la répartition des acides gras entre les phospholipides et les triglycérides .....</i>	<i>80</i>
2.2.1 Séparation des fractions phospholipides et triglycérides par extraction en phase solide .....	80
2.2.2 Analyse des acides gras contenus dans les fractions phospholipides et triglycérides .....	82
<b>PARTIE B : .....</b>	<b>87</b>
<b>DETERMINATION DES ESPECES MOLECULAIRES DE LA PHOSPHATIDYLCHOLINE .....</b>	<b>87</b>
<b>1. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>88</b>
1.1 <i>Réactifs .....</i>	<i>88</i>
1.2 <i>Protocoles de purification des phosphatidylcholines .....</i>	<i>88</i>
1.2.1 Chromatographie Flash .....	88
1.2.2 Chromatographie préparative .....	89
1.2.3 Vérification de la pureté de la fraction phosphatidylcholine .....	89
1.3 <i>Chromatographie en phase gazeuse .....</i>	<i>90</i>
1.4 <i>Séparation et identification des espèces moléculaires de phosphatidylcholine .....</i>	<i>91</i>
<b>2. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>93</b>
2.1 <i>Purification des phosphatidylcholines .....</i>	<i>93</i>
2.2 <i>Profils d'acides gras des phosphatidylcholines purifiées .....</i>	<i>95</i>
2.3 <i>Espèces moléculaires de phosphatidylcholine .....</i>	<i>97</i>
2.3.1 Séparation chromatographique .....	97
2.3.2 Identification .....	99
2.3.3 Profils des espèces moléculaires de phosphatidylcholine .....	102
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>106</b>
<b>PUBLICATION 1 .....</b>	<b>109</b>
<b>CHAPITRE 3 : .....</b>	<b>117</b>
<b>ETUDE DE LA STABILITE A L'OXYDATION DES PHOSPHOLIPIDES ET COMPARAISON AVEC LES TRIGLYCERIDES .....</b>	<b>117</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>118</b>
<b>2. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>120</b>
2.1 <i>Réactifs et solutions .....</i>	<i>120</i>
2.1.1 Réactifs .....	120
2.1.2 Solutions stock .....	120
2.2 <i>Détermination de la température optimale d'oxydation .....</i>	<i>121</i>
2.2.1 Traitement des échantillons .....	121
2.2.2 Analyse par spectrométrie de masse .....	121
2.3 <i>Chromatographie liquide haute performance (CHLP-MS) .....</i>	<i>122</i>
<b>3. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>123</b>
3.1 <i>Produits d'oxydation des phospholipides étudiés .....</i>	<i>123</i>
3.1.1 Détermination des températures optimales d'oxydation .....	123
3.1.2 Identification des produits d'oxydation des phospholipides .....	124
3.2 <i>Influence du constituant en position sn-3 .....</i>	<i>133</i>
3.2.1 Cinétiques d'oxydation des triglycérides .....	133

3.2.2 Cinétiques d'oxydation des phosphatidylcholines .....	137
3.2.3 Cinétique d'oxydation de SOPE .....	140
3.2.4 Exploitation des résultats .....	141
<b>4. CONCLUSION.....</b>	<b>149</b>
<b>PUBLICATION 2 .....</b>	<b>151</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>159</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>165</b>

# **Introduction générale**

---

La découverte de la lécithine par Vauquelin remonte au XIX<sup>ème</sup> siècle, quand des lipides contenant du phosphore ont été décrits dans le tissu neural. Ce n'est que quelques décennies plus tard que Gobley a isolé du jaune d'œuf une substance dotée de propriétés émulsifiantes, qu'il appelle lécithine (du grec *lekitos*, qui signifie jaune d'œuf). Aujourd'hui, la lécithine peut désigner deux choses : d'abord la lécithine, aussi connue sous le nom de phosphatidylcholine (PC), désigne une classe de phospholipides (PL), au même titre que la phosphatidyléthanolamine (PE). Mais la lécithine désigne aussi plus fréquemment un mélange de différentes classes de PL. Au cours de notre étude, le terme de lécithine renverra à un mélange de différents PL. Elle peut être extraite de différentes sources. A l'heure actuelle, le jaune d'œuf en est encore une source importante, même s'il a été largement supplanté par le soja. Cependant, les nouvelles mesures législatives européennes visant à déclarer tout ajout d'allergènes potentiels dans les aliments et les nouvelles réglementations concernant les OGM ont tendance à favoriser le développement et l'utilisation d'autres sources de lécithines, comme par exemple les lécithines de tournesol, d'arachide ou de colza.

Les lécithines sont tout d'abord utilisées pour leurs propriétés technologiques. On les retrouve dans divers produits comme les peintures, les shampooings, les dépoussiérants, mais aussi dans de nombreux produits issus de l'industrie agro-alimentaire, en tant qu'émulsifiant ou agent de texture par exemple. Mais, la lécithine fait aussi partie des lipides présents naturellement dans notre alimentation (œuf, lait, soja). Toutefois les modifications des comportements alimentaires, visant à limiter la consommation de cholestérol ont fait baisser la consommation d'œufs et donc la consommation de PL (81). La crise de la « vache folle », liée à l'encéphalopathie spongiforme bovine, a également diminué fortement la consommation d'abats riches en PL tels que la cervelle.

Pourtant, de nombreuses études ont montré que la lécithine possède par l'intermédiaire des PL qu'elle contient, des effets bénéfiques sur la santé humaine. Les PL sont des constituants des cellules et jouent de nombreux rôles dans la signalisation cellulaire. La lécithine protège aussi le système cardio-vasculaire notamment en diminuant le taux de cholestérol, améliore les facultés cognitives ou encore protège le foie en favorisant les processus de détoxification et en limitant les états dégénératifs tels que la cirrhose ou la fibrose hépatique. Ainsi, on peut facilement supposer que de nombreux bienfaits sont minimisés voire perdus avec les nouvelles habitudes alimentaires qui se sont installées et qui ont entraîné une baisse de la consommation de PL. Pourtant, la lécithine, majoritairement

composée de PC, est une bonne source de choline, mais également d'acides gras polyinsaturés (AGPI) qui sont tous des nutriments essentiels.

Des compléments alimentaires à base de PL de différentes origines (végétales, marines) sont disponibles dans le commerce depuis plusieurs années. Les compléments alimentaires sont définis comme des denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses [...] (3). Cependant, généraliser l'utilisation de compléments alimentaires pour réguler la consommation de lécithine de l'ensemble d'une population n'est pas la solution pour pallier à la baisse de consommation de PL. Ces différentes constatations ont donc conduit un certain nombre de nutritionnistes et d'industriels de l'agro-alimentaire à envisager la mise sur le marché d'aliments supplémentés en lécithine pour atteindre les quantités de PL recommandées. Certains extraits contenant des PL ont déjà été autorisés par l'Union européenne en tant que nouvel aliment ou nouvel ingrédient alimentaire. C'est le cas notamment des PL du jaune d'œuf (purs de 85 à 100%), autorisés dès l'an 2000 (1) et de l'huile de krill (Neptune Krill Oil : NKO) qui a reçu l'approbation en 2009 (4).

Supplémenter des aliments en PL nécessite donc de choisir des nutriments à fort potentiel nutritionnel afin d'apporter le maximum de bienfaits. Les molécules les plus intéressantes sont celles qui véhiculent des AG essentiels et/ou des AGPI comme les acides eicosapentaénoïque (EPA) ou docosahexaénoïque (DHA). Supplémenter les aliments avec des substances pures est tout à fait irréalisable à l'échelle industrielle, du fait de la difficulté et du coût exorbitant à obtenir des substances pures. Il faut donc obligatoirement se tourner vers des sources naturelles de PL, ce qui nécessite un important travail de caractérisation. Au cours de ce travail de thèse, des méthodes analytiques ont été mises au point afin de pouvoir sélectionner des sources de PL à fort potentiel nutritionnel. Les méthodes analytiques développées ont permis l'analyse des familles et des espèces moléculaires des phosphatidylcholines (PC) des matrices choisies.

Par ailleurs, l'utilisation de sources de PL insaturés pose forcément la problématique de la stabilité de ces sources vis-à-vis de l'oxydation. L'oxydation des AGPI à longues chaînes sous forme de triglycérides (TG) a été largement étudiée au cours de ces dix dernières années. En revanche, peu d'informations sont aujourd'hui disponibles à la fois sur la nature

des produits de dégradation générés à partir de PL polyinsaturés suite à un traitement thermique et sur l'influence de la structure sur leur stabilité vis-à-vis de l'oxydation thermique. Avant de passer à l'étape de supplémentation, il est important de connaître le devenir des molécules d'intérêt suite au traitement thermique qu'elles peuvent subir. Ce travail de thèse a permis d'identifier les produits de dégradation issus du traitement thermique de deux espèces moléculaires de PC et d'une espèce de PE. Les cinétiques de formation des produits d'oxydation et de dégradation des produits de départ ont été étudiées et comparées entre elles d'une part et avec celles des TG correspondants d'autre part, afin d'évaluer la stabilité des PL étudiés par rapport aux TG.

# Chapitre 1

---

## Contexte de l'étude

Ce premier chapitre introduit le contexte de l'étude. Les nombreuses fonctionnalités et intérêts des PL seront présentés. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux intérêts des PL au niveau de l'alimentation, tant pour leurs bienfaits nutritionnels que technologiques, mais également pour leur capacité à prévenir certaines maladies. Comme les PL de l'alimentation sont inévitablement soumis aux processus oxydatifs, un bilan du mécanisme d'oxydation des lipides, ainsi que du rôle joué par les PL dans les systèmes lipidiques soumis à l'oxydation seront décrits. Enfin, un bilan des techniques analytiques utilisées pour l'extraction et l'analyse des PL aussi bien issus de matrices biologiques qu'alimentaires sera donné en fin de chapitre.

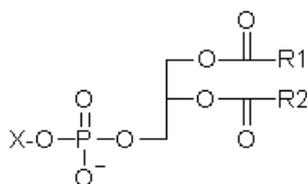
# 1. Biochimie des phospholipides

## 1.1 Structures et classification

Les lipides sont des molécules très importantes pour la vie. Il en existe un très grand nombre, ce qui a conduit à établir une classification. Les lipides sont séparés en deux grandes classes que sont les lipides simples et les lipides complexes. Les lipides simples sont uniquement constitués d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène. Les lipides contenus dans cette classe sont les glycérides, les stérides et les cérides. Les lipides complexes sont également constitués de carbone, d'oxygène et d'hydrogène mais contiennent en plus au moins un hétéroatome. Au sein de la classe des lipides complexes, on trouve notamment les phospholipides (PL), qui sont des lipides polaires. On trouve deux types de PL : les glycérophospholipides (glycéroPL) et les phosphosphingolipides. La différenciation entre ces deux classes se fait par la nature du squelette de base : soit le glycérol, soit la sphingosine.

### 1.1.1 Glycérophospholipides

Les glycéroPL (Figure 1) sont des molécules amphiphiles, constituées d'un squelette glycéride, de deux acides gras (AG) et d'un ester phosphorique estérifié en position *sn*-3. Le constituant principal des glycéroPL est l'acide phosphatidique (PA), encore appelé 1,2-diacyl-*sn*-glycerol-3-phosphate. Les deux AG en position *sn*-1 (R1) et *sn*-2 (R2) sont des AG à chaînes longues ( $14 \leq C \leq 22$ ) et l'AG en position 2 est souvent insaturé.



**Figure 1** : Formule générale d'un glycéroPL

Le nombre d'insaturations peut varier de 0 à 6. Le PA est un intermédiaire de synthèse des glycéroPL qui sont obtenus par estérification d'une deuxième fonction acide du phosphate à l'aide d'un composé hydroxylé : X-OH. Les composés hydroxylés estérifiant le groupement phosphate sont le plus souvent des alcools aminés ou des polyols (Tableau 1).

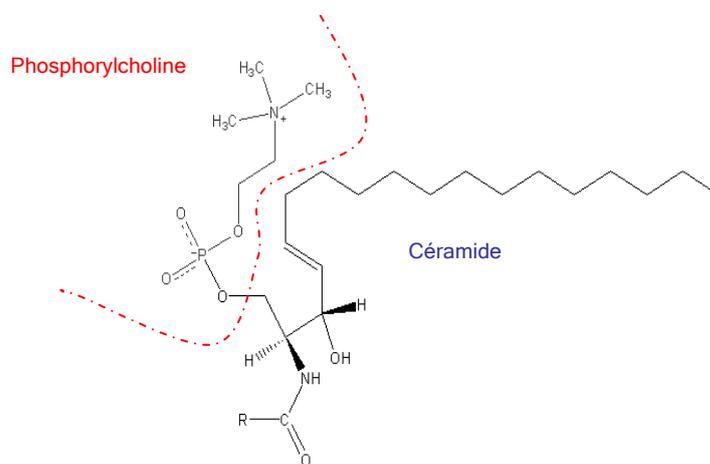
C'est d'ailleurs la nature de ces composés hydroxylés qui a conduit à répartir les glycéroPL en différentes classes ou familles. Les familles existantes sont les phosphatidylcholines (PC), encore appelées 1,2-diacyl-*sn*-glycerol-3-phosphorylcholine ou lécithines, les phosphatidyléthanolamines (PE) (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phosphoryléthanolamine ou céphalines), les phosphatidylsérines (PS) (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine), les phosphatidylinositols (PI) (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1-D-myo-inositol ou inositides) et les phosphatidylglycérols (PG) (1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-phospho-1'-*sn*-glycerol).

**Tableau 1** : Classification des glycéroPL

Substituant HO-X		GlycéroPL	
<i>Nom</i>	<i>Formule</i>	<i>Famille</i>	<i>Symboles</i>
Sérine		Phosphatidylsérines -	PS
Ethanolamine		Phosphatidyléthanolamines Céphalines	PE
Choline		Phosphatidylcholines Lécithines	PC
Myo-inositol		Phosphatidylinositols Inositides	PI
Glycérol		Phosphatidylglycérols -	PG

### 1.1.2 Phosphosphingolipides

Les sphingolipides contiennent une molécule de sphingosine, qui est un alcool aminé à longue chaîne insaturée. Le groupement amine de la sphingosine est lié à un AG par une liaison amide. Ce groupement est appelé céramide. La sphingomyéline (SM), qui est l'un des sphingolipides les plus répandus est constituée d'un céramide et d'un groupement phosphorylcholine (Figure 2). Chez l'être humain, la SM représente plus de 85% des sphingolipides. D'autres sphingolipides, estérifiés cette fois avec un groupement phosphoryléthanolamine sont également possibles.



**Figure 2** : Structure de la SM

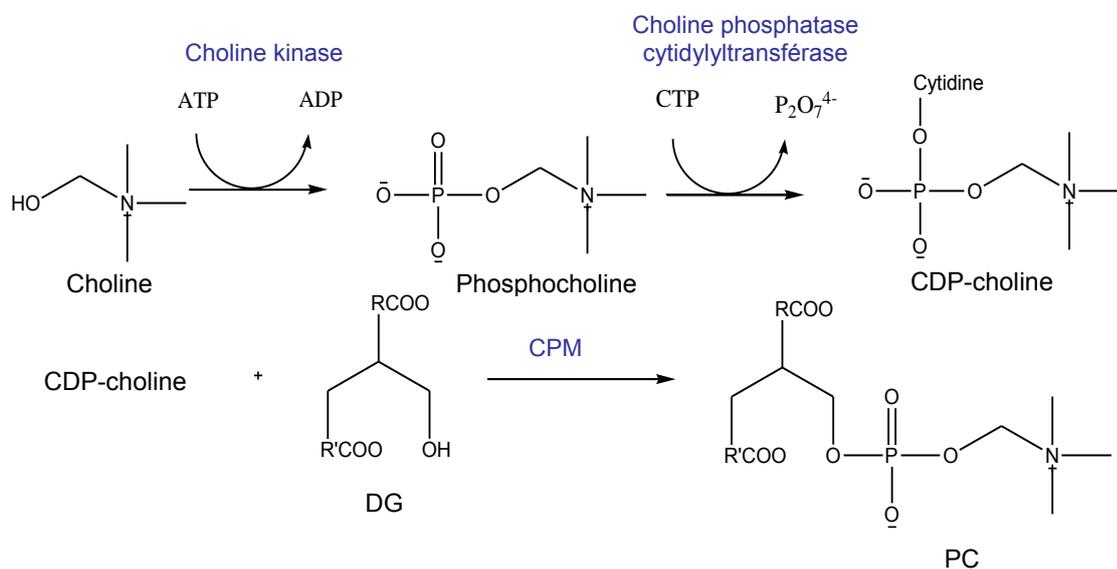
## 1.2 Biosynthèse des glycérophospholipides

Les mécanismes de biosynthèse présentés ici concernent les animaux et les végétaux, sauf indication contraire.

### 1.2.1 Phosphatidylcholines

La PC, qui est l'un des PL majoritaire dans les membranes cellulaires des animaux et des végétaux, est synthétisée essentiellement dans l'appareil de Golgi, et dans une moindre mesure, dans les mitochondries (27;177). L'étape terminale de la biosynthèse des PL se produit dans le réticulum endoplasmique. Chez les vertébrés, la principale voie de biosynthèse de la PC à partir de la choline est la voie dite de Kennedy (6;56) (Figure 3). La choline entre dans la cellule par diffusion facilitée où elle est phosphorylée par catalyse par la choline

kinase. La diffusion facilitée est un mode de transport transmembranaire qui permet le passage d'un analyte au travers de la membrane par l'intermédiaire d'une protéine transmembranaire de transport. La phosphocholine ainsi formée se combine à une molécule de cytidine triphosphate (CTP) pour donner de la CDP-choline (cytidine-diphosphate choline), au niveau du cytosol, du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi, à l'aide de la choline phosphatase cytidylyltransférase (171). La dernière étape est la combinaison de la CDP-choline avec un diglycéride (DG) grâce à la CDP-choline 1,2 diacylglycerol phosphocholine transférase, encore appelée choline phosphotransférase microsomiale (CPM) (45;171).



**Figure 3** : Voie métabolique de synthèse de la PC (6)

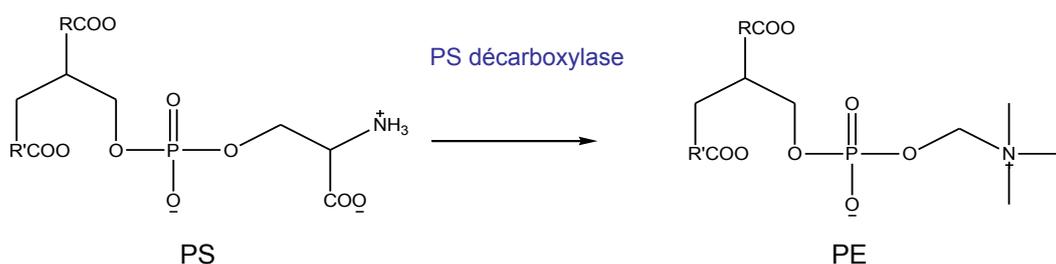
La deuxième voie de biosynthèse de la PC se fait dans les microsomes hépatiques à partir de PE qui est progressivement méthylée en utilisant la S-adénosylméthionine comme donneur de groupements méthyles pour former des mono-, di- et enfin triméthyl-PE (= PC) sous l'action de la PE méthyltransférase (56). Cette voie de méthylation est moins importante que celle décrite précédemment. Cependant, elle peut représenter jusqu'à 40% de la PC synthétisée dans le foie (164). Ce pourcentage important peut s'expliquer par le fait que cette voie métabolique de synthèse de PC s'avère nécessaire au bon fonctionnement du foie (195).

Une troisième voie de biosynthèse se développe à partir de la phosphocholine, dérivant de la dégradation de la SM par une sphingomyélinase acide dans les lysosomes (83), qui est incorporée dans PC de la même façon que dans la première voie métabolique décrite.

Plusieurs études ont montré que les voies de synthèse sont dépendantes de la nature des AG. Il semblerait que pour des molécules contenant des AG saturés à chaîne moyenne (16 à 18 atomes de carbone), la voie CDP-choline est favorisée, alors que pour des espèces à chaînes longues et polyinsaturées (acide arachidonique par exemple), c'est la voie de méthylation de PE qui est privilégiée. Ainsi, les espèces moléculaires produites par l'une ou l'autre des voies de synthèse sont différentes (55).

### 1.2.2 Phosphatidyléthanolamines

Trois voies de synthèse ont été mises en évidence pour la PE. La première, qui se produit dans le réticulum endoplasmique, est une voie de synthèse similaire à celle de PC (56;176) (Figure 3). Cette fois, les enzymes mises en jeu sont l'éthanolamine kinase, l'éthanolamine phosphatase cytidylyltransférase et la CDP-éthanolamine 1,2 diacylglycerol phosphoéthanolamine transférase. L'éthanolamine remplace la choline, la phosphocholine est remplacée par la phosphoéthanolamine et enfin la CDP-éthanolamine remplace la CDP-choline. La seconde voie de synthèse se produit dans les mitochondries par décarboxylation de la PS (Figure 4). Enfin, une troisième voie métabolique existe dans le réticulum endoplasmique où les têtes polaires des PL s'interchangent (84). Dans le foie, la PE est synthétisée à la fois à partir de la voie CDP-éthanolamine et de la voie utilisant la décarboxylation de la PS (152).

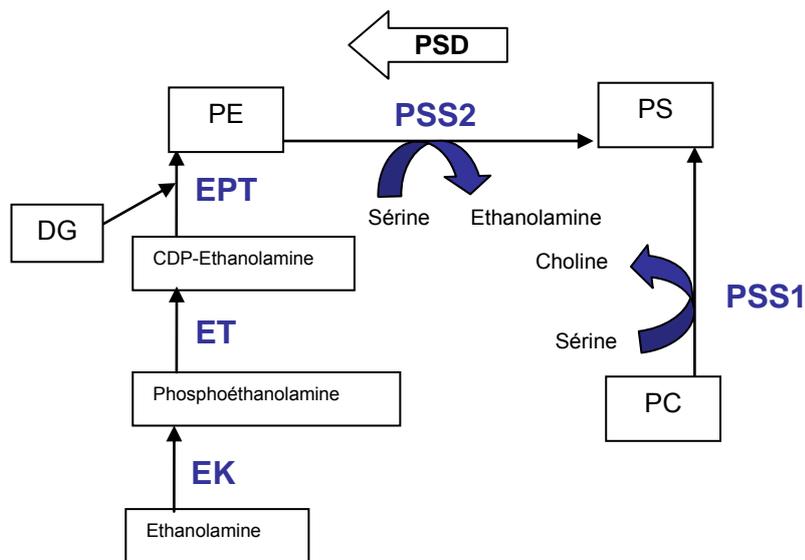


**Figure 4** : Voie de synthèse de la PE par décarboxylation de la PS

### 1.2.3 Phosphatidylsérines

Chez les mammifères et les végétaux, la voie principale de synthèse de la PS s'effectue dans le réticulum endoplasmique et les membranes mitochondriales

correspondantes. La synthèse de la PS provient du remplacement de la tête éthanolamine de la PE par de la sérine libre (56;176). Cette réaction peut également se produire en échangeant la choline de la PC avec de la sérine. Deux enzymes spécifiques de la tête polaire de départ ont été mises en évidence : la PS synthase-1 (PSS1) qui échange la choline par la sérine et la PS synthase-2 (PSS2) qui substitue la sérine à l'éthanolamine (66;177). En étudiant le métabolisme de PE et PS, de nombreux liens entre ces deux familles ont été mis en évidence. La Figure 5 montre les différentes interactions au niveau de la synthèse de ces deux classes de PL (176).



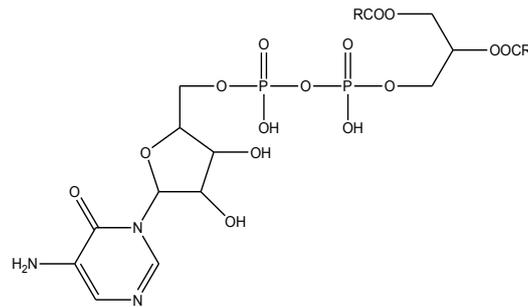
**Figure 5** : Métabolisme de PS et PE chez les mammifères (176)

Ser : sérine, Etn : éthanolamine, Cho : choline, P-Etn : phosphoéthanolamine, PSS1 : PS-synthase-1, PSS2 : PS-synthase-2, PSD : PS decarboxylase, DG : diglycéride, EK : éthanolamine kinase, EPT : éthanolamine phosphotransférase, ET : CTP-phosphoéthanolamine cytidylyltransferase

Une autre voie de synthèse de PS a été mise en évidence chez les levures et les procaryotes. Elle est commune à PS, PI et PG. Elle sera détaillée dans le paragraphe suivant.

#### 1.2.4 Phosphatidylinositols et phosphatidylglycérols

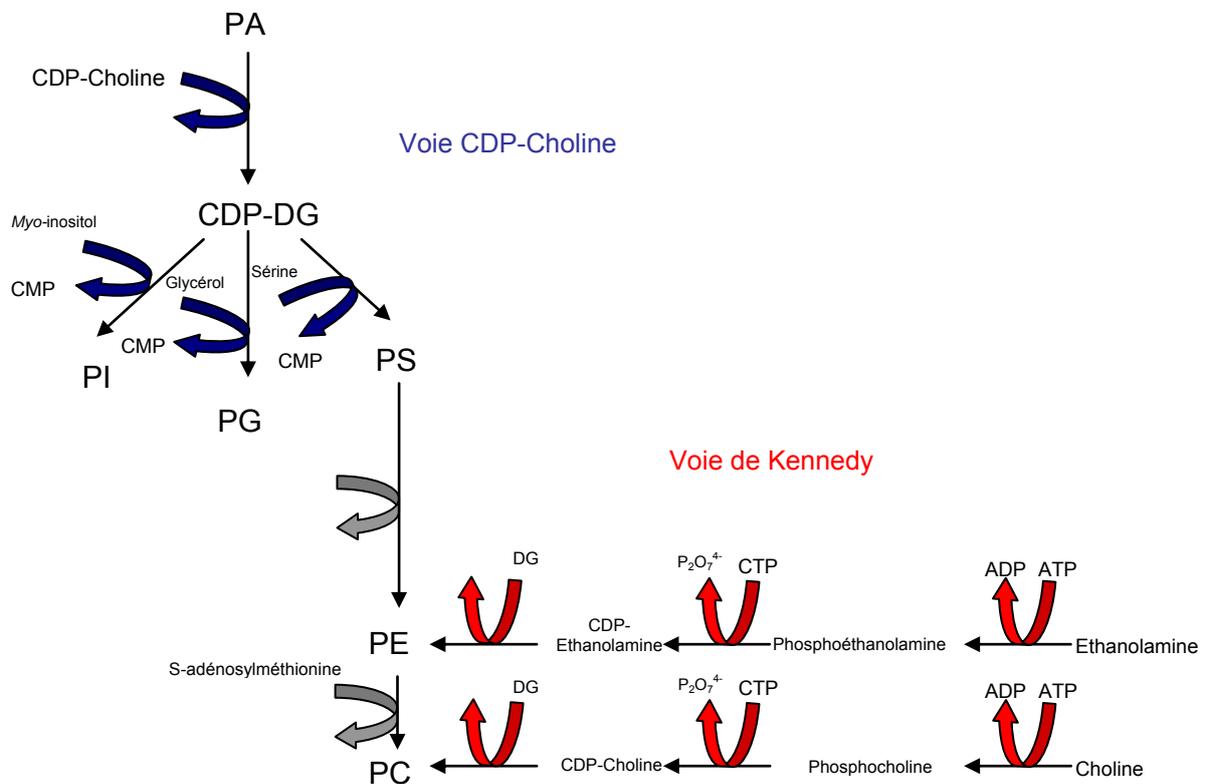
La biosynthèse de PI et PG implique une réaction entre la CDP-choline et PA, qui entraîne la formation d'une CDP-diglycéride (Figure 6).



**Figure 6** : Structure de la CDP-diglycéride (131)

Cette molécule réagit avec le *myo*-inositol, pour donner du CMP (cytidine monophosphate) et du PI, sous l'action de la PI synthase. Certains autres PL (PG et PS) sont synthétisés de la même façon, à partir de la CDP-diglycéride et du glycérol ou de la sérine, mais sous l'action d'enzymes différentes (PG ou PS synthases).

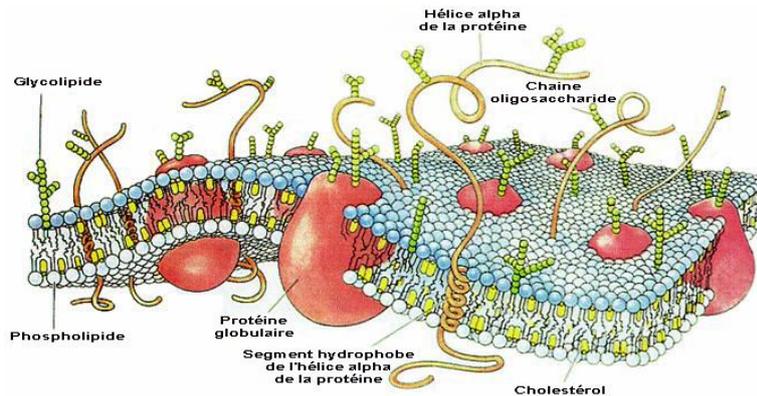
Il existe donc deux voies principales de biosynthèse des PL : la voie CDP-diglycéride et la voie de Kennedy, qui conduisent chacune à différentes familles de PL (Figure 7). Par exemple, la voie CDP-choline conduit à la formation de PI, PS et PG. PE et PC sont formés à partir de la voie de Kennedy, même si des voies de synthèse transversales sont possibles pour former PE à partir de PS (Figure 5).



**Figure 7** : Schéma global de la biosynthèse des PL (adapté d'après (7))

### 1.3 Rôle des phospholipides dans la signalisation cellulaire

La signalisation cellulaire, qu'elle soit intra ou intercellulaire, implique la membrane comme un élément fondamental de la communication à l'intérieur d'un organisme (106). La membrane cellulaire est soumise à une multitude de signaux, aussi bien au niveau des protéines ancrées dans la membrane, que des lipides tels que le cholestérol et les PL (Figure 8).



**Figure 8** : Schéma d'une membrane cellulaire (5)

Le rôle structural des PL dans la membrane cellulaire est évidemment très important, mais de plus en plus les PL sont définis comme des composés bioactifs de la cellule. Certains PL, notamment les sphingolipides, ont été identifiés comme molécules signal (106), jouant un rôle sur la croissance et la fonction des cellules. Différents mécanismes sont impliqués dans la transduction du signal cellulaire : la diffusion facilitée des solutés et des ions, l'activation de protéines kinases et de phospholipases, qui sont à l'origine du renouvellement des PL membranaires (45).

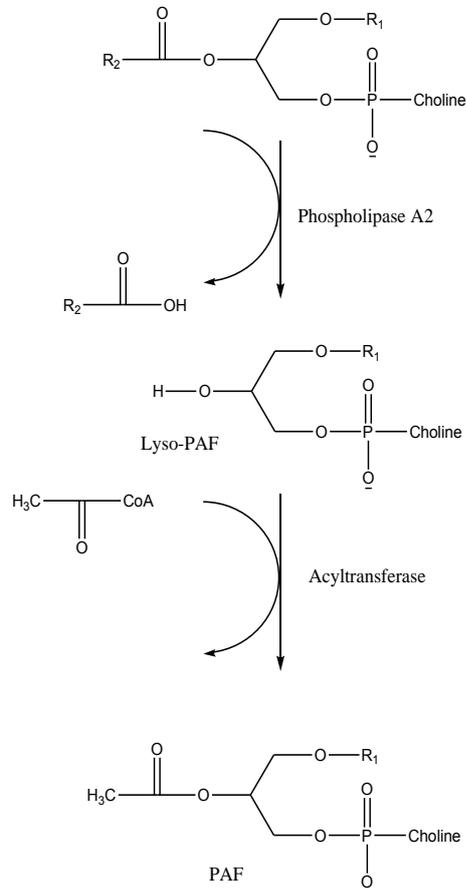
PI est impliqué dans la transmission des messages au travers de la membrane cellulaire. Il est activé par 2 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) en phosphatidylinositol 4,5 bis phosphate. Par l'intermédiaire de la phospholipase C, il est clivé en DG qui active la protéine kinase C et en inositol 1,4,5 triphosphate IP3 qui ouvre les canaux intracellulaires et ainsi augmente les concentrations en calcium et activent des enzymes qui pourront modifier des protéines très importantes (par exemple les protéines d'échange ionique) pour le fonctionnement de la cellule (74).

Les lyso-PL sont des molécules intermédiaires dans le métabolisme des PL. Par rapport aux PL, ils ont perdu un des AG, ce qui les rend encore plus polaires que les PL. La lyso-PC est une molécule biologiquement active issue de l'hydrolyse de la PC. Son origine peut provenir soit de l'absorption intestinale de la PC alimentaire, soit de l'action de la lécithine cholestérol acyle transférase (LCAT) dans le plasma, soit du passage intermembranaire des PC nécessitant l'action d'une phospholipase (45). La LCAT est une enzyme plasmatique qui fabrique des lyso-PC et des esters de cholestérol à partir de la PC et du cholestérol. Des effets de la lyso-PC qui sont considérés comme néfastes ont été mis en évidence, comme l'inhibition de la migration des cellules endothéliales, essentielle au bon rétablissement artériel après un accident vasculaire (47). La présence de lyso-PC dans les LDL (low density lipoproteins) oxydées a également été remarquée dans le développement de l'athérosclérose (95;162). Cependant, d'autres effets, bénéfiques cette fois, ont été démontrés plus récemment. En effet, Shaul et Mineo ont démontré que l'association des lyso-PC avec les HDL (high density lipoproteins) stimule la formation de monoxyde d'azote NO, qui présente des propriétés anti-athérogènes (151).

Le lyso-PA est connu depuis longtemps pour être le précurseur de la biosynthèse des PL chez les eucaryotes et procaryotes. Ce n'est que plus tardivement que son implication dans la signalisation cellulaire a été mise en évidence (118). Il est reconnu comme un important médiateur de régénération tissulaire et de cicatrisation. Il induit également la croissance des fibroblastes (117), des cellules musculaires vasculaires lisses, des cellules endothéliales et des kératinocytes (118). Il agit aussi très largement dans le processus réparateur. Il régule la croissance cellulaire au cours de certains processus cancérogènes, comme le cancer ovarien. Cependant, comme pour la lyso-PC, tous les effets du lyso-PA ne sont pas forcément bénéfiques : il peut par exemple entraîner une augmentation des désordres cellulaires résultant du stress oxydatif ou encore il intervient dans les premiers stades de formation de l'athérosclérose (45;172).

L'hydrolyse des PL conduit aussi à la formation d'autres médiateurs lipidiques, comme le facteur d'activation des plaquettes (PAF). Le terme de facteur d'activation des plaquettes a été introduit pour décrire l'activité d'un métabolite non identifié, qui intervient dans l'agrégation des plaquettes sanguines. En 1979, un PL est identifié comme responsable de ce phénomène et sa structure est 1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine. Il est synthétisé à partir de la 1-O-alkyl-2-acyl-glycérophosphocholine qui est hydrolysée par la

phospholipase A2 en lyso-PAF et en un AG libre, souvent l'acide arachidonique (20:4). Le lyso-PAF résultant de cette lyse est alors acétylé pour donner le PAF (1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) (Figure 9).



**Figure 9 :** Biosynthèse du PAF à partir de la 1-O-alkyl-2-acyl-glycérophosphocholine (10)

De nombreuses autres fonctions ont été mises au jour pour ce composé, comme son rôle de médiateur de l'inflammation et son implication dans les mécanismes de la réponse immunitaire (12;45).

## 2. Les phospholipides et l'alimentation

La découverte des PL remonte au XIX<sup>ème</sup> siècle, quand Théodore Gobley identifie dans le jaune d'œuf un lipide phosphoré, qu'il appelle "lécithine" (du grec "lekithos" qui signifie jaune d'œuf). Le terme lécithine est aujourd'hui parfois utilisé à tort. En effet, si l'on se base sur la classification (Tableau 1), le terme lécithine renvoie à la famille des PC, de la même façon que le terme céphaline se réfère aux PE. Pourtant, la plupart du temps lorsqu'on parle de lécithine, il s'agit d'un mélange de PL et d'autres constituants. D'un point de vue réglementaire, toute substance contenant plus de 60% de lipides polaires (PL ou glycolipides) et moins de 40% de lipides neutres répond à la définition de lécithine selon le *Codex alimentarius*. Dans cette partie, nous traiterons les PL dans leur ensemble, c'est-à-dire la lécithine comme mélange de PL et non comme la classe PC.

### 2.1 Sources

Les PL sont des constituants très importants au niveau des membranes cellulaires. Ils sont présents aussi bien chez les animaux que chez les végétaux. Comme ils sont essentiels à la vie, on les retrouve dans les organes vitaux, tels que le cerveau, le foie et les reins chez les animaux et dans les racines, les graines et les noix chez les végétaux. La source végétale la plus fréquente de lécithine est le soja qui fournit plus de 90% des lécithines végétales. Cependant, d'autres sources sont aussi parfois utilisées telles que le colza, le maïs ou les graines d'arachide (150). En ce qui concerne les lécithines d'origine animale, c'est la lécithine d'œuf qui est la plus répandue, même si d'autres sources comme le lait ou les tissus cérébraux ont pu être utilisées. Des différences notables entre les lécithines végétales et animales ont pu être mises en évidence (Tableau 2) (45;150). Les lécithines végétales contiennent en majorité PC, PE et PI. D'autres familles de PL comme PS peuvent être présentes mais généralement en faible quantité. En revanche, les lécithines d'origine animale sont, en général plus riches en PC (c'est le cas de la lécithine d'œuf, notamment) et contiennent de la SM, qui est une famille de PL que l'on ne retrouve que dans les sources d'origine animale. Les tissus cérébraux sont les sources qui contiennent la plus grande variété de classes de PL (150).

**Tableau 2** : Composition en PL de différentes sources (en % molaire) (45;150)

Classes de PL	Lécithine de Soja	Lécithine de Colza	Lécithine d'Arachide	Lait	Lécithine d'Oeuf	Tissus cérébraux
PC	23	37	23	34	75	22
PE	24	30	8	33	19	35
PI	21	13	17	5	2	2
PA	5	-	2	-	-	1
PS	2	-	-	3	-	19
SM	-	-	-	25	4	16
Phytoglycolipides	13	20	38	-	-	-
Autres PL	12	-	12	-	-	2

- : non détecté

Les lécithines se différencient donc par le type et le pourcentage relatif des familles de PL qu'elles contiennent, mais la nature des AG portés par ces PL est également un facteur de différenciation (Tableau 3) (45). En effet, les lécithines végétales sont d'une manière générale plus riches en acides linoléique (18:2) et  $\alpha$ -linoléique (18:3) qu'en AG saturés, alors que dans les lécithines animales, les acides palmitique (16:0) et stéarique (18:0) sont beaucoup plus abondants que les AG polyinsaturés. L'acide arachidonique (20:4), quant à lui, est d'une manière générale, uniquement présent dans les lécithines animales (45;150).

**Tableau 3** : Composition en acides gras de certaines sources de PL (% molaires) (45)

AG	Lécithine de Soja	Lécithine de Colza	Lécithine d'Arachide	Lécithine d'Oeuf
Palmitique (16:0)	14	10	7	39
Stéarique (18:0)	4	2	3	10
Oléique (18:1)	11	44	45	31
Linoléique (18:2)	64	36	22	15
$\alpha$ -linoléique (18:3)	7	8	-	-
Arachidique (20:0)	-	-	23	-
Arachidonique (20:4)	-	-	-	5

- : non détecté

Des sources émergentes de PL sont en train d'apparaître sur le marché, notamment des sources d'origine marine. Dans ces nouvelles sources potentielles, on trouve différents maillons de la chaîne alimentaire, comme les microalgues ou certains crustacés, qui peuvent contenir des quantités importantes de lipides. Dans les lipides polaires, la proportion en acides gras polyinsaturés (AGPI), notamment l'acide eicosapentaénoïque (EPA ou C20:5) et l'acide docosahexaénoïque (DHA ou C22:6) varie selon les espèces. Chez certaines d'entre elles comme les dinoflagellées, le DHA est l'un des AG majoritaires estérifiés aux PL (100;163). Si l'on considère les crustacés, qui constituent le maillon suivant dans la chaîne alimentaire, on retrouve certaines espèces, comme le krill, qui présentent un intérêt tout particulier en tant que sources de PL polyinsaturés. Le krill est un voisin de la crevette et est présent en abondance dans tous les océans, notamment les mers froides. Il peut contenir une quantité très variable de lipides, dont 40 % à 60 % sont des phospholipides (14;144). Il s'agit donc d'une source potentielle de lipides polaires extrêmement importante.

Même si comme on vient de le voir, il existe un grand nombre de sources de PL, un certain nombre d'entre elles ne sont pas exploitées industriellement. Les lécithines produites chaque année avec un fort tonnage sont les lécithines de soja et d'œuf. La préparation industrielle de la lécithine permet d'obtenir un mélange de phosphatides insolubles dans l'acétone. L'obtention de la lécithine se fait par des procédés physico-chimiques assez simples (broyage, filtration, centrifugation, fractionnement par précipitation à l'acétone) comme indiqué dans la Figure 10.

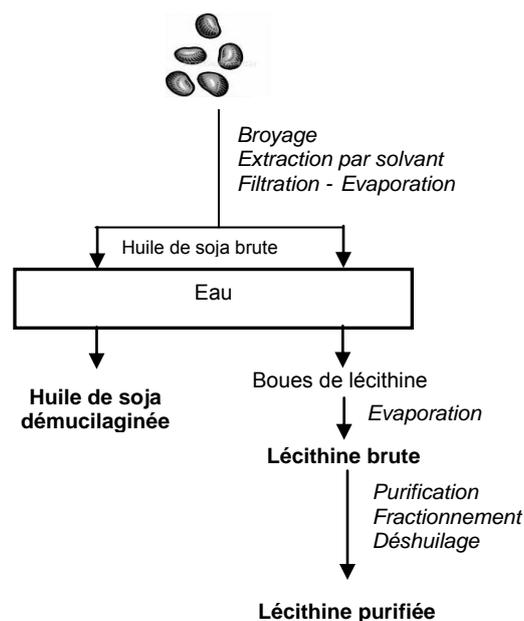


Figure 10 : Obtention industrielle de la lécithine de soja (45)

Différents degrés de pureté peuvent être obtenus au cours de ce procédé. Les produits non raffinés contiennent plusieurs classes de PL, notamment PC, PE, PS et PI combinés à d'autres substances comme les glycolipides ou les lipides neutres (45;150). En fonction du degré de pureté, la lécithine est obtenue sous différentes formes physiques (poudres, granules ou pâtes) et avec des pourcentages variables de PC entre 20 et 95%. Le procédé d'obtention de la lécithine d'œuf est basé sur les mêmes principes que celui des lécithines végétales (notamment du soja). Durant les dix dernières années, différents travaux ont été menés concernant des méthodes d'extraction des lécithines (128;129;187;188;192). Les méthodes mises au point sont parfois sélectives de certaines classes de PL ou visent à enlever le cholestérol présent dans les lécithines d'œuf, mais ne sont pour l'instant pas appliquées à l'échelle industrielle.

## 2.2 Mécanismes d'absorption des phospholipides alimentaires (Cas de la phosphatidylcholine)

La digestion des lipides commence dans la cavité buccale où ils sont exposés aux lipases qui sont sécrétées par la langue et qui démarrent le processus de digestion des lipides. La digestion se poursuit dans l'estomac sous l'effet combiné des lipases linguales et gastriques. L'estomac constitue le site majeur pour l'émulsification des lipides alimentaires et des vitamines liposolubles. Les émulsions de lipides entrent dans le duodénum sous forme de fines gouttelettes et sous l'action de la bile et des sucs pancréatiques, ils vont subir de profondes modifications physico-chimiques. Le processus d'émulsification (Figure 11 **A**) se poursuit dans le duodénum avec l'hydrolyse (Figure 11 **B**) et la formation de micelles (Figure 11 **C**) qui sont les deux étapes précédant l'absorption au travers de la paroi intestinale (Figure 11 **D**) (80). Les TG et PL alimentaires sont mélangés avec les PL biliaries dans la lumière intestinale. Les PL prédominants dans la lumière intestinale sont les PC, que l'on retrouve dans les micelles contenant également du cholestérol et des sels biliaries. La digestion des PL commence avec l'action de la phospholipase pancréatique A2 sécrétée avec d'autres lipases en réponse à la consommation d'aliments, qui les lyse en lyso-PL et AG libres. Les TG, quant à eux sont lysés par des lipases en AG libres et en monoglycérides (MG). Ces produits lysés s'intègrent aux micelles qui se forment spontanément en présence de sels biliaries et passent ainsi la barrière intestinale. Les lyso-PL absorbés sont réacylés en PL et les MG en TG au

niveau de la muqueuse intestinale et peuvent passer dans la lymphe par association avec les chylomicrons (Figure 11 E).

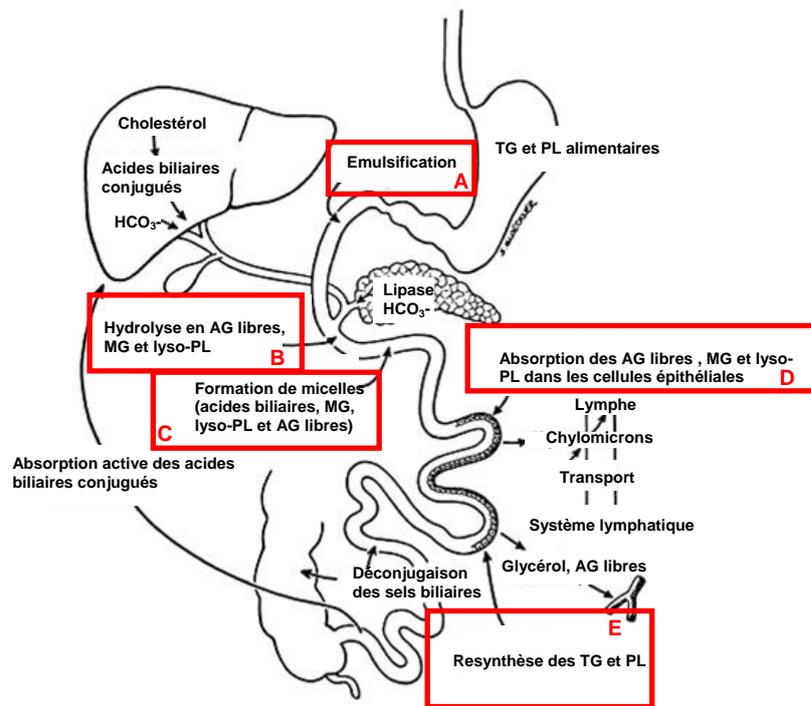


Figure 11 : Mécanisme d'absorption des PL et TG alimentaires (2)

Des études ont montré que 50% des PC alimentaires sont absorbés sous forme de lyso-PC, le reste étant dégradé en glycérophosphocholine et phosphorylcholine. Mais des travaux menés sur modèle animal laissent penser qu'un certain pourcentage de PC pourrait être absorbé sans modification chimique (45). Mais, quelle que soit la façon dont sont absorbées les PC (intacts ou sous forme de lyso-PC), elles sont de toute façon retransformées en PC et intégrées aux HDL d'origine intestinale.

La biodisponibilité de la PC contenue dans les lécithines est évaluée à l'aide du taux de choline retrouvé dans le plasma et le cerveau, mais également à l'aide du taux d'acétylcholine du cerveau. Plusieurs études ont montré que la lécithine est une meilleure source de choline, que la forme chlorure de choline, utilisée habituellement (73;150;189). En ce qui concerne les AG, il a été démontré que leur biodisponibilité est accrue si ils sont vectorisés par des PL, plutôt que par des TG (15;64;102;130;132;184). Le passage des AG au travers des membranes cellulaires et leur taux dans le milieu intracellulaire est supérieur quand ils sont estérifiés à des PL (130).

## 2.3 Intérêts nutritionnels des lécithines

### 2.3.1 Rôle des phospholipides dans la prévention du risque cardiovasculaire

Différents facteurs sont responsables de l'augmentation du risque cardio-vasculaire et les facteurs nutritionnels ne sont pas à négliger. Les maladies cardio-vasculaires sont l'une des premières causes de décès en France (environ 32% des décès par an). Beaucoup d'études ont cherché à mettre en évidence les facteurs de risque qui établissent un lien direct entre maladie cardio-vasculaire, alimentation et mode de vie. Quatorze facteurs ont été mis en évidence, dont l'hyperhomocystéinémie et l'hypercholestérolémie. Dans cette partie, nous nous intéresserons essentiellement à l'influence des PL alimentaires sur ces deux facteurs.

- Hyperhomocystéinémie

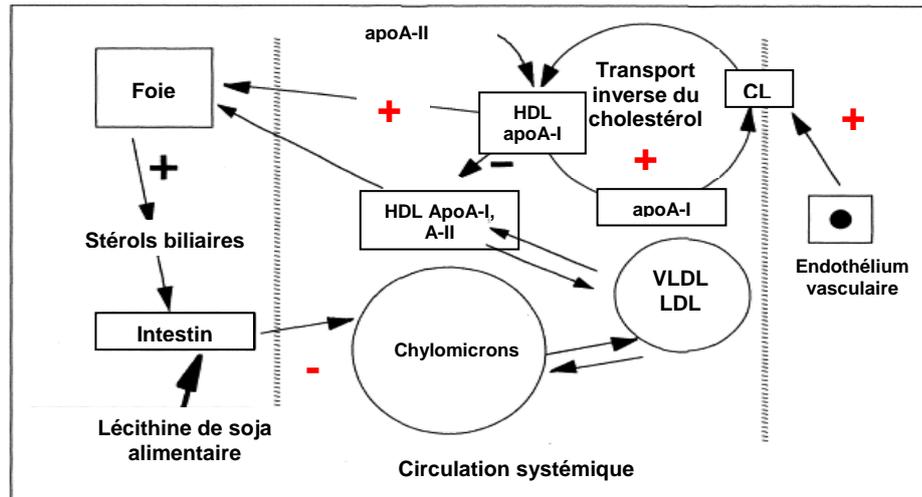
L'homocystéine est un composé intermédiaire formé au cours du métabolisme de la méthionine. C'est un métabolite dont l'élimination dépend directement de la choline. En effet, l'homocystéine est convertie en méthionine par la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase, qui utilise une forme oxydée de la choline (la bêtaïne) (194). D'autres composés sont essentiels à l'élimination de l'homocystéine comme la vitamine B6, la bêtaïne ou l'acide folique.

Des études ont montré que l'homocystéine est un facteur primaire du risque cardio-vasculaire, comme par exemple pour l'infarctus du myocarde ou pour la thrombose (16;31;113;148;160). Des patients présentant une hyperhomocystéinémie, traités avec de la choline ou de la bêtaïne combinée avec de la vitamine B6 ou de l'acide folique, ont montré une baisse de leur taux d'homocystéine plasmatique (74;126). Cependant certaines études ont montré qu'une consommation plus élevée de choline ou de bêtaïne ne constitue pas une protection contre le risque cardio-vasculaire (26). Pourtant, lors d'une étude chez la souris et chez l'homme, un régime appauvri en choline entraîne rapidement une augmentation du taux d'homocystéine plasmatique (54) et entraîne chez le rat le développement du processus athéromateux. Ces résultats suggèrent qu'une consommation adéquate de choline ou de lécithine pourrait constituer une bonne protection contre une augmentation du taux d'homocystéine (45;150).

- Hypercholestérolémie

Plusieurs études dans différents pays ont montré que le taux de cholestérol total plasmatique est directement corrélé avec les maladies cardio-vasculaires (180). L'augmentation du taux de cholestérol-HDL, parallèlement à la diminution du taux de cholestérol plasmatique, des LDL et des VLDL apparaît comme un marqueur important de prévention du risque cardio-vasculaire (90) et de régression des lésions coronaires (34). Différentes corrélations entre le taux de cholestérol et le risque cardio-vasculaire ont été faites et il a été clairement démontré qu'une baisse du taux de cholestérol diminue le risque d'accidents cardio-vasculaires et inversement (98). Même si le lien entre cholestérol alimentaire et cholestérol plasmatique n'est pas totalement élucidé, l'une des solutions préconisées par les nutritionnistes est de réduire les apports en cholestérol pour limiter le risque cardiovasculaire. Plusieurs nutriments, et notamment les lécithines ont fait l'objet d'études visant à déterminer l'impact de leur consommation alimentaire sur le taux de cholestérol et donc ainsi sur le risque cardio-vasculaire.

Dans le compartiment plasmatique, les LDL assurent l'approvisionnement en cholestérol des tissus extra hépatiques. Les tissus périphériques sont cependant incapables de dégrader le cholestérol ainsi accumulé. Dans ces conditions, l'homéostasie du cholestérol ne peut être maintenue que grâce à un système d'épuration et de transport vers le foie. Cette voie de retour du cholestérol, des tissus périphériques vers le foie, est nommée transport inverse du cholestérol. Ce système peut être divisé en plusieurs étapes (Figure 12). La première constitue l'efflux du cholestérol cellulaire. Par la suite le cholestérol libre nouvellement acquis est estérifié au sein des particules HDL. Enfin, dans une dernière étape, le cholestérol retourne au foie, soit directement par captation des particules HDL, soit via le transfert aux autres lipoprotéines de basse densité, les VLDL et LDL.



**Figure 12 :** Effets de la lécithine de soja sur le métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines (112)

CL : cholestérol libre, VLDL : lipoprotéines de très basse densité, LDL : lipoprotéines de basse densité, HDL : lipoprotéines de haute densité, ApoA-I et ApoA-II : apolipoprotéines A-I et A-II  
 + : stimulation par les PC, - : inhibition par les PC.

Plusieurs modèles expérimentaux ont clairement mis en évidence l'effet hypocholestérolémiant de la lécithine de soja (86;136;137). L'effet le plus marqué est obtenu avec des lécithines polyinsaturées, par comparaison à des triglycérides polyinsaturés. La lécithine agit donc grâce à sa tête polaire, mais aussi grâce à la nature de ses acides gras. Les lécithines alimentaires entraînent une inhibition de l'absorption intestinale du cholestérol chez l'homme et chez le rat. Il a été montré chez le rat comme chez le lapin, que la consommation de lécithine induit une augmentation du taux de cholestérol biliaire, qui entraîne une diminution de l'absorption du cholestérol alimentaire (136;137).

Une autre hypothèse est mise en avant pour expliquer l'effet hypocholestérolémiant de la lécithine. Il semblerait que le transport inverse du cholestérol par les HDL soit amplifié par l'ingestion de lécithine, ce qui permet de limiter le taux de cholestérol circulant, susceptible de se déposer dans les vaisseaux sanguins (46). Enfin, l'ingestion de lécithine favorise la synthèse et la sécrétion des sels biliaires. Cette augmentation de la sécrétion du cholestérol biliaire est à relier directement à une augmentation de la captation hépatique du cholestérol et à la diminution très significative du taux plasmatique de cholestérol total, ainsi qu'à l'excrétion des stérols hors de l'organisme (Figure 12).

### 2.3.2 Rôle des phospholipides dans la prévention du diabète

Des études épidémiologiques ont montré que le diabète et la consommation de graisses saturées sont directement reliés et que l'incidence de cette maladie est moindre chez les populations consommant une plus grande quantité de graisses polyinsaturées (45). Pour certains auteurs, la PC polyinsaturée présente un effet cytoprotecteur envers les cellules bêta du pancréas, ce qui indirectement permet le maintien de la synthèse de l'insuline et de sa sécrétion pour une homéostasie normale du glucose (101).

Les AGPI incorporés dans les PL membranaires exercent un rôle de régulateur sur les cellules mais aussi sur la microcirculation, par la production d'eicosanoïdes. Le diabète entraîne une diminution de la synthèse de ces AGPI, ce qui provoque de graves bouleversements au niveau du métabolisme des membranes et au niveau microcirculatoire, ce qui peut conduire à des neuropathies (polynévrite par exemple). L'utilisation de PL enrichis en DHA a permis de rétablir, tout du moins partiellement, le flux sanguin chez des patients diabétiques atteints de neuropathie (52).

### 2.3.3 Rôle des phospholipides au niveau du cerveau et du système nerveux

Plusieurs études ont montré que l'ingestion de lécithine pouvait jouer un rôle de prévention dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, ainsi que dans les syndromes de Tourette et de Friedreich (150). La lécithine agit comme une réserve de choline qui peut fournir de la choline sur demande. Des études animales et humaines ont confirmé que l'ingestion de lécithine améliore les capacités cognitives et d'apprentissage (24;82) et peut retarder les dégénérescences cognitives liées à l'âge.

