

N° d'ordre : 2929

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES,
SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

Noredine MOUSSAOUI

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

**FORMULATION DE LIPOSOMES A HAUTE TENEUR EN ACIDES
GRAS POLY-INSATURES n-3 ADAPTES POUR LA COSMETIQUE
ET/OU LES NUTRACEUTIQUES**

Soutenue le : 10 décembre 2004

Après avis de :

P. Clouet, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

Rapporteurs

P. Méléard, Professeur, ENSC, Rennes

Devant la commission d'examen formée de :

V. Pallet, Professeur, Université Bordeaux 1, Talence

Président et Rapporteur

M. Cansell, Maître de Conférences, Université Bordeaux 1, Talence

Examineurs

P. Clouet, Professeur, Université de Bourgogne, Dijon

P. Méléard, Professeur, ENSC, Rennes

A. Plantefève, Ingénieur, Stéarinerie Dubois, Boulogne

S. Ravaine, Professeur, CRPP, Pessac

A ma famille qui m'a soutenu tout au long de mes études

Ce travail a été réalisé au laboratoire « Unité Nutrition et Signalisation Cellulaire » de l'Université Bordeaux 1, avec le soutien financier de la Stéarinerie Dubois et de l'Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT), dans le cadre d'une convention CIFRE n°279/2000.

Mes premiers remerciements iront à Madame Maud Cansell, Maître de Conférences à l'Université Bordeaux 1 et HDR au laboratoire « Milieux dispersés alimentaires : physico-chimie, formulation et vectorisation nutritionnelle » pour m'avoir initié à la recherche au cours de mon DEA et surtout pour avoir dirigé mes travaux avec compétence, disponibilité et patience.

Je souhaite adresser ma profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur Bernard Entressangles qui a suivi ces travaux avec intérêt. Je vous remercie de l'aide et des conseils que vous m'avez accordés pour l'avancement de ce travail de thèse et l'élaboration de ce mémoire.

Mes remerciements vont également à la Stéarinerie Dubois et plus particulièrement à Monsieur Alain Denizot, Directeur commercial et Mademoiselle Aude Plantefève, Ingénieur interface recherche et développement – marketing, pour l'intérêt qu'ils ont porté à cette thèse.

Monsieur Pierre Clouet, Professeur à l'Université de Bourgogne, je suis très honoré de l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mes remerciements les plus sincères pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Monsieur Philippe Méléard, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, je vous adresse mes plus vifs remerciements pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Madame Véronique Pallet, Professeur à l'Université Bordeaux 1, je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur Serge Ravaine, Professeur au Centre de Recherche Paul Pascal, pour avoir accepté d'examiner ce travail, recevez mes plus vifs remerciements.

Je tiens également à remercier Madame Oda Réiko, Maître de Conférences à l'Université Bordeaux 1, pour son aide dans l'élaboration des clichés de microscopie électronique à transmission.

Je voudrais manifester ma profonde gratitude à toute l'équipe du département de Biochimie – Nutrition de l'ITERG pour leur apport technique et scientifique ainsi que pour leur sympathie. Un grand merci à Nicole Combe, Carole Boué-Vaysse, Laurence Fonséca, Sabrina Serrano, Benjamin Buaud et Nadège Dubourdieu.

Je souhaite remercier Christine Grangé, Laurent Caunes, Liliane Régnier, Alain Pierre Petit et Emilie Leborgne qui ont participé à la bonne réalisation de ce travail.

Je remercie chaleureusement mes amis qui m'ont soutenu tout au long de ces 4 ans. Je pense notamment à Sabrina Serrano, Benjamin Buaud, Jessica Perreira, Lucile Sené et Karine Bermond.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des annexes

Contexte de l'étude	1
A. Synthèse bibliographique.....	5
I. Structure, composition et métabolisme lipidique de la peau	7
I.1. Structure de la peau	7
I.2. Composition lipidique de l'épiderme	9
I.3. Rôles des lipides du <i>stratum corneum</i> dans les fonctions de barrière de la peau	11
I.4. Métabolisme lipidique de l'épiderme.....	15
I.4.1. Métabolisme du cholestérol et des sphingolipides	16
I.4.2. Métabolisme des acides gras	17
I.4.3. Métabolisme des eicosanoïdes.....	19
II. Modification du profil lipidique de la peau par le régime alimentaire.....	25
II.1. Supplémentation des régimes en acides gras poly-insaturés de la série n-3	25
II.2. Supplémentation des régimes en acides gras poly-insaturés de la série n-6	28
II.3. Supplémentation mixte des régimes alimentaires en acides gras poly-insaturés des séries n-3 et n-6.....	30
III. Interactions des liposomes avec la peau	32
III.1. Effets des liposomes sur l'ultrastructure du <i>stratum corneum</i>	32
III.2. Effets des liposomes sur l'état d'hydratation du <i>stratum corneum</i>	37

B.	Matériel et méthodes	39
I.	Préparation et caractérisations physico-chimiques des Marinosomes®	41
I.1.	Préparation des Marinosomes®	41
I.2.	Conditionnement des Marinosomes®	41
I.3.	Caractérisations physiques des Marinosomes®	43
I.4.	Caractérisations chimiques des Marinosomes®	44
I.4.1.	Dosage des produits d'oxydation volatils.....	44
I.4.2.	Hydrolyse non-enzymatique des phospholipides	45
II.	Approche expérimentale pour l'utilisation des Marinosomes® en cosmétique	47
II.1.	Irritation cutanée	47
II.2.	Irritation oculaire.....	47
II.2.1.	Détermination du potentiel irritant sur culture cellulaire	49
II.2.2.	Potentiel irritant sur membrane chorio-allantoïdienne	50
II.2.3.	Activité anti-inflammatoire	53
III.	Approche expérimentale pour l'utilisation des Marinosomes® en nutrition	55
III.1.	Animaux	55
III.2.	Régimes alimentaires	55
III.3.	Protocoles nutritionnels et sacrifices.....	56
III.4.	Extraction et analyses des extraits lipidiques.....	58
III.4.1.	Extraction des lipides totaux.....	58
III.4.2.	Fractionnement des lipides totaux	58
III.4.3.	Analyse des acides gras	59
III.4.4.	Dosage du phosphore.....	60
III.4.5.	Dosage des triglycérides.....	60
III.4.6.	Dosage du cholestérol total.....	61
III.5.	Traitements statistiques des résultats	61

C.	Résultats et discussion.....	63
I.	Comportement physico-chimique et efficacité des Marinosomes® en application topique	67
I.1.	Stabilité physique des Marinosomes® en fonction du pH et/ou de la concentration du calcium	68
I.1.1.	Effet du pH	70
I.1.2.	Effet du calcium.....	73
I.1.3.	Effet combiné du pH et de la concentration des ions calcium.....	77
I.2.	Stabilité chimique des Marinosomes® en fonction du pH et/ou de la concentration des ions calcium	79
I.2.1.	Hydrolyse non enzymatique des phospholipides.....	79
I.2.2.	Oxydation des acides gras	82
I.3.	Evaluation, <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> , de l'activité biologique des Marinosomes® dans le cadre de l'application topique	88
I.3.1.	Evaluation de l'innocuité des Marinosomes®	89
I.3.2.	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des Marinosomes®	93
II.	Effets des AGPI n-3 sous forme d'huile de poisson ou de Marinosomes® sur le métabolisme des lipides, <i>in vivo</i>, chez le rat	101
II.1.	Modification du profil des lipides du plasma.....	101
II.1.1.	Triglycérides.....	101
II.1.2.	Cholestérol.....	105
II.1.3.	Phospholipides.....	108
II.1.4.	Conclusion : influence de la forme physico-chimique des lipides alimentaires sur la modification du profil des lipides du plasma	113
II.2.	Devenir métabolique des acides gras au niveau du plasma	113
II.2.1.	Modification du profil des acides gras totaux	115
II.2.2.	Modification du profil des acides gras des triglycérides du plasma.....	122
II.2.3.	Modification du profil des acides gras des phospholipides du plasma.....	124
II.2.4.	Modification du profil des acides gras des esters de cholestérol du plasma	127
II.3.	Conclusion : influence de la forme physico-chimique des lipides alimentaires sur la modification du profil des acides gras du plasma	129

II.4.	Devenir métabolique des acides gras au niveau des globules rouges	131
III.	Etude de la réversibilité des effets des AGPI n-3, <i>in vivo</i>, chez le rat	139
III.1.	Réversibilité du profil des différentes fractions lipidiques du plasma	139
III.2.	Réversibilité du profil des acides gras du plasma	141
III.3.	Conclusion : influence de la forme physico-chimique des lipides alimentaires sur la réversibilité du profil des lipides du plasma.....	147
	Conclusion et perspectives	149
	Publications personnelles.....	153
	Références bibliographiques	154
	Annexes	169

Liste des abréviations

ACAT :	Acyl-Coenzyme A cholestérol acyl transférase
AGPI :	Acide gras poly-insaturé
CCM :	Chromatographie sur couche mince
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
DGLA (20:3 n-6) :	Acide dihomog- γ -linoléinique
DHA (22:6 n-3) :	Acide docosahexaénoïque
DO :	Densité optique
DPA (22:5 n-3) :	Acide docosapentaénoïque
EMAG :	Ester méthylique d'acide gras
EPA (20:5 n-3) :	Acide eicosapentaénoïque
HDL :	Lipoprotéine de haute densité (High Density Lipoprotein)
15-HEPE :	Acide 15-hydroxyeicosapentaénoïque
HEPES :	N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[acide 2-éthane sulfonique]
15-HETE :	Acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque
15-HETrE :	Acide 15-hydroxyeicosatriénoïque
13-HODE :	Acide 13-hydroxy-9,11-octadiénoïque
17-HODHE :	Acide 17-hydroxydocosahexaénoïque
HMG-CoA réductase :	β -hydroxy- β -méthylglutaryl-Coenzyme A réductase
IL-8 :	Interleukine-8
LCAT :	Lécithine cholestérol acyl transférase
LDL :	Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)
LSS :	Lauryl sulfate de sodium
LT :	Leucotriène
Lyso-PC :	Lyso-phosphatidylcholine
Lyso-PE :	Lyso-phosphatidyléthanolamine
PAF :	Facteur d'agrégation plaquettaire (Platelet Activating Factor)
PC :	Phosphatidylcholine
PE :	Phosphatidyléthanolamine
PG :	Prostaglandine
PLA ₂ :	Phospholipase A ₂
PS :	Phosphatidylsérine
TPA :	Tétradécanoylphorbol-13-acétate
VLDL :	Lipoprotéine de très faible densité (Very Low Density Lipoprotein)

Liste des figures

Figure 1 :	Représentation schématique de la structure de la peau (A) et de la structure histologique de l'épiderme (B) (d'après Mazière, 1997).....	8
Figure 2 :	Formation du ciment intercornéocytaire du <i>stratum corneum</i> (Bouwstra <i>et al.</i> , 2003)....	8
Figure 3 :	Schéma de la biosynthèse des acides gras insaturés.	18
Figure 4 :	Représentation schématique de la synthèse des éicosanoïdes <i>via</i> la voie de la lipoxygénase à partir des acides gras des séries n-6 et n-3.	20
Figure 5 :	Représentation schématique de la synthèse des éicosanoïdes <i>via</i> la voie de la cyclooxygénase à partir des acides gras des séries n-6 et n-3.	22
Figure 6 :	Protocole de sacrifice des rats suite aux régimes supplémentés avec des AGPI n-3 sous forme d'un mélange lipidique à base d'huile de poisson ou de Marinosomes [®] et au régime alipidique.	56
Figure 7 :	Cliché de microscopie optique en contraste de phase d'une suspension de Marinosomes [®] . OLV : liposome oligolamellaire ; MLV : liposome multilamellaire....	69
Figure 8 :	Clichés de microscopie électronique après cryofracture d'une suspension de Marinosomes [®] . A) Vue d'ensemble de la suspension de Marinosomes [®] ; B) Marinosome [®] oligolamellaire de grande taille ; C) Marinosome [®] oligolamellaire de petite taille.	69
Figure 9 :	Variation de la densité optique (DO) à 400 nm d'une suspension de Marinosomes [®] conservée à 37°C en fonction du pH. (●) : DO immédiatement après dilution ; (○) : DO 24 heures après dilution.	71
Figure 10 :	Cliché de microscopie optique en contraste de phase d'agrégats de Marinosomes en suspension à pH 4 après 1 heure d'incubation à 37°C.	71
Figure 11 :	Variation de la densité optique (DO) à 400 nm d'une suspension de Marinosomes [®] stockée à 37°C et pH 7,4 en fonction de la concentration des ions calcium. (●) : DO immédiatement après dilution ; (△) : DO 1 heure après dilution ; (□) : DO 27 heures après dilution.	74
Figure 12 :	Cliché de microscopie optique en contraste de phase d'agrégats de Marinosomes [®] en suspension après 1 heure d'incubation à 37°C dans une solution contenant des ions calcium à une concentration de 9 mM.	74
Figure 13 :	Clichés de microscopie optique d'agrégats de Marinosomes [®] en suspension dans une solution contenant des ions calcium à une concentration de 9 mM, après 48 heures	

	d'incubation à 37°C. A) Observation en contraste de phase ; B) Observation en lumière polarisée.	75
Figure 14 :	Variation de la densité optique (DO), immédiatement après dilution, à 400 nm d'une suspension de Marinosomes [®] conservée à 37°C en fonction de la concentration des ions calcium et du pH.	78
Figure 15 :	Cliché de microscopie optique en contraste de phase d'agrégats de Marinosomes [®] en suspension dans une solution à pH 4,8 contenant des ions calcium à une concentration de 9 mM.	78
Figure 16 :	Formation du propanal (nmol/μmol de lipides totaux) dans une suspension de Marinosomes [®] ([Lipides] = 2 g.L ⁻¹ , [Ca ²⁺] = 0 mM) au cours du temps. (■) pH 7,4 et 25°C ; (▲) pH 7,4 et 37°C ; (□) pH 4,0 et 37°C.	83
Figure 17 :	Formation du propanal (nmol/μmol de lipides totaux) dans une suspension de Marinosomes [®] ([Lipides] = 2 g.L ⁻¹) au cours du temps, à 25°C et pH 7,4, en fonction de la concentration des ions calcium. (■) : [Ca ²⁺] = 0 mM ; (●) : [Ca ²⁺] = 2,5 mM ; (▲) : [Ca ²⁺] = 9 mM.	86
Figure 18 :	Formation du propanal (nmol/μmol de lipides totaux) dans une suspension de Marinosomes [®] ([Lipides] = 2 g.L ⁻¹) au cours du temps, en fonction de la concentration des ions calcium. (□) : 37°C, pH 4, [Ca ²⁺] = 0 mM ; (■) : 37°C, pH 4, [Ca ²⁺] = 9 mM ; (△) : 25°C, pH 7,4, [Ca ²⁺] = 9 mM.	86
Figure 19 :	Activité anti-inflammatoire et production de prostaglandine E ₂ (PGE ₂) par les kératinocytes en culture non activés par l'huile de croton (Témoin), activés par l'huile de croton (Croton, [Huile] = 20 mg.L ⁻¹) et en fonction de la concentration de lipides d'une suspension de Marinosomes [®] ajoutée au milieu de culture pendant 48 h préalablement à l'addition de l'huile de croton.	94
Figure 20 :	Activité anti-inflammatoire et production de l'interleukine 8 (IL-8) par les kératinocytes en culture non activés par l'huile de croton (Témoin), activés par l'huile de croton (Croton, [Huile] = 20 mg.L ⁻¹) et en fonction de la concentration de lipides d'une suspension de Marinosomes [®] ajoutée au milieu de culture pendant 48 heures préalablement à l'addition de l'huile de croton.	97
Figure 21 :	Corrélation entre les productions de prostaglandine E ₂ (PGE ₂) et d'interleukine-8 (IL-8) par les kératinocytes en culture et incubés préalablement en présence de Marinosomes [®] avant leur activation par l'huile de croton.	99

Figure 22 :	Evolution de la concentration des triglycérides plasmatiques (mg.dL ⁻¹ de plasma) pour les rats soumis au régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson (○) ou avec les Marinosomes [®] (■).	103
Figure 23 :	Evolution de la concentration du cholestérol total plasmatique (mg.dL ⁻¹ de plasma) pour les rats soumis au régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson (○) ou avec les Marinosomes [®] (■).	106
Figure 24 :	Evolution de la concentration des phospholipides plasmatiques (mg.dL ⁻¹ de plasma) pour les rats soumis au régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson (○) ou avec les Marinosomes [®] (■).	109
Figure 25 :	Corrélation entre la concentration des phospholipides plasmatiques (mg.dL ⁻¹ de plasma) et la concentration des phospholipides hépatiques (mg.g ⁻¹ de foie) pour les rats soumis au régime supplémenté avec les Marinosomes [®] (■).	112
Figure 26 :	Corrélation entre la concentration des phospholipides plasmatiques (mg.dL ⁻¹ de plasma) et la concentration du cholestérol total plasmatique (mg.dL ⁻¹ de plasma) pour les rats soumis au régime supplémenté avec les Marinosomes [®] (■).	112
Figure 27 :	Evolution des taux des AGPI n-6 et n-3 (% en poids par rapport aux acides gras totaux) dans les lipides totaux du plasma des rats en fonction de la durée du régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson (○) ou avec les Marinosomes [®] (■). A : acide linoléique (18:2 n-6) ; B : acide arachidonique (20:4 n-6) ; C : EPA (20:5 n-3) ; D : DHA (22:6 n-3).	120
Figure 28 :	Evolution des taux des AGPI n-6 et n-3 (% en poids par rapport aux acides gras totaux) dans les lipides totaux des globules rouges des rats en fonction de la durée du régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson (○) ou avec les Marinosomes [®] (■). A : acide linoléique (18:2 n-6) ; B : acide arachidonique (20:4 n-6) ; C : EPA (20:5 n-3) ; D : DHA (22:6 n-3).	136
Figure 29:	Corrélation entre les taux d'EPA (20:5 n-3) (% en poids par rapport aux acides gras totaux) des lipides totaux du plasma et des globules rouges (GR) pour les rats soumis au régime supplémenté avec les Marinosomes [®] (■) et pour les rats soumis au régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson (○).	138
Figure 30:	Corrélation entre les taux de DHA (22:6 n-3) (% en poids par rapport aux acides gras totaux) des lipides totaux du plasma et des globules rouges (GR) pour les rats soumis au régime supplémenté avec les Marinosomes [®] (■) et pour les rats soumis au régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson (○).	138

Liste des tableaux

Tableau I :	Composition des lipides (% en poids) de l'épiderme humain (Ponec <i>et al.</i> , 1988).....	10
Tableau II :	Variation de la composition des lipides (% en poids) des différentes strates de l'épiderme de l'abdomen humain (d'après Lampe <i>et al.</i> , 1983b).	10
Tableau III :	Composition des acides gras des lipides totaux (% en poids) de l'épiderme humain.	12
Tableau IV :	Rôles des principales classes de lipides du <i>stratum corneum</i> dans les fonctions de la peau.	13
Tableau V :	Modification du profil des acides gras de la peau suite à des régimes supplémentés avec des huiles riches en acides gras poly-insaturés de la série n-3.	27
Tableau VI :	Modification du profil des acides gras de la peau suite à des régimes supplémentés en huiles riches en acides gras poly-insaturés de la série n-6.	29
Tableau VII :	Exemples de formulation de vésicules lipidiques utilisées en application occlusive <i>in vitro</i> et mode d'interaction avec la peau.	34
Tableau VIII :	Exemples de formulation de vésicules lipidiques utilisées en application non occlusive <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> et mode d'interaction avec la peau.	35
Tableau IX :	Composition des lipides (% en poids) du mélange lipidique utilisé pour la préparation des Marinosomes®.....	42
Tableau X :	Composition des phospholipides (% en poids) présents dans le mélange lipidique utilisé pour la préparation des Marinosomes®.....	42
Tableau XI :	Conditions expérimentales des études physico-chimiques testées sur les suspensions de Marinosomes® ([Lipides] = 2 g.L ⁻¹).	42
Tableau XII :	Classification d'un produit en fonction de son pouvoir irritant (PI).	48
Tableau XIII :	Classification d'un produit en fonction de son indice d'irritation oculaire équivalent (IO _{eq}).	51
Tableau XIV :	Cotation des réactions de la membrane chorio-allantoïdienne à un produit en fonction du temps d'apparition.	52
Tableau XV :	Classification d'un produit en fonction de son indice d'irritation primaire sur membrane chorio-allantoïdienne (IP-MCA).	52

Tableau XVI :	Potentiel irritant oculaire d'un produit en fonction de son indice équivalent ($IO_{\acute{e}q}$) et de son indice d'irritation primaire sur membrane chorio-allantoïdienne (IP-MCA).....	52
Tableau XVII :	Composition des acides gras (% en poids des acides gras totaux) des Marinosomes [®] et du mélange lipidique à base d'huile de poisson (huile de poisson) utilisés pour la supplémentation des régimes.....	57
Tableau XVIII :	Evolution de la composition des phospholipides et lyso-phospholipides constitutifs des membranes des Marinosomes [®] au cours du temps, à pH 4.....	80
Tableau XIX :	Evaluation de la cytotoxicité de la suspension de Marinosomes [®] ([Lipides] = 0,2 g.L ⁻¹) vis-à-vis de fibroblastes de cornée de lapin (lignée SIRC) en culture.....	90
Tableau XX :	Evolution en fonction du temps des taux des acides gras majoritaires saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides totaux du plasma des rats soumis à un régime supplémenté avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson.....	114
Tableau XXI :	Evolution en fonction du temps des taux des acides gras majoritaires saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides totaux du plasma des rats soumis à un régime supplémenté avec les Marinosomes [®]	118
Tableau XXII :	Evolution de la concentration des acides gras majoritaires des triglycérides du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes [®]	123
Tableau XXIII :	Evolution de la concentration des acides gras majoritaires des phospholipides du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes [®]	125
Tableau XXIV :	Evolution de la concentration des acides gras majoritaires des esters de cholestérol du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes [®]	128

Tableau XXV :	Rapport EPA/DHA dans les lipides totaux et les différentes classes de lipides plasmatiques des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes [®]	130
Tableau XXVI :	Evolution en fonction du temps des taux des acides gras majoritaires saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides des globules rouges des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson.....	133
Tableau XXVII :	Evolution en fonction du temps des taux des acides gras majoritaires saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides des globules rouges des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec les Marinosomes [®]	135
Tableau XXVIII :	Concentrations plasmatiques des triglycérides, du cholestérol total et des phospholipides (mg.dL ⁻¹) avant (temps 0) ou après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes [®] suivis de 4 (temps 17) ou 7 jours (temps 20) de régime alipidique.....	140
Tableau XXIX:	Evolution des taux des acides gras majoritaires des lipides totaux du plasma (% en poids des acides gras totaux) des rats témoins, des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes [®] suivis de 7 jours (temps 20) de régime alipidique.	142
Tableau XXX :	Evolution des concentrations des acides gras majoritaires des triglycérides du plasma (en µg.mL ⁻¹ de plasma) des rats témoins, des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes [®] suivis de 7 jours (temps 20) de régime alipidique.	143
Tableau XXXI :	Evolution des concentrations des acides gras majoritaires des phospholipides du plasma (en µg.mL ⁻¹ de plasma) des rats témoins, des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes [®] suivis de 7 jours (temps 20) de régime alipidique.....	145
Tableau XXXII :	Evolution des concentrations des acides gras majoritaires des esters de cholestérol du plasma (en µg.mL ⁻¹ de plasma) des rats témoins, des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes [®] suivis de 7 jours (temps 20) de régime alipidique.	146

Liste des annexes

Annexe 1 :	Formules des différents céramides retrouvés au niveau du <i>stratum corneum</i>	171
Annexe 2 :	Evolution en fonction du temps des taux des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides totaux du plasma des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson.....	172
Annexe 3 :	Evolution des taux des acides gras des lipides totaux du tissu adipeux (% en poids des acides gras totaux) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.	174
Annexe 4 :	Evolution des taux des acides gras des lipides totaux du foie (% en poids des acides gras totaux) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.....	175
Annexe 5 :	Evolution en fonction du temps des taux des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides totaux du plasma des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec les Marinosomes®.	176
Annexe 6a :	Evolution de la concentration des acides gras des triglycérides du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes®.	178
Annexe 6b :	Evolution du taux des acides gras des triglycérides du plasma (% en poids par rapport aux acides gras totaux) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes®.	179
Annexe 7a :	Evolution de la concentration des acides gras des phospholipides du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.....	180
Annexe 7b :	Evolution du taux des acides gras des phospholipides du plasma (% en poids par rapport aux acides gras totaux) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.	181

Annexe 8a:	Evolution des taux des acides gras des esters de cholestérol du plasma (% en poids des acides gras totaux) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.	182
Annexe 8b:	Evolution des concentrations des acides gras des esters de cholestérol du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.	183
Annexe 9 :	Evolution en fonction du temps des taux des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides des globules rouges des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson.	184
Annexe 10 :	Evolution en fonction du temps des taux des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides des globules rouges des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec les Marinosomes®.	186
Annexe 11 :	Evolution des taux des acides gras des lipides totaux du plasma (% en poids des acides gras totaux) des rats avant (temps 0) et après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes® (temps 13) suivie d'un régime alipidique de 7 jours (temps 20). ..	188
Annexe 12 :	Evolution des concentrations des acides gras des triglycérides du plasma ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats avant (temps 0) et après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes® (temps 13) suivie d'un régime alipidique de 7 jours (temps 20). ..	189
Annexe 13 :	Evolution des concentrations des acides gras des phospholipides du plasma ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats avant (temps 0) et après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes® (temps 13) suivie d'un régime alipidique de 7 jours (temps 20). ..	190
Annexe 14 :	Evolution des concentrations des acides gras des esters de cholestérol du plasma ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats avant (temps 0) et après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes® (temps 13) suivie d'un régime alipidique de 7 jours (temps 20). ..	191

Contexte de l'étude

Il est maintenant largement admis que l'aliment ne doit plus être considéré comme un simple apport d'énergie mais comme un support de nutriments d'intérêt. Parmi ceux-ci, on trouve les acides gras dits **essentiels** que sont, d'une part, l'acide eicosapentaénoïque (**EPA**, 20:5 n-3) et de l'acide docosahexaénoïque (**DHA**, 22:6 n-3) synthétisés à partir de l'acide α -linoléique (18:3 n-3) et, d'autre part, l'acide arachidonique (20:4 n-6) synthétisé à partir de l'acide linoléique (18:2 n-6). L'importance structurale et physiologique des acides gras poly-insaturés (AGPI) à très longue chaîne de la série n-3 chez l'Homme est nettement démontrée. Ainsi, un apport en EPA (20:5 n-3) ou (et) DHA (22:6 n-3) peut être nécessaire, voire indispensable en cas de déficience de certaines voies métaboliques. Par ailleurs, ces AGPI de la série n-3 pourraient intervenir dans la prévention ou le traitement de certaines pathologies (maladies cardio-vasculaires, pathologies cutanées (psoriasis, eczéma), dysfonctionnement immunitaire...).

Les possibilités d'apport de ces acides gras sont variées tant du point de vue des formes physico-chimiques disponibles (acides gras libres ou estérifiés, en solution ou inclus dans un système colloïdal) que vis-à-vis de leur voie d'administration (orale, topique, parentérale ...). Chacune des voies d'administration est définie par des caractéristiques spécifiques qui conditionnent, en partie, la biodisponibilité des AGPI dans l'organisme. Ainsi, dans le cas de l'apport des acides gras par **voie orale**, les conditions du tractus gastro-intestinal, notamment les conditions chimiques (pH, activités enzymatiques, présence de sels biliaires), et l'importante activité métabolique du foie peuvent réduire l'efficacité et/ou la durée d'action des actifs considérés. La **voie topique, i.e., administration de molécules actives sur la peau**, peut être une alternative à l'administration orale, notamment si l'organe ciblé est la peau. En effet, l'accessibilité directe de cet organe, associée à sa faible activité métabolique comparée à celle du foie, permet, dans certains cas, d'améliorer l'action du principe actif en prolongeant son temps de résidence et en le maintenant à une concentration suffisante au niveau du site d'application. En revanche, la structure stratifiée de la peau et l'organisation lamellaire de ses lipides constituent un obstacle majeur à une diffusion rapide des principes actifs appliqués.

Ces diverses approches laissent une place importante à la recherche de formes innovantes avec pour objectif une amélioration de la biodisponibilité des AGPI pour une meilleure efficacité biologique. Dans ce contexte, le laboratoire s'intéresse, depuis quelques années, à un mélange lipidique naturel extrait d'un organisme marin riche en AGPI n-3 estérifiés au sein de phospholipides. La composition particulière de ce mélange en lipides polaires en fait un candidat approprié pour la formulation de vésicules lipidiques, structures organisées délimitées par une ou plusieurs membrane(s) formée(s) d'une double couche de molécules lipidiques, que nous avons appelées « **Marinosomes[®]** ». Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre général de l'étude de l'efficacité des Marinosomes[®] en tant que vecteurs d'AGPI n-3 par la voie topique et par la voie orale.

Dans la mesure où une étude bibliographique antérieure (Nacka, 2001) a déjà présenté le devenir métabolique des AGPI n-3 apportés par voie orale, nous nous proposons de présenter, dans la partie **Synthèse bibliographique**, l'importance des lipides en termes de nature et de composition, sur les caractéristiques structurales, fonctionnelles et physiologiques de la peau. L'accent est mis sur les AGPI et leur métabolisme. Les études sur les modifications du profil lipidique de la peau par l'apport oral de lipides sont ensuite présentées. Dans le cadre des solutions alternatives à l'apport de lipides par voie orale, la possibilité d'utiliser un système vecteur tel que les liposomes dans l'optique de délivrer des lipides d'intérêt au niveau de la peau est abordée avec notamment les interactions de ces structures avec la peau.

L'**étude expérimentale** est basée sur l'évaluation de l'efficacité des Marinosomes[®] en tant que vecteurs d'AGPI n-3, dans le cadre des applications topique et orale. Les méthodologies employées sont détaillées dans la partie **Matériel et Méthodes**. La partie **Résultats et discussion** comporte 2 chapitres qui se réfèrent aux 2 voies d'administration des Marinosomes[®]. L'utilisation des Marinosomes[®] dans le cadre de la **voie topique** nécessite, au préalable, la connaissance et la compréhension du comportement des liposomes dans l'environnement de la peau. C'est pourquoi dans un premier temps, le comportement physico-chimique des Marinosomes[®] est étudié, *in vitro*, dans des conditions mimant les conditions physiologiques retrouvées au niveau de l'épiderme. Dans un deuxième temps, l'effet des Marinosomes[®] au niveau cutané est abordé en termes de toxicité et d'efficacité à travers des études *in vitro* sur cultures cellulaires et des tests *in vivo* chez l'Homme. Dans le cadre de la **voie orale**, des études préalables ont démontré que les liposomes à base de lipides marins présentaient un comportement physico-chimique dans des conditions mimant celles retrouvées au niveau du tractus gastro-intestinal qui en faisaient des candidats intéressants

pour des études de biodisponibilité digestive des AGPI n-3 (Nacka *et al.*, 2001a ; Nacka *et al.*, 2001b). Par ailleurs, l'absorption lymphatique, chez le rat, des AGPI présentés sous forme de phospholipides (liposomes) est meilleure que celle obtenue pour les mêmes AGPI estérifiés dans des triglycérides (huile de sardine) (Cansell *et al.*, 2003). Il s'agit, à présent, d'élargir ce résultat dans le cadre d'études de supplémentation de régimes alimentaires pour appréhender le devenir *in vivo* des AGPI n-3, au-delà de la lymphe. Les études portent, d'une part, sur l'incorporation des AGPI n-3 dans les lipides du plasma et des globules rouges et, d'autre part, sur l'effet des suppléments du régime alimentaire sur des paramètres lipidiques sanguins tels que les concentrations des lipides circulants. Les résultats obtenus avec les Marinosomes[®] et un mélange d'huiles de composition similaire en acides gras sont comparés.

A. Synthèse bibliographique

1. Structure, composition et métabolisme lipidique de la peau

1.1. Structure de la peau

La peau est constituée de trois couches superposées, l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Fig. 1A). Le derme confère à la peau sa résistance et son élasticité. Il est tapissé par l'épiderme et repose sur l'hypoderme qui assure la jonction avec les structures anatomiques sous-cutanées.

Dans la suite de cette présentation, nous nous intéresserons uniquement à l'**épiderme** puisqu'il constitue la principale barrière physique s'opposant à la pénétration de molécules extérieures et qu'il est concerné, en premier lieu, dans le cadre de l'application topique. L'épiderme est composé de plusieurs couches de cellules histologiquement distinctes (Fig. 1B). C'est un tissu dynamique, en constante régénération, pour lequel une perte de cellules au niveau de la surface du **stratum corneum** (desquamation) est contrebalancée par une multiplication cellulaire des kératinocytes à la base de l'épiderme. Ainsi, au cours de leur migration, de la couche basale vers le **stratum corneum**, les kératinocytes se différencient en cornéocytes. Il s'agit de structures anucléées, squameuses, plates, enrobées par des lipides non polaires extracellulaires et interconnectées par des structures protéiques : les desmosomes. Les différentes étapes de la **différenciation des kératinocytes** sont associées à des modifications qui interviennent à la fois au niveau structural et au niveau de leur composition chimique. Des organelles ovoïdes, les corps lamellaires, apparaissent dans les cellules du **stratum spinosum**. Ils s'enrichissent progressivement et de manière coordonnée en un mélange de lipides polaires et d'enzymes cataboliques telles que des protéases, des glycosidases, des phospholipases et des sphingomyélinases (Rassner *et al.*, 1999). Puis, en réponse à un signal, probablement une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire (Gniadecki et Gajkowska, 2003), les corps lamellaires se déplacent à la périphérie apicale des cellules granuleuses, fusionnent avec la membrane plasmique et sécrètent leur contenu dans les espaces intercellulaires par exocytose (Fartasch, 1996). Certains lipides polaires sont hydrolysés, ce qui rend le mélange lipidique plus hydrophobe. L'ensemble des lipides s'organise en structures multifeuillets orientées parallèlement à la surface des cornéocytes pour former le ciment intercornéocytaire du **stratum corneum** (Fig. 2) (Bouwstra *et al.*, 2003).

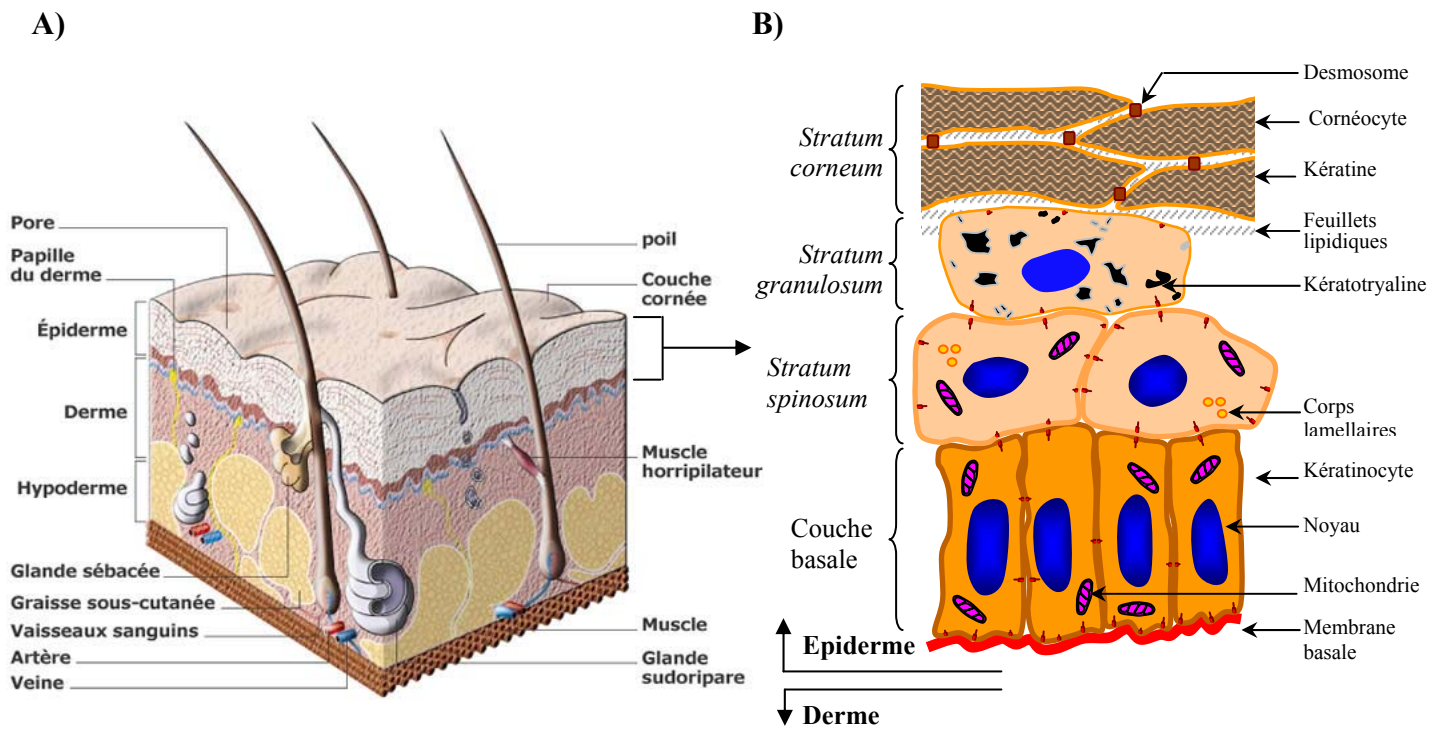


Figure 1 : Représentation schématique de la structure de la peau (A) et de la structure histologique de l'épiderme (B) (d'après Mazière, 1997).

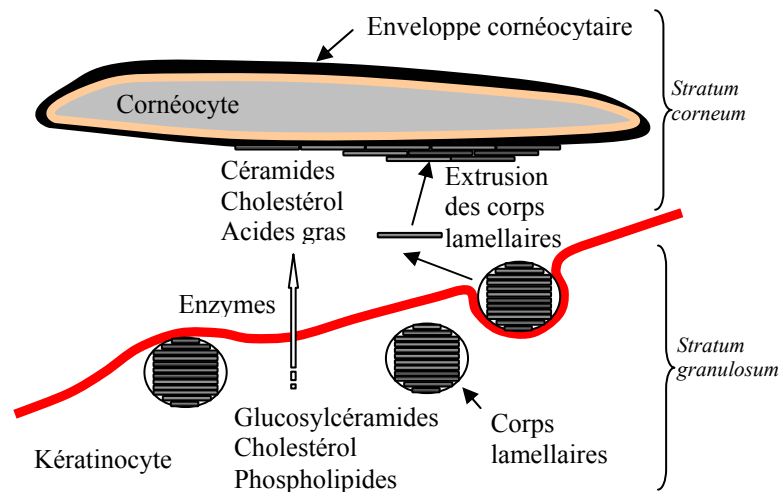


Figure 2 : Formation du ciment intercornéocyte du *stratum corneum* (Bouwstra et al., 2003).

1.2. Composition lipidique de l'épiderme

La composition lipidique de l'épiderme humain est connue depuis une quinzaine d'années. Les lipides présents au niveau de l'épiderme sont de nature variée et présentent des polarités différentes, des plus hydrophobes (cholestérol, triglycérides) aux plus polaires tels que des phospholipides et des céramides (Tableau I).

Chaque couche histologique de l'épiderme possède une composition lipidique particulière qui est fonction du **niveau de différenciation** (Wertz et van den Bergh, 1998). A titre d'exemple, le tableau II présente la composition des lipides des différentes strates de l'épiderme de l'abdomen chez l'Homme (Lampe *et al.*, 1983b). L'analyse de la couche basale et du *stratum spinosum* met en évidence une proportion similaire de lipides apolaires et de phospholipides, et la présence minoritaire de sulfate de cholestérol et de sphingolipides. Au fur et à mesure du processus de différenciation des kératinocytes en cornéocytes, on note un enrichissement en lipides apolaires (triglycérides et acides gras libres) et en céramides au détriment des phospholipides qui ne représentent plus que 5 % des lipides du *stratum corneum*. Cette diminution de la proportion des phospholipides reflète leur hydrolyse qui a lieu, d'une part, dans les corps lamellaires, par une phospholipase A₂ (PLA₂) et par une phospholipase B comme le suggère l'absence de lyso-phospholipides (Maury *et al.*, 2002) et, d'autre part, dans les espaces intercornéocytaires, après leur sécrétion par les corps lamellaires (Mao-Qiang *et al.*, 1995). Au niveau du *stratum corneum*, les sphingolipides sont essentiellement représentés par des céramides répartis en huit classes de molécules qui diffèrent les unes des autres par la structure de leur tête polaire (sphingosine, phytosphingosine ou 6-hydroxysphingosine) et/ou la nature des acides gras (acide linoléique (18:2 n-6) lié à un acide gras ω-hydroxylé pour les céramides 1 et 4, par exemple) (Bouwstra *et al.*, 2003). Les formules chimiques des ces lipides sont présentées Annexe 1.

Si les lipides majoritaires du *stratum corneum* sont représentés par les sphingolipides (essentiellement des céramides), le cholestérol et les acides gras libres, des différences de compositions sont observées en fonction de différents paramètres :

- La localisation du *stratum corneum* prélevé. Par exemple, il existe une proportion plus élevée de stérols libres au niveau des lipides de la voûte plantaire (30-40 % (Lampe *et al.*, 1983a ; Zellmer et Lasch, 1997 ; Mazière, 1997)) comparativement aux avant-bras (7 % (Bonté *et al.*, 1997)) ;

Tableau I : Composition des lipides (% en poids) de l'épiderme humain (Ponec *et al.*, 1988).

Lipides	
Phospholipides	65,5
Sphingomyéline	9,3
Phosphatidylcholine + phosphatidylsérine	31,9
Phosphatidylinositol	6,5
Phosphatidyléthanolamine	17,8
Sulfate de cholestérol	1,4
Lipides apolaires	22,9
Stérols libres	15,8
Acides gras libres	1,1
Triglycérides	3,9
Esters de stérols	2,1
Sphingolipides	10,2
Glucosylcéramides	1,8
Céramides	0,7

Tableau II : Variation de la composition des lipides (% en poids) des différentes strates de l'épiderme de l'abdomen humain (d'après Lampe *et al.*, 1983b).