Une consommation de choline trop faible peut être impliquée dans le développement de la maladie d'Alzheimer, qui affecte directement les récepteurs cholinergiques. Les neurones cholinergiques utilisent la choline pour synthétiser un neurotransmetteur : l'acétylcholine. La consommation d'aliments riches en choline ou en lécithine augmente la concentration en choline dans le plasma, ce qui entraîne une augmentation du niveau de choline et d'acétylcholine dans le cerveau.

D'autres auteurs se sont intéressés à la PS, qui est une famille de PL très abondante dans le cerveau. Des études cliniques ont montré que la PS maintient les fonctions cérébrales, qui déclinent avec l'âge. Même si les études cliniques sur les fonctions mentales

sont très difficiles à réaliser, certaines améliorations au niveau de la reconnaissance des visages ont pu être mises en évidence (53). Heiss *et al* ont également montré que les sujets traités avec de la PS faisaient preuve d'une meilleure activité cérébrale que les patients non traités avec PS et que le déclin des fonctions cognitives s'était stabilisé à la fin de l'étude (71).

#### 2.3.4 Rôle des phospholipides dans la prévention des pathologies du foie

Un régime déficient en choline peut favoriser la cancérogenèse du foie. Un déficit en choline ou en lécithine provoque une accumulation des TG dans le foie qui sont métabolisés en DG, qui s'accumulent à leur tour dans le foie. Ce déficit perturbe les signaux transmembranaires dans le foie et contribue au développement du cancer. Une supplémentation en choline, sous forme de lécithine a montré une diminution du taux de lipides dans le foie chez des patients sous nutrition parentérale totale (150).

Indépendamment de sa capacité à fournir de la choline, la PC possède également des effets hépatoprotecteurs propres. Une étude a été menée sur des singes nourris avec un régime alimentaire riche en alcool, enrichi ou non par de la lécithine. Les résultats ont montré que les singes nourris avec les régimes non supplémentés en lécithine développent des cirrhoses hépatiques et des fibroses, alors qu'aucun singe nourri avec un régime supplémenté n'en a développé (105). En revanche, si la tête polaire est substituée, aucun effet protecteur du foie n'a été mis en évidence.

#### 2.3.5 Effet protecteur des phospholipides sur la muqueuse gastro-intestinale

La PC aurait montré des effets protecteurs au niveau de la muqueuse intestinale. Les sels biliaires présentent une très bonne capacité détergente puisqu'ils ont pour rôle de former des micelles avec les lipides issus de la digestion pour les faire passer au travers de la barrière intestinale. Mais cette capacité détergente peut devenir toxique pour les lipides de la membrane intestinale, en provoquant par exemple des cholécystites ou des ulcérations gastriques (58). La lécithine agit en se mélangeant aux sels biliaires pour former des micelles mixtes, moins toxiques que les micelles de sels biliaires seuls (22). Treede *et al* ont montré en utilisant des modèles de cellules, que seule la PC peut inhiber les processus inflammatoires. La consommation de lécithine à forte teneur en PC pourrait s'avérer utile dans la protection de la muqueuse intestinale ou dans le traitement de la colite ulcéreuse (174).

### 2.3.6 Vectorisation des acides gras par les phospholipides

Les AGPI jouent différents rôles très importants dans bon nombre de fonctions de l'organisme, en particulier dans la réduction du risque cardiovasculaire, de l'hypertension, de l'inflammation (65;150). Parmi ces AG, l'acide linoléique (18:2) et l'acide linoléique (18:3) sont des AG extrêmement importants, puisqu'ils ne sont pas synthétisés par l'organisme humain et qu'ils doivent impérativement être amenés par l'alimentation. Ces deux AG sont également les précurseurs d'autres AG comme l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) qui sont essentiels pour le développement cérébral et rétinien (15;70;75). Plusieurs études ont montré qu'au niveau de la biodisponibilité et de l'assimilation des AG, les PL sont des vecteurs d'AG beaucoup plus efficaces que les TG (15;102;184), qui sont pourtant les lipides majoritaires de notre alimentation. Plusieurs études se sont intéressées aux fonctions cérébrales et il a été montré qu'une supplémentation en DHA sous forme de PL améliore le comportement, l'apprentissage et les fonctions visuelles chez des souris déficitaires en AG oméga-3 (40). De plus, Bourre *et al.* ont montré qu'une supplémentation en AGPI sous forme de PL est plus efficace que sous la forme TG (30) et la lyso-PC a été proposée comme étant un vecteur spécifique des AG vers le cerveau (97).

Les bienfaits exposés dans cette partie mettent en avant les PL, et plus particulièrement PC. Ces molécules apparaissent comme des nutriments très bénéfiques pour la santé. Ainsi, les PL se différencient beaucoup des autres catégories de lipides que sont les TG et le cholestérol. De nombreuses études ont été menées sur ces deux classes de lipides très présentes dans notre alimentation, du fait de leurs effets néfastes. En revanche, peu d'études et de moyens ont été dévolus à la promotion de la lécithine et des PL en tant que lipides ou nutriments bénéfiques. Quelques études ont montré comme décrit plus haut que la lécithine peut amplifier le transport inverse du cholestérol (138). Les propriétés anti-athérogènes et anti-inflammatoires des PL laissent supposer que les PL alimentaires ont un rôle protecteur vis-à-vis du risque cardio-vasculaire. Malgré tout, peu d'informations sont disponibles sur la consommation réelle de lécithine, puisque les tables de composition des aliments ne donnent pas d'informations sur leur teneur globale en PL et encore moins sur la répartition par classe de PL. Ce manque de données est regrettable car elles sont indispensables pour évaluer correctement les apports nutritionnels conseillés. Des estimations prétendent qu'il faudrait une consommation journalière de 6 g de PL ou de lécithine pour un adulte. Actuellement, la consommation serait seulement de 2-3 g par jour. Il conviendrait de compenser ces déficits

par de nouveaux vecteurs alimentaires riches ou enrichis en PL. Il serait sans doute pertinent et probablement utile de développer de nouvelles gammes d'aliments, à coût peu élevé, présentant la double caractéristique de diminuer l'apport calorique en graisses, tout en apportant des quantités adéquates de lécithine (45). Cependant, enrichir des aliments en lécithines demande des études préalables sur la stabilité des molécules d'intérêt ainsi ajoutées pour évaluer le devenir de ces produits au cours de la préparation de l'aliment ou encore des procédés industriels de transformation.

## 2.4 Intérêts technologiques

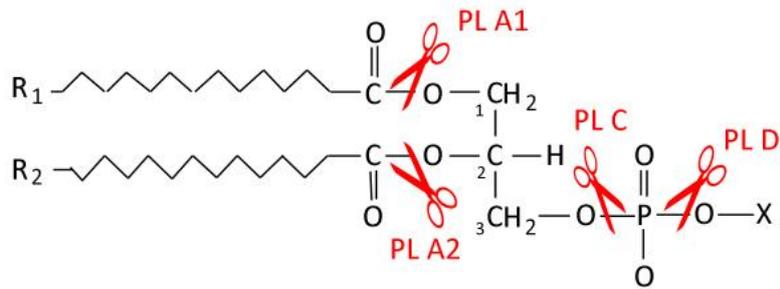
Les utilisations de la lécithine en agro-alimentaire sont liées à ses propriétés multifonctionnelles. En temps qu'additif alimentaire, elle est aussi connue sous le nom de E322 et est utilisée essentiellement pour ses propriétés émulsifiantes, sa capacité à former des films, son rôle de surfactant, sa capacité à réduire la viscosité et ses propriétés antioxydantes (150). Les quatre premières sont directement liées au caractère amphiphile des PL, qui est dû à l'association dans la molécule d'une partie polaire et d'une partie apolaire. Ce caractère amphiphile leur confère une affinité à la fois pour les phases aqueuses et pour les phases lipophiles, ce qui permet d'obtenir des émulsions stables. Le Tableau 4 donne un aperçu des applications industrielles de la lécithine dans le domaine agroalimentaire.

**Tableau 4** : Applications industrielles de la lécithine en agroalimentaire ; adapté d'après (45)

<b>Applications</b>	<b>Propriétés de la lécithine</b>
Biscuits et pâtisseries	Rhéologie, homogénéisation des graisses, dispersion des graisses
Chocolats	Dispersion des graisses, stabilisation de l'émulsion
Fromage fondu	Anti-agglomérant
Margarines	Emulsifiant, antioxydant
Sauces salades	Stabilisation d'émulsions
Pâtes alimentaires	Tenue de la couleur
Aliments pour enfants	Emulsifiant

L'alimentation animale est aussi un utilisateur important de lécithine, notamment dans l'élevage et les procédés d'engraissement. Elle intervient en particulier dans l'amélioration de la digestibilité des lipides et prévient le risque d'engorgement du foie. Cet additif alimentaire empêche aussi le dessèchement de la peau, améliore le métabolisme énergétique, le gain de poids et la qualité du pelage (45).

Afin d'améliorer les propriétés technologiques des lécithines, certaines modifications chimiques peuvent être appliquées aux groupements fonctionnels. Les réactions d'acétylation, d'hydroxylation et d'hydrolyse sont utilisées à des fins commerciales (150). L'acétylation est formée sur le groupement amine primaire de PE. Cette réaction permet d'augmenter la fluidité, la dispersion et les propriétés émulsifiantes. La réaction d'hydroxylation est produite en faisant réagir de la lécithine brute avec du peroxyde d'hydrogène, de l'acide lactique ou de l'acide acétique. Les deux sites susceptibles d'être modifiés sur la molécule sont les doubles liaisons des chaînes d'AG ou la fonction éthanolamine de la tête polaire. Le fait d'hydroxyler les lécithines augmente leur pouvoir émulsifiant et favorise la dispersion dans l'eau. La dernière modification que l'on peut trouver est l'hydrolyse. Les lécithines utilisées industriellement sont des lécithines partiellement hydrolysées, en général avec la phospholipase A2. Comme pour les lécithines hydroxylées, le pouvoir émulsifiant des lécithines partiellement hydrolysées est supérieur à celui des lécithines non hydrolysées. L'hydrolyse chimique étant souvent difficile à contrôler, la méthode enzymatique lui est souvent préférée. Différentes enzymes spécifiques des PL sont disponibles (50), mais chacune d'entre elles lyse au niveau d'un site de clivage particulier (Figure 13). Les phospholipases A1 (EC 3.1.1.32) et A2 (EC 3.1.1.4) clivent respectivement les AG estérifiés en position 1 et 2 et libèrent ainsi des lyso-PL. La phospholipase C (EC 3.1.4.3) lyse la liaison ester entre le groupement glycérol et l'ester phosphorique, libérant un DG et un phosphoalcool. Enfin, la phospholipase D (EC 3.1.4.4) lyse la fonction ester entre la fonction acide du phosphate et l'alcool, libérant un phosphatide et un alcool. Une autre phospholipase est disponible, il s'agit de la phospholipase B (EC 3.1.1.5) qui combine les lyses des sites A, en libérant les deux AG ainsi qu'un glycérophosphorylalcool.



**Figure 13** : Sites de lyse des différentes phospholipases (11)

Les lécithines présentent donc un intérêt important au niveau technologique, comme agent de texture, émulsifiant, anti-agglomérant ou encore comme dispersant. Ces aspects technologiques s'ajoutent aux propriétés nutritionnelles et métaboliques, énoncées précédemment.

## 3. Oxydation des phospholipides

L'oxydation des lipides a été beaucoup étudiée, notamment celle des esters méthyliques d'AG, des AG libres (43;44;149) ou encore des TG (37;123). Beaucoup moins de travaux ont été réalisés sur les PL, mais comme ce sont des molécules contenant des AG, souvent insaturés, le mécanisme d'oxydation des PL insaturés suit la même tendance que celle des AGPI (62). Des données sont disponibles sur l'oxydabilité des AG en fonction de la forme sous laquelle ils sont étudiés (AG libres, MG, DG, TG). La nature des produits d'oxydation est identique mais la vitesse d'oxydation dépend de la forme sous laquelle se trouve l'AG (51;150). Comme les mécanismes mis en jeu sont identiques pour tous les AG quelle que soit leur forme chimique, nous traiterons donc les mécanismes d'oxydation des lipides en général.

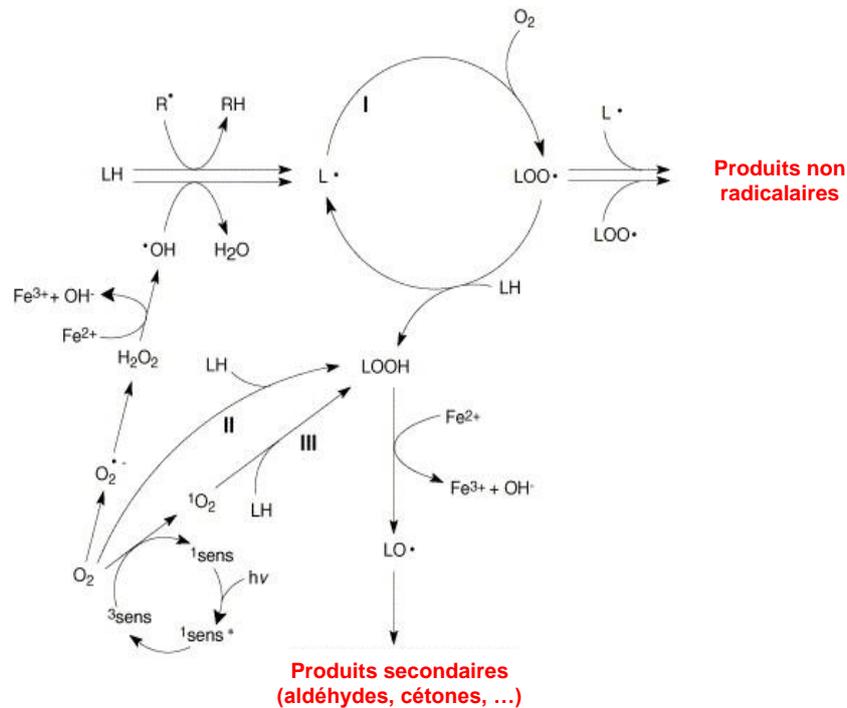
### 3.1 Oxydation des acides gras

#### 3.1.1 Mécanismes d'oxydation des acides gras

L'oxydation des lipides insaturés dépend du niveau d'activation de l'oxygène. Trois voies sont généralement reconnues (Figure 14). La voie (I), souvent appelée auto-oxydation, est un mécanisme se produisant à pression atmosphérique et impliquant des radicaux libres. L'auto-oxydation est fortement catalysée par la présence d'ions métalliques comme le Fe II ou le Fe III. La voie (II) implique les lipoxygénases qui sont des enzymes très répandues dans le règne animal et végétal qui catalysent l'oxygénation des doubles liaisons des AGPI. La troisième et dernière voie possible est la photo-oxydation (III) qui nécessite la présence d'un photo-sensibilisateur (chlorophylle par exemple) pour former soit des oxygènes singulet capables de se fixer directement sur les AGPI sans passer par l'étape radicalaire, soit directement des radicaux libres (39;62).

Les AGPI sont particulièrement fragiles vis-à-vis de l'oxydation car les radicaux libres se propagent le long des chaînes d'AG, grâce à leurs insaturations. Les traces d'ions métalliques ou les métalloprotéines sont également des facteurs accélérateurs du processus oxydatif (Figure 14). Les hydroperoxydes sont les produits primaires de l'oxydation des

AGPI. Ils sont formés suivant les voies I, II ou III (Figure 14) et sont ensuite décomposés en radicaux peroxy ou alkoxy. L'un et l'autre peuvent induire de nouvelles réactions radicalaires et les radicaux alkoxy peuvent en plus se décomposer en aldéhydes et autres produits secondaires d'oxydation, volatils ou non.



**Figure 14 :** Mécanismes possibles de l'oxydation des lipides insaturés : (I) Réaction radicalaire initiée par activation de l'oxygène par irradiation ou encore par des oxydants pour former des radicaux hydroxyl ; (II) Formation des hydroperoxydes par voie enzymatique par la lipoxigénase ; (III) Formation des hydroperoxydes par la formation d'oxygène singulet ou par la formation directe de radicaux, initiée par la lumière (photo-oxydation) (39)

### 3.1.1.1 Auto-oxydation

L'auto-oxydation est la réaction directe entre l'oxygène moléculaire et des composés organiques. Cette réaction chimique se décompose en trois étapes que l'on appelle initiation, propagation et terminaison.

L'étape d'initiation est l'étape au cours de laquelle un hydrocarbure insaturé perd un atome d'hydrogène (en position  $\alpha$  du groupement méthylène ou le H en position bis allylique) pour former un radical libre (Équation 1). L'initiation est l'étape limitante de la réaction d'oxydation, mais la vitesse de la réaction d'initiation augmente avec le degré d'insaturation des lipides.



Puis les réactions s'enchaînent, les radicaux libres formés fixent l'oxygène moléculaire et forment des radicaux libres peroxy instables (Équation 2), qui peuvent réagir avec une nouvelle molécule d'acide gras pour former des hydroperoxydes et de nouveaux radicaux libres (Équation 3), c'est l'étape de propagation.



Un radical libre peut initier la formation de nombreuses molécules d'hydroperoxydes. Les hydroperoxydes catalysent l'auto-oxydation en se décomposant en radicaux libres (Équation 4, Équation 5, Équation 6). La vitesse de la réaction augmente avec la concentration en hydroperoxydes. Un tel processus est qualifié d'auto-catalytique.



Enfin, les radicaux vont se recombiner pour conduire à des produits de réaction non radicalaires (Équation 7, Équation 8, Équation 9). C'est la phase de terminaison.



### 3.1.1.2 Oxydation enzymatique

Un autre mécanisme important d'oxydation est l'oxydation enzymatique. Les lipides sont oxydés à la suite de multiples réactions enzymatiques avec tout d'abord la libération des AG par l'action de lipases et de phospholipases. Les AG libérés par la lipolyse peuvent ensuite être oxydés le plus souvent par les lipoxygénases, qui sont présentes à la fois dans les tissus animaux et végétaux. Sous la forme native, elles contiennent un atome de fer sous la forme Fe (II) au site actif, qui va être oxydé en Fe (III) par les produits de réactions (hydroperoxydes lipidiques ou peroxyde d'hydrogène) pour permettre la catalyse de la

réaction. L'enzyme, ainsi activée, arrache l'hydrogène du groupe méthylène de l'AGPI avec réduction du Fe (III) en Fe (II) (Figure 15).

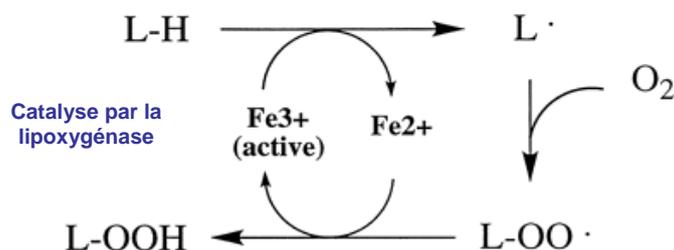


Figure 15 : Mécanisme de la lipoxygénase (32)

### 3.1.1.3 Photo-oxydation

L'oxydation par l'oxygène singulet est très importante pour les lipides exposés à la lumière visible et ultraviolette. En présence d'un photosensibilisateur, tel que la riboflavine (Figure 16a) ou la chlorophylle (Figure 16b), l'énergie irradiante convertit l'oxygène normal à l'état triplet, en oxygène à l'état singulet, qui est mille fois plus actif que l'oxygène dans son état triplet. Les photosensibilisateurs interviennent dans l'oxydation des lipides selon deux types de mécanismes.

Les photosensibilisateurs de type I, tels que la riboflavine, agissent comme des radicaux libres initiateurs. Dans leur état triplet, ils arrachent un atome d'hydrogène ou un électron directement aux molécules lipidiques pour former un radical capable de réagir avec l'oxygène (Équation 10).

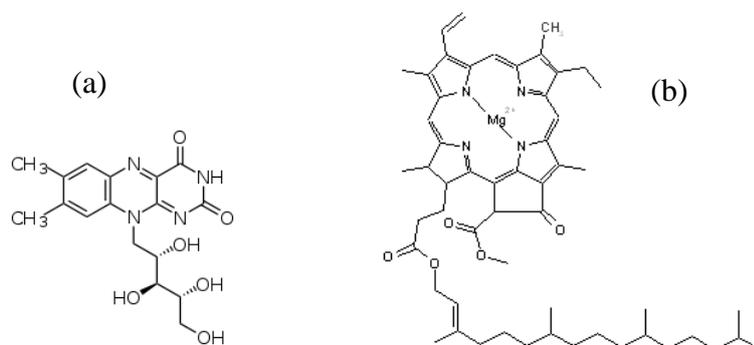
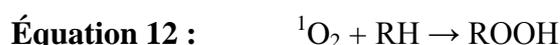


Figure 16 : Structures de deux photosensibilisateurs : (a) riboflavine, (b) chlorophylle a

Selon le second mécanisme, les molécules photosensibles de type II, telles que la chlorophylle, réagissent dans leur état excité (Sens\*) avec l'oxygène triplet ( $^3\text{O}_2$ ) auquel elles transfèrent leur énergie pour former de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) (Équation 11).



L'oxygène singulet ainsi formé est très électrophile et peut réagir directement et très rapidement sur un acide gras insaturé (RH) formant ainsi un hydroperoxyde (ROOH) (Équation 12).



Du fait de cette grande réactivité, les hydroperoxydes formés par l'oxygène singulet peuvent jouer un grand rôle dans l'initiation de l'auto-oxydation.

### 3.1.2 Produits d'oxydation des acides gras

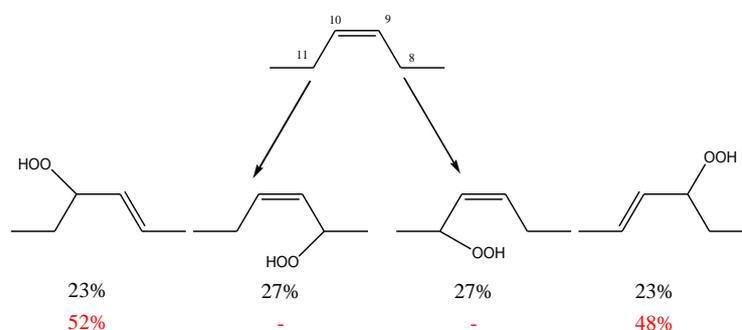
#### 3.1.2.1 Hydroperoxydes

Les hydroperoxydes sont les produits primaires d'oxydation. Ils ne sont pas volatils, sans odeur et sans goût (62). Leur formation dans les matrices alimentaires ou autres n'est pas responsable de la détérioration des qualités organoleptiques. La formation et le devenir des hydroperoxydes d'AG ont été largement étudiés (62).

Comme on l'a vu précédemment, dans le cas de l'auto-oxydation, la formation des hydroperoxydes débute avec l'arrachement d'un atome d'hydrogène en position  $\alpha$  de la double liaison. Un radical très stable est formé au sein duquel les électrons sont délocalisés autour de la double liaison ; sur 3 atomes de carbone pour l'oléate et sur 5 atomes de carbone pour le linoléate (62).

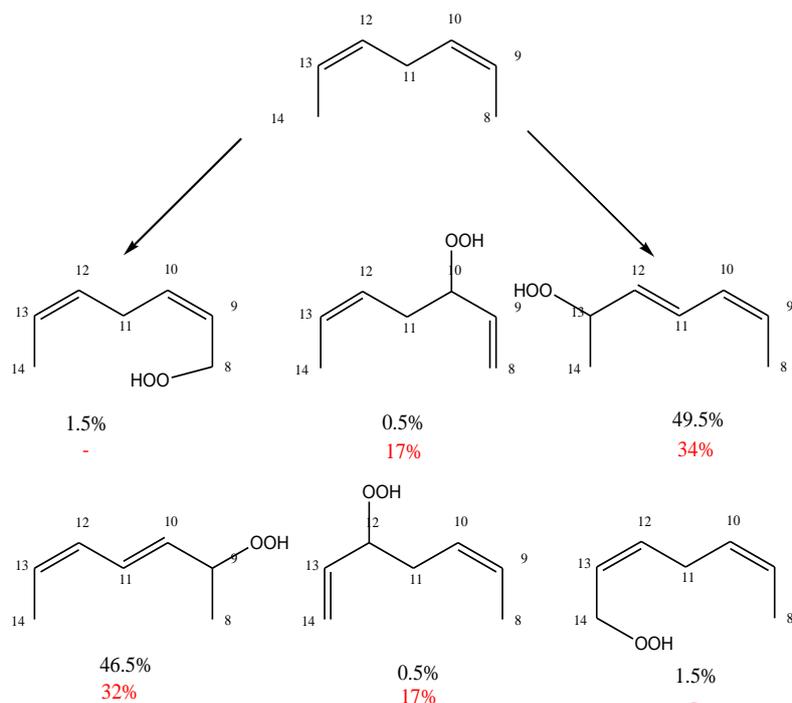
L'analyse des hydroperoxydes de l'acide oléique remonte à 1943 avec les travaux de Farmer *et al* (59). Les résultats de leurs travaux leur ont permis d'émettre l'hypothèse que le mécanisme qui entre en jeu dans l'auto-oxydation, possède des probabilités égales de former

les hydroperoxydes sur les carbones 8, 9, 10 et 11 (Figure 17). Par la suite, les divers travaux visant à élucider les mécanismes de formation des hydroperoxydes par oxydation radicalaire ont confirmé ces hypothèses. Les proportions des différents hydroperoxydes obtenus sont tout à fait cohérentes avec les mécanismes proposés. Dans le cas de la photo-oxydation, un atome d'oxygène singulet est inséré sur l'un des carbones de la double liaison, qui de ce fait est décalée sur une position allylique dans la configuration *trans* (168). En conséquence, les hydroperoxydes qui en résultent possèdent uniquement une double liaison dans la configuration *trans* (Figure 17) (43). Ce phénomène se produit aussi pendant l'auto-oxydation, mais il est beaucoup moins important que lors de la photo-oxydation.



**Figure 17** : Hydroperoxydes formés à partir de l'acide oléique. Les valeurs en noir (%) sont les proportions relatives obtenues par auto-oxydation, les valeurs en rouge (%) sont les proportions relatives obtenues par photo-oxydation (25;62)

L'auto-oxydation de l'acide linoléique donne majoritairement deux mono-hydroperoxydes (Figure 18), qui représentent à eux seuls 96% des hydroperoxydes formés (25). En ce qui concerne l'acide linoléique, les produits majoritaires formés lors de la photo-oxydation présentent une double liaison en configuration *trans* (Figure 18). La diversité de produits formés lors de la photo-oxydation est moins importante que lors de l'auto-oxydation, aussi bien pour l'acide oléique que pour l'acide linoléique (Figure 17 et Figure 18).



**Figure 18** : Hydroperoxydes formés à partir de l'acide linoléique. Les valeurs en noir (%) sont les proportions relatives obtenues par auto-oxydation, les valeurs en rouge (%) sont les proportions relatives obtenues par photo-oxydation (25;62)

### 3.1.2.2 Produits secondaires de l'oxydation

Les hydroperoxydes sont des composés relativement stables sous certaines conditions (température faible, solution diluée, absence de catalyseur (métaux), présence d'antioxydants). Cependant, ces conditions sont rarement réunies et les hydroperoxydes se transforment en produits secondaires d'oxydation. La plupart du temps, les hydroperoxydes se dégradent en suivant la voie homolytique qui forme des radicaux peroxy et alkoxy (Équation 4 à Équation 6). Des mélanges complexes contenant une multitude de produits de dégradation sont alors obtenus. On distingue différentes catégories parmi eux notamment, les produits de scission, les monomères oxydés et les oligomères oxydés (Figure 19).

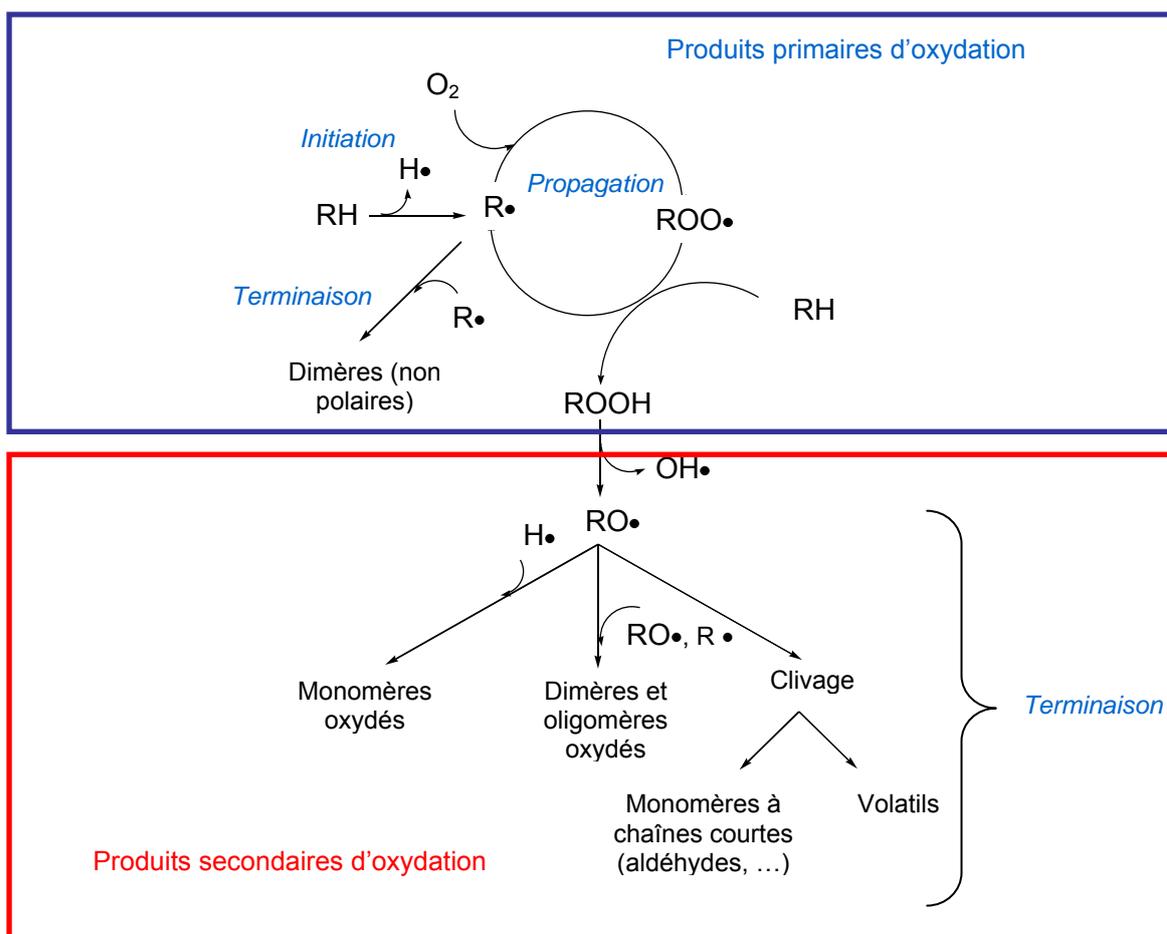


Figure 19 : Schéma global de formation des produits primaires et secondaires d'oxydation (13)

- Produits de scission

Les produits volatils sont obtenus par clivage homolytique ( $\beta$  scission) des hydroperoxydes sous l'action des radicaux alkoxy. Les produits ainsi formés sont des aldéhydes et des radicaux alkyl et oléfiniques (61;62). Deux voies sont possibles pour le clivage homolytique. La première (Voie A) se produit à la liaison carbone-carbone située en position  $\beta$  par rapport à la double liaison, alors que la seconde (Voie B) induit le clivage sur la liaison C-C en  $\alpha$ , directement adjacente à la double liaison (Figure 20). Les radicaux alkyl (Voie A) forment soit un alcool par réaction avec un radical hydroxyl, soit un hydrocarbure par arrachement d'un atome d'hydrogène. Ils peuvent également donner des hydroperoxydes, qui pourront à leur tour se décomposer. Les radicaux oléfiniques (Voie B) réagissent soit avec un radical hydrogène pour donner une oléfine, soit avec un radical hydroxyl pour produire un aldéhyde en équilibre tautomérique avec un énol (62) (Figure 20).

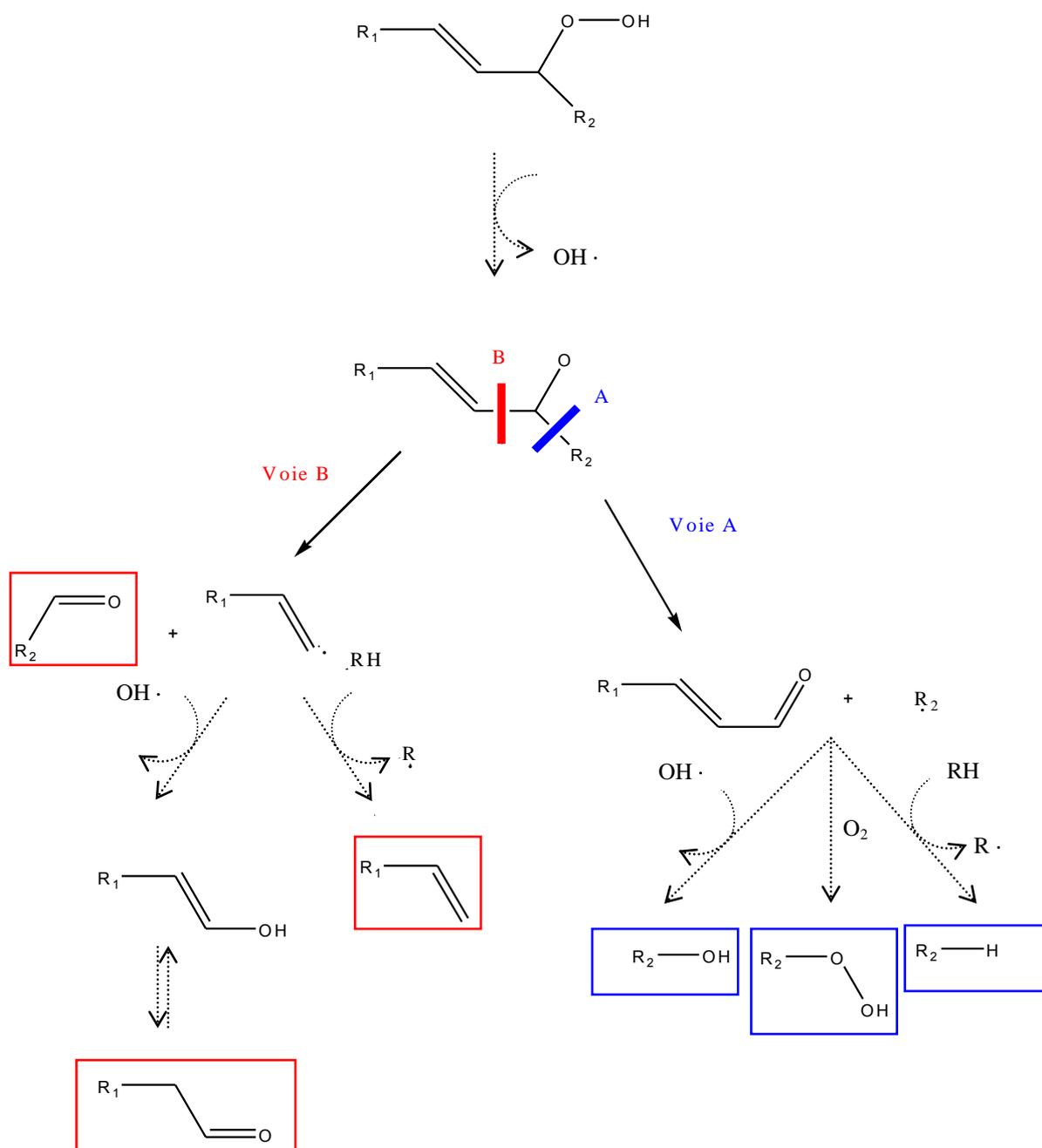
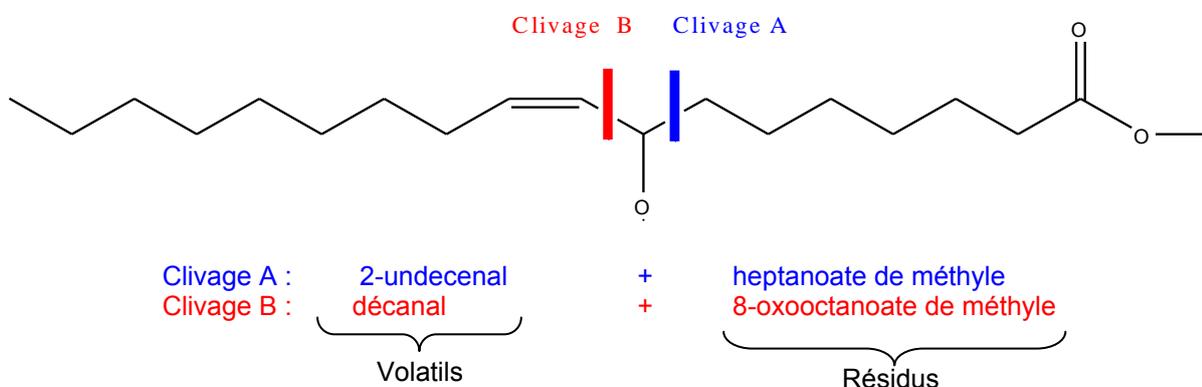


Figure 20 :  $\beta$  scission homolytique des mono-hydroperoxydes (62)

En plus des produits volatils formés lors de la scission, on retrouve aussi les résidus à chaînes courtes. L'exemple de l'oléate hydroperoxyde est donné dans la Figure 21.



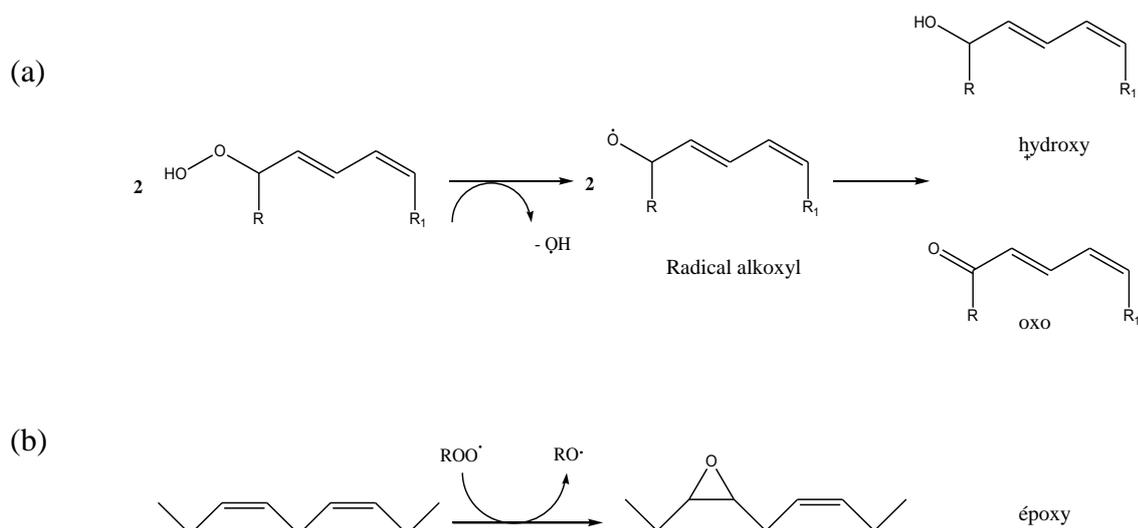
**Figure 21** : Produits d'oxydation issus de la  $\beta$  scission de l'hydroperoxyde (8-OOH) de l'oléate de méthyle (62)

Quand il s'agit de l'oxydation des TG ou des PL, le résidu reste lié au squelette glycérique. Ce sont donc des composés de masse moléculaire relativement élevée qui sont formés. Ces molécules sont très utiles pour évaluer la qualité des huiles (62).

- Monomères oxydés

Les monomères oxydés sont caractérisés par la présence d'une ou plusieurs fonctions oxygénées sur une ou plusieurs des chaînes d'AG de la molécule de départ. Ce sont des produits d'oxydation stables résultant de la décomposition des hydroperoxydes. Les principales fonctions que l'on retrouve sont en général les groupements hydroxy, oxo ou époxy. Peu d'études ont été menées sur la formation de ces groupements sur les PL. La plupart des informations obtenues sur ces molécules ont été obtenues avec les esters méthyliques d'AG. Les groupements hydroxyl et les groupements oxo se forment simultanément. Deux radicaux alkoxyl se recombinent entre eux : un atome d'hydrogène est échangé entre les deux radicaux. Celui qui perd son atome d'hydrogène se transforme en groupement oxo et celui qui fixe l'atome d'hydrogène devient un groupement hydroxyl (Figure 22a).

En ce qui concerne le groupement époxy, il a été démontré qu'il peut être formé suivant deux mécanismes distincts, soit sur la double liaison (Figure 22b), soit sur la liaison adjacente (123).



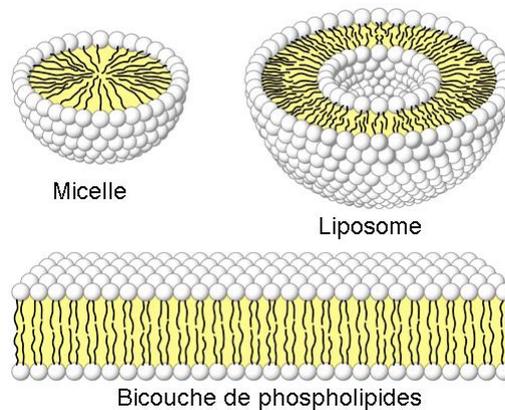
**Figure 22 :** (a) Formation des groupements hydroxy et oxo à partir des radicaux alkoxy ; (b) Formation des anneaux époxy à partir des radicaux peroxy (62)

- Dimères, trimères et oligomères oxydés

Peu d'informations sont disponibles sur la composition chimique des fractions oligomériques. La plupart des composés identifiés sont en général issus des TG. Les polymères formés sont essentiellement des dimères et trimères oxydés, reliés entre eux par les liaisons C-C ou des liaisons C-O-C (8). Même si les AG libres et les esters méthyliques d'AG peuvent se dimériser ou s'oligomériser facilement (à température ambiante), les TG ont plutôt tendance à s'oxyder en bis- ou tris-hydroperoxydes. A des températures plus élevées (> 210°C), l'oligomérisation des TG devient possible. Les composés formés sont alors des molécules de haute masse moléculaire qui ne comportent plus de groupements hydroperoxydes (62).

### 3.2 Influence des phospholipides sur l'oxydabilité d'un système lipidique

Comme nous l'avons dit précédemment, l'oxydation des PL suit la même tendance que celle des TG ou des AG. Plus un PL est insaturé, plus il aura tendance à s'oxyder rapidement. Cependant, le comportement des PL vis-à-vis de l'oxydation présente un certain nombre de particularités qui sont loin d'être totalement élucidées. Les PL peuvent être antioxydants ou prooxydants vis-à-vis des TG en fonction du système dans lequel ils se trouvent (124). Bien que les raisons de ce comportement ne soient pas bien connues, il apparaît comme évident que l'influence des PL sur l'oxydation est plus importante au niveau de la période d'induction et au cours des premières étapes de l'oxydation (92) que dans les étapes suivantes. Le système dans lequel se trouvent les PL a une grande influence sur leur comportement vis-à-vis de l'oxydation. Le caractère amphiphile des PL leur confère une capacité à s'organiser en différentes structures telles que les micelles, les bicouches ou encore les liposomes (Figure 23), qui permettent d'isoler la phase organique (ou lipidique) de la phase aqueuse. En fonction de la nature du système et de sa composition en lipides, en ions métalliques ou en anti-oxydants naturels, les PL pourront jouer un rôle pro-oxydant ou anti-oxydant.



**Figure 23** : Structures possibles issues du réarrangement des PL (9)

#### 3.2.1 Effet pro-oxydant

Dans les systèmes mixtes comportant des PL et des TG, les PL (qui contiennent souvent plus d'insaturations) sont oxydés préférentiellement et peuvent propager le phénomène d'oxydation aux TG. Dans ce cas, ils sont les déclencheurs de l'oxydation du

système, ce qui leur donne un caractère pro-oxydant. L'autre facteur qui entre en ligne de compte dans le caractère pro-oxydant des PL est leur capacité à complexer les ions métalliques dans leur sphère d'hydratation (150).

### 3.2.2 Effet anti-oxydant

Les PL possèdent un effet anti-oxydant lié à leur caractère amphiphile, puisqu'ils se placent au niveau des interfaces eau-huile où ils sont en contact avec les catalyseurs. Ils sont donc les premiers à être touchés par le phénomène d'oxydation, et de ce fait, ils retardent la dégradation des TG présents dans la matrice. L'association des PL en bicouches (Figure 23) permet d'isoler les radicaux libres des autres lipides constitutifs du mélange. Les bicouches lipidiques possèdent une grande viscosité, ce qui réduit la migration des catalyseurs, ralentit le transfert des radicaux et l'étape de propagation et accélère la phase de terminaison (62;150). Le processus oxydatif est ainsi ralenti.

De nombreuses études ont également mis en évidence l'existence d'une synergie entre les PL et les tocophérols, déjà connus comme antioxydants naturels. Cette propriété a été attribuée au fait que les PL sont capables de donner un atome d'hydrogène issu de leur fonction amine. Cet atome d'hydrogène régénère ainsi la molécule de tocophérol oxydée (87) et son effet protecteur du système est ainsi prolongé. L'effet synergique des PL dépend donc de la nature de la tête polaire (19) puisqu'il faut qu'elle soit capable de donner un de ces atomes d'hydrogène. Des études ont montré que la synergie est plus forte entre les tocophérols et PE qu'avec les autres PL. L'influence de la nature des AG des PL a également été mise en évidence (87).

En ce qui concerne les PL, peu de travaux ont été réalisés pour identifier la nature des produits de dégradation générés par les processus oxydatifs auxquels les aliments sont soumis, comme le chauffage ou l'exposition à la lumière, alors que les transformations des TG ont été étudiées, notamment dans les huiles de fritures. Avant toute supplémentation alimentaire en PL, il serait intéressant d'identifier les produits formés lors de ces processus oxydatifs pour évaluer l'impact des procédés ou du stockage.

## 4. Méthodes d'analyse des phospholipides

La quasi-totalité des travaux menés jusqu'ici sur les PL concerne essentiellement les matrices biologiques (sang, plasma, cerveau humain, ...). Dans cette partie, nous nous intéresserons aux techniques analytiques utilisées pour analyser les PL.

### 4.1 Extraction

#### 4.1.1 Extraction des phospholipides en deux étapes

Cette méthode d'extraction est composée de deux étapes. La première consiste à extraire les lipides totaux de la matrice, puis à séparer les PL de cet extrait lipidique par une méthode d'extraction en phase solide. L'extraction liquide-liquide des lipides totaux nécessite l'utilisation d'un solvant organique polaire comme le méthanol ou l'éthanol. La méthode d'extraction liquide-liquide la plus utilisée est la méthode mise au point par Folch *et al.* en 1957 (60). L'utilisation d'un mélange à base de chloroforme et de méthanol (2/1, v/v) permet l'extraction des PL simultanément à celle des autres lipides. De nombreuses variations de cette méthode ont ensuite été développées, notamment par Bligh et Dyer en 1959 (28).

L'extraction en phase solide (SPE) permet d'isoler la fraction contenant les PL des autres constituants du mélange. Différents greffages sont possibles et les plus utilisés pour l'extraction des PL sont la silice vierge ou la silice greffée avec des groupements aminopropyles (38;50;134). Cependant, l'utilisation de la SPE est loin d'être la plus répandue en ce qui concerne les PL.

#### 4.1.2 Extraction des phospholipides en une étape

D'autres méthodes, plus récentes mais moins faciles à mettre en oeuvre peuvent aussi être utilisées pour extraire directement les PL. On peut citer par exemple l'extraction par des fluides supercritiques. Plusieurs auteurs ont cherché à mettre au point des méthodes d'extraction sélectives des PL, issus essentiellement des lécithines de jaune d'œuf ou de soja (17;167;192). En règle générale, l'extraction des PL par fluide supercritique s'effectue à

l'aide de CO<sub>2</sub> et d'un modificateur de phase. Comme l'objectif est d'extraire des PL dans un but alimentaire, les solvants utilisés doivent être compatibles avec ce type d'application. L'éthanol est le co-solvant le plus utilisé (42;116).

## 4.2 Analyses chromatographiques des phospholipides

### 4.2.1 Chromatographie planaire

La chromatographie planaire est l'une des premières méthodes à avoir été utilisée pour la séparation des PL et elle est encore beaucoup employée aujourd'hui. La phase stationnaire la plus courante reste la silice, même si l'alumine donne aussi des résultats intéressants (135;139). Les phases mobiles les plus fréquemment utilisées pour la séparation des PL sont le chloroforme, le méthanol et l'eau, mais d'autres solvants comme l'hexane, isopropanol, l'éthanol ou la triéthylamine sont parfois utilisés (135). Cependant, la chromatographie planaire, qu'elle soit mono- ou bidimensionnelle, n'est pas suffisamment résolutive pour permettre la séparation des espèces moléculaires issues de chaque famille de PL.

### 4.2.2 Chromatographie gazeuse

L'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des PL est une méthode longue, qui ne permet pas d'analyser les molécules intactes. La très faible volatilité des PL, due à la présence de la tête polaire, rend impossible l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des PL intacts. Les PL doivent subir une réaction de dérivation qui les rend plus volatils, mais ceci conduit à une perte d'informations au niveau structural. Les AG peuvent être convertis en esters méthyliques d'AG, mais l'information sur la structure du PL est perdue. L'autre réaction la plus couramment utilisée est la transformation des PL en DG (1,2-diacyl-3-glycérol), souvent à l'aide de la phospholipase C (178), qui permet de lyser la tête polaire. Les résidus glycériques ainsi obtenus peuvent être convertis en groupements triméthylsilylés, ou encore en dérivés acétylés (125). L'identification des résidus se fait par spectrométrie de masse ou par spectrométrie de masse en tandem. Il faut préciser que l'identification des résidus ne donne pas d'information sur la famille de PL. Avant toute réaction de dérivation, il faut isoler chaque famille les unes des autres.

#### 4.2.3 Chromatographie liquide

La chromatographie liquide haute performance est la méthode la plus utilisée pour l'analyse des PL. De nombreuses études ont été menées et différents types de détecteurs ont été utilisés. Les plus courants sont les détecteurs UV, les détecteurs évaporatifs à diffusion de lumière (DEDL) et les spectromètres de masse. La chromatographie implique un phénomène de partage qui est effectué soit sur phase normale, soit sur phase inverse. Pour la séparation sur phase normale, la phase stationnaire la plus utilisée reste le gel de silice (91;135;143). Certaines méthodes utilisent aussi des gels de silice greffés par des groupements diols (69;93;107;161), parfois aminopropyles ou cyanopropyles (145). L'utilisation de la chromatographie en phase normale permet la séparation des familles de PL en utilisant des mécanismes d'adsorption. L'élution des composés d'intérêt se fera selon la polarité de la tête polaire, de la moins polaire à la plus polaire.

La séparation en phase inverse peut aussi être utilisée. Cette fois, la phase mobile est plus polaire que la phase stationnaire. L'échantillon injecté sera séparé grâce à un mécanisme de partition entre la phase stationnaire et la phase mobile et l'élution sera basée sur la lipophilicité des molécules qui est due à la fois à la longueur de la chaîne carbonée des AG et au nombre de doubles liaisons présentes. En général, on utilise la séparation en phase inverse pour analyser les espèces moléculaires présentes au sein d'une seule et unique famille de PL (par exemple PC), afin de subir uniquement l'influence des AG et non celle de la tête polaire (identique pour chaque molécule au sein d'une famille).

Le Tableau 5 donne un aperçu des techniques utilisées pour l'analyse des PL dans différentes matrices. Comme nous l'avons dit précédemment, la plupart des matrices étudiées sont biologiques, par exemple le sang humain, les spermatozoïdes ou encore le fluide bronchoalvéolaire. Bien d'autres échantillons biologiques ont été étudiés mais les techniques chromatographiques et les détecteurs (UV, ELSD, MS) sont sensiblement les mêmes que ceux présentés dans le Tableau 5. Toutefois, quelques études ont utilisé des détecteurs de radioactivité en marquant préalablement les PL (68), des détecteurs de fluorescence après dérivation post-colonne (170) ou encore des détecteurs à indice de réfraction (67) mais en règle générale, ces détecteurs sont peu utilisés.

En ce qui concerne les matrices alimentaires, peu de travaux ont été réalisés si ce n'est sur le jaune d'œuf et les graines de soja qui sont les deux sources principales de lécithines au niveau industriel. Les méthodes utilisées sont relativement variées (Tableau 5) tant au niveau de la séparation que de la détection. Les données disponibles concernant la composition en PL de ces matrices restent cependant rares et souvent incomplètes.

**Tableau 5** : Aperçu des techniques analytiques les plus couramment utilisées pour l'analyse des PL

<b>Echantillons</b>	<b>Classe de lipides</b>	<b>Séparation</b>	<b>Détection</b>	<b>Références</b>
Fluide bronchoalvéolaire	PC, PE, PG	CLHP phase inverse	ESI-MS	(23)
	PC, PG	Chromatographie planaire	MALDI-TOF-MS	(157)
Cerveille de rat	PS, PI, PE, PC	CLHP phase inverse	Thermospray-MS	(109)
	PC, SM	-	ESI-MS <sup>3</sup>	(76)
Cerveau humain	PC, PE, PI, PS, SM	CLHP phase normale	ESI-MS	(88)
	PC, PE, PS	CLHP phase inverse	UV	(185)
Spermatozoïdes	PC, PE	Chromatographie planaire	MALDI-TOF-MS	(147)
	PE	Chromatographie planaire	MALDI-TOF-MS	(104)
	PC, SM	-	MALDI-TOF-MS	(146)
Hippocampe de rat	PS, PE, PC	CLHP/CPG	ESI-MS/FID	(183)
	PC, PE, PI, PS	CLHP phase normale	ESI-MS <sup>2</sup>	(78)
Sang humain	PC, PE, PI, PG, PS	CLHP phase normale	ESI-MS <sup>3</sup>	(175)
	PC, PE	-	ESI-MS <sup>2</sup>	(114)
Jaune d'oeuf	PC, PE, SM	CLHP phase normale	ELSD, UV	(91)
	PE, PI, PC, SM, Lyso-PC	CLHP phase normale	ESI-MS <sup>2</sup>	(127)
Soja	PC	CLHP phase inverse	ESI-MS <sup>2</sup>	(21)
	PC	CLHP phase inverse	ESLD	(182)
	PC, PE	CLHP phase inverse	UV	(169)



## **Chapitre 2 :**

---

# **Caractérisation de sources de phospholipides polyinsaturés**

## Introduction

Même si l'utilisation des lécithines en tant qu'additif est très connue des industriels de l'industrie agro-alimentaire, ce sont les propriétés bénéfiques des PL sur la santé qui les ont conduits à envisager une supplémentation de certains aliments en PL polyinsaturés. Cette supplémentation est en particulier considérée comme un moyen d'augmenter l'apport alimentaire en AGPI facilement assimilables. La préparation de produits supplémentés en PL polyinsaturés à partir d'espèces pures de PL n'est pas envisageable, étant donné que l'obtention de substances pures est un véritable challenge technologique, qui engendrerait des coûts bien trop élevés pour les industries agro-alimentaires. La solution réside donc certainement dans la sélection de sources naturelles, riches en PL polyinsaturés à condition d'avoir une bonne connaissance de la composition en PL de ces sources.

A ce jour, la question de savoir s'il vaut mieux consommer l'EPA et le DHA ou plutôt leur précurseurs (acide linoléique 18:2 ou  $\alpha$ -linoléique 18:3) est toujours très controversée. Il n'a pas été démontré clairement si la quantité de précurseurs consommée est suffisante pour synthétiser les quantités nécessaires d'AGPI ou si une supplémentation en EPA et DHA est nécessaire. Certaines études montrent que les laits infantiles supplémentés en acide  $\alpha$ -linoléique 18:3 donnent des résultats comparables au lait maternel, naturellement riche en DHA, pour le développement rétinien (18;79). D'autres études montrent que la maturité visuelle est réduite avec la consommation de laits infantiles enrichis en  $\alpha$ -linoléique 18:3, comparés aux laits enrichis en DHA (70;110). Toutefois, ces experts sont d'accord pour dire que les AGPI sont d'une importance cruciale dans l'alimentation et jouent un rôle primordial au niveau nutritionnel.

Parmi les informations disponibles à ce jour se rapportant à la structure moléculaire des PL, très peu concernent les matrices alimentaires. Le plus souvent les études ont été menées sur des matrices biologiques. En ce qui concerne les matrices alimentaires, ce sont les PL de soja et de jaune d'œuf (91) qui ont été les plus étudiés, surtout parce qu'ils sont les constituants majeurs des lécithines utilisées industriellement comme additif et pour lesquels les profils des familles et des espèces moléculaires ont déjà été établis (127;182). Certaines études ont combiné la séparation chromatographique en phase liquide et la collection de

fractions, avant de convertir les PL collectés en esters méthyliques d'AG qui sont analysés par GC-FID ou GC-MS (33;182). D'autres, en revanche, ont utilisé des méthodes beaucoup plus rapides comme la CLHP couplée à la spectrométrie de masse en tandem (76;127). Quoiqu'il en soit, la majorité des données concernent surtout les profils d'AG relatifs à une famille de PL préalablement isolée (PC par exemple) et non l'identification de la structure des espèces moléculaires de cette même famille.

Cinq sources potentielles de PL ont été étudiées dans ce chapitre. Il s'agit de sources connues, mais dont les profils phospholipidiques n'ont pas tous été établis. Les graines de soja et le jaune d'œuf étant des matières premières utilisées pour la fabrication des lécithines, certaines informations sont déjà disponibles pour ces deux matrices. En revanche, les trois autres sources choisies que sont l'huile de krill, le foie de bœuf et la cervelle de veau, ont été beaucoup moins étudiées.

L'objectif de ce chapitre était de mettre au point une méthode permettant de caractériser des sources alimentaires de PL envisageables pour une supplémentation. Dans une première partie, il s'agit d'établir le profil phospholipidique de différentes sources de PL en mettant au point une méthode d'extraction et de dosage des PL. L'établissement des courbes d'épuisement permet de déterminer le nombre d'extractions nécessaires à l'épuisement de la matrice. Le dosage des PL permettra de déterminer les sources potentielles riches en PL, ainsi que les différentes familles présentes. Il s'agissait également de mettre au point une méthode de purification permettant d'isoler les PL des TG, afin de déterminer le profil d'AG de chacune des fractions isolées. L'analyse par chromatographie en phase gazeuse et l'analyse statistique par un test de Student ont permis de mettre en évidence les différences d'abondance des AG en fonction de la structure moléculaire à laquelle ils sont associés.

Dans une deuxième partie, le but recherché était de déterminer le profil moléculaire de la famille PC pour chacune des matrices sélectionnées afin de connaître l'association des AG présents sur le squelette glycérique des molécules. Pour ce faire, nous avons mis au point une méthode chromatographique permettant la séparation des différentes molécules présentes dans la famille PC (99). L'ajout d'un sel de lithium dans la phase mobile et l'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem ( $MS^2$ ) a permis de déterminer la nature des AG liés au squelette glycérique. Les profils d'AG des PC purifiées ont également été établis, cette fois

par chromatographie en phase gazeuse. Cette méthode analytique a été appliquée aux PC purifiées à partir des matrices alimentaires choisies selon leur profil phospholipidique (Partie A). L'étude de la PC de jaune d'œuf et de la PC de soja a permis de vérifier les résultats obtenus avec les autres études publiées. En revanche, l'étude de la PC issue de l'huile de krill, n'ayant jamais été menée, elle nous a permis d'établir pour la première fois, le profil de ses espèces moléculaires.

## **Partie A :**

---

# **Extraction et analyse des phospholipides et détermination des profils d'acides gras**

Dans cette partie, deux grands axes seront présentés, à savoir la méthode d'extraction utilisée pour extraire les PL des matrices alimentaires choisies et la méthode de SPE utilisée lors de la caractérisation des profils d'AG des fractions PL et TG. Cette première partie décrit la première étape du processus de screening de sources alimentaires de PL.

# 1. Matériels et méthodes

## 1.1 Extraction des lipides totaux et analyse des phospholipides

### 1.1.1 Matrices alimentaires et substances de références

Cinq matrices alimentaires connues pour contenir des PL ont été étudiées. Il s'agit du jaune d'œuf de poule, des graines de soja jaune (*Glycine maxima*), du foie de bœuf, de la cervelle de veau et de l'huile de krill. Les œufs, les graines de soja et le foie de bœuf proviennent tous d'un supermarché local. La cervelle de veau a été achetée chez un boucher et l'huile de krill vient de chez Ocean Nutrition (Belgique). La cervelle de veau, le foie de bœuf et l'huile de krill sont stockés à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la préparation des échantillons. Les œufs de poule sont stockés à  $+4^{\circ}\text{C}$  et préparés avant la date limite de consommation (1 mois après la ponte). Les graines de soja sont stockées à température ambiante dans leur emballage d'origine.

Différentes substances de référence ont été utilisées pour identifier les familles de PL présentes dans les échantillons. La L- $\alpha$ -phosphatidylcholine issue du soja, le L- $\alpha$ -phosphatidylinositol issu de foie d'origine bovine et la L- $\alpha$ -phosphatidylserine de cervelle porcine proviennent de chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA). La L- $\alpha$ -phosphatidyléthanolamine et la sphingomyéline issues de jaune d'œuf ont été achetées chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

### 1.1.2 Préparation des échantillons

La préparation de l'échantillon est incontestablement l'étape cruciale dans le protocole d'extraction. En effet, c'est au cours de cette étape que seront libérés les analytes d'intérêt, ici les PL. Plusieurs types de préparation d'échantillons ont été testés pour maximiser la quantité de lipides totaux et de PL extraits.

- Cryobroyage

Le cryobroyeur (6870 Freezer/Mill, Spex CertiPrep, Stanmore, Grande Bretagne) permet de broyer l'échantillon de façon efficace tout en le protégeant des dégradations oxydatives causées par l'échauffement qui se produit au cours du broyage. L'échantillon est placé dans une cuve remplie d'azote liquide, ce qui permet de rendre les échantillons plus cassants et de les maintenir en anoxie à une température très basse. La méthode de broyage utilisée comporte trois cycles organisés comme suit : 1 min de refroidissement dans l'azote liquide, 5 min de broyage puis encore 1 min de refroidissement. Après avoir été broyé, l'échantillon est récupéré sous forme de poudre qui peut être stockée telle quelle ou lyophilisée.

- Lyophilisation

La lyophilisation consiste à ôter l'eau d'un produit liquide, pâteux ou solide, à l'aide d'un refroidissement rapide dans l'azote liquide suivi d'une évaporation sous vide de la glace sans la faire fondre (sublimation). La vapeur d'eau quitte le produit et on la capture par piégeage cryogénique à l'aide d'un condenseur. Cette technique permet de conserver les propriétés chimiques du produit traité. L'échantillon (broyé ou non) est placé dans l'azote liquide. Il est ensuite mis dans le lyophilisateur (Alpha 2-4, Bioblock Scientific, Illkirch, France) et est soumis à une dessiccation primaire, qui permet d'éliminer l'eau libre de l'échantillon pendant une nuit. Ensuite, une dessiccation secondaire permet d'éliminer l'eau liée à l'échantillon. A la fin de la lyophilisation, le produit compte moins de 5% d'eau.

### 1.1.3 Protocole d'extraction des lipides totaux

Tous les solvants utilisés pour le protocole d'extraction sont de qualité analytique. Ce protocole d'extraction est adapté d'après celui développé par Folch *et al* (60). La Figure 24 schématise le protocole d'extraction utilisé. Un gramme d'échantillon est mis en contact avec 30 mL de solvant d'extraction (Chloroforme/Méthanol, 2:1, v/v) dans un tube Flacon de 50 mL (Bioblock Scientific, Illkirch, France) et l'ensemble est placé pendant 20 minutes dans un agitateur orbital (Bioblock Scientific, Illkirch, France) à température ambiante et à une vitesse

de 350 rpm. L'ensemble est centrifugé à l'aide d'un rotor incliné (5 min à 20°C, 8500 g). Le surnageant est transvasé dans un autre tube Falcon de 50 mL, puis lavé avec 5 mL d'une solution de chlorure de sodium 0,9% (w/w) pour éliminer les composés non lipidiques. Le culot est ré-extrait quatre fois de la même façon pour épuiser l'échantillon (Figure 24). Après le lavage, les systèmes biphasiques sont centrifugés (5 min à 20°C, 2500 g) puis séparés à l'aide d'une pipette Pasteur. Les phases organiques sont filtrées sur filtre papier (Whatman GmbH, Dassel Allemagne) et transférées dans des ballons de 25 ml. Elles sont évaporées d'abord à l'aide d'un évaporateur rotatif (bain à 45°C), puis à sec sous flux d'azote. Après chaque extraction, les extraits lipidiques sont pesés. Chaque extrait lipidique est repris dans 2 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2 :1, v/v), filtré à l'aide de filtres seringues PTFE 0,45 µm, dilué si nécessaire et injecté en CLHP. Quatre répétitions au moins sont réalisées pour chaque matrice alimentaire. Les résultats sont exprimés sous la forme (Moyenne ± Ecart-type).

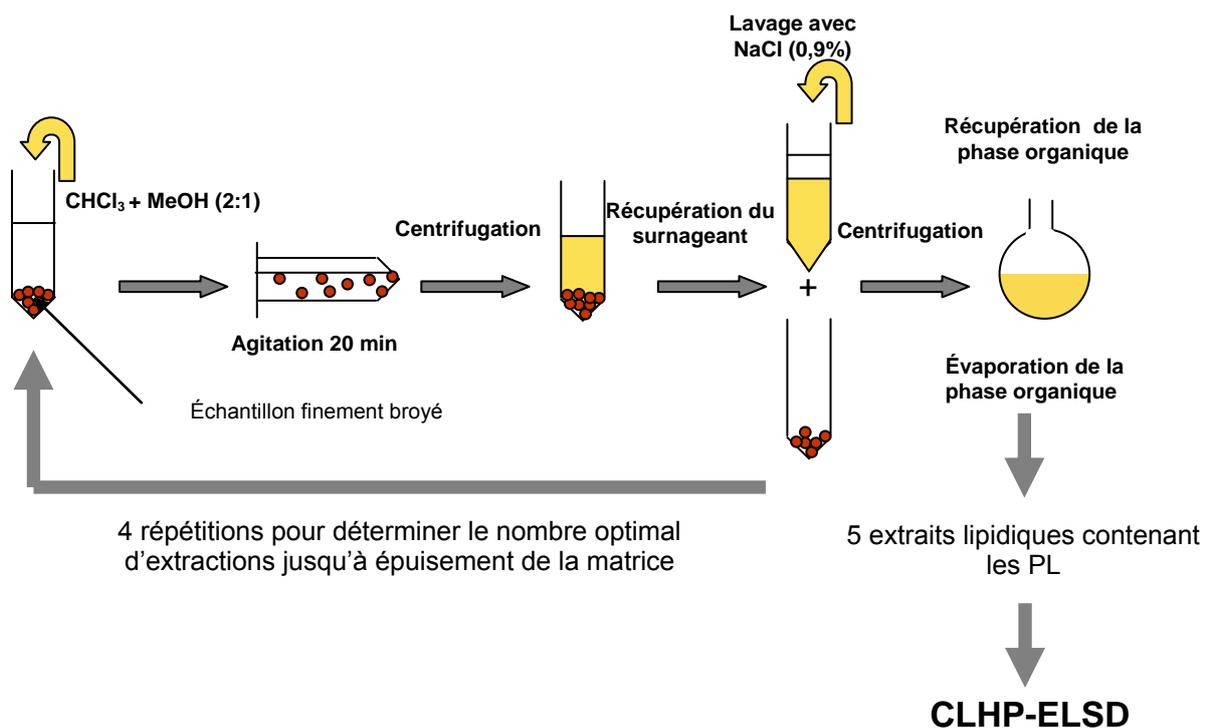


Figure 24 : Protocole d'extraction des lipides totaux, adapté d'après (60)

#### 1.1.4 Méthodes chromatographiques

Un système chromatographique constitué d'un contrôleur 616, d'un détecteur évaporatif à diffusion de lumière 2424 et d'un injecteur automatique 717Plus (Waters, Saint-Quentin-Fallavier, France) a été utilisé pour effectuer les analyses chromatographiques. La

méthode employée pour la séparation des PL est une adaptation de la méthode mise au point par Rombaut *et al.* (143). La séparation est effectuée sur phase normale (Phenomenex Luna, 150 x 3 mm, 3 µm). La phase mobile est un gradient à base de chloroforme, de méthanol et d'un tampon aqueux acide. Tous les solvants utilisés sont de qualité CLHP. Le tampon est préparé à partir d'une solution aqueuse d'acide formique 1M (99-100%, Prolabo, VWR International, Fontenay sous Bois, France) ajustée à pH=3 avec de la triéthylamine (99 % Acros Organics, Geel, Belgium) et est filtré sur membrane 0,45 µm. Le gradient utilisé pour la séparation des familles de PL est linéaire (Tableau 6). Le débit de phase mobile est fixé à 0,5 ml/min. La détection est effectuée avec un DEDL. Les paramètres optimaux pour la détection (pression du gaz, température du tube) ont été mis au point au laboratoire. Le gaz utilisé pour la nébulisation est de l'azote fourni par un générateur (Domnik Hunter, Villefranche-sur-Saône, France). La pression d'azote est fixée à 45 psi (3,1 MPa) et la température du gaz à 45°C.

**Tableau 6** : Gradient utilisé pour la séparation des PL, adapté d'après (143)

Temps (min)	% Chloroforme	% Méthanol	% Tampon
0	88	12	0
20	28	60	12

Les différentes classes de PL sont identifiées par comparaison des temps de rétention avec ceux des étalons. Le dosage de chaque famille de PL a été effectué à l'aide d'une calibration externe. Pour chaque classe de PL, on prépare une gamme d'étalonnage entre 0,1 et 1,1 mg/mL. Les courbes d'étalonnage sont données sous la forme d'une équation quadratique :  $y=ax^2+bx+c$ .

## 1.2 Détermination de la répartition des acides gras entre les phospholipides et les triglycérides

### 1.2.1 Matériels et réactifs

Les cartouches utilisées pour l'extraction en phase solide sont à base de silice greffée par des groupements aminopropyles (6 mL, 1000 mg, Chromabond, Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Les solvants de qualité analytique utilisés pour l'élution sont le chloroforme (Riedel-de Haen, Seelze, Allemagne), l'isopropanol (Merck KgaA, Darmstadt, Allemagne), l'éther diéthylique (Carlo Erba Reactifs-SDS, Val de Reuil, France), le méthanol (Carlo Erba Reactifs-SDS, Val de Reuil, France), l'eau Milli-Q et un tampon préparé avec de l'acide formique 1M (99-100%, Prolabo, VWR International, Fontenay sous Bois, France) et ajusté à pH=3 à l'aide de la triéthylamine (99 % Acros Organics, Geel, Belgium). Un mélange standard de PL issus de la lécithine de soja (Laboratorium für Auftragsanalytik GmbH, Allemagne) a été utilisé pour déterminer les taux de recouvrement.

### 1.2.2 Extraction en phase solide

La séparation des PL des autres classes de lipides a été effectuée à partir des lipides totaux extraits grâce à la méthode présentée dans le paragraphe (1.1.3 Protocole d'extraction). Cent mg des extraits lipidiques, de concentration en lipides totaux connue, sont déposés sur des cartouches de silice greffée avec des groupements aminopropyles et élués avec différentes solutions choisies suivant les caractéristiques de polarité des composés à séparer à chaque étape. La méthode est inspirée de celle de Kaluzny *et al* (89), mais elle a subi quelques modifications.

Préalablement, la cartouche est conditionnée avec environ 20 mL de chloroforme. L'échantillon à analyser (en phase chloroformique) est déposé sur la cartouche (environ 100 mg de lipides). Les TG et autres lipides neutres sont élués à l'aide de 15 mL d'un mélange chloroforme/isopropanol (2:1, v/v). La deuxième élution avec 15 ml d'éther diéthylique permet de garantir l'extraction totale des AG libres et des éventuels TG résiduels. Une troisième élution avec 30 mL de méthanol permet d'éluer une partie des PL, majoritairement PC et PE. Enfin, 30 ml d'une solution constituée de chloroforme/méthanol/tampon pH=3 (28:60:12, v/v) sont utilisés afin d'éluer les PL restants. Chaque fraction est récupérée dans un ballon indépendant.

Cette méthode a été mise au point avec de la lécithine de soja contenant des TG, de la PC, de la PE et du PI. Après chaque élution, le solvant est évaporé et la fraction est reprise dans un volume de chloroforme identique à celui déposé sur la cartouche. Chaque fraction est

analysée par CLHP-DEDL avec la méthode chromatographique décrite dans le paragraphe (1.1.4 Méthodes chromatographiques). Les taux de recouvrement, exprimés en (Pourcentage  $\pm$  Ecart-type) sont déterminés en comparant les surfaces des pics obtenus en CLHP pour chaque famille dans l'extrait lipidique d'une part et dans les différentes fractions d'élution d'autre part. Le taux de recouvrement a été déterminé à partir de trois répétitions.

### 1.2.3 Transestérification

Afin de déterminer la répartition des AG entre les fractions PL et TG, une réaction de transestérification est utilisée afin d'analyser les AG présents. Pour ce faire, 10 mg de la fraction (TG ou PL) sont mis en contact avec 0,2 mL de potasse méthanolique à 0,5 M et 5 mL de *n*-heptane. L'ensemble est agité au Vortex pendant 2 min et est laissé décanter 1 h à température ambiante. La phase heptanique est récupérée et injectée en chromatographie en phase gazeuse.

### 1.2.4 Chromatographie en phase gazeuse

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC-FID) des esters méthyliques d'AG issus des fractions PL et TG est effectuée sur une colonne CP-Sil 88 [(88% cyanopropyle)-arylpolysiloxane), 100 m x 0,25 mm, 0,2  $\mu$ m, Varian]. Des échantillons de 1  $\mu$ L sont injectés à l'aide d'un injecteur splitless. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium de haute pureté (99,9995%). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 230°C. La colonne est soumise à un gradient de température comme décrit ci-après : 5 min à 60°C, puis augmentation de la température jusqu'à 165°C (15°C/min). Cette température est maintenue pendant 1 min, puis de nouveau augmentée jusqu'à 225°C (2°C/min). La température finale est maintenue pendant 30 min. Les esters méthyliques d'AG ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux d'étalons (FAME mix C4-C24, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

Les surfaces obtenues après la chromatographie en phase gazeuse sont normalisées : le pourcentage de chaque AG est calculé de la façon suivante (Équation 13).

$$\text{Équation 13 : } \% = \frac{A(\text{Pic})}{\sum A(\text{Pics})} \times 100$$

Dans cette équation,  $A(Pic)$  représente la surface donnée pour le pic d'un AG identifié et  $\sum A(Pics)$  représente la somme des aires de tous les pics d'AG identifiés. Pour le calcul des pourcentage d'AG en chromatographie en phase gazeuse à détection par ionisation de flamme, il est habituel de considérer que le facteur de réponse de tous les AG est identique.

#### 1.2.5 Analyse des résultats

Trois répétitions sont effectuées pour chaque analyse et les résultats sont exprimés sous la forme (Moyenne  $\pm$  Ecart-type). Afin de déterminer si des différences existent dans la répartition entre TG et PL, un test statistique de Student a été effectué pour chaque échantillon. L'intervalle de confiance choisi est de 95%.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1 Extraction des lipides totaux et analyse des phospholipides

L'extraction des lipides totaux et des PL a été effectuée sur 4 des 5 matrices choisies. L'huile de krill n'a pas subi d'extraction étant donné qu'il s'agit déjà de la fraction lipidique issue des crustacés.

#### 2.1.1 Préparation des échantillons

Étant donnée la nature très différente des quatre matrices à extraire, la préparation des échantillons avant l'extraction a dû être adaptée pour chacune d'entre elles (Tableau 7). Le foie de boeuf et la cervelle de veau ont été préparés de la même façon, à savoir un broyage cryogénique suivi d'une lyophilisation. En effet, l'extraction de ces deux matrices sans l'étape de lyophilisation s'est avérée très difficile. D'abord, la grande quantité d'eau présente dans les échantillons (80,7% pour la cervelle de veau et 65,2% pour le foie) modifie la polarité du solvant d'extraction. Ensuite, la matrice à extraire a tendance à se contracter lorsqu'elle est mise en contact avec le solvant d'extraction. L'étape de lyophilisation s'avère donc essentielle pour l'extraction aussi bien pour le foie que pour la cervelle de veau.

En ce qui concerne le jaune d'œuf, aucune étape de broyage n'est nécessaire puisqu'il s'agit d'une matrice liquide. Seule l'étape de lyophilisation s'avère indispensable. En effet, la mise en contact du jaune d'œuf liquide avec les solvants d'extraction provoque, comme dans le cas de la cervelle de veau et du foie de bœuf, la formation de filaments très difficile à extraire, du fait de la non-homogénéité du mélange. Ces filaments sont probablement dus à la précipitation des protéines contenues dans le jaune d'œuf dans les solvants organiques utilisés.

Finalement, la préparation des graines de soja se limite au broyage cryogénique, puisque les graines sont sèches. Leur teneur en eau est trop faible (8,2%) pour modifier significativement la polarité des solvants d'extraction ou l'efficacité même de l'extraction.

**Tableau 7** : Tableau récapitulatif des méthodes utilisées pour la préparation des échantillons

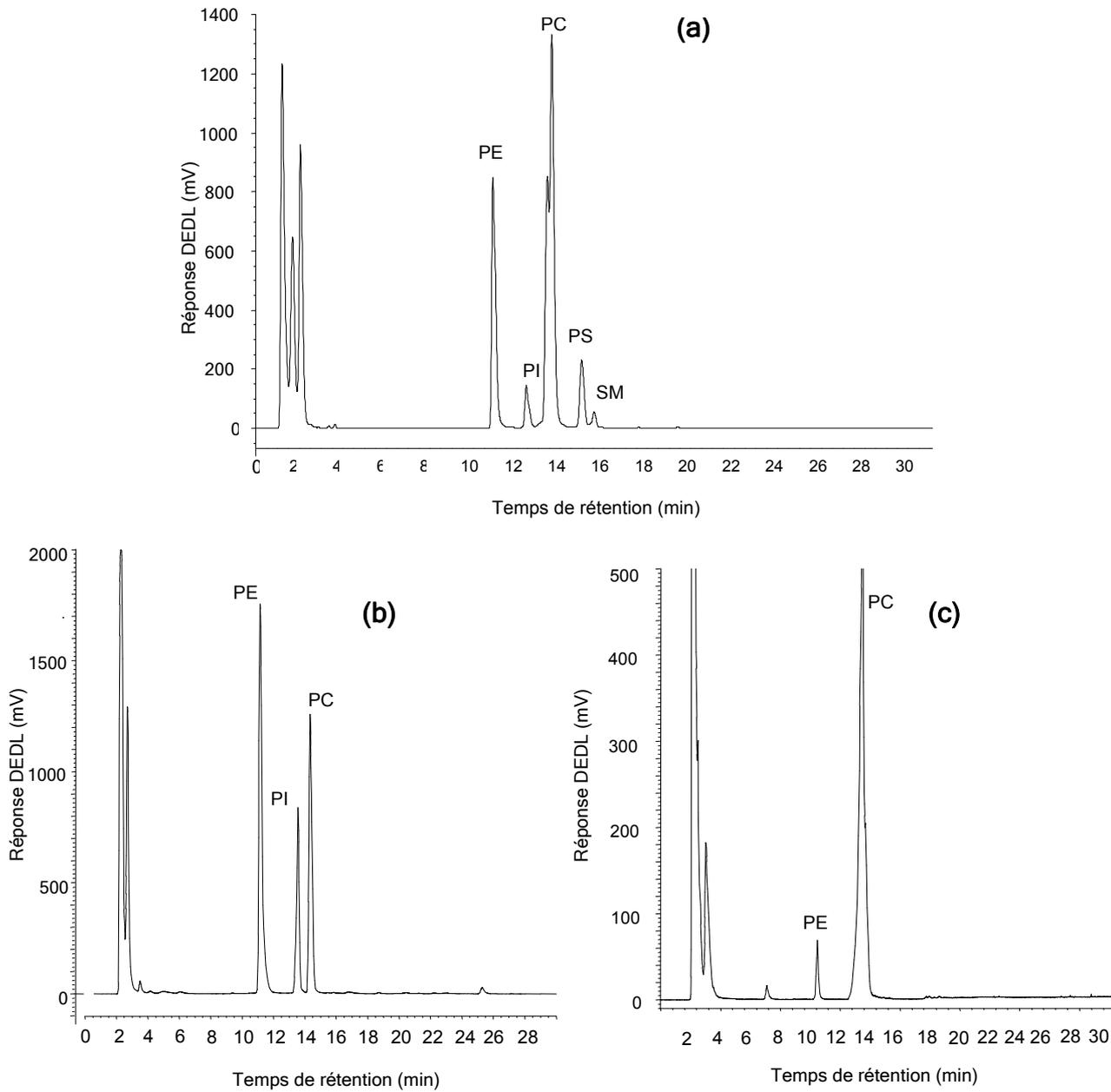
<b>Matrice</b>	<b>Cryo-Broyage</b>	<b>Lyophilisation</b>
Foie de bœuf	✓	✓
Cervelle de veau	✓	✓
Jaune d'oeuf		✓
Graines de soja	✓	

✓ : oui

### 2.1.2 Identification des familles de phospholipides

La séparation des classes de PL a été effectuée sur l'extrait lipidique total de chaque échantillon. Les différentes familles de PL présentes dans les matrices alimentaires ont été identifiées par comparaison de leurs temps de rétention avec ceux des étalons. Seuls le foie de bœuf (Figure 25a) et la cervelle de veau contiennent simultanément ces 5 classes. Les graines de soja (Figure 25b), quant à elles, contiennent PE, PI et PC dans des proportions relativement proches. Le jaune d'œuf, comme l'huile de krill (Figure 25c) contient majoritairement PE et PC. Le jaune d'œuf contient en plus quelques traces de PI.

Il faut noter que certains pics peuvent présenter des épaulements comme PC dans l'extrait lipidique total de foie de bœuf (Figure 25a). Certains pics sont plus larges d'une matrice à l'autre, comme PC krill par exemple (Figure 25c). Ce phénomène est encore accentué lors de l'utilisation d'une colonne chromatographique à faible granulométrie, qui améliore la résolution des pics chromatographiques. Deux colonnes différentes ont été testées au cours de ce travail : une colonne 150 x 3 mm, 3 µm et une colonne 250 x 3 mm, 5 µm. L'apparition d'épaulements dans les pics obtenus avec la colonne de plus faible granulométrie a mis en évidence une grande variété de molécules présentes dans les familles de PL identifiées.



**Figure 25 :** Chromatogrammes des familles de PL identifiées dans l'extrait lipidique de différentes matrices étudiées : (a) Familles de PL du foie de bœuf, (b) Familles de PL des graines de soja, (c) Familles de PL de l'huile de krill.

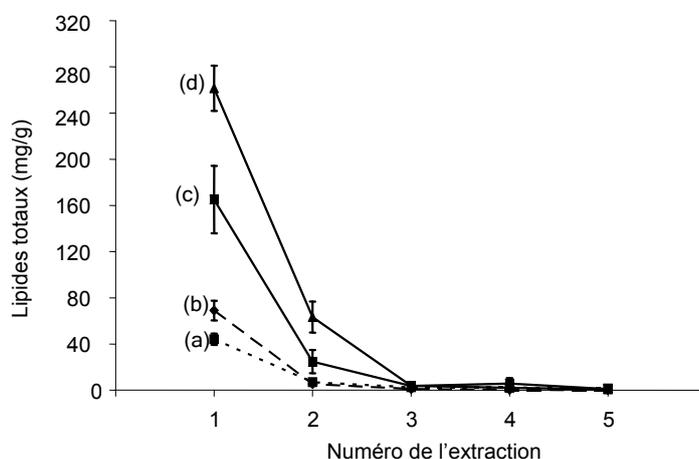
Cela s'explique par le fait que comme il s'agit d'une analyse des familles de PL, chaque pic chromatographique contient plusieurs molécules différentes. Les épaulements ou élargissements sont dus aux différents AG liés au squelette glycérique, qui modifient légèrement la polarité des molécules d'une matrice à l'autre.

### 2.1.3 Détermination du nombre optimal d'extractions

#### 2.1.3.1 Lipides totaux

- Courbes d'épuisement

Le protocole de Folch *et al.* (60) est utilisé pour extraire les lipides totaux d'un échantillon. Comme nous avons quelque peu modifié cette méthode, nous avons cherché à évaluer le nombre optimal d'extractions nécessaires à l'épuisement des lipides totaux dans les matrices sélectionnées. Après chaque étape du protocole d'extraction (Figure 24), la fraction lipidique totale a été pesée et la masse obtenue ramenée à 1 g d'échantillon humide. Les courbes d'épuisement ont été tracées, permettant de déterminer le nombre d'extractions nécessaire (Figure 26).



**Figure 26 :** Teneur en lipides totaux en mg/g d'aliment humide des extraits obtenus après chaque extraction successive du résidu. (a) Foie de bœuf, (b) Cerveille de veau, (c) Graines de soja, (d) Jaune d'œuf

- Dosage

En analysant les résultats obtenus, il apparaît que 3 extractions successives sont nécessaires pour épuiser les lipides totaux de l'échantillon. A partir de ces résultats, la teneur

en lipides totaux de chaque matrice a pu être déterminée. Le Tableau 8 donne les valeurs moyennes obtenues pour plusieurs répétitions ( $n \geq 4$ ) pour chaque matrice.

**Tableau 8** : Teneur en lipides totaux des matrices étudiées en mg/g d'aliment humide

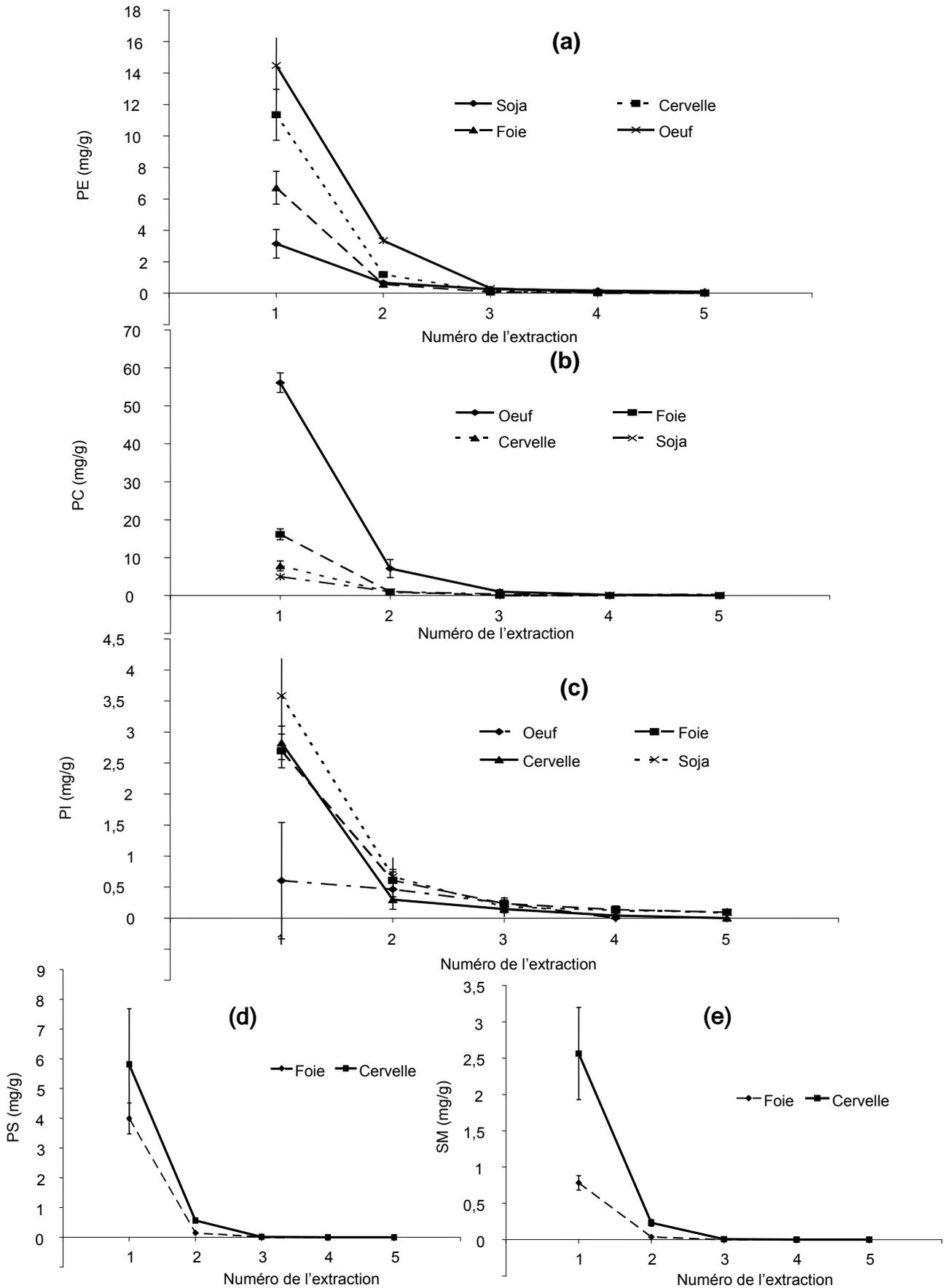
	<b>Jaune d'oeuf</b>	<b>Foie de boeuf</b>	<b>Cervelle de veau</b>	<b>Graines de soja</b>
Lipides totaux (mg/g)	328.7	71.8	94.6	250.4
(Ecart-type)	(7.3)	(6.9)	(10.7)	(21.3)

Ces résultats montrent que le jaune d'œuf est la matrice la plus riche en lipides avec 32,9%. La cervelle de veau et le foie de bœuf sont relativement pauvres en lipides (respectivement 9,5 et 7,2%). Ces résultats concordent avec les tables de composition déjà existantes (159). En revanche, en ce qui concerne les graines de soja, le pourcentage de lipides totaux extraits est supérieur (25,0%) à celui donné dans ces mêmes tables de composition (18,1%) (159). Ceci s'explique très certainement par le fait que la préparation des échantillons est grandement améliorée par l'utilisation du broyage cryogénique, qui permet d'obtenir une poudre très fine, ce qui augmente la surface de contact entre la matrice à extraire et le solvant.

#### 2.1.3.2 Familles de phospholipides

- Courbes d'épuisement

Comme montré précédemment, 5 classes de PL ont été identifiées. La PE et la PC sont communes à toutes les matrices, alors que PS, PI et SM sont plus spécifiques. La PS et la SM sont présentes dans les produits carnés, ici la cervelle de veau et le foie de bœuf. Le PI est présent en grande quantité dans les graines de soja et à l'état de traces dans le jaune d'œuf. Afin de déterminer le nombre d'extractions nécessaires pour extraire la totalité des PL présents, chaque extrait obtenu a été injecté en CLHP-DEDL. Chaque famille a été quantifiée et les courbes d'épuisement ont été tracées pour chaque classe de PL dans chaque matrice (Figure 27). De la même façon que pour les lipides totaux, une seule extraction n'est pas suffisante pour extraire la totalité des PL. Trois extractions sont nécessaires pour extraire PE, PC, PS et SM. En ce qui concerne PI, même si les teneurs sont faibles, il semblerait que 4 extractions soient suffisantes pour en extraire la totalité, puisqu'à la cinquième extraction, plus de PI libre n'est extrait.



**Figure 27** : Teneur en PL de chaque extrait en mg/g d'aliment humide après chaque extraction successive du résidu pour les différentes matrices étudiées : Foie de bœuf, Cerveille de veau, Graines de soja et Jaune d'œuf. (a) PE, (b) PC, (c) PI, (d) PS et (e) SM

- Dosage

Comme pour les lipides totaux, le dosage de chaque famille de PL a été effectué. Le Tableau 9 donne les concentrations de chaque famille de PL pour chaque matrice étudiée. Pour déterminer les quantités de PL dans l'huile de krill, celle-ci a été injectée directement 3 fois sans préparation préalable autre qu'une dilution dans le chloroforme pour obtenir une concentration de 2 mg/mL.

**Tableau 9** : Quantités respectives de chaque classe de PL en mg/g d'aliment humide dans les matrices sélectionnées

	<b>PE (mg/g)</b> (Ecart-type)	<b>PC (mg/g)</b> (Ecart-type)	<b>PI (mg/g)</b> (Ecart-type)	<b>PS (mg/g)</b> (Ecart-type)	<b>SM (mg/g)</b> (Ecart-type)	<b>PL totaux</b> (mg/g)
Jaune d'oeuf (n=6)	18,2 (1,1)	64,5 (2,1)	0,4 (0,1)	n.d	n.d	83,1
Foie de boeuf (n=6)	7,4 (1,2)	17,2 (1,4)	3,8 (0,4)	4,3 (0,6)	0,9 (0,1)	33,6
Cervelle de veau (n=7)	12,7 (1,6)	8,8 (1,4)	3,3 (0,3)	6,4 (1,8)	2,8 (0,7)	34,0
Graines de soja (n=4)	4,3 (1,1)	6,7 (1,0)	4,8 (0,6)	n.d	n.d	15,8
Huile de krill (n=3)	23,5 (1,2)	294,0 (1,8)	n.d	n.d	n.d	317,5

n représente le nombre de répétitions pour chaque matrice, n.d : non détecté

Si l'on considère les teneurs totales en PL, l'huile de krill est la matrice la plus riche en PL (317,5 mg/g). Les résultats exprimés ici sont en accord avec d'autres études montrant que les PL sont très abondants dans cette huile (4;144). La famille majoritaire est la PC (294,0 mg/g, soit 92,6%). La PE est la seconde famille présente mais en quantité plus faible (23,5 mg/g, soit 7,4%). Ces données varient en fonction de l'espèce mais aussi de la saison de capture (144).

Le jaune d'œuf est aussi très riche en PL avec 83,1 mg/g. Les familles majoritaires sont la PC (64,5 mg/g, soit 77,6%) et la PE (18,2 mg/g, soit 21,9%). Le PI est aussi présent mais dans des proportions très faibles (0,4 mg/g, soit 0,5%) par rapport aux deux autres familles PC

et PE). Cette composition des PL du jaune d'œuf est en accord avec d'autres études (91;150) ou avec les tables de compositions (159). La SM n'a pas été détectée dans nos échantillons, alors que Kivini *et al.* ont montré qu'elle est présente dans le jaune d'œuf (91). Cette différence peut être liée à plusieurs facteurs, comme par exemple la race des poules, mais aussi et surtout à leur alimentation, qui peut être différente et qui a une grande influence sur la nature des PL du jaune d'œuf (127).

Dans les graines de soja, la quantité totale de PL est de 15,8 mg/g, ce qui est une valeur supérieure aux données des tables de composition (6,0 mg/g) (150). Une différence importante est à noter par rapport au jaune d'œuf et à l'huile de krill. En effet, dans les deux matrices précédentes, la PC est largement majoritaire, alors que dans les graines de soja, les proportions entre les trois familles sont très proches. La classe majoritaire reste la PC (6,7 mg/g) mais elle ne représente que 42,4%, suivie de PI (4,8 mg/g,) qui représente 30,4% et enfin PE (4,3 mg/g) avec 27,2%. Des auteurs ont montré que la nature, ainsi que la teneur des classes de PL présentes dans les graines de soja est dépendante du degré de maturation des graines (45;150). Plus les graines sont mûres, plus leur teneur en PE, PI et PC est élevée par rapport aux autres classes de lipides polaires, comme les glycolipides. Les graines utilisées ici sont pour la consommation humaine, donc leur degré de maturation est élevé. Les résultats obtenus ici sont cohérents.

Les abats, particulièrement le foie et la cervelle, sont connus pour contenir d'importantes quantités de PL (150). Ces deux matrices sont les plus riches en terme de diversité de classes de PL. Elles contiennent en plus des familles déjà citées pour le soja ou l'œuf, de la PS et de la SM. Le foie de bœuf contient 33,6 mg/g de PL avec PC comme classe majoritaire (17,2 mg/g, soit 51,2%), suivi de PE (7,4 mg/g, soit 22,0%). La PS (4,3 mg/g, soit 12,8%), le PI (3,8 mg/g, soit 11,3%) et la SM (0,9 mg/g, soit 2,7%) sont les classes minoritaires. Les tables de composition étant relativement pauvres en informations sur les profils phospholipidiques des aliments, nos résultats n'ont pas pu être comparés avec ceux de la littérature. Cependant, quelques données sont disponibles pour le foie de porc, et les teneurs obtenues ici pour le foie de bœuf suivent la même tendance (159).

Enfin, les résultats obtenus pour la cervelle de veau montrent que cette matrice a une teneur en PL totaux relativement semblable à celle du foie de bœuf avec 34,0 mg/g. Contrairement aux autres matrices étudiées, PC n'est plus la famille majoritaire, puisqu'elle

ne représente ici que 25,9% des PL totaux (8,8 mg/g). La PE (12,7 mg/g, soit 37,3%) est la classe la plus abondante dans la cervelle de veau. De plus, les autres classes comme PS (6,4 mg/g, soit 18,8%) et SM (2,8 mg/g, soit 8,2%) sont plus abondantes dans la cervelle que dans le foie. Le PI en revanche, est légèrement moins concentré dans la cervelle (3,3 mg/g, soit 9,7%). Ces résultats sont tout à fait en accord avec les tables de composition (159) et avec des études qui montrent que la matière grise et la myéline du cerveau sont riches en PS (121).

**Remarque :**

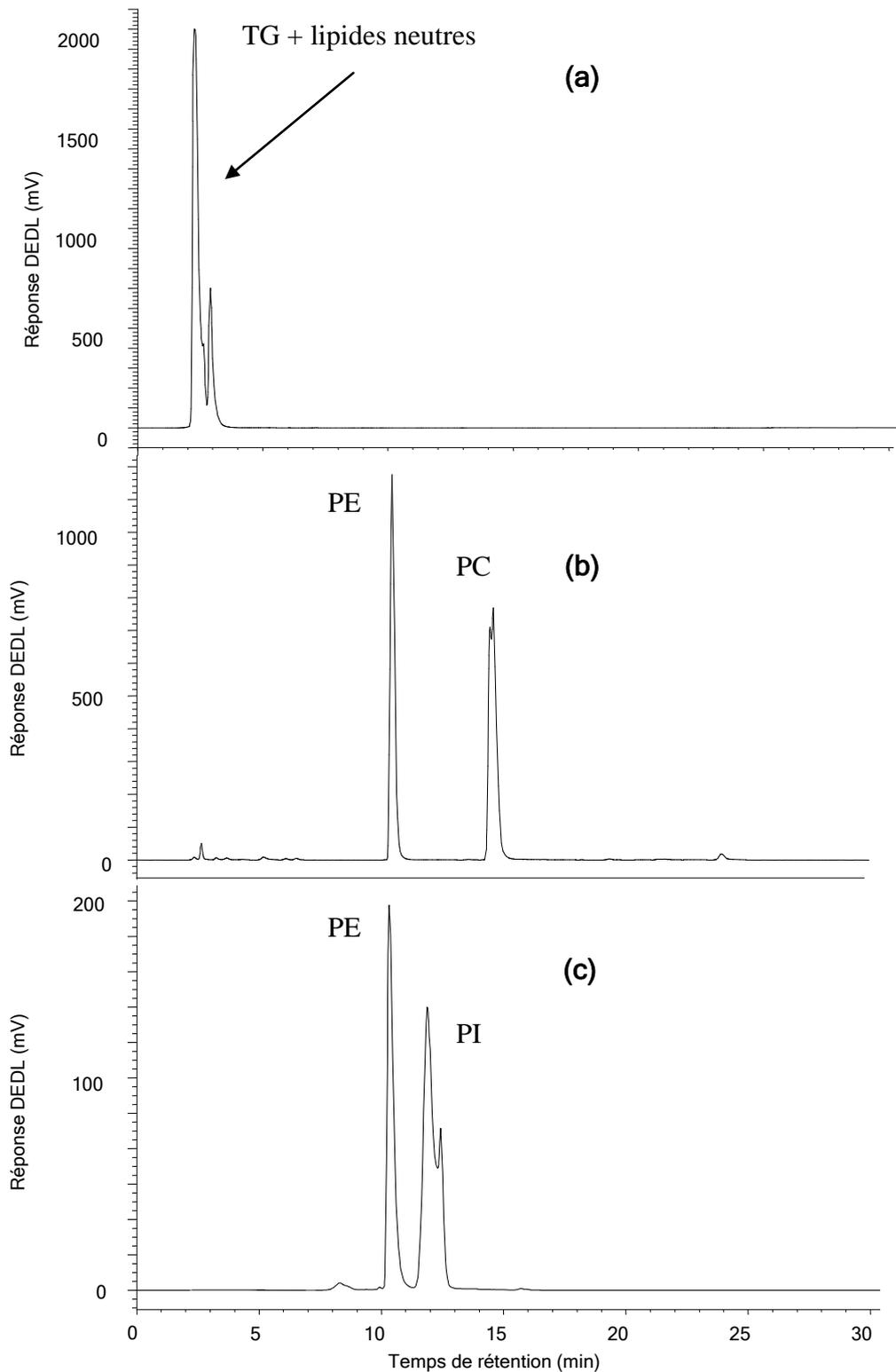
L'utilisation de la méthode des ajouts pour évaluer le recouvrement des différentes classes de PL n'a pas été utilisée ici. En effet, comme les PL sont les constituants des membranes lipidiques, ils sont liés aux autres constituants de la membrane cellulaire, comme les protéines. L'ajout de PL sous forme libre dans la matrice n'aurait pas été révélateur de leur comportement réel lors de l'extraction. L'utilisation d'aliments à teneur certifiée en PL serait la deuxième solution envisageable pour vérifier l'efficacité de la méthode. Cependant, aucun aliment de ce type n'est disponible sur le marché. La méthode d'extraction mise au point nécessite 3 cycles successifs d'extraction pour épuiser la matrice et non pour extraire la totalité des PL. Cette méthode donne à notre avis une estimation plus « vraie » de leur biodisponibilité dans le tractus digestif. C'est cette méthode qui sera utilisée pour la suite des travaux présentés dans cette thèse.

## 2.2 Détermination de la répartition des acides gras entre les phospholipides et les triglycérides

### 2.2.1 Séparation des fractions phospholipides et triglycérides par extraction en phase solide

Les différentes étapes d'élution ont été mises au point ou modifiées à partir de la méthode de Kaluzny *et al.* (89). Après chaque étape d'élution, l'éluat issu de la cartouche d'extraction est injecté en CLHP pour vérifier la présence ou l'absence de telle ou telle famille de lipides. La méthode a été mise au point avec de la lécithine de soja, contenant des TG, de la PC, de la PE et du PI. Chacun des chromatogrammes donnés dans la Figure 28, montre les classes lipidiques présentes dans chacune de fractions éluées. Comme les fractions 1 et 2 ne contiennent pas de PL, nous les avons regroupées en une seule et injectées en CLHP-DEDL (Figure 28a). La fraction 3 contient essentiellement de la PC et de la PE, même si un petit pic de TG est encore détecté en début de chromatogramme (Figure 28b). Enfin, la fraction 4 contient le reste de PE et le PI (Figure 28c), qui n'est élué qu'avec un éluant acide, d'où l'utilisation du tampon à pH=3 dans le solvant d'élution. Ces constatations ont permis de montrer qu'en regroupant les fractions (1+2) et (3+4), les TG et les PL sont séparés les uns des autres.

Afin de déterminer quelles proportions de TG sont présentes dans la fraction PL (3+4), nous avons calculé le pourcentage de TG à l'aide des aires des pics. Comme chaque famille de lipides, voire même chaque molécule, possède un facteur de réponse différent avec un détecteur DEDL, ce calcul n'est qu'une évaluation. Nous avons pu évaluer que les TG sont présents à moins de 5% dans la fraction PL. Nous avons considéré que des fractions de PL pures à 95% étaient suffisantes pour évaluer la répartition des AG entre les fractions TG et PL. Dans les conditions utilisées, on ne peut s'attendre à une précision supérieure à 95%, mais comme l'objectif de cette partie est purement qualitatif (calcul de pourcentages relatifs), on estime qu'une pureté à 95% est suffisante.



**Figure 28 :** Chromatogrammes obtenus en CLHP-DEDL pour les différentes fractions éluées lors de la séparation par SPE après passage sur la cartouche de SPE greffée par des groupements aminopropyles. (a) Fractions 1 et 2 regroupées qui ne contiennent que des TG et d'autres lipides neutres, mais pas de PL ; (b) Fraction 3 contenant essentiellement de la PC et de la PE, mais pas (ou très peu) de TG ; (c) Fraction 4 contenant de la PE et le PI.

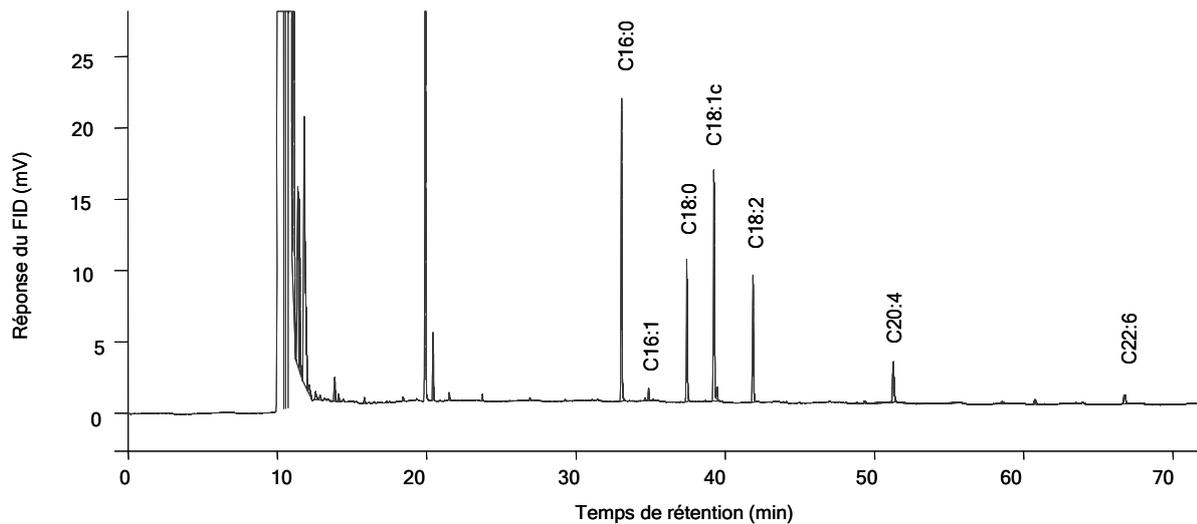
Afin de vérifier l'efficacité de l'extraction en phase solide, un mélange standard de PL issu de la lécithine de soja a été utilisé pour calculer les taux de recouvrement pour chaque famille de PL. Les résultats obtenus figurent dans le Tableau 10. Les taux de recouvrement de PE et PC sont supérieurs à 80% (81,8% pour PE et 91,0% pour PC). En revanche, le taux de recouvrement de PI est plus faible puisqu'il est de 71,6%. Le fait que PI soit plus difficile à éluer s'explique par son caractère acide qui entraîne une plus grande rétention sur la cartouche. C'est pour cette raison que l'éluant utilisé lors de la dernière étape de SPE contient un tampon acide à pH=3. Cette constatation a déjà été faite à plusieurs reprises par des auteurs différents (50;134). On considère que les taux de recouvrement obtenus sont satisfaisants, car comme expliqué précédemment, l'objectif de cette partie est qualitatif. De plus, certains auteurs comme Pernet *et al.* ont obtenu des taux proches des nôtres avec 81,1% pour PE et 85,2% pour PC sur des cartouches aminopropyles (134).

**Tableau 10** : Taux de recouvrement obtenus pour chaque classe de PL du mélange standard issu de la lécithine de soja

<b>Famille de PL</b>	<b>Taux de recouvrement (n=3)</b>
PE	(81,8 ± 8,3) %
PI	(71,6 ± 12,8) %
PC	(91,0 ± 10,0) %

### 2.2.2 Analyse des acides gras contenus dans les fractions phospholipides et triglycérides

Chaque fraction isolée précédemment lors de la SPE a été conservée à +4°C jusqu'à l'étape de transestérification et d'analyse des AG par chromatographie en phase gazeuse. Pour chaque analyse, on obtient un chromatogramme dont un exemple est reproduit dans la Figure 29 permettant d'établir le profil d'AG.



**Figure 29** : Chromatogramme (GC-FID) des AG méthylés issus de la fraction PL du jaune d'œuf

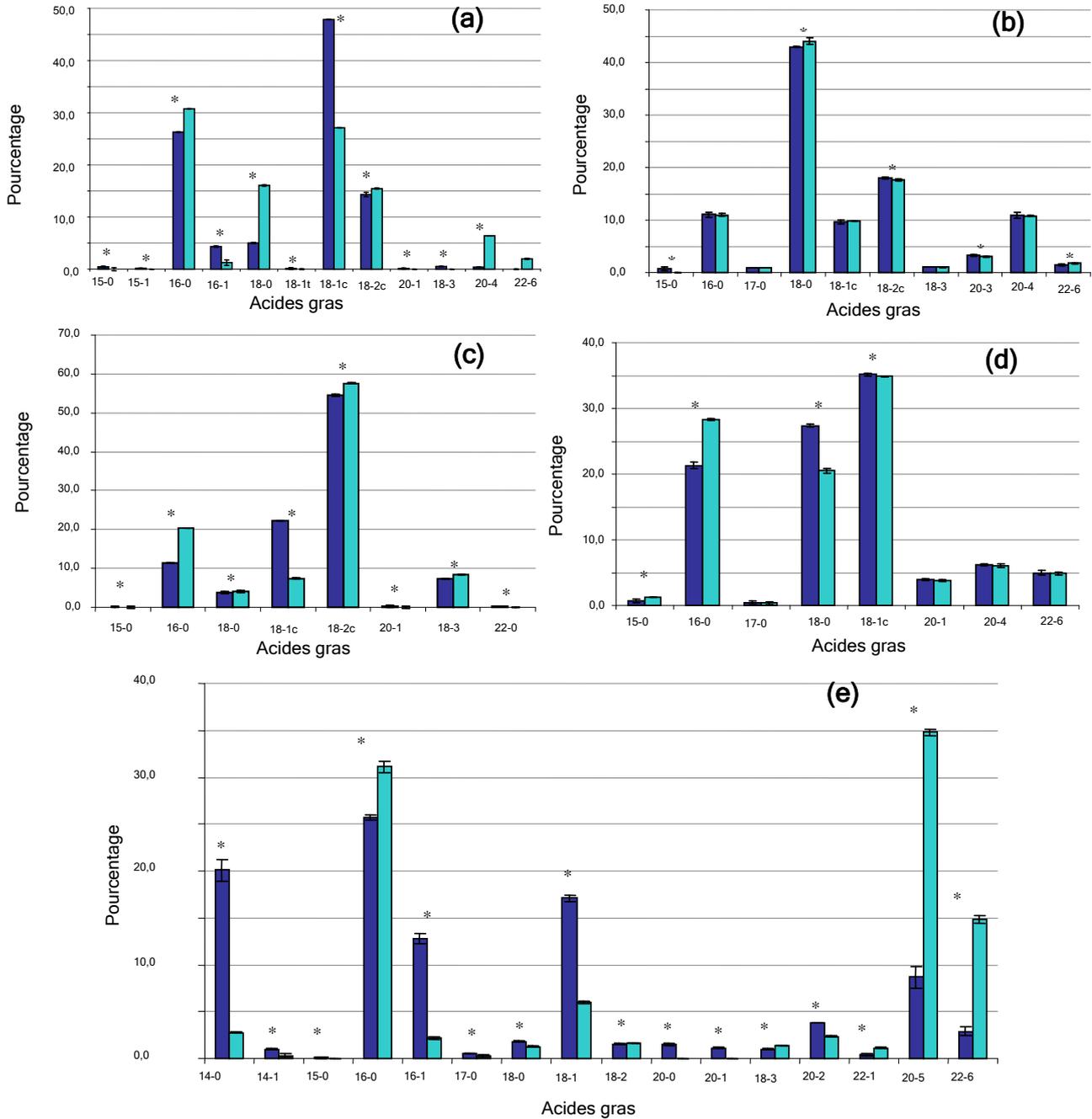
La répartition des AGPI des PL ou des TG est un critère de choix pour la sélection de sources potentielles de PL, puisque comme il a été dit précédemment, la biodisponibilité des AGPI des PL est bien supérieure à celle des AGPI des TG. La Figure 30 donne le pourcentage de chaque AG pour chacune des matrices, dans la fraction PL et dans la fraction TG. Les matrices ayant des origines diverses (végétale, animale, marine), les profils d'AG sont relativement différents d'une matrice à l'autre.