Lipides	Couche basale et <i>stratum spinosum</i>	<i>Stratum granulosum</i>	<i>Stratum corneum</i>
Phospholipides	44,5	25,3	4,9
Sulfate de cholestérol	2,4	5,5	1,5
Lipides apolaires	51,0	56,5	77,7
Stérols libres	11,2	11,5	14,0
Acides gras libres	7,0	9,2	19,3
Triglycérides	12,4	24,7	25,2
Esters de stérols	5,3	4,7	5,4
Squalène	4,9	4,6	4,8
n-alkanes	3,9	3,8	6,1
Sphingolipides	7,3	11,7	18,1
Glucosylcéramides	3,5	5,8	trace
Céramides	3,8	8,8	18,1

- La technique d'obtention du *stratum corneum*, notamment le nombre de « stripping » utilisé (permettant de faire varier l'épaisseur des échantillons de *stratum corneum*) (Bonté *et al.*, 1997 ; Norlén *et al.*, 1998 ; Norlén *et al.*, 1999) ;
- La technique d'extraction et d'analyse des lipides (Zellmer et Lasch, 1997 ; Martini, 2003) ;
- Les sujets participant aux études (variations individuelles (Zellmer et Lasch, 1997 ; Norlén *et al.*, 1999), âge (Rogers *et al.*, 1996), variations saisonnières (Rogers *et al.*, 1996)) ;
- La prise en compte ou non des lipides du sébum (Bonté *et al.*, 1997 ; Norlén *et al.*, 1998).

En ce qui concerne la **composition des acides gras des lipides totaux** de l'épiderme humain (Tableau III) et avec les précautions précédemment évoquées pour la comparaison des résultats, il apparaît que les acides gras saturés majoritaires de l'épiderme sont l'acide palmitique (16:0), l'acide stéarique (18:0) et l'acide lignocérique (24:0). Les acides gras mono-insaturés sont essentiellement représentés par l'acide oléique (18:1 n-9). Enfin, les AGPI présents dans les lipides totaux de l'épiderme appartiennent à la série n-6. Il s'agit de l'acide linoléique (18:2 n-6) et de l'acide arachidonique (20:4 n-6). Il est intéressant de noter, d'une part, la présence d'acide dihomo- γ -linoléique (DGLA, 20:3 n-6) dans l'épiderme humain et, d'autre part, l'absence d'acides gras de la série n-3. Les différentes **fractions lipidiques du *stratum corneum*** présentent des profils d'acides gras spécifiques mais la comparaison des différentes études ne permet pas de dégager un consensus sur un profil lipidique moyen pour une fraction lipidique donnée.

1.3. Rôles des lipides du stratum corneum dans les fonctions de barrière de la peau

Les fonctions de la peau sont multiples et font intervenir les différents types de lipides présents au niveau du *stratum corneum* (Tableau IV). Dans ce qui suit, nous ne détaillerons que les fonctions de la peau relatives à la mise en place d'une barrière, soit pour retenir des molécules à l'intérieur de l'organisme (barrière contre la perte en eau), soit pour prévenir l'entrée de molécules étrangères (perméabilité membranaire, cohésion du *stratum corneum*).

Tableau III : Composition des acides gras des lipides totaux (% en poids) de l'épiderme humain.

Acides gras	Chapkin <i>et al.</i> , 1986	Ponec <i>et al.</i> , 1988	Vicanova <i>et al.</i> , 1999
14:0	1,1	-	-
16:0	14,0	15,8	10,1
16:1 n-9	2,3	1,8	2,3
18:0	11,1	14,8	9,1
18:1 n-9	15,1	16,6	15,0
18:2 n-6	21,5	23,3	27,5
20:0	1,6	-	0,9
20:3 n-6	1,5	-	0,6
20:4 n-6	6,2	2,1	3,5
22:0	2,7	-	1,7
24:0	10,0	10,2	10,9
24:1 n-9	-	-	0,7
25:0	-	2,7	2,7
26:0	-	5,3	8,8
28:0	-	2,7	2,4

Tableau IV: Rôles des principales classes de lipides du *stratum corneum* dans les fonctions de la peau.

Fonction de la peau	Lipide impliqué	Rôle du lipide	Références
Barrière contre la perte en eau	Céramide 1	Participation à la formation des feuillettes multilamellaires du <i>stratum corneum</i> et empilement latéral des lipides	Rogers <i>et al.</i> , 1996
	Céramide 2	Augmentation de la solubilité du cholestérol	Claudy, 2003
	Acides gras libres	Participation à la formation des feuillettes multilamellaires du <i>stratum corneum</i> et à la structure des corps lamellaires	Bouwstra <i>et al.</i> , 1996 Mao-Qiang <i>et al.</i> , 1993a
	Cholestérol	Régulation de la mobilité des chaînes hydrocarbonées dans les bicouches lipidiques Participation à la formation des feuillettes multilamellaires du <i>stratum corneum</i> et à l'empilement latéral des lipides	Mizushima <i>et al.</i> , 1996 Bouwstra <i>et al.</i> , 1996
	Phospholipides	Source d'acides gras après sécrétion par les corps lamellaires et hydrolyse	Mao-Qiang <i>et al.</i> , 1995
	Sulfate de cholestérol	Stabilisation des feuillettes multilamellaires du <i>stratum corneum</i> en améliorant la dissolution du cholestérol	Bouwstra <i>et al.</i> , 2003
Perméabilité membranaire, cohésion	Céramides	Flexibilité du <i>stratum corneum</i> Diminution de la perméabilité membranaire par la création d'un état lipidique solide ou gel qui présente une faible diffusion latérale par rapport à l'état liquide	Rogers <i>et al.</i> , 1996 Coderch <i>et al.</i> , 2003
	Acides gras libres	Augmentation de la perméabilité membranaire par fluidification des domaines ordonnés du <i>stratum corneum</i> ou création de séparation de phases au sein des lipides membranaires	Wertz et van den Bergh, 1998
	Cholestérol	Augmentation de la fluidité membranaire	Wertz et van den Bergh, 1998
	Esters de cholestérol	Formation probable de micro-domaines dans les espaces lamellaires du <i>stratum corneum</i>	Wertz et van den Bergh, 1998
	Céramides intracellulaires	Agents pro ou anti-apoptotiques	Claudy, 2003 Geilen <i>et al.</i> , 1997
Croissance, différenciation et apoptose	Sulfate de cholestérol	Modulation de la desquamation du <i>stratum corneum</i> par sa propre desulfatation	Lampe <i>et al.</i> , 1983b
Immunité	Gangliosides	Détérioration de la transduction des signaux d'activation entraînant l'altération des cellules immunitaires	Popa et Portoukalian, 2003
Antimicrobien	Acides gras libres	Acide sapiénique (16:1 n-10) très actif contre les microorganismes gram +	Wertz et van den Bergh, 1998

La fonction de **barrière** de la peau **contre la perte en eau** réside dans le maintien d'un gradient de concentration d'eau entre les couches profondes de l'épiderme et le *stratum corneum*. Dans les conditions « normales » d'humidité, le *stratum corneum* contient environ 20 % d'eau, alors que, dans l'épiderme profond, la teneur en eau est de l'ordre de 70 % (Cevc et Blume, 1992). De nombreuses études montrent que la fonction de barrière de l'épiderme repose essentiellement sur l'organisation multilamellaire des lipides du *stratum corneum*. Ainsi, le taux de diffusion de l'eau dépend du nombre de couches du *stratum corneum* (Humbert, 2003).

Parmi les lipides présents au niveau du *stratum corneum*, l'implication des céramides, du cholestérol et des acides gras libres dans la fonction de barrière a été largement étudiée. Les **céramides** extracellulaires jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité physique des couches lipidiques lamellaires (Rogers *et al.*, 1996 ; Claudy, 2003 ; Coderch *et al.*, 2003). En effet, ces lipides constitués de longues chaînes d'acides gras saturés sont des molécules à haut point de fusion qui, à température ambiante, se présentent dans un état cristallin rigide (Coderch *et al.*, 2003). L'intervention spécifique des céramides de type 1 dans la fonction de barrière hydrique de l'épiderme proviendrait de l'estérification d'un acide linoléique (18:2 n-6) ω -hydroxylé (Rogers *et al.*, 1996). Cet acide gras pourrait s'orienter dans l'axe de la multicouche malgré ses doubles liaisons *cis* et favoriser la compacité des multifeuillets (Mazière, 1997). Des études réalisées sur des mélanges de lipides montrent que le **cholestérol** interagit, pour partie, avec les céramides (Mizushima *et al.*, 1996). Dans ce cadre, il améliorerait la flexibilité des structures lamellaires en augmentant la mobilité des chaînes hydrocarbonées et en diminuant les interactions au niveau des têtes polaires des céramides. La part de cholestérol qui n'interagirait pas avec les céramides formerait des micro-domaines (Bouwstra *et al.*, 2003). Enfin, la présence d'**acides gras libres** est indispensable à la mise en place des feuillets lamellaires, en s'intercalant entre les phases lamellaires (Mao-Qiang *et al.*, 1993a ; Bouwstra *et al.*, 1996). Ceci est rendu possible car le pH légèrement acide (pH 5) au niveau de la surface de l'épiderme conduit à un faible taux d'ionisation de la tête polaire des acides gras (Lieckfeldt *et al.*, 1995) et donc à une répulsion électrostatique minimale. Si le rôle individuel de chaque type de lipide dans la fonction de barrière de l'épiderme contre la perte en eau est bien démontré, diverses études suggèrent que cette fonction résulte en fait de la présence simultanée et coopérative des différents lipides en proportions bien définies et qui aboutit à une organisation optimale des diverses molécules au sein des feuillets multilamellaires (Mao-Qiang *et al.*, 1993b ; Bouwstra *et al.*, 2003).

Bien que l'épaisseur du *stratum corneum* soit faible (10 - 20 μm), cette strate de l'épiderme est une barrière très efficace à la pénétration de substances extérieures. Ce sont les mêmes lipides cités précédemment, céramides, cholestérol et acides gras, qui interviennent dans la **perméabilité de la peau** vis-à-vis des molécules autres que l'eau et qui participent, par là même, au rôle de **cohésion** du *stratum corneum* (Wertz et van den Bergh, 1998). Les **céramides** interviennent dans la compacité du *stratum corneum* par la formation d'un réseau rigide dû : i) aux liaisons hydrogène développées entre deux groupes méthylènes adjacents aux têtes polaires des céramides, ce qui a pour conséquence une compaction des chaînes hydrocarbonées (Hadgraft, 2001) ; ii) à l'interdigitation des longues chaînes des ω -hydroxycéramides (Wertz et van den Bergh, 1998). Le rôle des **acides gras libres** sur la cohésion du *stratum corneum* est plus controversé. Ils modifieraient l'arrangement latéral des lipides présents (cholestérol et céramides) permettant l'obtention de structures lamellaires plus rigides (Bouwstra et Honeywell-Nguyen, 2002). Pour d'autres auteurs, les acides gras libres auraient un effet fluidifiant sur les domaines ordonnés du *stratum corneum*, soit en s'intercalant entre deux phases lamellaires (Bouwstra *et al.*, 1996), soit en créant des séparations de phases au sein des lipides membranaires par la formation de pools d'acides gras au sein des bicouches organisées (Wertz et van den Bergh, 1998 ; Hadgraft, 2001). Tout comme pour la fonction de barrière contre la perte en eau, la présence simultanée des trois classes de lipides (céramides, cholestérol et acides gras libres) serait nécessaire à la cohésion cutanée optimale. En effet, des études réalisées sur des mélanges binaires de ces lipides suggèrent que : i) la diminution du niveau d'organisation des feuilletts multilamellaires par l'effet fluidifiant du cholestérol sur l'empilement des chaînes hydrocarbonées des céramides conduirait à un épiderme trop perméable si seuls ces deux lipides étaient présents ; ii) à l'inverse le mélange de céramides et d'acides gras libres correspondrait, lui, à une membrane trop rigide ; iii) même si les caractéristiques du mélange cholestérol – acides gras libres se rapprochent le plus de celles déterminées *in vivo*, un tel mélange pourrait être instable dans les conditions réelles de fonctionnement du *stratum corneum* (Chen *et al.*, 2001).

1.4. Métabolisme lipidique de l'épiderme

Pour que l'épiderme puisse remplir ses fonctions de barrière, la génération des lipides qui constituent les feuilletts intercornéocytaires est nécessaire. Il y a deux sites principaux de l'épiderme où ces lipides sont requis, d'une part, dans la couche basale, pour la biosynthèse

membranaire et, d'autre part, dans les strates supérieures, pour la production des corps lamellaires. De manière générale, les lipides présents au niveau de l'épiderme peuvent provenir, soit d'une synthèse *de novo*, soit de l'internalisation des lipoprotéines de faible densité (low density lipoprotein, LDL) et très faible densité (very low density lipoprotein, VLDL). En effet, les fibroblastes (Oram *et al.*, 1980 ; Ranganathan *et al.*, 1988) et des kératinocytes (Ponec *et al.*, 1992 ; Furumoto *et al.*, 2002) de peau humaine sont capables de capter et d'internaliser ces lipoprotéines.

1.4.1. Métabolisme du cholestérol et des sphingolipides

Le **cholestérol**, présent au niveau de l'épiderme, provient en faible partie de l'endocytose des LDL et VLDL *via* des récepteurs présents en surface des kératinocytes (Ponec *et al.*, 1992 ; Furumoto *et al.*, 2002). L'essentiel (environ 80 %) est synthétisé *de novo* par des tissus extra-hépatiques (peau, intestin, carcasse) (Feingold *et al.*, 1982). Au niveau de la peau de primate, les sites de synthèse du cholestérol se répartissent entre le derme (80 % du cholestérol cutané) et la couche basale et le *stratum spinosum* de l'épiderme (20 %) (Feingold *et al.*, 1983). La formation du cholestérol s'effectue à partir de l'acétyl coenzyme A par une suite de réactions faisant intervenir différentes enzymes du métabolisme dont la β -hydroxy- β -méthylglutaryl-Coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase) qui catalyse l'étape limitante de la synthèse du cholestérol. Suivant les auteurs, la synthèse du cholestérol cutané est dépendante (Anderson et Dietschy, 1977) ou non (Feingold *et al.*, 1982) des teneurs en cholestérol circulant. Par ailleurs, la biosynthèse du cholestérol de l'épiderme est accélérée par des perturbations de la fonction de barrière de la peau (Menon *et al.*, 1985 ; Grubauer *et al.*, 1987 ; Proksch *et al.*, 1990 ; Harris *et al.*, 1997), et notamment une modification du gradient aqueux trans-épidermique (Grubauer *et al.*, 1987). Cette activation est corrélée à une activité accrue des différentes enzymes intervenant dans la synthèse du cholestérol (Proksch *et al.*, 1990 ; Harris *et al.*, 1997). Il s'ensuit un rétablissement de la fonction cutanée quelques heures après l'induction de la perturbation (Menon *et al.*, 1985 ; Grubauer *et al.*, 1987 ; Proksch *et al.*, 1990).

L'épiderme est également un site important de synthèse *de novo* de **sphingolipides**. Cette synthèse est localisée à la fois dans les couches profondes et supérieures de l'épiderme (Holleran *et al.*, 1995). La formation des céramides fait intervenir différentes enzymes dont la

sérine palmitoyl transférase qui est l'enzyme limitante de cette biosynthèse (Holleran *et al.*, 1991). De même que pour le cholestérol, la rupture de la fonction de barrière de l'épiderme conduit à une activation de la voie de synthèse des sphingolipides qui s'accompagne d'une activité accrue de la sérine palmitoyl transférase (Holleran *et al.*, 1991 ; Harris *et al.*, 1997). Cependant, la synthèse des sphingolipides est retardée par rapport à celle immédiate du cholestérol et des acides gras libres. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer ce résultat, soit les sphingolipides proviennent, dans un premier temps, d'un pool de stockage, soit ils interviennent après la restauration des niveaux de cholestérol et d'acides gras libres épidermiques (Holleran *et al.*, 1991).

1.4.2. Métabolisme des acides gras

Les acides gras circulent dans l'organisme, soit liés à l'albumine plasmatique, soit sous forme estérifiée dans des triglycérides, des phospholipides et des esters de cholestérol, ces lipides étant eux-mêmes organisés dans des structures supramoléculaires que sont les lipoprotéines. Les lipoprotéines jouent donc un rôle important dans le transport des acides gras endogènes et exogènes vers les tissus cibles. Parmi ces tissus, la peau est un site de métabolisation lipidique très actif.

L'épiderme est capable de synthétiser ses propres **acides gras saturés** à partir de l'acétyl-CoA car il exprime, comme d'autres tissus (foie, tissu adipeux...), une acide gras synthase, enzyme multifonctionnelle, qui peut générer l'acide palmitique (16:0), précurseur des acides gras saturés à très longue chaîne tels que l'acide lignocérique (24:0) et l'acide cérotique (26:0). Cette enzyme est très exprimée au niveau du *stratum granulosum*, un peu moins au niveau du *stratum spinosum*, ce qui suggère que la synthèse des acides gras augmente avec la différenciation de l'épiderme (Uchiyama *et al.*, 2000).

Les cellules des mammifères sont capables de synthétiser les **acides gras insaturés de la série n-9** à partir de l'acide stéarique (18:0) (Fig. 3). Par contre, la synthèse des acides gras insaturés des séries n-3 et n-6 n'est pas possible à partir de l'acide stéarique du fait de l'absence des $\Delta 12$ et $\Delta 15$ désaturases. C'est pourquoi l'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide α -linoléique (18:3 n-3) sont considérés comme des **acides gras indispensables** et doivent donc être apportés par l'alimentation (Burr et Burr, 1930). Au niveau cutané, il a été montré

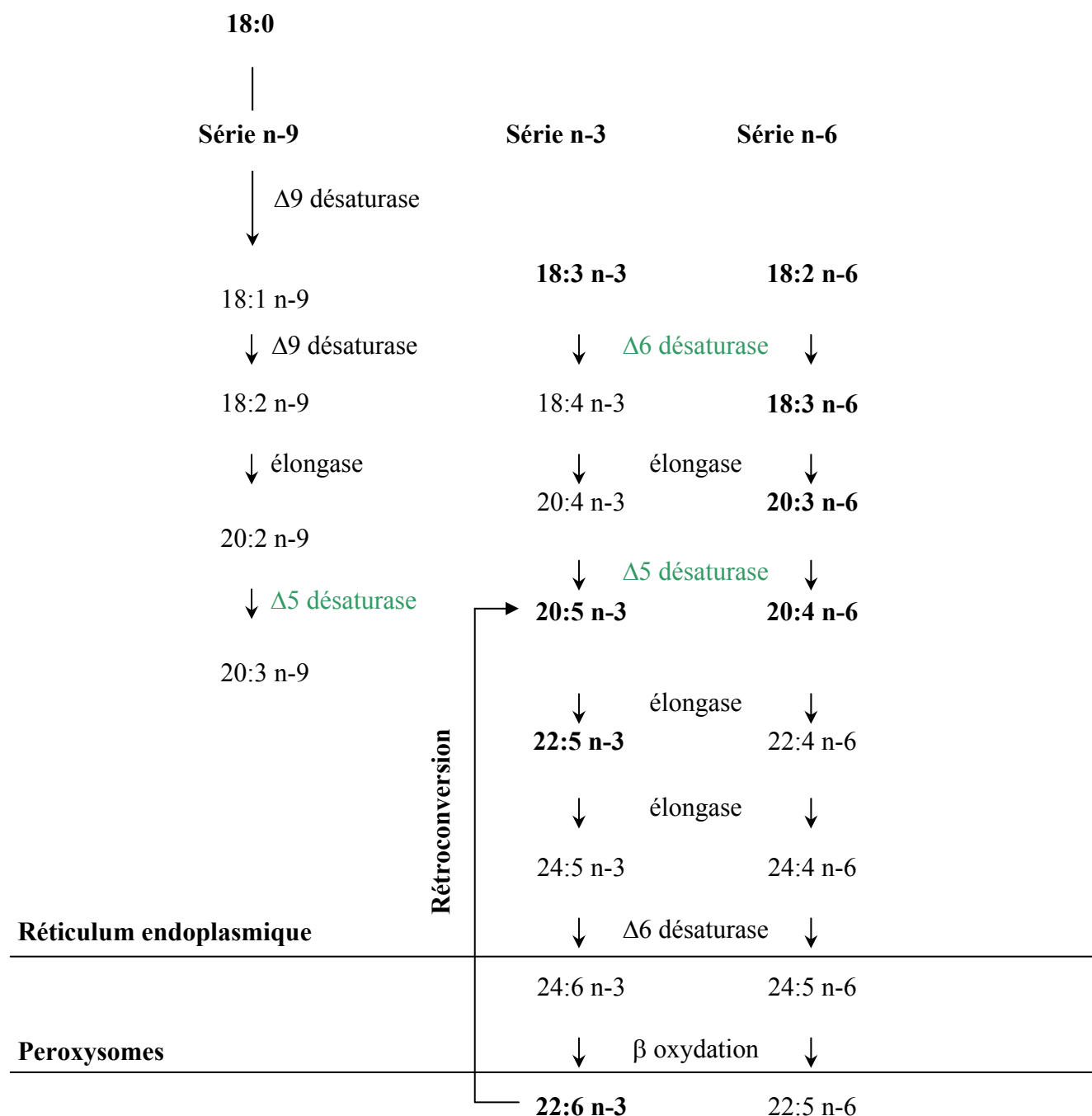


Figure 3 : Schéma de la biosynthèse des acides gras insaturés.

Les $\Delta 5$ et $\Delta 6$ désaturases (en vert) sont absentes au niveau de l'épiderme. Ainsi, les acides gras insaturés en C18 précurseurs des séries n-3 et n-6 et leurs homologues à très longue chaîne ($\geq C20$) doivent être apportés à l'épiderme *via* la circulation sanguine. 18:3 n-3 : acide α -linoléinique ; 20:5 n-3 : acide éicosapentaénoïque ; 22:5 n-3 : acide docosapentaénoïque ; 22:6 n-3 : acide docosahexaénoïque ; 18:2 n-6 : acide linoléique ; 18:3 n-6 : acide γ -linoléinique ; 20:3 n-6 : acide dihomo- γ -linoléinique ; 20:4 n-6 : acide arachidonique.

que seul l'acide linoléique (18:2 n-6) est essentiel de sorte qu'une carence en cet acide gras conduit à des pathologies cutanées (Horrobin, 2000) et/ou des perturbations de la barrière cutanée (Grubauer *et al.*, 1987).

Les **acides gras insaturés** à très longue chaîne **des séries n-3 et n-6** tels que l'acide arachidonique (20:4 n-6), l'EPA (20:5 n-3) et le DHA (22:6 n-3) peuvent être synthétisés, à partir de l'acide linoléique (18:2 n-6) et de l'acide α -linoléique (18:3 n-3) par une alternance d'élongations, par une élongase, et de désaturations, par les $\Delta 6$ et $\Delta 5$ -désaturases. Une étape de β -oxydation peroxisomale est nécessaire à la formation du DHA (22:6 n-3) (Fig. 3). Bien que les kératinocytes d'épiderme humain en culture possèdent les enzymes nécessaires à l'élongation et à la désaturation des acides gras indispensables en acides gras essentiels (Marcelo et Dunham, 1993), la peau ne présente pas *in vivo* d'activité $\Delta 6$ et $\Delta 5$ -désaturases (Chapkin *et al.*, 1986). Ainsi, l'acide arachidonique (20:4 n-6) présent au niveau de l'épiderme ne peut provenir que de deux sources, une source exogène *via* l'alimentation et une source endogène *via* sa synthèse à partir de l'acide linoléique (18:2 n-6) au niveau d'un tissu autre que la peau (le foie, par exemple). Il est à noter qu'une $\Delta 6$ -désaturase a été identifiée au niveau des glandes sébacées de la peau. Cependant, il semble que cette enzyme intervienne essentiellement dans la désaturation de l'acide palmitique en acide sapiénique (16:1 n-10) (Ge *et al.*, 2003).

1.4.3. Métabolisme des eicosanoïdes

Les acides gras présents dans les phospholipides membranaires peuvent être libérés suite aux actions de la PLA₂ et de la phospholipase C (Fig. 4). Parmi ces acides gras, les AGPI des séries n-6 et n-3 sont les précurseurs de médiateurs lipidiques de signalisation, les eicosanoïdes, *via* le métabolisme oxygéné qui fait intervenir deux voies de synthèse : la voie de la cyclooxygénase et la voie de la lipoxygénase. Ce sont les mêmes enzymes qui agissent sur les acides gras et leurs métabolites indépendamment de la série dont ils proviennent. Ainsi, en fonction des concentrations du substrat présentes ou des affinités, les enzymes vont agir préférentiellement sur un substrat plutôt que sur un autre.

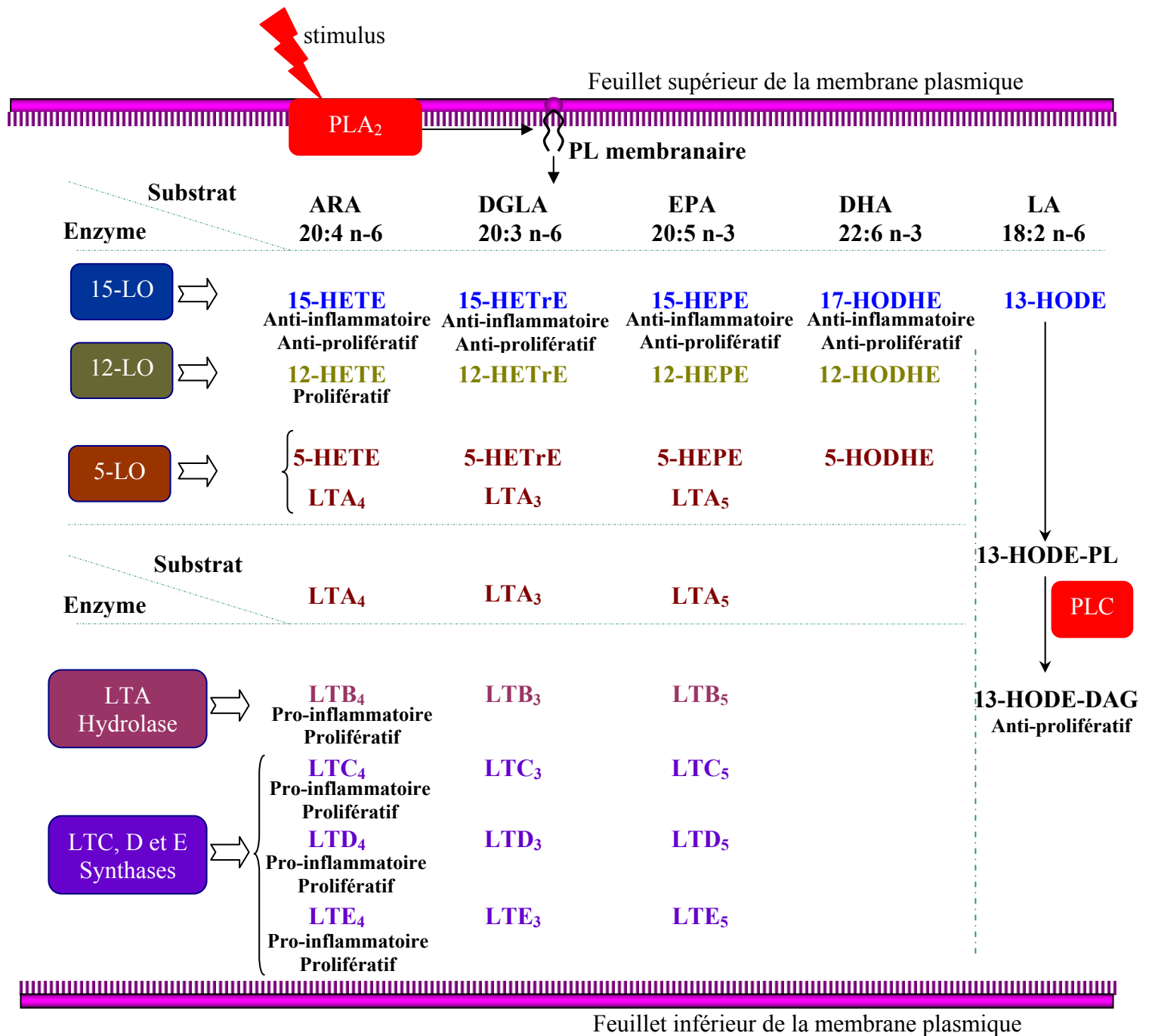


Figure 4 : Représentation schématique de la synthèse des éicosanoïdes *via* la voie de la lipoxygénase à partir des acides gras des séries n-6 et n-3.

PLA₂ : phospholipase A₂ ; PLC : phospholipase C ; HETE : acide hydroxyeicosatétraénoïque ; HETrE : l'acide 15-hydroeicosatriénoïque ; HEPE : acide hydroxyeicosapentaénoïque ; HODHE : acide hydroxydocosahexaénoïque ; 13-HODE : acide 13-hydroxy-9,11-octadiénoïque ; PL : phospholipide ; DAG : diacylglycérol ; LTA, B, C, D, E : leucotriène A, B, C, D ou E ; LO : Lipoxygénase ; ARA : acide arachidonique (20:4 n-6) ; DGLA : acide dihomog- γ -linoléique (20:3 n-6) ; EPA : acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3) ; DHA : acide docosahexaénoïque (22:6 n-3) ; LA : acide linoléique (18:2 n-6).

- **Voie de la lipoxygénase (Fig. 4)**

La membrane plasmique de l'épiderme contient différentes lipoxygénases et leucotriène synthases qui agissent sur des acides gras de la série n-6 (acide linoléique (18:2 n-6), DGLA (20:3 n-6), acide arachidonique (20:4 n-6)) et de la série n-3 (EPA (20:5 n-3) et DHA (22:6 n-3)). Ces enzymes conduisent à la formation de composés monohydroxylés et à divers leucotriènes (LT). Ces métabolites peuvent présenter, à fortes concentrations, des activités biologiques vis-à-vis des processus inflammatoires et prolifératifs (Ziboh, 1996 ; Ziboh *et al.*, 2000 ; Fogh et Kragballe, 2000). De manière générale, les LT issus de l'acide arachidonique (20:4 n-6) tels que les LT B₄, C₄, D₄, et E₄ sont des médiateurs pro-inflammatoires (Fogh et Kragballe, 2000). Les composés hydroxylés tels que l'acide 13-hydroxy-9,11-octadiénoïque (13-HODE), sous la forme de diacylglycérol issu de l'acide linoléique (18:2 n-6) (Ziboh *et al.*, 2000), l'acide 15-hydroxyeicosatriénoïque (15-HETrE) formé à partir du DGLA (20:3 n-6), l'acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque (15-HETE) issu de l'acide arachidonique (20:4 n-6), l'acide 15-hydroxyeicosapentaénoïque (15-HEPE) formé à partir de l'EPA (20:5 n-3) et l'acide 17-hydroxydocosahexaénoïque (17-HODHE) formé à partir du DHA (22:6 n-3), sont des médiateurs aux propriétés anti-prolifératives (Ziboh, 1996 ; Xi *et al.*, 2000 ; Chung *et al.*, 2002). Ces composés hydroxylés ont aussi des propriétés anti-inflammatoires car ils inhibent la synthèse du LTB₄, médiateur pro-inflammatoire issu de l'acide arachidonique (20:4 n-6) *via* la 5-lipoxygénase (Ziboh *et al.*, 2000). Les activités anti-inflammatoires sont différentes en fonction des hydroxyacides (15-HETrE > 17-HODHE > 15-HEPE > 15-HETE). Par ailleurs, l'EPA (20:5 n-3) entre en compétition avec l'acide arachidonique (20:4 n-6) dans la voie de synthèse des LT de la série 5 aux activités peu inflammatoires, comparées à celles des LT de la série 4 (Ziboh *et al.*, 2000).

- **Voie de la cyclooxygénase (Fig. 5)**

L'épiderme est également un site d'activité d'une cyclooxygénase, de prostaglandines synthases et d'une thromboxane synthase qui agissent sur des acides gras des séries n-6 (DGLA (20:3 n-6) et acide arachidonique (20:4 n-6)) et n-3 (EPA, 20:5 n-3). La transformation de l'acide arachidonique (20:4 n-6) par la voie de la cyclooxygénase conduit aux prostaglandines (PG) et aux thromboxanes de la série 2 aux rôles pro-inflammatoires et immuno-suppresseurs (Fogh et Kragballe, 2000). Lorsque le substrat des enzymes est le

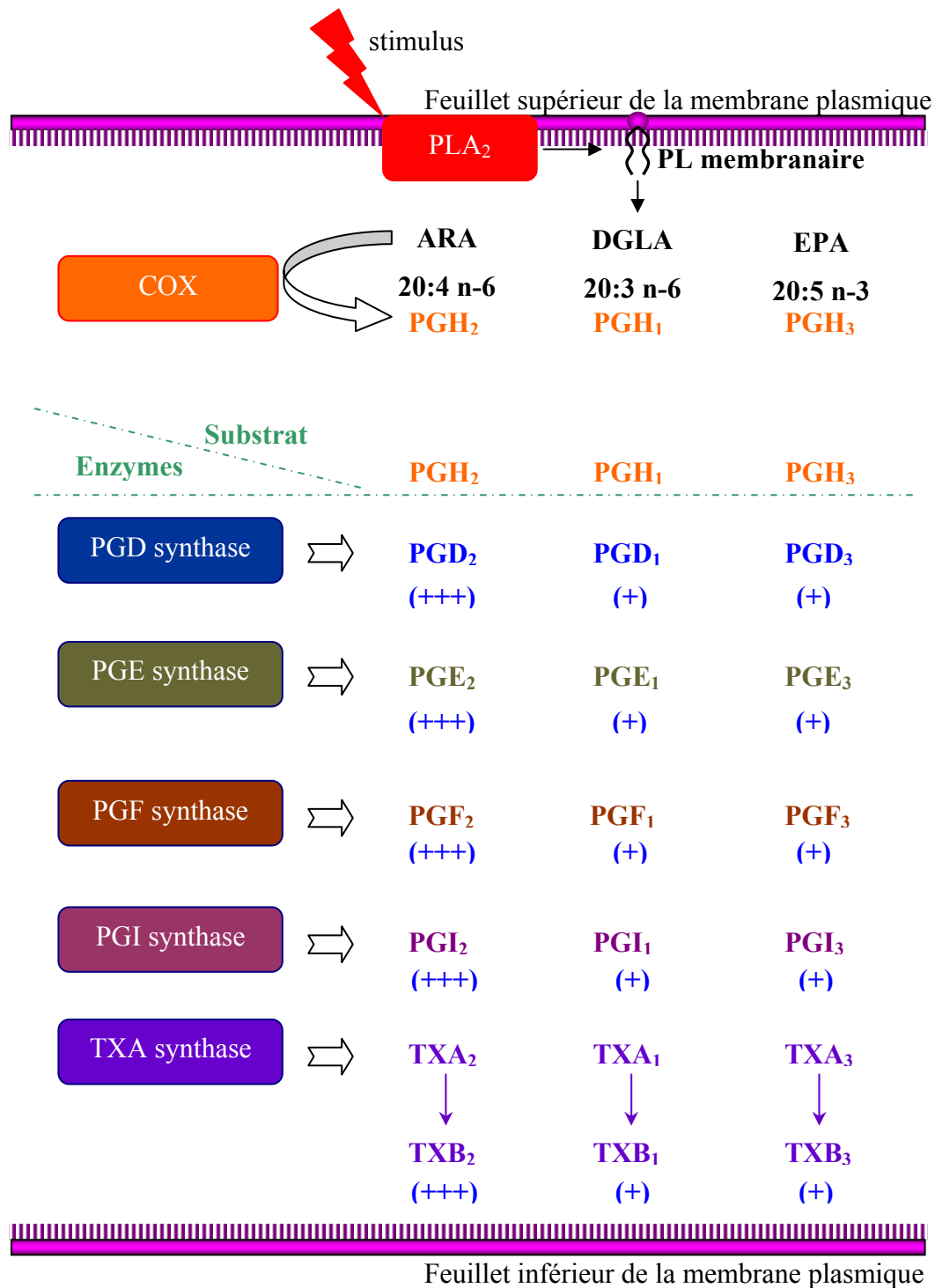


Figure 5 : Représentation schématique de la synthèse des éicosanoïdes *via* la voie de la cyclooxygénase à partir des acides gras des séries n-6 et n-3.

PGH, D, E, F, I : prostaglandine H, D, E, F ou I ; TXA, B : thromboxane de type A ou B. COX : cyclooxygénase ; (+++): activité pro-inflammatoire importante ; (+): activité pro-inflammatoire réduite. ARA : acide arachidonique (20:4 n-6) ; DGLA : acide dihomo- γ -linoléinique (20:3 n-6) ; EPA : acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3).

DGLA (20:3 n-6), il y a formation de PG de la série 1 dont l'activité pro-inflammatoire est moins importante que celle des PG de la série 2. Par ailleurs, la PGE₁ est un inhibiteur de la PLA₂ empêchant ainsi la libération de l'acide arachidonique (20:4 n-6) à partir des phospholipides membranaires (Horrobin, 2000). La voie de la cyclooxygénase sur l'EPA (20:5 n-3) conduit aux PG de la série 3 aux propriétés pro-inflammatoires moins importantes que celles de la série 2 (Ziboh, 1996 ; Ziboh *et al.*, 2000).

L'épiderme est un site de métabolisation important des lipides nécessaires au maintien des **propriétés physiologiques** de la peau. Parmi ces lipides, les AGPI présents dans les phospholipides membranaires tiennent une place importante. En effet, ils sont les précurseurs des eicosanoïdes, médiateurs intervenant dans les processus inflammatoires et prolifératifs et donc directement impliqués dans les lésions de la peau, telles que la dermatose atopique ou l'eczéma. Du fait de l'absence d'activité des $\Delta 6$ et $\Delta 5$ -désaturases au niveau de l'épiderme, ces acides gras sont nécessairement apportés par la circulation sanguine, ce qui implique que le statut en acides gras de l'alimentation peut moduler la synthèse de ces médiateurs lipidiques au niveau de la peau.

II. Modification du profil lipidique de la peau par le régime alimentaire

Il existe de nombreuses études, chez l'Homme et chez l'animal, montrant que la nature des lipides ingérés modifie le profil des acides gras des lipides plasmatiques. Cependant, les études présentant les répercussions de ces modifications sur le profil lipidique de l'épiderme sont relativement récentes et peu nombreuses, en particulier chez l'Homme. Les premières études portant sur la modification du profil des acides gras de la peau par administration orale d'huiles riches en AGPI ont débuté en 1985. Il s'agit essentiellement d'études cliniques visant à traiter des maladies de peau telles que le psoriasis (Ziboh *et al.*, 1986), la dermatose atopique (Schäfer et Kragballe, 1991 ; Yang *et al.*, 2000) et à diminuer la sensibilité de la peau aux ultraviolets (Rhodes *et al.*, 1994). Des études chez l'animal ont également montré les effets sur la peau d'une carence artificielle en AGPI essentiels (Hansen et Jensen, 1985 ; Chapkin *et al.*, 1987 ; Bowen et Clandinin, 2000 ; Chung *et al.*, 2002). Il faut noter que les différentes études répertoriées sont difficilement comparables car :

- Elles font intervenir des individus aux caractéristiques physiologiques différentes (personnes atteintes de psoriasis (Ziboh *et al.*, 1986 ; Rhodes *et al.*, 1994), de dermatose atopique (Schäfer et Kragballe, 1991), ayant une peau sensible aux ultraviolets (Rhodes *et al.*, 1994)) ou des modèles animaux différents (rat (Bowen et Clandinin, 2000) ou porc (Chapkin *et al.*, 1987 ; Chung *et al.*, 2002 ; Fu et Sinclair, 2000)) ;
- Elles se déroulent sur des durées variables, de 14 jours (Bowen et Clandinin, 2000) à 4 mois (Yang *et al.*, 2000) ;
- Elles concernent des huiles riches en AGPI n-3 et/ou n-6, pures ou en mélange. Les huiles sont mélangées à l'alimentation ou présentées sous forme de capsules. Les quantités d'AGPI ingérées sont variables.

II.1. Supplémentation des régimes en acides gras poly-insaturés de la série n-3

Les études de supplémentation des régimes alimentaires en AGPI n-3 partent du postulat selon lequel l'acide arachidonique (20:4 n-6) des tissus et ses métabolites étant

largement impliqués dans les désordres cutanés, il devrait être possible de modifier la formation et le métabolisme de cet acide gras, en enrichissant les membranes en AGPI de la série n-3. L'objectif de ces suppléments des régimes est triple : i) l'acide α -linoléique (18:3 n-3) est un substrat compétitif de la séquence réactionnelle d'élongation et de désaturation de l'acide linoléique (18:2 n-6) ; ii) les AGPI n-3 entrent directement en compétition avec l'acide arachidonique (20:4 n-6) au niveau des enzymes du métabolisme des eicosanoïdes ; iii) la libération d'AGPI n-3 dans la cellule conduit à la formation d'hydroxyacides (15-HEPE et 17-HODHE) aux propriétés anti-inflammatoires et de PG et LT dont l'activité biologique est plus faible que celle des produits issus de l'acide arachidonique (20:4 n-6).

Le tableau V compare les différentes études de la littérature portant sur la modification du profil des acides gras de la peau suite à une supplémentation des régimes alimentaires en AGPI n-3. L'apport supplémentaire d'acides gras de la série n-3 dans les régimes alimentaires est réalisé par des huiles de poisson ou un mélange d'huiles végétales.

Malgré les différences méthodologiques déjà mentionnées (Homme ou modèle animal, période de supplémentation du régime, dose d'AGPI administrée), la supplémentation des régimes alimentaires en AGPI n-3 à très longue chaîne (**EPA (20:5 n-3) et DHA (22:6 n-3)**) conduit à un enrichissement des lipides totaux en ces acides gras, chez l'Homme et chez l'animal. Par exemple, le taux d'AGPI n-3 totaux augmente d'un facteur 13 après 3 mois de supplémentation du régime sans qu'il y ait de modification du pourcentage en acides gras de la série n-6 (Rhodes *et al.*, 1994). Cependant, l'incorporation des AGPI n-3 au niveau cutané peut être dépendante des individus impliqués dans l'étude alors que leur incorporation dans les lipides plasmatiques n'est pas soumise à la variabilité individuelle (Ziboh *et al.*, 1986). De plus, suivant l'acide gras considéré, chez l'animal, l'incorporation est préférentielle dans certaines classes de lipides de l'épiderme. Par exemple, l'EPA (20:5 n-3) et le DHA (22:6 n-3) sont préférentiellement incorporés dans les phospholipides par rapport aux lipides apolaires (Chapkin *et al.*, 1987).