La source qui présente la plus grande diversité d'AG est l'huile de krill avec 16 AG différents répartis entre l'acide myristique (14:0) et le DHA (22:6) (Figure 30e). Tous les AG identifiés dans l'huile de krill ont un pourcentage significativement différent selon qu'ils se trouvent dans les PL ou les TG. Les AG saturés majoritaires identifiés sont l'acide myristique (14:0), qui est beaucoup plus présent dans les TG ; l'acide palmitique (16:0) est très abondant à la fois dans les TG et les PL, mais sensiblement plus dans les PL. Les AG monoinsaturés les plus représentés, comme l'acide palmitoléique (16:1) et l'acide oléique (18:1) sont présents principalement dans les TG. Enfin, les AGPI les plus abondants sont l'EPA et le DHA (144). Proportionnellement à l'ensemble des AG, les AGPI EPA et DHA sont prédominants dans les PL puisque l'EPA représente environ 35% des AG et le DHA environ 15% alors que pour les TG, l'EPA représente moins de 10% et le DHA moins de 5% de l'ensemble des AG (Figure 30e).

La deuxième matrice étudiée qui possède la plus grande variété d'AG est le jaune d'œuf (Figure 30a). Comme pour l'huile de krill, tous les AG identifiés ont un pourcentage significativement différent selon la fraction dont ils sont issus (PL ou TG). Sept AG majoritaires ont pu être identifiés (Figure 29). Les AG saturés majoritaires sont l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0) qui sont plus abondants sur PL que sur les TG.

L'acide oléique (18:1) représente quasiment 50% des AG identifiés dans la fraction TG, alors qu'il représente moins de 30% dans la fraction PL. L'acide palmitoléique (16:1) est majoritairement présent sur les TG. En ce qui concerne les AGPI, le pourcentage d'acide linoléique (18:2) est légèrement supérieur dans la fraction PL. Les pourcentages de l'acide arachidonique (20:4) et du DHA (22:6) sont, quant à eux également bien supérieurs dans la fraction PL que la fraction TG.

Le foie de bœuf (Figure 30b) et la cervelle de veau (Figure 30d) sont les deux matrices qui présentent le moins de différences entre les fractions TG et PL. Pour le foie de bœuf, sur 10 AG identifiés, 5 seulement présentent des proportions significativement différentes dans les fractions PL et TG, d'après le test de Student (Figure 30b). Il s'agit de l'acide pentadécanoïque (15:0), linoléique (18:2) et di-homo- $\gamma$ -linoléique (20:3) qui sont, en proportions plus abondants sur les TG que sur les PL, alors que l'acide oléique (18:1) et le DHA (22:6) sont, quant à eux, plus abondants sur les PL que sur les TG. Pour la cervelle de veau, les différences significatives notables sur le profil d'AG concernent quatre AG (Figure 30d) : l'acide pentadécanoïque (15:0) et l'acide palmitique (16:0), qui représentent un pourcentage plus grand sur les PL ; pour l'acide stéarique (18:0) et l'acide oléique (18:1) c'est l'inverse.



**Figure 30** : Profils d'AG des fractions TG (bleu marine) et PL (bleu clair) pour chacune des matrices alimentaires étudiées : (a) Jaune d'œuf, (b) Foie de bœuf, (c) Graines de soja, (d) Cerveille de veau, (e) Huile de krill. \* indique les différences significatives ( $P < 0.05$ ) données par le test de Student pour chaque AG entre les fractions TG et PL.

Les profils d'AG des fractions PL et TG des graines de soja sont significativement différents (Figure 30c). Tous les AG identifiés ont un pourcentage significativement différent dans la fraction PL et TG. Les acides palmitique (16:0), stéarique (18:0), linoléique (18:2) et linoléique (18:3) présentent un pourcentage plus grand dans la fraction PL. Les autres AG identifiés (pentadécanoïque (15:0), oléique (18:1), gadoléique (20:1), béhénique (22:0)) sont proportionnellement plus abondants dans la fraction TG.

Parmi les aliments étudiés ici, trois se détachent des autres pour devenir des éventuelles sources de PL riches en AGPI : la plus intéressante est sans conteste, l'huile de krill qui est très riche en PL totaux, qui en plus présentent une forte proportion d'EPA et de DHA. Le jaune d'œuf est également intéressant, puisque les acides arachidonique (20:4) et DHA sont exclusivement portés par les PL. Enfin, le soja, connu depuis longtemps pour sa forte teneur en PL et en AG essentiels, reste une source intéressante. Les deux sources animales, que sont le foie de bœuf et la cervelle de veau, présentent moins d'intérêt au niveau du type d'AG présents d'une part, et de leur répartition entre les fractions PL et TG, d'autre part.

Au vu des résultats présentés dans cette première partie, seules les quatre sources possédant PC comme famille de PL majoritaire seront conservées pour la suite de l'étude. Il s'agira donc de l'huile de krill, des graines de soja, du foie de bœuf et du jaune d'œuf. L'argument qui apparaît comme évident pour la suppression de la cervelle de veau comme source potentielle, est la controverse sur les produits bovins suite à la crise de la vache folle.

## **Partie B :**

---

# **Détermination des espèces moléculaires de la phosphatidylcholine**

L'objectif de cette partie est de déterminer les profils des espèces moléculaires de la PC, qui a été identifiée comme la famille majoritaire dans les matrices alimentaires sélectionnées (Partie A). L'utilisation de la CLHP couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier les différentes espèces moléculaires et de déterminer les espèces moléculaires majoritaires pour chaque matrice étudiée.

# 1. Matériels et méthodes

## 1.1 Réactifs

Tous les solvants utilisés pour la chromatographie liquide (méthanol, acétonitrile) sont de qualité HPLC. Les solvants utilisés pour l'étape d'extraction et de purification (chloroforme, *n*-heptane, méthanol) sont de qualité analytique. La solution d'acide phosphomolybdique à 20% dans l'éthanol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) est utilisée pour révéler les spots en chromatographie planaire. L'hydroxyde de lithium monohydraté (LiOH, H<sub>2</sub>O) et l'hydroxyde d'ammonium à 33% sont de qualité analytique. L'étalon de PC de soja a été acheté chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Les extraits lipidiques des quatre matrices alimentaires choisies (huile de krill, jaune d'œuf, graines de soja et foie de bœuf) ont été préparés comme décrit dans la Partie A.

## 1.2 Protocoles de purification des phosphatidylcholines

Afin d'isoler la PC, différentes méthodes ont été mises au point et utilisées en fonction du profil phospholipidique des matrices, obtenu dans la Partie A. La chromatographie Flash est utilisée pour isoler la PC de l'huile de krill, des graines de soja et du jaune d'œuf, alors que la chromatographie préparative, combinée à la collection de fractions est utilisée pour l'extrait lipidique de foie de bœuf.

### 1.2.1 Chromatographie Flash

Un aliquot de 150 mg de l'extrait lipidique total (huile de krill, soja ou jaune d'œuf) est déposé sur une cartouche de 15 g de silice conditionnée avec 150 mL de *n*-heptane et est

soumis à une chromatographie Flash (CombiFlash Retrieve, Serlabo, Entraigues sur la Sorgue, France). L'élution est réalisée avec un débit de 10 mL/min à l'aide de différents mélanges de solvants : d'abord 60 mL d'heptane, puis 60 mL de chloroforme, 120 mL d'un mélange chloroforme/méthanol/eau (35/65/4, v/v/v) et enfin 120 mL d'éthanol pour rincer la cartouche. Des fractions de 10 mL sont collectées en sortie du système et pour chacune d'entre elles, on effectue une analyse par chromatographie planaire sur plaque de silice. La migration s'effectue à l'aide d'un mélange chloroforme/méthanol/eau (35/65/4, v/v/v) et les plaques sont révélées à l'aide d'acide phosphomolybdique à 20% dans l'éthanol. La comparaison des  $R_f$  des produits élués avec celui de l'étalon PC permet d'identifier les fractions contenant la famille d'intérêt. Les fractions retenues sont rassemblées et évaporées à l'évaporateur rotatif.

### 1.2.2 Chromatographie préparative

Un système chromatographique constitué d'un contrôleur 616, d'un DEDL 2424 et d'un injecteur automatique 717Plus (Waters, Saint-Quentin-Fallavier, France) a été utilisé pour effectuer les analyses chromatographiques décrites ci-après. Afin de purifier la PC contenue dans l'extrait lipidique de foie de bœuf, une colonne chromatographique semi-préparative a été utilisée. Un aliquot de 100 mg de l'extrait lipidique total de foie de bœuf dans le chloroforme est injecté sur une colonne semi-préparative Lichrospher, 250 x 10 mm, 10  $\mu$ m (Interchim, Montluçon, France). Les solvants utilisés sont les mêmes que dans la méthode présentée dans la Partie A. Seul le débit est augmenté à 2 mL/min, et le gradient est effectué en 35 min au lieu de 20. Comme le DEDL est un détecteur destructif, un split est mis en place avant l'entrée dans le détecteur afin de pouvoir collecter le pic d'intérêt. Un tiers de la phase mobile (0,7 mL/min) entre dans le détecteur et les deux tiers restants (1,3 mL/min) sont envoyés vers un collecteur de fractions. Le pic de PC est identifié par son temps de rétention et des fenêtres de temps sont mises en place au niveau du collecteur de fractions.

### 1.2.3 Vérification de la pureté de la fraction phosphatidylcholine

La pureté de la fraction PC obtenue pour chacune des quatre matrices est vérifiée par chromatographie liquide en utilisant les mêmes conditions que dans la méthode

chromatographique décrite dans la Partie A. La pureté des fractions obtenues est calculée de la façon suivante :

$$\text{Équation 14 : } P = \frac{A_{PC}}{A_t} \times 100$$

La pureté ( $P$ ) est calculée en fonction de la surface du pic correspondant à la famille PC ( $A_{PC}$ ) et de la somme totale des aires de tous les pics du chromatogramme ( $A_t$ ).

### 1.3 Chromatographie en phase gazeuse

La méthode utilisée pour la chromatographie en phase gazeuse est la même que celle présentée dans la Partie A. Un chromatographe en phase gazeuse Varian 3400 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme a été utilisé pour analyser les esters méthyliques d'AG après la transestérification des PC purifiées à partir des matrices alimentaires (cf. Partie A). L'analyse des esters méthyliques d'AG est effectuée sur une colonne CP-Sil 88 [(88% cyanopropyle)-arylpolysiloxane), 100 m x 0,25 mm, 0,2  $\mu$ m, Varian]. Des échantillons de 1  $\mu$ L sont injectés à l'aide d'un injecteur splitless. Le gaz vecteur utilisé est de l'hélium de haute pureté (99,9995%). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées à 230°C. Le gradient de température utilisé est le même que celui présenté dans la Partie A. Les esters méthyliques d'AG ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux d'étalons (FAME mix C4-C24, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France).

Les surfaces obtenues après la chromatographie en phase gazeuse sont normalisées : le pourcentage de chaque AG est calculé de la façon suivante (Équation 15).

$$\text{Équation 15 : } \% = \frac{A(Pic)}{\sum A(Pics)} \times 100$$

Dans cette équation,  $A(Pic)$  représente la surface donnée pour le pic d'un AG identifié et  $\sum A(Pics)$  représente la somme des aires de tous les pics d'AG identifiés. Chaque analyse est effectuée trois fois et les résultats sont exprimés sous la forme (Moyenne  $\pm$  Ecart-type).

## 1.4 Séparation et identification des espèces moléculaires de phosphatidylcholine

Les espèces moléculaires de PC ont été analysées à l'aide d'un système chromatographique constitué d'une pompe binaire Prostar 210, d'un injecteur automatique 410 et d'un spectromètre de masse triple quadripôle 1200L équipé d'une source d'ionisation ESI (Varian, Les Ulis, France). La pression de l'azote de haute pureté, fourni par un générateur (Domnik Hunter, Villefranche-sur Saône, France) et utilisé comme gaz de nébulisation, est fixée à 46 psi (3,2 MPa). L'azote est également utilisé comme gaz séchant et sa température est fixée à 300°C. La séparation chromatographique des espèces moléculaires de PC est effectuée sur une colonne de phase inverse C18 Isis Nucleodur 250 x 3 mm, 3 µm (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). La phase mobile utilisée est un mélange acétonitrile/méthanol (40/60, v/v) additionnée de 0,1% d'hydroxyde d'ammonium, utilisé dans des conditions isocratiques à un débit de 1 mL/min. Un split est mis en place en sortie de colonne pour limiter à 0,2 mL/min le débit de phase mobile entrant dans le spectromètre de masse.

Afin de faciliter l'identification des espèces moléculaires de PC, 3 mL d'une solution de formiate de lithium à 10 mM dans un mélange H<sub>2</sub>O/iso-propanol (1:1, v/v) sont ajoutés à 1 litre de phase mobile. Les ions majoritaires détectés sont sous la forme [M+Li]<sup>+</sup>, ce qui correspond à l'ion moléculaire associé à un ion lithium. L'acquisition est faite en mode positif dans une gamme de masse située entre les *m/z* 450 et 900. L'identification des AG liés au squelette glycérique des PC s'effectue par fragmentation des adduits lithium dans une gamme de masse entre *m/z* 200 et 600. Le gaz de collision utilisé est de l'argon de haute pureté et l'énergie de collision utilisée pour fragmenter les ions parents est de 30 V.

Le pourcentage de chaque espèce moléculaire identifiée est calculé de la façon suivante :

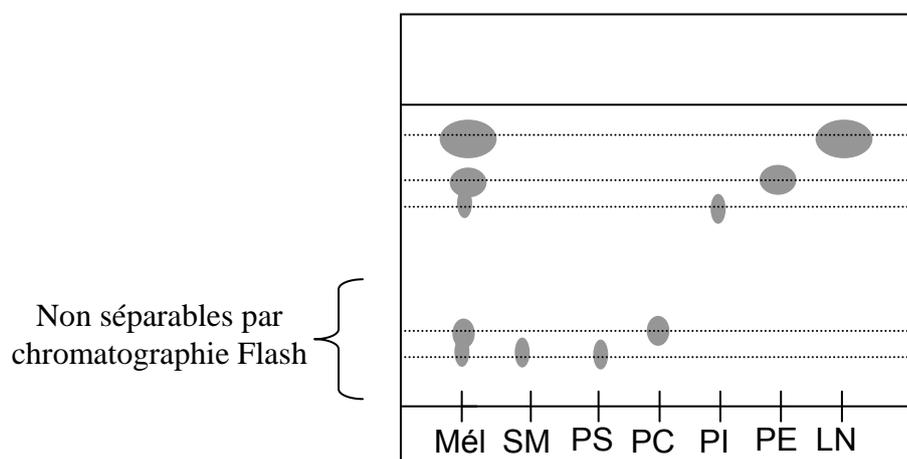
$$\text{Équation 16 : \%} = \frac{A(\text{Pic}(m/z))}{\sum A(\text{Pics})} \times 100$$

$A(Pic(m/z))$  représente la surface du pic pour un  $m/z$  donné et  $\sum A(Pics)$  renvoie à la somme des surfaces de tous les pics identifiés. Toutes les analyses sont réalisées trois fois et les résultats sont exprimés sous la forme (Pourcentage moyen  $\pm$  Ecart-type).

## 2. Résultats et discussion

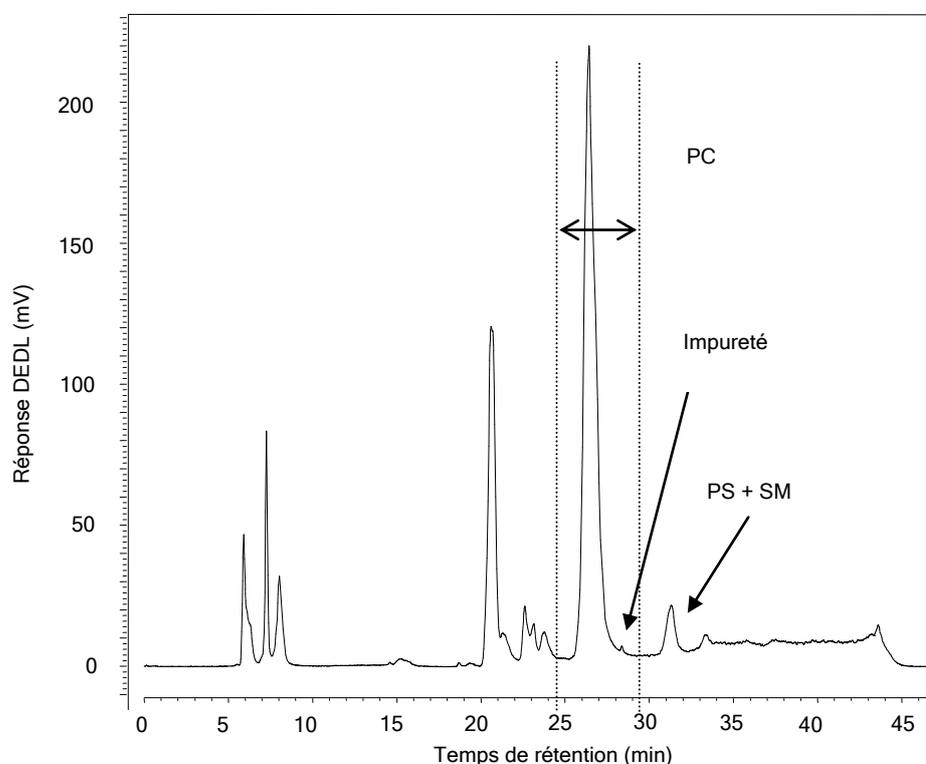
### 2.1 Purification des phosphatidylcholines

Comme nous l'avons vu précédemment dans la Partie A, la méthode de SPE développée ne permet pas de séparer PC de PE. Nous avons donc dû envisager une autre méthode de purification. La classe PC a été séparée des autres classes de lipides comme les lipides non polaires, mais aussi des autres familles de PL en utilisant soit la chromatographie Flash, soit la CLHP préparative combinée à la collection de fractions. Les lipides apolaires sont élués avec du chloroforme et la PC est éluée avec le mélange chloroforme/méthanol/eau (35/65/4, v/v/v). La chromatographie Flash est une méthode très simple et très rapide à mettre en œuvre, mais qui ne permet pas d'isoler correctement la PC de la PS ou de la SM avec les conditions utilisées ici lorsque celles-ci sont présentes dans la matrice, contrairement à la CLHP préparative. La Figure 31 représente schématiquement la séparation sur chromatographie plane de la séparation obtenue avec la chromatographie Flash avec les éluants utilisés.



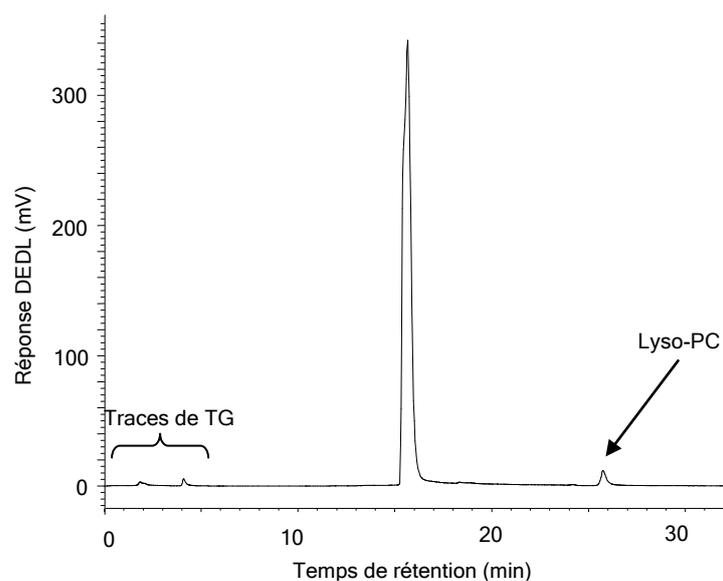
**Figure 31** : Représentation schématique d'une séparation par chromatographie plane des différents étalons de PL présents dans les matrices étudiées. La SM, la PS et la PC ne sont pas séparables entre elles avec les conditions d'éluion utilisées chloroforme/méthanol/eau (35/65/4, v/v/v). Mél : mélange des différents étalons, LN : lipides neutres

Parmi les quatre matrices analysées, seul l'extrait lipidique de foie de bœuf contient de la PS et de la SM, ce qui justifie l'utilisation de la CLHP préparative pour cette matrice (Figure 32).



**Figure 32 :** Profil phospholipidique de l'extrait lipidique de foie de bœuf obtenu par CLHP-DEDL sur une colonne semi-préparative (250 x 10 mm, 10  $\mu$ m) en utilisant un gradient linéaire allant de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (88/12) à  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/1\text{M}$  acide formique ajusté à pH=3 avec la triéthylamine (28/60/12) à un débit de 2 mL/min. La flèche située entre les pointillés représente la fenêtre de temps utilisée pour la collection de fractions.

Pour chacune des matrices étudiées, les fractions contenant la PC purifiée sont rassemblées et la pureté de l'ensemble est vérifiée par CLHP-DEDL. Les taux de pureté des PC isolées à partir des matrices alimentaires sont les suivants : 98,7% pour la PC issue du jaune d'œuf, 98,0% pour celle isolée de l'huile de krill, 95,0% pour les graines de soja et enfin 90,1% pour la PC isolée du foie de bœuf (Figure 33). Avec des taux de pureté obtenus pour chacune des PC isolées supérieurs à 90%, nous avons considérés qu'ils étaient suffisants pour établir les profils d'AG et pour l'analyse des espèces moléculaires.



**Figure 33** : Chromatogramme de la PC obtenue après purification de l'extrait lipidique de foie de bœuf. La séparation est effectuée sur une colonne de phase normale (150 x 3 mm, 3  $\mu$ m) avec un gradient linéaire allant de  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (88/12) à  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/1\text{M}$  acide formique ajusté à pH=3 avec la triéthylamine (28/60/12) à un débit de 0,5 mL/min.

## 2.2 Profils d'acides gras des phosphatidylcholines purifiées

Le calcul des pourcentages respectifs de chaque AG a permis d'établir les profils d'AG des PC purifiées pour chaque matrice alimentaire étudiée. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 11.

La PC de soja contient beaucoup d'AGPI, comparé aux sources animales. Par exemple, les acides linoléique 18:2 (57,6%) et  $\alpha$ -linoléique 18:3 (6,6%) sont particulièrement abondants dans la PC issue du soja. Certains AG saturés sont spécifiques de la matrice soja, comme par exemple les acides béhénique (22:0) et lignocérique (24:0).

**Tableau 11** : Profils d'AG des PC purifiées à partir de l'extrait lipidique de graines de soja, de jaune d'œuf, d'huile de krill et de foie de bœuf<sup>a</sup>

AG identifiés	PC soja (%) <sup>b</sup>	PC jaune d'œuf (%) <sup>b</sup>	PC huile de krill (%) <sup>b</sup>	PC foie de bœuf (%) <sup>b</sup>
14 : 0	n.d	n.d	2,2 ± 0,09	n.d
15 : 0	n.d	0,3 ± 0,01	0,4 ± 0,02	n.d
16 : 0	19,9 ± 0,03	34,1 ± 0,2	26,8 ± 0,1	20,3 ± 0,6
16 : 1 (n-7)	n.d	1,6 ± 0,03	1,8 ± 0,08	n.d
17 : 0	0,2 ± 0,01	n.d	0,2 ± 0,06	0,5 ± 0,4
18 : 0	4,8 ± 0,02	13,6 ± 0,2	1,6 ± 0,05	36,4 ± 0,02
18 : 1 (n-9)	9,4 ± 0,08	29,3 ± 0,4	5,7 ± 0,03	11,7 ± 0,5
18 : 2 (n-6)	57,6 ± 0,10	16,0 ± 0,2	3,0 ± 0,02	21,2 ± 0,7
18 : 3 (n-3)	6,6 ± 0,01	n.d	1,7 ± 0,01	n.d
20 : 0	n.d	n.d	0,1 ± 0,05	n.d
20 : 1 (n-11)	n.d	n.d	0,6 ± 0,01	1,5 ± 0,08
20 : 2 (n-6)	n.d	n.d	2,4 ± 0,01	n.d
20 : 3 (n-3)	n.d	n.d	n.d	2,5 ± 0,07
20 : 4 (n-6)	n.d	4,5 ± 0,02	0,6 ± 0,01	5,8 ± 0,2
22 : 0	0,8 ± 0,01	n.d	n.d	n.d
22 : 1 (n-13)	n.d	n.d	1,3 ± 0,02	n.d
22 : 2 (n-6)	n.d	n.d	0,8 ± 0,01	n.d
24 : 0	0,5 ± 0,01	n.d	n.d	n.d
24 : 1 (n-9)	n.d	n.d	0,5 ± 0,01	n.d
20 : 5 (n-3)	n.d	n.d	34,1 ± 0,07	n.d
22 : 6 (n-3)	0,3 ± 0,01	0,8 ± 0,7	16,4 ± 0,1	n.d
<b>% d'AG saturés</b>	<b>26,1</b>	<b>48,0</b>	<b>31,1</b>	<b>57,2</b>
<b>% d'AG monoinsaturés</b>	<b>9,4</b>	<b>30,9</b>	<b>9,9</b>	<b>13,3</b>
<b>% d'AGPI</b>	<b>64,5</b>	<b>21,1</b>	<b>59,0</b>	<b>29,5</b>

<sup>a</sup> Les résultats sont exprimés sous la forme [moyenne (n=3) ± écart-type]

<sup>b</sup> Le pourcentage exprimé est un pourcentage relatif par rapport à la somme des aires de tous les pics d'AG (Équation 13)

n.d : non détecté

En ce qui concerne la PC de jaune d'œuf, les acides palmitique 16:0 (34,1%) et oléique 18:1 (29,3%) sont les deux acides gras majoritaires identifiés, suivis des acides linoléique 18:2 (16,0%) et stéarique 18:0 (13,6%). Ces résultats sont tout à fait concordants avec une précédente étude (127). Les mêmes AG majoritaires ont été identifiés dans la PC de foie de bœuf mais à des pourcentages différents : 18:0 (36,4%), 18:2 (21,2%), 16:0 (20,3%) et 18:1 (11,7%). Les AG minoritaires (< 3%) identifiés dans le foie de boeuf sont les acides gadoléique (20:1) et di-homo- $\gamma$ -linoléique (20:3), alors que dans le jaune d'œuf, il s'agit de l'acide palmitoléique 16:1 (1,6%) et du DHA 22:6 (0,8%).

La PC issue de l'huile de krill est celle qui contient la plus grande variété d'AG, par rapport aux autres matrices. Cette remarque avait déjà été faite pour la fraction PL dans la Partie A. Bien que le nombre d'AG identifiés soit plus élevé comparé aux autres matrices, trois AG sont très largement majoritaires devant les autres. Il s'agit de l'EPA (20:5), qui représente à lui seul 34,1%, de l'acide palmitique 16:0 (26,8%) et du DHA (22:6) qui représente 16,4%. A eux trois, ces AG représentent plus des trois-quarts des AG présents dans la PC issue de l'huile de krill. Ces résultats sont en accord avec ceux présentés dans une étude précédente où il est démontré que ces trois AG sont très abondants dans l'huile de krill (96). Saito *et al* ont également montré que, même si la composition en AG varie en fonction de la période de capture du krill, la PC est toujours très riche en DHA, EPA et en acide palmitique (144).

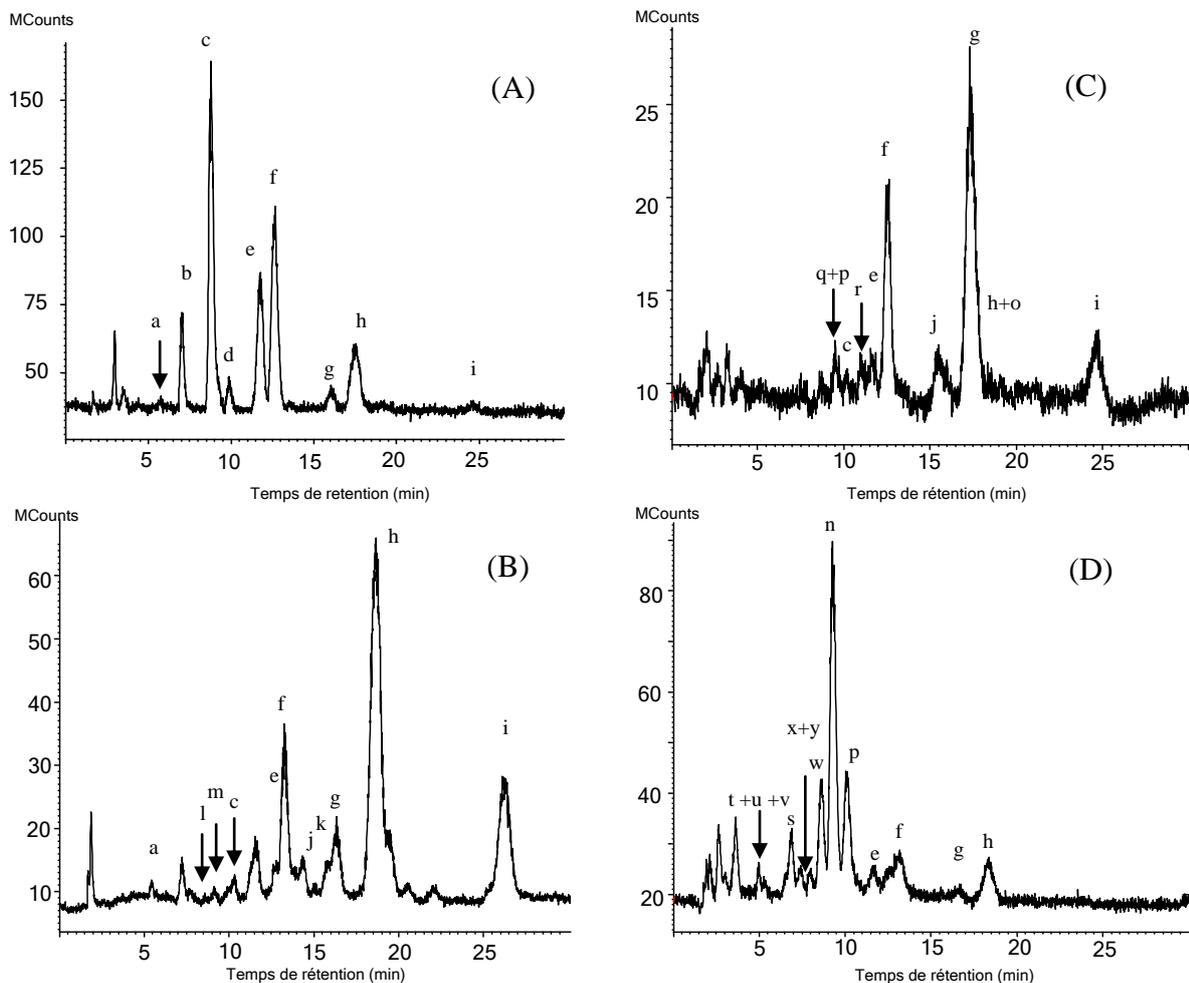
En ce qui concerne la répartition entre les AG saturés, monoinsaturés et polyinsaturés, les pourcentages relatifs des uns par rapport aux autres sont relativement différents d'une matrice à l'autre (Tableau 11). C'est dans la PC des graines de soja et la PC de l'huile de krill que les AGPI sont les plus abondants (soja : 64,5% et krill : 59,0%). La différence notable entre les PC de ces deux matrices réside dans la nature des AGPI qui composent la PC de soja ou la PC de krill, comme il a été montré précédemment. Les AG saturés quant à eux, sont prédominants dans les sources animales, avec 31,2% pour la PC de l'huile de krill, 48,0% dans la PC de jaune d'œuf et 57,2% dans la PC issue du foie de bœuf.

### 2.3 Espèces moléculaires de phosphatidylcholine

#### 2.3.1 Séparation chromatographique

La séparation chromatographique des espèces moléculaires a été effectuée sur une colonne de 250 mm et d'une granulométrie de 3  $\mu\text{m}$ . Les tests précédents sur des colonnes soit de même longueur (250 mm), mais de granulométrie plus importante (5  $\mu\text{m}$ ), soit sur des colonnes plus courtes (100 ou 150 mm) mais de même granulométrie (3  $\mu\text{m}$ ) n'ont pas donné de résultats satisfaisants. C'est pourquoi nous avons opté pour une colonne longue (250 mm) présentant une faible granulométrie (3  $\mu\text{m}$ ), afin d'optimiser la résolution des pics, d'autant plus que la phase mobile choisie ne générerait pas de pression trop élevée, même avec ces dimensions de colonne.

Les chromatogrammes obtenus sont donnés dans la Figure 34. Avec moins de 10 pics chromatographiques, la PC de soja (Figure 34A) et la PC de jaune d'œuf (Figure 34C) ont une composition moléculaire qui paraît plus simple que les deux autres matrices étudiées (Figure 34B et D), pour lesquels on obtient au moins 15 pics. A en juger par la comparaison des temps de rétention et des ratios  $m/z$ , certaines espèces moléculaires semblent communes à différentes sources de PC. Cette remarque semble particulièrement vraie pour les sources animales que sont le foie de bœuf et le jaune d'œuf.



**Figure 34 :** Chromatogrammes des espèces moléculaires des PC purifiées obtenus en CLHP-ESI-MS: (A) PC issue du soja, (B) PC issue du foie de bœuf, (C) PC issue du jaune d'œuf, (D) PC issue de l'huile de krill. La séparation est faite dans des conditions isocratiques avec une phase mobile  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{CH}_3\text{OH}$  (40/60, v/v) contenant 0,1% d'hydroxyde d'ammonium à un débit de 1 mL/min. Les lettres assignées aux différents pics correspondent aux espèces moléculaires suivantes : a: 18:3-18:3-PC, b: 18:3-18:2-PC, c: 18:2-18:2-PC, d: 16:0-18:3-PC, e: 18:1-18:2-PC, f: 16:0-18:2-PC, g: 16:0-18:1-PC, h: 18:0-18:2-PC + 18:1-18:1-PC, i: 18:0-18:1-PC; j: 18:0-20:4-PC, k: 18:0-20:3-PC, l: 18:1-20:4-PC, m: 18:2-20:3-PC, n: 16:0-20:5-PC, o: 16:0-18:0-PC, p: 16:0-22:6-PC, q: 18:1-22:6-PC, r: 18:0-22:6-PC, s: 14:0-20:5-PC, t: 20:5-20:5-PC, u: 20:5-22:6-PC, v: 22:6-22:6-PC, w: 18:1-20:5-PC, x: 18:0-20:5-PC, y: 18:1-20:4-PC

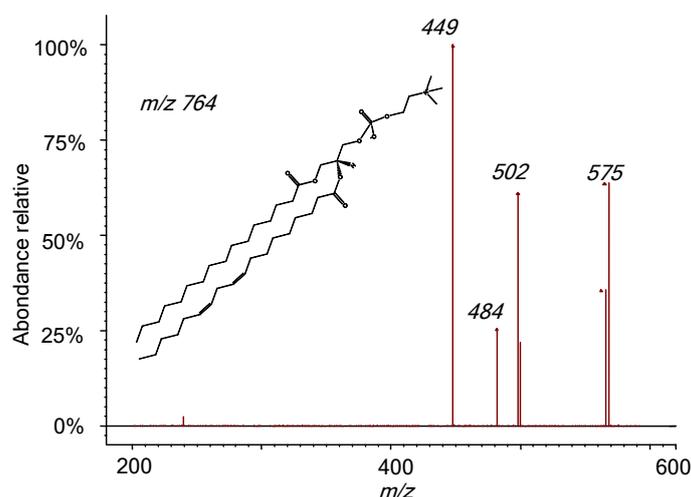
### 2.3.2 Identification

La méthode que nous avons utilisée dans un premier temps pour identifier les espèces moléculaires de la PC consistait à séparer les différentes espèces moléculaires de PC, à les analyser en spectrométrie de masse pour avoir le ratio  $m/z$ , puis à collecter les fractions contenant chaque espèce, à les transestérifier et à les analyser par chromatographie en phase gazeuse pour identifier les AG liés à chaque molécule. Cette méthode permet d'identifier les espèces moléculaires, mais uniquement pour les espèces majoritaires et pour des pics bien séparés par la chromatographie liquide. Cette méthode est également très longue comparée à la deuxième technique que nous avons utilisée (identification avec le lithium). Cependant, l'utilisation de cette méthode plus longue a permis de vérifier que la méthode au lithium donnait les bonnes identifications, puisque les espèces majoritaires de la PC de soja identifiées en utilisant les deux méthodes, sont les mêmes.

Très vite, nous avons opté pour l'identification avec le lithium car elle permet d'identifier beaucoup plus rapidement les espèces moléculaires. Celles de PC sont détectées en tant qu'adduits lithiés  $[M+Li]^+$ . Le sel de lithium ajouté à la phase mobile n'interfère pas sur la séparation chromatographique, ce qui permet de combiner l'utilisation d'une méthode chromatographique efficace avec une bonne identification structurale grâce au lithium. L'ajout de lithium pour l'identification structurale des espèces moléculaires de PC a déjà été utilisé par d'autres auteurs, mais pas en combinaison avec une séparation chromatographique (77;114;115). Il est important de préciser que l'identification qui est proposée dans cette partie ne prend pas en compte les positions des AG sur le squelette glycérique.

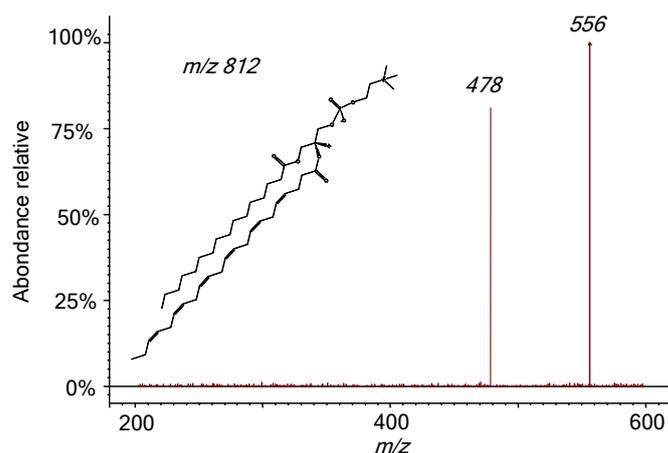
Pour identifier les espèces moléculaires de PC, les adduits lithiés sont fragmentés en spectrométrie de masse en tandem ( $MS^2$ ). Des études précédentes ont montré que trois sortes de fragments caractéristiques sont obtenues au cours de la fragmentation :  $[MLi-AG]^+$  qui correspond à la perte d'un AG ;  $[MLi-AGLi]^+$  qui correspond à la perte d'un AG lithié et enfin  $[MLi-TMA-AG]^+$  qui correspond à la perte d'un AG et d'un groupement triméthylamine (TMA, 59 Da). Hsu *et al* ont mis ces fragments en évidence et ils ont montré qu'ils permettaient l'identification de différentes espèces de PC, qu'elles soient symétriques ou non et insaturées ou non (77). Afin d'illustrer la méthode utilisée pour l'identification de chacune des espèces moléculaires contenues dans les PC purifiées, trois exemples seront présentés en détail :  $m/z$  764,  $m/z$  812 et  $m/z$  784.

Les ions fils obtenus en mode positif après fragmentation de l'adduit lithié  $m/z$  764 (RT=13,2 min) sont donnés dans la Figure 35. L'un des deux AG estérifiés au squelette glycérique a été identifié comme étant l'acide palmitique 16:0 grâce aux ions fils  $m/z$  449 et 502, qui correspondent respectivement aux fragments  $[\text{MLi-TMA-(16:0)}]^+$  et  $[\text{MLi-(16:0)Li}]^+$ . Le deuxième AG a été identifié comme étant l'acide linoléique 18:2 grâce à l'ion  $m/z$  484, qui correspond au fragment  $[\text{MLi-(18:2)}]^+$ . Le dernier fragment ( $m/z$  575) correspond à la masse de l'ion parent ( $m/z$  764) qui a perdu sa tête polaire, sous forme d'un adduit lithié (soit 189 Da). Ce fragment est caractéristique de la famille PC mais n'apporte aucune information sur la nature des AG estérifiés au squelette glycérique. La structure de l'espèce moléculaire contenue dans le pic sortant à RT=13,2 min et présentant l'ion  $m/z$  764 est donnée dans la Figure 35. Il s'agit de  $[(16:0-18:2)\text{-PC} + \text{Li}]^+$ .



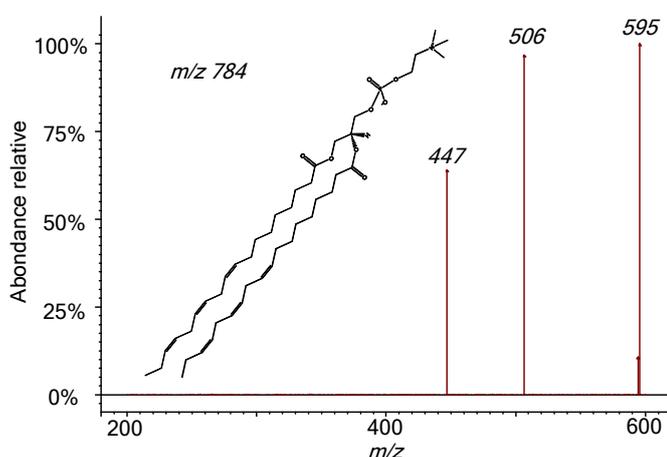
**Figure 35** : Ions fils obtenus en ESI-MS en mode positif après fragmentation entre  $m/z$  200 et 600 de l'ion parent  $m/z$  764 (RT=13,2 min)

Les ions fils obtenus en mode positif après fragmentation de l'adduit lithié  $m/z$  812 (RT=9,6 min) sont donnés dans la Figure 36. Les deux ions obtenus après la fragmentation de l'ion parent ont permis d'identifier les AG liés au squelette glycérique. L'ion  $m/z$  478 et l'ion  $m/z$  556 correspondent respectivement aux fragments  $[\text{MLi-(22:6)Li}]^+$  et  $[\text{MLi-(16:0)}]^+$ , ce qui nous permet d'identifier la molécule de départ comme étant  $[(16:0-22:6)\text{-PC} + \text{Li}]^+$ .



**Figure 36** : Ions fils obtenus en ESI-MS en mode positif après fragmentation entre  $m/z$  200 et 600 de l'ion parent  $m/z$  812 (RT=8,6 min)

Le troisième exemple est donné dans la Figure 37. Le spectre de masse obtenu après fragmentation de l'ion  $m/z$  784 (RT=6,0 min) contient trois fragments qui permettent d'identifier l'espèce moléculaire de PC comme étant  $[(18:3-18:3)\text{-PC} + \text{Li}]^+$ . Les fragments  $m/z$  447 et 506 correspondent respectivement aux fragments  $[\text{MLi}-(18:3)]^+$  et  $[\text{MLi-TMA}-(18:3)]^+$ , ce qui ne nous donne qu'un seul AG. Le troisième et dernier fragment ( $m/z$  595), tout comme pour le  $m/z$  575 provenant de l'ion parent  $m/z$  764, correspond à la masse de l'ion parent ( $m/z$  784) qui a perdu sa tête polaire sous forme d'un adduit lithié (soit 189 Da).



**Figure 37** : Ions fils obtenus en ESI-MS en mode positif après fragmentation entre  $m/z$  200 et 600 de l'ion parent  $m/z$  784 (RT=6,0 min)

L'approche utilisée, illustrée ici par trois exemples concrets, a été appliquée à chacun des ions de  $m/z$  détectés en MS pour chacune des PC purifiées à partir des matrices alimentaires. Cette méthode a permis d'identifier les espèces moléculaires constitutives des PC purifiées et d'établir le profil de ces espèces moléculaires par matrice.

### 2.3.3 Profils des espèces moléculaires de phosphatidylcholine

Le Tableau 12 donne les profils obtenus pour chaque PC purifiée à partir des matrices alimentaires sélectionnées. En ce qui concerne la PC de soja, l'espèce moléculaire majoritaire identifiée est (18:2-18:2)-PC qui représente 34,0%, suivi de (16:0-18:2)-PC (20,8%) et de (18:1-18:2)-PC (16,3%). Les espèces minoritaires identifiées sont par exemple (18:0-18:2)-PC (3,2%), (16:0-18:3)-PC (2,8%) ou encore (18:0-18:1)-PC (1,6%) et (18:3-18:3)-PC (0,7%). Des tendances similaires dans la répartition des espèces moléculaires de la PC de soja avaient déjà été mises en évidence dans des études précédentes (20;21;182), mais pas forcément avec une identification sûre des AG. La méthode utilisée ici permet d'obtenir des ions caractéristiques des AG estérifiés au squelette glycérique. L'identification des AG constitutifs des espèces moléculaires de la PC de soja est également en accord avec le profil d'AG obtenu pour cette même PC (Tableau 11), qui présente de forts pourcentages de 16:0, 18:0, 18:1, 18:2 et 18:3.

Les espèces moléculaires majoritaires identifiées dans la PC de jaune d'œuf (Tableau 12) sont (16:0-18:1)-PC qui représente 39,7%, suivi de (16:0-18:2)-PC (20,2%), (18:0-18:2)-PC (8,3%) et (18:0-18:1)-PC (8,9%). Les espèces minoritaires comprennent les structures suivantes : (18:2-18:2)-PC (3,3%), (18:1-18:2)-PC (3,1%), mais également des espèces moléculaires contenant du DHA comme (16:0-22:6)-PC (2,8%) ou (18:0-22:6)-PC (1,1%). Les résultats obtenus pour les espèces moléculaires de la PC de jaune d'œuf sont d'une façon générale en accord avec l'étude de Pacetti *et al.* (127). L'espèce moléculaire majoritaire identifiée dans leur étude est également (16:0-18:1)-PC. Cependant, des différences sont observables, notamment en ce qui concerne les espèces moléculaires minoritaires. Ces différences peuvent être attribuées à l'alimentation des poules, qui affecte la composition en AG. En se basant sur le profil d'espèces moléculaires de la PC de jaune d'œuf, il est clair que le 16:0 est l'AG majoritaire, puisqu'il est présent dans les deux espèces majoritaires qui représentent à elles seules 60% des espèces moléculaires identifiées. Ce résultat est en accord avec le profil d'AG de la PC de jaune d'œuf donné dans le Tableau 11. Dans une moindre mesure, les mêmes observations peuvent être faites pour l'AG 18:1.

Tableau 12 : Profils des espèces moléculaires de PC à partir des matrices purifiées <sup>a</sup>

m/z [M + Li]	Structure <sup>b</sup>	Temps de rétention (min)	PC soja (%)	PC jaune d'oeuf (%)	PC krill (%)	PC foie (%)
738	(16:0-16:1)PC	11,5	nd <sup>c</sup>	nd	2,7 ± 0,1	nd
740	(16:0-16:0)PC	17,4	0,9 ± 0,2	nd	nd	0,7 ± 0,0
758	(14:0-20:5)PC	6,5	nd	nd	3,2 ± 0,0	nd
	(14:1-20:4)PC	6,0	nd	nd	nd	0,2 ± 0,0
762	(16:0-18:3)PC	10,4	2,8 ± 0,4	nd	nd	nd
764	(16:0-18:2)PC	13,2	20,8 ± 1,0	20,2 ± 0,7	2,6 ± 0,0	10,9 ± 0,2
	(16:1-18:1)PC	13,6	nd	nd	1,1 ± 0,1	nd
766	(16:0-18:1)PC	15,6	5,5 ± 1,5	39,7 ± 1,9	5,9 ± 0,1	9,1 ± 0,2
768	(16:0-18:0)PC	17,5	nd	4,5 ± 0,1	nd	nd
778	(17:0-18:2)PC	15,5	nd	nd	nd	0,7 ± 0,3
780	(17:0-18:1)PC	20,9	nd	nd	nd	0,9 ± 0,0
	(18:3-18:3)PC	6,0	0,7 ± 0,2	nd	nd	0,2 ± 0,0
784	(14:0-22:6)PC	5,8	nd	nd	1,4 ± 0,0	nd
	(16:1-20:5)PC	6,5	nd	nd	1,3 ± 0,3	nd
786	(18:2-18:3)PC	8,6	7,7 ± 1,2	nd	nd	nd
	(16:0-20:5)PC	8,1	nd	nd	32,4 ± 0,3	0,3 ± 0,0
788	(18:2-18:2)PC	11,0	34,0 ± 2,0	3,3 ± 0,2	1,0 ± 0,1	3,3 ± 0,3
	(16:0-20:4)PC	8,7	nd	nd	4,1 ± 0,1	nd
790	(18:1-18:2)PC	13,3	16,3 ± 0,2	3,1 ± 0,3	1,0 ± 0,1	3,5 ± 0,4
	(16:0-20:3)PC	12,6	nd	nd	4,1 ± 0,1	2,8 ± 0,4
792	(18:0-18:2)PC	18,7	6,3 ± 0,3	8,3 ± 0,7	6,6 ± 0,9	34,3 ± 0,5
	(18:1-18:1)PC	17,8	3,2 ± 0,4	3,3 ± 0,7	nd	nd
794	(18:0-18:1)PC	22,4	1,6 ± 0,2	8,9 ± 0,5	nd	15,9 ± 0,5
	(16:0-22:6)PC	9,6	nd	2,8 ± 0,1	11,9 ± 0,0	nd
812	(18:2-20:4)PC	8,2	nd	nd	nd	0,4 ± 0,0
	(18:1-20:5)PC	7,5	nd	nd	7,4 ± 0,4	nd
814	(18:0-20:5)PC	9,1	nd	nd	1,3 ± 0,4	nd
	(18:1-20:4)PC	9,7	nd	nd	1,9 ± 0,1	1,6 ± 0,6
816	(18:2-20:3)PC	10,8	nd	nd	nd	1,2 ± 0,7
	(18:0-20:4)PC	15,5	nd	4,5 ± 0,3	nd	5,7 ± 0,3
818	(18:1-20:3)PC	15,7	nd	nd	nd	nd
	(18:0-20:3)PC	16,0	nd	nd	nd	5,5 ± 0,2
832	(18:2-20:1)PC	16,4	nd	nd	nd	nd
	(20:5-20:5)PC	4,4	nd	nd	1,7 ± 0,0	nd
836	(20:4-20:4)PC	9,4	nd	nd	nd	0,1 ± 0,1
838	(18:1-22:6)PC	8,9	nd	0,3 ± 0,6	nd	nd
	(18:0-22:6)PC	12,0	nd	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,1	nd
840	(20:3-20:3)PC	13,2	nd	nd	nd	0,8 ± 0,0
	(20:1-20:5)PC	8,2	nd	nd	nd	nd
842	(20:4-20:1)PC	15,2	nd	nd	nd	2,2 ± 0,2
858	(20:5-22:6)PC	4,6	nd	nd	2,3 ± 0,0	nd
884	(22:6-22:6)PC	5,0	nd	nd	0,8 ± 0,0	nd

<sup>a</sup> Les résultats sont exprimés en (Pourcentage moyen ± Ecart-type) pour n=3 répétitions

<sup>b</sup> La position des AG sur le squelette glycérique n'a pas été déterminée

<sup>c</sup> nd : non détecté

Les quatre espèces moléculaires majoritaires identifiées dans la PC de foie de bœuf sont les mêmes que celles identifiées dans la PC de jaune d'œuf, mais présentes dans des proportions différentes. (18:0-18:2)-PC représente 34,3%, (18:0-18:1)-PC (15,9%), (16:0-18:2)-PC (10,9%) et enfin (16:0-18:1)-PC (9,1%). Cette identification est en accord avec le profil d'AG présenté dans le Tableau 11, qui montre que 18:2, 16:0 et 18:1 sont les AG majoritaires. Lors de leurs études sur la PC de foie de bovin, Bang *et al.* avaient identifié (18:0-21:3)-PC comme étant l'espèce moléculaire majoritaire (21) alors que Dobson *et al.* ont identifié (18:0-18:2)-PC, (18:0-18:1)-PC et (16:0-18:1)-PC comme espèces majoritaires (57). Au vu de nos résultats obtenus pour les espèces moléculaires et pour le profil d'AG, il semblerait que les identifications proposées par Bang *et al.* soient erronées. Les espèces minoritaires identifiées comprennent (18:0-20:3)-PC, (18:2-20:1)-PC, (18:0-20:4)-PC, (18:1-20:3)-PC, (18:1-18:2)-PC, (16:0-20:4)-PC, et (16:0-20:3)-PC et sont les mêmes que celles identifiées dans les autres études. Les quelques différences mineures observées avec les espèces minoritaires peuvent être attribuées à la fois aux régimes alimentaires des animaux, comme nous l'avons vu pour les poules mais aussi à l'animal en lui-même (par exemple son âge : veau ou bœuf). Certaines espèces moléculaires n'ont pas pu être séparées par chromatographie. Deux cas sont alors possibles : si elles n'ont pas le même ratio  $m/z$  alors on peut les différencier par l'ion parent et évaluer leur pourcentage respectif (ce qui a souvent été le cas ici), en revanche, si les deux espèces ne sont pas séparées ni par chromatographie, ni par leur ratio  $m/z$  alors il n'est pas possible de les différencier, comme c'est le cas avec (18:0-20:3)-PC et (18:2-20:1)-PC. Le pourcentage calculé prend donc en compte les deux espèces (Tableau 12).

En ce qui concerne l'huile de krill, il semblerait que ce soit la première fois que l'identification des espèces moléculaires ait été entreprise, bien que les profils d'AG aient déjà été établis pour PC, PE et TG (144). L'espèce majoritaire qui a été identifiée avec la méthode présentée ici est (16:0-20:5)-PC (32,4%). Bien que présentant des pourcentages relativement élevés, les autres espèces comme (16:0-22:6)-PC (11,9%), (18:1-20:5)-PC (7,4%) (18:0-18:2)-PC (6,6%), (16:0-18:1)-PC (5,9%) et (16:0-20:4)-PC (4,1%) sont beaucoup moins abondantes. Cette fois encore, les profils des espèces moléculaires (Tableau 12) et des AG (Tableau 11) concordent, en montrant que l'EPA, le DHA et le 16:0 sont les AG majoritaires. De plus, les espèces moléculaires de la PC de krill contiennent aussi (14:0-20:5)-PC (3,2%) et (14:0-22:6)-PC (1,4%), qui sont deux espèces contenant l'acide myristique (14 :0), un AG courant dans les produits d'origine marine.

Bien que les profils des espèces moléculaires des PC aient été établis, les positions respectives des AG dans les molécules identifiées ne sont pas encore connues. Cependant, de nombreuses études, menées pour chercher à comprendre la répartition des AG saturés ou insaturés au sein des molécules de PC, ont montré que les AG saturés se trouvent plus souvent en position *sn*-1, alors que les AGPI sont en général estérifiés en position *sn*-2 du squelette glycérique (94;111;186). Ceci est particulièrement vrai pour les AGPI à 20 et 22 atomes de carbone, comme l'EPA (20:5) et le DHA (22:6).

Il existe cependant des exceptions dans lesquelles on trouve soit des AG saturés en position *sn*-2, lorsque par exemple les deux AG de la PC sont des AG saturés, c'est le cas pour (16:0-16:0)-PC, qui a été identifié dans la PC de soja, mais aussi de foie de bœuf (Tableau 12), soit des AGPI en *sn*-1 lorsque la PC ne contient que des AGPI comme par exemple (22:6-22:6)-PC dans la PC de krill. Ces exceptions sont en général présentes à de très faibles proportions (Tableau 12). On peut donc assez facilement supposer que les espèces telles que (16:0-22:6)-PC dans la PC de krill ou (16:0-18:2)-PC, retrouvés en proportions assez importantes dans les quatre matrices, possèdent l'AGPI en position *sn*-2. Cette tendance à présenter les AGPI en position *sn*-2 est également vraie pour d'autres familles de PL comme PE par exemple (186).

Des quatre sources de PC étudiées ici, deux sont particulièrement intéressantes comme sources d'AGPI et semblent se compléter. La PC issue des graines de soja présente trois espèces très majoritaires, contenant toutes de l'acide linoléique (18:2). Des espèces moins abondantes mais tout aussi intéressantes ont été mises en évidence comme (18:2-18:3)-PC, qui ne contient que des AG essentiels. La seconde source particulièrement intéressante est la PC issue de l'huile de krill. Ses espèces moléculaires majoritaires sont riches en AGPI à 20 carbones ou plus, comme (16:0-22:6) et (16:0-20:5). Les deux autres sources étudiées sont incontestablement les sources les moins intéressantes, du fait de leur teneur élevée en AG saturés (Tableau 11).