La supplémentation du régime en **acide α -linoléique** (18:3 n-3) conduit à une augmentation de sa teneur dans les lipides cutanés (Fu et Sinclair, 2000 ; Bowen et Clandinin, 2000). Cependant, suivant les études, l'enrichissement en acide α -linoléique (18:3 n-3) s'accompagne (Bowen et Clandinin, 2000) ou non (Fu et Sinclair, 2000) d'une augmentation

Tableau V : Modification du profil des acides gras de la peau suite à des régimes supplémentés avec des huiles riches en acides gras poly-insaturés de la série n-3.

Sujets	Source des AGPI	Dose ingérée	Durée (j)	Lipides de l'épiderme analysés	Effet de la supplémentation sur le profil des acides gras				Références	
13 sujets atteints de psoriasis	Huile de poisson	EPA : 11 – 14 g/j DHA : 7,2 – 9,0 g/j	56	Lipides totaux	Augmentation du rapport EPA/DHA variable en fonction des individus *				Ziboh <i>et al.</i> , 1986	
13 femmes photosensibles ou atteintes de psoriasis	Capsules d'huile de poisson	EPA : 1,8 g/j DHA : 1,2 g/j	90	Lipides totaux	n-6	NS	EPA *	+ ¹ +++	Rhodes <i>et al.</i> , 1994	
Porcs déficients en acides gras essentiels	Huile de poisson	EPA : 0,26 g/j DHA : 0,18 g/j	42	Lipides totaux	LA **	- 26 %	EPA	+	Chapkin <i>et al.</i> , 1987	
					ARA	NS	DPA	++		
							DHA	+++		
				Lipides apolaires	LA	NS	EPA	NS	Chapkin <i>et al.</i> , 1987	
					ARA	NS	DPA	NS		
							DHA	++		
				Phospholipides	LA	- 53 %	EPA	+++	Chapkin <i>et al.</i> , 1987	
					ARA	NS	DPA	+++		
							DHA	+++		
Porcs	Huiles végétales en mélange	ALA : 1,73 g pour 100 g d'aliment	21	Lipides totaux de la peau	LA ***	NS	ALA	+	Fu et Sinclair, 2000	
					ARA	- 26 %	EPA	NS		
							DPA	NS		
							DHA	NS	Fu et Sinclair, 2000	
Rats	Huiles végétales	ALA : 4 g pour 100 g d'aliment	14	Lipides totaux de la peau	LA ***	- 28 %	ALA	++		Bowen et Clandinin, 2000
					ARA	NS	EPA	++		
							DPA	++		
							DHA	NS	Bowen et Clandinin, 2000	

LA : acide linoléique (18:2 n-6) ; ALA : acide α -linoléique (18:3 n-3) ; EPA : acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3) ; DHA : acide docosahexaénoïque (22:6 n-3) ; DPA : acide docosapentaénoïque (22:5 n-3) ; ARA : acide arachidonique (20:4 n-6) ; ¹ : Facteur multiplicatif (+) : 1<+≤10 ; 10<++≤100 ; +++ : > 100 ; NS : variation non significative. Les facteurs multiplicatifs sont exprimés par rapport : aux sujets avant supplémentation (*) ; à un régime déficient en acides gras essentiels (**) ; à un régime pauvre en ALA (***)

des teneurs en AGPI n-3 à plus longue chaîne tels que l'EPA (20:5 n-3), l'acide docosapentaénoïque (DPA, 22:5 n-3) et le DHA (22:6 n-3). L'acide α -linoléique (18:3 n-3) pourrait être, soit β -oxydé, soit excrété au niveau de la peau (Fu et Sinclair, 2000). En revanche, il y a toujours une diminution significative de l'acide linoléique (18:2 n-6) (Bowen et Clandinin, 2000) ou de son métabolite, l'acide arachidonique (20:4 n-6) (Fu et Sinclair, 2000).

11.2. Supplémentation des régimes en acides gras poly-insaturés de la série n-6

Les études de supplémentation des régimes alimentaires en AGPI n-6 partent des postulats selon lesquels : i) l'acide linoléique (18:2 n-6) est un acide gras indispensable entrant dans la composition des céramides 1 qui participent activement à la fonction de barrière cutanée de la peau (Rogers *et al.*, 1996) ; ii) l'acide linoléique (18:2 n-6) est le précurseur d'un diacylglycérol substitué par le 13-HODE qui module l'activité et l'expression de la protéine kinase C épidermique impliquée dans l'hyperprolifération de l'épiderme (Ziboh *et al.*, 2000) ; iii) l'acide γ -linoléique (18:3 n-6) est le précurseur du DGLA (20:3 n-6) du fait de la présence d'une élongase au niveau cutané (Chapkin *et al.*, 1986). Le DGLA (20:3 n-6) sert de substrat aux enzymes du métabolisme des eicosanoïdes permettant la synthèse de molécules à l'activité pro-inflammatoire réduite telles que la PGE₁ et anti-inflammatoire telles que le 15-HETrE (Ziboh *et al.*, 2000).

Le tableau VI compare les différentes études de la littérature portant sur la modification du profil des acides gras de la peau suite à une supplémentation des régimes alimentaires en AGPI n-6. L'apport supplémentaire d'acides gras de la série n-6 dans les régimes alimentaires est réalisé par des huiles végétales extraites de graines de primevère, de bourrache ou de carthame. Il est intéressant de noter que l'acide γ -linoléique (18:3 n-6) est préférentiellement estérifié en position *sn*-3 dans l'huile de primevère et en position *sn*-2 dans l'huile de bourrache.

La supplémentation des régimes alimentaires en AGPI n-6 sous la forme d'**acide linoléique (18:2 n-6)** associée ou non à l'**acide γ -linoléique (18:3 n-6)** conduit, dans la plupart des cas, à un enrichissement des lipides de l'épiderme en ces acides gras, et, parfois, en métabolites supérieurs, DGLA (20:3 n-6) et acide arachidonique (20:4 n-6).

Tableau VI : Modification du profil des acides gras de la peau suite à des régimes supplémentés en huiles riches en acides gras poly-insaturés de la série n-6.

Sujets	Source des AGPI	Doses ingérées (g/j)	Durée (j)	Lipides de l'épiderme analysés	Effet de la supplémentation sur le profil des acides gras				Références
					LA	GLA	DGLA	ARA	
15 sujets avec dermatose atopique	Capsules d'huile de primevère	LA : 4,3 GLA : 0,6	70	Phosphatidylcholine	NS *		+ ¹	+	Schäfer et Kragballe, 1991
				Lipides totaux	+ **	NS	NS	NS	
Porcs déficients en acides gras essentiels	Huile carthame	LA : 1,19	42	Lipides neutres	+	NS	NS	NS	Chapkin <i>et al.</i> , 1987
				Phospholipides	+	NS	NS	NS	
				Lipides totaux	+	++	NS	NS	
	Huile primevère	LA : 1,11 GLA : 0,14	Lipides neutres	+	NS	NS	NS		
			Phospholipides	+	++	+	+		
			Phospholipides	NS **	NS	+++	++		
Porcs déficients en acides gras essentiels	Huile primevère	LA : 2,15 GLA : 0,36	70	Céramides	+	NS	++	- 80 %	Chung <i>et al.</i> , 2002
				Lipides neutres	+	NS	++	NS	
				Phospholipides	NS	NS	+++	++	
	Huile bourrache	LA : 1,15 GLA : 0,71	Céramides	+	NS	+++	NS		
			Lipides neutres	- 25 %	NS	++	NS		
			Phospholipides	+	NS	+++	++		
Mélange huiles : Primevère : 50 % Bourrache : 50 %	LA : 2,23 GLA : 0,42	Céramides	+	NS	+++	- 53 %			
		Lipides neutres	NS	NS	++	+			

LA : acide linoléique (18:2 n-6) ; GLA : acide γ -linoléique (18:3 n-6) ; DGLA : acide dihomogamma-linoléique (20:3 n-6) ; ARA : acide arachidonique (20:4 n-6) ; ¹ : Facteur multiplicatif (+) : 1<+≤10 ; 10<++≤100 ; +++ : > 100 ; NS : variation non significative. Les facteurs multiplicatifs sont exprimés par rapport : aux sujets avant supplémentation (*) ; à un régime déficient en acides gras essentiels (**).

Un apport journalier de 6 g d'huile de primevère pendant 70 jours est nécessaire pour augmenter significativement les taux d'acide arachidonique (20:4 n-6) et du DGLA (20:3 n-6) de la phosphatidylcholine (PC) de l'épiderme de sujets atteints de dermatose atopique (Schäfer et Kragballe, 1991). L'enrichissement en DGLA (20:3 n-6) est identique dans les phospholipides et est plus important dans les céramides de l'épiderme suite à une supplémentation du régime en huile de bourrache par rapport à une supplémentation du régime en huile de primevère (Chung *et al.*, 2002). Si on compare les résultats obtenus avec l'huile de primevère et le mélange 50/50 huile de primevère / huile de bourrache, correspondant à un apport identique des différents acides gras mais avec une stéréospécificité différente, on constate que la présence d'acide γ -linoléinique (18:3 n-6) en position *sn*-2 (huile de bourrache), plutôt qu'en position *sn*-3 (huile de primevère) conduit à une plus grande proportion du DGLA dans les céramides avec le mélange d'huiles. Ces résultats suggèrent que l'élongation de l'acide γ -linoléinique (18:3 n-6) en DGLA (20:3 n-6) et l'incorporation de ce métabolite dans les lipides de l'épiderme dépendent à la fois de sa teneur dans l'huile alimentaire mais également de sa position sur le squelette glycérol des triglycérides alimentaires.

11.3. Supplémentation mixte des régimes alimentaires en acides gras poly-insaturés des séries n-3 et n-6

Pour les raisons évoquées dans les deux paragraphes précédents, l'apport concomitant d'acides gras des séries n-3 et n-6 peut présenter un intérêt dans la régulation des fonctions physiologiques de la peau. Peu d'études rapportent l'influence de l'apport simultané d'acides linoléique (18:2 n-6) et α -linoléinique (18:3 n-3). Une étude menée chez le rat avec une supplémentation mixte des régimes sous la forme d'un mélange d'huiles végétales (tournesol : 50 % ; soja : 40 % ; lin : 10 %), pendant 26 jours montre que 18,7 % de l'**acide linoléique (18:2 n-6)** ingéré s'accumule en tant que tel dans les différents organes (foie, peau, tissus adipeux et viscéral), 3,0 % sont convertis en AGPI à très longue chaîne, le reste étant β -oxydé (75,5 %) ou excrété (1,2 %) (Cunnane et Anderson, 1997). Des résultats similaires sont trouvés pour l'**acide α -linoléinique (18:3 n-3)** (accumulation (10,9 %), conversion (1,4 %), β -oxydation (84,9 %) et excrétion (2,2 %)). Au niveau de la peau, une telle supplémentation du régime alimentaire entraîne une augmentation significative des taux d'acides linoléique

(18:2 n-6) et α -linoléique (18:3 n-3), respectivement, de 4 et 7 %. Simultanément, leurs métabolites à longue chaîne augmentent de 26 % pour la série n-6 et 10 % pour la série n-3.

Une autre étude porte sur la supplémentation des régimes en acides gras essentiels sous forme d'huiles extraites de graines ou de baies d'aubépine, présentées sous forme de capsules, pendant 4 mois, chez des sujets atteints de dermatose atopique (Yang *et al.*, 2000). Seule la supplémentation des régimes à base de l'huile extraite de graines d'aubépine (la plus riche en acides linoléique (18:2 n-6) et α -linoléique (18:3 n-3)) augmente significativement le taux de DPA (22:5 n-3) des phospholipides de l'épiderme. Cependant, cette période de supplémentation de 4 mois n'est pas suffisante pour modifier de manière significative les taux d'EPA (20:5 n-3) et de DHA (22:6 n-3). Ce résultat suggère que la composition des acides gras des phospholipides de l'épiderme est régulée.

En conclusion, les études montrent la possibilité de modifier le profil lipidique de la peau par une supplémentation des régimes en AGPI de la série n-3 et/ou de la série n-6. Ces études entrent dans le cadre des relations entre les apports nutritionnels en acides gras et l'état fonctionnel de la peau. Une revue récente (Boelsma *et al.*, 2001) met bien en évidence le rôle des acides gras alimentaires sur certaines propriétés physiologiques de la peau. Ainsi, une modification du profil des acides gras de l'épiderme peut engendrer deux conséquences sur la peau :

- L'une directe qui traduit le fait que les acides gras jouent un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité du *stratum corneum* et permettent, notamment, d'assurer la fonction de barrière à l'évaporation cutanée. Ainsi, l'effet bénéfique d'une supplémentation du régime alimentaire en acide linoléique (18:2 n-6) sur la rétention d'eau par la peau a été mis en évidence (Hansen et Jensen, 1985 ; Melton *et al.*, 1987 ; Humbert, 2003) ;
- L'autre indirecte qui traduit le fait que les AGPI sont des précurseurs de métabolites actifs. Ainsi, les AGPI n-3 ont montré leur influence positive sur le système immunitaire (Kelley *et al.*, 1991 ; Wu *et al.*, 1999) et leur effet photoprotecteur vis-à-vis des rayons ultraviolets (Rhodes *et al.*, 1994). Leur action bénéfique sur des pathologies cutanées de type inflammatoire telles que la dermatose atopique (Horrobin, 2000) et le psoriasis (Ikai, 1999) a aussi été largement démontrée.

III. Interactions des liposomes avec la peau

Nous avons montré que la composition lipidique particulière du *stratum corneum* et son organisation confèrent à la peau des propriétés de barrière contre la perte en eau et que le *stratum corneum* constitue une zone cohésive limitant la pénétration de molécules extérieures. Ainsi, pour améliorer l'efficacité d'un principe actif administré par voie topique, il est nécessaire qu'il soit formulé. Deux approches sont le plus souvent utilisées (Foldvari, 2000). La première consiste à associer le principe actif avec des molécules favorisant leur pénétration dans l'épiderme. Cette solution n'est pas toujours satisfaisante car elle favorise plutôt l'absorption percutanée que le ciblage de l'épiderme et elle peut être associée à des effets secondaires (Schmid et Korting, 1996). La seconde approche réside dans l'incorporation des molécules actives dans un système vecteur. Dans ce contexte, les **vésicules lipidiques ou liposomes** sont des candidats intéressants (Lasic, 1993). Ils favorisent la dissolution des molécules hydrophobes, permettent l'encapsulation de molécules hydrosolubles, et forment une matrice visqueuse. L'utilisation des liposomes comme vecteurs de principes actifs en application topique est décrite depuis les années 75 (Lasic, 1993). Cependant, il est important de remarquer que, même en l'absence de composés actifs, les liposomes sont des vecteurs d'eau et de lipides, de par leur structure et leur composition. A ce titre, ils peuvent modifier l'ultrastructure de la peau et son état d'hydratation. Ce sont ces deux points qui sont développés ci-après.

III.1. Effets des liposomes sur l'ultrastructure du stratum corneum

De nombreuses études se proposent de comprendre les mécanismes de pénétration des liposomes dans les différentes couches du *stratum corneum* (Lasic, 1993 ; Bouwstra *et al.*, 2003). Pour évaluer l'interaction des liposomes avec la peau et, notamment, leur effet sur l'ultrastructure du *stratum corneum*, deux approches sont utilisées : i) une application occlusive qui consiste à mettre le produit en contact avec la peau et à recouvrir le site d'application avec une membrane imperméable ; ii) une application non occlusive qui permet le maintien du gradient osmotique trans-épidermique. Les expérimentations peuvent être réalisées *in vitro* sur de la peau humaine ou animale, mais de plus en plus d'études *in vivo*

sont menées chez l'Homme grâce au développement de nouvelles techniques d'observation microscopique.

Quelques études récentes portant sur l'effet des liposomes sur l'organisation du *stratum corneum* dans le cadre de l'application occlusive et non occlusive sont reportées, respectivement, dans les tableaux VII et VIII. De manière générale, l'interaction des liposomes peut induire des modifications plus ou moins prononcées de l'ultrastructure du *stratum corneum*, soit au niveau intercellulaire, soit au niveau intracellulaire. La pénétration des liposomes est principalement influencée par la méthode d'application et l'état thermodynamique des bicouches. Ainsi, les liposomes dont les membranes sont dans l'état « gel » n'interagissent pas ou peu avec l'épiderme, les structures membranaires des vésicules restant à l'interface entre la suspension et le *stratum corneum* (van den Bergh *et al.*, 1998) ou au niveau des couches superficielles du *stratum corneum* (Lasch et Bouwstra, 1995 ; Betz *et al.*, 2001). En revanche, les liposomes constitués de bicouches dans un état « cristal liquide » modifient l'organisation des lipides du *stratum corneum* :

- En pénétrant sous forme intacte dans les couches plus profondes de l'épiderme (Bouwstra *et al.*, 1990) ;
- En modifiant la morphologie des cornéocytes. Suite à l'application des liposomes, les cornéocytes apparaissent gonflés par rapport à ceux du *stratum corneum* non traité (Lasch et Bouwstra, 1995) ou contiennent des structures vésiculaires (van den Bergh *et al.*, 1998) ;
- En formant des amas de structures membranaires au sein des lamelles lipidiques intercellulaires de la peau (Lasch et Bouwstra, 1995 ; Betz *et al.*, 2001 ; Honeywell-Nguyen *et al.*, 2003).

Plusieurs **mécanismes** sont évoqués pour expliquer les interactions entre les liposomes et le *stratum corneum* :

- **Les liposomes peuvent pénétrer intacts dans le *stratum corneum* grâce à un gradient de lipides, de pression ou d'hydratation.** Dans le cas du gradient d'hydratation, la force d'hydratation est générée par la différence de la teneur en eau entre le *stratum corneum* (20 %) et le *stratum granulosum* (70 %). Cette force pourrait déplacer les liposomes à travers la peau dès lors qu'elle serait supérieure à la résistance générée par le passage des liposomes à travers les régions lipidiques. Ce mécanisme concernerait les liposomes élastiques de petite taille (Cevc *et al.*, 2002 ; Honeywell-Nguyen *et al.*, 2003) ;

Tableau VII : Exemples de formulation de vésicules lipidiques utilisées en application occlusive *in vitro* et mode d'interaction avec la peau.

Formulation des vésicules	Type – taille des vésicules (nm)	Etat des lipides	Temps d'application	Tissu	Modification de l'ultrastructure du <i>stratum corneum</i>	Références
Cholestérol:C ₁₂ EO ₃ (60:40 % en mole)	MLV	Gel	48 h	<i>Stratum corneum</i> humain	Pénétration des vésicules intactes ou désintégration des vésicules et reformation	Bouwstra <i>et al.</i> , 1990
	SUV					
PC:PE:PI:N-acyl-PE:stéarine:huile de soja (28:2:11:32:12:21 en poids)	UV	Gel	48 h	<i>Stratum corneum</i> humain	Fusion des vésicules avec la couche supérieure du <i>stratum corneum</i>	Lasch et Bouwstra, 1995
PC et lyso-PC:PE:PA et N-acyl-PE (85:10:5 % en poids)		Cristal liquide			Intégration de fragments de membranes de liposomes dans le <i>stratum corneum</i>	
DSPC:cholestérol:acide stéarique (48:30:22 % en poids)	120-200	Gel	24 h	<i>Stratum corneum</i> humain	Formation d'amas lipidiques à la surface du <i>stratum corneum</i>	van den Bergh <i>et al.</i> , 1998
DLPC:cholestérol:acide stéarique (48:30:22 % en poids)		Cristal liquide			Formation de structures vésiculaires dans les couches profondes du <i>stratum corneum</i>	
Phospholipon [®] 80	225 ± 8	Cristal liquide	158 h	Epiderme humain	Distribution homogène des lipides dans les zones lamellaires du <i>stratum corneum</i>	Betz <i>et al.</i> , 2001
Sphingomyéline	327 ± 20				Gel	
PEG-8-L:L-595:sulfosuccinate (50:50:5 en mole)	95-110	Cristal liquide	1 h	Peau humaine	Pénétration de quelques vésicules intactes et formation de plaques lipidiques dans les couches profondes du <i>stratum corneum</i>	Honeywell-Nguyen <i>et al.</i> , 2003

C_nEO_m : polyoxyéthylène-alkyl-éther 3 ≤ m ≤ 7 et 12 ≤ n ≤ 18 ; PEG-8-L : octaoxyéthylène laurate ester ; L-595 : sucroester laurique ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PI : phosphatidylinositol ; N-acyl-PE : N-acyl-phosphatidyléthanolamine. Lyso-PC : lyso-phosphatidylcholine ; PA : acide phosphatidique ; DSPC : distéarylphosphatidylcholine ; DLPC : dilaurylphosphatidylcholine MLV : liposomes multilamellaires ; SUV : liposomes unilamellaires de petite taille ; UV : vésicules unilamellaires.

Tableau VIII : Exemples de formulation de vésicules lipidiques utilisées en application non occlusive *in vitro* et *in vivo* et mode d'interaction avec la peau.

Formulation des vésicules	Type – taille des vésicules (nm)	Etat des lipides	Type d'expérimentation et temps d'application	Tissu	Modification de l'ultrastructure du <i>stratum corneum</i>	Références
PEG-8-L:L-595 (30:70 % en mole)	LUV 100 à 150	Cristal liquide	<i>in vitro</i> 16 h	Epiderme humain	Désorganisation des lipides intercellulaires Présence d'agrégats lipidiques et de structures vésiculaires unilamellaires dans les espaces intercellulaires du <i>stratum corneum</i>	van den Bergh <i>et al.</i> , 1999
Wasag-7:cholestérol:sulfate de cholestérol (50:50:5 en mole)		Gel			Pas de modification de l'ultrastructure du <i>stratum corneum</i>	
Transfersomes [®]	150 ± 30	Cristal liquide	<i>in vivo</i> 8 à 12 h	Peau de souris	Présence de vésicules lipidiques intactes dans l'ensemble du <i>stratum corneum</i>	Cevc <i>et al.</i> , 2002
PEG-8-L:L-595:sulfosuccinate (50:50:5 en mole)	100-120	Cristal liquide	<i>in vivo</i> 1 à 4 h	Peau humaine	Pénétration de quelques vésicules intactes et formation de plaques lipidiques à partir de fragments vésiculaires	Honeywell-Nguyen <i>et al.</i> , 2003

PEG-8-L : octaoxyéthylène laurate ester ; L-595 : sucroester laurique ; Wasag-7 : sucroester stéarique (70 %) et palmitique (30 %) ; Transfersomes[®] : liposomes à base de lécithine de soja, de cholate de sodium et d'éthanol ; LUV : liposomes unilamellaires de grande taille.

- **Les liposomes peuvent pénétrer intacts dans le *stratum corneum* par des zones privilégiées.** Deux cas de figure peuvent être envisagés : soit les liposomes passent à travers des pores qui représenteraient des imperfections de l'organisation des lipides intercornéocytaires (Honeywell-Nguyen *et al.*, 2003) ; soit les liposomes dégradent l'empilement des lipides membranaires créant des points par lesquels il peut y avoir pénétration. Ce dernier mode de pénétration est préconisé, par exemple, pour les éthosomes (liposomes contenant des proportions importantes d'éthanol (20 à 50 %)) (Touitou *et al.*, 2000) ou pour des liposomes riches en PC, c'est à dire incapables de fusionner avec les lipides des zones intermembranaires du *stratum corneum* (Zellmer *et al.*, 1998) ;
- **Les liposomes s'adsorbent en surface du *stratum corneum*.** Dans ce cas, il y a formation d'un réseau dense de bicouches lipidiques dû à l'agrégation et à la fusion des liposomes. Ces phénomènes seraient rendus possibles par le pH du *stratum corneum* et/ou la présence des cornéocytes. Ils concernent principalement les liposomes dont la membrane est dans un état gel, à base de phospholipides (van den Bergh *et al.*, 1998), de sphingolipides (Betz *et al.*, 2001) ou de tensioactifs non ioniques (Lasch et Bouwstra, 1995 ; van den Bergh *et al.*, 1999) ;
- **Les liposomes peuvent fusionner avec les lipides lamellaires du *stratum corneum*.** Les liposomes ayant une forte teneur en PC (Betz *et al.*, 2001), lyso-phosphatidylcholine (lyso-PC) (Kirjavainen *et al.*, 1996) ou à base de tensioactifs non ioniques (Lasch et Bouwstra, 1995; Honeywell-Nguyen *et al.*, 2003) peuvent être concernés par ce mécanisme. On observe alors différents types d'organisation lipidiques présents simultanément ou non dans les couches profondes du *stratum corneum* : des agrégats sphériques oligolamellaires ou non (van den Bergh *et al.*, 1999), des petites structures sphériques aplaties (Lasch et Bouwstra, 1995). Dans certains cas, ces phénomènes de fusion peuvent même entraîner une désorganisation des empilements intercellulaires du *stratum corneum* avec un changement local d'orientation des zones lamellaires (van den Bergh *et al.*, 1999) ;
- **Les structures vésiculaires se désintègrent à la surface du *stratum corneum* pour diffuser dans les espaces intercellulaires.** Par exemple, des liposomes à base de phosphatidylsérine et, dans une moindre mesure, de lipides extraits du *stratum corneum* humain n'ont aucun effet sur l'organisation structurale du

stratum corneum reconstitué (Zellmer *et al.*, 1998). Les résultats sont interprétés en termes de miscibilité des lipides des liposomes avec ceux du *stratum corneum* ;

- **Les liposomes peuvent fusionner avec les espaces intracellulaires du *stratum corneum*.** En effet, la présence de petits agrégats lipidiques au sein des cornéocytes suggère la fusion d'une partie des liposomes avec l'enveloppe des cornéocytes (van den Bergh *et al.*, 1999).

III.2. Effets des liposomes sur l'état d'hydratation du stratum corneum

L'état d'hydratation de la peau joue un rôle primordial dans le maintien de ses propriétés mécaniques, une perte en eau trop importante étant le signe de pathologies cutanées telles que la dermatose atopique et le psoriasis. Pour maintenir le niveau d'hydratation, plusieurs stratégies sont couramment utilisées :

- L'apport d'eau directement au *stratum corneum* par l'application d'une formulation aqueuse ou contenant des molécules fortement hydratées ;
- L'utilisation d'agents occlusifs tels que des huiles minérales qui vont établir un film lipidique à la surface du *stratum corneum* et bloquer physiquement la perte en eau trans-épidermique (Lynde, 2001) ;
- L'utilisation d'agents humectants (glycérine, sorbitol) qui, en théorie, attirent l'eau présente dans les couches profondes de l'épiderme vers le *stratum corneum* (Lynde, 2001) ;
- L'utilisation d'agents émoullissants (cholestérol, squalène, acides gras) qui vont remplir les espaces intercornéocytaires de lipides (Lynde, 2001) ;
- L'utilisation de lipides similaires à ceux présents au niveau du *stratum corneum* (céramides, acides gras essentiels) de manière à rétablir la fonction de barrière de l'épiderme.

Les liposomes pourraient contribuer à l'amélioration de l'état d'hydratation de la peau à divers titres :

- Ils apportent de l'eau par leur **volume interne aqueux** et *via* l'**hydratation des têtes polaires** des phospholipides ;
- Ils empêchent l'évaporation transcutanée en créant un **film hydro-lipidique** à la surface du *stratum corneum*. Sur la base des résultats obtenus sur les interactions

des liposomes avec le *stratum corneum*, on peut supposer que les liposomes les plus aptes à créer ce film seraient ceux constitués de lipides dans un état gel ;

- Les liposomes, par leur membrane, permettent l'apport de **lipides** participant à la fonction de barrière contre la perte en eau. Il peut s'agir de lipides structuraux entrant dans la composition des espaces interconocytaires du *stratum corneum* comme le cholestérol, ou de lipides fonctionnels comme des acides gras essentiels véhiculés sous forme de phospholipides par exemple.

On trouve cependant dans la littérature peu d'études portant sur le rôle des liposomes pour diminuer la perte en eau trans-épidermique (de Pera *et al.*, 2000 ; Hatziantoniou *et al.*, 2000 ; Coderch *et al.*, 2002). Une étude chez la souris montre que l'abolition de la perte en eau induite par des rayons ultraviolets B est fortement dépendante de la composition des lipides et de la taille des liposomes, les liposomes de petite taille et préparés à partir de lipides d'origine marine étant plus efficaces que des liposomes de grande taille préparés à partir de lipides végétaux (Hatziantoniou *et al.*, 2000). Des études chez l'Homme, utilisant des liposomes à base d'un mélange de lipides du *stratum corneum*, ou de lipides extraits de la laine, montrent que les fonctions de barrière de peaux endommagées sont restaurées (de Pera *et al.*, 2000 ; Coderch *et al.*, 2002).

En conclusion, si l'effet des liposomes sur **l'organisation des lipides** du *stratum corneum* est étudié depuis plus de 20 ans, il n'apparaît pas de consensus sur les mécanismes d'action impliqués. L'interaction des liposomes avec l'épiderme résulterait plutôt d'un mécanisme multifactoriel complexe. Il en est de même pour l'effet des liposomes sur la perte insensible en eau de l'épiderme. La comparaison des résultats de la littérature est d'autant plus délicate que les liposomes utilisés possèdent des caractéristiques physico-chimiques variées (composition, taille) de sorte qu'ils ne présentent pas la même stabilité, ni les mêmes caractéristiques de surface. Ainsi, des forces différentes (forces de van der Waals, forces d'hydratation et électrostatiques) sont mises en œuvre dans les interactions entre les liposomes et le *stratum corneum*. Néanmoins, toutes les études s'accordent sur le fait que le devenir des liposomes en contact avec le *stratum corneum* dépend principalement de la composition des membranes des vésicules qui conditionne l'état thermodynamique des membranes. Enfin, il faut noter que les résultats sont le plus souvent obtenus sur des peaux saines. Dans le cas des peaux malades présentant des défauts de perméabilité, les liposomes pourraient atteindre les couches profondes de l'épiderme et même du derme (Schmid et Korting, 1996).

B. Matériel et méthodes

1. Préparation et caractérisations physico-chimiques des Marinosomes[®]

1.1. Préparation des Marinosomes[®]

Le mélange de lipides utilisé pour la préparation des liposomes est un mélange naturel de lipides extraits d'un organisme marin. Il est fourni par la société Phosphotech (Phosphomins[®]). De l' α -tocophérol (Fluka) est systématiquement ajouté au mélange de lipides à raison de 5 % en poids. Les tableaux IX et X présentent la composition des lipides du mélange lipidique final utilisé.

Les Marinosomes[®] sont préparés dans une solution tampon (10 mM de N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[acide 2-éthane sulfonique] (HEPES, Sigma Aldrich) ajustée à pH 7,4). Pour les études physico-chimiques, les Marinosomes[®] sont préparés par hydratation d'un film de lipides par la solution de tampon HEPES à une concentration finale de 20 g.L⁻¹ comme précédemment décrit (Nacka *et al.*, 2001a). La distribution en taille des Marinosomes[®] est rendue plus homogène par la technique dite d'extrusion qui consiste à éliminer les liposomes de grande taille en faisant passer la suspension à travers un filtre de diamètre de pores défini. Dans notre cas, un passage unique est appliqué à la suspension et les filtres utilisés sont en polycarbonate (diamètre de pores : 5 μ m) (Millipore). Pour les études de supplémentation des régimes des rats, la concentration de lipides est de 200 g.L⁻¹. Les lipides et l' α -tocophérol (30 g) en solution chloroformique sont déposés sur les parois d'un ballon par évaporation du solvant. Les Marinosomes[®] sont obtenus par hydratation, sous agitation rotative et sous vide, pendant 12 heures. Il n'y a pas d'étape d'extrusion.

1.2. Conditionnement des Marinosomes[®]

Le comportement physico-chimique des Marinosomes[®] est étudié dans les conditions de l'application topique vis-à-vis des paramètres température, pH et concentration du calcium (ajouté sous forme de chlorure de calcium) (Tableau XI). Les conditions de référence sont la

Tableau IX : Composition des lipides (% en poids) du mélange lipidique utilisé pour la préparation des Marinosomes®.

	Phospholipides	Cholestérol	Triglycérides	α-tocophérol
% en poids	74,8 ± 5,2	14,3 ± 1,5	5,9 ± 0,9	5,0 ± 0,0

Les valeurs représentent la moyenne de 3 analyses effectuées sur 3 lots de mélange lipidique.

Tableau X : Composition des phospholipides (% en poids) présents dans le mélange lipidique utilisé pour la préparation des Marinosomes®.

	PC	PE	Lyso-PC	Lyso-PE	Autres
% en poids	71,3 ± 2,0	18,0 ± 0,5	1,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1	7,0 ± 0,2

PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; Lyso-PC : lyso-phosphatidylcholine ; Lyso-PE : lyso-phosphatidyléthanolamine. Les valeurs représentent la moyenne de 2 analyses effectuées sur un mélange lipidique.

Tableau XI : Conditions expérimentales des études physico-chimiques testées sur les suspensions de Marinosomes® ([Lipides] = 2 g.L⁻¹).

Température (°C)	pH	[Calcium] (g.L⁻¹)
25	7,4	0
37	7,4	0
25	4,0	0
25	7,4	2,5
25	7,4	9
37	4,8	9

solution tampon HEPES à pH 7,4, sans calcium et une température de 25°C. Les études sont réalisées sur une durée maximale de 48 heures pour une concentration de lipides de 2 g.L⁻¹.

1.3. Caractérisations physiques des Marinosomes®

La taille et la forme des Marinosomes® ainsi que leur évolution dans les conditions d'utilisation en application topique sont suivies par différentes méthodes :

- La **turbidimétrie**. Cette méthode est basée sur la propriété des particules à diffuser la lumière. Elle rend compte de la morphologie des particules (taille et forme) et de son évolution (Yoshikawa *et al.*, 1983 ; Matsuzaki *et al.*, 2000). La densité optique (DO) est lue à 400 nm (spectrophotomètre UV/VIS Lambda BIO 20, Perkin Elmer), longueur d'onde à laquelle les lipides et la solution tampon HEPES n'absorbent et ne diffusent pas la lumière. Les suspensions de Marinosomes® sont diluées pour que la DO initiale soit de l'ordre de 0,5 (soit une concentration de lipides d'environ 0,4 g.L⁻¹) de telle sorte qu'il soit possible de suivre l'évolution morphologique des Marinosomes® par les variations de turbidité ;
- La **granulométrie laser**. Une lumière laser qui éclaire une particule n'est pas seulement diffractée, mais aussi réfléchiée et diffusée. La quantité de lumière déviée et l'importance de l'angle de déviation permettent de mesurer la taille des particules. Les mesures sont réalisées sur un granulomètre Mastersizer 2000 (Malvern). Le diamètre moyen des Marinosomes® ainsi que la distribution des particules sont obtenus ;
- La **microscopie en contraste de phase**. Le microscope optique est composé d'un microscope Olympus CX 40 équipé d'un dispositif de contraste de phase, d'un objectif x 40/0,65 (Olympus) et d'une caméra vidéo (Sony DKC-CM30). Le contraste de phase permet l'observation d'objets peu absorbants, présentant un indice de réfraction différent de celui du milieu environnant. Dans le cas des membranes de phospholipides, il est possible de visualiser, à la résolution optique, la séparation, par les membranes, du milieu aqueux environnant. Avec le montage utilisé, les vésicules apparaissent comme des cercles sombres sur un fond plus clair ;

- La **microscopie électronique après cryo-fracture**. Les clichés de microscopie électronique sont réalisés au Centre de Ressources en Microscopie Electronique de Bordeaux en collaboration avec R. Oda (Institut Européen de Chimie et Biologie). Les échantillons de Marinosomes[®] sont analysés selon le protocole décrit dans la référence Arnold *et al.* (2002). Une goutte de suspension de Marinosomes[®] ([Lipides] = 20 g.L⁻¹) est placée entre deux plaques de cuivre. L'ensemble est congelé rapidement dans du propane liquide refroidi par de l'azote liquide et placé sur une unité de transport conservée dans l'azote liquide jusqu'à l'étape de cryo-fracture. Cette étape consiste à placer l'unité de transport dans une enceinte (BAF 300) sous vide (10⁻⁶ mbar), à une température de -120 °C. Lorsque la température et le vide désirés sont atteints, l'échantillon est fracturé en enlevant rapidement la plaque supérieure. Un film de platine et de carbone est déposé avec un angle de 45° sur la partie de l'échantillon mise à nu, puis un film de carbone est déposé avec un angle de 90° pour consolider le système. La réplique ainsi obtenue est lavée par un mélange chloroforme:méthanol (2:1 en volume) pour éliminer les Marinosomes[®] puis disposée sur une grille en cuivre à 200 mailles. La réplique est visualisée avec un microscope électronique en mode transmission à 200 kV (Jeol 2000 FX) équipé d'une caméra (EMTV10S). Les images sont numérisées à l'aide du logiciel Quantel Sapphire.

1.4. Caractérisations chimiques des Marinosomes[®]

1.4.1. Dosage des produits d'oxydation volatils

La stabilité des Marinosomes[®] vis-à-vis de l'oxydation est testée par le dosage des aldéhydes volatils par chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à l'espace de tête. Le propanal est le produit de l'oxydation secondaire des AGPI de la série n-3 (Frankel et Tappel, 1991) tandis que le pentanal et l'hexanal sont les produits résultant de l'oxydation des AGPI de la série n-6. Après équilibre entre la phase liquide et la phase gazeuse située au dessus du liquide, 2 mL de l'espace de tête sont prélevés et analysés (GC 8130, Carlo-Erba, colonne capillaire DB 1701, J&W, longueur = 30 m, diamètre interne = 0,32 mm, épaisseur du film = 1 µm). La pression du gaz vecteur (hydrogène) est fixée à 0,4 bar. Les températures de

l'injecteur et du détecteur sont de 250°C. La température de la colonne est initialement de 40°C pendant 5 min puis elle augmente jusqu'à 200°C à raison de 10°C.min⁻¹. Des gammes d'étalonnage sont réalisées à partir de standards d'aldéhydes purs (propanal, pentanal et hexanal, Sigma) dans les mêmes conditions chromatographiques pour déterminer la quantité de produits d'oxydation présente dans les suspensions de Marinosomes[®]. L'oxydation complète des AGPI est obtenue en incubant les liposomes en présence d'un tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 7,4 et du complexe oxydant FeSO₄ 20µM / ADP 120 µM / Ascorbate 200 µM, pendant 1 heure à 37°C.

I.4.2. Hydrolyse non-enzymatique des phospholipides

L'apparition des produits d'hydrolyse des phospholipides, la lyso-PC et la lyso-phosphatidyléthanolamine (lyso-PE) est quantifiée. Suite à une extraction des lipides (Cf. § B.III.4.1.) constitutifs des Marinosomes[®], les différents phospholipides sont fractionnés par chromatographie bi-dimensionnelle sur couche mince. Les lipides sont déposés sur une plaque de silicagel 60H. Les différentes classes de lipides sont séparées par une migration avec un mélange de solvants chloroforme:acétone:méthanol:acide acétique:eau (50:20:10:10:5 en volume). Une seconde migration est réalisée perpendiculairement à la première avec un mélange n-butanol:acide acétique:eau (60:20:20 en volume) (Wolff *et al.*, 1984). Un prélèvement des différents spots révélés par des vapeurs d'iode, suivi d'un dosage du phosphore (Cf. § B.III.4.4) est ensuite réalisé.

II. Approche expérimentale pour l'utilisation des Marinosomes[®] en cosmétique

Tous les tests pour évaluer l'efficacité des Marinosomes[®] en cosmétique sont réalisés par le laboratoire BioHC (Bordeaux).

II.1. Irritation cutanée

Les tests d'irritation cutanée sont réalisés sur 13 sujets (9 femmes et 4 hommes), âgés de 21 à 56 ans. L'irritation primaire cutanée est évaluée par la technique du test épicutané sous occlusion. Des cupules d'aluminium de 8 mm de diamètre et de 20 μ L de capacité (surface de recouvrement 50 mm²) sont montées par paire sur un ruban adhésif. Deux cupules témoins reçoivent, soit du lauryl sulfate de sodium (LSS, témoin positif) à 1 %, soit de l'eau distillée (témoin négatif). Une troisième cupule reçoit un papier buvard imprégné de la suspension de Marinosomes[®] ([Lipides] = 20 g.L⁻¹). Le système est appliqué sur la peau du dos de chaque sujet, dans la région sous-scapulaire, puis est recouvert d'un ruban adhésif (Urgoderm). Ces pansements occlusifs restent appliqués 24 heures.

Trente min et 60 min après le retrait du pansement, les sujets sont soumis à un examen cutané. Six paramètres d'irritation (érythème, œdème, vésicules, sécheresse cutanée, rugosité cutanée et réflectivité de la peau à la lumière) sont recherchés et pondérés selon une échelle arbitraire de 0 à 4. Les sujets présentant une irritation au niveau du site d'application du témoin négatif sont exclus de l'étude. Le pouvoir irritant des Marinosomes[®] est déterminé après pondération des résultats obtenus par ceux du témoin positif. Suivant la valeur obtenue, le pouvoir irritant du produit testé est défini selon le tableau XII.

II.2. Irritation oculaire

Classiquement, le potentiel irritant oculaire d'un produit cosmétique était évalué par le test de Draize chez le lapin. Ce test consistait à injecter le produit (100 mg) dans la poche conjonctive de l'œil du lapin et à noter l'apparition de lésions oculaires telles que des

Tableau XII : Classification d'un produit en fonction de son pouvoir irritant (PI).