## Conclusion

Ce chapitre est le point de départ du screening de sources de PL polyinsaturés. L'intérêt pour ces sources porte sur différents aspects : la composition en PL, la composition en AG et enfin la nature et le pourcentage des espèces moléculaires. Les matrices « idéales », qui pourraient être utilisées en tant que suppléments alimentaires doivent comporter des AGPI des séries oméga-3 (acide  $\alpha$ -linoléique, EPA et DHA) et oméga-6 (acide linoléique, acide arachidonique) et ces AG doivent être portés préférentiellement par les PL qui sont plus facilement assimilés par l'organisme que les TG (102;130;184). Certains de ces AG ne sont pas synthétisés par l'organisme, ils sont dits « essentiels ». C'est le cas de l'acide linoléique (18:2), qui est le précurseur des oméga-6 comme l'acide arachidonique (20:4), mais aussi de l'acide  $\alpha$ -linoléique (18:3), précurseurs d'AGPI comme l'EPA et le DHA. Par conséquent, il est impératif de les apporter par le biais de l'alimentation normale ou si les quantités préconisées dans les recommandations ne sont pas atteintes, par le biais d'aliments supplémentés.

Lorsqu'on considère la teneur en PL des sources étudiées, on voit que la famille de PL la plus répandue est la PC, quelle que soit la nature ou l'origine des matrices alimentaires. En effet, cette classe de PL est la famille majoritaire pour 4 des 5 matrices étudiées. Seule la cervelle de veau contient plus de PE que de PC. Les autres classes sont plus spécifiques des matrices étudiées (PI dans le soja, PS et SM dans les abats). D'un point de vue nutritionnel, même si la PS suscite un intérêt grandissant au niveau cognitif (150), la majorité des études menées à ce jour l'a été sur la PC (45). Cet intérêt pour la PC s'explique donc par ses aspects physiologiques intéressants, mais certainement aussi par son abondance relativement importante dans la nature.

L'étude de la répartition des AG entre les fractions PL et TG permet de montrer l'intérêt qu'il y a à s'intéresser aux PL plutôt qu'aux TG. Il est clair au vu des résultats obtenus que l'huile de krill apparaît comme une source très intéressante de PL polyinsaturés. L'EPA et le DHA présents dans les PL représentent quasiment 50% des AG totaux de la fraction PL, ce qui en fait une source intéressante en AG oméga-3 à longues chaînes (4). Les résultats montrent donc que proportionnellement, les PL apportent plus d'AGPI que les TG.

Les PL du jaune d'œuf sont eux aussi vecteurs de DHA, mais en quantités beaucoup plus faibles que ceux que l'on retrouve dans l'huile de krill. Cependant, l'acide linoléique (18:2), qui est un AG essentiel est porté en quantité non négligeable par la fraction PL. Enfin, les PL issus des graines de soja sont vecteurs d'acide  $\alpha$ -linoléique (18:3) et linoléique (18:2), ce qui fait du soja une bonne source d'AG essentiels. Il est important de noter ici que ces trois matrices apporteraient des AG différents en tant que sources d'AGPI-PL. En fonction de la supplémentation désirée (AG essentiels ou AG à longue chaînes), chacune de ces trois sources présente des atouts.

Si l'on compare les profils d'AG issus de la fraction PL à ceux des PC purifiées, on remarque que pour les matrices où PC est largement majoritaire (comme l'huile de krill et le jaune d'œuf), peu de différences sont observables, ce qui est tout à fait logique. En revanche, si l'on compare ces profils pour les matrices où PC est beaucoup moins abondant, on voit que les différences sont beaucoup plus prononcées. Par exemple, si l'on considère le foie de bœuf, l'acide palmitique (16:0) représente 20,3% dans la PC purifiée alors qu'il représente 11,0% dans la fraction PL. Une différence est aussi à noter pour l'acide stéarique (18:0) qui représente 36,4% pour la PC purifiée et 44,1% pour la fraction PL. Cette remarque permet de mettre en évidence la diversité des AG lié aux PL, et plus particulièrement les différences notables entre les différentes familles.

La méthode mise au point pour l'analyse des espèces moléculaires permet d'identifier les AG liés au squelette glycérique. Cette méthode a été appliquée aux PC des quatre matrices sélectionnées dans la Partie A de ce chapitre. Nous avons ainsi pu constater que pour chacune des quatre PC purifiées, deux ou trois espèces moléculaires sont majoritaires par rapport aux autres, c'est le cas notamment de la PC de soja, avec (18:2-18:2)-PC, (16:0-18:2)-PC et (18:1-18:2)-PC qui à eux trois représentent plus de 70%. La même tendance est observée aussi avec les autres matrices. Les profils des espèces moléculaires de PC ont également permis de mettre en évidence des molécules communes à toutes les matrices. C'est le cas, notamment avec (16:0-18:1)-PC et (18:0-18:2)-PC que l'on retrouve dans toutes les matrices étudiées.

La méthode développée ici pour établir les profils de différentes PC d'origine naturelle est rapide. L'étape de purification effectuée avec la chromatographie Flash est très simple à mettre en œuvre et permet d'obtenir des rendements de purification intéressants (une seule purification permet de réaliser l'ensemble des analyses) ainsi qu'une pureté des PC purifiées

supérieure à 90%. L'utilisation de la chromatographie semi-préparative, bien que légèrement plus longue, est tout aussi efficace. Des tests, qui n'ont pas été présentés dans cette partie, ont été effectués en chromatographie Flash pour essayer d'isoler PE et PI des autres classes de PL. Ces tentatives ont jusqu'ici échoué. Cependant, l'alternative serait d'utiliser la chromatographie semi-préparative combinée à la collection de fractions, comme pour la PC de foie de bœuf, afin d'obtenir des fractions pures de PE ou de PI pour en déterminer le profil moléculaire. L'utilisation du lithium pour identifier les structures est une méthode qui pourrait tout à fait s'appliquer à d'autres familles de PL, la seule condition étant que l'analyse puisse se faire en mode d'ionisation positif. Ceci laisse supposer que l'utilisation du lithium dans l'identification des espèces moléculaires de PE s'avère tout à fait envisageable.

# Publication 1

---

## Investigation of Natural Phosphatidylcholine Sources: Separation and Identification by Liquid Chromatography–Electrospray Ionization–Tandem Mass Spectrometry (LC–ESI–MS<sup>2</sup>) of Molecular Species

JULIE LE GRANDOIS,<sup>†</sup> ERIC MARCHIONI,<sup>\*,†</sup> MINJIE ZHAO,<sup>†</sup> FRANCESCA GIUFFRIDA,<sup>‡</sup>  
SAÏD ENNAHAR,<sup>†</sup> AND FRANÇOISE BINDLER<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences de l'Aliment, IPHC-DSA, Université de Strasbourg,  
CNRS, 74, route du Rhin, 67400 Illkirch, France, and <sup>‡</sup>Nestlé Research Center, Nestec Limited, Post Office  
Box 44, CH-1000 Lausanne 26, Switzerland

This study is a contribution to the exploration of natural phospholipid (PL) sources rich in long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) with nutritional interest. Phosphatidylcholines (PCs) were purified from total lipid extracts of different food matrices, and their molecular species were separated and identified by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC-ESI–MS<sup>2</sup>). Fragmentation of lithiated adducts allowed for the identification of fatty acids linked to the glycerol backbone. Soy PC was particularly rich in species containing essential fatty acids, such as (18:2–18:2)PC (34.0%), (16:0–18:2)PC (20.8%), and (18:1–18:2)PC (16.3%). PC from animal sources (ox liver and egg yolk) contained major molecular species, such as (16:0–18:2)PC, (16:0–18:1)PC, (18:0–18:2)PC, or (18:0–18:1)PC. Finally, marine source (krill oil), which was particularly rich in (16:0–20:5)PC and (16:0–22:6)PC, appeared to be an interesting potential source for food supplementation with LC-PUFA–PLs, particularly eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA).

**KEYWORDS:** Phosphatidylcholine; PUFA; supplementation; molecular species; lithium; LC–ESI–MS

### INTRODUCTION

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) play very important roles in many aspects of human health, in particular in reducing risks of cardiovascular diseases, inflammation, hypertension, allergies, and immune and renal disorders (1, 2). Among these, linoleic acid (18:2) and  $\alpha$ -linolenic acid (18:3) are considered as essential fatty acids (FAs), because they have to be necessarily supplied by the diet and cannot be synthesized by the human organism. Moreover, they are the precursors of long-chain PUFAs (LC-PUFAs), in particular eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which are essential for brain and retina development (3–5). It is still unclear though whether the consumption of the precursors (18:3 and 18:2) is sufficient to synthesize the necessary amounts of LC-PUFAs or if diet supplementation with EPA and DHA may be required. In fact, while some reports showed infant formulas supplemented with 18:3 giving retina development comparable to human breast milk (containing DHA) (6, 7), others showed reduced visual maturity with infant formulas supplemented with 18:3 compared to formulas that were supplemented with DHA (4, 8). However, there is agreement among investigators on the crucial importance of PUFAs in the diet and their essential role in human nutrition.

\*To whom correspondence should be addressed. Telephone: +33-390-244-326. Fax: +33-390-244-325. E-mail: eric.marchioni@pharma.u-strasbg.fr.

The natural molecular forms of PUFAs are typically triacylglycerols (TAGs) and phospholipids (PLs). While TAGs are quite a homogeneous group of lipids, PLs can be divided into three classes: glycerophospholipids, ether glycerolipids, and sphingophospholipids. Glycerophospholipids represent the most widespread PL class and can be divided into subclasses according to their polar head, with phosphatidylcholine (PC) being the predominant one. In the human diet, TAGs are the major carriers of FAs, with 50–100 g/day for an adult, followed by PLs, with 2–10 g/day (9). Studies showed however that, when it comes to FA bioavailability, PLs are much more efficient carriers than TAGs (3, 10, 11).

Supplementation of food products with PUFA-rich phospholipids (PUFA–PLs) has recently emerged as an interesting way of increasing the assimilation and the health benefits of LC-PUFAs in the human body. The preparation of food supplements containing pure molecular species (rich in 18:2, 18:3, DHA, and EPA) is not only technically challenging but may turn out to be costly and industrially unrealistic. The solution may however lie in the exploration and tapping of natural PL sources rich in molecular species with PUFAs of nutritional interest.

This study describes the development of an analytical method intended for the determination of molecular species from glycerophospholipids. PC was picked as the model and was extracted and purified from various food matrices: soy as a plant source, egg yolk and ox liver as animal sources, and krill oil as a marine

animal source. Molecular species profiles were determined using liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC–ESI–MS<sup>2</sup>) by fragmenting lithiated adducts of the molecular species of PC.

This analytical method can be advantageously used by the food industry to screen both new potential sources of bioactive ingredients and the quality of their raw materials.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** All solvents used for high-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were HPLC-grade. Methanol was purchased from VWR (Strasbourg, France), and acetonitrile was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), methanol, and *n*-heptane (Carlo Erba, Val de Reuil, France) used for lipid extraction and PC purification were of analytical grade. Wash solution was prepared from sodium chloride of analytical grade and Ultrapure water (Millipore, Molsheim, France). Soy PC standard was purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Hens' eggs (6.5% PC), soybeans (*Glycine max*) (0.7% PC), and ox liver (1.7% PC) were purchased from a local retailer. Krill oil (29.0% PC) has been kindly provided by Nestec SA (Lausanne, Switzerland).

**Sample Preparation and Lipid Extraction.** Preparation was different for each sample depending upon its physical state. Both soy beans and ox liver were grinded, but only ox liver was lyophilized after grinding. Egg yolk was lyophilized but without grinding. Krill oil was fractionated and analyzed as such without further preparation. Grinding was achieved under cryogenic conditions (liquid nitrogen, 3 steps of 5 min) using a 6870 Freezer/Mill (Spex CertiPrep, Stanmore, U.K.). Total lipids were extracted according to Folch et al. (12), with minor modifications. A total of 1 g of the treated food matrix was suspended in 30 mL of a CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v) mixture and shaken mechanically for 20 min. The suspension was centrifuged at 8500g for 10 min, and the supernatant was removed and washed with 5 mL of sodium chloride aqueous solution (1%, w/v). The organic phase containing the lipid fraction was removed, evaporated under vacuum, and dried under a gentle stream of N<sub>2</sub>. The total lipid extract was weighed and dissolved in 1 mL of CHCl<sub>3</sub>.

**Liquid Chromatography. Flash Chromatography.** A 150 mg aliquot of the total lipid extract (from krill oil, soy, or egg) was subjected to preparative flash chromatography (CombiFlash retrieve, Serlabo, Entraigues sur la Sorgue, France) onto a 15 g silica cartridge preconditioned with *n*-heptane. Elution was performed at a flow rate of 10 mL/min using 60 mL of CHCl<sub>3</sub>, then 120 mL of CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (35:65:4, v/v/v) mixture, and finally 120 mL of ethanol for a column wash. Fractions (10 mL) were collected and tested by thin-layer chromatography (TLC) using silica plates, CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (35:65:4, v/v/v) as an eluent, and phosphomolybdic acid in ethanol (20:80, v/v) to visualize compounds. PC was identified in comparison of its retention factor (*R<sub>f</sub>*) to the one of soy PC (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) as a reference. Fractions containing pure PC were pooled and evaporated under vacuum.

**HPLC.** A chromatographic system made of a 616 controller, a 2424 ELS detector, and a 717Plus autosampler (Waters, Saint Quentin Fallavier, France) was used to perform the chromatographic analyses. High-purity nitrogen from a nitrogen generator (Domnik Hunter, Villefranche-sur-Saône, France) was used as a nebulizing gas at a pressure of 45 psi. The drift tube temperature was set at 45 °C. Separations were performed at room temperature using a 20 min linear gradient ranging from CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (88:12, v/v) to CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/1 M formic acid adjusted to pH 3 with triethylamine (28:60:12, v/v/v) (13). This chromatographic system and this gradient were both used for PC purification and to check purity of the isolated PC.

To isolate PC from ox liver, a 100 mg aliquot of the ox liver lipidic extract was injected on a 250 × 10 mm, 10 μm normal-phase Lichrospher column (Interchim, Montluçon, France). A total of 2/3 of the mobile-phase flow, which was set at a rate of 2 mL/min, was diverted, ahead of the ELSD inlet, to a fraction collector. The PC peak was identified in comparison of its retention time to the standard one, and time windows were set to collect the PC peak.

The purity of PC isolated from each matrix was checked by injecting a fraction of the purified samples on a 150 × 3 mm, 3 μm Luna normal phase (Phenomenex, Le Pecq, France) using a flow rate of 0.5 mL/min. Purity (*P*)

of the isolated PC was calculated as follows:

$$P = \frac{A_{PC}}{A_t} \times 100$$

where *A*<sub>PC</sub> is the PC peak area and *A*<sub>t</sub> is the total of peak areas on the chromatogram.

**Separation and Identification of Molecular Species by LC–ESI–MS.** Molecular species of PC were determined using a Prostar HPLC system made of two 210 solvent delivery modules, a 410 auto-sampler, and a 1200 L triple quadrupole mass spectrometer fitted with an ESI source (Varian, Les Ulis, France). High-purity nitrogen (Domnik Hunter) was used as a nebulizing gas, set at 46 psi, and as a drying gas, set at 300 °C. Separation was performed on a C18 reverse-phase 250 × 3 mm, 3 μm Isis Nucleodur column (Macherey-Nagel) using an isocratic flow of CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>3</sub>OH (40:60, v/v) containing 0.1% NH<sub>4</sub>OH at a rate of 1 mL/min. A split system however allowed the HPLC effluent to enter the mass spectrometer at a flow rate of 0.2 mL/min. To help the identification of the molecular species, 3 mL of 10 mM lithium formate was added to 1 L of mobile phase. Major detected ions were [M + Li]<sup>+</sup> referring to the molecular ion with a lithium adduct. Acquisition was performed in positive mode in a mass range between *m/z* 450 and 900. *m/z* ([M + Li]<sup>+</sup>) were fragmented in positive mode (MS<sup>2</sup>), which was used to identify FA linked to the PC glycerol backbone. The mass range was set between *m/z* 200 and 600 for fragmentation products. The dwell time was set to 0.2 s for each *m/z*. Argon was used as a collision gas, and collision energy was set to 30 V. The percentage of each molecular species was calculated as follows:

$$\% = \frac{A(\text{peak}(m/z))}{\sum A(\text{peaks})} \times 100$$

where *A*(peak(*m/z*)) refers to the peak area of the selected *m/z* and  $\sum A(\text{peaks})$  refers to the sum of all peak areas. Analyses were performed in triplicate, with results expressed as mean ± standard deviation (SD).

**Gas Chromatographic Analysis of FA.** A 3400 Varian gas chromatograph equipped with a flame ionization detector was used for the analysis of FA methyl esters (FAMES) after transesterification of

**Table 1.** FA Profiles of Purified PC from Soybeans, Egg Yolk, Krill Oil, and Ox Liver<sup>a</sup>

FAs	soy PC (%) <sup>b</sup>	egg yolk PC (%) <sup>b</sup>	krill oil PC (%) <sup>b</sup>	ox liver PC (%) <sup>b</sup>
14:0	nd <sup>c</sup>	nd	2.2 ± 0.09	nd
15:0	nd	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.02	nd
16:0	19.9 ± 0.03	34.1 ± 0.2	26.8 ± 0.1	20.3 ± 0.6
16:1 (n-7)	nd	1.6 ± 0.03	1.8 ± 0.08	nd
17:0	0.2 ± 0.01	nd	0.2 ± 0.06	0.5 ± 0.4
18:0	4.8 ± 0.02	13.6 ± 0.2	1.6 ± 0.05	36.4 ± 0.02
18:1 (n-9)	9.4 ± 0.08	29.3 ± 0.4	5.7 ± 0.03	11.7 ± 0.5
18:2 (n-6)	57.6 ± 0.10	16.0 ± 0.2	3.0 ± 0.02	21.2 ± 0.7
18:3 (n-3)	6.6 ± 0.01	nd	1.7 ± 0.01	nd
20:0	nd	nd	0.1 ± 0.05	nd
20:1 (n-11)	nd	nd	0.6 ± 0.01	1.5 ± 0.08
20:2 (n-6)	nd	nd	2.4 ± 0.01	nd
20:3 (n-3)	nd	nd	nd	2.5 ± 0.07
20:4 (n-6)	nd	4.5 ± 0.02	0.6 ± 0.01	5.8 ± 0.2
22:0	0.8 ± 0.01	nd	nd	nd
22:1 (n-13)	nd	nd	1.3 ± 0.02	nd
22:2 (n-6)	nd	nd	0.8 ± 0.01	nd
24:0	0.5 ± 0.01	nd	nd	nd
24:1 (n-9)	nd	nd	0.5 ± 0.01	nd
20:5 (n-3)	nd	nd	34.1 ± 0.07	nd
22:6 (n-3)	0.3 ± 0.01	0.8 ± 0.7	16.4 ± 0.1	nd
∑ saturated FAs	26.1	48.0	31.2	57.2
∑ monounsaturated FAs	9.4	30.9	9.9	13.3
∑ PUFAs	64.5	21.1	59.0	29.5

<sup>a</sup> Results (*n* = 3) are expressed as mean ± SD. <sup>b</sup> Percentage of the total peak area of FAs. <sup>c</sup> nd = not detected.

purified PC. Separation was made by a CP Sil 88 column [(88% cyanopropyl)-arylpolydimethylsiloxane, 100 m × 0.25 mm, 0.2 μm, Varian]. Samples (1 μL) were injected. Carrier gas was helium of high purity (99.9995%). The injector and detector were set to 230 °C, and the column was set at 60 °C, held for 5 min, and raised to 165 °C (rate of 15 °C/min). The temperature of 165 °C was held for 1 min and then raised to 225 °C (rate of 2 °C/min). The final temperature was maintained for 30 min. Peaks were identified by a comparison to standards (FAME mix C4–C24, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Purified PC were transesterified using KOH (0.5 M) in CH<sub>3</sub>OH by vortexing for 2 min at room temperature. After decantation, FAME were extracted using *n*-heptane. Gas chromatography (GC) data were normalized, and the percentage of each FA was calculated as follows:

$$\% = \frac{A(\text{peak}(m/z))}{\sum A(\text{peaks})} \times 100$$

where  $A(\text{peak})$  refers to the area of each identified peak and  $\sum A(\text{peaks})$  refers to the sum of areas of each identified peak. Each analysis was performed in triplicate. All results are expressed as mean ± SD.

## RESULTS AND DISCUSSION

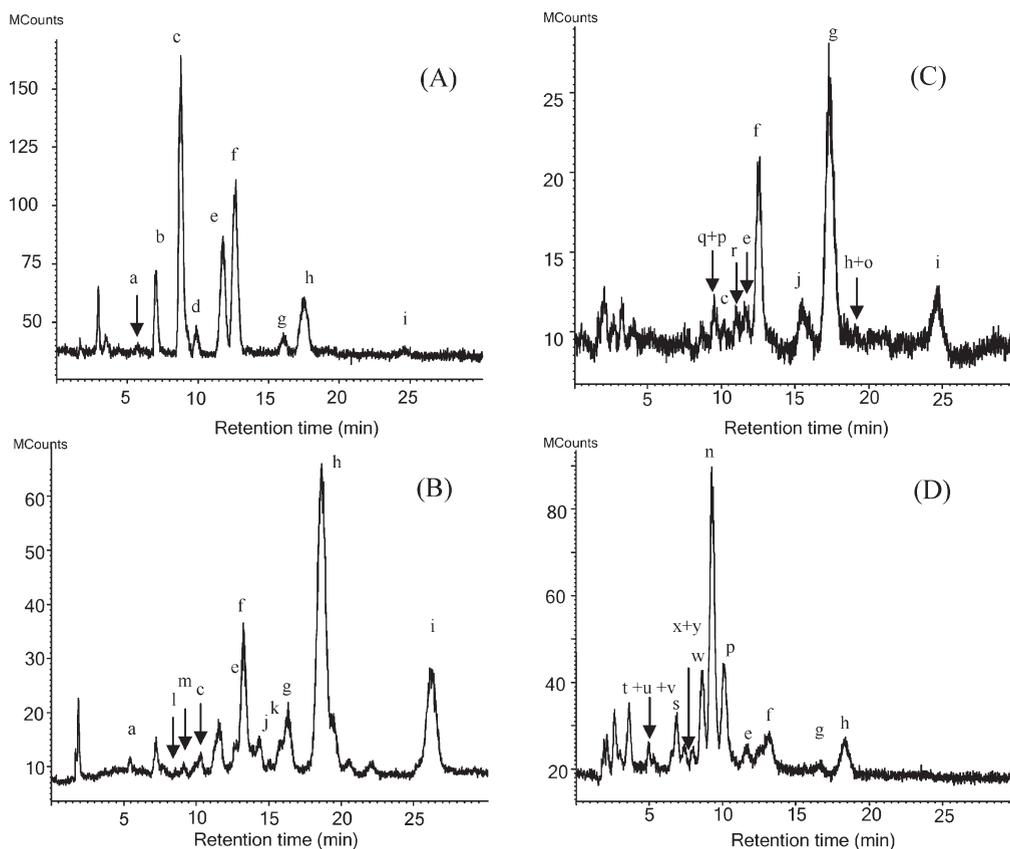
**Purification of PC.** PC was separated from non-polar lipids and other PLs using either flash chromatography or preparative HPLC. While flash chromatography was fast and easy, it was ineffective with food samples containing phosphatidylserine or sphingomyeline. Preparative HPLC on the other hand allowed for the isolation of PC from such samples as ox liver for instance, which contained both of these PLs. After each chromatographic

step, fractions containing PC were pooled and purity was checked by HPLC–evaporative light-scattering detector (ELSD). Purity levels for PC isolated from each food sample were as follows: 98.7% for egg yolk, 98.0% for krill oil, 95.0% for soy, and 90.1% for ox liver. These levels were sufficient for the subsequent determinations of FA profiles and molecular species in PC samples.

**FA Profiles of Purified PC.** Table 1 shows FA profiles of PC purified from the studied food matrices as determined from the normalized data of GC–FID analysis. Soy PC was naturally shown to contain higher proportions of unsaturated FA, as compared to PC from animal sources. For instance, 18:2 (57.6%) and 18:3 (6.6%) were particularly abundant in soy PC. Some saturated FA, such as 22:0 (0.8%) and 24:0 (0.5%), were also present in soy PC, while they were not found in PC from egg yolk, ox liver, and krill oil. Conversely, 20:4 was identified in egg yolk PC (4.5%) and ox liver PC (5.8%), while it was not detected in soy PC.

As far as egg yolk PC is concerned, 16:0 (34.1%) and 18:1 (29.3%) were the two main FA identified, followed by 18:2 (16.0%) and 18:0 (13.6%) (Table 1), which is in agreement with a previous report (14). The same FAs were predominant in ox liver but at different levels: 18:0 (36.4%), 18:2 (21.2%), 16:0 (20.3%), and 18:1 (11.7%). Minor FA were 20:1 (1.5%) and 20:3 (2.5%) in ox liver and 16:1 (1.6%) and DHA (0.8%) in egg yolk.

Krill oil PC contained the largest variety of FAs in comparison to other matrices but with EPA (34.1%), 16:0 (26.8%), and DHA (16.4%) being the three major FAs. This result is in accordance



**Figure 1.** Chromatograms of purified PC: (A) soy, (B) ox liver, (C) egg yolk, and (D) krill oil using LC–ESI–MS. Separation was performed using isocratic conditions: CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>3</sub>OH (40:60) containing 0.1% NH<sub>4</sub>OH at a flow rate of 1 mL/min onto a reverse-phase column (250 × 3 mm, 3 μm). Letters are assigned to major identified peaks: a, 18:3–18:3-PC; b, 18:3–18:2-PC; c, 18:2–18:2-PC; d, 16:0–18:3-PC; e, 18:1–18:2-PC; f, 16:0–18:2-PC; g, 16:0–18:1-PC; h, 18:0–18:2-PC + 18:1–18:1-PC; i, 18:0–18:1-PC; j, 18:0–20:4-PC; k, 18:0–20:3-PC; l, 18:1–20:4-PC; m, 18:2–20:3-PC; n, 16:0–20:5-PC; o, 16:0–18:0-PC; p, 16:0–22:6-PC; q, 18:1–22:6-PC; r, 18:0–22:6-PC; s, 14:0–20:5-PC; t, 20:5–20:5-PC; u, 20:5–22:6-PC; v, 22:6–22:6-PC; w, 18:1–20:5-PC; x, 18:0–20:5-PC; and y, 18:1–20:4-PC.

with a previous study showing that these three FAs were very abundant in krill oil (15), including krill PC (14). Saito et al. showed that, even if krill FA composition varied according to the period of capture, its PC was always rich in EPA, DHA, and 16:0 (16).

The relative rates of saturated, monounsaturated, and PUFAs were very different among food matrices (Table 1). PUFAs were most abundant in soy PC (64.5%) and in krill oil PC (59.0%) but with the latter containing far higher amounts of LC-PUFAs, namely, EPA and DHA, which is in line with the usual composition of food products from marine sources (1). Saturated FAs on the other hand were predominant in animal source foods: 31.2% in krill oil PC, 48.0% in egg yolk PC, and 57.2% in ox liver PC. These data on FA distribution profiles in purified PC were later used in a comparative analysis of the molecular species determinations to check if the identified structures in each PC matched its determined FA composition.

**PC Molecular Species.** *Chromatographic Separation.* Separation was achieved using a 3  $\mu\text{m}$  column, and MS chromatograms are given in Figure 1. With less than 10 chromatographic peaks, soy PC (Figure 1A) and egg yolk PC (Figure 1C) had a simple composition compared to ox liver PC (Figure 1B) and krill PC (Figure 1D), which showed at least 15 peaks. Judging by the retention times, the same molecular species could be present in different foods. It is particularly true for the animal source ones: egg yolk and ox liver, where several peaks have the same retention times.

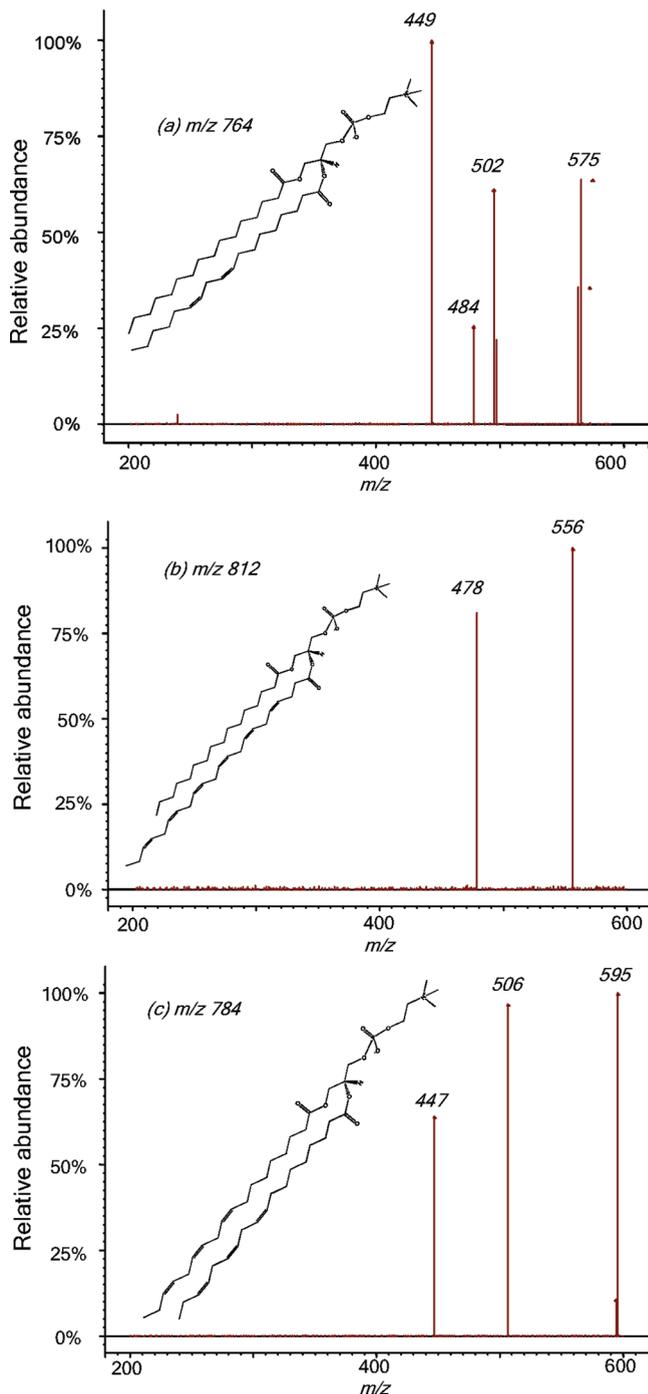
*Identification of PC Molecular Species.* Molecular species of PC were detected as  $m/z$  of lithium adducts  $[\text{M} + \text{Li}]^+$ . Lithium was added to the chromatographic mobile phase and was shown not to interfere with the separation, which allowed for the combination of an effective chromatographic separation and an improved structural identification. Lithium has already been used in previous studies to identify molecular species of PC but with no chromatographic separation beforehand (17–19). To identify PC molecular species, lithium adducts were fragmented in  $\text{MS}^2$ , which was previously shown to yield three main fragments:  $[\text{MLi} - \text{FA}]^+$  corresponding to the loss of a FA group,  $[\text{MLi} - \text{FALi}]^+$  corresponding to the loss of a lithium salt of an FA group, and  $[\text{MLi} - \text{TMA} - \text{FA}]^+$  corresponding to the loss of a trimethylamine group (TMA, 59 Da) and a FA group (17). The obtained fragmentation patterns of lithium adducts proved in fact to be effective in identifying various PC species, including symmetrical, asymmetrical, saturated, and unsaturated ones (17). The identification performed in this study did not take into account the position of the FA in the glycerol moiety and was in most cases tentative.

Representative  $\text{MS}^2$  fragmentation spectra of the molecular species of PC are presented in Figure 2.

Figure 2a shows the  $\text{MS}^2$  spectrum of the species  $m/z$  764 (RT = 13.2 min). One of its two FAs was identified as 16:0 based on  $m/z$  449 and 502, which correspond respectively to fragments  $[\text{MLi} - (16:0) - \text{TMA}]^+$  and  $[\text{MLi} - (16:0)\text{Li}]^+$ . The second FA was identified as 18:2 based on  $m/z$  484, which corresponds to fragment  $[\text{MLi} - (18:2)]^+$ . An additional fragment,  $m/z$  575, matched the mass of the PC minus its phosphocholine head with a lithium adduct (17). Consequently, the molecule detected as a lithium adduct with  $m/z$  764 (RT = 13.2 min) was identified as  $[(16:0-18:2)\text{PC} + \text{Li}]^+$ .

Figure 2b shows the  $\text{MS}^2$  fragmentation spectrum of the molecular species  $m/z$  812 (RT = 8.6 min), which was identified as  $[(16:0-22:6)\text{PC} + \text{Li}]^+$ . The two ions obtained,  $m/z$  478 and 556, corresponded in fact respectively to fragments  $[\text{MLi} - (22:6)\text{Li}]^+$  and  $[\text{MLi} - (16:0)]^+$ , showing DHA and 16:0 as the two FAs of the molecule.

A third example is given in Figure 2c with the  $\text{MS}^2$  spectrum of  $m/z$  784 (RT = 6.0 min) containing three fragments that allowed



**Figure 2.** Ions obtained in positive mode in ESI- $\text{MS}^2$  between 200 and 600 from fragmentation of lithiated adducts: (a) fragmentation of  $m/z$  764, (b) fragmentation of  $m/z$  812, and (c) fragmentation of  $m/z$  784 and their corresponding structures.

for its identification as  $[(18:3-18:3)\text{PC} + \text{Li}]^+$ . Two of these fragments,  $m/z$  506 and 447, were identified as  $[\text{MLi} - (18:3)]^+$  and  $[\text{MLi} - \text{TMA} - (18:3)]^+$ , which pointed to 18:3 as the sole FA. The third fragment,  $m/z$  595, corresponded, as above for  $m/z$  575, to the loss of the phosphocholine head with a lithium adduct. This approach was applied to each  $m/z$  detected with purified PC samples and allowed for the identification of the constitutive molecular species for each food investigated.

*PC Molecular Species Profiles.* Table 2 gives the relative distributions of the various PC molecular species in the foods investigated. As far as soy PC is concerned, the major species was

**Table 2.** Molecular Species Profiles of Each Purified PC<sup>a</sup>

<i>m/z</i> [M + Li]	structure <sup>b</sup>	retention time (min)	soy PC (%) <sup>c</sup>	egg yolk PC (%) <sup>c</sup>	krill oil PC (%) <sup>c</sup>	ox liver PC (%) <sup>c</sup>
738.6	(16:0–16:1)PC	11.5	nd <sup>d</sup>	nd	2.7 ± 0.1	nd
740.6	(16:0–16:0)PC	17.4	0.9 ± 0.2	nd	nd	0.7 ± 0.0
758.6	(14:0–20:5)PC	6.5	nd	nd	3.2 ± 0.0	nd
	(14:1–20:4)PC	6.0	nd	nd	nd	0.2 ± 0.0
762.6	(16:0–18:3)PC	10.4	2.8 ± 0.4	nd	nd	nd
764.6	(16:0–18:2)PC	13.2	20.8 ± 10	20.2 ± 0.7	2.6 ± 0.0	10.9 ± 0.2
	(16:1–18:1)PC	13.6	nd	nd	1.1 ± 0.1	nd
766.6	(16:0–18:1)PC	15.6	5.5 ± 1.5	39.7 ± 1.9	5.9 ± 0.1	9.1 ± 0.2
768.6	(16:0–18:0)PC	17.5	nd	4.5 ± 0.1	nd	nd
778.6	(17:0–18:2)PC	15.5	nd	nd	nd	0.7 ± 0.3
780.6	(17:0–18:1)PC	20.9	nd	nd	nd	0.9 ± 0.0
784.6	(18:3–18:3)PC	6.0	0.7 ± 0.2	nd	nd	0.2 ± 0.0
	(14:0–22:6)PC	5.8	nd	nd	1.4 ± 0.0	nd
	(16:1–20:5)PC	6.5	nd	nd	1.3 ± 0.3	nd
786.6	(18:2–18:3)PC	8.6	7.7 ± 1.2	nd	nd	nd
	(16:0–20:5)PC	8.1	nd	nd	32.4 ± 0.3	0.3 ± 0.0
788.6	(18:2–18:2)PC	11.0	34.0 ± 2.0	3.3 ± 0.2	1.0 ± 0.1	3.3 ± 0.3
	(16:0–20:4)PC	8.7	nd	nd	4.1 ± 0.1	nd
790.6	(18:1–18:2)PC	13.3	16.3 ± 0.2	3.1 ± 0.3	1.0 ± 0.1	3.5 ± 0.4
	(16:0–20:3)PC	12.6	nd	nd	4.1 ± 0.1	2.8 ± 0.4
792.6	(18:0–18:2)PC	18.7	6.3 ± 0.3	8.3 ± 0.7	6.6 ± 0.9	34.3 ± 0.5
	(18:1–18:1)PC	17.8	3.2 ± 0.4	3.3 ± 0.7	nd	nd
794.6	(18:0–18:1)PC	22.4	1.6 ± 0.2	8.9 ± 0.5	nd	15.9 ± 0.5
812.6	(16:0–22:6)PC	8.6	nd	2.8 ± 0.1	11.9 ± 0.0	nd
	(18:2–20:4)PC	8.2	nd	nd	nd	0.4 ± 0.0
	(18:1–20:5)PC	7.5	nd	nd	7.4 ± 0.4	nd
814.6	(18:0–20:5)PC	9.1	nd	nd	1.3 ± 0.4	nd
	(18:1–20:4)PC	9.7	nd	nd	1.9 ± 0.1	1.6 ± 0.6
	(18:2–20:3)PC	10.8	nd	nd	nd	1.2 ± 0.7
816.6	(18:0–20:4)PC	15.5	nd	4.5 ± 0.3	nd	5.7 ± 0.3
	(18:1–20:3)PC	15.7	nd	nd	nd	nd
818.6	(18:0–20:3)PC	16.0	nd	nd	nd	5.5 ± 0.2
	(18:2–20:1)PC	16.4	nd	nd	nd	nd
832.6	(20:5–20:5)PC	4.4	nd	nd	1.7 ± 0.0	nd
836.6	(20:4–20:4)PC	9.4	nd	nd	nd	0.1 ± 0.1
838.6	(18:1–22:6)PC	8.9	nd	0.3 ± 0.6	nd	nd
840.6	(18:0–22:6)PC	12.0	nd	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.1	nd
	(20:3–20:3)PC	13.2	nd	nd	nd	0.8 ± 0.0
	(20:1–20:5)PC	8.2	nd	nd	nd	nd
842.6	(20:4–20:1)PC	15.2	nd	nd	nd	2.21 ± 0.2
858.6	(20:5–22:6)PC	4.6	nd	nd	2.3 ± 0.0	nd
884.6	(22:6–22:6)PC	5.0	nd	nd	0.8 ± 0.0	nd

<sup>a</sup> Results ( $n = 3$ ) are expressed as mean ± SD. <sup>b</sup> The position of fatty acids in the glycerol moiety has not been determined. <sup>c</sup> Percentages of all identified molecular species. <sup>d</sup> nd = not detected.

(18:2–18:2)PC (34.0%), followed by (16:0–18:2)PC (20.8%) and (18:1–18:2)PC (16.3%), while minor ones included (18:0–18:2)PC (3.2%), (16:0–18:3)PC (2.8%), (18:0–18:1)PC (1.6%), and (18:3–18:3)PC (0.7%). Similar patterns have already been reported for soy PC (20–22). Species determination data for soy PC is in agreement with its FA profile (Table 1), with high amounts of 16:0, 18:0, 18:1, 18:2, and 18:3 and 18:2 being by far the predominant one.

The major molecular species in egg yolk PC was identified as (16:0–18:1)PC (39.7%), followed by (16:0–18:2)PC (20.2%), (18:0–18:2)PC (8.9%), and (18:0–18:1)PC (8.3%). Minor species included (18:2–18:2)PC (3.3%), (18:1–18:2)PC (3.1%), (16:0–22:6)PC (2.8%), and (18:0–22:6)PC (1.1%). The data reported here for egg yolk are to a certain extent in agreement with a previous report by Pacetti et al. (14), essentially showing a similar pattern and (16:0–18:1)PC as the predominant species. Some quantitative differences that were observed, especially with minor molecular species, may be attributed to differences in hens' diet, which affects FA composition. On the basis of the PC molecular species, 16:0 is the most abundant FA, being part of two species

that accounted for ca. 60% of all species. This is in accordance with the FA profile of egg yolk PC, which showed that 16:0 represented 34.1% of the total FA content (Table 1). To a lesser extent, a similar observation was made for 18:1.

The four main molecular species in ox liver were the same as in the other animal source food, egg yolk, albeit in different proportions: (18:0–18:2)PC (34.3%), (18:0–18:1)PC (15.9%), (16:0–18:2)PC (10.9%), and (16:0–18:1)PC (9.1%). This matched the FA pattern, which showed 18:0 (36.4%), 18:2 (21.2%), 16:0 (20.3%), and 18:1 (11.7%) as the dominant FAs in ox liver (Table 1). Bovine liver PC molecular species have been determined by Bang et al. (20) and Dobson et al. (23). With a content of 21.59%, (18:0–21:3)PC was found by Bang et al. to be the major molecular species. What is striking about this identification is that 21:3, which was not present in our determinations, is an extremely rare FA. Dobson et al. on the other hand showed a pattern much closer to our findings, with (18:0–18:2)PC, (18:0–18:1)PC, and (16:0–18:1)PC being the main species and no (18:0–21:3)PC being detected (23). These remarks let us think that the identification performed by Bang et al. is probably

wrong. Minor species found in ox liver included (18:0–20:3)-PC + (18:2–20:1)PC (5.5%), (18:0–20:4)PC + (18:1–20:3)PC (5.7%), (18:1–18:2)PC (3.5%), (16:0–20:4)PC (3.3%), and (16:0–20:3)PC (2.8%) and were essentially the same as those identified in other studies. Some few differences observed with minor molecular species could be ascribed to the animal origin and diet, which affect the FA content (14). For molecular species that could not be adequately separated by chromatography, e.g., (18:0–20:3)PC and (18:2–20:1)PC, the calculated content took the two structures into account (Table 2).

As far as krill oil is concerned, to our knowledge, this is the first time the identification of PL molecular species is investigated, although FA profiles have already been determined for phosphatidylethanolamine, PC, and TAG in krill (*Euphausia pacifica*) (16). The major PC molecular species was determined as (16:0–20:5)-PC and represented 32.4% of all PC. Other species, such as (16:0–22:6)PC (11.9%), (18:1–20:5)PC (7.4%), (18:0–18:2)PC (6.6%), (16:0–18:1)PC (5.9%), and (16:0–20:4)PC (4.1%), were less abundant. Once again, the patterns of molecular species and FA coincided, because both determinations indicated that EPA, DHA, and 16:0 were the predominant FAs. Interestingly, minor molecular species of krill oil PC included two [(14:0–20:5)PC (3.2%) and (14:0–22:6)PC (1.4%)] with 14:0, the presence of which is a common feature of marine oils.

In this study, an effective method of separation and identification of PC molecular species was reported. This method used lithium formate to form lithiated adducts. MS<sup>2</sup> fragmentation of these adducts allowed for the identification of FA linked to the glycerol backbone of PC molecular species. As an example of application, the relative contents of individual molecular species were determined, which allowed for a sound comparison of PC structures from foods of plant, animal, and marine origins, represented by soy, ox liver, egg yolk, and krill oil. Soy lecithin, mainly made of PC and already in use as a food additive and a nutritional complement, was therefore shown to be highly rich in essential FAs but not in their LC-PUFA metabolites. Krill oil PC showed an opposite pattern in comparison to soy PC, with very low amounts of 18:2 or 18:3 detected (< 5%) but with EPA and DHA being the most abundant among the foods tested (> 50%). This study developed is an interesting contribution to the investigation of new sources rich in LC-PUFA-PLs. As an example, krill oil was shown as a potential source for food supplementation with EPA and DHA.

## ABBREVIATIONS USED

LC-PUFA, long-chain polyunsaturated fatty acid; EPA or 20:5 (n-3), eicosapentaenoic acid; DHA or 22:6 (n-3), docosahexaenoic acid; PL, phospholipid; PUFA-PL, PUFA-rich PL; PC, phosphatidylcholine; TAG, triacylglycerol; LC, liquid chromatography; ESI, electrospray ionization; MS, mass spectrometry; ELSD, evaporative light-scattering detector; GC, gas chromatography; FID, flame ionization detector; 14:0, myristic acid; 16:0, palmitic acid; 16:1 (n-7), palmitoleic acid; 17:0, heptadecanoic acid; 18:0, stearic acid; 18:1 (n-9), oleic acid; 18:2 (n-6), linoleic acid; 18:3 (n-3),  $\alpha$ -linolenic acid; 20:1 (n-11), gadoleic acid; 20:3 (n-3), dihomogamma-linolenic acid; 20:4 (n-6), arachidonic acid; 22:0, behenic acid; 24:0, lignoceric acid.

## LITERATURE CITED

- (1) Shahidi, F. *Nutraceutical and Specialty Lipids and Their Co-products*; Taylor and Francis: Oxford, U.K., 2006.
- (2) Goodnight, S. H.Jr.; Harris, W. S.; Connor, W. E.; Illingworth, D. R. Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **1982**, *2*, 87–113.

- (3) Amate, L.; Gil, A.; Ramirez, M. Feeding infant piglets formula with long-chain polyunsaturated fatty acids as triacylglycerols or phospholipids influences the distribution of these fatty acids in plasma lipoprotein fractions. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1250–1255.
- (4) Heinemann, K. M.; Waldron, M. K.; Bigley, K. E.; Lees, G. E.; Bauer, J. E. Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids are more efficient than  $\alpha$ -linolenic acid in improving electroretinogram responses of puppies exposed during gestation, lactation, and weaning. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1960–1966.
- (5) Horrocks, L. A.; Yeo Young, K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol. Res.* **1999**, *40*, 211–225.
- (6) Auestad, N.; Montalto, M. B.; Hall, R. T.; Fitzgerald, K. M.; Wheeler, R. E.; Connor, W. E.; Neuringer, M.; Connor, S. L.; Taylor, J. A.; Hartmann, E. E. Visual acuity, erythrocyte fatty acid composition, and growth in term infants fed formulas with long chain polyunsaturated fatty acids for one year. *Pediatr. Res.* **1997**, *41*, 1–10.
- (7) Innis, S. M.; Nelson, C. M.; Lwanga, D.; Rioux, F. M.; Waslen, P. Feeding formula without arachidonic acid and docosahexaenoic acid has no effect on preferential looking acuity or recognition memory in healthy full-term infants at 9 mo of age. *Am. J. Clin. Nutr.* **1996**, *64*, 40–46.
- (8) Makrides, M.; Simmer, K.; Goggin, M.; Gibson, R. A. Erythrocyte docosahexaenoic acid correlates with the visual response of healthy, term infants. *Pediatr. Res.* **1993**, *33*, 425–427.
- (9) Parmentier, M.; Sayed Mahmoud, C.; Linder, M.; Fanni, J. Polar lipids: n-3 PUFA carriers for membranes and brain: Nutritional interest and emerging processes. *OCL* **2007**, *14*, 224–229.
- (10) Lemaitre-Delaunay, D.; Pachiardi, C.; Laville, M.; Pousin, J.; Armstrong, M.; Lagarde, M. Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [<sup>13</sup>C]DHA in phosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 1867–1874.
- (11) Wijendran, V.; Huang, M. C.; Diao, G. Y.; Boehm, G.; Nathanielsz, P. W.; Brenna, J. T. Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates. *Pediatr. Res.* **2002**, *51*, 265–272.
- (12) Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
- (13) Rombaut, R.; Camp, J. V.; Dewettinck, K. Analysis of phospho- and sphingolipids in dairy products by a new HPLC method. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 482–488.
- (14) Pacetti, D.; Boselli, E.; Hulan, H. W.; Frega, N. G. High performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry of phospholipid molecular species in eggs from hens fed diets enriched in seal blubber oil. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1097*, 66–73.
- (15) Kusumoto, N.; Ando, Y.; Matsukura, R.; Mukai, T. Lipid profile of krill *Euphausia pacifica* collected in the pacific ocean near Funka Bay, Hokkaido, Japan. *J. Oleo Sci.* **2004**, *53*, 45–51.
- (16) Saito, H.; Kotani, Y.; Keriko, J. M.; Xue, C.; Taki, K.; Ishihara, K.; Ueda, T.; Miyata, S. High levels of n-3 polyunsaturated fatty acids in *Euphausia pacifica* and its role as a source of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids for higher trophic levels. *Mar. Chem.* **2002**, *78*, 9–28.
- (17) Hsu, F. F.; Bohrer, A.; Turk, J. Formation of lithiated adducts of glycerophosphocholine lipids facilitates their identification by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 516–526.
- (18) Moe, M. K.; Anderssen, T.; Strom, M. B.; Jensen, E. Vicinal hydroxylation of unsaturated fatty acids for structural characterization of intact neutral phospholipids by negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2121–2130.
- (19) Moe, M. K.; Anderssen, T.; Ström, M. B.; Jensen, E. Total structure characterization of unsaturated acidic phospholipids provided by vicinal di-hydroxylation of fatty acid double bonds and negative electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 46–59.
- (20) Bang, D. Y.; Kang, D.; Moon, M. H. Nanoflow liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the characterization of intact phosphatidylcholines from soybean, bovine brain, and liver. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1104*, 222–229.

- (21) Wang, T.; Hammond, E.; Cornette, J.; Fehr, W. Fractionation of soybean phospholipids by high-performance liquid chromatography with an evaporative light-scattering detector. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 1313–1321.
- (22) Bang, D. Y.; Ahn, E. J.; Moon, M. H. Shotgun analysis of phospholipids from mouse liver and brain by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *852*, 268–277.
- (23) Dobson, G.; Deighton, N. Analysis of phospholipid molecular species by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of diacylglycerol nicotinate. *Chem. Phys. Lipids* **2001**, *111*, 1–17.

---

**Received March 17, 2009. Revised manuscript received May 11, 2009. Accepted May 17, 2009.**

## **Chapitre 3 :**

---

**Etude de la stabilité à l'oxydation des phospholipides et comparaison avec les triglycérides**

# 1. Introduction

L'oxydation des lipides est un mécanisme qui modifie beaucoup la qualité nutritionnelle des produits en entraînant une diminution de la valeur nutritionnelle d'une part et en produisant des molécules potentiellement toxiques d'autres part (133;155). Même si l'étude des phénomènes d'oxydation des lipides remonte à un certain nombre d'années, elle fait encore aujourd'hui l'objet de nombreux travaux. Les molécules les plus étudiées sont sans aucun doute les AG, les TG et le cholestérol, mais l'intérêt grandissant pour les PL rend incontournable l'étude de leurs produits de dégradation. Si plusieurs études ont été menées sur les produits secondaires résultant de l'oxydation des PL (41;48) ou sur l'oxydation globale des fractions PL par la mesure des indices de peroxydes par exemple (49;72;85), il y en a peu qui se sont intéressées à la détermination de la nature des produits primaires et aux produits monomériques de l'oxydation (140-142) et, à notre connaissance, aucune ne s'est focalisée sur les produits issus de l'oxydation thermique.

L'intérêt nutritionnel des PL ne semble plus à démontrer, si l'on se réfère à la bibliographie présentée dans le Chapitre 1. Cependant, avant toute supplémentation alimentaire, il convient d'évaluer la stabilité des molécules d'intérêt et d'identifier les transformations qu'elles peuvent subir lors des différents procédés mis en œuvre au cours de la fabrication du produit supplémenté. Une supplémentation en PL apparaîtra comme réellement intéressante si ces derniers sont au moins aussi stables que les TG et si les produits générés lors de l'oxydation ne présentent pas de toxicité particulière. Comme le chauffage est un procédé qui est très répandu dans l'industrie agro-alimentaire, nous avons choisi d'évaluer l'impact de l'oxydation thermique.

Afin de pouvoir comparer la stabilité relative des PL et des TG, il fallait d'abord identifier les produits de dégradation des PL choisis, puis déterminer les cinétiques de formation de ces produits oxydés et de dégradation des produits de départ. Une fois ces résultats obtenus, une comparaison à l'aide d'un outil statistique a permis de déterminer qui des PL ou des TG sont les plus stables vis-à-vis du traitement thermique appliqué. L'identification des produits de dégradation des PL étudiés permet de savoir quel type de

molécules est produit lors du processus oxydatif. Cette identification constitue le point de départ d'une éventuelle étude sur la toxicité de ces molécules.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Réactifs et solutions

#### 2.1.1 Réactifs

Les étalons de PL utilisés (1-stearoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (SOPC), 1-stearoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (SLPC) et 1-stearoyl-2-oleyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (SOPE)) ont été achetés chez Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA) et possèdent une pureté supérieure à 99,9%. Les étalons de TG (1,3-stearoyl-2-oleyl-glycerol (SOS) et 1,3-stearoyl-2-linoleoyl-glycerol (SLS)) proviennent de chez Larodan (Malmö, Suède). Le méthanol de qualité HPLC et l'acide formique (99-100%) de qualité analytique ont été achetés chez VWR (Strasbourg, France). L'eau ultrapure est produite au laboratoire par un système de purification Synergy UV (Millipore, Molsheim, France). Le chloroforme, l'hydroxyde de sodium et l'hydroxyde d'ammonium sont de qualité analytique et viennent de chez Riedel de Haën (Sigma-Aldrich, Seelze, Allemagne). L'acide formique et la soude utilisés (Riedel de Haën, Seelze, Allemagne) sont de qualité analytique. Un étalon de 1-stearoyl-2-oleyl-*sn*-glycerol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) a été utilisé au cours de l'identification des produits d'oxydation de SOPE.

#### 2.1.2 Solutions stock

Des solutions mères à 10 mg/mL dans le chloroforme sont préparées à partir des différents étalons de PL et de TG. Les solutions mères sont stockées dans des flacons ambrés à -20°C afin de limiter au maximum les phénomènes d'oxydation. Les échantillons analysés sont préparés dans des flacons bruns de 4 mL (VWR, Vials 4 mL, hauteur: 44 mm, diamètre interne: 12 mm) en introduisant 100 µL de la solution mère de PL ou de TG. Chaque solution est évaporée à sec sous azote et conservée au congélateur à -20°C jusqu'à oxydation.

## 2.2 Détermination de la température optimale d'oxydation

### 2.2.1 Traitement des échantillons

Pour mener cette étude sur la stabilité des PL, il a fallu déterminer les températures auxquelles les molécules choisies forment des produits de dégradation. Plusieurs températures ont été testées sur SOPC et SLPC pour déterminer les conditions les plus favorables à la formation des produits primaires d'oxydation : les hydroperoxydes. Chaque échantillon est analysé trois fois. Les deux PL choisis sont oxydés dans une étuve pendant 30 min à des températures variant entre 50°C et 175°C. Les températures indiquées sont précises au degré près. Une étude similaire a été menée à des températures fixes et à des durées de chauffage variables entre 5 et 120 min. Les flacons dans lesquels sont préparés les échantillons sont laissés ouverts pendant le chauffage afin de laisser l'oxygène de l'air circuler normalement. Après avoir été oxydés, les échantillons sont refroidis sous un filet d'eau froide jusqu'à température ambiante. Un mL de méthanol est ajouté dans le flacon contenant l'échantillon, puis une dilution au 1/50 est effectuée pour obtenir des échantillons de concentration en produit de départ égale à 0,02 mg/mL. Les solutions sont filtrées à l'aide de filtres seringue 0,45µm en PTFE (Macherey-Nagel, Hoerd, France).

### 2.2.2 Analyse par spectrométrie de masse

Afin de déterminer la température optimale d'oxydation, les échantillons sont analysés par spectrométrie de masse. Cinq µL de chaque échantillon oxydé comme décrit précédemment, sont injectés dans un spectromètre de masse quadripolaire 1200L (Varian, Les Ulis, France) équipé d'une source d'ionisation ESI. L'échantillon est entraîné vers le spectromètre de masse par un flux de méthanol à un débit de 0,2 mL/min. Le gaz de nébulisation, dont la pression est fixée à 46 psi est de l'azote de haute pureté, produit par un générateur (Domnik Hunter, Villefranche-sur-Saône, France). Il est aussi utilisé comme gaz séchant et sa température est alors fixée à 300°C. L'acquisition est effectuée en mode positif et la gamme de masse utilisée s'étend de  $m/z$  500 à 1000.