PI	Classification
$0 \leq \text{PI} < 0,1$	Non irritant
$0,1 \leq \text{PI} < 0,3$	Légèrement irritant
$0,3 \leq \text{PI} < 0,5$	Moyennement irritant
$0,5 \leq \text{PI}$	Irritant

Le pouvoir irritant est calculé par la formule :

$$\text{PI} = \frac{\text{PL}_1 + \text{PL}_2}{\text{AL}_1 + \text{AL}_2}$$

avec :

- AL_1 : somme des scores d'irritation des différents paramètres pour l'ensemble des sujets à la 1^{ère} lecture (30 min) pour le témoin positif (LSS) ;
- AL_2 : somme des scores d'irritation des différents paramètres pour l'ensemble des sujets à la 2^{ème} lecture (60 min) pour le témoin positif (LSS) ;
- PL_1 : somme des scores d'irritation des différents paramètres pour l'ensemble des sujets à la 1^{ère} lecture (30 min) pour les Marinosomes[®] ;
- PL_2 : somme des scores d'irritation des différents paramètres pour l'ensemble des sujets à la 2^{ème} lecture (60 min) pour les Marinosomes[®].

rougeurs, des suintements au niveau de l'iris et/ou de la cornée. Ce test n'étant plus autorisé depuis le 1^{er} janvier 1998 par la législation, il a été remplacé par d'autres méthodes. Une étude réalisée sur 107 produits cosmétiques (Boue-Grabot *et al.*, 1995) montre qu'il existe une bonne corrélation entre le test de Draize et deux méthodes utilisées en association : la cytotoxicité observée sur culture de fibroblastes de cornée de lapin, d'une part, et la mesure des effets du produit sur la membrane chorio-allantoïdienne d'œuf de poule, d'autre part. Ces deux méthodes sont désormais des méthodes officielles (Arrêtés respectifs du Journal Officiel de la République Française du 27 décembre 1999 et du 26 décembre 1996 relatifs aux méthodes d'analyse nécessaires aux contrôles de la composition des produits cosmétiques).

II.2.1. Détermination du potentiel irritant sur culture cellulaire

La cytotoxicité oculaire des Marinosomes[®] est testée sur des fibroblastes de cornée de lapin (lignée Statens serumInstitut Rabbit Cornea (SIRC) n° CCL-60 - American Type Culture Collection, Maryland, USA) cultivés dans du milieu de culture complet (Dubelcco's Modified Eagle's Medium, Gibco) additionné de sérum de veau fœtal (10 %) et d'antibiotiques. L'ensemencement de la suspension cellulaire s'effectue dans des puits de culture « transwell » dont le fond est constitué d'une membrane en polycarbonate de porosité égale à 0,4 µm, à raison de 30 000 cellules par puits. Les unités de culture sont ensuite mises à incuber à 37°C, en atmosphère humide renfermant 5 % de CO₂. Quarante huit heures après l'ensemencement, les puits de culture sont transférés dans des cupules contenant les Marinosomes[®] ([Lipides] = 0,2 g.L⁻¹) et une solution de Hank's additionnée de Tween 20 (0,01 %). L'ensemble est placé, à 37°C, pendant 30 min, 60 min et 240 min (3 puits sont traités par temps de contact). Parallèlement, 3 puits placés dans des cupules contenant la solution de Hank's additionnée de Tween 20 sont mis à incuber pendant 30 min (culture témoin).

La viabilité cellulaire des cultures « traitées » avec les Marinosomes[®] et « témoin » est évaluée par un test colorimétrique au rouge neutre. Après incubation de 2 à 3 heures avec le colorant à la concentration de 0,05 g.L⁻¹, la DO de la suspension est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques (Dynatech MR 5000) à 540 nm. La DO, pour chaque temps de contact, permet de déterminer un pourcentage de cytotoxicité. A partir de ces pourcentages, un indice moyen de cytotoxicité (IMC) est calculé puis l'indice d'irritation oculaire équivalent (IO_{eq}) est déterminé.

Cet indice permet de classer le produit selon le barème de Draize (Arrêté du Journal Officiel de la République Française du 9 juin 1992 relatif aux méthodes d'analyse nécessaires aux contrôles de la composition des produits cosmétiques) (Tableau XIII).

II.2.2. Potentiel irritant sur membrane chorio-allantoïdienne

Le test de Hen's sur membrane chorio-allantoïdienne d'œuf (HET-CAM pour Hen's egg chorioallantoic membrane test) est effectué sur des œufs de poule (de taille, de poids (50 à 60 g) et de qualité standards) embryonnés (White Leghorn) provenant de l'INRA. Après 10 jours d'incubation à 37°C, la coquille de l'œuf est soigneusement découpée autour de la poche à air de manière à faire apparaître la membrane chorio-allantoïdienne richement vascularisée. La suspension de Marinosomes[®] ([Lipides] = 20 g.L⁻¹), l'eau physiologique (témoin négatif) ou le LSS à 3 % (témoin positif) sont appliqués à raison de 200 µL sur la membrane chorio-allantoïdienne, laissés en contact pendant 20 s puis éliminés par rinçage avec 5 mL de sérum physiologique à 37°C. Six œufs sont mis en contact avec les Marinosomes[®], 3 œufs provenant du même arrivage sont placés dans les mêmes conditions expérimentales et traités avec du sérum physiologique ou du LSS. Un examen visuel de la membrane est réalisé avant toute application de produit, puis 30 s, 2 et 5 min après élimination du produit appliqué. L'examen consiste à détecter l'apparition des phénomènes suivants au niveau de la membrane :

- Injection : les capillaires et les petits vaisseaux deviennent apparents suite à l'afflux sanguin ;
- Hémorragie : il y a effusion de sang hors des vaisseaux sanguins ;
- Coagulation : il y a opacification de la membrane suite à la coagulation extra- et/ou intra-vasculaire des protéines.

Les réactions observées sont cotées selon des échelles en fonction de leur temps d'apparition (Tableau XIV). Les cotations obtenues pour les 3 phénomènes sont additionnées et représentent un indice d'irritation individuel pour chaque œuf. La moyenne des indices individuels permet d'obtenir un indice d'irritation primaire sur membrane chorio-allantoïdienne (IP-MCA) (Tableau XV).

Compte tenu de la complémentarité des deux méthodes utilisées, le potentiel irritant oculaire du produit testé est évalué selon le tableau XVI (Boue-Grabot *et al.*, 1995).

Tableau XIII : Classification d'un produit en fonction de son indice d'irritation oculaire équivalent (IO_{éq}).

IO_{éq}	Classification
IO _{éq} ≤ 15	Faiblement irritant
15 < IO _{éq} ≤ 30	Moyennement irritant
30 < IO _{éq} ≤ 50	Irritant
50 < IO _{éq}	Très irritant

L'indice d'irritation équivalent est calculé selon la formule :

$$IO_{éq} = 0,922 \times IMC + 2,787$$

avec IMC : indice moyen de cytotoxicité donné par :

$$IMC = \frac{\%_{30\text{min}} + 0,5 \times \%_{60\text{min}} + 0,125 \times \%_{240\text{min}}}{3}$$

avec %_t : pourcentage de cytotoxicité au temps t donné par :

$$\%_t = \frac{DO_{TE} - DO_{TR}}{DO_{TE}} \times 100$$

où :

- DO_{TE} : DO moyenne (sur 3 puits) de la culture « témoin » ;
- DO_{TR} : DO moyenne de la culture « traitée ».

Tableau XIV : Cotation des réactions de la membrane chorio-allantoïdienne à un produit en fonction du temps d'apparition.

Temps d'apparition	Injection	Hémorragie	Coagulation
30 s	5	7	9
2 min	3	5	7
5 min	1	3	5
Après 5 min	0	0	0

Tableau XV : Classification d'un produit en fonction de son indice d'irritation primaire sur membrane chorio-allantoïdienne (IP-MCA).

IP-MCA	Classification
$0 \leq \text{IP-MCA} \leq 0,9$	Pratiquement non irritant
$1 \leq \text{IP-MCA} \leq 4,9$	Faiblement irritant
$5 \leq \text{IP-MCA} \leq 8,9$	Modérément irritant
$9 \leq \text{IP-MCA} \leq 21$	Très irritant

Tableau XVI : Potentiel irritant oculaire d'un produit en fonction de son indice équivalent ($\text{IO}_{\text{éq}}$) et de son indice d'irritation primaire sur membrane chorio-allantoïdienne (IP-MCA).

IP-MCA	$\text{IO}_{\text{éq}}$		
	$\text{IO}_{\text{éq}} \leq 15$	$15 < \text{IO}_{\text{éq}} \leq 30$	$30 < \text{IO}_{\text{éq}}$
$0 \leq \text{IP-MCA} \leq 4,9$	Faiblement irritant	Moyennement irritant	Irritant / très irritant
$5 \leq \text{IP-MCA} \leq 8,9$	Moyennement irritant	Moyennement irritant	Irritant / très irritant
$9 \leq \text{IP-MCA} \leq 21$	Irritant / très irritant	Irritant / très irritant	Irritant / très irritant

II.2.3. Activité anti-inflammatoire

L'évaluation de la **cytotoxicité** des Marinosomes[®] sur kératinocytes humains est déterminée préalablement à l'étude de l'activité anti-inflammatoire de ces liposomes. Six concentrations de Marinosomes[®], comprises entre 5.10^{-3} et 2.10^{-1} g.L⁻¹, sont mises en contact avec les kératinocytes humains pendant une période de 72 heures. La viabilité cellulaire est déterminée comme précédemment (formule du %_t, Cf. § B.II.2.1.).

Pour l'évaluation de l'**activité anti-inflammatoire** des Marinosomes[®], la suspension est testée à 4 niveaux de concentration : 10^{-3} , 2.10^{-3} , 10^{-2} et 2.10^{-2} g.L⁻¹ (concentrations non cytotoxiques). Les kératinocytes humains sont traités pendant 48 heures avec les Marinosomes[®] avant induction du stress irritatif. Le stress irritatif est induit par la présence dans le milieu de culture d'une solution d'huile de croton à la concentration finale de 2.10^{-2} g.L⁻¹, pendant 24 heures. Les métabolites marqueurs de l'activité anti-inflammatoire, interleukine 8 (IL-8) et PGE₂, sont quantifiés dans les surnageants des cultures cellulaires par dosages immunochimiques (Kit n°2237, Immunotech ; Kit n°DE0100, R&D Systems). En parallèle, le dosage des protéines cellulaires est réalisé par la technique de Bradford (Biorad). L'activité anti-inflammatoire (en %) est déterminée selon la formule :

$$100 - \frac{[X]_{\text{Marinosomes}^{\circledast} + \text{croton}} - [X]_{\text{Marinosomes}^{\circledast}}}{[X]_{\text{croton}} - [X]_{\text{Marinosomes}^{\circledast}}} \times 100$$

avec :

- X représentant le métabolite PGE₂ ou IL-8 ;
- $[X]_{\text{Marinosomes}^{\circledast} + \text{croton}}$: la concentration du métabolite X (pg de X / µg de protéines) pour les puits traités avec les Marinosomes[®] et l'huile de croton ;
- $[X]_{\text{Marinosomes}^{\circledast}}$: la concentration du métabolite X (pg de X / µg de protéines) pour les puits traités avec les Marinosomes[®] uniquement ;
- $[X]_{\text{croton}}$: la concentration du métabolite X (pg de X / µg de protéines) pour les puits traités avec l'huile de croton uniquement.

III. Approche expérimentale pour l'utilisation des Marinosomes® en nutrition

III.1. Animaux

Les études de supplémentation des régimes sont réalisées avec des rats mâles de souche « Wistar », âgés de 5 semaines, provenant de l'élevage Janvier (Saint Berthevin, 53). Dès leur arrivée au laboratoire, les rats sont répartis par groupe de 3, dans des cages. La température de l'animalerie est régulée à $22 \pm 1^\circ\text{C}$ et le degré hygrométrique est de $52,5 \pm 2,5 \%$. Les animaux sont soumis à l'alternance naturelle du jour et de la nuit. Le poids des rats à leur arrivée est de l'ordre de 200 g.

III.2. Régimes alimentaires

Différents régimes alimentaires sont utilisés :

- **Régime complet** : Ce régime se présente sous forme de bouchons (A04, UAR) contenant : 68,3 % de glucides, 16,5 % de protéines, 4 % de cellulose, 5,2 % de sels minéraux, 1 % de vitamines et 5 % de matière grasse ;
- **Régime alipidique** : Il s'agit d'une poudre alipidique contenant : 63,5 % de glucides, 22,5 % de protéines, 6 % de cellulose, 7 % de sels minéraux, 1 % de vitamines et moins de 0,1 % de matière grasse ;
- **Régime supplémenté en AGPI n-3 sous forme de Marinosomes®** : au cours du régime alipidique, la suspension de Marinosomes® est administrée aux rats en une dose journalière par intubation gastrique de manière à s'assurer de la quantité réelle ingérée et éviter les phénomènes d'oxydation par contact prolongé de la suspension à l'air ;
- **Régime supplémenté en AGPI n-3 sous forme d'un mélange de matières grasses** : un mélange mimant la composition du cholestérol et des acides gras des Marinosomes® est préparé à partir d'une huile de poisson (EPAX 2050TG,

Polaris), de cholestérol (Sigma) et de végétaline commerciale dans des proportions respectives de 56, 15 et 24 % en poids.

Pour les 2 régimes riches en AGPI n-3, 5 % en poids d' α -tocophérol (Fluka) sont ajoutés aux suppléments lipidiques. Cette proportion a été déterminée comme étant optimale pour éviter l'oxydation des AGPI dans les conditions du milieu gastro-intestinal (Nacka *et al.*, 2001b). Les compositions des acides gras des deux mélanges lipidiques sont présentées dans le tableau XVII.

III.3. Protocoles nutritionnels et sacrifices

A leur arrivée, les rats sont nourris avec l'aliment complet jusqu'au début de l'expérimentation de supplémentation des régimes. L'expérimentation débute par la mise sous régime alipidique des rats pendant deux jours. Puis, les animaux reçoivent par intubation gastrique, le matin, l'équivalent de 3 g de lipides / kg (soit l'équivalent d'environ 0,6 g de lipides par jour). Ces lipides se présentent sous la forme d'une suspension aqueuse dans le cas des Marinosomes[®] (intubation de 3 mL) et sous forme d'huile dans le cas du mélange de matières grasses (intubation de 0,7 mL). Entre temps, les rats disposent d'eau et de poudre alipidique à volonté. Les animaux reçoivent le complément lipidique pendant 13 jours. Le poids des animaux est suivi tout au long des expérimentations. Après 13 jours sous régime supplémenté, certains rats reçoivent uniquement le régime alipidique pendant 4 et 7 jours avant d'être sacrifiés (Fig. 6).

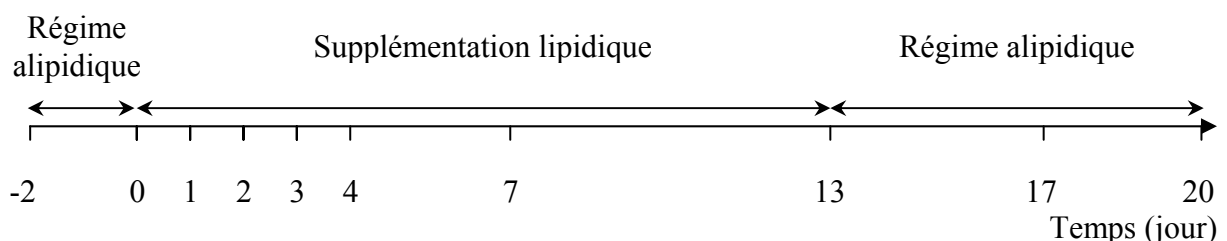


Figure 6 : Protocole de sacrifice des rats suite aux régimes supplémentés avec des AGPI n-3 sous forme d'un mélange lipidique à base d'huile de poisson ou de Marinosomes[®] et au régime alipidique.

Tableau XVII : Composition des acides gras (% en poids des acides gras totaux) des Marinosomes® et du mélange lipidique à base d'huile de poisson (huile de poisson) utilisés pour la supplémentation des régimes.

Acides gras	Marinosomes®		Huile de poisson
12:0	0,0	± 0,0	16,6
14:0	1,5	± 0,0	6,9
15:0	0,5	± 0,1	0,0
16:0 DMA	1,0	± 0,4	0,0
16:0	26,6	± 2,8	3,6
17:0 iso	0,1	± 0,2	0,0
17:0	0,7	± 0,1	0,1
18:0 DMA	0,2	± 0,1	0,0
18:0	2,6	± 0,4	3,4
20:0	0,1	± 0,0	1,3
22:0	0,3	± 0,0	1,3
23:0	0,1	± 0,1	0,1
24:0	0,0	± 0,0	0,4
Σ AGS	33,7	± 3,6	33,7
14:1 n-5	0,1	± 0,0	0,0
16:1 n-9	0,4	± 0,1	0,3
16:1 n-7	0,4	± 0,1	0,0
17:1	0,5	± 0,6	0,0
18:1 DMA	0,1	± 0,0	0,1
18:1 n-9	2,5	± 0,2	2,1
18:1 n-7	0,8	± 0,2	0,5
20:1 n-9	4,3	± 0,6	0,8
20:1 n-7	0,2	± 0,2	0,1
22:1 n-9	0,5	± 0,5	0,0
24:1 n-9	0,7	± 0,1	0,0
Σ AGMI	10,3	± 0,2	3,9
18:2 n-6	0,4	± 0,1	0,5
18:3 n-6	0,2	± 0,3	0,1
18:3 n-3	0,1	± 0,0	0,6
20:2 n-9	0,0	± 0,0	0,2
20:2 n-6	0,2	± 0,0	0,3
20:3 n-6	0,0	± 0,0	0,2
20:4 n-6	2,1	± 0,3	0,9
20:3 n-3	0,1	± 0,0	0,0
20:5 n-3	15,0	± 2,2	18,8
22:4 n-6	0,1	± 0,0	0,2
22:5 n-6	0,3	± 0,0	0,8
22:5 n-3	0,3	± 0,1	3,5
22:6 n-3	37,0	± 1,2	36,4
Σ AGPI	56,0	± 3,8	62,4
Σ AGPI n-6	3,2	± 0,1	3,0
Σ AGPI n-3	52,6	± 3,5	59,3
n-6/n-3	0,06	± 0,00	0,05

La composition des acides gras des Marinosomes® représente la moyenne ± écart-type pour les deux lots de lipides marins utilisés pour les régimes supplémentés. DMA : diméthylacétal. Σ : somme.

A intervalle régulier, 8 rats sont sacrifiés, 24 heures après le dernier apport de lipides, par décapitation afin de récupérer les différents organes et le sang. Le sang, récupéré dans un tube hépariné, est centrifugé à 1500 g à 4°C pendant 15 min pour séparer le plasma des globules rouges. Le plasma est stocké à -20°C jusqu'à analyse. Les globules rouges sont repris dans un volume de sérum physiologique équivalent au volume de plasma prélevé. L'ensemble est mélangé puis centrifugé à 1500 g à 4°C pendant 15 min. Le surnageant est éliminé et les globules rouges sont stockés à -20°C jusqu'à analyse. Le tissu adipeux, la peau et le foie sont pesés, lavés avec du sérum physiologique puis stockés à -20°C jusqu'à analyse.

III.4. Extraction et analyses des extraits lipidiques

III.4.1. Extraction des lipides totaux

Les lipides totaux sont extraits du matériel biologique (plasma, globules rouges, tissus) selon la technique de Folch (Folch *et al.*, 1957) par un mélange chloroforme:méthanol (2:1 en volume). La concentration des lipides dans la phase organique se fait par addition d'une solution de chlorure de potassium à 0,8 % (KCl) et d'un mélange chloroforme:méthanol:KCl (3:48:47 en volume). Les lipides ainsi extraits sont conservés à 4 °C jusqu'à analyse.

III.4.2. Fractionnement des lipides totaux

Les lipides totaux sont déposés sur une plaque en verre recouverte de silicagel 60H (Merck, France) activée à 110°C pendant 1 heure et conservée à 80°C jusqu'à son emploi. La séparation des lipides par chromatographie sur couche mince (CCM) est réalisée avec un mélange d'hexane:di-éthyl éther:acide acétique dans les proportions 80:20:1 en volume (Combe *et al.*, 1997). Les différentes classes de lipides sont révélées, soit par vaporisation d'une solution de 2,7-dichlorofluorescéine à 0,2 % dans l'éthanol et visualisation sous une lampe à ultraviolets dans le cas où les acides gras sont analysés, soit par des vapeurs d'iode dans le cas où une analyse quantitative des phospholipides est réalisée. La zone de silicagel correspondant aux lipides recherchés est délimitée et transférée dans un tube pour être analysée.

III.4.3. Analyse des acides gras

III.4.3.1. Préparation des esters méthyliques

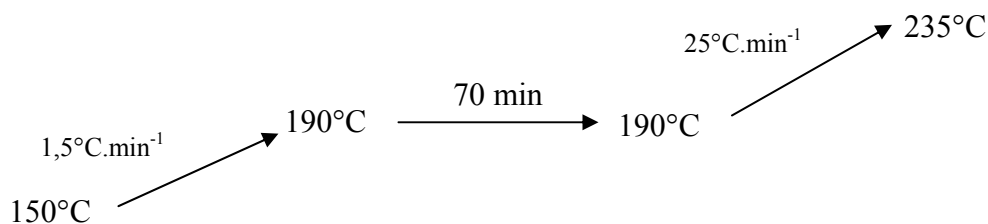
Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont obtenus par la technique de Morrisson (Morrisson et Smith, 1964). Les lipides (lipides totaux ou les différentes classes de lipides obtenues après séparation par CCM) sont disposés dans un tube hermétique. Les lipides (lipides totaux, triglycérides) sont mis en solution dans 0,5 mL d'hexane. Les esters de cholestérol sont mis en solution dans 0,5 mL de benzène. La méthylation des acides gras se fait après addition de 1 mL de trifluorure de bore en solution méthanolique (14 % en poids). Dans le cas des phospholipides, seul le trifluorure de bore est ajouté. L'incubation à 100°C est réalisée pendant 90 min pour les lipides totaux et les phospholipides et 60 min pour les triglycérides et les esters de cholestérol. Les EMAG sont extraits, après addition de 2 mL d'hexane et 1 mL d'eau distillée pour les lipides totaux, les triglycérides et les esters de cholestérol, l'eau distillée est remplacée par une solution d'hydroxyde de sodium (5N) dans le cas des phospholipides. L'extraction est répétée 3 fois. Les phases organiques sont alors réunies et concentrées puis lavées avec 1 mL d'eau distillée. La phase organique contenant les EMAG est prélevée et conservée à -20°C jusqu'à analyse.

L'analyse quantitative des acides gras se fait par addition d'une quantité connue de standard interne. Dans les cas des triglycérides, 60 µL d'une solution chloroformique de trionadécanoïne (Sigma) à $4,62 \cdot 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$ sont ajoutés aux triglycérides avant méthylation. Dans le cas des phospholipides, 60µL de 1,2-diérucoyl-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine (Sigma) en solution chloroforme:méthanol (2:1 en volume) à $4,58 \cdot 10^{-1} \text{ g.L}^{-1}$ sont utilisés. Les acides gras des esters de cholestérol sont quantifiés à l'aide de 75 µL d'une solution chloroformique de cholestéryl béhénate (Sigma) à $1,01 \text{ g.L}^{-1}$.

III.4.3.2. Conditions chromatographiques

Les EMAG sont analysés par CPG (HP 5890, Hewlett Packard) avec une colonne capillaire BPX 70 (longueur = 60 m, diamètre interne = 0,25 mm, épaisseur du film = 0,25 µm). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont fixées respectivement à

250°C et 300°C. La pression du gaz vecteur (hélium) est de 1,5 bar. Le programme de température pour l'élution des EMAG est le suivant :



Les EMAG sont détectés par ionisation de flamme. L'intensité du signal issu de la dégradation des EMAG est transmise à un intégrateur pour obtenir le chromatogramme. L'identification des EMAG est obtenue par comparaison des temps de rétention à ceux de standards chromatographiés dans les mêmes conditions. La quantification des EMAG est obtenue par rapport à l'aire du standard interne.

III.4.4. Dosage du phosphore

Les phospholipides des extraits lipidiques de plasma et de foie sont quantifiés par le dosage du phosphore (Ames, 1966). Après minéralisation des composés organiques, le phosphore minéral libéré est mis en présence de molybdate d'ammonium pour former de l'acide phosphomolybdique. Cet acide réagit avec l'acide ascorbique pour former un complexe phosphomolybdique-ascorbate bleu qui est dosé à 820 nm. Le traitement de l'échantillon se fait parallèlement à celui d'une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une solution de phosphore inorganique de concentration connue. La concentration des phospholipides peut alors être déterminée en prenant en compte le fait qu'une molécule de phospholipide apporte une molécule de phosphore et en considérant une masse molaire moyenne de 775 g.mol⁻¹ pour les phospholipides.

III.4.5. Dosage des triglycérides

Les triglycérides du plasma des rats sont dosés par voie enzymatique (Triglycérides LabBo, LabBo Immunosystèmes). L'action de la lipoprotéine lipase sur les triglycérides libère du glycérol qui, après complexation, forme un composé rouge (quinonéimine)

absorbant à 546 nm. L'étalon est une solution de glycérol à 200 mg.dL⁻¹. La concentration des triglycérides, exprimée en mg.dL⁻¹, est déterminée par la relation :

$$[\text{Triglycérides}] = \frac{\text{DO}_{\text{dosage}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times 200$$

III.4.6. Dosage du cholestérol total

Le cholestérol total (libre et estérifié) du plasma des rats est quantifié par voie enzymatique (Cholestérol LabBo Immunosystèmes). Le cholestérol est complexé à un chromophore détecté à 500 nm. L'étalon est une solution de cholestérol à 200 mg.dL⁻¹. La concentration du cholestérol total, exprimée en mg.dL⁻¹, est déterminée par la relation :

$$[\text{Cholestérol}] = \frac{\text{DO}_{\text{dosage}}}{\text{DO}_{\text{étalon}}} \times 200$$

III.5. Traitements statistiques des résultats

Les traitements statistiques des résultats sont réalisés grâce au logiciel Statgraphics (version 5.1). Le test t de Student est utilisé pour comparer deux groupes de résultats. Le test des étendues multiples (LSD) permet de comparer différents groupes de résultats pour en créer des familles. Les résultats sont exprimés sous la forme de leur moyenne suivie de leur écart-type.

C. Résultats et discussion

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier l'efficacité de ces Marinosomes[®] en tant que vecteurs d'AGPI n-3 pour la voie topique et pour la voie orale.

L'utilisation des Marinosomes[®] dans le cadre de la **voie topique** nécessite, au préalable, la connaissance et la compréhension du comportement des liposomes dans l'environnement de la peau. C'est pourquoi, dans un premier temps, le comportement physico-chimique des Marinosomes[®] est étudié, *in vitro*, dans des conditions mimant les conditions physiologiques retrouvées au niveau de l'épiderme. Dans un deuxième temps, l'effet des Marinosomes[®] au niveau cutané est abordé en termes de toxicité et d'efficacité à travers des études *in vitro* sur cultures cellulaires et des tests *in vivo* chez l'Homme.

Dans le cadre de la **voie orale**, des études préalables ont démontré que les liposomes à base de lipides marins présentaient un comportement physico-chimique, dans des conditions mimant celles retrouvées au niveau du tractus gastro-intestinal, qui en font des candidats intéressants pour des études de biodisponibilité digestive des AGPI n-3 (Nacka *et al.*, 2001a ; Nacka *et al.*, 2001b). Par ailleurs, l'absorption lymphatique, chez le rat, des AGPI présentés sous forme de phospholipides (liposomes) est meilleure que celle obtenue pour les mêmes AGPI estérifiés dans des triglycérides (huile de sardine) (Cansell *et al.*, 2003). Il s'agit, à présent, d'élargir ce résultat dans le cadre d'études de supplémentation des régimes en AGPI n-3 pour appréhender le devenir *in vivo* de ces acides gras, au-delà de la lymphe. Les études portent, d'une part, sur l'incorporation des AGPI n-3 dans les lipides du plasma, des globules rouges, et, d'autre part, sur l'effet des suppléments des régimes sur des paramètres lipidiques sanguins tels que les niveaux en lipoprotéines et les concentrations des lipides. Les résultats obtenus avec les Marinosomes[®] et un mélange d'huiles de composition similaire en acides gras sont comparés.

I. Comportement physico-chimique et efficacité des Marinosomes[®] en application topique

Nous avons montré dans la synthèse bibliographique que, parmi les différents paramètres favorisant l'interaction des liposomes avec le *stratum corneum*, l'état physique des membranes des liposomes joue un rôle prépondérant alors que les critères de taille et de lamellarité sont moins déterminants (Cf. § A.III.1.). L'estérification, en quantité importante, d'AGPI dans les phospholipides utilisés pour la préparation des Marinosomes[®] conduit à des membranes à l'état cristal liquide à température ambiante. De ce point de vue, les Marinosomes[®] apparaissent donc comme des candidats intéressants pour l'application topique. Dans la mesure où la morphologie des liposomes ne semble pas conditionner de manière prépondérante leur devenir, nous avons choisi de préparer les suspensions de Marinosomes[®] par extrusion, méthode rapide, simple et non dénaturante vis-à-vis de molécules fragiles comme les AGPI (Lasic, 1993). Cette technique donne lieu à l'obtention de liposomes dont la taille est centrée sur le diamètre de pore de l'unité d'extrusion (5 µm dans notre cas).

La validation de la vectorisation des AGPI n-3 par les Marinosomes[®] passe, au préalable, par la connaissance du comportement physico-chimique des vésicules lipidiques dans des conditions mimant celles retrouvées au niveau de l'épiderme. Trois paramètres sont testés : i) la température qui varie entre 31°C à la surface de la peau et 37°C dans les couches plus profondes ; ii) le pH qui est compris entre 4,8 (en surface) et 7,4 (en profondeur) ; iii) la concentration des ions calcium qui peut atteindre 9 mM au niveau du *stratum granulosum*. Les caractérisations réalisées concernent donc l'évolution de la morphologie des Marinosomes[®] et la stabilité à l'hydrolyse et à l'oxydation des AGPI n-3, en fonction des variations des paramètres température, pH et concentration des ions calcium, pris individuellement ou combinés.

Dans le cadre du bon fonctionnement de la peau, nous avons montré l'importance des lipides dans les fonctions de barrière contre la perte en eau (Cf. § A.I.3.) et le rôle préventif des AGPI de la série n-3 dans les phénomènes inflammatoires (Cf. § A.I.4.3.). Dans la mesure où les Marinosomes[®] vectorisent des AGPI n-3 (par les phospholipides), l'efficacité de ces liposomes en application topique est évaluée du point de vue de leurs activités anti-inflammatoires. Ces études sont réalisées après avoir démontré, au préalable, l'absence de toxicité des Marinosomes[®].

1.1. Stabilité physique des Marinosomes[®] en fonction du pH et/ou de la concentration du calcium

Les Marinosomes[®] observés en microscopie à contraste de phase apparaissent sous la forme d'objets isolés plus ou moins sphériques et contrastés (Fig. 7). Il est généralement admis que les objets les moins contrastés correspondent à des liposomes unilamellaires ou oligolamellaires (quelques bicouches) tandis que les objets les plus contrastés correspondent à des liposomes multilamellaires. La suspension de Marinosomes[®] est donc un mélange d'objets hétérogènes en taille, en forme et en lamellarité. La présence de liposomes multilamellaires est confirmée par l'observation du même échantillon en microscopie en lumière polarisée, où les liposomes multilamellaires se signalent par une croix de Malte caractéristique d'un empilement important de structures organisées. Toutefois, la microscopie optique ne permet pas de déterminer le nombre exact de bicouches. L'observation de la suspension de Marinosomes[®] en microscopie électronique à transmission après cryofracture des échantillons (Fig. 8) indique la présence de liposomes majoritairement oligolamellaires et de tailles variables. Ces clichés de microscopie optique et électronique sont concordants avec les mesures de granulométrie effectuées sur les suspensions de Marinosomes[®], qui indiquent que : i) le diamètre moyen des Marinosomes[®] est de $5,3 \pm 1,1 \mu\text{m}$; ii) la distribution en taille des Marinosomes[®] est unimodale et large.

Si l'hétérogénéité de la suspension de Marinosomes[®] en termes de taille et de lamellarité est un frein à une interprétation précise du comportement physico-chimique des liposomes dans les conditions testées, elle résulte tout d'abord du choix de la technique de préparation des liposomes. En effet, l'objectif premier est d'utiliser une méthode de préparation simple, peu coûteuse et facilement transférable à l'échelle industrielle. La technique d'extrusion répond à ces critères. Le deuxième objectif est de valider l'utilisation des Marinosomes[®] en application topique sachant que, pour la voie orale, le comportement physico-chimique de liposomes riches en AGPI est déjà satisfaisant (Nacka *et al.*, 2001a ; Nacka *et al.*, 2001b). Enfin, la complexité du mélange de lipides utilisé pour la formulation des Marinosomes[®] rend la maîtrise de la morphologie des liposomes délicate. Ainsi, dans notre étude, le chlorure de sodium est absent de la solution d'hydratation du film de lipides car certaines formulations cosmétiques, de type gel notamment, peuvent voir leur stabilité diminuer en présence de sels. Malgré cette absence d'ions sodium, les Marinosomes[®] obtenus

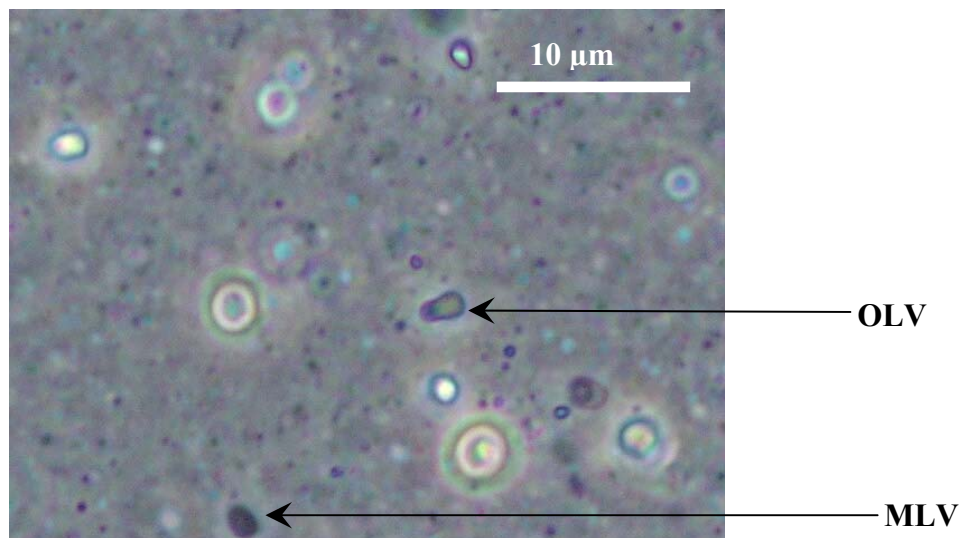


Figure 7 : Cliché de microscopie optique en contraste de phase d'une suspension de Marinosomes[®].
 OLV : liposome oligolamellaire ; MLV : liposome multilamellaire.

Les Marinosomes[®] sont préparés par extrusion sur filtre de polycarbonate de 5 μm de diamètre de pores.

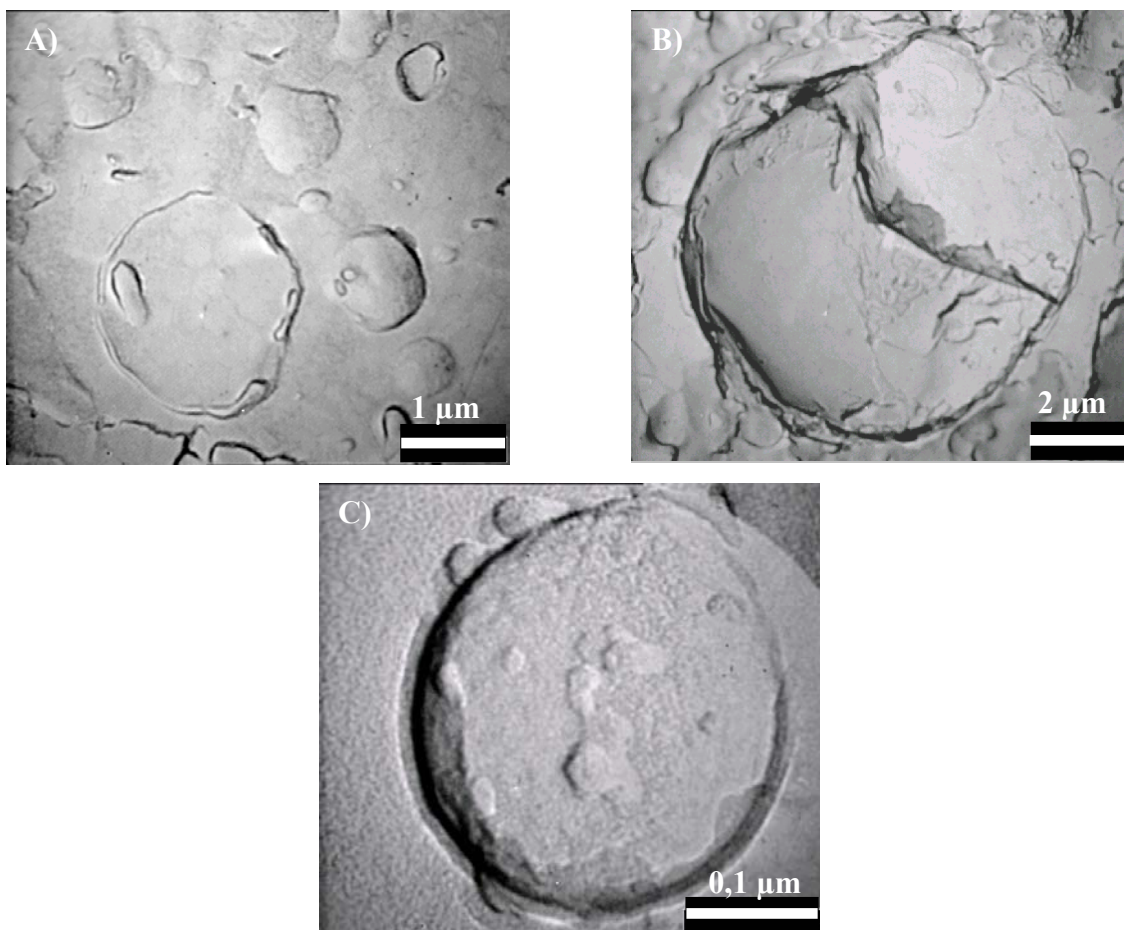


Figure 8 : Clichés de microscopie électronique après cryofracture d'une suspension de Marinosomes[®].
 A) Vue d'ensemble de la suspension de Marinosomes[®] ; B) Marinosome[®] oligolamellaire de grande taille ;
 C) Marinosome[®] oligolamellaire de petite taille.

Les Marinosomes[®] sont préparés par extrusion sur filtre de polycarbonate de 5 μm de diamètre de pores.

ont des caractéristiques en termes de diamètre moyen et distribution en taille très proches de celles observées pour des liposomes à base d'un mélange de lipides marins similaire (66 % de phospholipides et 27 % de cholestérol), mais préparés avec un milieu d'hydratation des phases lamellaires contenant 145 mM de chlorure de sodium (Nacka *et al.*, 2001a). Néanmoins, la comparaison des clichés de microscopie optique des suspensions préparées en absence de NaCl suggère une proportion plus faible de Marinosomes[®] multilamellaires. L'objectif de l'étude du comportement physique des Marinosomes[®] dans les conditions topiques est de mettre en évidence d'éventuelles modifications structurales qui pourraient, à l'avenir, permettre d'appréhender le devenir de ces liposomes lorsqu'ils seront appliqués sur la peau.

1.1.1. Effet du pH

La turbidimétrie est une méthode simple qui permet de suivre globalement des variations de morphologie des liposomes. Cette méthode est donc utilisée pour étudier le comportement des Marinosomes[®] après dilution dans des solutions de pH variant entre 4,0 et 7,4, pour des suspensions conservées à une température de 37°C.

La mesure de la turbidité juste après dilution de la suspension de Marinosomes[®] dans des milieux de pH décroissant, indique une légère augmentation de la DO (Fig. 9). Cette augmentation est statistiquement significative par rapport à la valeur initiale pour des valeurs de pH comprises entre 4,0 et 5,0. L'observation de la suspension à pH 4,0, en microscopie en contraste de phase, met en évidence l'existence d'agrégats de Marinosomes[®] entourés de petits objets très contrastés (Fig. 10). Ainsi, les liposomes placés en milieu acide peuvent subir deux processus différents : un phénomène d'agrégation ou une réduction de taille. Ces deux processus conduisent à des effets inverses sur la variation de la DO, ce qui pourrait expliquer la faible variation de ce paramètre en fonction du pH. En effet, s'il est admis qu'un phénomène d'agrégation se caractérise par une augmentation de la DO de la suspension, une diminution de taille des liposomes conduit, elle, à une diminution de la turbidité du système (Yoshikawa *et al.*, 1983).

Le **phénomène d'agrégation** consiste en la mise en contact des membranes des liposomes, sans mise en contact des espaces aqueux des entités en présence. Il a été montré que la valeur du pH isoélectrique du mélange de lipides marins, présenté sous forme de liposomes, est comprise entre 4 et 6 (Nacka *et al.*, 2001a). La région d'agrégation des

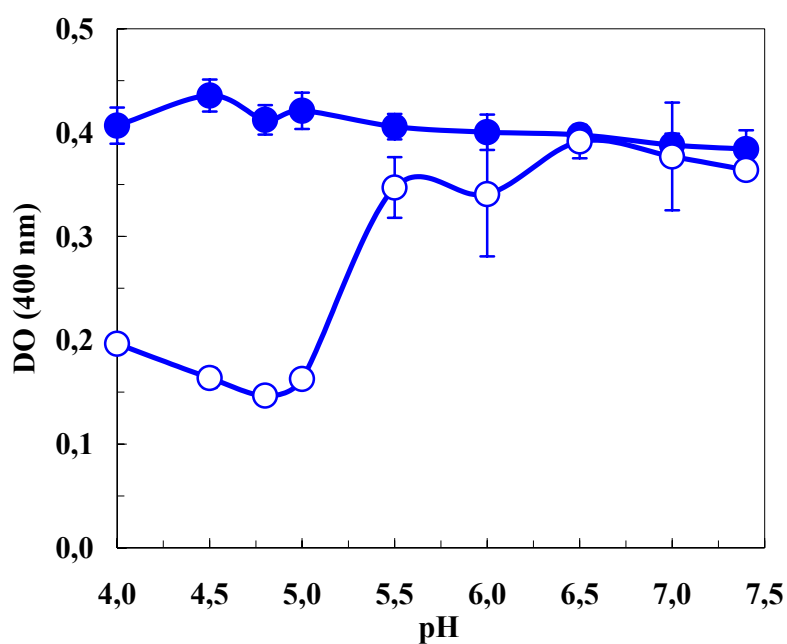


Figure 9 : Variation de la densité optique (DO) à 400 nm d'une suspension de Marinosomes® conservée à 37°C en fonction du pH. (●) : DO immédiatement après dilution ; (○) : DO 24 heures après dilution.

Les Marinosomes® sont préparés par extrusion sur filtre de polycarbonate de 5 μm de diamètre de pores, à une concentration de lipides de 20 g.L^{-1} . La suspension est diluée dans des solutions de pH connus à une concentration finale de lipides de 0,2 g.L^{-1} . Les résultats présentés sont une moyenne de 3 expériences indépendantes.

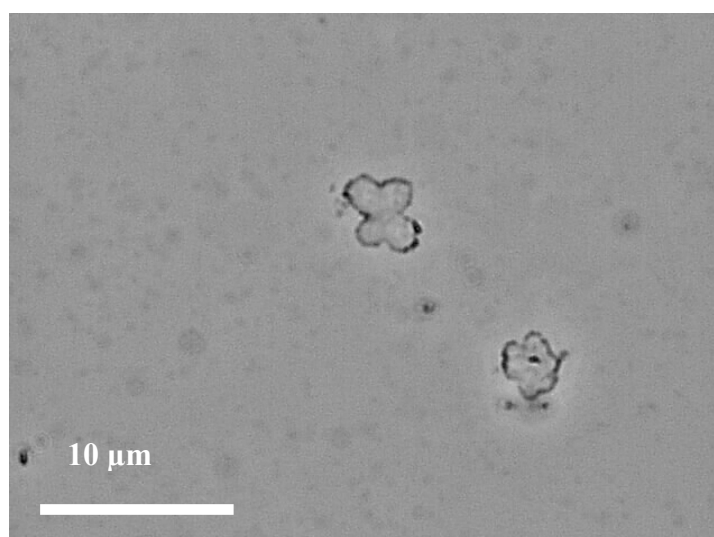


Figure 10 : Cliché de microscopie optique en contraste de phase d'agrégats de Marinosomes en suspension à pH 4 après 1 heure d'incubation à 37°C.

Marinosomes[®] correspond donc à la zone de pH où les répulsions électrostatiques sont les plus faibles. Pour des pH supérieurs au point isoélectrique, l'existence de charges de surface (la surface devient globalement chargée négativement) prévient le phénomène d'agrégation.

L'apparition de **structures membranaires** denses autour des Marinosomes[®] agrégés pourrait s'expliquer par plusieurs processus concomitants ou non :

- Une réorganisation des membranes constitutives des liposomes. En effet, une modification de l'état d'ionisation des lipides peut induire des changements dans l'empilement moléculaire des phospholipides (Tocanne et Teissié, 1990) ;
- Une sortie d'eau du volume interne des liposomes vers l'extérieur en raison de la différence de concentration des protons de part et d'autre de la membrane, conduisant à une diminution globale de la taille des liposomes ;
- Des réarrangements membranaires aboutissant à la disparition des grands liposomes au profit de petites particules. L'existence de réarrangements membranaires sous la forme de bourgeonnements qui s'isoleraient de la vésicule mère a été évoquée pour les liposomes à base de lipides marins suite à l'apparition d'une deuxième population de liposomes plus petits, détectée par chromatographie d'exclusion stérique (Nacka *et al.*, 2001b).

Les valeurs de turbidité sont dépendantes du **temps d'incubation** des liposomes dans le milieu acide (Fig. 9). Pour des pH inférieurs à 5, une diminution importante de la DO est observée après 24 heures de conservation. La suspension contient des objets dont la taille est inférieure à 0,4 μm correspondant à la limite de résolution du microscope optique. Ceci suggère que les réarrangements structuraux initiés par la mise en contact des Marinosomes[®] avec un milieu acide perdurent. La diminution de taille pourrait toucher les Marinosomes[®] sélectivement en fonction de leur lamellarité. Les liposomes uni ou oligolamellaires subirait les premiers les variations de pression osmotique et/ou les phénomènes de réarrangements membranaires, les liposomes multilamellaires seraient plus résistants à ces variations. En revanche, pour des pH voisins de la neutralité (entre 6,5 et 7,5), il n'y a pas d'évolution de la DO de la suspension pendant 24 heures, ce qui suggère une stabilité morphologique des Marinosomes[®] vis-à-vis des phénomènes d'agrégation et/ou de fusion. Cette stabilité est confirmée par les mesures de granulométrie : après 24 heures d'incubation à pH 6,5, le diamètre moyen des Marinosomes[®] est de $5,5 \pm 1,9 \mu\text{m}$, c'est à dire similaire à celui mesuré pour la suspension initiale ($5,3 \pm 1,1 \mu\text{m}$).

Pour des pH compris entre 6,5 et 7,5, les membranes des Marinosomes[®] sont chargées négativement du fait, notamment, de la charge nette des têtes polaires du phosphatidylinositol et de la phosphatidylsérine (PS) (3,7 % des phospholipides totaux) et développent donc des forces de répulsion électrostatique. De plus, la PC confère aussi aux bicouches un potentiel électrochimique légèrement négatif (Kraayenhof *et al.*, 1996). Ainsi, dans les lipides marins, la présence d'espèces chargées, associée à une faible force ionique de la solution tampon, assure une bonne stabilité des suspensions de Marinosomes[®] en fonction du temps, à pH neutre.

1.1.2. Effet du calcium

Le comportement des Marinosomes[®], après dilution dans des solutions de chlorure de calcium variant entre 0 et 9 mM, est étudié par turbidimétrie pour des suspensions conservées à 25 et 37°C (Fig. 11). A 37°C, l'effet immédiat de la mise en contact des Marinosomes[®] avec des concentrations des ions calcium croissantes n'est mesurable en turbidimétrie qu'à partir de 2,5 mM et se traduit par une augmentation de la DO jusqu'à une concentration des ions calcium de 6 mM. Au-delà de cette concentration, la DO se stabilise. Après 1 heure d'incubation, on observe une augmentation significative des turbidités des suspensions dès lors que la concentration des ions calcium est supérieure à 2,5 mM. Ces valeurs de turbidité diminuent pour des temps d'incubation plus longs (27 heures). On peut noter que, pour une concentration des ions calcium de 9 mM, les variations de DO sont aussi cinétiquement dépendantes de la température (insert, Fig. 11).

L'observation des Marinosomes[®] en microscopie optique en contraste de phase révèle dès la première heure des modifications de l'état d'agrégation des liposomes au-delà d'une concentration des ions calcium de 2,5 mM (Fig. 12). Ainsi, on note un phénomène d'agrégation des liposomes qui se traduit par l'augmentation de turbidité des suspensions. En revanche, pour des temps d'incubation longs, on observe la coexistence de divers types d'objets :

- Des Marinosomes[®] isolés, (Fig. 13A) ;
- Des liposomes multilamellaires qui pourraient résulter de la fusion d'une partie des Marinosomes[®] agrégés (Fig. 13B).

Par ailleurs, on ne peut pas exclure la présence de petits objets non visualisés en microscopie optique et qui résulteraient d'une réduction de taille due à une sortie d'eau du volume interne aqueux, de par la concentration des ions calcium élevée dans le milieu extérieur.

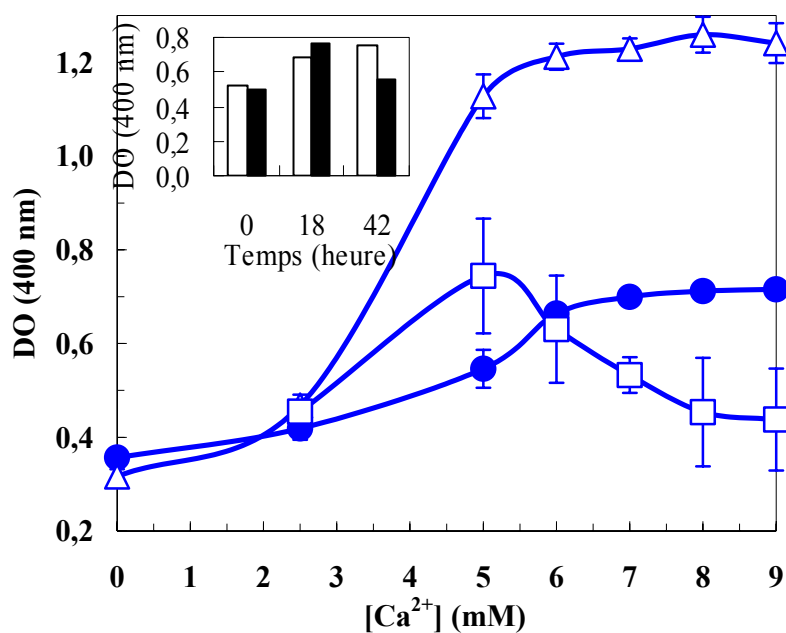


Figure 11 : Variation de la densité optique (DO) à 400 nm d'une suspension de Marinosomes[®] stockée à 37°C et pH 7,4 en fonction de la concentration des ions calcium. (●) : DO immédiatement après dilution ; (△) : DO 1 heure après dilution ; (□) : DO 27 heures après dilution.

Le graphe en insert représente l'influence de la température de stockage sur l'évolution de la DO pour une suspension de Marinosomes[®] conservée à 25 °C (barre creuse) et 37°C (barre pleine) pour une concentration des ions calcium de 9 mM. Les Marinosomes[®] sont préparés par extrusion sur filtre de polycarbonate de 5 µm de diamètre de pores, à une concentration de lipides de 20 g.L⁻¹. La suspension est diluée dans des solutions de concentrations des ions calcium connues, à une concentration finale de lipides de 0,2 g.L⁻¹. Les résultats présentés sont une moyenne de 3 expériences indépendantes.

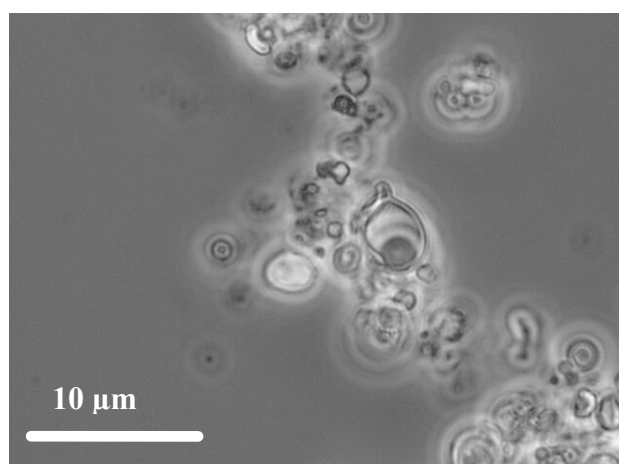


Figure 12 : Cliché de microscopie optique en contraste de phase d'agrégats de Marinosomes[®] en suspension après 1 heure d'incubation à 37°C dans une solution contenant des ions calcium à une concentration de 9 mM.

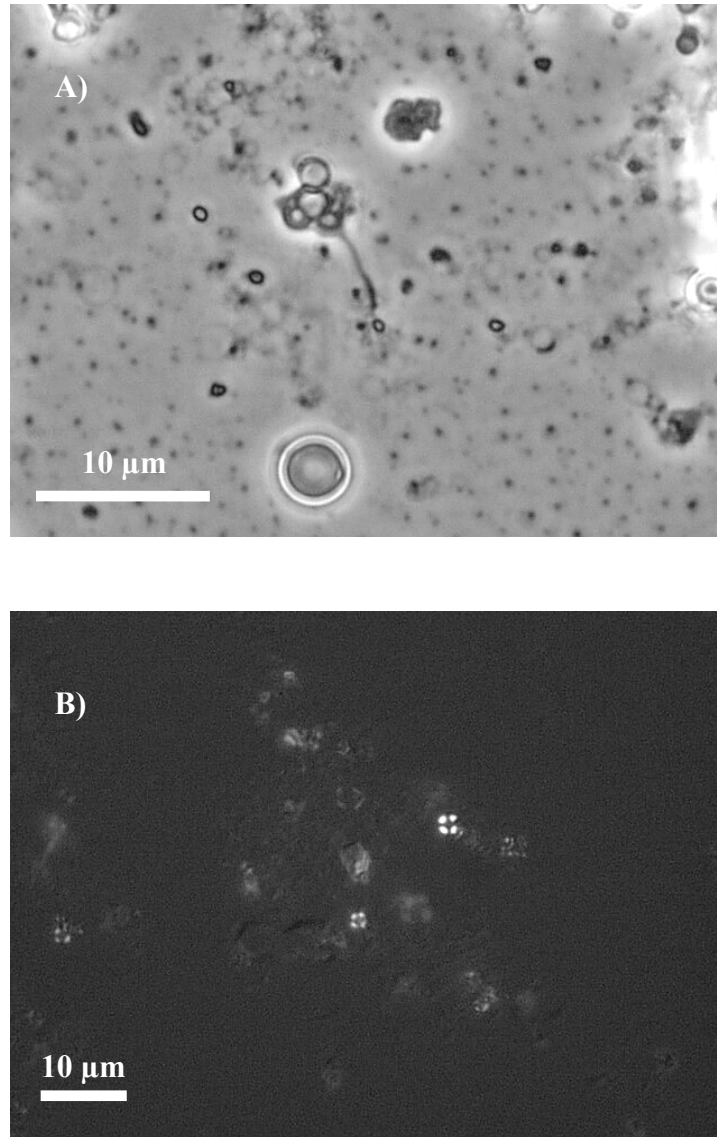


Figure 13 : Clichés de microscopie optique d'agrégats de Marinosomes[®] en suspension dans une solution contenant des ions calcium à une concentration de 9 mM, après 48 heures d'incubation à 37°C. A) Observation en contraste de phase ; B) Observation en lumière polarisée.

Le **rôle du calcium dans les phénomènes d'agrégation et/ou de fusion** a été largement étudié pour des liposomes de composition variée. Le phénomène d'agrégation concerne aussi bien les vésicules composées de phospholipides chargés (Wilschut et Papahadjopoulos, 1979 ; Bental *et al.*, 1987 ; Matsumura *et al.*, 1995, Aranda *et al.*, 1996 ; Averbakh et Lobyshev, 2000) que des liposomes composés de lipides zwitterioniques (Matsumura *et al.*, 1995). Cependant, le phénomène d'agrégation est modulé par la présence d'autres lipides comme le cholestérol (Bental *et al.*, 1987). Les **phénomènes de fusion** en présence de calcium ont été principalement étudiés sur des vésicules à base de PS (Duzgunes *et al.*, 1981 ; Bental *et al.*, 1987 ; Aranda *et al.*, 1996).

Dans le **cas des Marinosomes[®]**, la complexité du mélange de lipides constituant les liposomes et l'hétérogénéité des vésicules tant en taille qu'en lamellarité pourraient expliquer les différentes structures observées et impliquer plusieurs mécanismes d'action des ions calcium. En effet, on trouve à la fois, des lipides tels que la PS et la PE, qui favorisent les phénomènes d'agrégation et de fusion, et une forte proportion de PC, qui aurait tendance à inhiber ces processus selon la taille des liposomes considérés (Matsumura *et al.*, 1995). De manière générale, le rôle du calcium dans le phénomène de fusion peut être expliqué, notamment, par la formation de complexes de phospholipides inter-membranaires déshydratés avec les cations divalents permettant la mise en commun des membranes de deux vésicules (Duzgunes *et al.*, 1981). Néanmoins, la liaison des ions calcium entraîne des modifications physico-chimiques spécifiques à chaque espèce de phospholipides (Tocanne et Teissié, 1990). Ainsi, en présence de calcium, la PS précipite sous forme de structures cylindriques multilamellaires et des mélanges de phosphatidylinositol et PE s'organisent en phase hexagonale inverse. L'interaction du calcium avec la PS conduirait à une déshydratation de la tête polaire et, donc, à un changement de conformation qui peut s'accompagner d'un relargage de protons du groupe sérine. Dans le cas de la PE, le calcium détruirait plutôt les liaisons hydrogène développées entre les têtes polaires éthanolamine. Pour les lipides restant en phase lamellaire, comme la PC, la liaison des ions calcium se fait sur les groupements phosphate, ce qui a pour conséquence de changer la conformation et l'orientation de la tête polaire phosphocholine, provoquant un effet condensant sur l'organisation moléculaire des lipides (Tocanne et Teissié, 1990). Outre les rôles différents, voire antagonistes, des différents phospholipides du mélange utilisé dans les réorganisations membranaires, les 5 % (en poids) d' α -tocophérol présents au sein des membranes des Marinosomes[®] peuvent aussi jouer un rôle. En effet, l' α -tocophérol pourrait stabiliser les membranes vis-à-vis des phénomènes de

fusion en augmentant l'hydratation de la surface membranaire rendant ainsi la déshydratation complète des têtes polaires par les ions calcium plus difficile (Aranda *et al.*, 1996). Parallèlement, la vitamine E pourrait favoriser la cinétique des réarrangements membranaires intra-liposomes comme cela a été montré pour des liposomes géants de composition lipidique similaire (Nacka *et al.*, 2001c). Par ailleurs, il est connu qu'une fois que le calcium a pénétré dans le volume interne du liposome, il y a une augmentation importante de la perméabilité membranaire (Averbakh et Lobyshev, 2000) qui pourrait favoriser le flux d'eau et conduire à d'autres restructurations. L'augmentation de la concentration des cations divalents près de la surface des vésicules induit la formation, au niveau du feuillet membranaire externe, de domaines phospholipidiques dans lesquels les chaînes hydrocarbonées sont complètement cristallisées. Des défauts structuraux pourraient apparaître entre les zones fluides (feuillet interne) et les zones cristallisées (feuillet externe). Les ions calcium pourraient pénétrer dans le volume interne des liposomes *via* ces discontinuités structurales (Averbakh et Lobyshev, 2000).

1.1.3. Effet combiné du pH et de la concentration des ions calcium

La figure 14 présente l'évolution de la DO de suspensions de Marinosomes[®] soumises simultanément à des variations de pH et de concentrations des ions calcium immédiatement après dilution des échantillons.

En absence de calcium, on retrouve la faible augmentation de la DO quand le milieu est acidifié (Fig. 14 et 9). De même, à pH neutre, la turbidité augmente sensiblement lorsque la concentration des ions calcium augmente (Fig. 14 et 11). L'effet combiné d'une diminution du pH et d'une augmentation de la concentration des ions calcium conduit à une augmentation importante de la DO, et suggère un effet synergique de ces deux paramètres sur les valeurs de turbidité. L'observation des suspensions en microscopie optique en contraste de phase fait apparaître des structures agrégées (Fig. 15). Ce cliché suggère que la taille des liposomes dans les agrégats est plus petite que celle observée dans les agrégats formés en présence d'ions calcium uniquement (Fig. 12). Ce phénomène pourrait provenir d'un effet cumulé d'une diminution des forces électrostatiques répulsives au pH isoélectrique et des ions calcium sur l'agrégation et/ou la fusion. Il a été montré qu'il existe un phénomène de compétition entre les

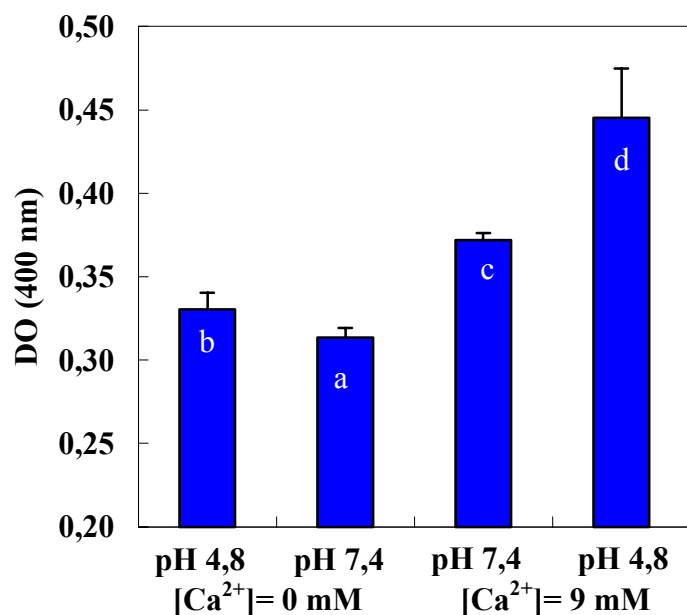


Figure 14 : Variation de la densité optique (DO), immédiatement après dilution, à 400 nm d'une suspension de Marinosomes[®] conservée à 37°C en fonction de la concentration des ions calcium et du pH.

Les Marinosomes[®] sont préparés par extrusion sur filtre de polycarbonate de 5 µm de diamètre de pores, à une concentration de lipides de 20 g.L⁻¹. La suspension est diluée dans des solutions de concentrations des ions calcium et de pH connus, à une concentration finale de lipides de 0,2 g.L⁻¹. Les résultats présentés sont une moyenne de 3 expériences indépendantes. Les valeurs des barres affectées de lettres différentes sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).

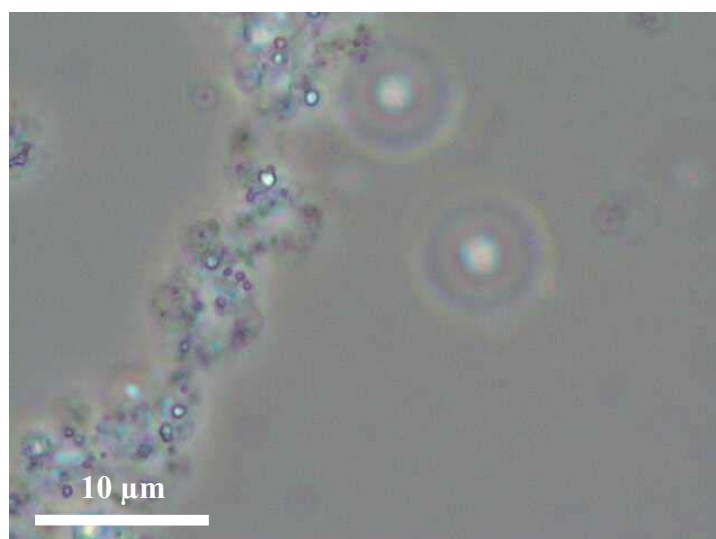


Figure 15 : Cliché de microscopie optique en contraste de phase d'agrégats de Marinosomes[®] en suspension dans une solution à pH 4,8 contenant des ions calcium à une concentration de 9 mM.

protons et les cations au niveau des sites de liaisons des têtes polaires des phospholipides, de sorte que, par exemple, la liaison des ions calcium avec la PE est d'autant plus importante que le pH est élevé (Tocanne et Teissié, 1990). Dans nos conditions expérimentales, à pH 4,8, la quantité de protons est très inférieure à celle des ions calcium. On peut donc supposer que l'action des protons est négligeable ou de moindre importance par rapport à celle des ions calcium. Par ailleurs, l'agrégation pourrait piéger des ions calcium et augmenter localement leur concentration au niveau des membranes, potentialisant ainsi l'action de cet ion.

1.2. Stabilité chimique des Marinosomes[®] en fonction du pH et/ou de la concentration des ions calcium

La stabilité chimique des suspensions de Marinosomes[®] est évaluée dans des conditions se rapprochant de celles trouvées au niveau de la peau. Cette étude consiste à évaluer l'oxydation des acides gras constitutifs des membranes des vésicules et l'hydrolyse non enzymatique des phospholipides.

1.2.1. Hydrolyse non enzymatique des phospholipides

Parmi les différents facteurs à prendre en compte pour évaluer la stabilité des liposomes, l'hydrolyse des phospholipides est un paramètre important (Zuidam *et al.*, 1995 ; Heurtault *et al.*, 2003). En effet, cette hydrolyse peut conduire, à partir d'un pourcentage d'hydrolyse dit critique, à une augmentation de la perméabilité membranaire (Grit et Crommelin, 1993 ; Heurtault *et al.*, 2003) et à des modifications structurales, dans la mesure où les lyso-phospholipides et les acides gras générés peuvent se comporter comme des agents solubilisants (Grit et Crommelin, 1993 ; Lasic, 1993, Zuidam *et al.*, 1995).

La stabilité des Marinosomes[®] vis-à-vis de l'hydrolyse chimique est évaluée par l'apparition des lyso-phospholipides et la disparition de leurs précurseurs. Dans la mesure où la PC et la PE représentent à elles deux près de 90 % (en poids) des phospholipides totaux du mélange lipidique utilisé, seuls leurs produits d'hydrolyse (la lyso-PC et la lyso-PE) sont analysés (Tableau XVIII). La composition des phospholipides de la suspension de Marinosomes[®] placée dans les conditions de l'application topique n'est pas significativement

Tableau XVIII : Evolution de la composition des phospholipides et lyso-phospholipides constitutifs des membranes des Marinosomes[®] au cours du temps, à pH 4.

Les Marinosomes[®] sont préparés par extrusion sur filtre de polycarbonate de 5 µm de diamètre de pores à une concentration de lipides de 20 g.L⁻¹. La suspension est diluée à une concentration finale de lipides de 0,2 g.L⁻¹ par une solution HEPES sans calcium ou dans une solution HEPES contenant des ions calcium à une concentration de 9 mM. Les suspensions sont incubées à 37°C. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes.

Temps (heure)	0	6	24	48
[Calcium] = 0 mM				
PC	72,3 ± 3,1	70,9 ± 0,3	71,5 ± 1,7	70,1 ± 1,3
PE	17,6 ± 4,0	18,4 ± 2,4	16,4 ± 2,2	15,9 ± 1,8
Lyso-PC	3,2 ± 0,8	1,4 ± 0,2	1,9 ± 0,6	2,4 ± 1,3
Lyso-PE	1,8 ± 0,6	2,2 ± 0,6	2,2 ± 0,4	1,9 ± 0,2
Autres	5,0 ± 1,0	7,1 ± 3,4	8,1 ± 1,5	9,8 ± 1,5
[Calcium] = 9 mM				
PC	72,3 ± 3,1	nd	71,4 ± 1,6	71,4 ± 1,6
PE	17,6 ± 4,0	nd	18,1 ± 2,6	17,8 ± 2,6
Lyso-PC	3,2 ± 0,8	nd	3,2 ± 0,7	2,2 ± 0,7
Lyso-PE	1,8 ± 0,6	nd	1,9 ± 0,5	2,2 ± 0,5
Autres	5,0 ± 1,0	nd	5,4 ± 1,9	6,5 ± 1,9

PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ;

Lyso-PC : lyso-phosphatidylcholine ; Lyso-PE : lyso-phosphatidyléthanolamine ;

nd : non déterminé.

modifiée après 48 heures de conservation en milieu acide (pH 4), à 37°C, en absence et en présence d'ions calcium (9 mM).

De manière générale, la vitesse de l'hydrolyse chimique des phospholipides dépend de la température (Grit et Crommelin, 1993 ; Allen Zhang et Pawelchak, 2000), de la charge de surface des liposomes (Grit et Crommelin, 1993 ; Vernooij *et al.*, 2002) et du pH (Grit et Crommelin, 1993 ; Allen Zhang et Pawelchak, 2000 ; Vernooij *et al.*, 2002). Néanmoins, la cinétique d'hydrolyse est relativement lente. Ainsi, une augmentation de seulement 15 % des acides gras libres est mesurée après 16 mois de stockage des liposomes de PC, à pH neutre (Samuni *et al.*, 2000). Moins de 1 % de la dipalmitoyl-PC est hydrolysée par jour à pH 4 et à 30°C (Zuidam et Crommelin, 1995) et la vitesse d'hydrolyse est de 0,45 % dans le cas de la PC d'œuf dans les mêmes conditions de pH et de température (Allen Zhang et Pawelchak, 2000). Dans le cas des Marinosomes[®], le phénomène d'hydrolyse chimique n'est pas détectable car les temps d'incubation testés sont courts (48 heures) mais largement supérieurs au temps maximal d'application d'une formulation cosmétique. Néanmoins, la stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse des Marinosomes[®] pourrait refléter la présence de cholestérol qui agirait, en plus de son rôle condensant, comme un agent déshydratant au niveau des lipides membranaires limitant ainsi l'attaque nucléophile par l'eau des liaisons esters (Samuni *et al.*, 2000). Une étude réalisée sur des liposomes à base de lipides marins de composition proche de celle des Marinosomes[®] a mis en évidence une hydrolyse significative des phospholipides (+ 5 à 7 %) après 24 heures d'incubation des liposomes à pH 7,4. Cette hydrolyse est favorisée (+ 4 à 23 %) par une incubation des liposomes à des pH très acides (1,5 – 2,5) (Nacka *et al.*, 2001a). Cette différence de stabilité vis-à-vis de l'hydrolyse des liposomes à base de lipides marins et des Marinosomes[®] pourrait provenir de plusieurs phénomènes liés au comportement des phospholipides vis-à-vis des protons et/ou à la présence de phospholipides chargés positivement. En effet, les protons peuvent interagir, soit avec les fonctions esters, soit avec les têtes polaires des phospholipides. Ce partage des protons pourrait induire un phénomène de compétition entre la réaction d'hydrolyse et la réaction de neutralisation des phospholipides. Ainsi, aux pH très acides, les protons seraient en quantité suffisante pour favoriser la protonation des esters et, donc, initier la réaction d'hydrolyse. Cette réaction serait moins favorisée à pH 4. Par ailleurs, le changement d'état d'ionisation des phospholipides aux pH acides pourrait induire des changements de conformation des têtes polaires conduisant à des réarrangements membranaires eux aussi susceptibles de favoriser les réactions d'hydrolyse. Ces réarrangements seraient atténués à pH 4.

1.2.2. Oxydation des acides gras

Les lipides, phospholipides et triglycérides, utilisés dans cette étude sont particulièrement riches en AGPI. De ce fait, ils peuvent subir un processus d'oxydation *via* un mécanisme en chaîne impliquant des radicaux libres, conduisant à la formation d'hydroperoxydes qui se décomposent ensuite en produits secondaires (alcools, aldéhydes, acides, cétones...) (Frankel, 1984). Le propanal, le pentanal et l'hexanal sont trois aldéhydes volatils, dosés par CPG, correspondant à des produits secondaires d'oxydation. L'oxydation des Marinosomes[®] est évaluée par le dosage du propanal, dans la mesure où cet aldéhyde est le produit d'oxydation le plus abondant, puisqu'il résulte de l'oxydation des AGPI de la série n-3 (Frankel et Tappel, 1991), et que, dans le mélange lipidique utilisé, ces acides gras représentent plus de 90 % des AGPI totaux. La concentration des lipides des suspensions de Marinosomes[®] est de 2 g.L⁻¹ pour modéliser le comportement de ces liposomes dans une formulation cosmétique à 10 %. Cette remarque est importante car il a été montré que les taux d'oxydation mesurés sont dépendants de la concentration des lipides, c'est-à-dire de la concentration des liposomes (Nacka *et al.*, 2001a). Le suivi de l'oxydation est réalisé pendant 27 heures en considérant que ce temps correspond à la durée d'action maximale d'une formulation utilisée en application topique.

La figure 16 présente les profils d'apparition du propanal, en fonction de la température et du pH, en absence d'ions calcium. De manière générale, le mécanisme d'auto-oxydation des acides gras peut être décomposé en trois phases principales : i) une phase de latence qui correspond au temps nécessaire à l'initiation de la réaction radicalaire où le propanal est en quantité non détectable ; ii) une phase de propagation où la quantité de propanal augmente de manière importante ; iii) une phase de terminaison qui correspond à l'arrêt de la réaction radicalaire en chaîne. La quantité de propanal produite pendant 27 heures par les suspensions de Marinosomes[®] incubés à 25 °C à pH 7,4 peut être considérée comme négligeable compte tenu de la limite de détection de l'appareillage. Cette stabilité oxydative des liposomes à base de lipides marins conservés en milieu neutre et à température ambiante se prolonge d'ailleurs pour des temps d'incubation plus longs (Nacka, 2001). Cette stabilité des Marinosomes[®] peut provenir : i) de la présence d' α -tocophérol à 5 % (en poids) qui joue son rôle d'antioxydant naturel (Fukuzawa *et al.*, 1998) ; ii) de la nature de la tête polaire des phospholipides, les fonctions amines des groupements choline et éthanolamine pouvant agir *via* une réaction nucléophile en décomposant les hydroperoxydes en alcools

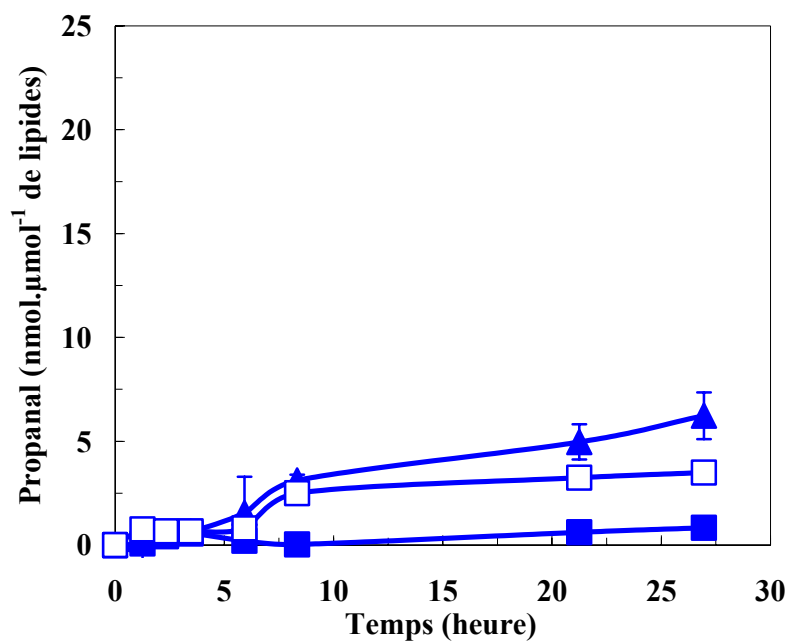


Figure 16 : Formation du propanal (nmol/μmol de lipides totaux) dans une suspension de Marinosomes[®] ([Lipides] = 2 g.L⁻¹, [Ca²⁺] = 0 mM) au cours du temps. (■) pH 7,4 et 25°C ; (▲) pH 7,4 et 37°C ; (□) pH 4,0 et 37°C.

Les Marinosomes[®] sont préparés par extrusion sur filtre de polycarbonate de 5 μm de diamètre de pores, à une concentration de lipides de 20 g.L⁻¹. La suspension est diluée à une concentration finale de lipides de 2 g.L⁻¹ par une solution HEPES de pH contrôlé. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes.

(Saito et Ishihara, 1997) ; iii) de la distribution sélective des AGPI majoritairement en position *sn-2* dans les phospholipides marins (Nara *et al.*, 1997) ; iv) de l'organisation des phospholipides dans la bicouche, notamment la conformation des chaînes hydrocarbonées (Araseki *et al.*, 2002).

L'**augmentation de température** de 25°C à 37°C favorise le processus d'oxydation des AGPI dans la mesure où, après une phase de latence de 5 heures, on observe une augmentation significative de la quantité de propanal. Cependant, après 27 heures d'incubation, le processus d'oxydation n'est pas complet. En effet, une suspension de Marinosomes[®] placée dans des conditions pro-oxydantes, en présence du complexe Fe²⁺/ascorbate, conduit à la formation de 103 nmol de propanal/μmol de lipides. Ainsi, après 27 heures d'incubation, la quantité de propanal formée ne représente que 5,8 % de la quantité maximale pouvant être générée par l'oxydation des lipides. La vitesse d'oxydation des AGPI dépend de la température du milieu (Lasic, 1993) et la constante de la vitesse du phénomène d'auto-oxydation suit la loi d'Arrhénius. L'augmentation de la température conduit à une augmentation de la probabilité de collision entre les radicaux libres et les chaînes insaturées des acides gras. La faible proportion d'AGPI oxydés mesurée après 27 heures d'incubation des Marinosomes[®] à la température de 37°C peut s'expliquer par la stabilité intrinsèque des liposomes, déjà commentée précédemment, et justifierait l'utilisation des Marinosomes[®] en application topique, dans la mesure où la durée maximale de mise en contact d'une préparation cosmétique sur la peau ne devrait pas dépasser 27 heures.

L'**acidification** des suspensions de Marinosomes[®] à pH 4,0 induit une augmentation de la quantité de propanal qui est significative après 8 heures d'incubation et qui représente, après 27 heures d'incubation, 4,4 % de la quantité produite lors de l'oxydation maximale des Marinosomes[®]. Il est connu que les phospholipides présents dans les membranes des liposomes sont plus sensibles à l'oxydation en milieu acide qu'en milieu neutre (Ohyashiki *et al.*, 1993 ; Ohyashiki et Nunomura, 2000). Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette augmentation de l'oxydabilité : i) la présence des protons qui facilitent la formation de radicaux libres hydroxy (Ohyashiki et Nunomura, 2000) ; ii) la génération spécifique à pH acide de radicaux, tels que l'anion superoxyde et sa forme protonée (radical hydroperoxy dont le pK est de l'ordre de 4,7-4,8) (Ohyashiki et Nunomura, 2000). Ce radical hydroperoxy présente d'ailleurs un pouvoir oxydant plus élevé que celui de l'anion superoxyde ; iii) la décomposition plus rapide des peroxydes lipidiques à pH acide (Kamal-Eldin et Appelqvist, 1996) ; iv) l'agrégation des liposomes et la diminution de la mobilité des chaînes d'acides

gras au sein des membranes lipidiques qui pourrait en résulter (Ohyashiki *et al.*, 1993). L'influence des modifications structurales sur l'oxydabilité est à souligner puisque, pour des liposomes à base de lipides marins, la quantité de propanal générée est dépendante de la concentration de lipides (Nacka *et al.*, 2001a). Dans notre cas, ces différents mécanismes physico-chimiques pourraient intervenir pour expliquer l'oxydation des AGPI des Marinosomes[®] en milieu acide. Néanmoins, le processus d'oxydation reste limité malgré une certaine instabilité morphologique des Marinosomes[®] en milieu acide (Fig. 9).

Les cinétiques d'apparition du propanal dans des suspensions de Marinosomes[®] pour différentes **concentrations des ions calcium** sont présentées Figure 17. La présence d'ions calcium à la concentration de 2,5 mM ne modifie pas significativement les quantités de propanal produites par rapport aux résultats obtenus en absence d'ions calcium. En revanche, lorsque la concentration des ions calcium augmente à 9 mM, on observe, après la phase de latence de 6 heures, une augmentation rapide de la quantité de propanal produite. Celle-ci atteint une valeur de 22 nmol/μmol de lipides, après 27 heures d'incubation, ce qui représente 14,5 % du propanal produit si l'oxydation des acides gras était totale. L'influence de la teneur des ions calcium sur la stabilité oxydative des Marinosomes[®] pourrait être reliée aux modifications structurales observées pour des concentrations de Ca²⁺ de 9 mM. En effet, plusieurs études montrent que la stabilité oxydative des lipides est étroitement liée à la présence d'ions métalliques ne présentant pas de potentiel redox de par leur rôle sur l'organisation des lipides dans la membrane. Ainsi, une forte corrélation a été démontrée entre la lipoperoxydation des liposomes à base de PC et PS et les changements structuraux, tels qu'une rigidification des membranes et une séparation de phase des lipides, induits par divers ions métalliques (Verstraeten *et al.*, 1997 ; Adonaylo et Oteiza, 1999). Les cations pourraient favoriser, au sein des membranes des vésicules, la formation de clusters de PS dans lesquels les chaînes d'acides gras seraient moins mobiles, ce qui favoriserait l'initiation et/ou la propagation des réactions radicalaires d'oxydation en présence d'un oxydant (Verstraeten *et al.*, 1997). On peut toutefois noter que parmi les différents cations testés (Al³⁺, Sc³⁺, Ga³⁺, Y³⁺, La³⁺, Be²⁺, Ca²⁺), le calcium est celui qui engendre le moins de modifications structurales et, donc, les plus faibles niveaux de peroxydation (Verstraeten et Oteiza, 1995 ; Adonaylo et Oteiza, 1999).

La figure 18 présente le profil d'apparition du propanal en fonction du temps lorsque les facteurs température (37°C), pH (4,0) et concentration des ions calcium (9 mM) sont combinés. La présence de propanal est détectée dès les premiers temps de la cinétique dans

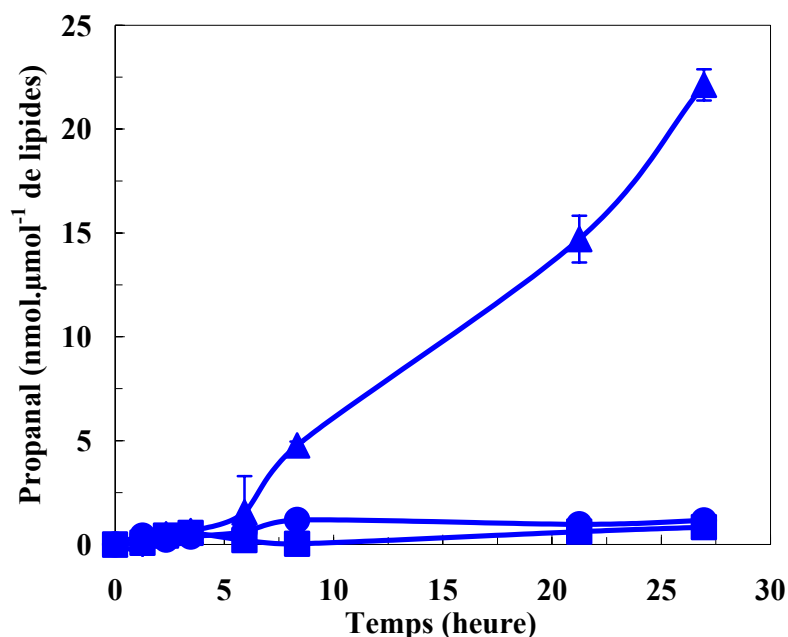


Figure 17 : Formation du propanal (nmol/μmol de lipides totaux) dans une suspension de Marinosomes[®] ([Lipides] = 2 g.L⁻¹) au cours du temps, à 25°C et pH 7,4, en fonction de la concentration des ions calcium. (■) : [Ca²⁺] = 0 mM ; (●) : [Ca²⁺] = 2,5 mM ; (▲) : [Ca²⁺] = 9 mM.