La température optimale d'oxydation sera définie ici comme étant la température à laquelle le pourcentage maximum d'hydroperoxydes est formé pour chaque PL étudié. Le pourcentage d'hydroperoxydes est calculé de la façon suivante :

$$\text{Équation 17 : } \frac{A_{[M+H+32]T}}{A_{[M+H]}} \times 100$$

$(A_{[M+H+32]T})$  représente la surface du pic correspondant à l'ion  $m/z$  de l'hydroperoxyde  $[M+H+32]$  formé à une température donnée (T) et  $A_{[M+H]}$  correspond à la surface du pic du produit de départ  $[M+H]$  sans oxydation.

### 2.3 Chromatographie liquide haute performance (CHLP-MS)

Le système de chromatographie utilisé pour la séparation et l'identification des produits de dégradation est composé de deux pompes Prostar 210 (Varian), d'un injecteur automatique Prostar 410 (Varian) et d'un spectromètre de masse à source d'ionisation ESI comme décrit ci-dessus. Les séparations chromatographiques des PL et des TG ont été effectuées sur une colonne de chromatographie en phase inverse C8 Lichrospher RP Select B 250 x 4 mm, 5  $\mu\text{m}$  (Interchim, Montluçon, France) à l'aide d'un gradient linéaire à base de méthanol et d'eau MilliQ contenant chacun 0,1% d'hydroxyde d'ammonium. Pour les PC et les TG, le gradient utilisé passe de 85% de méthanol à 100% en 40 min, puis la composition est stable pendant 30 min. Le gradient utilisé pour la séparation des produits de dégradation de SOPE passe de 75% de méthanol à 100% en 30 min, puis la composition reste stable pendant 10 min. Le débit de phase mobile est de 1 mL/min. Un split est installé en sortie de colonne afin de n'envoyer que 0,2 mL/min de phase mobile dans le spectromètre de masse. L'acquisition des données s'effectue dans une gamme de masses comprise entre  $m/z$  500 et 1100.

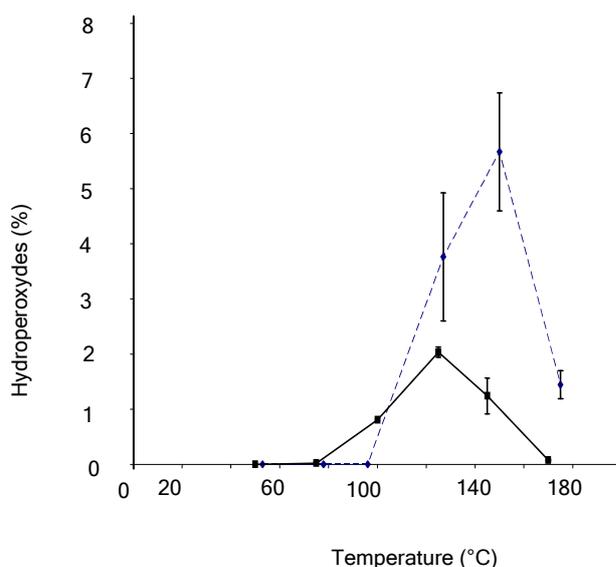
Afin de confirmer la structure des produits de dégradation formés, 10  $\mu\text{L}$  d'acide formique (1M) sont ajoutés à l'échantillon et immédiatement neutralisés par 10  $\mu\text{L}$  de soude (1M). Les échantillons sont analysés de la même façon que précédemment. L'ajout d'acide formique va permettre d'ouvrir les éventuels groupements époxy présents, de les convertir en groupement diols (119) et de provoquer ainsi un décalage dans le temps de rétention.

## 3. Résultats et discussion

### 3.1 Produits d'oxydation des phospholipides étudiés

#### 3.1.1 Détermination des températures optimales d'oxydation

Pour déterminer les conditions optimales d'oxydation pour SOPC et SLPC à sec, les pourcentages d'hydroperoxydes formés aux différentes températures testées ont été calculés. Les résultats sont présentés sous la forme d'une courbe dans la Figure 38. Il apparaît clairement que la température qui permet d'obtenir le pourcentage le plus élevé d'hydroperoxydes est différente pour SOPC et SLPC. Pour des durées d'oxydation égales (30 min), la production d'hydroperoxydes est maximale à 125°C pour SLPC et à 150°C pour SOPC. Ces résultats sont cohérents avec des études qui montrent que l'acide linoléique libre est plus sensible au processus oxydatif que l'acide oléique libre (150).



**Figure 38** : Evolution de la formation des hydroperoxydes issus de SOPC (-----) et SLPC (—) en fonction de la température. Toutes les oxydations ont été faites pendant 30 min.

Il est aussi important de noter que le pourcentage d'hydroperoxydes produit pour SOPC est plus important que pour SLPC. Ce résultat est aussi en accord avec des études précédentes qui ont montré que la quantité d'hydroperoxydes produits au cours du processus oxydatif diminue avec le nombre de doubles liaisons portées par l'AG. Ce résultat est directement lié à la décomposition des hydroperoxydes, plus importante pour les molécules qui présentent le plus d'insaturations (62;150).

Pour des températures inférieures à 80°C pour SLPC et inférieures à 100°C pour SOPC, le processus oxydatif semble lent, ce qui explique les faibles pourcentages d'hydroperoxydes présents aussi bien pour SOPC, que pour SLPC (Figure 38). Les hydroperoxydes ne sont pas encore formés ou en très faibles quantités. Il en est de même pour les autres produits de dégradation, issus de la décomposition des hydroperoxydes. Cette remarque implique une relative stabilité du système étudié, jusqu'à ce que l'énergie d'activation soit suffisante pour initier le processus d'oxydation. Pour des températures supérieures à 80°C pour SLPC et supérieures à 100°C pour SOPC, l'énergie d'activation semble suffisamment élevée pour former des quantités d'hydroperoxydes relativement importantes et déstabiliser le système en transformant ces hydroperoxydes en autres produits d'oxydation. En effet, il est bien connu qu'une augmentation de la température accélère le processus oxydatif, mais il a aussi été montré pour les AG libres que la chaleur favorise la décomposition des hydroperoxydes (62;150). Le mécanisme oxydatif est, d'une certaine façon une compétition entre la formation et la décomposition des hydroperoxydes. Pour identifier la nature des produits d'oxydation formés à partir de la décomposition des hydroperoxydes ainsi que leur cinétique de formation, les oxydations ont été menées aux températures déterminées ici, soit 125°C pour SLPC et 150°C pour SOPC.

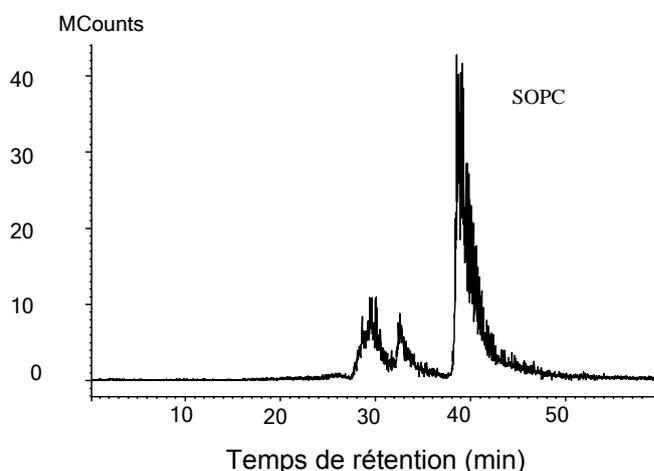
A partir de ces résultats, nous avons choisi de travailler à ces deux températures pour toutes les molécules étudiées au cours de ce chapitre. Dans un souci de comparaison, toutes les molécules qui ne présentent qu'une seule insaturation (SOPC, SOS, SOPE) seront oxydées à 150°C, alors que les molécules présentant deux insaturations (SLPC et SLS) seront oxydées à 125°C.

### 3.1.2 Identification des produits d'oxydation des phospholipides

#### 3.1.2.1 Produits d'oxydation de SOPC

Afin d'identifier les produits de dégradation générés lors du processus oxydatif, les échantillons de SOPC ont été chauffés à 150°C comme déterminé précédemment. La durée d'oxydation a été fixée à 45 min pour laisser la réaction de décomposition des hydroperoxydes s'amorcer et ainsi pouvoir observer les produits de dégradation issus des

hydroperoxydes. Le chromatogramme obtenu après l'analyse par CLHP-MS d'un échantillon de SOPC chauffé à 150°C est donné dans la Figure 39.



**Figure 39** : Profil chromatographique de SOPC oxydée obtenu en CLHP-MS sur une colonne de phase inverse C8 Lichrospher Select B (250 x 4,6, 5  $\mu$ m) en utilisant un gradient linéaire allant de CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (+ 0,1% NH<sub>4</sub>OH) (85/15) à CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (+ 0,1% NH<sub>4</sub>OH) (100/0) avec un débit de 1mL/min.

L'acquisition des données en mode TIC (Total Ion Current) a permis de détecter plusieurs  $m/z$ . Le Tableau 13 donne les différentes structures possibles pour les  $m/z$  détectés, les temps de rétention des pics correspondants et indique si oui ou non le pic concerné a réagi en présence d'acide formique.

**Tableau 13** : Structures possibles des produits obtenus après l'oxydation de SOPC

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Structures possibles <sup>a</sup>	Temps de rétention (min)	Réaction avec l'acide formique <sup>b</sup>
788,6	<i><b>18:0-18:1-PC</b></i>	41,7	-
802,6	18:0-18:1(Ep)-PC <i><b>18:0-18:1(Ke)-PC</b></i>	29,9	-
804,6	18:0-18:0(Ep)-PC 18:0-18:0(Ke)-PC <i><b>18:0-18:1(OH)-PC</b></i>	29,1	-
804,6	<i><b>18:0-18:0(Ep)-PC</b></i> 18:0-18:0(Ke)-PC 18:0-18:1(OH)-PC	32,7	+
820,6	<i><b>18:0-18:1(OOH)-PC</b></i>	29,5	+

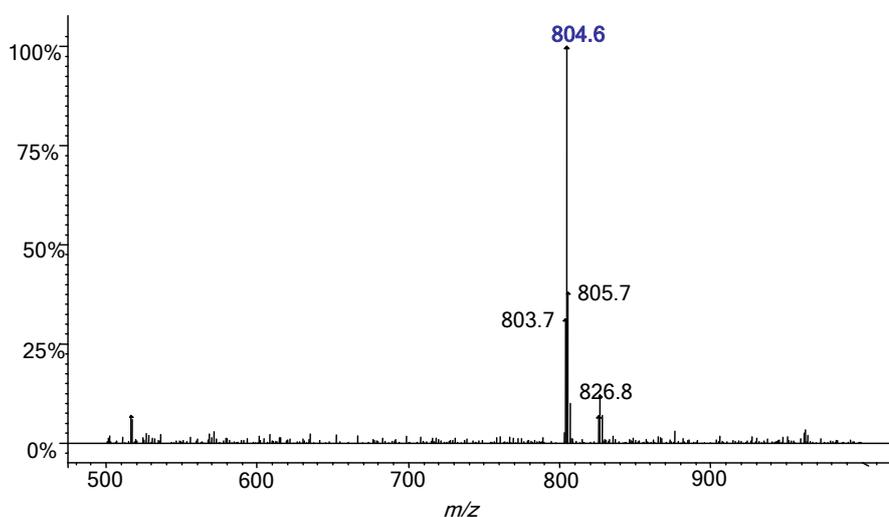
<sup>a</sup> 18:0 correspond à l'acide stéarique et 18:1 à l'acide oléique, Ep correspond à un groupement époxy, Ke à un groupement oxo, OH à un groupement hydroxyl et OOH correspond à un groupement hydroperoxyde

<sup>b</sup> - : pas de modification du temps de rétention, + : modification du temps de rétention

Les structures en gras et en italique correspondent aux structures effectivement identifiées

L'ion caractérisé par un  $m/z$  788,6 détecté dans le pic sortant à 41,7 min correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  de SOPC. Trois autres ions ont pu être identifiés dans le chromatogramme: un ion présentant un  $m/z$  802,6 ; un autre avec  $m/z$  804,6 et enfin un dernier avec  $m/z$  820,6. Chaque  $m/z$  correspond à différentes structures possibles (Tableau 13). L'ion de  $m/z$  802,6 peut porter aussi bien un groupement époxy (Ep) : 18:0-18:1(Ep)-PC, qu'un groupement oxo (Ke) : 18:0-18:1(Ke)-PC sur l'acide oléique. En ajoutant de l'acide formique à l'échantillon, aucune modification du temps de rétention n'a été observée, ce qui permet d'identifier le groupement porté par l'acide comme étant un groupement oxo. La structure du pic sortant à 29,9 min avec un  $m/z$  802,6 est 18:0-18:1(Ke)-PC.

L'ion de  $m/z$  804,6 a été détecté dans deux pics chromatographiques différents : à 29,1 min et 32,7 min. Le spectre de masse de l'ion détecté à 32,7 min est donné dans la Figure 40. Trois structures sont possibles : un groupement époxy : 18:0-18:0(Ep)-PC, un groupement oxo : 18:0-18:0(Ke)-PC ou un groupement hydroxyl : 18:0-18:1(OH)-PC (Tableau 13). L'addition d'acide formique provoque la disparition du second pic chromatographique à 32,7 min, mais n'a aucune influence sur le premier à 29,1 min. Ces résultats montrent donc que le second pic possède la structure suivante : 18:0-18:0(Ep)-PC. En ce qui concerne le pic sortant à 29,1 min, deux structures sont possibles, mais la structure la plus probable est 18:0-18:1(OH)-PC, étant donné que 18:0 (Ke) est une structure qui n'a jamais été répertoriée dans la littérature. Les autres structures identifiées (epoxy-octadécanoate, oxo-octadécénoate et hydroxy-octadécénoate) ont été identifiées par d'autres auteurs suite à l'oxydation thermique de l'acide oléique libre et de l'ester méthylique d'acide oléique (62;103;179).

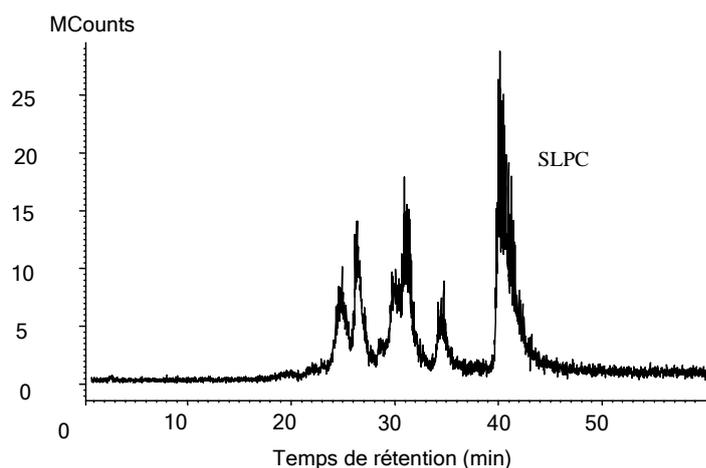


**Figure 40** : Spectre de masse de l'ion  $m/z$  804,6 détecté dans le pic chromatographique élué à 32,7 min

Enfin, l'ion caractérisé par un  $m/z$  820,6 est le dernier ion détecté dans les produits de dégradation issus de SOPC. Il est détecté dans un pic à 29,5 min. Une seule structure est possible pour cette molécule : 18:0-18:1(OOH)-PC (Tableau 13). L'addition d'acide formique fait disparaître le pic, ce qui révèle la réactivité de la molécule. Cette instabilité de la molécule est tout à fait en accord avec la structure identifiée.

### 3.1.2.2 Produits d'oxydation de SLPC

Dans ce cas-ci, les échantillons ont été chauffés à 125°C pendant 30 min, afin d'identifier les produits d'oxydation formés. Les ions détectés dans le chromatogramme (Figure 41) sont donnés dans le Tableau 14.



**Figure 41** : Profil chromatographique de SLPC oxydée obtenu en CLHP-MS sur une colonne de phase inverse C8 Lichrospher Select B (250 x 4,6, 5  $\mu$ m) en utilisant un gradient linéaire allant de CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (+ 0,1% NH<sub>4</sub>OH) (85/15) à CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (+ 0,1% NH<sub>4</sub>OH) (100/0) avec un débit de 1mL/min

Le pic ayant un temps de rétention de 40,7 min contient un ion de  $m/z$  786,6 qui correspond à l'ion moléculaire  $[M+H]^+$  de SLPC, la molécule de départ non oxydée. Cinq autres ions ont pu être détectés dans le chromatogramme (Figure 41) :  $m/z$  800,6 ;  $m/z$  802,6 ;  $m/z$  816,6 ;  $m/z$  818,6 et enfin  $m/z$  834,6. Comme précédemment, nous avons regroupé les différentes structures possibles pour les  $m/z$  détectés dans le Tableau 14.

**Tableau 14** : Structures possibles des produits obtenus après l'oxydation de SLPC

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Structures possibles <sup>a</sup>	Temps de rétention (min)	Réaction avec l'acide formique <sup>b</sup>
786,6	<i>18:0-18:2-PC</i>	40,7	-
800,6	<i>18:0-18:2(Ep)-PC</i> <i>18:0-18:2(Ke)-PC</i>	28,9	+/-
802,6	18:0-18:1(Ep)-PC 18:0-18:1(Ke)-PC <i>18:0-18:2(OH)-PC</i>	28,3	-
802,6	<i>18:0-18:1(Ep)-PC</i> 18:0-18:1(Ke)-PC 18:0-18:2(OH)-PC	32,4	+
816,6	<i>18:0-18:1(Ep, Ke)-PC</i> 18:0-18:2(Ep, OH)-PC	24,5	+
818,6	<i>18:0-18:2(OOH)-PC</i> 18:0-18:2(OH, OH)-PC 18:0-18:1(OH, Ep)-PC 18:0-18:1(Ke, OH)-PC 18:0-18:0(Ke, Ke)-PC	27,7	+
834,6	<i>18:0-18:1(Ep, OOH)-PC</i> 18:0-18:2(OH, OH, OH)-PC	22,5	+

<sup>a</sup> 18:0 correspond à l'acide stéarique, 18:1 réfère à l'acide oléique et 18:2 correspond à l'acide linoléique, Ep correspond à un groupement époxy, Ke à un groupement oxo, OH à un groupement hydroxyl et OOH correspond à un groupement hydroperoxyde

<sup>b</sup> - : pas de modification du temps de rétention, +: modification du temps de rétention

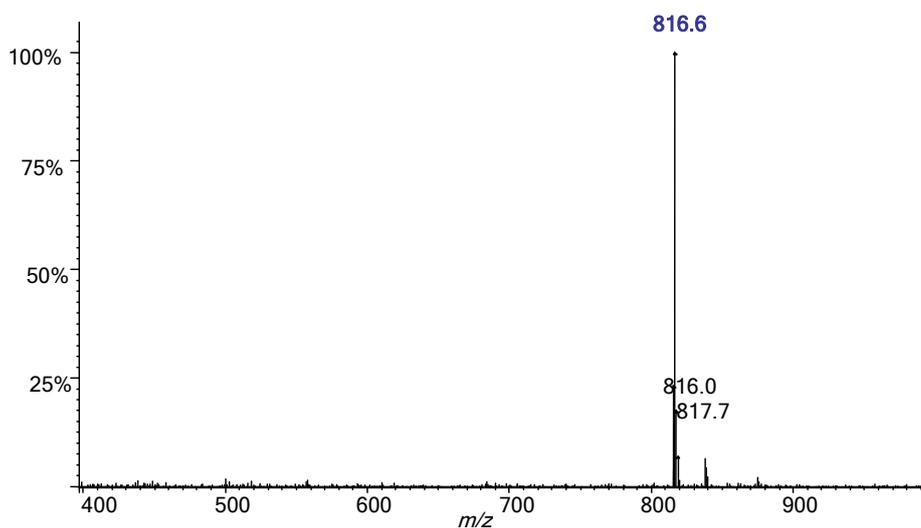
Les structures en gras et en italique correspondent aux structures effectivement identifiées

L'ion de  $m/z$  800,6 correspond à un pic chromatographique asymétrique à un temps de rétention de 28,9 min. Deux structures sont possibles pour cet ion (Tableau 14) : une structure portant un groupement époxy : 18:0-18:2(Ep)-PC ou une structure portant un groupement oxo : 18:0-18:2(Ke)-PC sur l'acide linoléique. L'ajout d'acide formique ne fait pas disparaître le pic entièrement, ce qui laisse supposer que le pic à 28,9 min est en réalité constitué des deux produits d'oxydation mentionnés ci-dessus, ce qui peut justifier la forme asymétrique du pic chromatographique.

L'ion de  $m/z$  802,6 présente un profil similaire à celui de l'ion  $m/z$  804,6 détecté dans les produits d'oxydation de SOPC. En effet, deux pics chromatographiques sont détectés avec cet ion. Trois structures sont possibles pour  $m/z$  802,6 comme indiqué dans le Tableau 14. En ajoutant de l'acide formique dans l'échantillon, seul le second pic disparaît. Comme pour

SOPC, le premier pic est identifié comme portant un groupement hydroxyl : 18:0-18:2(OH)-PC et le second porte un groupement époxy : 18:0-18:1(Ep)-PC.

L'ion correspondant à  $m/z$  816,6 a été détecté à un temps de rétention de 24,5 min et son spectre de masse est donné dans la Figure 42. Cette molécule présente elle aussi deux structures possibles, comme indiqué dans le Tableau 14 : 18:0-18:1(Ep, Ke)-PC and 18:0-18:2(Ep, OH)-PC. Dans ce cas, le traitement des échantillons avec l'acide formique confirme que la molécule en question possède un groupement époxy, étant donné que le pic disparaît. De plus, comme la molécule de départ (SLPC) porte deux insaturations qui sont sensibles à l'oxydation, 18:0-18:1(Ep, Ke)-PC est la structure la plus probable, ce qui est en accord avec de précédentes études (173). Une structure telle que 18:0-18:2(Ep, OH)-PC serait plutôt formée sur des molécules plus fortement insaturées comme l'acide linoléique (62).



**Figure 42** : Spectre de masse de l'ion  $m/z$  816,6 détecté dans le pic chromatographique élué à 24,5 min

L'ion de  $m/z$  818,6 est détecté dans le pic élué à 27,7 min. Cinq structures sont possibles pour ce pic (Tableau 14), qui réagit au traitement par l'acide formique. Cette réactivité permet de réduire le nombre de structures possibles aux deux molécules qui sont sensibles à l'acide : 18:0-18:2(OOH)-PC et 18:0-18:1(OH, Ep)-PC.

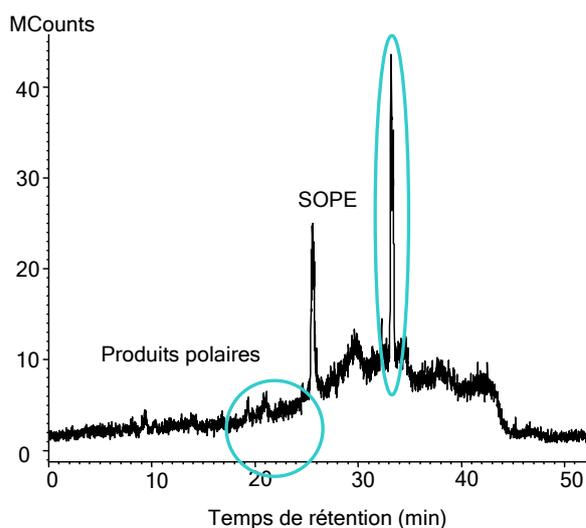
Le dernier ion détecté avec  $m/z$  834,6 est élué à un temps de rétention de 22,5 min. Deux structures sont possibles pour cette molécule (Tableau 14) : 18:0-18:1(Ep, OOH)-PC et 18:0-18:2(OH, OH, OH)-PC. Le produit correspondant à ce  $m/z$  834,6 est très sensible au

traitement acide, ce qui indique que la structure est très probablement 18:0-18:1(Ep, OOH)-PC.

Les structures qui sont proposées ici pour les produits d'oxydation de SLPC sont également cohérentes avec l'ordre d'éluion des différents pics chromatographiques (Tableau 14) et les structures proposées, comme le keto-linoleate, l'époxy-linoleate, l'hydroxyl-linoleate, le ketoepoxy-oleate et l'époxy-oleate ont déjà été identifiées comme étant des produits d'oxydation de l'acide linoléique libre ou de l'ester méthylique d'acide linoléique dans des études précédentes (62;173;179). En ce qui concerne les hydroperoxydes, l'époxyhydroperoxyde est une molécule qui est obtenue par oxydation de l'acide linoléique (62).

### 3.1.2.3 Produits d'oxydation de SOPE

Comme pour l'identification des produits de dégradation de SOPC, SOPE a été chauffé pendant 45 min à 150°C. La dégradation de SOPE donne des résultats très différents (Figure 43) de ceux obtenus pour SOPC (Figure 39). En effet, très peu de produits polaires sont détectés en avant du pic de SOPE non oxydé, mais en revanche un massif apparaît à un temps de rétention aux environs de 34 min (Figure 43). Afin de déterminer la structure du produit contenu dans ce pic, son spectre de masse (Figure 44) a été étudié. Au vu des masses obtenues, l'ion de  $m/z$  645,4 correspond à  $[M+Na]^+$  et l'ion de  $m/z$  605,4 correspond à l'ion  $[M-H_2O+H]^+$ , l'ion moléculaire de  $m/z$  622,6  $[M+H]^+$  n'étant que très peu visible.



**Figure 43** : Profil chromatographique de SOPE oxydée 45 min à 150°C obtenu en CLHP-MS sur une colonne de phase inverse C8 Lichrospher Select B (250 x 4,6 mm, 5µm) en utilisant un gradient linéaire allant de CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (+0.1% NH<sub>4</sub>OH) (75/25) à CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (+0.1% NH<sub>4</sub>OH) (100/0) avec un débit de 1 mL/min

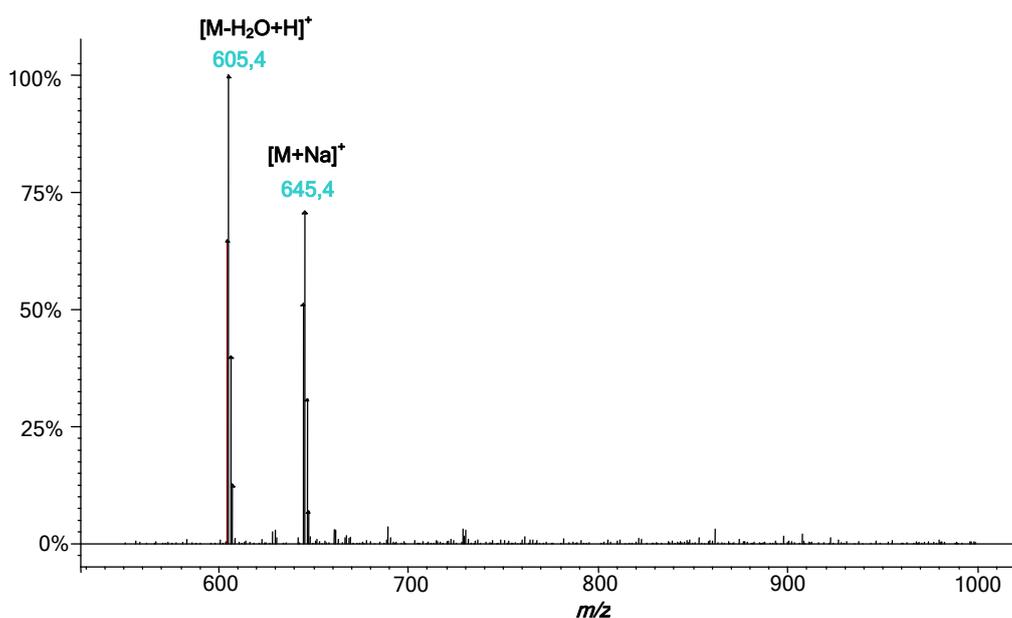


Figure 44 : Spectre de masse du produit de dégradation élué à t=34 min.

La structure du produit élué à t=34 min serait donc un produit de dégradation résultant de l'hydrolyse du groupement phosphate, ce qui conduirait à la formation d'un DG : 1-stearoyl-2-oleyl-*sn*-glycerol. Afin de vérifier cette hypothèse, un étalon de 1-stearoyl-2-oleyl-*sn*-glycerol a été injecté en chromatographie liquide avec le même gradient que pour les produits d'oxydation de SOPE. Le temps de rétention et le spectre de masse du pic identifié comme un DG sont identiques à ceux de l'étalon, on peut donc conclure que le pic sortant à 34 min est le 1-stearoyl-2-oleyl-*sn*-glycerol. Le pic est en fait dédoublé, ce qui est probablement dû à la présence d'isomères. Peu d'études ont été menées sur les phénomènes d'hydrolyse qui se produisent pendant le processus d'oxydation, toutefois certains auteurs ont démontré que cette formation de DG était possible (29).

En ce qui concerne les produits d'oxydation de SOPE, trois produits différents ont pu être identifiés (Tableau 15) : un produit portant un groupement oxo : 18:0-18:1(Ke)-PE, un autre portant un groupement époxy : 18:0-18:0(Ep)-PE et enfin un hydroperoxyde : 18:0-18:1(OOH)-PE. Ces produits sont de même nature que ceux identifiés pour SOPC, mais les pics obtenus dans le chromatogramme sont bien plus petits.

**Tableau 15** : Structures des produits obtenus après l'oxydation de SOPE

$m/z$ $[M+H]^+$	Structures identifiées	Temps de rétention (min)
746,6	18:0-18:1-PE	26,8
760,6	18:0-18:1(Ke)-PE	21,7
762,6	18:0-18:0(Ep)-PE	22,2
778,6	18:0-18:1(OOH)-PE	20,7
605,1	18:0-18:1-OH	33,7

18:0 correspond à l'acide stéarique et 18:1 réfère à l'acide oléique, Ep correspond à un groupement époxy, Ke à un groupement oxo, OH à un groupement hydroxyl et OOH correspond à un groupement hydroperoxyde.

La première partie de ce chapitre a permis de montrer que l'oxydation des PL insaturés conduit, comme pour les autres classes de lipides, à des hydroperoxydes qui sont dégradés en d'autres produits d'oxydation. Les structures qui ont été identifiées ici ont également été retrouvées sur des TG oxydés (35-37;63;122;123;153;154). Etant donné que le traitement thermique est l'une des étapes importantes des procédés de fabrication ou de transformation des aliments, évaluer son impact sur la structure et sur la stabilité des PL est d'un grand intérêt pour les industriels de l'agro-alimentaire mais aussi pour les consommateurs. Connaître le comportement des PL vis-à-vis de l'oxydation est important, mais il faut pouvoir évaluer si un TG pris dans les mêmes conditions sera plus stable ou non, qu'un PL. La deuxième partie de ce chapitre évaluera l'influence du groupement estérifié en position *sn*-3 du glycérol sur la stabilité des AG. Pour cela, on comparera la cinétique de formation des produits d'oxydation d'un même AG (oléique ou linoléique) appartenant soit à un PL, soit à un TG. Deux types de PL, à savoir PC et PE seront étudiés afin d'évaluer l'influence de la tête polaire.

### 3.2 Influence du constituant en position *sn*-3

Dans les systèmes purs, les AG libres s'oxydent moins rapidement que les esters méthyliques d'AG (156). Ce phénomène s'explique par la différence d'environnement de l'acide carboxylique de la molécule. En effet, dans les AG libres, la fonction carboxylique est disponible et permet la décomposition non radicalaire des hydroperoxydes (150). En ce qui concerne les AG portés par les TG, leur oxydation est en général plus rapide que pour les AG libres, mais moins que pour les esters méthyliques d'AG, ceci du fait du manque d'accessibilité des doubles liaisons (150;190). L'alignement des chaînes d'AG est plus irrégulier dans les TG, ce qui limite l'accès des doubles liaisons aux radicaux. Peu d'informations sont disponibles quant à l'oxydabilité relative des PL par rapport aux TG. Dans cette partie, nous allons comparer les cinétiques de formation des produits d'oxydation de ces molécules, ainsi que les cinétiques de dégradation des produits de départ, afin d'évaluer leur stabilité.

Les structures des TG oxydés sont connues car elles ont fait l'objet de nombreux travaux, contrairement aux PL. Dans cette étude, l'identification des produits oxydés issus des TG a été effectuée de la même façon que celle des PL, mais ne sera pas détaillée ici. Seules les courbes de stabilité seront présentées, puis comparées à celles des PL étudiées, dans la partie suivante. Afin de pouvoir comparer la stabilité d'une espèce par rapport à l'autre, chaque TG choisi a été oxydé à la même température que le PL correspondant.

#### 3.2.1 Cinétiques d'oxydation des triglycérides

Il est important de préciser que les cinétiques concernant les produits d'oxydation ne permettent pas de comparer quantitativement deux produits entre eux. La détection par spectrométrie de masse donne des réponses très différentes d'une molécule à l'autre, en fonction de leur capacité à s'ioniser. Il n'est donc pas possible de déterminer la molécule la plus abondante uniquement avec les surfaces des pics. Le tracé des courbes cinétiques permet toutefois d'évaluer la concentration d'une espèce en fonction du temps et donc la stabilité de chaque produit d'oxydation vis-à-vis du traitement thermique.

## 3.2.1.1 SOS et ses oxydes

La dégradation de SOS et la formation des ses oxydes à 150°C ont été suivies au cours du temps entre 0 et 120 min. La surface du pic de SOS reste stable jusqu'à 30 min d'oxydation, puis diminue rapidement jusqu'à quasiment disparaître à 120 min d'oxydation (Figure 45a).

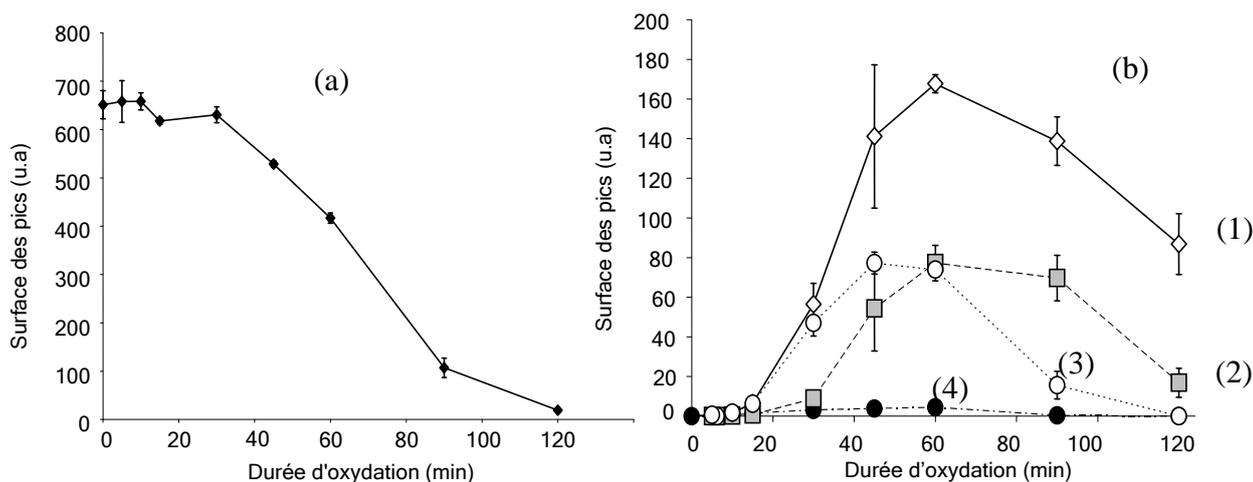
Les produits d'oxydation de SOS identifiés sont au nombre de quatre. Les structures de ces produits d'oxydation sont 18:0-18:0(Ep)-18:0, 18:0-18:1(Ke)-18:0, 18:0-18:1(OOH)-18:0 et 18:0-18:1(Ep)-18:0 (Tableau 16).

**Tableau 16** : Structures des produits obtenus après l'oxydation de SOS

$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Structures identifiées	Temps de rétention (min)
889,8	18:0-18:1-18:0	53,8
903,8	18:0-18:1(Ep)-18:0	45,1
903,8	18:0-18:1(Ke)-18:0	46,2
905,8	18:0-18:0(Ep)-18:0	48,8
921,8	18:0-18:1(OOH)-18:0	44,2

18:0 correspond à l'acide stéarique et 18:1 réfère à l'acide oléique, Ep correspond à un groupement époxy, Ke à un groupement oxo, OH à un groupement hydroxyl et OOH correspond à un groupement hydroperoxyde.

Leur cinétique de formation a été suivie. Les produits d'oxydation de SOS commencent à apparaître dès 15 min et ils atteignent tous leur maximum entre 45 et 60 min (Figure 45b). L'oléate-hydroperoxyde (18:0-18:1(OOH)-18:0) atteint son maximum pour une durée d'oxydation de 45 min, puis la surface du pic correspondant diminue jusqu'à disparaître au bout de 120 min d'oxydation. Il faut également noter qu'au bout des 120 min d'oxydation, 18:0-18:1(Ep)-18:0 a quasiment disparu.



**Figure 45** : Evolution : (a) de la surface du pic de SOS en fonction de la durée d'oxydation à 150°C, (b) des surfaces des pics des produits d'oxydation formés à 150°C. (1) 18:0-18:0(Ep)-18:0, (2) 18:0-18:1(Ke)-18:0, (3) 18:0-18:1(OOH)-18:0, (4) 18:0-18:1(Ep)-18:0

### 3.2.1.2 SLS et ses oxydes

La dégradation de SLS et la formation des ses oxydes à 125°C ont été suivies au cours du temps entre 0 et 120 min. Contrairement à SOS, aucune période d'induction n'est visible au niveau de la décroissance de la surface du pic de SLS (Figure 46a). En effet, la diminution est immédiate et très rapide. Il est important de noter qu'après 90 min d'oxydation à 125°C, la surface du pic correspondant à SLS est quasi nulle.

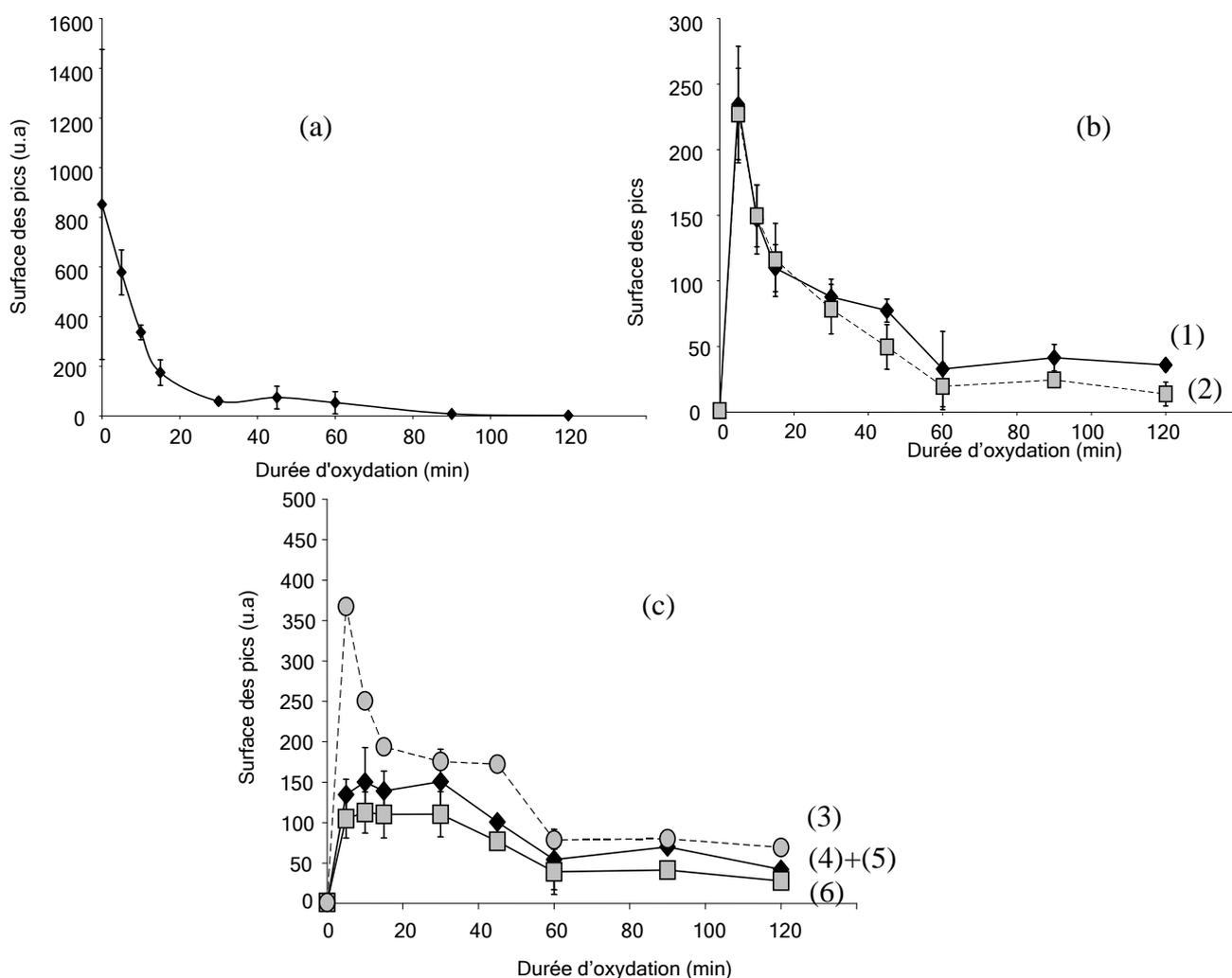
Comme pour les oxydes de SLPC, deux groupes de produits de dégradation ont pu être identifiés (Tableau 17).

**Tableau 17** : Structures des produits obtenus après l'oxydation de SLS

$m/z$ $[M+H]^+$	Structures identifiées	Temps de rétention (min)
887,8	18:0-18:2-18:0	54,1
901,8	18:0-18:2(Ep)-18:0	48,9
901,8	18:0-18:2(Ke)-18:0	48,9
903,8	18:0-18:1(Ep)-18:0	48,5
917,8	18:0-18:1(Ep,Ke)-18:0	44,6
919,8	18:0-18:2(OOH)-18:0	44,9
935,8	18:0-18:1(Ep,OOH)-18:0	42,6

18:0 correspond à l'acide stéarique, 18:1 réfère à l'acide oléique et 18:2 correspond à l'acide linoléique, Ep correspond à un groupement époxy, Ke à un groupement oxo, OH à un groupement hydroxyl et OOH correspond à un groupement hydroperoxyde

Le premier groupe comprend les produits d'oxydation portant un groupement hydroperoxyde : 18:0-18:2(OOH)-18:0 et 18:0-18:1(Ep, OOH)-18:0. Les surfaces des pics correspondant à ces deux composés atteignent un maximum après 5 min d'oxydation, puis diminuent jusqu'à 60 min avant de se stabiliser à de très faibles quantités (Figure 46b). Le deuxième groupe compte quatre produits d'oxydation : 18:0-18:2(Ep)-18:0, 18:0-18:2(Ke)-18:0, 18:0-18:1(Ep, Ke)-18:0, 18:0-18:1(Ep)-18:0. 18:0-18:1(Ep, Ke)-18:0 atteint son maximum à 5 min d'oxydation à 125°C, puis diminue jusqu'à 120 min. Les trois autres produits de dégradation (18:0-18:1(Ep)-18:0, 18:0-18:2(Ep)-18:0 et 18:0-18:2(Ke)-18:0) atteignent leur maximum entre 5 et 30 min, puis diminuent jusqu'à atteindre un palier à partir de 60 min.



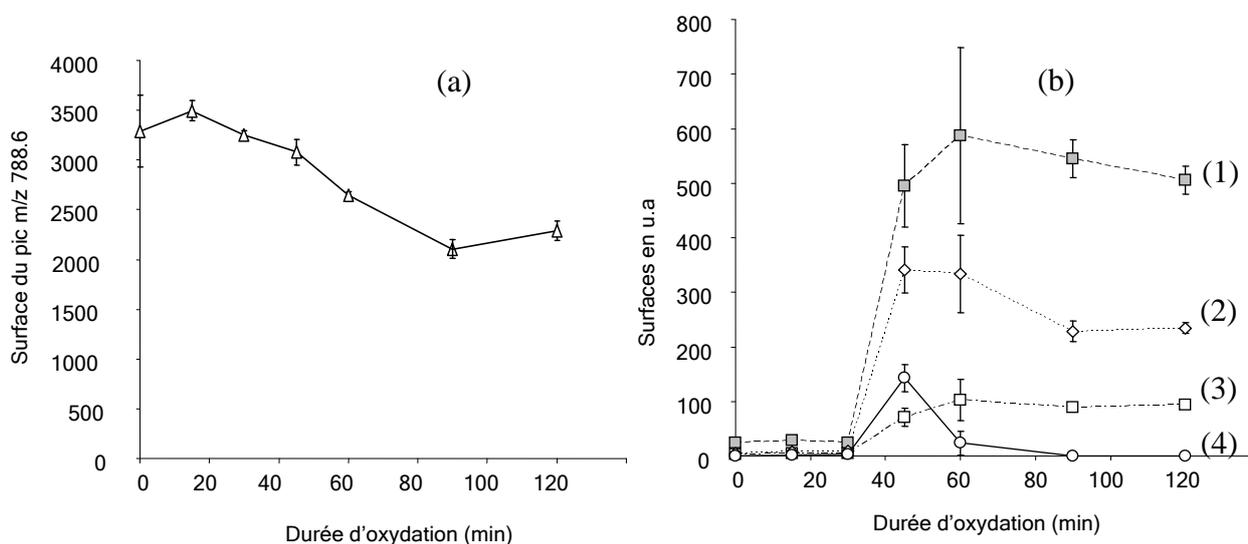
**Figure 46 :** Evolution : (a) de la surface du pic de SLS en fonction de la durée d'oxydation à 125°C, (b) et (c) des surfaces des pics des produits d'oxydation formés à 125°C. (1) 18:0-18:2 (OOH)-18:0, (2) 18:0-18:1 (Ep, OOH)-18:0, (3) 18:0-18:1 (Ep, Ke)- 18:0, (4) 18:0-18:2 (Ep)-18:0, (5) 18:0-18:2 (Ke)-18:0, (6) 18:0-18:1 (Ep)-18:0

Il semble important de préciser ici, que l'étude de la formation des produits de dégradation de SLS permet d'affirmer avec certitude que la température utilisée pour l'oxydation de cette molécule est trop élevée. En effet, à cette température, la période d'induction est très courte, voire inexistante. Pour obtenir des courbes cinétiques plus exploitables, il aurait certainement fallu oxyder SLS à une température plus faible. Cependant, l'objectif de ce chapitre étant de mettre en évidence les différences de stabilité entre les TG et les PL, il nous fallait travailler à des températures identiques afin de pouvoir comparer les résultats.

### 3.2.2 Cinétiques d'oxydation des phosphatidylcholines

#### 3.2.2.1 SOPC et ses oxydes

La dégradation de SOPC et la formation de ses produits d'oxydation à 150°C ont été suivies au cours du temps, de 0 à 120 min d'oxydation. Le comportement des produits de dégradation au cours du temps permet d'obtenir des informations sur leur stabilité, ce qui est une indication supplémentaire pour confirmer leurs structures. La surface du pic de SOPC diminue graduellement entre 30 et 90 min, puis semble se stabiliser (Figure 47a).



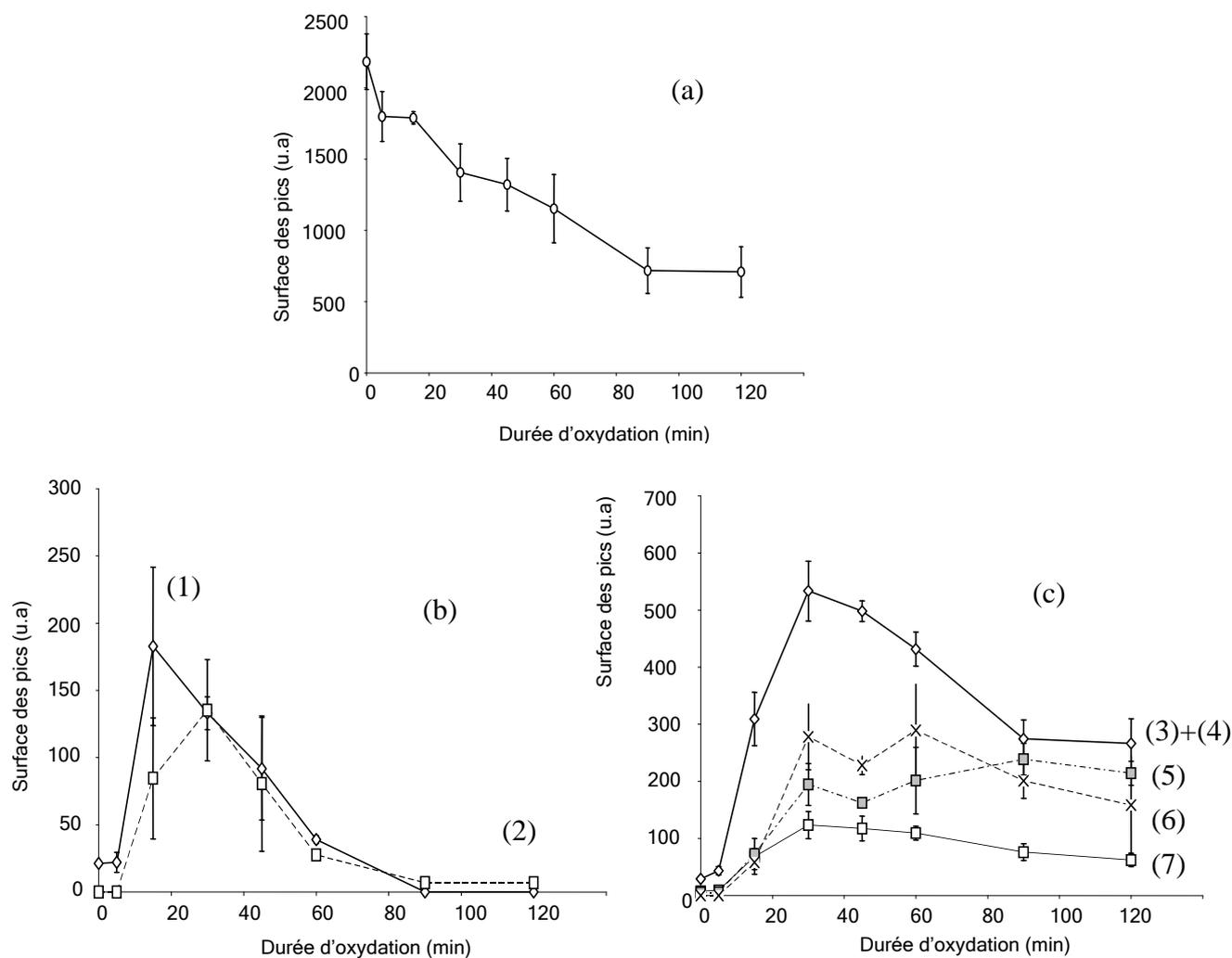
**Figure 47** : Evolution : (a) de la surface du pic de SOPC en fonction de la durée d'oxydation à 150°C, (b) des surfaces des pics des produits d'oxydation formés à 150°C. (1) : 18:0-18:1(Ep)-PC ; (2) : 18:0-18:1(Ke)-PC, (3) 18:0-18:1(OH)-PC et (4) 18:0-18:1(OOH)-PC

Le comportement des produits de dégradation au cours du temps permet d'obtenir des informations sur leur stabilité. Pour certains oxydes, notamment les hydroperoxydes, l'instabilité des molécules peut être une indication supplémentaire pour confirmer leurs structures. Les produits d'oxydation ne sont détectés qu'à partir de 30 min d'oxydation. Il paraît important de signaler que c'est l'ion de  $m/z$  820,6 (18:0-18:1(OOH)-PC) qui atteint le premier son maximum, avant de décroître et de disparaître totalement à 90 min. Ce comportement vis-à-vis de l'oxydation (Figure 47b) confirme sa structure d'hydroperoxyde. L'ion de  $m/z$  802,6 (18:0-18:1(Ke)-PC) atteint un maximum après 45 min d'oxydation, avant de décroître et de se stabiliser à partir de 90 min. Les produits relatifs à l'ion de  $m/z$  804,6 (18:0-18:1(OH)-PC et 18:0-18:0(Ep)-PC) atteignent leur maximum après 60 min d'oxydation et se stabilisent à partir de 90 min (Figure 47b). Ces courbes montrent que les produits d'oxydation dont la formation au cours du temps a été suivie sont stables, mis à part l'hydroperoxyde, ce qui est bien connu dans le mécanisme d'oxydation. Il faut toutefois noter que certains composés formés, comme les composés carbonylés tels que 18:0-18:1(Ke)-PC, sont très réactifs en présence d'amines libres. Dans les matrices alimentaires, ce type de composés réagit très certainement avec les protéines pour former d'autres produits de dégradation comme les imines (62) dans les réactions de Maillard. Ces produits ne resteront donc pas intacts dans la matrice alimentaire et il sera sans doute difficile de pouvoir les détecter. Cependant, d'autres produits comme 18:0-18:1(OH)-PC, sont moins réactifs que les dérivés carbonylés et seront donc plus facilement détectables dans les matrices alimentaires enrichies en PL.

#### 3.2.2.2 SLPC et ses oxydes

La dégradation de SLPC et la formation de ses oxydes à 125°C ont été suivies au cours du temps, entre 0 et 120 min. Les courbes obtenues sont présentées dans la Figure 48. La Figure 48a montre l'évolution de la surface du pic de SLPC en fonction de la durée d'oxydation à 125°C. SLPC diminue de façon assez brutale dès le début de l'oxydation et ne se stabilise pas avant 90 min. La décroissance de SLPC est plus importante que celle de SOPC pour des durées d'oxydation identiques (Figure 47a et 48a). Comme montré précédemment, ce résultat est tout à fait en accord avec le fait que SLPC est plus sensible à l'oxydation que SOPC.

En ce qui concerne la formation des produits d'oxydation issus de SLPC, deux groupes de produits ont pu être identifiés. Le premier de ces deux groupes inclut les produits de dégradation qui atteignent rapidement un maximum, avant de décroître et de disparaître complètement (Figure 48b), alors que le second groupe comprend des produits plus stables qui ne disparaissent pas au bout de 120 min d'oxydation (Figure 48c).



**Figure 48** : Evolution : (a) de la surface du pic de SLPC en fonction de la durée d'oxydation à 125°C, (b) et (c) des surfaces des pics des produits d'oxydation formés à 125°C. (b) : 1 : 18:0-18:2(OOH)-PC ; 2 : 18:0-18:1(Ep, OOH)-PC. (c) : 3 : 18:0-18:2(Ke)-PC, (4) 18:0-18:2(Ep)-PC, (5) 18:0-18:1(Ep)-PC, (6) 18:0-18:2(OH)-PC, (7) 18:0-18:1(Ep, Ke)-PC

Le premier groupe comprend les produits détectés avec les ions de  $m/z$  818,6 et  $m/z$  834,6. Le pic correspondant à l'ion de  $m/z$  818,6 atteint un maximum au bout de 15 min, puis

la surface du pic commence à décroître jusqu'à devenir nulle au bout de 90 min (Figure 48b). Ce phénomène déjà observé pour SOPC s'explique par le fait que ce pic correspond à un hydroperoxyde : 18:0-18:2(OOH)-PC. La surface du pic correspondant à  $m/z$  834,6 atteint un maximum après 30 min d'oxydation, puis décroît jusqu'à 90 min avant de quasiment disparaître (Figure 48b). L'allure de la courbe est très similaire à celle de  $m/z$  818,6 ce qui suggère que cette molécule porte aussi un groupement hydroperoxyde, ce qui est en accord avec la structure déterminée plus haut : 18:0-18:1(Ep, OOH)-PC.