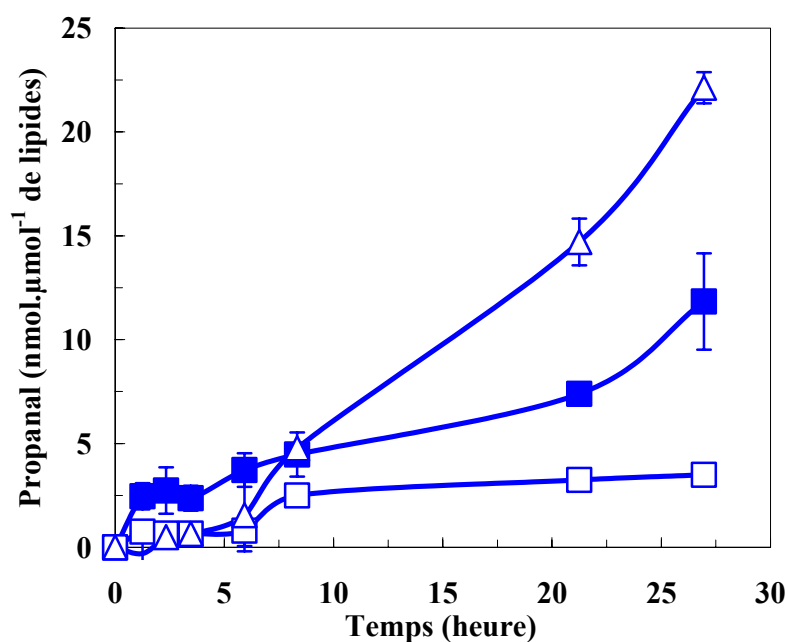


Figure 18 : Formation du propanal (nmol/μmol de lipides totaux) dans une suspension de Marinosomes[®] ([Lipides] = 2 g.L⁻¹) au cours du temps, en fonction de la concentration des ions calcium. (□) : 37°C, pH 4, [Ca²⁺] = 0 mM ; (■) : 37°C, pH 4, [Ca²⁺] = 9 mM ; (△) : 25°C, pH 7,4, [Ca²⁺] = 9 mM.

Les Marinosomes[®] sont préparés par extrusion sur filtre de polycarbonate de 5 μm de diamètre de pores, à une concentration de lipides de 20 g.L⁻¹. La suspension est diluée à une concentration finale de lipides de 2 g.L⁻¹ par une solution tampon HEPES de pH contrôlé, à différentes concentrations des ions calcium. Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes.

une proportion qui représente 2,5 % du propanal qui pourrait être formé par oxydation complète des acides gras des Marinosomes[®]. La quantité de propanal reste à cette valeur pendant 3 heures pour augmenter ensuite et atteindre une valeur maximale de 12 nmol/ μ mol de lipides, après 27 heures. Ainsi, l'effet combiné des trois paramètres température, pH et concentration des ions calcium a deux effets majeurs : i) une diminution du temps de latence qui passe de 5 heures pour chacun des facteurs pris individuellement à moins de 1 heure lorsque les facteurs sont combinés ; ii) une diminution de la vitesse d'apparition du propanal au cours de la phase de propagation par rapport aux conditions les plus oxydantes testées (pH 7,4 ; 25°C ; $[Ca^{2+}] = 9$ mM), ce qui a pour conséquence de réduire la quantité de propanal après 27 heures d'incubation.

Une fois encore, la diminution de la stabilité oxydative des Marinosomes[®] à pH acide, en présence d'une concentration élevée de calcium, à 37°C, peut être attribuée aux modifications morphologiques des liposomes. Cette hypothèse est étayée par le fait que le couplage des trois facteurs, température, pH et calcium, conduit à un effet synergique sur les valeurs de turbidité suggérant une amplification des phénomènes de réorganisation membranaire (Fig. 14). Par ailleurs, pour des temps d'incubation longs, un processus de désagrégation ne peut être exclu (Cf. § C.I.1.3.). Cette dispersion des agrégats au cours du temps pourrait ralentir la propagation des réactions radicalaires et expliquer, au moins en partie, le fait que, lorsque les différents facteurs sont combinés, la quantité de propanal produite est inférieure à celle observée pour des conditions de conservation qui sembleraient plus favorables à une stabilité oxydative (pH 7,4 ; 25°C ; $[Ca^{2+}] = 9$ mM).

En conclusion, les Marinosomes[®] sont des liposomes constitués d'un mélange de lipides complexes qui doivent chacun participer à la stabilité physico-chimique de ces vésicules, *i.e.*, les lipides chargés pour établir des forces de répulsion électrostatique entre bicouches, le cholestérol pour améliorer la rigidité des membranes et prévenir l'hydrolyse des phospholipides, l' α -tocophérol pour prévenir l'oxydation des AGPI. Néanmoins, il apparaît que les Marinosomes[®] placés dans des conditions physico-chimiques se rapprochant de celles retrouvés au niveau de l'épiderme subissent des modifications morphologiques et chimiques qui, de plus, évoluent dans le temps. En effet, suite à une acidification du milieu et/ou en présence de concentration élevée des ions calcium, différents processus semblent coexister au sein de la population des Marinosomes[®] : agrégation, fusion, diminution de taille suite au choc osmotique, désagrégation (pour des temps d'incubation longs). Nos résultats suggèrent

que, si la stabilité des Marinosomes[®] vis-à-vis de l'hydrolyse est indépendante de ces modifications morphologiques, la stabilité oxydative y est plus sensible. Néanmoins, sur des temps courts (inférieurs à 7 heures), les Marinosomes[®] pourraient être considérés comme une source intéressante d'AGPI n-3 pour la peau d'autant plus que nous nous sommes placés dans des conditions physico-chimiques défavorables en utilisant les conditions extrêmes de température (37°C alors qu'en surface la température de la peau est de 31°C), de pH (il n'est que de 4 en surface) et de concentration des ions calcium (la concentration de 9 mM n'est mesurée que dans les couches profondes de l'épiderme). Par ailleurs, une captation et une utilisation rapide des AGPI au niveau de l'épiderme ne peuvent être exclues, ce qui préviendrait, de ce fait, la mise en place des phénomènes d'oxydation au sein des Marinosomes[®]. C'est pourquoi, nous avons envisagé leur utilisation dans le cadre de l'application topique et testé leur efficacité en tant que vecteurs d'AGPI n-3 et leur innocuité (absence d'effets secondaires).

1.3. Evaluation, in vivo et in vitro, de l'activité biologique des Marinosomes[®] dans le cadre de l'application topique

Nous avons vu dans la partie bibliographique qu'une modification des lipides du *stratum corneum* peut provoquer une altération des propriétés fonctionnelles de la peau (Cf. § A.I.3.). L'objectif de l'utilisation des Marinosomes[®] en application topique est donc de compléter le *stratum corneum*, soit en composés qui ne sont pas synthétisés *in situ* (c'est le cas des AGPI n-3 à très longues chaînes tels que l'EPA (20:5 n-3) et le DHA (22:6 n-3)), soit en composés qui sont naturellement présents au niveau de la peau (acides gras, cholestérol, phospholipides) mais qui, pour des questions d'âge, de santé ou de conditions environnementales, ne sont pas représentés à des niveaux suffisants. La supplémentation des régimes en ces composés peut alors stimuler et/ou rétablir les différentes fonctions de la peau. Dans ce cadre, l'utilisation des Marinosomes[®] est évaluée, d'une part, par l'innocuité de ces liposomes, et d'autre part, par la recherche d'une activité anti-inflammatoire. Les résultats obtenus sont interprétés en fonction de la composition des lipides des Marinosomes[®] et de leur comportement physico-chimique dans les conditions de l'application topique.

1.3.1. Evaluation de l'innocuité des Marinosomes®

Pour utiliser les Marinosomes® dans le domaine de l'application topique, il s'avère nécessaire de vérifier l'innocuité de ce type de liposomes vis-à-vis de la peau ou d'autres organes avec lesquels ils pourraient être en contact (les yeux, en particulier). Parmi les effets indésirables, on trouve : i) l'irritation qui est définie comme étant une réaction locale, inflammatoire, non-immunogénique, qui apparaît rapidement après application du produit et qui disparaît, en général, quelques jours après (Corsini et Galli, 1998 ; Welss *et al.*, 2004) ; ii) la toxicité, c'est-à-dire, la mort des cellules mises en contact avec le produit testé. Ces deux aspects sont abordés avec les Marinosomes® : i) à l'échelle des organes, avec des tests globaux, en évaluant l'irritation oculaire par une méthode alternative et l'irritation cutanée chez l'Homme ; ii) à l'échelle cellulaire, avec la détection de biomarqueurs, en évaluant leur cytotoxicité sur des fibroblastes de cornée de lapin. Ces évaluations sont couramment effectuées dans les laboratoires de cosmétologie pour s'assurer de l'innocuité d'un nouveau produit.

1.3.1.1. Cytotoxicité des Marinosomes®

L'effet des Marinosomes® sur la viabilité des cellules de fibroblastes de cornée de lapin est reporté dans le tableau XIX. L'incubation des cellules en culture avec la suspension de Marinosomes® conduit à un indice moyen de cytotoxicité de 1,7 après 4 heures de contact, pour la concentration de lipides étudiée. Cette valeur correspond à une **très faible cytotoxicité**.

Plusieurs paramètres physico-chimiques concourent au caractère non cytotoxique des Marinosomes® :

- La **composition** des Marinosomes®, en particulier la non cytotoxicité de la PC et de la PE (Mayhew *et al.*, 1987 ; Parnham et Wetzig, 1993) ;
- La **concentration** des Marinosomes® utilisée qui est faible (0,2 g.L⁻¹). On peut d'ailleurs noter que la non toxicité de liposomes à base de PC ou de dipalmitoyl-PC a été montrée pour des concentrations allant jusqu' à 2 g.L⁻¹ (Mayhew *et al.*, 1987) ;
- La **taille** des Marinosomes®. Le diamètre moyen important des liposomes (environ 5 µm) pourrait participer à l'effet non irritant des suspensions. En effet, une étude

Tableau XIX : Evaluation de la cytotoxicité de la suspension de Marinosomes[®] ([Lipides] = 0,2 g.L⁻¹) vis-à-vis de fibroblastes de cornée de lapin (lignée SIRC) en culture.

Temps (minute)	0	30	60	240
% de viabilité	100	97	98	92
% de cytotoxicité	0	3	2	8
Indice moyen de cytotoxicité (IMC)[*]				1,7

* le calcul de l'IMC est donné dans le § B.II.2.1..

réalisée sur des cellules humaines en culture indique une cytotoxicité plus élevée pour les liposomes de petite taille par rapport aux liposomes de plus grande taille (Mayhew *et al.*, 1987).

I.3.1.2. Irritation oculaire

L'indice moyen de cytotoxicité présenté dans le paragraphe précédent permet de déterminer un indice d'irritation oculaire équivalent (Cf. § B.II.2.1.). La valeur de 4,3 de cet indice permet de classer les Marinosomes[®] comme faiblement irritant (Cf. Tableau XIII, § B.II.2.1.). Par ailleurs, les Marinosomes[®] présentent un indice d'irritation primaire sur membrane chorio-allantoïdienne nul ce qui les classe comme pratiquement non irritants (Cf. Tableau XV, § B.II.2.2.). Le couplage de ces 2 résultats, indice d'irritation oculaire équivalent et indice d'irritation primaire sur membrane chorio-allantoïdienne, permet de s'assurer que, dans les conditions testées, la suspension de Marinosomes[®] présente un **potentiel irritant oculaire faible** (Cf. Tableau XVI, § B.II.2.2.). Ce résultat est en accord avec d'autres études montrant que les liposomes neutres n'altèrent pas les tissus oculaires (Tanaguchi *et al.*, 1988).

I.3.1.3. Irritation cutanée

L'**irritation cutanée** est définie comme étant une réaction réversible, localisée, caractérisée par l'apparition d'un **érythème et/ou œdème** suite à l'application unique ou répétée d'un agent chimique sur un site cutané (Corsini et Galli, 1998). Les mécanismes biochimiques mis en jeu dans le phénomène d'irritation cutanée sont complexes et encore mal définis. Les agents responsables de l'irritation peuvent intervenir *via* différents processus inflammatoires. Ils peuvent détruire le tissu ou altérer les fonctions cellulaires et/ou déclencher la libération, la formation ou l'activation de médiateurs de l'inflammation tels que l'histamine, des **eicosanoïdes**, des quinines, des facteurs du système du complément, des espèces oxygénées radicalaires et des **cytokines** (Corsini et Galli, 1998).

L'évaluation du pouvoir irritant cutané (Cf. § B.II.1.) sur volontaire par la technique dite du test épicutané sous occlusion conduit à l'absence de réaction, chez 13 sujets, suite à l'application de l'eau physiologique (témoin négatif) et des réactions classées de légères à

importantes chez tous les sujets suite à l'application de LSS (témoin positif). Après application des Marinosomes[®], on constate une absence de réaction chez 12 sujets et l'apparition d'un érythème modéré non persistant chez un seul sujet. Les Marinosomes[®] présentent donc un indice d'irritation cutané de 0,03 ce qui les classe comme un produit **non irritant au niveau cutané**.

Plusieurs paramètres physico-chimiques concourent au caractère non irritant des Marinosomes[®] :

- Les Marinosomes[®] sont principalement constitués de **PC**. Or, en application topique, les liposomes constitués de lécithines, qu'elles soient hydrogénées ou non, d'origines animale (œuf de poule) ou végétale (soja), sont généralement bien tolérés par la peau (Parnham et Wetzig, 1993 ; Dreher *et al.*, 1996 ; Fiume, 2001 ; Lampen *et al.*, 2003). La présence de PE, à raison de 20 %, dans les Marinosomes[®] n'entraîne pas de phénomènes d'irritation ;
- Les phospholipides des Marinosomes[®] sont riches en **AGPI**. Des études chez l'Homme et chez l'animal ont mis en évidence le caractère non irritant des huiles de poisson (Loden et Andersson, 1996 ; Loftsson *et al.*, 1997). Nos résultats suggèrent que la forme des AGPI (triglycérides ou phospholipides) n'influe pas sur l'innocuité des préparations testées ;
- L'**organisation** des phospholipides sous forme de liposomes ne modifie pas l'innocuité de la préparation. En effet, l'application topique de lécithine de soja sous la forme de liposomes ou d'un gel d'une microémulsion, ne conduit pas à l'apparition d'irritation après application unique du produit (Dreher *et al.*, 1996).

Nous avons montré à l'aide de différents tests globaux l'absence ou la faible intensité des effets cytotoxiques ou des phénomènes d'irritation oculaire et cutané lors de l'utilisation des Marinosomes[®]. Ces résultats sont intéressants car ils suggèrent une stabilité physico-chimique de ces liposomes qui leur permet d'être utilisables dans des conditions expérimentales variées (milieu de culture, membrane chorio-allantoïdienne, peau de volontaires).

1.3.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire des Marinosomes[®]

Les kératinocytes représentent près de 95 % des cellules épidermiques. Leurs rôles sont multiples tant sur le plan structural, maintien de l'intégrité de la peau et de ses fonctions de barrière, que sur le plan fonctionnel dans l'initiation et la propagation des réactions inflammatoires et immunologiques (Welss *et al.*, 2004). A ce jour, il est admis que les kératinocytes représentent une interface de signalisation qui transforme des stimuli non spécifiques de l'environnement en signaux endogènes. Ceci initie la libération et la synthèse d'une cascade de médiateurs pro-inflammatoires, modifie l'activité des enzymes et altère la prolifération et le métabolisme cellulaire (Boelsma *et al.*, 1997). Ces cellules constituent donc un bon modèle cellulaire pour l'étude des processus inflammatoires *in vitro*. L'évaluation de l'activité des Marinosomes[®] est donc déterminée, sur des kératinocytes en culture, suite à un stimulus pro-inflammatoire, en mesurant les concentrations, d'une part, de PGE₂, eicosanoïde issu du métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique (20:4 n-6), et, d'autre part, de l'interleukine-8 (IL-8), interleukine secondaire qui joue le rôle d'agent chimiotactique et d'activateur des cellules pro-inflammatoires telles que des neutrophiles et des lymphocytes T. Les marqueurs de l'inflammation sont mesurés après induction d'un stress inflammatoire avec de l'huile de croton, en présence ou non des Marinosomes[®]. L'huile de croton est couramment utilisée pour initier l'inflammation des kératinocytes. L'agent présent dans cette huile et responsable du stimulus est un ester de phorbol, le tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) (Goldyne et Evans, 1994 ; Corsini et Galli, 1998).

1.3.2.1. Effet des Marinosomes[®] sur la production de PGE₂

La PGE₂ est naturellement présente à un taux basal dans les kératinocytes en culture (Fig. 19). L'addition d'huile de croton conduit à une augmentation importante de la teneur en PGE₂ dans le milieu de culture. L'huile de croton agit sur les processus inflammatoires *via* un mécanisme d'activation des voies de formation des métabolites issus de l'acide arachidonique (20:4 n-6) (Kast *et al.*, 1993 ; Liu et Belury, 1998). Ceci se traduit par la stimulation de la production de PGE₂ dans les kératinocytes (Goldyne et Evans, 1994 ; Liu et Belury, 1998). Plus précisément, le TPA stimule la libération de l'acide arachidonique (20:4 n-6) *via* la

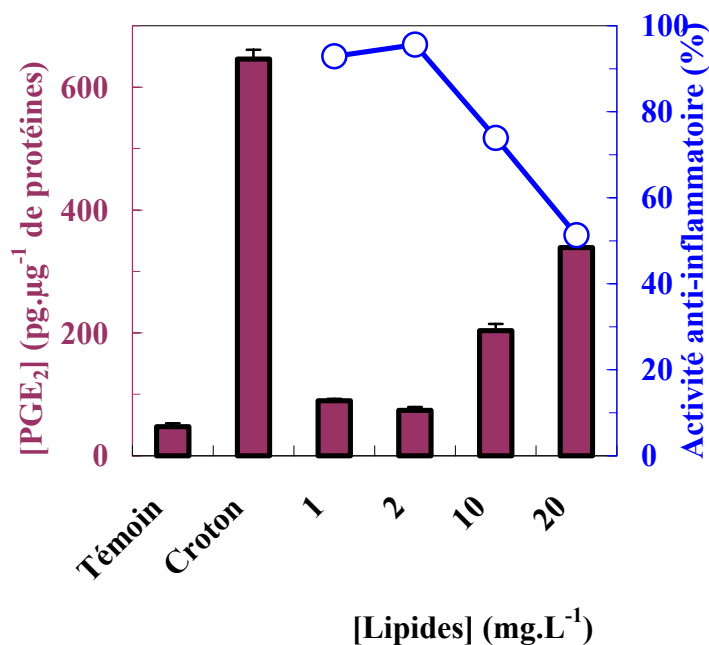


Figure 19 : Actiuité anti-inflammatoire et production de prostaglandine E₂ (PGE₂) par les kératinocytes en culture non activés par l'huile de croton (Témoin), activés par l'huile de croton (Croton, [Huile] = 20 mg.L⁻¹) et en fonction de la concentration de lipides d'une suspension de Marinosomes[®] ajoutée au milieu de culture pendant 48 h préalablement à l'addition de l'huile de croton.

Les Marinosomes[®] sont préparés par extrusion sur filtre de polycarbonate de 5 µm de diamètre de pores à une concentration de lipides de 20 g.L⁻¹. La suspension est ajoutée directement au milieu de culture de telle sorte que la concentration finale de lipides varie de 1 à 20 mg.L⁻¹. Les résultats représentent la moyenne de 3 puits de culture indépendants. L'actiuité anti-inflammatoire est calculée par la formule donnée dans le § B.II.2.3..

translocation partielle d'une PLA₂ cytosolique vers les membranes cellulaires, suite probablement à la phosphorylation de la PLA₂ par la protéine kinase C (Kast *et al.*, 1993).

Le traitement préalable des cultures cellulaires avec les Marinosomes[®] avant application de l'huile de croton diminue de manière significative la quantité de PGE₂ dosée dans le milieu extérieur. L'action des Marinosomes[®] sur la teneur en PGE₂ mesurée est **dose dépendante** (Fig. 19). La quantité de PGE₂ mesurée est minimale pour des concentrations de lipides de 1 et 2 µg.mL⁻¹ puis, au-delà, elle augmente proportionnellement aux concentrations de Marinosomes[®] utilisées. Ainsi, l'activité anti-inflammatoire des Marinosomes[®] est optimale pour les faibles concentrations de lipides de 1 à 2 µg.mL⁻¹. A ces concentrations de lipides, l'activité anti-inflammatoire est proche de 96 %.

Pour expliquer le rôle des Marinosomes[®] sur la production de la PGE₂, il faut émettre l'hypothèse qu'une interaction des liposomes avec les membranes des kératinocytes conduit à une augmentation de la teneur en AGPI n-3 des membranes. Plus précisément, comme classiquement évoqué dans le cadre des interactions liposomes - cellules (Lasic, 1993), cette augmentation pourrait résulter de la fusion des membranes des Marinosomes[®] riches en AGPI n-3 avec les membranes des kératinocytes et/ou d'une hydrolyse enzymatique ou non des phospholipides des liposomes suivie de la pénétration des AGPI n-3 dans les cellules. On peut noter que l'incubation des kératinocytes avec de l'EPA (20:5 n-3) conduit effectivement à une augmentation des AGPI n-3 dans les membranes (Lu *et al.*, 1995 ; Pupe *et al.*, 2002). Sur la base de cette hypothèse, les Marinosomes[®] pourraient agir sur la production de la PGE₂ selon 2 modes d'action selon leur concentration :

- Pour les suspensions de Marinosomes[®] faiblement concentrées ($[\text{Lipides}] \leq 2 \text{ mg.L}^{-1}$), la diminution de PGE₂ résulterait d'**une action directe** des AGPI n-3 incorporés dans les membranes des kératinocytes suite à l'interaction des cellules avec les Marinosomes[®]. La présence de ces AGPI n-3 membranaires permettrait la mise en place d'une compétition directe avec l'acide arachidonique (20:4 n-6) dans le métabolisme oxygéné (Cf. § A.I.4.3.) et/ou une modification de la fluidité membranaire qui influencerait l'activité des protéines et récepteurs participant à l'expression spécifique de certains eicosanoïdes et cytokines (Pupe *et al.*, 2002) ;
- Pour les suspensions de Marinosomes[®] concentrées ($[\text{Lipides}] > 10 \text{ mg.L}^{-1}$), l'augmentation de PGE₂ pourrait provenir de l'incorporation de l'EPA (20:5 n-3)

qui augmente la production d'interleukine-1 α (Pupe *et al.*, 2002) stimulant à son tour la synthèse de PGE₂ (Pentland et Mahoney, 1990 ; Welss *et al.*, 2004).

Ainsi, il existe une concentration optimale de Marinosomes[®] pour laquelle l'interaction des liposomes et des kératinocytes permettrait un enrichissement des membranes en AGPI n-3 sans favoriser de façon excessive la libération de PGE₂.

1.3.2.2. Effet des Marinosomes[®] sur la production de IL-8

Les kératinocytes constituent une source prépondérante de molécules participant aux réactions inflammatoires dont les cytokines (molécules informatives de nature peptidique). Certaines de ces molécules, comme l'interleukine 1 α , sont préformées et biologiquement actives dans les kératinocytes (Corsini et Galli, 1998 ; Pupe *et al.*, 2002). En réponse à un agent pro-inflammatoire, il y a stimulation de la libération de ces cytokines et production et libération d'autres cytokines dont l'IL-8 (Corsini et Galli, 1998 ; Pupe *et al.*, 2002). L'IL-8 est une cytokine chimiotactique qui entraîne la migration de cellules pro-inflammatoires telles que les cellules T et les neutrophiles dans l'épiderme (Barker *et al.*, 1991). Cette molécule est également impliquée dans la prolifération des kératinocytes en modulant le niveau des ions calcium cytosoliques (Welss *et al.*, 2004).

L'IL-8 n'est pas détectée à un taux basal dans les kératinocytes en culture (Fig. 20). L'addition d'huile de croton conduit à une augmentation significative de la quantité d'IL-8 dans le milieu de culture. Le TPA induit la production d'ARN messagers codant pour l'IL-8 lorsqu'il est mis en contact avec des kératinocytes (Barker *et al.*, 1991). De plus, les kératinocytes expriment l'IL-8 sous l'effet d'une augmentation des taux d'autres cytokines dont l'expression et/ou la libération sont elles-mêmes stimulées par l'action du TPA (Welss *et al.*, 2004).

Le traitement préalable des cultures cellulaires avec les Marinosomes[®] suivi de l'application d'huile de croton module la quantité d'IL-8. Au delà d'une concentration seuil de 1 mg.L⁻¹, plus la concentration des Marinosomes[®] augmente, plus la quantité d'interleukine diminue, c'est-à-dire plus l'activité anti-inflammatoire des liposomes augmente. Pour la concentration de lipides la plus élevée testée (20 mg.L⁻¹), les Marinosomes[®] conduisent à une activité anti-inflammatoire de 60 %. L'efficacité des

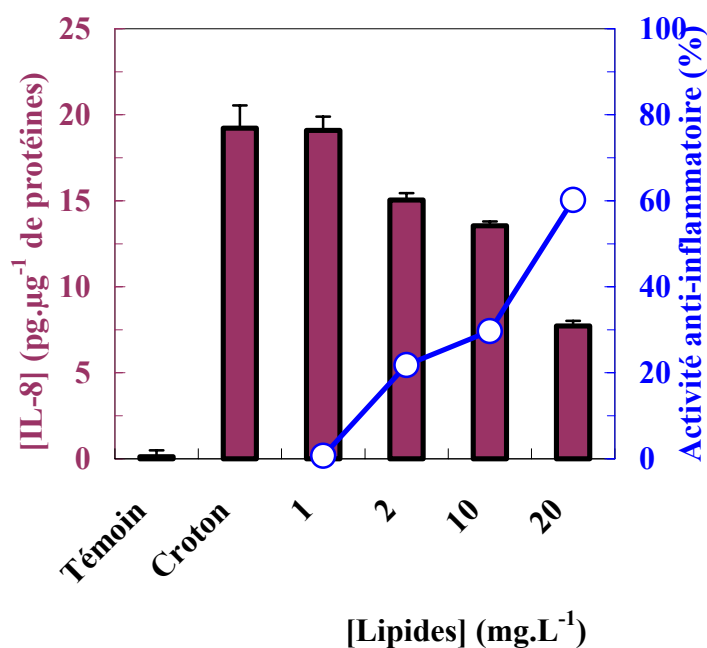


Figure 20 : Activité anti-inflammatoire et production de l'interleukine 8 (IL-8) par les kératinocytes en culture non activés par l'huile de croton (Témoin), activés par l'huile de croton (Croton, [Huile] = 20 mg.L⁻¹) et en fonction de la concentration de lipides d'une suspension de Marinosomes[®] ajoutée au milieu de culture pendant 48 heures préalablement à l'addition de l'huile de croton.

Les Marinosomes[®] sont préparés par extrusion sur filtre de polycarbonate de 5 µm de diamètre de pores à une concentration de lipides de 20 g.L⁻¹. La suspension est ajoutée directement au milieu de culture de telle sorte que la concentration finale de lipides varie de 1 à 20 mg.L⁻¹. Les résultats représentent la moyenne de 3 puits de culture indépendants. L'activité anti-inflammatoire est calculée par la formule donnée dans le § B.II.2.3..

Marinosomes[®] à réduire la libération de l'IL-8 pourrait provenir de plusieurs effets concomitants ou non :

- Les Marinosomes[®] pourraient inhiber directement (par les AGPI n-3) ou indirectement (par la génération de messagers secondaires) la libération de l'IL-8 en agissant au niveau transcriptionnel, comme cela a été montré pour d'autres molécules aux propriétés anti-inflammatoires (Redondo *et al.*, 1997). De plus, les AGPI de la série n-6 tels que l'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide arachidonique (20:4 n-6) peuvent augmenter l'expression des ARNm codant pour l'IL-8 tandis que d'autres et notamment l'acide α -linoléique (18:3 n-3) ne la modifie pas (Boelsma *et al.*, 1997). ;
- Les Marinosomes[®] pourraient moduler l'activité d'autres interleukines agissant en retour sur la synthèse de l'IL-8 ou induire une expression accrue de molécules d'adhésion suite à un traitement à base de cytokines pro-inflammatoires. Dans ce cas, l'incorporation des AGPI n-3 dans les membranes des kératinocytes et la modification de la fluidité membranaires qui en résulte moduleraient l'activité de certaines protéines membranaires tels que des récepteurs ou des enzymes (Lu *et al.*, 1995 ; Pupe *et al.*, 2002). La présence d'AGPI n-3 dans la membrane cellulaire, suite à une fusion par exemple, pourrait également empêcher la synthèse de l'IL-8

Il est intéressant de noter que la production de PGE₂ et celle de l'interleukine-8 sont corrélées négativement lorsque les kératinocytes sont mis en présence de concentrations croissantes de Marinosomes[®] (Fig. 21). La libération des médiateurs d'inflammation (PG et cytokines) est difficile à interpréter car elle est dépendante du temps et est régulée par un réseau complexe de rétrocontrôles par d'autres médiateurs. Ainsi, même si IL-8 et PGE₂ sont deux biomarqueurs des phénomènes pro-inflammatoires précoces de l'irritation cutanée, les facteurs qui provoquent leur libération ne font pas nécessairement appel aux mêmes voies de signalisation. La synthèse de PGE₂ ferait plutôt appel à des signaux de transduction alors que celle de l'IL-8 mettrait en jeu des signaux transcriptionnels. Cependant, certains facteurs peuvent aussi agir simultanément sur les voies de synthèse de ces 2 types de molécules. C'est le cas du facteur d'activation plaquettaire (platelet activating factor, PAF), médiateur lipidique intervenant dans les réactions inflammatoires. La PGE₂ est un inhibiteur de la synthèse du PAF tandis que l'IL-8 induit la synthèse du PAF (Pei *et al.*, 1998). Ainsi, la corrélation

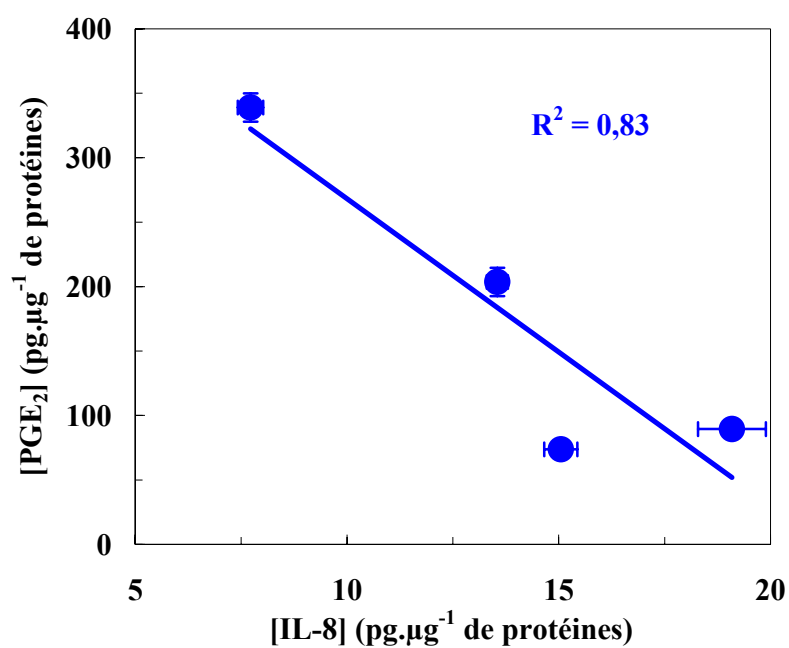


Figure 21 : Corrélation entre les productions de prostaglandine E₂ (PGE₂) et d'interleukine-8 (IL-8) par les kératinocytes en culture et incubés préalablement en présence de Marinosomes[®] avant leur activation par l'huile de croton.

Les données sont issues des figures 19 et 20 pour les quatre concentrations de lipides des suspensions de Marinosomes[®] testées.

négative retrouvée entre la production et/ou libération de la PGE₂ et de l'IL-8 pourrait résulter des actions inverses de la PGE₂ et de l'IL-8 sur ce médiateur d'inflammation.

En conclusion, nous avons montré, dans un premier temps, que les Marinosomes[®] sont des candidats intéressants comme source d'AGPI n-3 pour la peau du fait de leur comportement physico-chimique dans des conditions se rapprochant de celles retrouvées au niveau de l'épiderme. Leur utilisation en cosmétique nécessite, dans un deuxième temps, d'une part, une validation de leur caractère d'innocuité et, d'autre part, la mise en évidence d'un effet biologique. Les tests globaux classiquement utilisés en application topique mettent en évidence l'absence ou la faible intensité des effets cytotoxiques ou des phénomènes d'irritation oculaire et cutanée lors de l'utilisation des Marinosomes[®]. Ces résultats permettent d'envisager l'incorporation des Marinosomes[®] dans des formulations cosmétiques. Par ailleurs, des tests en culture cellulaire suggèrent qu'il est possible d'attribuer aux Marinosomes[®] des propriétés anti-inflammatoires dans la mesure où ces liposomes inhibent la formation de deux biomarqueurs des processus pro-inflammatoires la PGE₂ et l'IL-8. Néanmoins, du fait de la complexité des mécanismes biologiques mis en jeu, il apparaît que des concentrations antagonistes sont nécessaires pour obtenir les activités anti-inflammatoires désirées.

II. Effets des AGPI n-3 sous forme d'huile de poisson ou de Marinosomes[®] sur le métabolisme des lipides, in vivo, chez le rat

Des travaux préliminaires comparant, *in vivo*, chez le rat, l'absorption digestive des lipides suite à l'ingestion de liposomes et d'une huile de poisson ont mis en évidence : i) une meilleure absorption des lipides, notamment du DHA (22:6 n-3), sous forme de phospholipides (liposomes) par rapport à des triglycérides (huile) ; ii) une régulation des taux de phospholipides dans la lymphe suite à la synthèse *de novo* de triglycérides ; iii) une distribution des AGPI n-3 majoritairement en position externe (70 %) dans les triglycérides suite à l'absorption des liposomes alors qu'ils sont également répartis entre les positions externes et interne dans le cas de l'huile de poisson (Cansell *et al.*, 2003). Sur la base de ces résultats, l'objectif de cette étude est d'évaluer, d'une part, si cette amélioration de biodisponibilité digestive des AGPI n-3 observée avec les liposomes se répercute sur les taux d'acides gras du plasma et de divers organes (foie et tissu adipeux) et, d'autre part, si les effets hypolipémiants classiquement attribués aux AGPI n-3 sont différents pour un apport d'acides gras initialement sous forme de liposomes ou sous forme d'huile. Cette étude du devenir métabolique des lipides se base, donc, sur la quantification de **la biodisponibilité des lipides** au niveau du sang ainsi que sur les conséquences sur les paramètres lipidiques sanguins. Pour ce faire, des rats reçoivent, pendant 13 jours au plus, par intubation gastrique, des lipides sous différentes formes physiques et/ou chimiques, *i.e.*, soit sous forme de phospholipides (eux-mêmes organisés dans des Marinosomes[®]), soit sous forme de triglycérides (mélange de matières grasses, utilisé directement, sans émulsification préalable). Dans les deux cas, les quantités d'AGPI n-3 ingérés sont similaires (Tableau XVII - § B.III.2.).

II.1. Modification du profil des lipides du plasma

II.1.1. Triglycérides

L'évolution de la concentration des triglycérides du plasma des rats soumis à un régime supplémenté avec un mélange à base d'huile de poisson ou des Marinosomes[®] est

présentée Figure 22. Le plasma des rats est caractérisé initialement par une concentration moyenne des triglycérides de $112 \pm 27 \text{ mg.dL}^{-1}$ de plasma. Cette valeur est conforme à celles publiées dans d'autres études (Osmundsen *et al.*, 1998 ; Song *et al.*, 2000 ; Gaiva *et al.*, 2003).

L'évolution de la concentration des triglycérides plasmatiques des rats soumis à un régime supplémenté avec un **mélange lipidique à base d'huile de poisson** peut être décomposée en 2 temps : i) une diminution rapide et importante (- 60 %) de la teneur en triglycérides sur les 4 premiers jours ; ii) une phase stationnaire qui est maintenue jusqu'au 13^{ème} jour de la cinétique.

L'effet hypotriglycéridémiant des AGPI n-3 sous forme de triglycérides est clairement démontré chez l'Homme (Harris, 1989 ; Rambjør *et al.*, 1996 ; Mabile *et al.*, 2001 ; Roche et Gibney, 2000) et chez l'animal (Yoshida *et al.*, 1996 ; Ide *et al.*, 2000 ; Song *et al.*, 2000 ; Maldonado *et al.*, 2002 ; Murata *et al.*, 2002 ; Gaiva *et al.*, 2003). L'ampleur de la diminution de la concentration des triglycérides dépend, notamment, de la quantité d'AGPI n-3 administrée au cours de la supplémentation, du rapport EPA/DHA et de la durée du régime. Sur ce dernier point, même si plusieurs semaines de régime à base d'huile de poisson sont souvent testées (8 semaines (Gaiva *et al.*, 2003) ; 4 semaines (Murata *et al.*, 2002) ; 3 semaines (Yoshida *et al.*, 1996 ; Song *et al.*, 2000) ; 2 semaines (Ide *et al.*, 2000)), l'état stationnaire peut être atteint dès les premiers jours de supplémentation du régime (Maldonado *et al.*, 2002).

L'impact sur la teneur en triglycérides plasmatiques de la supplémentation du régime alimentaire des rats avec les **Marinosomes**[®] est similaire à celui observé avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson, à savoir, une diminution rapide et importante (- 42 %) de la concentration des triglycérides du plasma au cours des 4 premiers jours, puis l'établissement d'un état stationnaire.

Dans la littérature, à notre connaissance, seules 3 études traitent de l'effet des AGPI n-3 présentés sous forme de **phospholipides** sur le taux de triglycérides plasmatiques. Chez le porc, aucun effet hypotriglycéridémiant n'a été mis en évidence (Amate *et al.*, 2001). Chez le rat, certains auteurs reportent l'absence d'effet des phospholipides de soja ou d'œufs de poule enrichis en DHA (22:6 n-3) (Djemli-Shipkolye *et al.*, 2002) tandis que d'autres observent un effet hypotriglycéridémiant modéré (- 16 %) des phospholipides enrichis en DHA (22:6 n-3) (Song *et al.*, 2000). Parmi ces études, 2 seulement comparent, pour un même

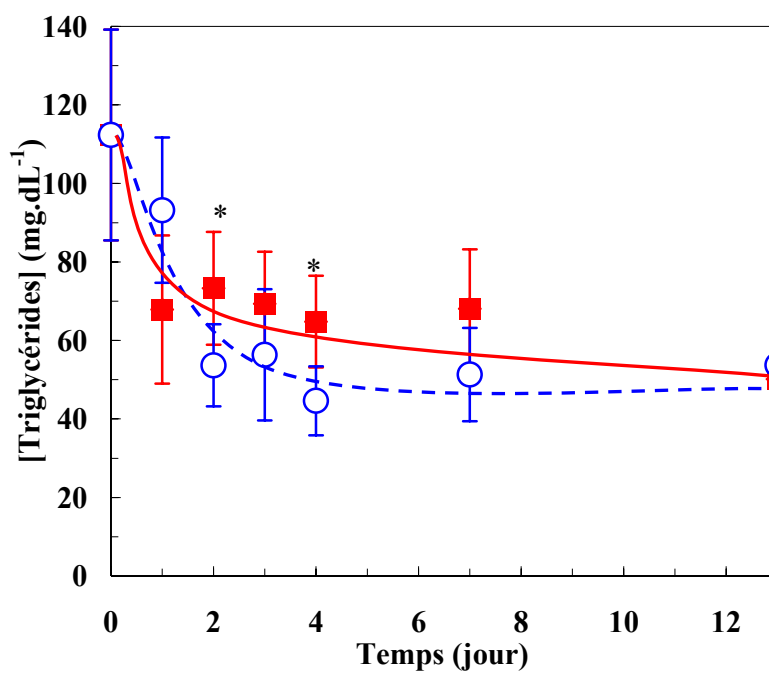


Figure 22 : Evolution de la concentration des triglycérides plasmatiques (mg.dL⁻¹ de plasma) pour les rats soumis au régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson (○) ou avec les Marinosomes® (■).

Les valeurs affectées d'une étoile, à un temps donné, sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).

apport en AGPI n-3, l'influence de la forme chimique de cet apport (phospholipides ou triglycérides) sur les teneurs en triglycérides plasmatiques. Chez le rat, l'effet hypotriglycéridémiant est 2,3 fois moins important quand le DHA (22:6 n-3) est apporté sous forme de phospholipides comparé à un apport sous forme de triglycérides (Song *et al.*, 2000). Chez le porc, il n'a pas été trouvé de différences significatives entre un apport d'AGPI n-3 sous forme de phospholipides ou de triglycérides (Amate *et al.*, 2001). Dans ce dernier cas, il faut souligner qu'aucune diminution significative de la concentration des triglycérides avec le régime à base d'huile de poisson par rapport au régime contrôle n'avait été mise en évidence. Ce résultat pourrait correspondre à l'absence d'EPA (20:5 n-3) dans le régime alimentaire et à la présence d'acide arachidonique (20:4 n-6), connu pour avoir un effet hypertriglycéridémiant, ce qui contrebalancerait l'effet du DHA (22:6 n-3).

Il est aussi intéressant de comparer nos résultats avec un régime à base d'une huile riche en AGPI n-3 dans laquelle ceux-ci sont estérifiés en positions externes des triglycérides. En effet, les triglycérides des chylomicrons conservant la distribution moléculaire des triglycérides alimentaires, l'absorption de ce type d'huile conduit à une situation similaire à celle obtenue suite à la digestion des Marinosomes[®] (Cansell *et al.*, 2003). Une étude montre que l'huile de phoque (AGPI n-3 majoritairement en positions externes dans les triglycérides) a un effet hypotriglycéridémiant plus important que l'huile de poisson (AGPI n-3 majoritairement en position interne) (Yoshida *et al.*, 1996). Les auteurs interprètent ce résultat comme une meilleure biodisponibilité des AGPI n-3 au niveau des phospholipides hépatiques, ce qui aurait pour conséquence une diminution de la synthèse des acides gras, et donc, une réduction de la synthèse des triglycérides et de la sécrétion des VLDL.