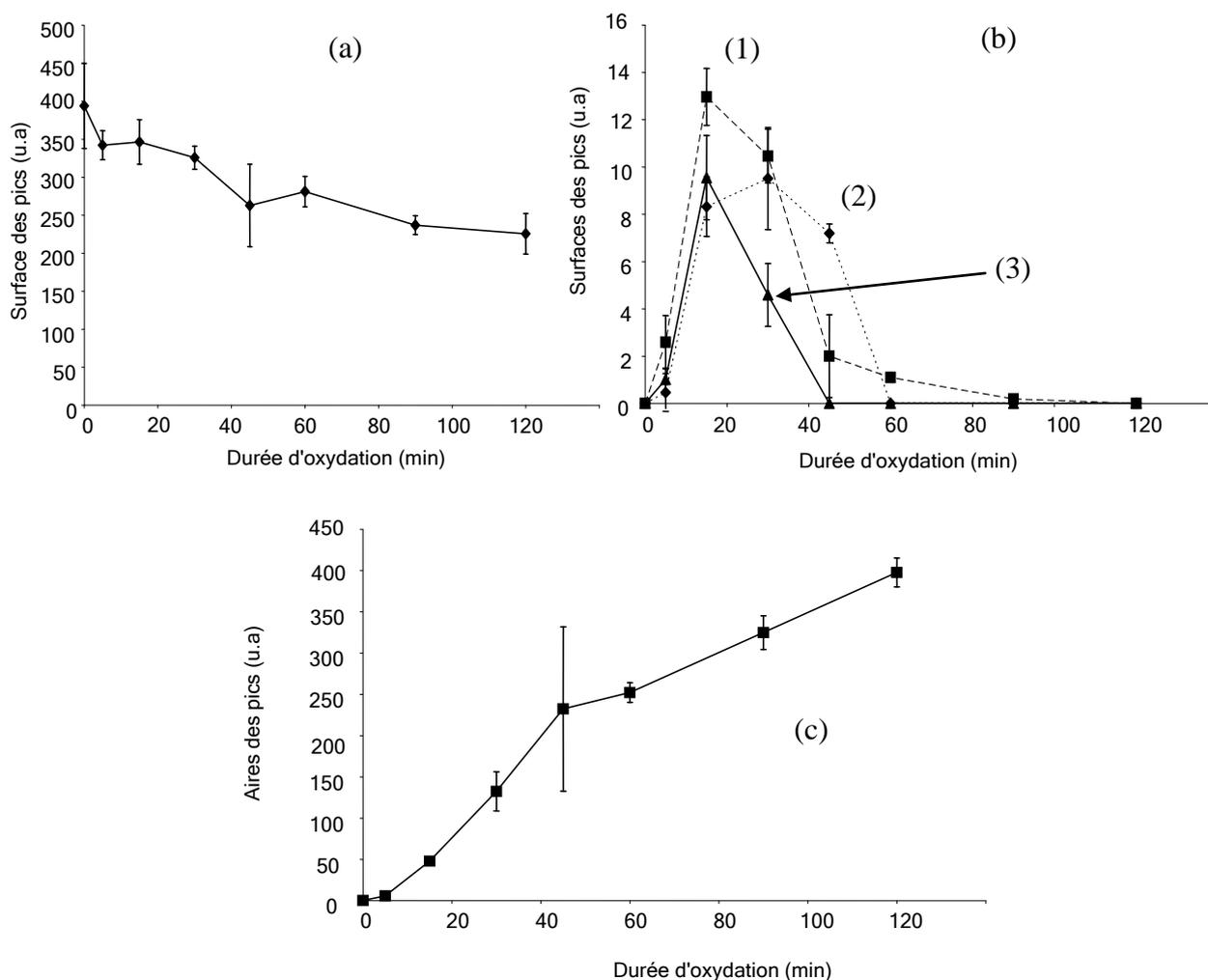
Le second groupe comprend les produits de dégradation  $m/z$  816,6 ;  $m/z$  802,6 et  $m/z$  800,6 (Figure 48c). Ces produits d'oxydation de SLPC se comportent de la même façon que les produits de dégradation de SOPC : chaque produit atteint un maximum après 30 min d'oxydation, puis diminue et se stabilise. Comme pour SOPC, les produits de ce groupe sont relativement stables une fois formés. Certains d'entre eux pourraient être retrouvés dans les aliments enrichis en SOPC ou SLPC, mais comme expliqué précédemment, les produits d'oxydation portant un dérivé carbonyle comme 18:0-18:2(Ke)-PC ou 18:0-18:1(Ep, Ke)-PC pourront réagir avec des dérivés aminés dans le cadre de la réaction de Maillard (62). Ces produits seront donc difficiles à retrouver dans les matrices alimentaires.

### 3.2.3 Cinétique d'oxydation de SOPE

Afin de pouvoir bien évaluer l'influence du groupement estérifié en position *sn*-3 du glycérol, nous avons étudié la cinétique de dégradation de la molécule SOPE et la cinétique de formation des produits de dégradation formés lors de l'oxydation. Comme cette molécule porte une seule insaturation, les études cinétiques ont été effectuées à 150°C entre 0 et 120 min, afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus pour SOPC et SOS.

Les courbes cinétiques relatives à chaque produit identifié ont pu être tracées (Figure 49b). L'évolution de la surface des deux pics de DG a également été suivie (Figure 49c). 18:0-18:1(OOH)-PE apparaît à partir de 5 min d'oxydation, atteint un maximum après 15 min, puis disparaît après 45 min d'oxydation. Ce comportement est cohérent avec la structure identifiée. 18:0-18:1(Ke)-PE apparaît aussi après 5 min d'oxydation, puis décroît jusqu'à quasiment disparaître après 120 min d'oxydation. Enfin, 18:0-18:0(Ep)-PE apparaît aussi à partir de 5 min et atteint son maximum entre 15 et 30 min avant de disparaître totalement

après 60 min d'oxydation (Figure 49b). En ce qui concerne le DG, sa formation est constante au cours de l'oxydation : la courbe obtenue est quasiment linéaire (Figure 49c).



**Figure 49** : Evolution : (a) de la surface du pic de SOPE en fonction de la durée d'oxydation à 150°C, (b) des surfaces des pics des produits d'oxydation formés à 150°C. (1) : 18:0-18:1(Ke)-PE ; (2) 18:0-18:0(Ep)-PE ; (3) 18:0-18:1(OOH)-PE, (c) de la somme des surfaces des pics de DG (18:0-18:1-OH)

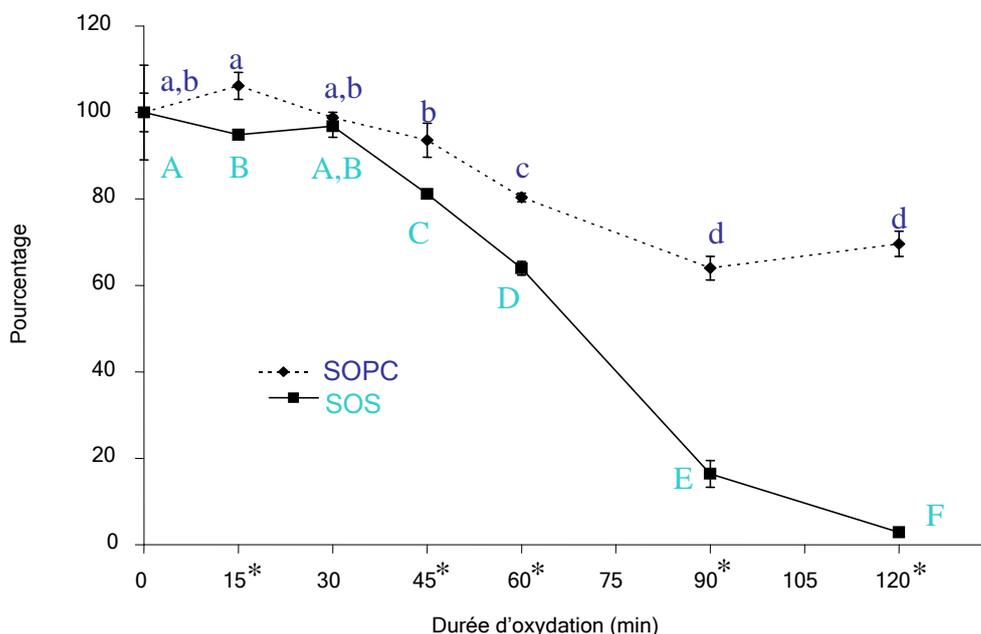
### 3.2.4 Exploitation des résultats

Afin de comparer la stabilité des AG liés à des PL et des TG, nous avons considéré les résultats obtenus pour la cinétique de dégradation du produit de départ.

## 3.2.4.1 Influence de la présence d'une tête polaire

- Comparaison SOPC/SOS

Les pourcentages restants de chaque produit de départ (SOPC ou SOS) ont été calculés et comparés avec un test statistique (one-way ANOVA) pour chaque durée d'oxydation (Figure 50). Les courbes cinétiques ont été comparées et durant les 30 premières minutes d'oxydation, aucune différence significative n'a pu être observée, ni pour SOS, ni pour SOPC à des durées d'oxydation différentes, ni entre SOS et SOPC à une durée d'oxydation donnée. Cette durée correspond donc à la période d'induction nécessaire au déclenchement du phénomène oxydatif à 150°C. A partir de 45 min d'oxydation, pour toutes les durées d'oxydation étudiées, les pourcentages restants de SOPC et SOS sont toujours significativement différents. SOS suit une décroissance régulière jusqu'à ce qu'il disparaisse quasiment à 120 min d'oxydation (2,9% restants), alors que la diminution de SOPC s'effectue entre 30 et 90 min, puis atteint un palier où il se stabilise pour atteindre 70% de produit de départ à 120 min d'oxydation (Figure 50).

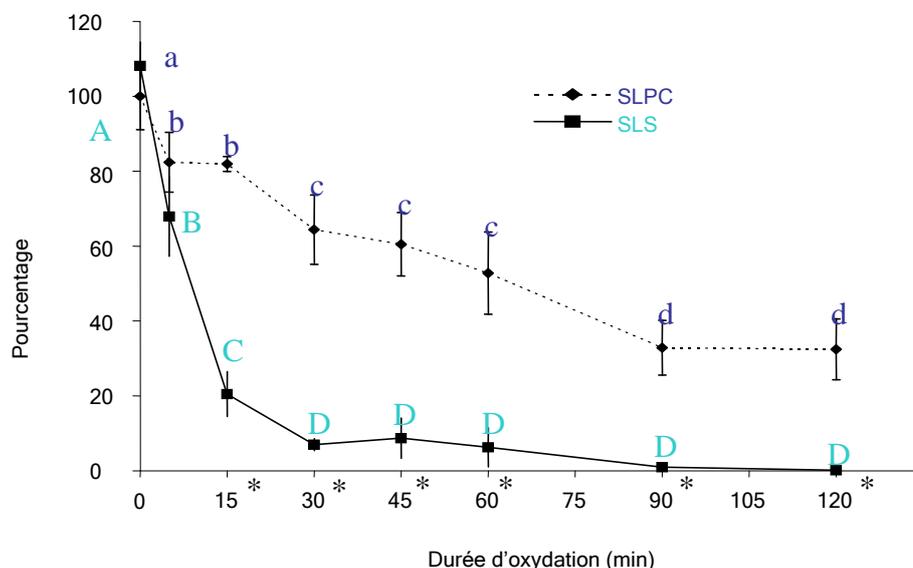


**Figure 50 :** Pourcentage de produit de départ restant après chauffage à 150°C. Trois répétitions de chaque échantillon ont été analysées. Les résultats sont donnés sous la forme (moyenne  $\pm$  écart-type). Pour SOPC, les moyennes données avec des lettres différentes (de a à d) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Pour SOS, les moyennes données avec des lettres différentes (de A à F) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ). \* indique que les pourcentages restants pour SOPC et SOS sont significativement différents ( $P < 0,05$ ) l'un de l'autre pour la durée d'oxydation considérée.

La comparaison des pourcentages restants à chaque durée d'oxydation permet de montrer que SOPC semble être une molécule plus stable que SOS. En comparant les résultats obtenus avec SLS et SLPC, nous verrons si cette tendance se confirme avec des molécules présentant deux doubles liaisons.

- Comparaison SLPC/SLS

Les cinétiques de décroissance de SLPC et SLS ont été comparées (Figure 51). Il apparaît très clairement sur cette figure que SLS décroît de façon significative dès les cinq premières minutes d'oxydation et ce phénomène se poursuit tout au long de la durée d'oxydation alors que pour SLPC, la décroissance est beaucoup moins rapide et les différences moins prononcées. En ce qui concerne SLS, aucune période d'induction n'est observée. Les résultats obtenus montrent aussi qu'au bout de 120 min d'oxydation, SLS a totalement disparu (moins de 1%), alors que 33% de SLPC sont encore présents par rapport au début de la cinétique d'oxydation.



**Figure 51 :** Pourcentage de produit de départ restant après chauffage à 125°C. Trois répétitions de chaque échantillon ont été analysées. Les résultats sont donnés sous la forme (moyenne  $\pm$  écart-type). Pour SLPC, les moyennes données avec des lettres différentes (de a à d) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Pour SLS, les moyennes données avec des lettres différentes (de A à D) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ). \* indique que les pourcentages restants pour SLPC et SLS sont significativement différents ( $P < 0,05$ ) l'un de l'autre pour la durée d'oxydation considérée.

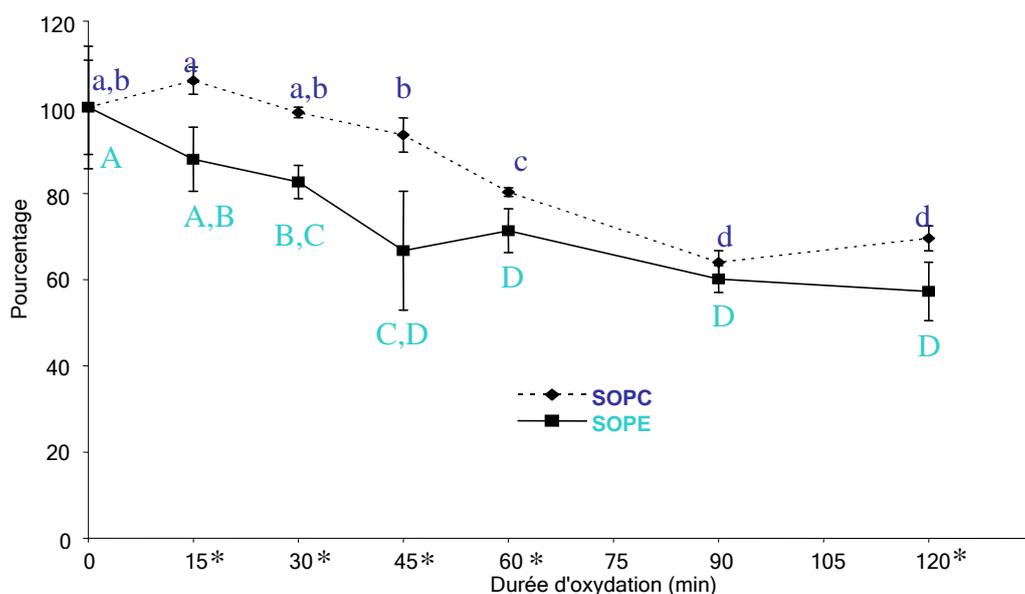
Comme pour les molécules monoinsaturées, les AG de PC semblent plus stables à l'oxydation que lorsqu'ils sont sous forme de TG. En effet, le pourcentage de perte du produit

de départ et la rapidité de dégradation sont beaucoup moins importants pour les PC que pour les TG.

Le but de cette partie était de comparer la stabilité des AG de différentes espèces de PC ou de TG vis-à-vis de l'oxydation thermique, et de cette façon d'obtenir des informations supplémentaires concernant l'intérêt de supplémenter des aliments en PL plutôt qu'en TG. Les deux structures étudiées sont relativement proches, étant donné que seul le groupement estérifié en position *sn*-3 du glycérol diffère entre les deux classes de molécules. PC contient un ester phosphorique contenant un groupement choline, alors que les TG contiennent un AG, saturé dans notre cas, pour éviter toute oxydation en position *sn*-3. Les résultats présentés ici démontrent clairement que les PC sont plus stables que les TG, et cette stabilité est donc directement reliée à la présence de la tête polaire.

#### 3.2.4.2 Influence de la nature de la tête polaire

Afin d'aller plus loin dans le raisonnement, nous avons évalué la stabilité d'un autre PL avec une tête polaire différente pour voir l'influence de la seule tête polaire sur la cinétique d'oxydation des AG. La courbe de décroissance de SOPE a été comparée à celle de SOPC afin de déterminer laquelle de ces deux classes de PL est la plus résistante au processus oxydatif. Les résultats sont donnés dans la Figure 52.



**Figure 52 :** Pourcentage de produit de départ restant (SOPE ou SOPC) après chauffage à 150°C. Trois répétitions de chaque échantillon ont été analysées. Les résultats sont donnés sous la forme (moyenne  $\pm$  écart-type). Pour SOPC, les moyennes données avec des lettres différentes (de a à d) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ). Pour SOPE, les moyennes données avec des lettres différentes (de A à D) sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ). \* indique que les pourcentages restants pour SOPC et SOPE sont significativement différents ( $P < 0,05$ ) l'un de l'autre pour la durée d'oxydation considérée.

En ce qui concerne la décroissance de SOPE, elle semble linéaire au cours du temps. On peut remarquer qu'à partir de 60 min d'oxydation, le pourcentage de SOPE restant ne varie plus statistiquement et reste aux alentours de 60%. En ce qui concerne les différences entre SOPE et SOPC, des différences significatives au niveau du pourcentage restant apparaissent déjà à partir de 15 min d'oxydation et ce jusqu'à 90 min, durée d'oxydation au-delà de laquelle, les pourcentages respectifs de SOPE et SOPC ne sont plus significativement différents.

Au vu des résultats présentés dans cette partie, SOPC apparaît comme étant une molécule plus stable que SOPE. Ces résultats sont en accord avec l'étude présentée par Yin *et al* (191), où les PL avec différentes têtes polaires sont mis en présence de myoglobine pour mimer l'environnement des PL des viandes rouges. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que PC est plus stable que PE dans les conditions oxydantes utilisées dans l'étude (pH variable, température variable) (191). Une autre étude avec l'hémoglobine au lieu de la myoglobine donne les mêmes résultats (165). Enfin, la même tendance a été mise en évidence

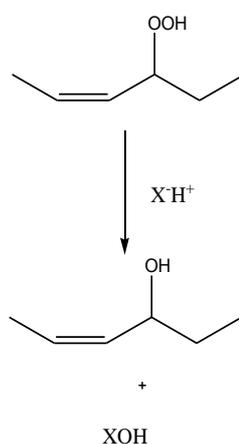
par une autre étude, en montrant que des liposomes constitués de (18:3-18:3)-PC sont plus stables vis-à-vis de l'oxydation catalysée par des métaux que ceux constitués de (18:3-18:3)-PE (181).

Très peu de travaux ont étudié la stabilité relative des PL par rapport aux TG correspondants, et aucune étude n'a porté sur l'oxydation de substances pures. La plupart des études menées sur la stabilité des PL l'a été dans des huiles et a évalué l'influence des PL sur l'oxydation des AG liés aux TG. Par exemple, Song *et al.* ont comparé la stabilité relative du DHA dans des huiles en fonction de la structure chimique dans laquelle il se trouve estérifié (ester éthylique de DHA, TG ou PL) (158). Ils ont clairement démontré que la forme de DHA la plus résistante à l'oxydation est la forme PL. Des résultats similaires ont été obtenus par Lyberg *et al.* (108). Takeuchi *et al.*, quant à eux, ont montré que dans des huiles contenant des AGPI, la fraction PL est plus stable que la fraction TG (166). Ils ont montré que la formation des hydroperoxydes est moins importante dans une huile contenant des PL, que dans des huiles hautement purifiées ne contenant pas de PL. Les résultats obtenus par Moriya *et al.* suivent la même tendance, à savoir qu'entre des huiles contenant différents pourcentages de PL, ce sont les plus riches en PL qui sont les plus stables vis-à-vis du processus oxydatif (120). Les résultats présentés dans ces études, bien qu'obtenus dans des huiles et non pas avec des substances pures sont en accord avec ceux obtenus dans notre étude, dans le sens où les AG des PC sont plus stables que ceux de leurs homologues TG ce qui montre bien l'influence de la nature du constituant estérifié en position *sn*-3 du glycérol. L'implication directe de l'amine quaternaire dans l'activité anti-oxydante de PC a déjà été évoquée à plusieurs reprises (62;124).

La stabilité de chaque produit de départ a été évaluée et les PL sont plus stables que les TG vis-à-vis de l'oxydation. Cet aspect est mis en évidence par le fait qu'à la fin de la période d'oxydation choisie (120 min), il reste toujours un pourcentage relativement important de PL alors qu'il ne reste quasiment plus de TG. Il semblerait donc qu'à un moment donné, le processus d'oxydation soit « bloqué » (probablement au niveau de la tête polaire) et empêche la formation de nouveaux produits d'oxydation. En ce qui concerne les produits de dégradation, le tracé des courbes cinétiques (Figure 45, Figure 46, Figure 47 et Figure 48) permet de montrer que les produits d'oxydation des PC sont également plus stables que les produits d'oxydation des TG. Ceci peut s'expliquer par le fait que la tête polaire étant toujours

présente sur les oxydes de PC identifiés, elle peut encore jouer son rôle protecteur vis-à-vis de l'oxydation et inhiber la décomposition des oxydes formés.

Le mécanisme mis en jeu dans cet effet stabilisateur n'est pas bien connu, mais il est supposé comme impliquant une dégradation non-radicalaire. Bien que peu d'explications aient été avancées pour expliquer ce qui se cache derrière cette propriété, deux hypothèses ont été avancées. La première suppose que cet effet vient de la capacité du groupement aminé à décomposer les hydroperoxydes de façon non radicalaire (Figure 53), ce qui entraîne la destruction de radicaux libres et de cette façon limite la phase de propagation du processus oxydatif (150). Cette hypothèse paraît plus probable pour les PE que pour les PC, du fait de la présence de l'amine secondaire qui peut céder un de ses atomes d'hydrogène.



**Figure 53** : Décomposition non-radicalaire des hydroperoxydes par un groupement nucléophile.  $X-H^+$  représente par exemple l'atome d'azote dans PE ou PC.

Une autre hypothèse a été avancée, qui s'appliquerait à PC. Elle est basée sur les travaux de Yoshimoto *et al.* qui ont étudié l'influence des PC sur la décomposition du peroxyde d'hydrogène (193). Cette fois, c'est le groupement phosphate qui est mis en jeu et non plus la partie aminée de la tête polaire. Le mécanisme de décomposition proposé est non-radicalaire et se base sur la polarisation de la liaison O-O au sein du peroxyde, ce qui permet une attaque nucléophile d'un oxygène d'un autre groupement peroxyde (Figure 54) et la formation d'eau et d'oxygène.

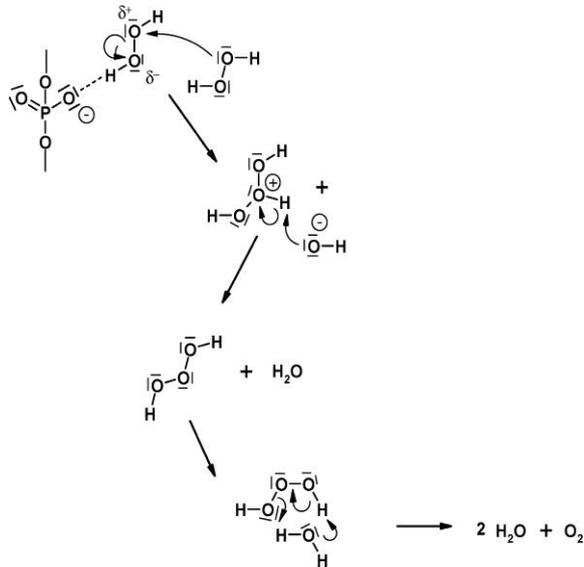


Figure 54 : Mécanisme proposé par Yoshimoto *et al* pour la décomposition non radicalaire du peroxyde d'hydrogène par les PC (193)

Il est donc évident que le ou les mécanismes impliqués dans l'effet stabilisateur des PL par rapport aux TG est loin d'être élucidé. La seule chose qui paraît évidente est le rôle que joue la tête polaire dans cet effet stabilisateur, mais il reste beaucoup à faire pour en comprendre le mécanisme exact.

## 4. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de mettre en évidence les différences de stabilité vis-à-vis de l'oxydation thermique entre deux types de glycérolipides, les PL et les TG. Pour ce faire, il a d'abord fallu identifier les produits d'oxydation des PL étudiés. La nature de ces produits d'oxydation (époxy, oxo, hydroxyle ou hydroperoxydes) est similaire à ceux identifiés par d'autres auteurs sur les AG libres ou ceux présents dans les TG. Une fois ces produits identifiés, leurs cinétiques de formation ont été déterminées afin d'évaluer la facilité avec laquelle ils se forment dans les conditions d'oxydation choisies (150°C pour les espèces mono-insaturées et 125°C pour les espèces di-insaturées). Cette première étape a également permis d'évaluer la stabilité des produits d'oxydation formés au cours du temps. Il est apparu que les produits formés lors du processus d'oxydation sont globalement stables, ce qui permet d'affirmer que certains d'entre eux pourront être retrouvés dans les matrices alimentaires. Tous les résultats obtenus dans ce chapitre ont permis d'effectuer une comparaison de la stabilité entre les PL (PC et PE) et les TG. Il est apparu clairement que les AG des PL (quelle que soit leur tête polaire) sont plus stables vis-à-vis de l'oxydation thermique que leurs homologues des TG. Cette tendance est également vraie pour leurs produits d'oxydation respectifs. Une précision supplémentaire a pu être apportée. Un classement a pu être établi donnant les stabilités dans l'ordre décroissant PC > PE > TG, en étudiant la stabilité de SOPC, SOPE et SOS. Ces résultats permettent de montrer que les PL en plus d'être plus intéressants au niveau nutritionnel, sont également plus stables que les TG correspondants ce qui apporte un argument favorable de plus pour la supplémentation alimentaire en AGPI par les PL.

Bien que les mécanismes soient loin d'être élucidés, la plus grande stabilité des PL vient incontestablement de la présence de leur tête polaire. Afin d'avoir plus d'informations pour évaluer la réelle influence de la nature de cette tête polaire, d'autres études devront être menées avec d'autres classes de PL, comme par exemple la PS ou le PI qui présentent de plus grandes différences que PE et PC entre elles. La collecte de ces différents résultats permettrait sans doute d'apporter de nouvelles informations et pourquoi pas un début d'explication ou de mécanisme. Il serait aussi intéressant de travailler avec des molécules présentant des AG comptant plus d'insaturations, comme l'acide  $\alpha$ -linoléique ou encore le DHA, qui sont des AG très intéressants d'un point de vue nutritionnel.



# Publication 2

---



## Analytical Methods

# Identification and kinetics of oxidized compounds from phosphatidylcholine molecular species

Julie Le Grandois<sup>a</sup>, Eric Marchioni<sup>a,\*</sup>, Saïd Ennahar<sup>a</sup>, Francesca Giuffrida<sup>b</sup>, Françoise Bindler<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie Analytique et Sciences des Aliments, IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS, 74, route du Rhin, 67400 Illkirch, France

<sup>b</sup>Nestlé Research Center, Nestec Ltd., P.O. Box 44, CH-1000 Lausanne 26, Switzerland

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 5 August 2008

Received in revised form 24 August 2009

Accepted 29 August 2009

## Keywords:

Phosphatidylcholine

Heat treatment

Oxidation

Kinetics

Analytical chemistry

HPLC-ESI-MS

## ABSTRACT

Heat-induced oxidative modifications of two phosphatidylcholine molecular species as potential functional food components were evaluated. 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (SOPC) and 1-stearoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (SLPC) were chosen as models. The optimal temperature for hydroperoxide formation was determined by MS for each standard: 125 °C for SLPC and 150 °C for SOPC. Oxidation was performed at these temperatures and degradation products were identified using LC-ESI-MS combined to an acid treatment. Kinetics of formation of oxidation products from SOPC and SLPC were monitored over 120 min and curves were drawn for each identified structure. Results showed that native phospholipids rapidly decreased with heat and that oxidation products showed functions, such as hydroxyl, oxo or epoxy groups. Kinetics pointed out that some of these quite stable oxidation products are likely to be found in sizable amounts in processed foods containing phospholipids.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Soy lecithin, that consists primarily of phospholipids (PL), is widely used in the food industry. The amphiphilic properties of PL make lecithin a good emulsifying and smoothing agent in chocolate, margarines, mayonnaise and instant products (Lin & Blank, 2003; Ulkowski, Musialik, & Litwinienko, 2005). Three main classes of PL were identified in soy lecithin: phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylinositol (PI). In addition to their technological properties, PL, especially PC, are of great nutritional interest: soy PL are rich in essential fatty acids (FA) such as linoleic and alpha-linolenic acids (Wang, Hammond, Cornette, & Fehr, 1999; Wang, Hammond, & Fehr, 1997) and in choline, a constitutive part of one of the polar heads, which is known to be essential for the synthesis of the neurotransmitter acetylcholine or for protecting liver (Shahidi, 2006). As far as assimilation of nutrients is concerned, several studies (Amate, Gil, & Ramirez, 2001; Lemaitre-Delaunay et al., 1999; Wijendran et al., 2002) showed that PC is a better carrier of polyunsaturated fatty acids (PUFA) than triacylglycerols (TAG). Cellular permeability to PUFA and their intracellular level were indeed much higher when linked to PL than to TAG, which suggests that food supplementation with PUFA-rich PL could enhance essential FA assimila-

tion and could help the consumers achieve the daily recommended intake of lecithin (Chanussot, 2008; Shahidi, 2006).

Food supplementation with lecithin or PL-PUFA rises however the question of their stability during processing, storage and cooking. Minor quantities of PL added to oils are known to improve stability against oxidation (Koprivnjak et al., 2008; Nwosu, Boyd, & Sheldon, 1997; Sugino et al., 1997), but very few information is available on changes in PL structures when added as antioxidants. It is however known that the most common change in lipid structure is oxidation, which is often caused by heat treatment, the most widely used unit operation during food processing and preparation. Lipid oxidation starts with the formation of hydroperoxides, defined as primary oxidation products, followed by further oxidative changes of the alkyl chains of fatty acids (Frankel, 2005). Other downstream changes result in the formation of dimeric compounds or in degradation products (volatiles). Few studies were however conducted on thermal oxidation of PL. Most of these studies used drastic oxidative treatments (Fenton reaction:  $\text{FeCl}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$  or  $\text{FeSO}_4 + \text{tert-butylhydroperoxide}$ ) that did not reflect processing or cooking conditions that a food matrix is usually subjected to (Reis, Domingues, Amado, Ferrer-Correia, & Domingues, 2005, 2007; Reis, Domingues, Ferrer-Correia, & Domingues, 2004; Spickett, Pitt, & Brown, 1998). In addition, while volatiles were investigated (Jewell & Nawar, 1980; Lin & Blank, 2003; Meynier, Genot, & Gandemer, 1998; Stephan & Steinhart, 1999), no data is available on heat-generated oxidation products.

\* Corresponding author. Tel.: +33 368 854 326; fax: +33 368 854 325.  
E-mail address: [eric.marchion@unistra.fr](mailto:eric.marchion@unistra.fr) (E. Marchioni).

The present study set out to investigate the oxidation conditions and products of PC during heat treatment as a step towards understanding the behaviour of PL with regard to thermal oxidation. Two molecular species of PC were selected as models: 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (SOPC) and 1-stearoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (SLPC). SLPC was previously identified in soy PC (Wang et al., 1997, 1999), while SOPC was chosen because of the limited number of oxidation products it would generate due to its single double bond. In this study, only the formation of hydroperoxides and oxidative changes that do not include dimerization and degradation were investigated.

First, in order to form the maximum of degradation products of interest, the temperature that allowed the production of the highest yield of hydroperoxides was determined. The second part of this work was aimed at elucidating the structures of the oxidation products and studying the kinetics of their formation, as well as the kinetics of degradation of the starting material (SOPC and SLPC).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and stock solutions

#### 2.1.1. Chemicals

SOPC and SLPC were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). HPLC grade methanol and analytical grade formic acid (99–100%) were purchased from VWR (Strasbourg, France). Ultrapure water was produced by a Synergy UV purification system (Millipore, Molsheim, France). Chloroform, ammonium hydroxide and sodium hydroxide were of analytical grade and were purchased from Riedel de Haën (Sigma–Aldrich, Seelze, Germany).

#### 2.1.2. Stock solutions

Stock solutions of 10 mg/mL were prepared by weighing SOPC or SLPC standards into amber vials and dissolving them in chloroform. Aliquots were prepared by introducing 100 µL of SOPC or SLPC stock solution into a 4 mL amber vial (VWR, vials 4 mL, height: 44 mm, internal diameter: 12 mm). Each vial was dried under nitrogen, closed and kept at –20 °C until oxidative treatment.

### 2.2. Oxidative treatments

#### 2.2.1. Determination of optimal oxidation temperature

Several temperatures were tested on SOPC and SLPC samples in order to determine the best conditions for hydroperoxide formation. All samples were analyzed in triplicate. Both PC were oxidized in an oven for 30 min at temperatures ranging from 50 to 175 °C. Accuracy of each indicated temperature was ±1 °C. Vials were left open to air during heating. After oxidation, samples were cooled down at room temperature. One millilitre methanol was added in vial, then a 1/50 dilution was performed to obtain 0.02 mg/mL. Solutions were filtered through 0.45 µm PTFE filters (Macherey–Nagel, Hoerd, France) as a precaution to eliminate potential particles, as no guard column was used. Filtered and non-filtered samples were not significantly different as far as responses (peak areas) were concerned (data not shown).

#### 2.2.2. Kinetics

Aliquots from stock solutions of SOPC and SLPC were oxidized in open vials at the appropriate temperature determined for each PC molecular species for durations between 0 and 120 min. Samples were cooled down at room temperature and 1 mL methanol was added to obtain 1 mg/mL PC. Each sample was filtered through 0.45 µm PTFE filters as described above and 10 µL were injected in the HPLC system.

### 2.3. Liquid chromatography and mass spectrometry

#### 2.3.1. Determination of optimal temperature for hydroperoxide formation by MS

Mass analysis was carried on 5 µL of each sample in a 1200 L triple quadrupole mass spectrometer (Varian, Les Ulis, France) fitted with an ESI source using methanol as mobile phase. High purity nitrogen, produced by a nitrogen generator (Domnik Hunter, Villefranche-sur-Saône, France) was used as nebulizing gas, set at 46 psi, and as a drying gas, set at 300 °C. Spectral data was acquired in positive mode (single quadrupole analysis) and the *m/z* scan range was from 500 to 1000. The best temperature of oxidation was defined at the temperature where the percentage of hydroperoxide was the highest for each starting material. The percentage was calculated as follows:

$$\frac{(A_{[M+H+32]})_T}{A_{[M+H]}} \times 100$$

where  $(A_{[M+H+32]})_T$  is the area of the peak corresponding to the extracted ion *m/z* of the hydroperoxide [M+H+32] formed at a given temperature (*T*) and where  $A_{[M+H]}$  is the area of the peak corresponding to the extracted ion *m/z* of the starting material [M+H] without oxidative treatment.

#### 2.3.2. Identification of oxidation products with LC–ESI–MS

The HPLC system was made of two Prostar 210 solvent delivery modules (Varian), a Prostar 410 autosampler (Varian) and an ESI mass spectrometer as described above. SOPC and SLPC oxidation products were separated on a reverse phase C8 Lichrospher RP Select B (Interchim, Montluçon, France) using a linear gradient ranging from 15% ultrapure water in methanol containing 0.1% NH<sub>4</sub>OH to 100% methanol containing 0.1% NH<sub>4</sub>OH. The flow rate was set to 1 mL/min through the column and split to derive 0.2 mL/min to the mass spectrometer. Mass spectra were acquired in a *m/z* range from 500 to 1000. To confirm oxidation products structures, 10 µL formic acid (1 M) were added to samples and immediately neutralized with 10 µL sodium hydroxide (1 M). Samples were then analyzed by LC–ESI–MS as described above. Indeed, by adding formic acid, an epoxy group will be opened and converted into a diol group (Mori, Porzio, & Schaleger, 1972), which will result in an *Rt* shift.

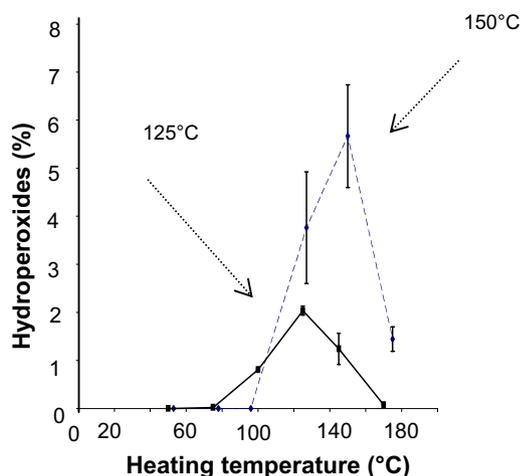
#### 2.3.3. Kinetic curves

Spectral data acquisition was performed using SIM (single ion monitoring) mode. Molecular ions corresponding to each identified product were selected. Based on areas of the chromatographic peaks, kinetic curves were drawn for each identified degradation product and for the starting material.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Determination of optimal oxidative temperatures

To determine the optimal oxidative conditions of SOPC and SLPC, the percentage of hydroperoxides [M+H+32] generated at several temperatures was determined. Fig. 1 shows that the temperature allowing the highest yield of hydroperoxides was different for thermally oxidized SOPC and SLPC. For the same oxidation time (30 min), production of hydroperoxides was the highest at 125 ± 1 °C for SLPC and at 150 ± 1 °C for SOPC. This is in accordance with reports showing that free linoleic acid is more sensitive to oxidation than free oleic acid (Shahidi, 2006). It is also noteworthy that the percentage of hydroperoxides produced by SOPC is higher than in the case of SLPC. This is also in accordance with previous studies showing that the amount of hydroperoxides



**Fig. 1.** Evolution of SOPC (—◆—) and SLPC (---■---) hydroperoxides production during thermal oxidation at different temperatures for 30 min.

generated through oxidation decreased with the increase of the number of double bonds, which is ascribed to a higher rate of hydroperoxide decomposition (Frankel, 2005; Shahidi, 2006). For temperatures below 80 °C for SLPC and below 100 °C for SOPC, the oxidative process seems to be slow, which explains the small amounts of hydroperoxides produced, either from SOPC or from SLPC (Fig. 1). Hydroperoxides were not formed or at a very small

**Table 1**

Possible structures of SOPC and SLPC oxidation products with the corresponding  $m/z$  and retention times.

Ion $m/z$ [M+H]	Possible structure(s) <sup>a</sup>	Rt (min)	Reaction with formic acid <sup>b</sup>
<i>SOPC oxidation products</i>			
788.6	<b>18:0-18:1-PC</b>	38.7	—
802.6	18:0-18:1 (Ep)-PC	29.9	—
	<b>18:0-18:1 (Ke)-PC</b>		
804.6	18:0-18:0 (Ep)-PC	29.1	—
	18:0-18:0 (Ke)-PC		
	<b>18:0-18:1 (OH)-PC</b>		
804.6	<b>18:0-18:0 (Ep)-PC</b>	32.7	+
	18:0-18:0 (Ke)-PC		
	18:0-18:1 (OH)-PC		
820.6	<b>18:0-18:1 (OOH)-PC</b>	29.5	+
<i>SLPC oxidation products</i>			
786.6	<b>18:0-18:2-PC</b>	37.7	—
800.6	<b>18:0-18:2 (Ep)-PC</b>	28.9	±
	<b>18:0-18:2 (Ke)-PC</b>		
802.6	18:0-18:1 (Ep)-PC	28.3	—
	18:0-18:1 (Ke)-PC		
	<b>18:0-18:2 (OH)-PC</b>		
802.6	<b>18:0-18:1 (Ep)-PC</b>	32.4	+
	18:0-18:1 (Ke)-PC		
	18:0-18:2 (OH)-PC		
816.6	<b>18:0-18:1 (Ep, Ke)-PC</b>	24.5	+
	18:0-18:2 (Ep, OH)-PC		
818.6	<b>18:0-18:2 (OOH)-PC</b>	27.7	+
	18:0-18:2 (OH, OH)-PC		
	18:0-18:1 (OH, Ep)-PC		
	18:0-18:1 (Ke, OH)-PC		
	18:0-18:0 (Ke, Ke)-PC		
834.6	<b>18:0-18:1 (Ep, OOH)-PC</b>	22.5	+
	18:0-18:2 (OH, OH, OH)-PC		

Bold italic characters refer to the identified structures.

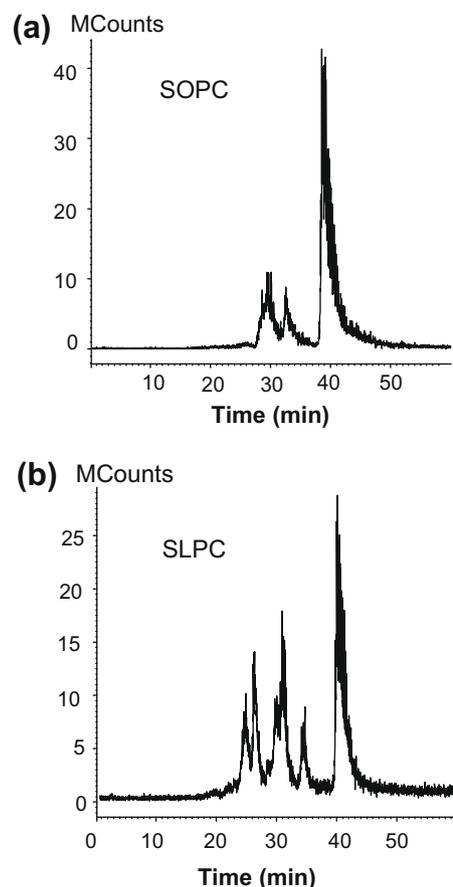
<sup>a</sup> 18:0 refers to stearic acid, 18:1 refers to oleic acid, 18:2 refers to linoleic acid. Ep refers to an epoxy group, Ke to an oxo group, OH to a hydroxyl group and OOH to a hydroperoxide group.

<sup>b</sup> —, no change in Rt; +, change in Rt.

yield, so they could not have been further decomposed into other oxidation products in a significant way. This implies a relative stability of the system until the activation energy is sufficient to initiate the oxidation process. At heating temperatures over 80 °C for SLPC and 100 °C for SOPC, activation energy is apparently high enough to form large amounts of hydroperoxides and to destabilize the system by breaking down the produced hydroperoxides at the same time. In fact, while it is known that the oxidation process is accelerated with the increase of temperature, it was also reported that heat promotes the decomposition of hydroperoxides on free fatty acids (Frankel, 2005; Shahidi, 2006). The overall process is in a way a competition between formation and decomposition of hydroperoxides. To study the kinetics of formation of oxidized products from hydroperoxides, temperatures that yielded the largest amounts of hydroperoxides were chosen.

### 3.2. Oxidation products from SOPC and oxidation kinetics

For the identification of thermally induced degradation products, samples of SOPC were heated at  $150 \pm 1$  °C as determined above for 45 min. Acquisition in RIC (Reconstructed Ion Monitoring) mode allowed the identification of several  $m/z$ . Table 1 shows the different ions, retention times (Rt) and possible structures of the products detected in chromatograms (Fig. 2a).  $m/z$  788.6, detected at 38.7 min, refers to the molecular ion  $[M+H]^+$  of SOPC. Three other  $m/z$  appeared in chromatograms after thermal treatment:  $m/z$  802.6,  $m/z$  804.6 and  $m/z$  820.6. Each  $m/z$  corresponds to several possible structures.  $m/z$  802.6 may carry an epoxy group (Ep): 18:0-18:1 (Ep)-PC or an oxo group (Ke): 18:0-18:1 (Ke)-PC on oleic acid. By adding formic acid, no change in Rt for the peak



**Fig. 2.** Chromatograms of oxidized (a) SOPC and (b) SLPC.

at 29.9 min could be observed (Table 1), which indicated that the structure of  $m/z$  802.6 is 18:0–18:1 (Ke)-PC.  $m/z$  804.6 was detected with two different  $R_t$ : 29.1 and 32.7 min (Fig. 3a). Three structures could be envisioned for this  $m/z$ : an epoxy group: 18:0–18:0 (Ep)-PC, an oxo group: 18:0–18:0 (Ke)-PC or a hydroxyl group: 18:0–18:1 (OH)-PC. The addition of formic acid made the latter peak disappear while the former remained unchanged. This result showed that the peak eluted at 32.7 min presents a 18:0–18:0 (Ep)-PC structure. For the  $m/z$  804.6 at 29.1 min, it can be suggested that its structure is most probably 18:0–18:1 (OH)-PC, an 18:0–18:0 (Ke)-PC structure being less likely since it has never been reported so far. The other structures (epoxy-octadecanoate, oxo-octadecenoate and hydroxy-octadecenoate) have in fact been identified in previous investigations of thermal degradation of oleic acid and methyl oleate (Frankel, 2005; Lercker, Bortolomeazzi, & Pizzale, 1998; Velasco, Berdeaux, Marquez-Ruiz, & Dobarganes, 2002). Finally,  $m/z$  820.6, which was detected at 29.5 min, may carry only one possible structure: a hydroperoxy group: 18:0–18:1 (OOH)-PC (Table 1). Adding formic acid made the peak disappear, which confirms the high reactivity of the molecule and therefore its hydroperoxide nature.

Kinetics of degradation of SOPC and of production of its oxidation products were monitored over time at  $150 \pm 1$  °C (Fig. 4). The behaviour of the degradation products provided information on their heat stability, which was an additional clue that helped confirm their structures. SOPC peak area gradually decreased between 30 and 90 min of oxidation then seemed to have stabilized (Fig. 4a). With regard to the oxidation products, their formation could only be detected after a minimal heating period of 30 min. It is noteworthy that  $m/z$  820.6 was the first to reach a maximum before decreasing until it totally disappeared after 90 min. Its

behaviour with regard to oxidation (Fig. 4b) confirmed its hydroperoxide structure.

As far as the other oxidation products are concerned,  $m/z$  802.6 (18:0–18:1 (Ke)-PC) reached a maximum after 45 min of heating before decreasing and stabilizing by 90 min.  $m/z$  804.6 (18:0–18:1 (OH)-PC and 18:0–18:0 (Ep)-PC) reached their maxima after 60 min of heating and stabilized (Fig. 4b). These kinetics showed that the oxidation products monitored here are stable. However, as carbonyl compounds (18:0–18:1 (Ke)-PC for example) are very reactive, they would certainly be involved in Maillard reactions in complex food matrices. This way, they would probably be converted into other degradation products such as imines (Frankel, 2005) and would not be present in sufficient concentrations to be detected. Nevertheless, as hydroxyl groups are less reactive than the carbonyl ones, they would probably be more readily detected in food matrices containing PL after oxidative treatment.

### 3.3. Oxidation products from SLPC and oxidation kinetics

Samples of SLPC were heated at  $125 \pm 1$  °C as determined above for 30 min to determine structures of SLPC degradation products. The obtained  $m/z$ , identified in RIC mode, are listed in Table 1.  $m/z$  786.6 with a  $R_t$  of 37.7 min refers to the molecular ion  $[M+H]^+$  of SLPC. Five other  $m/z$  were found in chromatograms (Fig. 2b).  $m/z$  800.6 gave an asymmetrical peak at an  $R_t$  of 28.9 min. Table 1 shows that two structures are likely for this products, an epoxy group 18:0–18:2 (Ep)-PC and an oxo group 18:0–18:2 (Ke)-PC on linoleic acid. By adding formic acid, the peak did not entirely disappear, which revealed that the peak with  $m/z$  800.6 is in fact made of two overlapped peaks, each corresponding to one of the possible structures. Another product,  $m/z$  802.6, showed a profile quite sim-

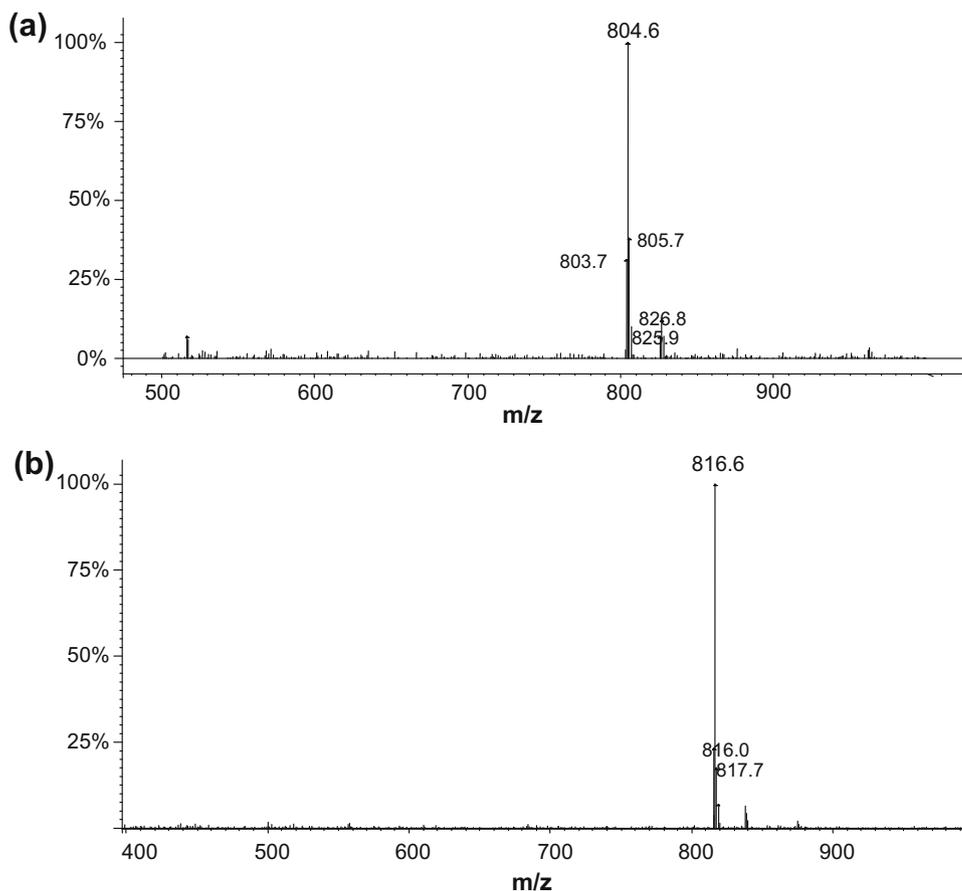
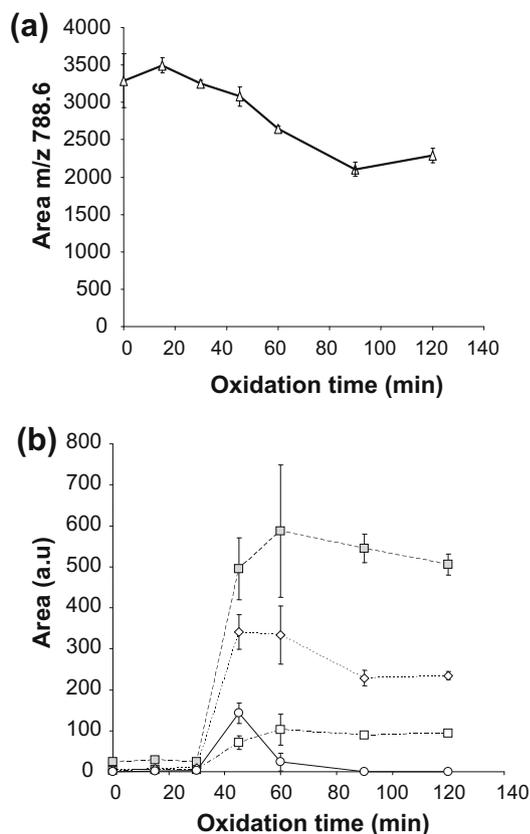


Fig. 3. Mass spectra of oxidation products at two different retention times: (a) SOPC ( $R_t = 32.7$  min) and (b) SLPC ( $R_t = 24.5$  min).



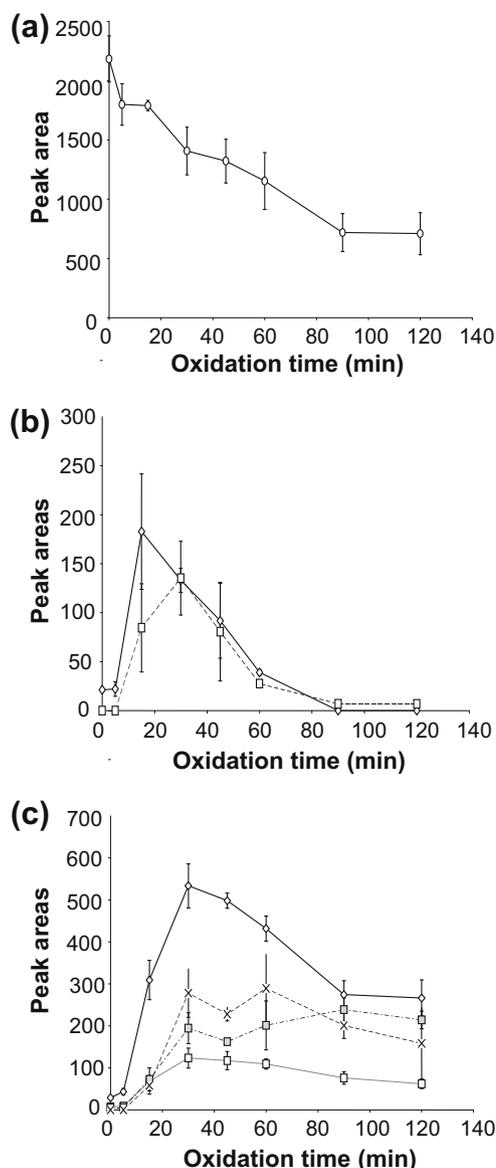
**Fig. 4.** Kinetics of SOPC oxidation during heat treatment at 150 °C: (a) evolution of SOPC area; (b) formation of oxidized products:  $\circ$ —  $m/z$  820.6,  $\diamond$ —  $m/z$  802.6,  $\square$ —  $m/z$  804.6 (2),  $\triangle$ —  $m/z$  804.6 (1).

ilar to that of  $m/z$  804.6 from SOPC, with two peaks were detected. Three structures were possible for  $m/z$  802.6 as shown in Table 1. By treating samples with formic acid, only the second of the two peaks disappeared (Table 1). As for SOPC, the first peak was identified as SLPC with a hydroxyl group: 18:0–18:2 (OH)-PC and the second one as SLPC with an epoxy group: 18:0–18:1 (Ep)-PC.  $m/z$  816.6, identified at an  $R_t$  of 24.5 (Fig. 3b), could be associated with two possible structures as shown in Table 1: 18:0–18:1 (Ep, Ke)-PC and 18:0–18:2 (Ep, OH)-PC. In this case, acidic treatment confirms that this oxidation product carries an epoxy group, since the peak disappeared. Moreover, since the starting material (SLPC) carries two double bonds which are sensitive to oxidation, an 18:0–18:1 (Ep, Ke)-PC structure was considered the most likely, which is in agreement with a previous report (Toschi, Costa, & Lercker, 1997). An 18:0–18:2 (Ep, OH)-PC structure would on the other hand be probably found in degradation products of more unsaturated fatty acids, such as linolenic acid (Frankel, 2005).  $m/z$  818.6, with an  $R_t$  of 27.7, which could be related to five possible structures (Table 1), was in fact quite unstable and its peak disappeared with acid treatment. This helped narrow down the possibilities to the two acid-sensitive structures: 18:0–18:2 (OOH)-PC and 18:0–18:1 (OH, Ep)-PC. The last identified  $m/z$ , 834.6, had an  $R_t$  of 22.5 and could be related to two possible structures as shown in Table 1: 18:0–18:1 (Ep, OOH)-PC and 18:0–18:2 (OH, OH, OH)-PC. The corresponding oxidation product was sensitive to acidic treatment, which indicated that the most likely structure for  $m/z$  834.6 was 18:0–18:1 (Ep, OOH)-PC. The suggested structures of oxidation products from SLPC were further confirmed by  $R_t$  values that were in accordance with their polarity (Table 1). In addition, structures, such as keto-linoleate, epoxy-linoleate, hydroxyl-linoleate, ketoepoxy-oleate and epoxyoleate, have previously been re-

ported by studies carried out on free linoleic acid and linoleic acid methyl ester (Frankel, 2005; Toschi et al., 1997; Velasco et al., 2002). As far as hydroperoxides are concerned, epoxy-hydroperoxide could be obtained from hydroperoxides of linoleate (Frankel, 2005).

Kinetics of degradation of SLPC and of production of its oxidation products were monitored over time at  $125 \pm 1$  °C (Fig. 5). Fig. 5a shows changes in the amounts SLPC and its oxidation products during heating at  $125 \pm 1$  °C. SLPC peak area decreased in a sharp and rapid way, and did not stabilize before 90 min of treatment. The decrease of SLPC was therefore more important than that of SOPC for the same heating durations (Figs. 4 and 5a). As previously mentioned, this result is in accordance with the fact that SLPC is more sensitive to oxidation than SOPC.