Les AGPI n-3 ont un **effet hypotriglycéridémiant** car ils affectent plusieurs voies du métabolisme lipidique et selon des mécanismes variés :

- Ils diminuent la **biodisponibilité des acides gras** pour la synthèse des triglycérides : les β -oxydations peroxysomale et mitochondriale hépatiques sont stimulées par l'EPA (20:5 n-3) (Osmundsen *et al.*, 1998 ; Berge *et al.*, 1999 ; Ide *et al.*, 2000). Les AGPI n-3 modulent la synthèse des enzymes impliquées dans le métabolisme oxydatif en agissant sur l'expression et la traduction des ARNm codant pour ces enzymes (Ide *et al.*, 2000) ;
- Ils diminuent la **synthèse des triglycérides** : l'EPA (20:5 n-3) et son dérivé, l'EPA-CoA, inhibent la diacylglycérol acyltransférase, enzyme impliquée dans la dernière étape de cette synthèse (Berge *et al.*, 1999). De plus, les AGPI n-3

inhibent la synthèse des acides gras en agissant sur l'expression et la traduction des ARNm codant pour les enzymes impliquées dans cette synthèse (Ide *et al.*, 2000) ;

- Ils diminuent la **sécrétion des lipoprotéines** : l'EPA (20:5 n-3) diminue la sécrétion des VLDL-TG par le foie, dans la circulation sanguine et, donc, la teneur en triglycérides circulants (Harris, 1989).

Dans notre cas, les faibles différences observées pour les deux types de supplémentation des régimes (mélange à base d'huile de poisson ou Marinosomes[®]) tout au long de la cinétique et l'obtention rapide d'un état stationnaire laissent à penser que la concentration des AGPI n-3 apportés par le mélange à base d'huile de poisson est suffisante pour observer un effet maximal sur la concentration des triglycérides du plasma. L'augmentation de la biodisponibilité digestive des AGPI n-3 par leur apport sous forme de Marinosomes[®] (Cansell *et al.*, 2003) et/ou la différence de position dans le squelette glycérol des triglycérides des chylomicrons (Cansell *et al.*, 2003) ne permettraient pas d'accentuer l'effet déjà optimal obtenu avec l'huile de poisson. En effet, des études dose-réponse montrent qu'il existe une concentration seuil des AGPI n-3 au-dessus de laquelle l'effet hypotriglycéridémiant n'est pas amélioré (Blonk *et al.*, 1990).

II.1.2. Cholestérol

L'évolution de la concentration du cholestérol total du plasma de rats soumis à un régime supplémenté avec un mélange à base d'huile de poisson ou des Marinosomes[®] est présentée Figure 23. Le plasma des rats contient initialement une concentration du cholestérol de $71 \pm 11 \text{ mg.dL}^{-1}$ de plasma. Cette valeur est en accord avec la littérature (Frøyland *et al.*, 1996 ; Fickova *et al.*, 1998 ; Yoshida *et al.*, 1996 ; Osmundsen *et al.*, 1998 ; Song *et al.*, 2000 ; Maldonado *et al.*, 2002 ; Gaiva *et al.*, 2003).

La concentration du **cholestérol** plasmatique des rats décroît de 30 % au cours des 3 premiers jours de supplémentation du régime avec **le mélange lipidique à base d'huile de poisson**. Après une phase de stabilisation, la teneur en cholestérol augmente significativement au 13^{ème} jour, mais reste, cependant, inférieure à la valeur initiale. Nous discuterons par la suite cette remontée du taux plasmatique de cholestérol au-delà de 7 jours de régime.

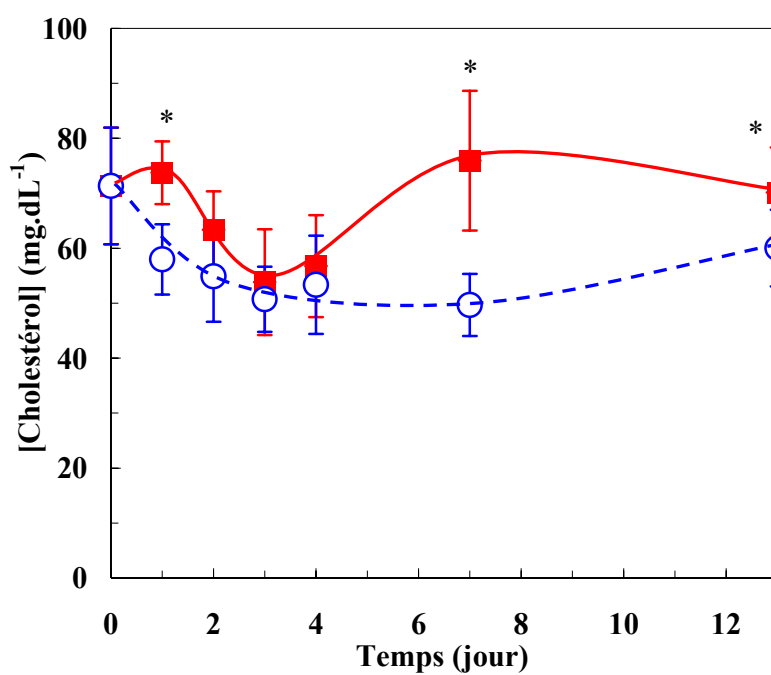


Figure 23 : Evolution de la concentration du cholestérol total plasmatique (mg.dL⁻¹ de plasma) pour les rats soumis au régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson (○) ou avec les Marinosomes® (■).

Les valeurs affectées d'une étoile, à un temps donné, sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).

Dans la littérature, la diminution du taux de cholestérol total dans le plasma suite à un apport d'AGPI n-3 est un résultat connu aussi bien pour l'Homme (Harris, 1989 ; Harris, 1996) que pour l'animal (Harris, 1996). Chez le rat, suivant les caractéristiques des rats considérés (espèce, âge, poids), les durées de régime et les quantités d'EPA (20:5 n-3) et de DHA (22:6 n-3) apportées par les régimes, les diminutions observées sont plus ou moins importantes. Néanmoins, des variations de 20 à 30 % par rapport à la concentration initiale de cholestérol total sont classiquement mesurées (Yoshida *et al.*, 1996 ; Osmundsen *et al.*, 1998 ; Maldonado *et al.*, 2002 ; Murata *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que, bien que la plupart des régimes soient appliqués sur des périodes de plusieurs semaines, l'état quasi-stationnaire peut être atteint dès 3 jours de régime (Maldonado *et al.*, 2002).

Concernant la supplémentation du régime des rats avec les **Marinosomes**[®], la concentration plasmatique du cholestérol total diminue jusqu'au 3^{ème} jour pour atteindre une valeur proche de celle mesurée avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson. En revanche, après 4 jours, cette concentration augmente pour retrouver sa valeur initiale dès le 7^{ème} jour.

Les études portant sur la supplémentation des régimes en AGPI n-3 sous forme de phospholipides sur des temps longs n'indiquent pas de variations de la teneur du plasma en cholestérol total par rapport à la valeur des animaux témoins (Song *et al.*, 2000 ; Amate *et al.*, 2001 ; Djemli-Shipkolye *et al.*, 2002). De plus, pour 2 de ces études qui comparent l'effet d'un apport des AGPI n-3 sous forme de phospholipides ou de triglycérides, aucune différence significative n'est observée entre ces 2 formes d'apport chez le rat (Song *et al.*, 2000) comme chez le porc (Amate *et al.*, 2001). Pour l'étude chez le porc, l'absence d'EPA (20:5 n-3) dans le régime alimentaire peut expliquer le résultat obtenu.

S'il est connu que les AGPI n-3 ont un **effet hypocholestérolémiant**, les mécanismes par lesquels ces acides gras agissent ne sont pas totalement élucidés. Ils pourraient intervenir au niveau de la synthèse du cholestérol et des esters de cholestérol proprement dits et sur la formation et la sécrétion des lipoprotéines. En effet, il a été montré que le DHA (22:6 n-3) (mais pas l'EPA (20:5 n-3)) diminue l'activité de l'HMG-CoA réductase, enzyme contrôlant la **biosynthèse du cholestérol** (Frøyland *et al.*, 1996). Cependant, pour des régimes longs (3 mois) supplémentés avec de l'EPA (20:5 n-3), l'activité de la HMG-CoA réductase est augmentée dans le foie (Frøyland *et al.*, 1996). Par ailleurs, il est admis que les AGPI n-3 interviennent sur les propriétés physiques des phospholipides des membranes cellulaires de

l'organisme en augmentant la fluidité membranaire. La HMG-CoA réductase, localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique des hépatocytes, pourrait voir son activité modifiée par l'incorporation des AGPI n-3 (Frøyland *et al.*, 1996). Au niveau des **lipoprotéines**, l'EPA (20:5 n-3) et le DHA (22:6 n-3) inhibent la sécrétion des VLDL (Frøyland *et al.*, 1996 ; Rambjør *et al.*, 1996). Ceci entraîne une diminution du taux de LDL (issues des VLDL) qui pourrait contribuer à la diminution de la concentration du cholestérol du plasma, dans la mesure où ces LDL sont riches en cholestérol. De plus, l'huile de poisson pourrait accélérer l'épuration des VLDL par les tissus périphériques. Cependant, ce phénomène serait mineur par rapport à la diminution de la sécrétion des VLDL (Lottenberg *et al.*, 1992).

L'évolution des concentrations du cholestérol plasmatique obtenus avec les Marinosomes[®] est plus complexe que celle observée avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson. D'une part, l'effet hypocholestérolémiant des AGPI n-3 se manifeste plus tardivement (au 2^{ème} jour de la cinétique seulement) et, d'autre part, pour des temps de la cinétique supérieurs à 4 jours, on note une augmentation de la concentration du cholestérol dans le plasma des rats soumis au régime à base de Marinosomes[®], contrairement aux rats recevant le régime à base d'huile de poisson (Fig. 23). Ces résultats pourraient provenir d'une augmentation de la **biodisponibilité du cholestérol** alimentaire contenu dans les Marinosomes[®] par rapport à celui contenu dans le mélange à base d'huile de poisson. Cette hypothèse, basée sur le parallèle entre la structure chimique du cholestérol et celle de la vitamine E, est confortée par l'existence d'une biodisponibilité lymphatique accrue de l' α -tocophérol incorporé dans la membrane des liposomes par rapport à une dissolution dans une huile de poisson (Nacka *et al.*, 2001c). Ainsi, la régulation de la concentration du cholestérol plasmatique par les AGPI n-3 dans le cas du régime supplémenté avec les Marinosomes[®] serait plus complexe.

II.1.3. Phospholipides

L'évolution de la concentration des phospholipides du plasma des rats soumis à un régime supplémenté avec un mélange à base d'huile de poisson ou des Marinosomes[®] est présentée Figure 24. La concentration initiale des phospholipides plasmatiques des rats est de $79 \pm 9 \text{ mg.dL}^{-1}$. Cette valeur est du même ordre de grandeur que celles publiées dans la

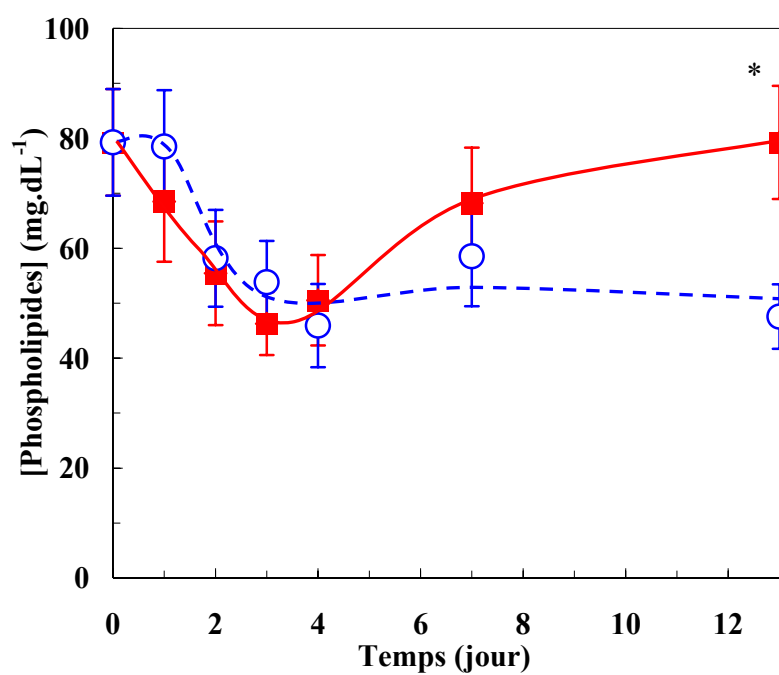


Figure 24 : Evolution de la concentration des phospholipides plasmatiques (mg.dL⁻¹ de plasma) pour les rats soumis au régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson (○) ou avec les Marinosomes® (■).

Les valeurs affectées d'une étoile, à un temps donné, sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).

littérature (Frøyland *et al.*, 1996 ; Osmundsen *et al.*, 1998 ; Song *et al.*, 2000 ; Maldonado *et al.*, 2002).

La concentration des phospholipides du plasma diminue sensiblement lorsque les rats sont soumis au régime supplémenté avec le **mélange à base d'huile de poisson**. Une valeur minimale de $46 \pm 8 \text{ mg.dL}^{-1}$ est obtenue pour une durée du régime de 4 jours, soit une réduction de 40 %. Puis, la concentration des phospholipides plasmatiques se stabilise jusqu'au 13^{ème} jour de la cinétique.

Dans la littérature, une supplémentation du régime en huile de poisson est généralement associée à une diminution de la concentration des phospholipides du plasma (Yoshida *et al.*, 1996 ; Maldonado *et al.*, 2002 ; Murata *et al.*, 2002). Cependant, certaines études rapportent aussi une stabilité de cette classe de lipides (Song *et al.*, 2000 ; Amate *et al.*, 2001).

La supplémentation du régime alimentaire des rats avec les **Marinosomes**[®] conduit à une diminution de la concentration des phospholipides plasmatiques pendant les premiers jours similaire à celle mesurée avec le régime à base d'huile de poisson. En revanche, au-delà de 4 jours, on observe une augmentation de la concentration des phospholipides plasmatiques, de sorte qu'on retrouve la concentration basale à la fin de la période de supplémentation du régime (13 jours).

Les études de la littérature utilisant des suppléments des régimes à base de phospholipides (Song *et al.*, 2000 ; Amate *et al.*, 2001 ; Djemli-Shipkolye *et al.*, 2002) indiquent une absence de modification de la concentration des phospholipides plasmatiques. Cette divergence avec nos résultats pourrait s'expliquer par l'origine des phospholipides alimentaires (Goustard-Langelier *et al.*, 1999 ; Djemli-Shipkolye *et al.*, 2002) et/ou une différence de biodisponibilité de ces phospholipides dans la mesure où ces études utilisaient les lipides mélangés aux autres aliments alors que, dans notre cas, ils sont organisés dans un système membranaire. L'action des AGPI n-3 sur la concentration des phospholipides du plasma peut provenir :

- D'une activation des β -oxydations peroxysomale et mitochondriale hépatiques (Hansen *et al.*, 1998), qui diminueraient la **disponibilité des acides gras** pour la synthèse *de novo* des phospholipides par le foie ;

- D'une activation de la **Lécithine Cholestérol Acyl Transférase** (LCAT) qui estérifie, sur le cholestérol plasmatique libre, l'acide gras interne de la PC et la transforme en lyso-PC transférée au foie *via* la sérum albumine (Jonas, 2000) ;
- De la diminution de la **production et de la sécrétion des VLDL** par le foie due à l'EPA (20:5 n-3) (Harris, 1989), d'où une diminution concomitante des taux plasmatiques de triglycérides (constituants majoritaires des VLDL) et, dans une moindre mesure, de cholestérol et phospholipides (constituants minoritaires de ces VLDL). Une épuration accrue des VLDL par les tissus périphériques pourrait aussi intervenir, même si ce phénomène semble être mineur par rapport à la diminution de la sécrétion des VLDL (Lottenberg *et al.*, 1992).

Une étude antérieure chez le rat a montré que la teneur en phospholipides des chylomicrons est indépendante de la forme chimique de l'apport alimentaire des AGPI n-3 (liposomes ou huile de poisson) (Cansell *et al.*, 2003). Nos résultats montrent qu'il en est de même pour les phospholipides plasmatiques pendant les premiers jours de supplémentation du régime avec les Marinosomes[®] ou le mélange à base d'huile de poisson. Cependant, cette situation n'est pas maintenue pour des temps de supplémentation du régime plus longs (Fig. 24). Par ailleurs, chez les rats soumis au régime à base de Marinosomes[®], il existe une corrélation négative forte entre la concentration des phospholipides au niveau du foie et celle au niveau du plasma (Fig. 25). Les produits phosphorylés issus de la digestion des phospholipides alimentaires, *i.e.*, lyso-phospholipides ou dérivés *sn*-glycérol-3-phosphoryl, pourraient être dirigés vers le foie pour y être métabolisés. Au début de la cinétique, ils auraient tendance à s'accumuler au niveau de cet organe. Puis, cette augmentation pourrait activer la synthèse des phospholipides hépatiques, immédiatement suivie d'une libération au niveau plasmatique sous forme de lipoprotéines. On peut d'ailleurs noter que cette sécrétion de phospholipides est corrélée positivement à l'augmentation de la concentration du cholestérol total plasmatique (Fig. 26). Ceci suggère que ces phospholipides participent à la formation des lipoprotéines véhiculant le cholestérol total et, donc, son épuration.

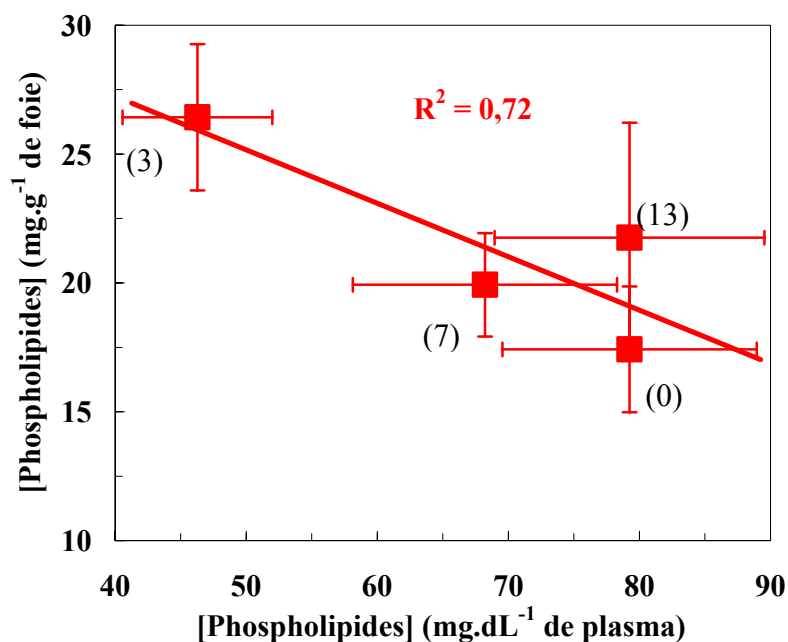


Figure 25 : Corrélation entre la concentration des phospholipides plasmatiques (mg.dL⁻¹ de plasma) et la concentration des phospholipides hépatiques (mg.g⁻¹ de foie) pour les rats soumis au régime supplémenté avec les Marinosomes® (■).

Les 4 points représentés correspondent aux temps 0, 3, 7 et 13 jours de la cinétique.

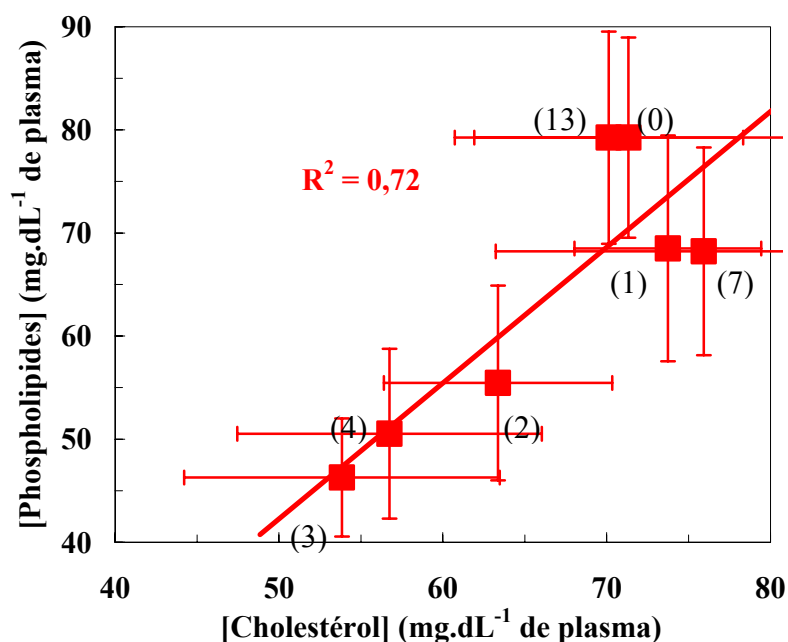


Figure 26 : Corrélation entre la concentration des phospholipides plasmatiques (mg.dL⁻¹ de plasma) et la concentration du cholestérol total plasmatique (mg.dL⁻¹ de plasma) pour les rats soumis au régime supplémenté avec les Marinosomes® (■).

Les 7 points représentés correspondent aux temps 0, 1, 2, 3, 4, 7 et 13 jours de la cinétique.

11.1.4. Conclusion : influence de la forme physico-chimique des lipides alimentaires sur la modification du profil des lipides du plasma

Les résultats obtenus pour la supplémentation des régimes en AGPI n-3 sous forme de Marinosomes[®] suggèrent que le métabolisme lipidique réagit à ce type de supplémentation en deux temps. **Jusqu'au 4^{ème} jour**, les rats se comportent de manière similaire, quelle que soit la forme physico-chimique d'apport des acides gras (Marinosomes[®] ou huile de poisson). On observe une régulation des lipides plasmatiques (diminution des concentrations des triglycérides, du cholestérol et des phospholipides) malgré l'apport supplémentaire de squelette phosphorylé dans le cas des Marinosomes[®]. **Au-delà du 4^{ème} jour**, plusieurs processus pourraient intervenir :

- Un surplus de composés phosphorylés au niveau de l'entérocyte qui serait répercuté au niveau du foie où ils pourraient servir à une **synthèse de novo de phospholipides**. L'augmentation de la teneur en phospholipides hépatiques pourrait alors conduire le foie à sécréter des lipoprotéines, entraînant la sécrétion accrue de cholestérol ;
- Un enrichissement en AGPI n-3 des lipoprotéines, chez les rats recevant le régime à base de Marinosomes[®], lié à l'accroissement de la biodisponibilité, qui pourrait modifier la **fluidité de ces lipoprotéines**. Comme elles sont impliquées dans le transport et l'élimination du cholestérol des tissus, l'enrichissement différent en AGPI n-3 suite aux 2 types de régimes pourrait également expliquer l'augmentation du taux de cholestérol avec les Marinosomes[®] après 4 jours ;

11.2. Devenir métabolique des acides gras au niveau du plasma

Le profil des acides gras totaux du plasma des rats avant le début du régime supplémentation avec les AGPI n-3 est présenté pour les acides gras majoritaires, dans le tableau XX (Temps 0) et, pour la composition complète en Annexe 2. Globalement, les 3 catégories d'acides gras saturés, mono-insaturés et poly-insaturés, représentent chacune environ un tiers des acides gras totaux. Dans chacune de ces catégories, certains acides gras tiennent une place prépondérante. Ainsi, les acides gras saturés sont majoritairement représentés par l'acide

Tableau XX : Evolution en fonction du temps des taux des acides gras majoritaires saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides totaux du plasma des rats soumis à un régime supplémenté avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson.

Temps (jour)	0 (N = 7)	1 (N = 6)	2 (N = 5)	3 (N = 7)	4 (N = 6)	7 (N = 4)	13 (N = 7)
14:0	0,9 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,3 ^b	0,8 ± 0,1 ^{ab}	0,9 ± 0,1 ^{ab}	0,7 ± 0,2 ^a
16:0	21,7 ± 0,5 ^a	24,2 ± 1,3 ^{bc}	27,0 ± 1,8 ^d	22,8 ± 2,6 ^{abc}	24,8 ± 2,6 ^c	23,4 ± 1,6 ^{abc}	22,3 ± 1,2 ^{ab}
18:0	7,0 ± 0,4 ^a	10,8 ± 1,6 ^d	9,8 ± 1,3 ^{cd}	8,9 ± 1,1 ^{bc}	10,3 ± 1,8 ^{cd}	8,7 ± 0,8 ^{bc}	8,5 ± 0,5 ^b
Σ AGS	31,1 ± 0,9^a	37,3 ± 3,1^{cd}	39,2 ± 3,2^d	35,0 ± 3,8^{bc}	37,8 ± 4,2^{cd}	34,9 ± 2,7^{abc}	33,5 ± 1,5^{ab}
16:1 n-9	1,1 ± 0,3 ^c	0,7 ± 0,2 ^b	0,6 ± 0,2 ^b	0,4 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,1 ^{ab}	0,8 ± 0,2 ^b	0,7 ± 0,2 ^b
16:1 n-7	4,9 ± 1,1 ^b	5,0 ± 0,7 ^b	5,5 ± 0,9 ^{bc}	3,2 ± 1,3 ^a	4,6 ± 0,6 ^b	5,7 ± 1,1 ^{bc}	6,6 ± 0,9 ^c
18:1 n-9	18,2 ± 1,6 ^{cd}	18,1 ± 1,0 ^c	19,8 ± 2,6 ^{cd}	11,2 ± 2,0 ^a	14,5 ± 1,1 ^b	19,4 ± 2,4 ^{cd}	20,9 ± 3,6 ^d
18:1 n-7	4,1 ± 0,8 ^c	3,9 ± 0,5 ^{bc}	3,7 ± 0,4 ^{bc}	2,5 ± 0,6 ^a	3,1 ± 0,3 ^{ab}	3,7 ± 0,8 ^{bc}	3,8 ± 0,3 ^{bc}
Σ AGMI	29,5 ± 3,4^c	28,9 ± 1,7^c	31,1 ± 3,1^{cd}	18,9 ± 3,4^a	24,1 ± 0,8^b	31,3 ± 3,4^{cd}	33,3 ± 2,8^d
18:2 n-6	15,0 ± 1,7^e	7,2 ± 0,9^{cd}	3,8 ± 0,3^a	8,4 ± 3,2^d	6,1 ± 1,4^{bc}	4,9 ± 0,4^{ab}	4,6 ± 1,0^{ab}
20:4 n-6	17,5 ± 1,5^c	13,9 ± 1,8^b	10,7 ± 1,6^a	15,3 ± 2,0^b	15,4 ± 0,8^{bc}	10,5 ± 1,6^a	9,5 ± 1,7^a
20:5 n-3	0,6 ± 0,1^a	3,5 ± 0,9^b	6,6 ± 1,9^{cd}	8,3 ± 1,3^d	6,1 ± 1,1^c	8,4 ± 1,1^d	10,2 ± 2,0^e
22:5 n-3	0,5 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,2 ^{bc}	0,8 ± 0,2 ^{ab}	2,1 ± 0,5 ^e	1,3 ± 0,3 ^{cd}	1,4 ± 0,3 ^d	1,3 ± 0,2 ^{cd}
22:6 n-3	2,6 ± 0,3^a	6,1 ± 0,9^b	6,4 ± 0,7^b	10,1 ± 1,3^d	7,7 ± 1,3^c	7,2 ± 1,2^{bc}	6,5 ± 0,9^b
Σ AGPI	39,4 ± 3,0^d	33,8 ± 2,7^b	29,7 ± 3,5^a	46,1 ± 3,7^e	38,1 ± 3,8^{cd}	33,8 ± 2,2^{abc}	33,2 ± 3,1^{ab}
Σ n-6	34,7 ± 2,8^c	22,4 ± 1,9^b	15,4 ± 2,0^a	24,9 ± 3,7^b	22,4 ± 2,0^b	16,3 ± 1,4^a	14,8 ± 1,4^a
Σ n-3	4,5 ± 0,6^a	11,0 ± 1,4^b	13,9 ± 2,6^c	21,0 ± 2,4^f	15,4 ± 2,6^{cd}	17,3 ± 2,2^{de}	18,2 ± 2,4^e
n-6/n-3	7,8 ± 1,0^d	2,1 ± 0,3^c	1,1 ± 0,3^{ab}	1,2 ± 0,2^{ab}	1,5 ± 0,2^b	1,0 ± 0,2^{ab}	0,8 ± 0,1^a

Seuls les acides gras dont les taux sont supérieurs à 1 % sont présentés. Les résultats complets sont reportés en Annexe 2. Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

palmitique (16:0) (21 %). L'acide (18:1 n-9) représente 62 % des acides gras mono-insaturés. Parmi les AGPI, les acides gras de la série n-6 sont prépondérants (88 % des AGPI) avec les acides linoléique (18:2 n-6) et arachidonique (20:4 n-6).

II.2.1. Modification du profil des acides gras totaux

Le tableau XX présente l'évolution du profil des acides gras majoritaires (% en poids par rapport aux acides gras totaux) des lipides totaux du plasma en fonction du temps de supplémentation (jusqu'à 13 jours) du régime alimentaire des rats avec le **mélange lipidique à base d'huile de poisson**. Les résultats complets sont reportés en Annexe 2.

Le taux **des acides gras saturés** augmente de manière significative sur les 2 premiers jours de supplémentation du régime, puis se stabilise autour de 35 % jusqu'au 13^{ème} jour. Les acides gras responsables de ces fluctuations sont l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0).

L'évolution du taux **des acides gras mono-insaturés** est beaucoup plus complexe. Ce taux fluctue entre 19 et 33 % des acides gras totaux, suivant le jour de supplémentation du régime considéré. L'acide gras principalement responsable de ces variations dans le temps est l'acide oléique (18:1 n-9).

L'impact du régime alimentaire à base d'huile de poisson sur le taux des **AGPI** est complexe, avec des valeurs variant entre 30 et 46 % suivant les jours de la cinétique. Cependant, les grandes tendances suivantes peuvent être dégagées :

- Le taux des **AGPI de la série n-6** diminue rapidement sur les 2 premiers jours, puis après une augmentation transitoire (3^{ème} et 4^{ème} jours de régime), diminue à nouveau mais avec une cinétique plus lente. On peut aussi noter que, sur les 2 premiers jours de régime, la vitesse de disparition de l'acide linoléique (18:2 n-6) est plus rapide que celle de l'acide arachidonique (20:4 n-6) (respectivement, 5,6 % / jour et 3,4 % / jour). Au 13^{ème} jour, le pourcentage de l'acide linoléique (18:2 n-6) a diminué de 69 % alors que la perte en acide arachidonique (20:4 n-6) n'est que de 46 % ;
- Un enrichissement important en **AGPI n-3** des lipides totaux du plasma est observé dès le 1^{er} jour de la supplémentation du régime. Il est intéressant de noter que la vitesse d'enrichissement en EPA (20:5 n-3) est de 3 % par jour jusqu'au 4^{ème} jour de régime, puis passe à 1 % par jour environ jusqu'à la fin de la

cinétique. Pour le DHA (22:6 n-3), le taux plasmatique maximal est atteint dès le 3^{ème} jour de supplémentation du régime. Au 13^{ème} jour, les pourcentages d'EPA (20:5 n-3) et de DHA (22:6 n-3) ont augmenté, respectivement, d'un facteur 17,0 et 2,5.

Ces variations des proportions des AGPI se répercutent sur le **rapport des acides gras n-6/n-3**. Celui-ci décroît d'un facteur 3,7 dès le 1^{er} jour de la supplémentation pour se stabiliser autour d'une valeur de 1 dès le 2^{ème} jour de régime.

Nos résultats sont en accord avec les études de la littérature concernant l'effet de régimes à base d'**huile de poisson** sur les profils des acides gras des lipides plasmatiques. Ainsi, la diminution du taux de certains AGPI n-6 et l'augmentation concomitante du taux de certains AGPI n-3 sont des résultats classiquement reportés chez l'Homme (Vidgren *et al.*, 1997 ; Vognild *et al.*, 1998) et chez l'animal (Song *et al.*, 2000 ; Amate *et al.*, 2001 ; Maldonado *et al.*, 2002). Les modifications des profils d'acides gras observées traduisent l'enrichissement en AGPI n-3 alimentaires des lipoprotéines circulantes issues du métabolisme des chylomicrons et/ou du métabolisme lipidique du foie. Par ailleurs, le tissu adipeux et le foie sont sollicités pour fournir les AGPI n-6 (notamment l'acide linoléique (18:2 n-6) précurseur de l'acide arachidonique (20:4 n-6)) qui ne sont plus apportés par le mélange à base d'huile de poisson (Tableau XVII). On observe, en effet, une diminution conséquente du taux de ces AGPI n-6 dans le foie (Annexe 3) et le tissu adipeux (Annexe 4) des rats au 13^{ème} jour de régime à base d'huile de poisson, comparativement aux rats témoins. La comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature en termes de valeurs est plus délicate car des paramètres expérimentaux, tels que la quantité et les proportions des différents acides gras présents dans le supplément lipidique, la durée du régime, le modèle animal considéré et/ou le mode d'expression des résultats, influencent les valeurs obtenues. Néanmoins, il est intéressant de noter qu'en ce qui concerne la durée du régime, la plupart des études se basent sur des durées de supplémentation de plusieurs semaines. Notre étude, en accord avec celle de Maldonado *et al.* (2002), montre que l'état stationnaire est atteint pour des temps différents en fonction de l'acide gras considéré : 3 à 4 jours suffisent pour l'acide linoléique (18:2 n-6), par exemple, alors que des temps plus longs sont requis pour d'autres acides gras comme l'EPA (20:5 n-3). Au 13^{ème} jour de supplémentation du régime, quel que soit l'acide gras considéré, on n'observe plus de variation significative des taux plasmatiques. En ce qui concerne les AGPI n-3, nos résultats montrent qu'il existe un phénomène de saturation de l'incorporation du DHA (22:6 n-3) qui n'est pas observé pour l'EPA (20:5 n-3).

Ce résultat est aussi reporté chez des souris dont le régime alimentaire est supplémenté en huile de poisson (Maldonado *et al.*, 2002).

De manière similaire, les acides gras des lipides totaux du plasma sont analysés en fonction du temps de supplémentation (jusqu'à 13 jours) du régime des rats avec les **Marinosomes**[®] (Tableau XXI, résultats complets en Annexe 5).

Par rapport aux rats témoins, le taux **des acides gras saturés** augmente de manière significative sur les 4 premiers jours de supplémentation du régime, puis se stabilise autour de 35 % jusqu'au 13^{ème} jour. Il n'y a pas d'évolution significative du taux **des acides gras mono-insaturés** par rapport à la valeur initiale malgré quelques fluctuations.

L'effet de la supplémentation du régime des rats avec les **Marinosomes**[®] sur le taux des **AGPI** plasmatiques se répercute sur les acides gras des séries n-6 et n-3 :

- Le taux des **AGPI de la série n-6** diminue dans le temps et se stabilise autour de 20 % dès le 3^{ème} jour. La cinétique de disparition de l'acide linoléique (18:2 n-6) est rapide sur les 2 premiers jours de régime (environ 3,5 % / jour) puis le taux d'acide linoléique (18:2 n-6) se stabilise jusqu'au 13^{ème} jour. La diminution du taux de l'acide arachidonique (20:4 n-6) n'est mesurable qu'à partir du 3^{ème} jour et le taux atteint varie peu pendant le reste de la cinétique. Au 13^{ème} jour de la cinétique, les taux des acides linoléique (18:2 n-6) et arachidonique (20:4 n-6) ont diminué respectivement de 60 et 27 % ;
- Un enrichissement important en **AGPI n-3** est observé dès le 1^{er} jour de la supplémentation du régime. La vitesse d'incorporation de l'EPA (20:5 n-3) est moins rapide que celle du DHA (22:6 n-3) dont le taux plasmatique maximal est atteint dès le 3^{ème} jour de supplémentation du régime. Au 13^{ème} jour de régime, les pourcentages d'EPA (20:5 n-3) et de DHA (22:6 n-3) ont augmenté respectivement d'un facteur 9,0 et 3,2.

Le **rapport des acides gras n-6/n-3** décroît d'un facteur 2 dès le 1^{er} jour de la supplémentation du régime pour se stabiliser autour d'une valeur minimale proche de 1,5 après 7 jours.

Peu d'études reportent l'effet d'un apport des acides gras alimentaires sous forme de **phospholipides** sur la composition des acides gras du plasma (Ramirez *et al.*, 2001). Des études visant à étudier l'effet de l'introduction de phospholipides dans les laits infantiles ont

Tableau XXI : Evolution en fonction du temps des taux des acides gras majoritaires saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides totaux du plasma des rats soumis à un régime supplémenté avec les Marinosomes®.

Temps (jour)	0 (N = 7)	1 (N = 6)	2 (N = 6)	3 (N = 6)	4 (N = 8)	7 (N = 12)	13 (N = 6)
14:0	0,9 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,2 ^{ab}	0,9 ± 0,2 ^{ab*}	1,0 ± 0,1 ^b	0,9 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,1 ^a
16:0	21,7 ± 0,5 ^{ab}	21,2 ± 2,5 ^{a*}	24,2 ± 3,2 ^{bc}	24,8 ± 3,9 ^c	26,5 ± 1,9 ^c	24,6 ± 1,9 ^c	24,7 ± 0,9 ^{c*}
18:0	7,0 ± 0,4 ^a	9,2 ± 0,9 ^{c*}	8,9 ± 2,0 ^{bc}	7,8 ± 1,4 ^{ab*}	8,6 ± 0,9 ^{bc}	7,8 ± 1,2 ^{ab}	7,6 ± 0,5 ^{ab*}
ΣAGS	31,1 ± 0,9^a	33,7 ± 2,6^{ab*}	35,6 ± 4,4^{bc*}	35,2 ± 3,9^{bc}	38,0 ± 2,0^c	35,2 ± 2,6^b	34,6 ± 0,8^b
16:1 n-9	1,1 ± 0,3 ^c	0,7 ± 0,2 ^b	0,8 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,3 ^b	0,6 ± 0,1 ^b
16:1 n-7	4,9 ± 1,1 ^{ab}	4,2 ± 1,1 ^a	5,2 ± 1,6 ^{ab}	5,8 ± 2,0 ^{b*}	7,8 ± 1,8 ^c	5,7 ± 1,4 ^b	5,8 ± 1,1 ^{ab}
18:1 n-9	18,2 ± 1,6 ^{bc}	16,0 ± 3,3 ^{ab}	14,9 ± 2,2 ^{a*}	16,0 ± 2,1 ^{ab*}	17,0 ± 1,0 ^{abc}	17,9 ± 2,9 ^{bc}	19,2 ± 1,8 ^c
18:1 n-7	4,1 ± 0,8 ^{bcd}	3,9 ± 1,0 ^{abc}	4,1 ± 0,6 ^{bcd}	4,4 ± 1,1 ^{cd*}	4,9 ± 0,8 ^d	3,3 ± 0,7 ^a	3,3 ± 0,4 ^{ab}
ΣAGMI	29,5 ± 3,4^{abc}	26,3 ± 4,8^a	26,6 ± 3,7^{ab}	28,9 ± 3,6^{abc*}	32,3 ± 2,9^c	29,7 ± 4,5^{abc}	30,8 ± 2,6^{bc}
18:2 n-6	15,0 ± 1,7^d	11,1 ± 2,3^{c*}	8,0 ± 1,9^{b*}	7,2 ± 3,4^{ab}	5,2 ± 1,0^a	7,0 ± 2,2^{ab}	6,0 ± 1,4^{ab}
20:4 n-6	17,5 ± 1,5^c	19,1 ± 3,6^{c*}	18,7 ± 2,8^{c*}	13,9 ± 0,6^{ab}	14,6 ± 2,1^b	11,8 ± 2,9^a	12,7 ± 1,8^{ab*}
20:5 n-3	0,6 ± 0,1^a	1,5 ± 0,3^{ab*}	2,1 ± 0,7^{bc*}	2,8 ± 1,3^{c*}	2,4 ± 0,8^c	4,5 ± 1,0^{d*}	5,4 ± 0,8^{d*}
22:5 n-3	0,5 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^{ab*}	0,9 ± 0,2 ^{bc}	1,1 ± 0,5 ^{c*}	0,6 ± 0,1 ^{ab}	0,9 ± 0,2 ^{c*}	1,0 ± 0,1 ^{c*}
22:6 n-3	2,6 ± 0,3^a	5,1 ± 0,6^{b*}	6,2 ± 1,4^b	8,6 ± 3,1^{c*}	5,1 ± 0,6^b	9,3 ± 1,6^{c*}	8,4 ± 1,2^{c*}
ΣAGPI	39,4 ± 3,0^{bc}	39,9 ± 5,3^{c*}	37,8 ± 5,3^{bc*}	35,9 ± 6,9^{bc*}	29,7 ± 2,3^a	35,1 ± 3,8^b	34,7 ± 2,6^b
Σ n-6	34,7 ± 2,8^c	31,6 ± 4,6^{bc*}	28,1 ± 4,1^{b*}	22,6 ± 3,8^a	20,9 ± 2,2^a	19,9 ± 3,7^a	19,5 ± 2,6^{a*}
Σ n-3	4,5 ± 0,6^a	8,1 ± 1,1^{b*}	9,5 ± 2,0^{b*}	12,9 ± 4,8^{c*}	8,3 ± 1,2^b	15,1 ± 2,4^c	15,0 ± 1,9^{c*}
n-6/n-3	7,8 ± 1,0^e	3,9 ± 0,5^{d*}	3,0 ± 0,6^{c*}	1,9 ± 0,5^{b*}	2,6 ± 0,5^c	1,4 ± 0,4^a	1,3 ± 0,3^{ab}

Seuls les acides gras dont les taux sont supérieurs à 1 % sont présentés. Les résultats complets sont reportés en Annexe 5. Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). Les valeurs des taux des acides gras affectées d'une étoile sont significativement différentes de celles du groupe de rats dont le régime est supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

montré une absorption des AGPI à longue chaîne, notamment du DHA (22:6 n-3), chez des enfants (Bondia-Martinez *et al.*, 1998 ; Carnielli *et al.*, 1998 ; Morgan *et al.*, 1998). Chez l'animal, rat (Song *et al.*, 2000) et porc (Amate *et al.*, 2001 ; Mathews *et al.*, 2002), un enrichissement en EPA (20:5 n-3) et/ou en DHA (22:6 n-3) des lipides plasmatiques est observé suite à une supplémentation des régimes en phospholipides extraits de soja ou d'œufs de poule. Les résultats obtenus avec les Marinosomes[®] sont, donc, en accord avec ces études. Néanmoins, une autre étude indique une absence d'enrichissement du plasma en AGPI n-3 suite à une supplémentation des régimes en phospholipides extraits de soja ou d'œufs de poule enrichis en DHA (22:6 n-3) (Djemli-Shipkolye *et al.*, 2002).