As far as the formation of thermally induced oxidation products is concerned, two groups could be identified: the first included products that rapidly reached a maximum before completely disappearing (Fig. 5b); the second included more stable products that



**Fig. 5.** Kinetics of SLPC oxidation during heat treatment at 125 °C: (a) evolution of SLPC area, (b) formation of oxidized products (group 1):  $\diamond$ —  $m/z$  818.6,  $\square$ —  $m/z$  834.6; (c) formation of oxidized products (group 2):  $\diamond$ —  $m/z$  800.6,  $\square$ —  $m/z$  802.6 (1),  $\square$ —  $m/z$  802.6 (2),  $\times$ —  $m/z$  816.6.

did not disappear (Fig. 5c). The first group included  $m/z$  818.6 and  $m/z$  834.6. The evolution of peak areas was monitored during heating. Fig. 5b shows that a maximum was reached after 15 min before the area started decreasing and totally disappeared after 90 min. As observed for SOPC and according to the identification, this behaviour is indicative of a hydroperoxide structure: 18:0–18:2 (OOH)-PC for  $m/z$  818.6.  $m/z$  834.6 area reached a maximum after 30 min oxidation and then it decreased until 90 min where very little product was detected (Fig. 5b). This trend, which is quite similar to that of  $m/z$  818.6, suggested that  $m/z$  834.6 also carries a hydroperoxide function, which is in accordance with the identified structure: 18:0–18:1 (Ep, OOH)-PC.

The second group of thermally generated products included compounds with  $m/z$  816.6,  $m/z$  802.6 and  $m/z$  800.6. These products behaved in the same way as oxidation products from SOPC: the amount of each product reached a maximum after 30 min of oxidation, then decreased and stabilized. As for SOPC, some oxidation products of this group, which is quite stable once formed, are likely to be found in sizable amounts in processed foods containing PL. As for SOPC, oxidation products containing a carbonyl group would probably be difficult to detect in complex food matrices due to Maillard reaction (Frankel, 2005).

Finally, heat treatment of unsaturated PL (SOPC and SLPC) leads to hydroperoxides which are degraded into further oxidized products. Structures elucidated for oxidation products of these unsaturated PL could also be identified in oxidized TAG (Byrdwell & Neff, 1999, 2001; Neff & Byrdwell, 1998), which suggests that their formation in PL is not all that surprising. As heat treatment is a major and widespread food process, investigating its impact on the structure, the stability and the safety of PL is of great interest to the consumer and to the food industry. While this study does not reflect the real conditions of a food matrix during processing, it allowed however the identification of degradation products that are likely to be formed in food from two major PC species, which represents a first step towards unravelling PL thermal degradation during food processing. As kinetics is influenced by the composition of the food matrix, it would probably differ if sugars, proteins, metals or other lipids are mixed together with unsaturated PL. Since the antioxidative capacity of PL is not fully understood (Shahidi, 2006), it is still unknown whether the oxidative process would be enhanced or inhibited in presence of other food constituents. Further investigations have to be carried out that take into account the effects of complex food matrices on the oxidative process.

## References

- Amate, L., Gil, A., & Ramirez, M. (2001). Feeding infant piglets formula with long-chain polyunsaturated fatty acids as triacylglycerols or phospholipids influences the distribution of these fatty acids in plasma lipoprotein fractions. *Journal of Nutrition*, 131, 1250–1255.
- Byrdwell, W. C., & Neff, W. E. (1999). Non-volatile products of triolein produced at frying temperatures characterized using liquid chromatography with online mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 852, 417–432.
- Byrdwell, W. C., & Neff, W. E. (2001). Autoxidation products of normal and genetically modified canola oil varieties determined using liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 905, 85–102.
- Chanussot, F. (2008). *La lécithine dans l'alimentation*. Lavoisier: Ted et Doc.
- Frankel, E. N. (2005). *Lipid oxidation* (2nd ed.). The Oily Press.
- Jewell, N., & Nawar, W. (1980). Thermal oxidation of phospholipids 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 57, 398–402.
- Koprivnjak, O., Skevin, D., Valic, S., Majetic, V., Petricevic, S., & Ljubenkov, I. (2008). The antioxidant capacity and oxidative stability of virgin olive oil enriched with phospholipids. *Food Chemistry*, 111, 121–126.
- Lemaître-Delaunay, D., Pachiaudi, 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 [ $^{13}C$ ]DHA in phosphatidylcholine. *Journal of Lipid Research*, 40, 1867–1874.
- Lercker, G., Bortolomeazzi, R., & Pizzale, L. (1998). Thermal degradation of single methyl oleate hydroperoxides obtained by photosensitized oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 1115–1120.
- Lin, J., & Blank, I. (2003). Odorants generated by thermally induced degradation of phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4364–4369.
- Meynier, A., Genot, C., & Gandemer, G. (1998). Volatile compounds of oxidized pork phospholipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 1–7.
- Mori, A. L., Porzio, M. A., & Schaleger, L. L. (1972). Kinetics and mechanism of epoxy ether hydrolysis. I. Mechanism of the hydrolysis of an acyclic hemiacetal intermediate. *Journal of the American Chemical Society*, 94, 5034–5039.
- Neff, W. E., & Byrdwell, W. C. (1998). Characterization of model triacylglycerol (triolein, trilinolein and trilinolenin) autoxidation products via high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 818, 169–186.
- Nwosu, C., Boyd, L., & Sheldon, B. (1997). Effect of fatty acid composition of phospholipids on their antioxidant properties and activity index. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 293–297.
- Reis, A., Domingues, M. R. M., Amado, F. M. L., Ferrer-Correia, A. J. V., & Domingues, P. (2005). Separation of peroxidation products of diacyl-phosphatidylcholines by reversed-phase liquid chromatography–mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 19, 129–137.
- Reis, A., Domingues, M. R. M., Amado, F. M. L., Ferrer-Correia, A. J. V., & Domingues, P. (2007). Radical peroxidation of palmitoyl-linoleoyl-glycerophosphocholine liposomes: Identification of long-chain oxidised products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 855, 186–199.
- Reis, A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J. V., & Domingues, M. R. M. (2004). Tandem mass spectrometry of intact oxidation products of diacylphosphatidylcholines: Evidence for the occurrence of the oxidation of the phosphocholine head and differentiation of isomers. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 1513–1522.
- Shahidi, F. (2006). *Nutraceutical and specialty lipids and their co-products*. CRC press, Taylor & Francis.
- Spickett, C. M., Pitt, A. R., & Brown, A. J. (1998). Direct observation of lipid hydroperoxides in phospholipid vesicles by electrospray mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine*, 25, 613–620.
- Stephan, A., & Steinhart, H. (1999). Identification of character impact odorants of different soybean lecithins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2854–2859.
- Sugino, H., Ishikawa, M., Nitoda, T., Koketsu, M., Juneja, L. R., Kim, M., et al. (1997). Antioxidative activity of egg yolk phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 551–554.
- Toschi, T., Costa, A., & Lercker, G. (1997). Gas chromatographic study on high-temperature thermal degradation products of methyl linoleate hydroperoxides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 387–391.
- Ulkowski, M., Musialik, M., & Litwinienko, G. (2005). Use of differential scanning calorimetry to study lipid oxidation. I. Oxidative stability of lecithin and linolenic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9073–9077.
- Velasco, J., Berdeaux, O., Marquez-Ruiz, G., & Dobarganes, M. C. (2002). Sensitive and accurate quantitation of monoepoxy fatty acids in thermoxidized oils by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 982, 145–152.
- Wang, T., Hammond, E., Cornette, J., & Fehr, W. (1999). Fractionation of soybean phospholipids by high-performance liquid chromatography with an evaporative light-scattering detector. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1313–1321.
- Wang, T., Hammond, E., & Fehr, W. (1997). Phospholipid fatty acid composition and stereospecific distribution of soybeans with a wide range of fatty acid composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74, 1587–1594.
- Wijendran, V., Huang, M. C., Diao, 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, 265–272.



# Conclusion générale

---

Les PL apparaissent de plus en plus comme des suppléments alimentaires intéressants, en tant que vecteurs d'AG d'une part, mais aussi en tant que lipides polaires très abondants dans les membranes cellulaires, notamment dans le cerveau. La meilleure biodisponibilité des AG des PL par rapport à ceux des TG a conduit certains industriels de l'agro-alimentaire à envisager des suppléments en PL polyinsaturés à l'aide d'extraits naturels très riches en PL. Il faut donc pouvoir caractériser les sources d'intérêt ou les extraits issus de ces sources afin d'évaluer si l'intérêt qu'on leur attribue est justifié ou non.

Dans la première partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de sources de PL polyinsaturés, qui s'avère être une étape essentielle dans le processus de mise sur le marché de produits supplémentés. Cinq matrices ont été étudiées comme sources potentielles de PL polyinsaturés : les graines de soja, dont est extraite industriellement la lécithine, le foie de boeuf, la cervelle de veau, le jaune d'œuf et enfin l'huile de krill. Les matrices alimentaires utilisées étant de nature différente, la préparation des échantillons a été adaptée pour chacune d'entre elles. Une étape d'extraction liquide-liquide a été mise au point afin d'optimiser les quantités de PL extraites à partir des différentes matrices sélectionnées. Les familles de PL extraites des matrices étudiées ont été identifiées et quantifiées par CLHP sur phase normale couplée à un DEDL. La PC a été identifiée comme la famille majoritaire pour quatre des cinq matrices étudiées. Seule la cervelle de veau présente une famille majoritaire différente à savoir la PE.

Après avoir déterminé la famille majoritaire, nous avons cherché à identifier pour chaque matrice étudiée, les différentes structures moléculaires de la PC. La première étape consistait à isoler PC des autres familles de lipides, comme les TG, mais aussi de certaines autres familles de PL (PE et PI). Une méthode de purification par chromatographie Flash en phase normale, qui permet d'isoler PC des autres classes de lipides a été mise au point. Pour les matrices les plus complexes qui présentent deux familles de PL supplémentaires que sont la PS et la SM, une chromatographie semi-préparative haute performance en phase normale, suivie d'une collection de fractions a été utilisée afin d'isoler PC du reste des PL. Chaque PC ainsi purifiée a été analysée sur phase inverse (C18) en CLHP-ESI-MS et MS<sup>2</sup> afin d'identifier chaque structure moléculaire présente dans la famille considérée. La phase mobile utilisée est isocratique à base de méthanol et d'acétonitrile. Un sel de lithium est ajouté à la phase mobile afin de faciliter l'identification de chaque espèce présente. L'identification a permis de montrer qu'il existe une très grande diversité d'espèces moléculaires au sein d'une

seule famille et que certaines espèces sont communes aux différentes matrices, comme 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (SOPC) et 1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (SLPC), alors que d'autres espèces (1,2-docosahexaenoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DHADHAPC)) se retrouvent exclusivement dans certaines matrices comme l'huile de krill.

Pour achever la caractérisation des sources étudiées, nous nous sommes finalement intéressés à la répartition des acides gras, plus particulièrement celle des AGPI entre les fractions PL et TG. Pour cela, une méthode de séparation de ces classes de lipides par SPE a été utilisée. Les fractions de TG et de PL ainsi obtenues sont transestérifiées et analysées par CPG-FID. Il a ainsi pu être démontré que, d'une façon générale, les AGPI sont liés préférentiellement aux PL plutôt qu'aux TG, ce qui constitue un argument supplémentaire pour la supplémentation des aliments par les PL.

La supplémentation alimentaire implique le passage par différents procédés qui peuvent induire des transformations au niveau chimique et organoleptique. L'un des procédés les plus susceptibles de provoquer des modifications ou des dégradations est le traitement thermique utilisé notamment lors de la stérilisation. Les modifications chimiques induites par la chaleur sur les TG ou sur les AG libres ont été beaucoup étudiées ces dernières années, mais peu d'auteurs se sont intéressés aux modifications des PL suite aux traitements thermiques.

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à l'oxydation thermique des PL dans la deuxième partie de cette thèse. Deux molécules « modèles » (SOPC et SLPC), identifiées dans le chapitre 2 comme largement répandues et communes à plusieurs matrices, ont été choisies pour débiter les études de l'impact de l'oxydation thermique. Les différents produits monomériques d'oxydation induits par le processus thermique ont été mis en évidence et identifiés. La nature de ces produits (hydroperoxy, epoxy, oxo ou hydroxy) est identique aux produits issus de l'oxydation des TG.

Bien que les AGPI portés par les PL soient mieux assimilés par l'organisme que ceux liés aux TG, il faut que ces PL soient au moins aussi stables, sinon plus, vis-à-vis de l'oxydation que les TG pour apporter un réel bénéfice. Afin d'évaluer la stabilité relative des

PC par rapport aux TG, nous avons comparé la stabilité de chaque PC avec celle de son homologue TG. Ainsi, SOPC a été comparé avec 1,3-stearoyl,2-oleoyl-glycerol (SOS) et SLPC avec 1,3-stearoyl,2-linoleoyl-glycerol (SLS). Les résultats obtenus ont permis de montrer que la présence de la tête polaire sur les PC stabilise les acides gras vis-à-vis de l'oxydation. Il a été démontré que la décroissance du pourcentage de produit de départ due à l'oxydation est plus rapide pour les TG que pour les PL. En effet, il reste plus de PC intacts que de TG intacts pour la même durée d'oxydation à des températures identiques.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à évaluer l'influence de la nature de la tête polaire sur la stabilité des molécules vis-à-vis de l'oxydation. Pour ce faire, nous avons travaillé avec 1-stearoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (SOPE) et comparé le pourcentage de produit de départ restant après différentes durées d'oxydation, avec les résultats obtenus pour SOPC dans les mêmes conditions. Deux différences importantes sont à noter : d'abord, les produits d'oxydation générés ne sont pas tous identiques entre SOPE et SOPC et l'étude cinétique montre que SOPE est moins stable que SOPC dans les conditions choisies, mais tout de même plus stable que SOS, le TG correspondant.

Ce travail de thèse est une première étape dans la recherche de sources potentielles de PL polyinsaturés, en vue d'une supplémentation alimentaire. La caractérisation est une étape déterminante dans le choix d'un ingrédient en vue d'une supplémentation. La mise en place de méthodes permettant d'établir les profils phospholipidiques permet de connaître la composition en molécules d'intérêt de la source potentielle et donc de confirmer ou non son intérêt. Une supplémentation alimentaire par des sources de PL riches en AGPI implique d'évaluer la stabilité thermique des molécules ajoutées et de prendre en considération les transformations qui peuvent se produire au cours du procédé ou du stockage des aliments supplémentés. Les phénomènes de dégradation les plus courants sont induits par la chaleur et/ou la lumière et conduisent à des modifications chimiques (le plus souvent oxydatives) sur les molécules d'intérêt. Dans ce travail, nous avons mis en évidence les produits d'oxydation de certains PL et étudié leurs cinétiques de formation, ce qui nous a permis de montrer qu'en règle générale, les PL sont plus stables que les TG. Ce résultat constitue donc un argument supplémentaire en faveur d'une supplémentation par les PL polyinsaturés plutôt que par des TG polyinsaturés.

De nombreux aspects restent toutefois à étudier, aussi bien au niveau de la caractérisation, que de l'oxydation des PL. En ce qui concerne la caractérisation, les espèces moléculaires d'autres familles pourront être caractérisées, comme par exemple PE qui est la deuxième famille la plus abondante après PC. Ensuite, des familles moins abondantes mais qui possèdent des propriétés métaboliques très intéressantes, comme PS, seraient aussi à caractériser. En ce qui concerne l'oxydation, l'étude des produits d'oxydation de PL appartenant à d'autres familles, comme SOPI ou SOPS permettrait de compléter les informations obtenues sur l'influence de la tête polaire vis-à-vis de l'oxydation thermique et peut-être d'aboutir à la définition d'un mécanisme de dégradation thermique. Dans ce travail, nous nous sommes uniquement intéressés aux produits monomériques de l'oxydation. Deux autres voies importantes de l'oxydation sont encore à considérer pour l'oxydation des PL : celle des produits volatils et celle des produits d'oligomérisation. L'étude de ces derniers s'avère très intéressante, surtout pour des PL présentant une amine libre qui peut être impliquée dans les réactions carbonyle-amine, plus communément appelées « réactions de Maillard », très importantes dans les matrices alimentaires. On voit donc que l'oxydation des PL est loin d'être totalement élucidée et que de nombreux produits de dégradation doivent encore être identifiés avant de commencer les suppléments en PL de quelques matrices alimentaires.



# Références bibliographiques

---

1. Décision 2000/195/CE de la Commission du 22 février 2000. *Parlement européen et Conseil du 10 juin 2002* **2009**.
2. Digestion. [www.operasavon.free.fr](http://www.operasavon.free.fr) **2009**.
3. Directive 2002/46/CE relative au rapprochement des législations des États membres concernant les compléments alimentaires. *Parlement européen et Conseil du 10 juin 2002* **2009**.
4. EFSA-Q-2008-027. *The EFSA Journal* **2009**.
5. Membrane cellulaire. <http://www.science-et-vie.net/img/illustrations/S/section-membrane-cellulaire.png> . 2009.
6. Metabolic pathway. <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/pc/index.htm> . 2009.
7. Metabolic pathways. <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/cdp-dg/index.htm> . 2009.
8. Oligomers. <http://www.lipidlibrary.co.uk/frying/c-dimer/index.htm> . 2009.
9. Organisation des PL. [www.bioweb.wku.edu](http://www.bioweb.wku.edu) **2009**.
10. PAF biosynthesis. <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/paf/index.htm> . 2009.
11. Phospholipases. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Phospholipase> . 2009.
12. Platelet activating factor. <http://www.lipidlibrary.co.uk/Lipids/paf/index.htm> . 2009.
13. Secondary oxidation products. <http://www.lipidlibrary.co.uk/frying/c-newcpds/index.htm> . 2009.
14. Albessard,E.; Mayzaud,P.; Cuzin-Roudy,J. Variation of lipid classes among organs of the Northern krill *Meganyctiphanes norvegica*, with respect to reproduction. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* **2001**, *129*, 373-390.
15. Amate,L.; Gil,A.; Ramirez,M. Feeding Infant Piglets Formula with Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids as Triacylglycerols or Phospholipids Influences the Distribution of These Fatty Acids in Plasma Lipoprotein Fractions. *Journal of Nutrition* **2001**, *131*, 1250-1255.
16. Arnesen,E.; Refsum,H.; Bonna,K.H.; Magne Ueland,P.; Forde,O.H.; Nordrehaug,J.E. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *International Journal of Epidemiology* **1995**, *24*, 704-709.
17. Aro,H.; Jarvenpaa,E.P.; Konko,K.; Sihvonon,M.; Hietaniemi,V.; Huopalahti,R. Isolation and purification of egg yolk phospholipids using liquid extraction and pilot-scale supercritical fluid techniques. *European Food Research and Technology* **2009**, *228*, 857-863.
18. Auestad,N.; Montalto,M.B.; Hall,R.T.; Fitzgerald,K.M.; Wheeler,R.E.; Connor,W.E.; Neuringer,M.; Connor,S.L.; Taylor,J.A.; Hartmann,E.E. Visual acuity, erythrocyte fatty acid composition, and growth in term infants fed formulas with long chain polyunsaturated fatty acids for one year. *Pediatric Research* **1997**, *41*, 1-10.
19. Bandarra,N.M.; Campos,R.M.; Batista,I.; Nunes,M.L.; Empis,J.M. Antioxidant synergy of alpha-tocopherol and phospholipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1999**, *76*, 905-913.
20. Bang,D.Y.; Ahn,E.; Moon,M.H. Shotgun analysis of phospholipids from mouse liver and brain by nanoflow liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2007**, *852*, 268-277.

21. Bang,D.Y.; Kang,D.; Moon,M.H. Nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the characterization of intact phosphatidylcholines from soybean, bovine brain, and liver. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1104*, 222-229.
22. Barrios,J.M.; Lichtenberger,L.M. Role of biliary phosphatidylcholine in bile acid protection and nsaid injury of the ileal mucosa in rats. *Gastroenterology* **2000**, *118*, 1179-1186.
23. Barroso,B.; Bischoff,R. LC-MS analysis of phospholipids and lysophospholipids in human bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2005**, *814*, 21-28.
24. Bartus,R.T.; Dean,R.L.; Pontecorvo,M.J.; Flicker,C. The cholinergic hypothesis: A historical overview, current perspective, and future directions. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1985**, *444*, 332-358.
25. Belitz,H.D.; Grosch,W. *Food chemistry*, Springer, 2nd ed.; **1999**.
26. Bidulescu,A.; Chambless,L.E.; Siega-Riz,A.M.; Zeisel,S.H.; Heiss,G. Usual choline and betaine dietary intake and incident coronary heart disease: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *BMC Cardiovascular Disorders* **2007**, *7*.
27. Bishop,W.R.; Bell,R.M. Assembly of phospholipids into cellular membranes: Biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annual Review of Cell Biology* **1988**, *4*, 579-610.
28. Bligh,E.G.; Dyer,E.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **1959**, *37*, 911.
29. Bonoli,M.; Caboni,M.F.; Rodriguez-Estrada,M.T.; Lercker,G. Effect of processing technology on the quality and composition of lipids of precooked chicken patties. *International Journal of Food Science and Technology* **2008**, *43*, 296-308.
30. Bourre,J.M.; Dumont,O. The administration of pig brain phospholipids versus soybean phospholipids in the diet during the period of brain development in the rat results in greater increments of brain docosahexaenoic acid. *Neuroscience Letters* **2002**, *335*, 129-133.
31. Boushey,C.J.; Beresford,S.A.A.; Omenn,G.S.; Motulsky,A.G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: Probable benefits of increasing folic acid intakes. *Journal of the American Medical Association* **1995**, *274*, 1049-1057.
32. Brash,A.R. Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 23679-23682.
33. Brouwers,J.F.H.M.; Gadella,B.M.; van Golde,L.M.G.; Tielens,A.G.M. Quantitative analysis of phosphatidylcholine molecular species using HPLC and light scattering detection. *Journal of Lipid Reserach* **1998**, *39*, 344-353.
34. Brown,W.V. Hypercholesterolemia in the United States: How far have we come? *American Journal of Medicine* **1997**, *102*, 3-6.
35. Byrdwell,W.C.; Neff,W.E. Non-volatile products of triolein produced at frying temperatures characterized using liquid chromatography with online mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **1999**, *852*, 417-432.
36. Byrdwell,W.C.; Neff,W.E. Autoxidation products of normal and genetically modified canola oil varieties determined using liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* **2001**, *905*, 85-102.

37. Byrdwell, W.; Neff, W.E. Dual parallel electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (MS), MS/MS and MS/MS/MS for the analysis of triacylglycerols and triacylglycerol oxidation products. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 300-319.
38. Carelli, A.; Brevedan, M.; Crapiste, G. Quantitative determination of phospholipids in sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1997**, *74*, 511-514.
39. Carlsen, C.U.; Moller, J.K.S.; Skibsted, L.H. Heme-iron in lipid oxidation. *Coordination Chemistry Reviews* **2005**, *249*, 485-498.
40. Carrie, I.; Clement, M.; De Javel, D.; Frances, H.; Bourre, J.M. Phospholipid supplementation reverses behavioral and biochemical alterations induced by n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency in mice. *Journal of Lipid Research* **2000**, *41*, 473-480.
41. Catala, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids* **2009**, *157*, 1-11.
42. Catchpole, O.J.; Tallon, S.J.; Eltringham, W.E.; Grey, J.B.; Fenton, K.A.; Vagi, E.M.; Vyssotski, M.V.; MacKenzie, A.N.; Ryan, J.; Zhu, Y. The extraction and fractionation of specialty lipids using near critical fluids. *Journal of Supercritical Fluids* **2009**, *47*, 591-597.
43. Chan, H.W.S.; Levett, G. Autoxidation of methyl linoleate. Separation and analysis of isomeric mixtures of methyl linoleate hydroperoxides and methyl hydroxylinoleates. *Lipids* **1977**, *12*, 99-104.
44. Chan, H.W.S.; Levett, G. Autoxidation of methyl linolenate: Analysis of methyl hydroxylinolenate isomers by high performance liquid chromatography. *Lipids* **1977**, *12*, 837-840.
45. Chanussot, F. *La lécithine dans l'alimentation*, Ted et Doc ed.; Lavoisier: **2008**.
46. Chanussot, F.; Domingo, N.; Polichetti, E. Reverse cholesterol transport and antiatherogenic properties of HDL. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **1999**, *34*, 311-317.
47. Chaudhuri, P.; Colles, S.M.; Damron, D.S.; Graham, L.M. Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration by increasing intracellular calcium and activating calpain. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* **2003**, *23*, 218-223.
48. Chen, X.; Zhang, W.; Laird, J.; Hazen, S.L.; Salomon, R.G. Polyunsaturated phospholipids promote the oxidation and fragmentation of gamma -hydroxyalkenals: formation and reactions of oxidatively truncated ether phospholipids. *Journal of Lipid Research* **2007**, M700598-MJLR200.
49. Cho, S.Y.; Joo, D.S.; Choi, H.G.; Naraand, E.; Miyashita, K. Oxidative stability of lipids from squid tissues. *Fisheries Science* **2001**, *67*, 738-743.
50. Christie, W.W. *Lipid analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, Third edition ed.; The Oily Press: Shepperton, **2003**.
51. Cosgrove, J.P.; Church, D.F.; Pryor, W.A. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids* **1987**, *22*, 299-304.
52. Coste, T.C.; Gerbi, A.; Vague, P.; Armand, M.; Pieroni, G.; Raccah, D. Supplementations with polyunsaturated fatty acids in diabetic neuropathy. *Cahiers de Nutrition et de Diététique* **2004**, *39*, 185-194.
53. Crook, T.; Petrie, W.; Wells, C.; Massari, D.C. Effects of phosphatidylserine in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology Bulletin* **1992**, *28*, 61-66.
54. Da Costa, K.A.; Gaffney, C.E.; Fischer, L.M.; Zeisel, S.H. Choline deficiency in mice and humans is associated with increased plasma homocysteine concentration after a methionine load. *American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, *81*, 440-444.

55. DeLong,C.J.; Shen,Y.J.; Thomas,M.J.; Cui,Z. Molecular distinction of phosphatidylcholine synthesis between the CDP- choline pathway and phosphatidylethanolamine methylation pathway. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 29683-29688.
56. Dennis,E.A.; Kennedy,E.P. Intracellular sites of lipid synthesis and the biogenesis of mitochondria. *Journal of Lipid Research* **1972**, *13*, 263-267.
57. Dobson,G.; Deighton,N. Analysis of phospholipid molecular species by liquid chromatography -- atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry of diacylglycerol nicotines. *Chemistry and Physics of Lipids* **2001**, *111*, 1-17.
58. Duane,W.C.; Wiegand,D.M.; Sievert,C.E. Bile acid and bile salt disrupt gastric mucosal barrier in the dog by different mechanisms. *The American journal of physiology* **1982**, *242*, G95-G99.
59. Farmer,E.H.; Sutton,D.A. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. Part IV. The isolation and constitution of photochemically-formed methyl oleate peroxide. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1943**, 119-122.
60. Folch,J.; Lees,M.; Stanley,G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **1957**, *226*, 497-509.
61. Frankel,E.N.; Neff,W.E.; Selke,E. Analysis of autoxidized fats by gas chromatography-mass spectrometry: VII. Volatile thermal decomposition products of pure hydroperoxides from autoxidized and photosensitized methyl oleate, linoleate and linolenate. *Lipids* **1981**, *16*, 279.
62. Frankel,E.N. *Lipid Oxidation*, 2<sup>nd</sup> edition ed.; The Oily Press: **2005**.
63. Giuffrida,F.; Destailats,F.; Skibsted,L.H.; Dionisi,F. Structural analysis of hydroperoxy- and epoxy-triacylglycerols by liquid chromatography mass spectrometry. *Chemistry and Physics of Lipids* **2004**, *131*, 41-49.
64. Gleize,B.; Payet,M.; Esmail,M.H.; Pieroni,G.; Coste,T.C. Docosahexaenoic acid-enriched egg phospholipids supplementation induces accretion of arachidonic acid in rat blood lipids. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* **2004**, *50*, 861-867.
65. Goodnight,S.H., Jr.; Harris,W.S.; Connor,W.E.; Illingworth,D.R. Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* **1982**, *2*, 87-113.
66. Grandmaison,P.A.; Nanowski,T.S.; Vance,J.E. Externalization of phosphatidylserine during apoptosis does not specifically require either isoform of phosphatidylserine synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2004**, *1636*, 1-11.
67. Gross,C.S.; Simms,P.J.; Towne,R.W.; Miller,R.E. Quantitative determination of dipalmitoylphosphatidylcholine and palmitic acid in porcine lung surfactants used in the treatment of respiratory distress syndrome. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2000**, *744*, 407-413.
68. Guan,Z.; Gruenler,J.; Piao,S.; Sindelar,P.J. Separation and quantitation of phospholipids and their ether analogues by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* **2001**, *297*, 137-143.
69. Harrabi,S.; Herchi,W.; Kallel,H.; Mayer,P.M.; Boukhchina,S. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of glycerophospholipids in corn oil. *Food Chemistry* **2009**, *114*, 712-716.
70. Heinemann,K.M.; Waldron,M.K.; Bigley,K.E.; Lees,G.E.; Bauer,J.E. Long-Chain (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids Are More Efficient than {alpha}-Linolenic Acid in Improving Electroretinogram Responses of Puppies Exposed during Gestation, Lactation, and Weaning. *Journal of Nutrition* **2005**, *135*, 1960-1966.

71. Heiss,W.D.; Kessler,J.; Mielke,R.; Szekely,B.; Herholz,K. Long-term effects of phosphatidylserine, pyritinol, and cognitive training in Alzheimer's disease. A neuropsychological, EEG, and PET investigation. *Dementia* **1994**, *5*, 88-98.
72. Hidalgo,F.J.; Nogales,F.; Zamora,R. Determination of pyrrolized phospholipids in oxidized phospholipid vesicles and lipoproteins. *Analytical Biochemistry* **2004**, *334*, 155.
73. Hirsch,M.J.; Growdon,J.H.; Wurtman,R.J. Relations between dietary choline or lecithin intake, serum choline levels, and various metabolic indices. *Metabolism: Clinical and Experimental* **1978**, *27*, 953-960.
74. Hodis,H.N.; Mack,W.J.; Dustin,L.; Mahrer,P.R.; Azen,S.P.; Detrano,R.; Selhub,J.; Alaupovic,P.; Liu,C.R.; Liu,C.H.; Hwang,J.; Wilcox,A.G.; Selzer,R.H. High-dose B vitamin supplementation and progression of subclinical atherosclerosis: A randomized controlled trial. *Stroke* **2009**, *40*, 730-736.
75. Horrocks,L.A.; Yeo Young K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacological Research* **1999**, *40*, 211-225.
76. Houjou,T.; Yamatani,K.; Imagawa,M.; Shimizu,T.; Taguchi,R. A shotgun tandem mass spectrometric analysis of phospholipids with normal-phase and/or reverse-phase liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 654-666.
77. Hsu,F.F.; Bohrer,A.; Turk,J. Formation of Lithiated Adducts of Glycerophosphocholine Lipids Facilitates their Identification by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9*, 516-526.
78. Hvattum,E.; Hagelin,G.; Larsen,A. Study of mechanisms involved in the collision-induced dissociation of carboxylate anions from glycerophospholipids using negative ion electrospray tandem quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1998**, *12*, 1405-1409.
79. Innis,S.M.; Nelson,C.M.; Lwanga,D.; Rioux,F.M.; Waslen,P. Feeding formula without arachidonic acid and docosahexaenoic acid has no effect on preferential looking acuity or recognition memory in healthy full-term infants at 9 mo of age. *American Journal of Clinical Nutrition* **1996**, *64*, 40-46.
80. Iqbal,J.; Hussain,M.M. Intestinal lipid absorption. *American Journal of Physiology - Endocrinological Metabolism* **2009**, *296*, E1183-E1194.
81. Ishinaga,M.; Ueda,A.; Mochizuki,T.; Sugiyama,S.; Kobayashi,T. Cholesterol intake is associated with lecithin intake in Japanese people. *Journal of Nutrition* **2005**, *135*, 1451-1455.
82. Izaki,Y.; Hashimoto,M.; Arita,J.; Iriki,M.; Hibino,H. Intraperitoneal injection of 1-oleoyl-2-docosahexaenoyl phosphatidylcholine enhances discriminatory shock avoidance learning in rats. *Neuroscience Letters* **1994**, *167*, 171-174.
83. Jansen,S.M.; Groener,J.E.M.; Poorthuis,B.J.H.M. Lysosomal phospholipase activity is decreased in mucopolidosis II and III fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1999**, *1436*, 363-369.
84. Jelsema,C.L.; Morre,D.J. Distribution of phospholipid biosynthetic enzymes among cell components of rat liver. *Journal of Biological Chemistry* **1978**, *253*, 7960-7971.
85. Jewell,N.E.; Nawar,W.W. Thermal oxidation of phospholipids. 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine. *Journal of the American Oil Chemical Society* **1980**, *57*, 398.
86. Jimenez,M.A.; Scarino,M.L.; Vignolini,F.; Mengheri,E. Evidence that polyunsaturated lecithin induces a reduction in plasma cholesterol level and favorable changes in lipoprotein composition in hypercholesterolemic rats. *Journal of Nutrition* **1990**, *120*, 659-667.

87. Judde,A.; Villeneuve,P.; Rossignol-Castera,A.; le Guillou,A. Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2003**, *80*, 1209.
88. Kakela,R.; Somerharju,P.; Tyynela,J. Analysis of phospholipid molecular species in brains from patients with infantile and juvenile neuronal-ceroid lipofuscinosis using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry* **2003**, *84*, 1051-1065.
89. Kaluzny,M.A.; Duncan,L.A.; Merritt,M.V.; Epps,D.E. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of Lipid Research* **1985**, *26*, 135-140.
90. Kashyap,M.L. Cholesterol and atherosclerosis: a contemporary perspective. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* **1997**, *26*, 517-523.
91. Kivini,H.; Jarvenpaa,E.P.; Aro,H.; Huopalahti,R.; Ryhanen,E.L. Qualitative and Quantitative Liquid Chromatographic Analysis Methods for the Determination of the Effects of Feed Supplements on Hen Egg Yolk Phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 4289-4295.
92. Koga,T.; Terao,J. Phospholipids increase radical-scavenging activity of vitamin E in a bulk oil model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 1450.
93. Kuhnz,W.; Zimmermann,B.; Nau,H. Improved separation of phospholipids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography - Biomedical Applications* **1985**, *344*, 309-312.
94. Kuksis,A.; Breckenridge,W.C.; Marai,L.; Stachnyk,O. Molecular species of lecithins of rat heart, kidney, and plasma. *Journal of Lipid Research* **1969**, *10*, 25-32.
95. Kume,N.; Gimbrone,J. Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* **1994**, *93*, 907-911.
96. Kusumoto,N.; Ando,Y.; Matsukura,R.; Mukai,T. Lipid profile of krill *Euphausia pacifica* collected in the pacific ocean near Funka Bay, Hokkaido, Japan. *Journal of Oleo Science* **2004**, *53*, 45-51.
97. Lagarde,M.; Bernoud,N.; Brossard,N.; Lemaitre-Delaunay,D.; Thies,F.; Croset,M.; Lecerf,J. Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain. *Journal of Molecular Neuroscience* **2001**, *16*, 201-204.
98. Law,M.R.; Wald,N.J.; Thompson,S.G. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *British Medical Journal* **1994**, *308*, 367-372.
99. Le Grandois,J.; Marchioni,E.; Zhao,M.; Giuffrida,F.; Ennahar,S.; Bindler,F. Investigation of Natural Phosphatidylcholine Sources: Separation and Identification by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS2) of Molecular Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 6014-6020.
100. Leblond,J.D.; Chapman,P.J. Lipid class distribution of highly unsaturated long chain fatty acids in marine dinoflagellates. *Journal of Phycology* **2000**, *36*, 103-108.
101. Lee,S.H.; Han,Y.M.; Min,B.H.; Park,I.S. Cytoprotective effects of polyenylphosphatidylcholine (PPC) on +1-cells during diabetic induction by streptozotocin. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **2003**, *51*, 1005-1015.
102. Lemaitre-Delaunay,D.; Pachiardi,C.; Laville,M.; Pousin,J.; Armstrong,M.; Lagarde,M. Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [13C]DHA in phosphatidylcholine. *Journal of Lipid Research* **1999**, *40*, 1867-1874.
103. Lercker,G.; Bortolomeazzi,R.; Pizzale,L. Thermal degradation of single methyl oleate hydroperoxides obtained by photosensitized oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1998**, *75*, 1115-1120.

104. Lessig,J.; Gey,C.; Süß,R.; Schiller,J.; Glander,H.J.; Arnhold,J. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and <sup>31</sup>P NMR spectroscopy. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* **2004**, *137*, 265-277.
105. Lieber,C.S.; Robins,S.J.; Li,J.; DeCarli,L.M.; Mak,K.M.; Fasulo,J.M.; Leo,M.A. Phosphatidylcholine protects against fibrosis and cirrhosis in the baboon. *Gastroenterology* **1994**, *106*, 152-159.
106. Luberto,C.; Hannun,Y.A. Sphingolipid metabolism in the regulation of bioactive molecules. *Lipids* **1999**, *34*, S5-S11
107. Lutzke,B.S.; Braughler,J.M. An improved method for the identification and quantitation of biological lipids by HPLC using laser light-scattering detection. *Journal of Lipid Research* **1990**, *31*, 2127-2130.
108. Lyberg,A.M.; Fasoli,E.; Adlercreutz,P. Monitoring the oxidation of docosahexaenoic acid in lipids. *Lipids* **2005**, *40*, 969-979.
109. Ma,Y.C.; Kim,H.Y. Development of the on-line high-performance liquid chromatography/thermospray mass spectrometry method for the analysis of phospholipid molecular species in rat brain. *Analytical Biochemistry* **1995**, *226*, 293-301.
110. Makrides,M.; Simmer,K.; Goggin,M.; Gibson,R.A. Erythrocyte docosahexaenoic acid correlates with the visual response of healthy, term infants. *Pediatric Research* **1993**, *33*, 425-427.
111. Marai,L.; Kuksis,A. Molecular species of lecithins from erythrocytes and plasma of man. *Journal of Lipid Research* **1969**, *10*, 141-152.
112. Mastellone,I.; Polichetti,E.; Gres,S.; De La Maisonneuve,C.; Domingo,N.; Marin,V.; Lorec,A.M.; Farnarier,C.; Portugal,H.; Kaplanski,G.; Chanussot,F. Dietary soybean phosphatidylcholines lower lipidemia: Mechanisms at the levels of intestine, endothelial cell, and hepato-biliary axis. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2000**, *11*, 461-466.
113. McCully,K.S. Homocysteine and vascular disease. *Nature Medicine* **1996**, *2*, 386-389.
114. Moe,M.K.; Anderssen,T.; Strom,M.B.; Jensen,E. Vicinal hydroxylation of unsaturated fatty acids for structural characterization of intact neutral phospholipids by negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 2121-2130.
115. Moe,M.K.; Anderssen,T.; Strom,M.B.; Jensen,E. Total structure characterization of unsaturated acidic phospholipids provided by vicinal di-hydroxylation of fatty acid double bonds and negative electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 46-59.
116. Montanari,L.; King,J.W.; List,G.R.; Rennick,K.A. Selective extraction of phospholipid mixtures by supercritical carbon dioxide and cosolvents. *Journal of Food Science* **1996**, *61*, 1230-1233+1253.
117. Moolenaar,W.H. LPA: A novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends in Cell Biology* **1994**, *4*, 213-219.
118. Moolenaar,W.H. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 12949-12952.
119. Mori,A.L.; Porzio,M.A.; Schaleger,L.L. Kinetics and mechanism of epoxy ether hydrolysis. I. Mechanism of the hydrolysis of an acyclic hemiacetal intermediate. *Journal of the American Chemical Society* **1972**, *94*, 5034-5039.
120. Moriya,H.; Kunimino,T.; Hosokawa,M.; Fukunaga,K.; Nishiyama,T.; Miyashita,K. Oxidative stability of salmon and herring roe lipids and their dietary effect on plasma cholesterol levels of rats. *Fisheries Science* **2007**, *73*, 668-674.

121. Mozzi,R.; Buratta,S.; Goracci,G. Metabolism and Functions of Phosphatidylserine in Mammalian Brain. *Neurochemical Research* **2003**, *28*, 195-214.
122. Makinen,M.; Piironen,V.; Hopia,A. Postcolumn chemiluminescence, ultraviolet and evaporative light-scattering detectors in high-performance liquid chromatographic determination of triacylglycerol oxidation products. *Journal of Chromatography A* **1996**, *734*, 221-229.
123. Neff,W.E.; Byrdwell,W.C. Characterization of model triacylglycerol (triolein, trilinolein and trilinolenin) autoxidation products via high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1998**, *818*, 169-186.
124. Nwosu,C.; Boyd,L.; Sheldon,B. Effect of fatty acid composition of phospholipids on their antioxidant properties and activity index. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1997**, *74*, 293-297.
125. Olsson,N.U.; Salem,N. Molecular species analysis of phospholipids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1997**, *692*, 245-256.
126. Olszewski,A.J.; Szostak,W.B.; Bialkowska,M.; Rudnicki,S.; McCully,K.S. Reduction of plasma lipid and homocysteine levels by pyridoxine, folate, cobalamin, choline, riboflavin, and troxerutin in atherosclerosis. *Atherosclerosis* **1989**, *75*, 1-6.
127. Pacetti,D.; Boselli,E.; Hulan,H.W.; Frega,N.G. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry of phospholipid molecular species in eggs from hens fed diets enriched in seal blubber oil. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1097*, 66-73.
128. Palacios,L.E.; Wang,T. Egg-yolk lipid fractionation and lecithin characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2005**, *82*, 571-578.
129. Palacios,L.E.; Wang,T. Extraction of egg-yolk lecithin. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2005**, *82*, 565-569.
130. Parmentier,M.; Sayed Mahmoud,C.; Linder,M.; Fanni,J. Polar lipids: n-3 PUFA carriers for membranes and brain: nutritional interest and emerging processes. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* **2007**, *14*, 224-229.
131. Paulus,H.; Kennedy,E.P. The Enzymatic Synthesis of Inositol Monophosphatide. *Journal of Biological Chemistry* **1960**, *235*, 1303-1311.
132. Payet,M.; Esmail,M.H.; Polichetti,E.; Le Brun,G.; Adjemout,L.; Donnarel,G.; Portugal,H.; Pieroni,G. Docosahexaenoic acid-enriched egg consumption induces accretion of arachidonic acid in erythrocytes of elderly patients. *British Journal of Nutrition* **2004**, *91*, 789-796.
133. Peng,S.K.; Taylor,C.B. Cholesterol autoxidation, health and arteriosclerosis. A review on situations in developed countries. *World review of nutrition and dietetics* **1984**, *44*, 117-154.
134. Pernet,F.; Pelletier,C.J.; Milley,J. Comparison of three solid-phase extraction methods for fatty acid analysis of lipid fractions in tissues of marine bivalves. *Journal of Chromatography, A* **2006**, *1137*, 127-137.
135. Peterson,B.L.; Cummings,B.S. A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples. *Biomedical Chromatography* **2006**, *20*, 227-243.
136. Polichetti,E.; Diaconescu,N.; De La Porte,P.L.; Malli,L.; Portugal,H.; Pauli,A.M.; Lafont,H.; Tuchweber,B.; Yousef,I.; Chanussot,F. Cholesterol-lowering effect of soyabean lecithin in normolipidaemic rats by stimulation of biliary lipid secretion. *British Journal of Nutrition* **1996**, *75*, 471-481.

137. Polichetti,E.; Janisson,A.; De La Porte,P.L.; Portugal,H.; Leonardi,J.; Luna,A.; La Droite,P.; Chanussot,F. Dietary polyenylphosphatidylcholine decreases cholesterolemia in hypercholesterolemic rabbits: Role of the hepato-biliary axis. *Life Sciences* **2000**, *67*, 2563-2576.
138. Pownall,H.J.; Ehnholm,C. Enhancing reverse cholesterol transport: The case for phosphatidylcholine therapy. *Current Opinion in Lipidology* **2005**, *16*, 265-268.
139. Pulfer,M.; Murphy,R.C. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *22*, 332-364.
140. Reis,A.; Domingues,M.R.M.; Amado,F.M.L.; Ferrer-Correia,A.J.V.; Domingues,P. Separation of peroxidation products of diacyl-phosphatidylcholines by reversed-phase liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* **2005**, *19*, 129-137.
141. Reis,A.; Domingues,P.; Ferrer-Correia,A.J., V; Domingues,M.R.M. Tandem mass spectrometry of intact oxidation products of diacylphosphatidylcholines: evidence for the occurrence of the oxidation of the phosphocholine head and differentiation of isomers. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 1513-1522.
142. Reis,A.; Domingues,M.R.M.; Amado,F.M.L.; Ferrer-Correia,A.J.; Domingues,P. Radical peroxidation of palmitoyl-linoleoyl-glycerophosphocholine liposomes: Identification of long-chain oxidised products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2007**, *855*, 186-199.
143. Rombaut,R.; Camp,J.V.; Dewettinck,K. Analysis of Phospho- and Sphingolipids in Dairy Products by a New HPLC Method. *Journal of Dairy Science* **2005**, *88*, 482-488.
144. Saito,H.; Kotani,Y.; Keriko,J.M.; Xue,C.; Taki,K.; Ishihara,K.; Ueda,T.; Miyata,S. High levels of n-3 polyunsaturated fatty acids in *Euphausia pacifica* and its role as a source of docosahexaenoic and icosapentaenoic acids for higher trophic levels. *Marine Chemistry* **2002**, *78*, 9-28.
145. Samet,J.M.; Friedman,M.; Henke,D.C. High-performance liquid chromatography separation of phospholipid classes and arachidonic acid on cyanopropyl columns. *Analytical Biochemistry* **1989**, *182*, 32-36.
146. Schiller,J.; Arnhold,J.; Glander,H.J.; Arnold,K. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy - Effects of freezing and thawing. *Chemistry and Physics of Lipids* **2000**, *106*, 145-156.
147. Schiller,J.; Mueller,K.; Suess,R.; Arnhold,J.; Gey,C.; Herrmann,A.; Lessig,J.; Arnold,K.; Mueller,P. Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry - A cautionary note. *Chemistry and Physics of Lipids* **2003**, *126*, 85-94.
148. Selhub,J.; Jacques,P.F.; Bostom,A.G.; D'Agostino,R.B.; Wilson,P.W.F.; Belanger,A.J.; O'Leary,D.H.; Wolf,P.A.; Schaefer,E.J.; Rosenberg,I.H. Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis. *New England Journal of Medicine* **1995**, *332*, 286-291.
149. Selke,E.; Frankel,E.N.; Neff,W.E. Thermal decomposition of methyl oleate hydroperoxides and identification of volatile components by gas chromatography-mass spectrometry. *Lipids* **1978**, *13*, 511-513.
150. Shahidi,F. *Nutraceutical and Specialty Lipids and their Co-Products*, CRC Press ed.; Taylor & Francis: **2006**.
151. Shaul,P.W.; Mineo,C. HDL action on the vascular wall: Is the answer NO? *Journal of Clinical Investigation* **2004**, *113*, 509-513.
152. Shiao,Y.J.; Lupo,G.; Vance,J.E. Evidence that phosphatidylserine is imported into mitochondria via a mitochondria-associated membrane and that the majority of mitochondrial phosphatidylethanolamine is

- derived from decarboxylation of phosphatidylserine. *Journal of Biological Chemistry* **1995**, *270*, 11190-11198.
153. Sjovall,O.; Kuksis,A.; Marai,L.; Myher,J. Elution factors of synthetic oxotriacylglycerols as an aid in identification of peroxidized natural triacylglycerols by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. *Lipids* **1997**, *32*, 1211-1218.
  154. Sjovall,O.; Kuksis,A.; Kallio,H. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of tert.-butyl hydroperoxide oxidation products of unsaturated triacylglycerols. *Journal of Chromatography A* **2001**, *905*, 119-132.
  155. Slim,R.; Hammock,B.D.; Toborek,M.; Robertson,L.W.; Newman,J.W.; Morisseau,C.H.P.; Watkins,B.A.; Saraswathi,V.; Hennig,B. The role of methyl-linoleic acid epoxide and diol metabolites in the amplified toxicity of linoleic acid and polychlorinated biphenyls to vascular endothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2001**, *171*, 184-193.
  156. Smith,P.; Waters,W.A. Oxidations of organic compounds by cobaltic salts. Part XII. Oxidations of unsaturated acids. *Journal of the Chemical Society B: Physical Organic* **1969**, 462-467.
  157. Sommerer,D.; Suess,R.; Hammerschmidt,S.; Wirtz,H.; Arnold,K.; Schiller,J. Analysis of the phospholipid composition of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from man and minipig by MALDI-TOF mass spectrometry in combination with TLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, *35*, 199-206.
  158. Song,J.H.; Inoue,Y.; Miyazawa,T. Oxidative Stability of Docosaehaenoic Acid-containing Oils in the Form of Phospholipids, Triacylglycerols, and Ethyl Esters. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **1997**, *61*, 2085-2088.
  159. Souci,S.W.; Fachmann,W.; Kraut,H. Food composition and nutrition tables. CRC Press, Ed.; medpharm: **1994**.
  160. Stampfer,M.J.; Malinow,M.R.; Willett,W.C.; Newcomer,L.M.; Upson,B.; Ullmann,D.; Tishler,P.V.; Hennekens,C.H. A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of myocardial infarction in US physicians. *Journal of the American Medical Association* **1992**, *268*, 877-881.
  161. Stith,B.J.; Hall,J.; Ayres,P.; Waggoner,L.; Moore,J.D.; Shaw,W.A. Quantification of major classes of Xenopus phospholipids by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Lipid Research* **2000**, *41*, 1448-1454.
  162. Stoll,L.L.; Oskarsson,H.J.; Spector,A.A. Interaction of lysophosphatidylcholine with aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **1992**, *262*, H1853-H1860.
  163. Sukenik,A.; Wannon,R. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. Isochrysis galbana. *Aquaculture* **1991**, *97*, 61-72.
  164. Sundler,R.; Akesson,B. Biosynthesis of phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines from ethanolamine and choline in rat liver. *Biochemical Journal* **1975**, *146*, 309-315.
  165. Szebeni,J.; Toth,K. Lipid peroxidation in hemoglobin-containing liposomes. Effects of membrane phospholipid composition and cholesterol content. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **1986**, *857*, 139-145.
  166. Takeuchi,M.; Hara,S.; Totani,Y.; Hibino,H.; Tanaka,Y. Autooxidative Behavior of Polyunsaturated Phospholipids.I. Oxidative Stability of Marine Oil Containing Polyunsaturated Phospholipids. *Journal of Japanese Oil Chemical Society* **1997**, *46*, 175-181.
  167. Taylor,S.L.; King,J.W.; Montanari,L.; Fantozzi,P.; Blanco,M.A. Enrichment and fractionation of phospholipid concentrates by supercritical fluid extraction and chromatography. *Italian Journal of Food Science* **2000**, *12*, 65-76.

168. Terao, J.; Matsushita, S. Geometrical isomers of monohydroperoxides formed by autoxidation of methyl linoleate. *Agricultural and Biological Chemistry* **1977**, *41*, 2401-2405.
169. Therond, P.; Couturier, M.; Demelier, J.F.; Lemonnier, F. Simultaneous determination of the main molecular species of soybean phosphatidylcholine or phosphatidylethanolamine and their corresponding hydroperoxides obtained by lipoxygenase treatment. *Lipids* **1993**, *28*, 245-249.
170. Thevenon, C.; El Bawab, S.; Chantegrel, B.; Lagarde, M. Highly sensitive measurement of lipid molecular species from biological samples by fluorimetric detection coupled to high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1998**, *708*, 39-47.
171. Tijburg, L.B.M.; Samborski, R.W.; Vance, D.E. Evidence that remodeling of the fatty acids of phosphatidylcholine is regulated in isolated rat hepatocytes and involves both the sn-1 and sn-2 positions. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* **1991**, *1085*, 184-190.
172. Tokumura, A.; Kanaya, Y.; Kitahara, M.; Miyake, M.; Yoshioka, Y.; Fukuzawa, K. Increased formation of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in serum of hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Lipid Research* **2002**, *43*, 307-315.
173. Toschi, T.; Costa, A.; Lercker, G. Gas chromatographic study on high-temperature thermal degradation products of methyl linoleate hydroperoxides. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1997**, *74*, 387-391.
174. Treede, I.; Braun, A.; Sparla, R.; Kuehnel, M.; Giese, T.; Turner, J.R.; Anes, E.; Kulaksiz, H.; Feullekrug, J.; Stremmel, W.; Griffiths, G.; Eehalt, R. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, 27155-27164.
175. Uran, S.; Larsen, A.; Jacobsen, P.B.; Skotland, T. Analysis of phospholipid species in human blood using normal-phase liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2001**, *758*, 265-275.
176. Vance, J.E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *Journal of Lipid Research* **2008**, *49*, 1377-1387.
177. Vance, J.E.; Vance, D.E. Does rat liver Golgi have the capacity to synthesize phospholipids for lipoprotein secretion? *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 5898-5909.
178. Vecchini, A.; Panagia, V.; Binaglia, L. Analysis of phospholipid molecular species. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1997**, *172*, 129-136.
179. Velasco, J.; Berdeaux, O.; Marquez-Ruiz, G.; Dobarganes, M.C. Sensitive and accurate quantitation of monoepoxy fatty acids in thermoxidized oils by gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2002**, *982*, 145-152.
180. Verschuren, W.M.M.; Jacobs, D.R.; Bloemberg, B.P.M.; Kromhout, D.; Menotti, A.; Aravanis, C.; Blackburn, H.; Buzina, R.; Dontas, A.S.; Fidanza, F.; Karvonen, M.J.; Nedeljkovic, S.; Nissinen, A.; Toshima, H. Serum total cholesterol and long-term coronary heart disease mortality in different cultures: Twenty-five-year follow-up of the seven countries study. *Journal of the American Medical Association* **1995**, *274*, 131-136.
181. Wang, J.Y.; Wang, Z.Y.; Kouyama, T.; Shibata, T.; Ueki, T. Significance of amino groups of phosphatidylethanolamine in phospholipid peroxidation of mixed liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* **1994**, *71*, 197-203.
182. Wang, T.; Hammond, E.; Cornette, J.; Fehr, W. Fractionation of soybean phospholipids by high-performance liquid chromatography with an evaporative light-scattering detector. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1999**, *76*, 1313-1321.

183. Wen,Z.; Kim,H.Y. Alterations in hippocampal phospholipid profile by prenatal exposure to ethanol. *Journal of Neurochemistry* **2004**, *89*, 1368-1377.
184. Wijendran,V.; Huang,M.C.; Diau,G.Y.; Boehm,G.; Nathanielsz,P.W.; Brenna,J.T. Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates. *Pediatric Research* **2002**, *51*, 265-272.
185. Wilson,R.; Bell,M.V. Molecular species composition of glycerophospholipids from white matter of human brain. *Lipids* **1993**, *28*, 13-17.
186. Wood,R.; Harlow,R.D. Structural analyses of rat liver phosphoglycerides. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1969**, *135*, 272-281.
187. Wu,Y.; Wang,T. Soybean lecithin fractionation and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2003**, *80*, 319-326.
188. Wu,Y.; Wang,T. Fractionation of crude soybean lecithin with aqueous ethanol. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2004**, *81*, 697-704.
189. Wurtman,R.J.; Hirsch,M.J.; Growdon,J.H. Lecithin consumption raises serum free choline levels. *Lancet* **1977**, *2*, 68-69.
190. Yanishlieva,N.; Marinova,E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry* **1995**, *54*, 377-382.
191. Yin,M.C.; Faustman,C. Influence of temperature, pH, and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid: A liposome model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1993**, *41*, 853-857.
192. Yip,S.H.H.; Ashraf-Khorassani,M.; Taylor,L.T. Analytical scale supercritical fluid fractionation and identification of single polar lipids from deoiled soybean lecithin. *Journal of Separation Science* **2008**, *31*, 1290-1298.
193. Yoshimoto,M.; Miyazaki,Y.; Umemoto,A.; Walde,P.; Kuboi,R.; Nakao,K. Phosphatidylcholine vesicle-mediated decomposition of hydrogen peroxide. *Langmuir* **2007**, *23*, 9416-9422.
194. Zeisel,S.H.; Blusztajn,J.K. Choline and human nutrition. *Annual Review of Nutrition* **1994**, *14*, 269-296.
195. Zhu,X.; Song,J.; Mar,M.H.; Edwards,L.J.; Zeisel,S.H. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) knockout mice have hepatic steatosis and abnormal hepatic choline metabolite concentrations despite ingesting a recommended dietary intake of choline. *Biochemical Journal* **2003**, *370*, 987-993.