La **comparaison** de l'impact d'un apport alimentaire en AGPI n-3, selon la forme de cet apport (mélange lipidique à base d'huile de poisson ou Marinosomes[®]) sur les profils des AGPI n-3 et n-6 des lipides plasmatiques met en évidence un certain nombre de similitudes et de différences (Fig. 27A-D).

Sur les 2 premiers jours de la cinétique, la diminution des taux des **AGPI n-6** est moins brutale avec les Marinosomes[®], du fait d'une disparition plus lente de l'acide linoléique (18:2 n-6) et d'un maintien du taux de l'acide arachidonique (20:4 n-6). Au 13^{ème} jour, seul l'acide arachidonique (20:4 n-6) a un taux plasmatique significativement supérieur dans le groupe de rats supplémentés avec les Marinosomes[®]. Ces résultats sont à rapprocher du taux supérieur d'acide arachidonique (20:4 n-6) dans les Marinosomes[®] par rapport au mélange à base d'huile de poisson (Tableau XVII). La diminution plus rapide de l'acide linoléique (18:2 n-6) par rapport à l'acide arachidonique (20:4 n-6) résulte, d'une part, d'un apport alimentaire en acide arachidonique (20:4 n-6) et, d'autre part, d'une synthèse de cet acide gras à partir de son précurseur alimentaire, l'acide linoléique (18:2 n-6). Néanmoins, cette synthèse n'est vraisemblablement pas aussi active qu'elle devrait l'être en raison de l'inhibition de la $\Delta 6$ -désaturase par les AGPI n-3 (Bézar *et al.*, 1994).

En ce qui concerne les **AGPI n-3**, pour les 2 régimes, les variations des taux d'incorporation par rapport au groupe témoin sont nettement en faveur de l'EPA (20:5 n-3) par rapport au DHA (22:6 n-3). De plus, il existe un phénomène de saturation de l'incorporation du DHA (22:6 n-3) dès 3 jours qui n'est observé pour l'EPA (20:5 n-3) qu'en fin de cinétique. Cette différence de cinétique d'incorporation peut s'expliquer par : i) un apport alimentaire en DHA (22:6 n-3) 2 fois supérieur à celui de l'EPA (20:5 n-3), de sorte que l'état stationnaire serait d'autant plus rapide à atteindre que la concentration d'AGPI d'origine exogène est importante ; ii) l'utilisation préférentielle de l'EPA (20:5 n-3) dans le

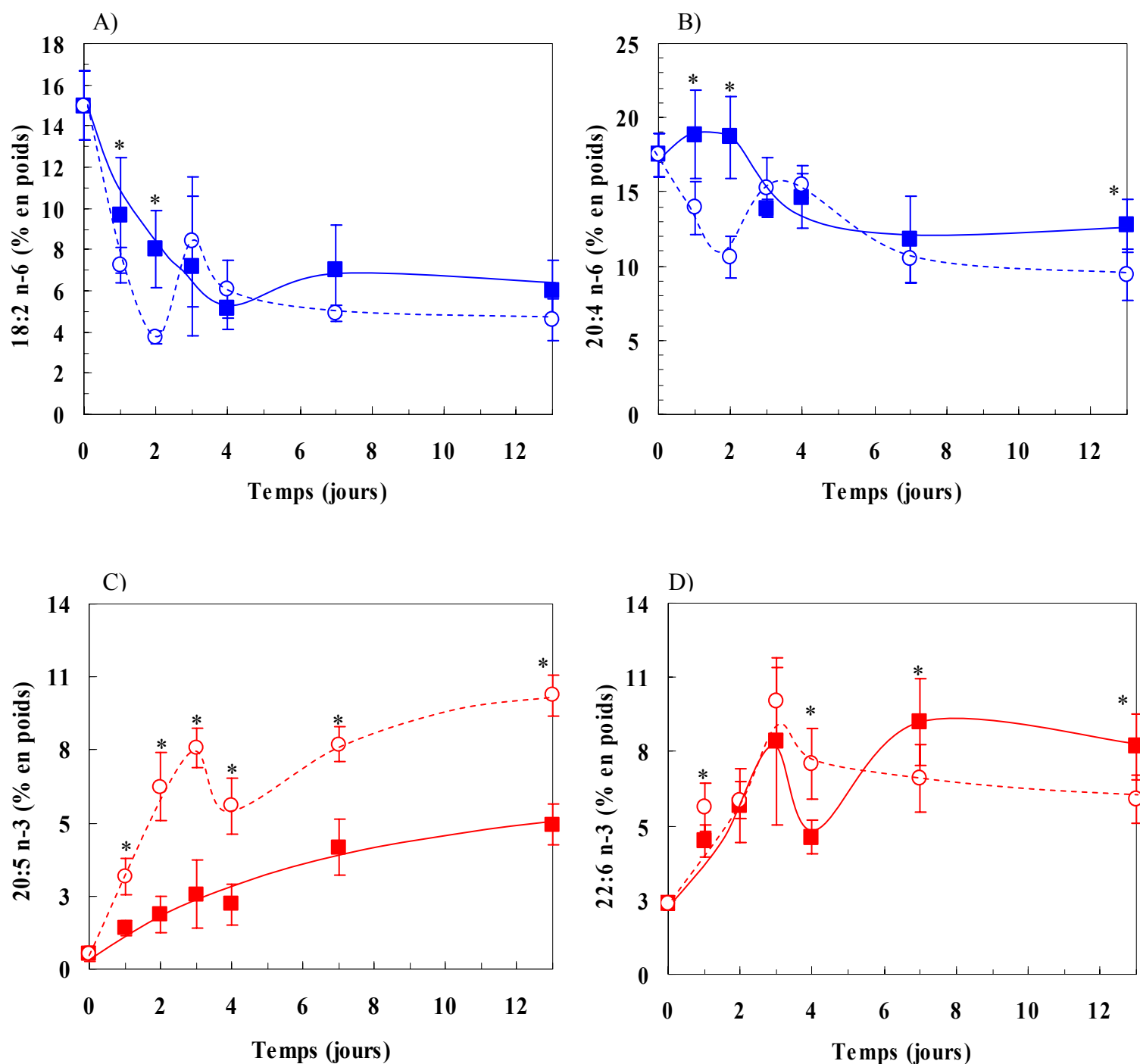


Figure 27 : Evolution des taux des AGPI n-6 et n-3 (% en poids par rapport aux acides gras totaux) dans les lipides totaux du plasma des rats en fonction de la durée du régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson (O) ou avec les Marinosomes® (■). A : acide linoléique (18:2 n-6) ; B : acide arachidonique (20:4 n-6) ; C : EPA (20:5 n-3) ; D : DHA (22:6 n-3).

Les valeurs affectées d'une étoile, à un temps donné, sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).

métabolisme énergétique (Berge *et al.*, 1999) ; iii) l'utilisation de l'EPA (20:5 n-3) dans différentes réactions du métabolisme des eicosanoïdes alors que le DHA (22:6 n-3) n'est le substrat que des lipoxgénases ; iv) l'incorporation préférentielle de l'EPA (20:5 n-3) dans d'autres organes (Ikeda *et al.*, 1998). Par ailleurs, on peut noter qu'il existe une régulation du taux de DPA (22:5 n-3) puisque, avec les deux régimes, les taux plasmatiques de cet acide gras sont sensiblement les mêmes. Dans le cas du régime à base d'huile de poisson contenant 3,5 % de cet acide gras, cette régulation pourrait résulter d'une utilisation du DPA (22:5 n-3) (conversion du DPA (22:5 n-3) en DHA (22:6 n-3) ou oxydation, par exemple). En revanche, dans le cas des Marinosomes[®], contenant 0,3 % de DPA (22:5 n-3), l'augmentation du taux plasmatique de cet acide gras pourrait provenir de l'élongation de l'EPA (20:5 n-3).

On observe un enrichissement légèrement plus important en DHA (22:6 n-3) du plasma pour la supplémentation du régime avec les Marinosomes[®] par rapport à celle avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson, mais le résultat inverse est obtenu pour l'EPA (20:5 n-3) (augmentation du taux d'incorporation d'un facteur 9 avec les Marinosomes[®] et de 17 avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson par rapport aux rats témoins). Or, une étude antérieure avait conclu à une meilleure biodisponibilité digestive des AGPI n-3 (Cansell *et al.*, 2003). Nous verrons par la suite que la contradiction apparente entre ces résultats peut être levée quand on considère les différences de composition des lipides (triglycérides, phospholipides, esters de cholestérol) du plasma entre les deux groupes de rats (huile de poisson et Marinosomes[®]) (Cf. § C.II.1.) et le mode d'expression des résultats (Cf. § C.II.2. et 3.).

L'évolution des AGPI des séries n-6 et n-3 est plus progressive dans le cas de la supplémentation du régime avec les Marinosomes[®] alors que le mélange à base d'huile de poisson conduit, aux 3^{ème} et 4^{ème} jours de régime, à des fluctuations importantes. En conséquence, la diminution du **rapport des acides gras n-6/n-3** est moins brutale avec le régime à base de Marinosomes[®], sur les premiers jours de la cinétique.

Il faut noter que l'analyse des résultats des acides gras des lipides totaux du plasma est peu pertinente dans notre cas, du fait des concentrations différentes des fractions lipidiques plasmatiques (triglycérides, cholestérol et phospholipides) pour les 2 types de régime. C'est pourquoi, les profils en concentration des acides gras des triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol du plasma sont déterminés.

11.2.2. Modification du profil des acides gras des triglycérides du plasma

Le tableau XXII présente l'évolution du profil des acides gras majoritaires (en concentration massique) des triglycérides du plasma pour les 2 groupes de rats : soumis à un régime supplémenté avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson et avec des Marinosomes[®], pendant 13 jours. Les résultats complets sont reportés en Annexe 6 (a et b).

De manière générale, **pour les deux régimes** à base d'huile de poisson ou de Marinosomes[®], la quantité totale d'acides gras issus des triglycérides du plasma diminue après 13 jours de supplémentation des régimes. Ceci reflète le rôle hypotriglycéridémiant des AGPI n-3 déjà discuté (Cf. § C.II.1.1.). De plus, ces régimes induisent des modifications du profil des acides gras des triglycérides du plasma. Proportionnellement à la quantité totale d'acides gras associée à chaque régime, on peut noter :

- Une diminution des teneurs en AGPI de la série n-6, provenant de la diminution importante de l'acide linoléique (18:2 n-6). Comparativement, la diminution de l'acide arachidonique (20:4 n-6) est nettement plus faible ;
- Une augmentation des teneurs en AGPI de la série n-3, provenant de l'augmentation de l'EPA (20:5 n-3), du DPA (22:5 n-3) et du DHA (22:6 n-3) ;
- Une réduction du rapport des acides gras n-6/n-3 d'un facteur d'environ 25 due à la modification du profil des AGPI.

La **comparaison** du type de supplémentation du régime sur les profils des acides gras des triglycérides plasmatiques met en évidence une incorporation similaire de l'EPA (20:5 n-3) dans les triglycérides plasmatiques et une meilleure incorporation du DHA (22:6 n-3) lorsque ces acides gras sont apportés par les Marinosomes[®] par rapport au mélange lipidique à base d'huile de poisson. En effet, le DHA (22:6 n-3) dans les triglycérides représente 76 % des AGPI n-3 dans le groupe des rats supplémentés avec les Marinosomes[®] contre 58 % seulement dans les AGPI n-3 des triglycérides pour les rats supplémentés avec le mélange à base d'huile de poisson. En revanche, il n'y a pas d'influence statistiquement significative du type de régime sur les concentrations des AGPI n-6.

L'augmentation des taux et des concentrations des AGPI n-3 et leur diminution pour les AGPI n-6 estérifiés dans les triglycérides du plasma peuvent être expliquées de la même façon que pour les lipides totaux et, notamment, par le rapport des acides gras n-6/n-3 du

Tableau XXII : Evolution de la concentration des acides gras majoritaires des triglycérides du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes[®].

Acides gras	Rats		
	Témoin	Régime huile	Régime Marinosomes [®]
14:0	3,8 ± 0,3 ^b	2,6 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,1 ^b
16:0	96,4 ± 6,2 ^b	55,0 ± 1,8 ^a	67,2 ± 11,2 ^a
18:0	8,1 ± 2,3 ^a	6,3 ± 0,6 ^a	6,7 ± 1,8 ^a
Σ AGS	111,4 ± 9,5 ^b	68,1 ± 3,0 ^a	82,3 ± 14,2 ^a
16:1 n-9	4,7 ± 0,9 ^b	1,8 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,3 ^a
16:1 n-7	26,1 ± 8,4 ^a	18,3 ± 1,6 ^a	21,6 ± 5,0 ^a
18:1 n-9	118,6 ± 4,9 ^b	67,0 ± 6,3 ^a	76,3 ± 21,5 ^a
18:1 n-7	21,2 ± 5,6 ^b	11,2 ± 0,8 ^a	14,7 ± 4,4 ^{ab}
Σ AGMI	174,2 ± 8,4 ^b	101,5 ± 4,8 ^a	121,2 ± 33,2 ^a
18:2 n-6	88,3 ± 3,3 ^b	3,9 ± 3,5 ^a	8,7 ± 1,0 ^a
18:3 n-3	3,9 ± 0,5 ^b	0,9 ± 0,4 ^a	0,6 ± 0,0 ^a
20:4 n-6	6,5 ± 0,9 ^b	1,2 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,4 ^a
20:5 n-3	1,0 ± 0,1 ^a	4,5 ± 0,8 ^b	3,3 ± 0,4 ^b
22:5 n-3	1,2 ± 0,0 ^a	3,3 ± 0,7 ^b	2,0 ± 0,5 ^{ab}
22:6 n-3	3,1 ± 0,5 ^a	11,7 ± 2,9 ^b	19,2 ± 2,7 ^c
Σ AGPI	112,2 ± 0,8 ^b	29,3 ± 6,3 ^a	38,0 ± 4,9 ^a
Σ n-6	101,9 ± 1,1 ^b	8,7 ± 3,6 ^a	12,6 ± 3,1 ^a
Σ n-3	9,3 ± 0,1 ^a	20,3 ± 4,0 ^b	25,1 ± 3,6 ^b
n-6/n-3	11,0 ± 0,2 ^b	0,4 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,2 ^a
Σ AG	397,7 ± 0,4 ^b	198,8 ± 2,0 ^a	241,6 ± 47,4 ^a

Seuls les acides gras dont les concentrations rapportées à la concentration totale des acides gras sont supérieures à 1 % sont présentés. Les résultats complets sont présentés Annexe 6 (a et b). Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). Nombre de rats = 3. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

mélange lipidique à base d'huile de poisson ou des Marinosomes[®]. Nos résultats concernant le mélange à base d'huile de poisson rejoignent ceux de la littérature montrant un enrichissement des triglycérides plasmatiques en AGPI n-3 chez l'Homme (Subbaiah *et al.*, 1993 ; Vidgren *et al.*, 1998) et chez l'animal (Fickova *et al.*, 1998 ; Amate *et al.*, 2001 ; Maldonado *et al.*, 2002). Néanmoins, contrairement à nos résultats, une étude chez le porc comparant l'apport des AGPI n-3 sous forme de phospholipides et de triglycérides n'a mis en évidence aucun enrichissement préférentiel en DHA (22:6 n-3) avec ces 2 sources de lipides (Amate *et al.*, 2001).

II.2.3. Modification du profil des acides gras des phospholipides du plasma

Le tableau XXIII présente l'évolution du profil des acides gras majoritaires (en concentration massique) des phospholipides du plasma pour les 2 groupes de rats : soumis à un régime supplémenté avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson et avec des Marinosomes[®], pendant 13 jours. Les résultats complets sont reportés en Annexe 7 (a et b).

Nous avons déjà discuté de l'évolution différente de la concentration des phospholipides plasmatiques, pour les deux régimes (Cf. § C.II.1.3.). Ce résultat est retrouvé lorsqu'on analyse la quantité totale d'acides gras issus des phospholipides du plasma, après 13 jours de supplémentation des régimes : elle est significativement plus faible dans le groupe de rats supplémentés par le mélange lipidique à base d'huile de poisson par rapport au groupe supplémenté avec les Marinosomes[®] ($299,7 \pm 23,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contre $428,6 \pm 44,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

De manière générale, **pour les 2 types de régime**, on observe au niveau des phospholipides plasmatiques, comme pour les acides gras des lipides totaux (Cf. § C.II.2.1.), une diminution des quantités d'AGPI n-6 et une augmentation des quantités d'AGPI n-3, ce qui conduit à une réduction du rapport n-6/n-3. La **comparaison** du type de supplémentation des régimes sur les profils, en concentration, des acides gras des phospholipides plasmatiques met en évidence une diminution environ 2 fois plus faible des concentrations des AGPI n-6 avec les Marinosomes[®] comparativement au mélange à base d'huile de poisson. Ce résultat est applicable aux acides linoléique (18:2 n-6) et arachidonique (20:4 n-6). Si la concentration des AGPI n-3 augmente de façon similaire suite aux 2 régimes, on observe une incorporation plus importante du DHA (22:6 n-3) lorsqu'il est apporté par les Marinosomes[®] par rapport au régime à base d'huile de poisson. En effet, le DHA (22:6 n-3) dans les phospholipides

Tableau XXIII : Evolution de la concentration des acides gras majoritaires des phospholipides du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.

Acides gras	Rats		
	Témoin	Régime huile	Régime Marinosomes®
16:0	103,6 ± 15,7 ^{ab}	75,8 ± 5,6 ^a	111,5 ± 23,3 ^b
18:0	77,8 ± 14,9 ^b	54,9 ± 5,7 ^a	67,9 ± 3,9 ^{ab}
24:0	7,2 ± 1,2 ^b	4,8 ± 0,4 ^a	6,3 ± 0,8 ^{ab}
Σ AGS	200,4 ± 32,3 ^b	142,6 ± 10,1 ^a	195,3 ± 29,0 ^b
16:1 n-7	5,6 ± 1,9 ^a	6,2 ± 0,3 ^a	9,1 ± 2,6 ^a
18:1 n-9	39,4 ± 9,5 ^{ab}	29,5 ± 1,5 ^a	53,2 ± 11,6 ^b
18:1 n-7	17,2 ± 4,8 ^b	10,8 ± 0,9 ^a	13,0 ± 1,9 ^{ab}
24:1 n-9	9,5 ± 2,2 ^b	5,0 ± 0,7 ^a	8,4 ± 1,4 ^b
Σ AGMI	76,4 ± 16,9 ^{ab}	55,4 ± 1,7 ^a	90,2 ± 16,6 ^b
18:2 n-6	34,9 ± 3,6 ^c	12,3 ± 3,5 ^a	23,0 ± 2,3 ^b
20:3 n-6	6,5 ± 1,2 ^b	2,9 ± 0,4 ^a	4,1 ± 0,3 ^a
20:4 n-6	64,5 ± 15,3 ^b	28,3 ± 2,6 ^a	49,8 ± 0,2 ^b
20:5 n-3	1,1 ± 0,5 ^a	20,3 ± 3,2 ^b	16,5 ± 2,0 ^b
22:5 n-6	4,5 ± 1,5 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,1 ^a
22:5 n-3	2,1 ± 0,2 ^a	6,0 ± 1,6 ^b	4,6 ± 0,1 ^b
22:6 n-3	19,2 ± 4,3 ^a	29,2 ± 5,6 ^b	40,0 ± 2,0 ^c
Σ AGPI	142,8 ± 28,5 ^b	101,7 ± 11,9 ^a	143,1 ± 2,7 ^b
Σ n-6	116,1 ± 22,3 ^c	45,1 ± 6,4 ^a	80,1 ± 2,6 ^b
Σ n-3	22,7 ± 4,8 ^a	56,1 ± 9,8 ^b	61,6 ± 1,9 ^b
n-6/n-3	5,1 ± 0,1 ^c	0,8 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,0 ^b
Σ AG	419,7 ± 76,7 ^b	299,7 ± 23,0 ^a	428,6 ± 44,6 ^b

Seuls les acides gras dont les concentrations rapportées à la concentration totale des acides gras sont supérieures à 1 % sont présentés. Les résultats complets sont présentés en Annexe 7 (a et b). Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5 \%$). Nombre de rats = 3. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

représente 65 % des AGPI n-3 dans le groupe des rats supplémentés avec les Marinosomes[®] alors qu'il n'est présent qu'à 52 % dans les AGPI n-3 des phospholipides pour les rats supplémentés avec le mélange à base d'huile de poisson. En revanche, les 2 régimes conduisent à des teneurs en EPA (20:5 n-3) similaires. L'ensemble de ces différences conduit à une diminution du rapport des acides gras n-6/n-3 significativement moins importante pour le groupe de rats supplémentés avec le régime à base de Marinosomes[®].

Nos résultats concernant le mélange à base d'huile de poisson rejoignent ceux de la littérature montrant un enrichissement des phospholipides plasmatiques en AGPI n-3 (EPA (20:5 n-3) et/ou DHA (22:6 n-3) suivant les régimes) chez l'Homme (Subbaiah *et al.*, 1993 ; Rambjør *et al.*, 1996 ; Vidgren *et al.*, 1998) et chez l'animal (Alessandri *et al.*, 1998 ; Fickova *et al.*, 1998 ; Goustard-Langelier *et al.*, 1999 ; Amate *et al.*, 2001 ; Maldonado *et al.*, 2002). Les variations mesurées sur les taux d'AGPI n-6 sont plus aléatoires et dépendent de la quantité de ces acides gras initialement présente dans l'alimentation. Les études qui comparent l'enrichissement des phospholipides du plasma en fonction de la forme chimique de ces acides gras (triglycérides ou phospholipides) s'accordent sur une diminution du taux d'acide arachidonique (20:4 n-6) moindre dans le cas d'un apport d'AGPI n-3 sous forme de phospholipides par rapport à une huile de poisson (Alessandri *et al.*, 1998 ; Goustard-Langelier *et al.*, 1999). Comparativement à l'huile de poisson, l'enrichissement en DHA (22:6 n-3) avec les phospholipides alimentaires est plus ou moins important selon les quantités de DHA (22:6 n-3) initiales (Alessandri *et al.*, 1998 ; Goustard-Langelier *et al.*, 1999 ; Amate *et al.*, 2001). Ces résultats peuvent être nuancés par la teneur en acides gras des différentes lipoprotéines. Ainsi, les proportions en acide arachidonique (20:4 n-6) et en DHA (22:6 n-3) sont plus importantes dans les HDL-phospholipides lorsque les acides gras alimentaires sont présentés sous forme phospholipides par rapport à la forme triglycérides. C'est l'inverse en ce qui concerne les LDL-phospholipides (Amate *et al.*, 2001).

On peut noter que la diminution des AGPI n-6 dans la fraction des phospholipides du plasma des rats est nettement moins importante que celle observée dans la fraction des triglycérides. Cette différence suggère un turnover des acides gras plus rapide dans les triglycérides que dans les phospholipides. Ce résultat pourrait provenir d'un devenir différent des 2 classes de lipides, les acides gras des triglycérides étant plutôt orientés vers le métabolisme énergétique des tissus cibles tandis que les acides gras présents dans les

phospholipides interviendraient davantage dans le renouvellement des acides gras membranaires des cellules.

II.2.4. Modification du profil des acides gras des esters de cholestérol du plasma

Le tableau XXIV présente l'évolution du profil des acides gras majoritaires (en concentration massique) des esters de cholestérol des lipides du plasma pour les rats soumis à un régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson et avec des Marinosomes[®], pendant 13 jours. Les résultats complets sont présentés en Annexe 8 (a et b).

Pour les 2 types de régime, pendant 13 jours, on peut noter :

- Une diminution des concentrations des 3 fractions d'acides gras : saturés, mono-insaturés et poly-insaturés (n-3 + n-6) ;
- Une diminution importante des concentrations de l'ensemble des AGPI n-6 ;
- Une forte augmentation de la concentration d'EPA (20:5 n-3) tandis que la concentration de DHA (22:6 n-3) n'est pas modifiée ;
- Une diminution importante du rapport des acides gras n-6/n-3.

La **comparaison** du type de supplémentation du régime sur les profils des concentrations des acides gras des esters de cholestérol plasmatiques met en évidence que la concentration des AGPI n-3 est similaire dans le cadre des 2 régimes tandis que la concentration en AGPI n-6 est 2 fois plus importante dans le cadre du régime supplémenté avec le mélange à base de Marinosomes[®] par rapport au régime à base d'huile de poisson. Cette différence se répercute sur le rapport des acides gras n-6/n-3 pour le groupe de rats supplémentés avec le régime à base de Marinosomes[®] qui se différencie d'un facteur 2 par rapport aux rats supplémentés avec le mélange à base d'huile de poisson.

Nos résultats concernant l'enrichissement des esters de cholestérol en AGPI n-3 suite à un régime contenant de l'huile de poisson sont concordants avec les études reportées dans la littérature chez l'Homme (Subbaiah *et al.*, 1993 ; Vidgren *et al.*, 1998). Chez l'animal, des résultats contradictoires sont reportés avec une incorporation de l'EPA (20:5 n-3) et du DHA (22:6 n-3) dans les esters de cholestérol (Maldonado *et al.*, 2002) ou l'absence d'enrichissement en AGPI n-3, et ce quelle que soit la forme chimique (triglycérides ou phospholipides) des acides gras alimentaires (Amate *et al.*, 2001).

Tableau XXIV : Evolution de la concentration des acides gras majoritaires des esters de cholestérol du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.

Acides gras	Rats		
	Témoin ^a	Régime huile ^β	Régime Marinosomes ^{®γ}
16:0	23,9 ^b	9,1 ± 1,2 ^a	18,5 ± 5,8 ^{ab}
18:0	2,6 ^b	0,7 ± 0,0 ^a	2,0 ± 0,9 ^{ab}
24:0	0,4 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
Σ AGS	30,1 ^b	11,1 ± 1,6 ^a	22,2 ± 6,9 ^{ab}
16:1 n-9	5,7 ^c	0,9 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,0 ^b
16:1 n-7	18,6 ^b	10,0 ± 2,1 ^a	11,5 ± 2,1 ^a
18:1 n-9	31,5 ^b	12,5 ± 0,6 ^a	23,6 ± 5,8 ^b
18:1 n-7	5,5 ^c	2,1 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,8 ^b
Σ AGMI	61,5 ^c	25,5 ± 3,0 ^a	40,1 ± 4,7 ^b
18:2 n-6	21,0 ^c	3,6 ± 0,0 ^a	7,2 ± 1,9 ^b
18:3 n-6	2,4 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
20:4 n-6	122,4 ^c	19,0 ± 0,8 ^a	33,8 ± 7,4 ^b
20:5 n-3	2,3 ^a	23,2 ± 2,9 ^b	15,5 ± 4,2 ^b
22:6 n-3	4,9 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	4,9 ± 1,9 ^a
Σ AGPI	156,6 ^b	49,7 ± 3,5 ^a	62,6 ± 15,7 ^a
Σ AGPI n-6	146,9 ^c	22,9 ± 0,8 ^a	41,4 ± 9,4 ^b
Σ AGPI n-3	7,5 ^a	26,6 ± 2,7 ^b	21,0 ± 6,3 ^b
n-6/n-3	19,6 ^c	0,9 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,1 ^b
Σ AG	248,2 ^b	86,2 ± 8,1 ^a	124,9 ± 27,4 ^a

Seuls les acides gras dont les concentrations rapportées à la concentration totale des acides gras sont supérieures à 0,01 sont présentés. Les résultats complets sont présentés en Annexe 8 (a et b). Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). α : pool de 3 échantillons issus de rats différents avant méthylation. β : moyenne de 2 pools de 3 et 4 échantillons issus de rats différents avant méthylation. γ : moyenne de 2 pools de 2 échantillons issus de rats différents avant méthylation. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

11.3. Conclusion : influence de la forme physico-chimique des lipides alimentaires sur la modification du profil des acides gras du plasma

Nous avons montré que, de manière générale, par rapport au mélange lipidique à base d'huile de poisson, les AGPI n-3 apportés par les Marinosomes[®] conduisent à une diminution moins rapide et, dans certains cas, moins importante du **rapport des acides gras n-6/n-3** des lipides plasmatiques. Ceci révèle l'importance de la forme physico-chimique sous laquelle sont apportés les AGPI n-3 vis-à-vis de leur incorporation dans les lipides plasmatiques.

Des différences significatives d'enrichissement en **AGPI n-3** sont obtenues, pour certaines classes de lipides, entre l'huile de poisson et les Marinosomes[®]. C'est le cas, par exemple, du **DHA (22:6 n-3)** qui présente une meilleure incorporation dans les lipides totaux avec les Marinosomes[®] comparativement au mélange à base d'huile de poisson. Dans la littérature, lorsque les phospholipides sont administrés en l'état, le DHA (22:6 n-3) est incorporé dans les lipides de manière similaire (Amate *et al.*, 2001 ; Mathews *et al.*, 2002) ou à des taux moindres (Song *et al.*, 2000), par rapport à des triglycérides. L'incorporation supérieure pour le DHA (22:6 n-3), lorsqu'il s'agit des Marinosomes[®] est en accord avec une meilleure biodisponibilité digestive de cet AGPI apporté sous forme de liposomes (Cansell *et al.*, 2003), c'est-à-dire lorsque les phospholipides sont organisés dans des membranes.

Pour l'**EPA (20:5 n-3)**, son incorporation dans les lipides totaux est similaire quelle que soit la forme physico-chimique alimentaire. Ce résultat ne va pas dans le sens de la meilleure biodisponibilité lymphatique démontrée pour cet acide gras (Cansell *et al.*, 2003). La position de l'EPA (20:5 n-3) sur le squelette glycérol des triglycérides des chylomicrons plasmatiques pourrait influencer sur son devenir métabolique. Il pourrait être incorporé de manière privilégiée dans certains tissus cibles suite à l'hydrolyse des triglycérides par la lipoprotéine lipase vasculaire ou participer, en tant que précurseur, à la synthèse d'autres molécules.

Cette différence d'incorporation de l'EPA (20:5 n-3) et du DHA (22:6 n-3) en fonction des régimes se répercute sur l'ensemble des classes de lipides et de manière quasiment équivalente pour les 2 régimes (Tableau XXV). Une attention particulière peut être portée sur les esters de cholestérol. Les esters de cholestérol peuvent être synthétisés au niveau du foie par l'acyl-CoA cholestérol acyl transférase (ACAT) à partir du pool d'acides gras libres. Néanmoins, l'essentiel de la synthèse des esters de cholestérol est réalisée par l'activité de la

Tableau XXV : Rapport EPA/DHA dans les lipides totaux et les différentes classes de lipides plasmatiques des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.

Rapport EPA/DHA	Rats	
	Régime huile	Régime Marinosomes®
Régime alimentaire	0,52	0,41
Lipides totaux	1,57	0,64
Triglycérides	0,39	0,17
Phospholipides	0,70	0,41
Esters de cholestérol	7,28	3,16

LCAT qui estérifie, sur le cholestérol plasmatique libre, l'acide gras en position *sn*-2 de la PC et éventuellement de la PE (Liu *et al.*, 1998 ; Jonas, 2000). Ainsi, **quelle que soit la forme physico-chimique de l'apport alimentaire des AGPI n-3**, l'enrichissement en ces acides gras, du foie, d'une part, et des phospholipides plasmatiques, d'autre part, explique l'incorporation des AGPI n-3 au niveau des esters de cholestérol. L'enrichissement des esters de cholestérol en EPA (20:5 n-3) par rapport au DHA (22:6 n-3) (Tableau XXV) peut être expliqué par plusieurs hypothèses : i) la LCAT présente une plus grande spécificité pour l'EPA (20:5 n-3) que pour le DHA (22:6 n-3) (Holub *et al.*, 1987) ; ii) l'EPA (20:5 n-3) serait préférentiellement estérifié en position *sn*-2 des phospholipides ; iii) le DHA (22:6 n-3) en position *sn*-2 modifierait la spécificité de la LCAT qui utiliserait l'acide gras en position *sn*-1. En effet, cet acide gras peut être utilisé pour la synthèse des esters de cholestérol lorsque la position *sn*-2 de la PC est estérifiée par un acide gras à longue chaîne (acides stéarique (16:0), arachidonique (20:4 n-6) ou DHA (22:6 n-3)) (Liu *et al.*, 1998). Il est intéressant de noter le rapport EPA/DHA dans les esters de cholestérol est environ 10 fois plus élevé que celui mesuré dans les phospholipides plasmatiques (0,7 et 0,4 pour le groupe de rats supplémentés avec le mélange à base d'huile de poisson et les Marinosomes[®], respectivement). Ce phénomène est également reporté, pour l'huile de poisson, chez l'Homme (Subbaiah *et al.*, 1993) et chez l'animal pour de courtes durées de régime (Maldonado *et al.*, 2002). Ceci suggère que la forme physico-chimique sous laquelle sont apportés les acides gras alimentaires n'influence pas la composition des esters de cholestérol mais plutôt celle des phospholipides. Cette interprétation est étayée par le fait que, rapportée au rapport EPA/DHA des lipides totaux, la diminution du rapport EPA/DHA dans les phospholipides est moins importante dans le cas de l'utilisation des Marinosomes[®] (36 %) que pour le régime à base d'huile de poisson (55 %).

11.4. Devenir métabolique des acides gras au niveau des globules rouges

Le profil des acides gras totaux des globules rouges de rats témoins, soumis à un régime alipidique, est présenté pour les acides gras majoritaires dans le tableau XXVI et pour la composition complète en Annexe 9. Les acides gras saturés représentent près de la moitié des acides gras totaux des lipides des globules rouges. Parmi ceux-ci, on note la présence de composés sous forme de diméthylacétal correspondant à des plasmalogènes méthylés. Un peu

plus du tiers des acides gras est constitué d'AGPI essentiellement représentés par ceux de la série n-6.

Suite à une supplémentation (jusqu'à 13 jours) du régime alimentaire des rats avec le **mélange lipidique à base d'huile de poisson** (Tableau XXVI pour les acides gras majoritaires, Annexe 9 pour les résultats complets), le taux des **acides gras saturés** reste globalement stable dans le temps malgré quelques fluctuations ponctuelles. Concernant le taux des **acides gras mono-insaturés**, on note deux augmentations aux 2^{ème} et 13^{ème} jours séparées par un état stationnaire. L'acide gras principalement responsable de ces variations dans le temps est l'acide oléique (18:1 n-9). L'impact de la supplémentation du régime sur le taux des **AGPI** est plus complexe et résulte, dès le 2^{ème} jour de la cinétique, d'une part, d'une diminution significative des AGPI n-6 (notamment des acides linoléique (18:2 n-6) et arachidonique (20:4 n-6)) et, d'autre part, d'un enrichissement significatif en AGPI n-3 avec une augmentation des taux de l'EPA (20:5 n-3) et du DHA (22:6 n-3). Ces variations des proportions des AGPI des 2 séries se répercutent sur le **rapport des acides gras n-6/n-3**. Celui-ci décroît d'un facteur proche de 2 dès le 2^{ème} jour de supplémentation du régime pour atteindre la valeur de 2,1 à la fin de la cinétique.

Ainsi, en accord avec d'autres études, un apport en AGPI n-3 sous forme d'huile de poisson conduit à leur incorporation dans les lipides des globules rouges (Vidgren *et al.*, 1997 ; Goustard-Langelier *et al.*, 1999 ; Alessandri *et al.*, 1998 ; Mabile *et al.*, 2001 ; Djemli-Shipkolye *et al.*, 2002 ; Maldonado *et al.*, 2002). Les cinétiques d'incorporation des AGPI n-3 dépendent de l'espèce considérée. Par exemple, l'incorporation maximale de l'EPA (20:5 n-3) et du DHA (22:6 n-3) est obtenue en 4 jours chez la souris (Maldonado *et al.*, 2002) et l'état stationnaire est obtenu après 8 semaines de régime chez l'Homme (Mabile *et al.*, 2001). De plus, des taux d'enrichissement peuvent être différents en fonction de la catégorie de lipides considérée. Ainsi, chez l'Homme, l'incorporation des AGPI n-3 dans la fraction PC des globules rouges est optimale après 4 semaines de régime tandis qu'elle n'est toujours pas stabilisée dans la fraction PE après 8 semaines (Mabile *et al.*, 2001).

L'analyse de l'évolution du profil des acides gras majoritaires (% en poids par rapport aux acides gras totaux) des lipides totaux des globules rouges des rats dont le régime alimentaire a été supplémente avec les **Marinosomes**[®], pendant 13 jours (Tableau XXVII et Annexe 10) indique que le taux des **acides gras saturés** est globalement stable dans le temps. Le taux des **acides gras mono-insaturés** fluctue de manière aléatoire entre 14 et 18 % au

Tableau XXVI : Evolution en fonction du temps des taux des acides gras majoritaires saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides des globules rouges des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson.

Temps (jour)	0 (N = 7)	2 (N = 4)	3 (N = 6)	4 (N = 5)	7 (N = 4)	13 (N = 7)
16:0 DMA	1,6 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,4 ^b	1,7 ± 0,2 ^a	1,9 ± 0,6 ^{ab}	1,8 ± 0,3 ^{ab}	1,8 ± 0,2 ^{ab}
16:0	28,3 ± 1,1 ^a	29,5 ± 1,2 ^{abc}	29,0 ± 1,9 ^{ab}	30,6 ± 1,6 ^{bc}	31,0 ± 1,0 ^c	29,9 ± 0,8 ^{bc}
18:0 DMA	1,1 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,8 ^b	1,2 ± 0,1 ^{ab}	1,5 ± 0,8 ^{ab}	1,2 ± 0,4 ^{ab}	1,1 ± 0,1 ^{ab}
18:0	13,2 ± 0,4 ^{bc}	11,9 ± 0,3 ^a	13,5 ± 0,5 ^c	12,9 ± 0,4 ^b	12,7 ± 0,5 ^b	11,9 ± 0,3 ^a
24:0	2,2 ± 0,2 ^b	2,2 ± 0,1 ^b	2,2 ± 0,4 ^b	2,2 ± 0,3 ^b	2,4 ± 0,3 ^b	1,8 ± 0,3 ^a
Σ AGS	48,9 ± 1,4 ^a	50,5 ± 1,2 ^{abc}	50,2 ± 2,0 ^{ab}	52,1 ± 1,4 ^c	51,9 ± 0,9 ^{bc}	49,1 ± 0,8 ^a
18:1 n-9	6,8 ± 0,5 ^a	7,3 ± 0,4 ^{ab}	7,0 ± 0,5 ^{ab}	8,1 ± 1,0 ^b	7,4 ± 0,5 ^{ab}	10,6 ± 1,6 ^c
18:1 n-7	3,3 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,4 ^a	3,7 ± 0,4 ^b	3,6 ± 0,2 ^{ab}	3,8 ± 0,2 ^b	3,7 ± 0,2 ^b
24:1 n-9	1,2 ± 0,1 ^b	1,5 ± 0,1 ^c	1,4 ± 0,2 ^{bc}	1,4 ± 0,1 ^{bc}	1,4 ± 0,3 ^{bc}	1,0 ± 0,2 ^a
Σ AGMI	13,6 ± 0,6 ^a	15,7 ± 0,6 ^b	14,4 ± 0,9 ^{ab}	15,6 ± 1,2 ^b	15,6 ± 1,2 ^b	18,5 ± 1,6 ^c
18:2 n-6	6,6 ± 0,4 ^c	5,1 ± 0,4 ^b	5,3 ± 0,3 ^b	5,4 ± 0,3 ^b	4,3 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,6 ^a
20:4 n-6	22,7 ± 0,9 ^d	17,7 ± 1,2 ^b	19,9 ± 1,9 ^c	17,5 ± 0,9 ^b	17,3 ± 1,1 ^{ab}	15,8 ± 1,5 ^a
20:5 n-3	0,2 ± 0,0 ^a	1,7 ± 0,1 ^b	1,6 ± 0,3 ^b	1,5 ± 0,2 ^b	2,7 ± 0,2 ^c	3,8 ± 0,4 ^d
22:4 n-6	1,8 ± 0,1 ^d	0,9 ± 0,1 ^b	1,2 ± 0,1 ^c	1,0 ± 0,1 ^b	1,0 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,1 ^a
22:5 n-3	2,0 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,1 ^c	2,3 ± 0,3 ^{bc}	2,0 ± 0,4 ^{ab}	2,2 ± 0,3 ^{abc}	2,3 ± 0,2 ^{bc}
22:6 n-3	2,2 ± 0,2 ^a	4,2 ± 0,4 ^c	3,7 ± 0,5 ^b	3,4 ± 0,3 ^b	3,9 ± 0,3 ^{bc}	4,3 ± 0,3 ^c
Σ AGPI	37,5 ± 1,1 ^c	33,9 ± 1,6 ^{ab}	35,4 ± 2,7 ^b	32,3 ± 1,3 ^a	32,5 ± 1,9 ^a	32,3 ± 1,5 ^a
Σ AGPI n-6	32,8 ± 0,8 ^d	25,2 ± 1,2 ^b	27,6 ± 1,7 ^c	25,1 ± 0,9 ^b	23,6 ± 1,6 ^b	21,7 ± 1,1 ^a
Σ AGPI n-3	4,5 ± 0,3 ^a	8,5 ± 0,4 ^{cd}	7,7 ± 0,9 ^{bc}	7,1 ± 0,7 ^b	8,8 ± 0,4 ^d	10,5 ± 0,6 ^e
n-6/n-3	7,3 ± 0,5 ^d	3,0 ± 0,1 ^b	3,6 ± 0,2 ^c	3,5 ± 0,3 ^c	2,7 ± 0,1 ^b	2,1 ± 0,1 ^a

Seuls les acides gras dont les taux sont supérieurs à 1 % sont présentés. Les résultats complets sont présentés en Annexe 9. Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. DMA : diméthylacétal.

cours de la cinétique. Le taux des **AGPI n-6** diminue dans le temps. La disparition de l'acide linoléique (18:2 n-6) est environ 2 fois moins importante que celle de l'acide arachidonique (20:4 n-6). En contrepartie, on note une augmentation du taux des AGPI n-3 qui provient d'une augmentation progressive des taux de l'EPA (20:5 n-3) et de DHA (22:6 n-3). Ces variations des AGPI se répercutent sur le **rapport des acides gras n-6/n-3** qui atteint une valeur proche de 3 après 2 semaines de régime.

Nos résultats sont en accord avec des études chez le porc (Alessandri *et al.*, 1998 ; Goustard-Langelier *et al.*, 1999) montrant un enrichissement en DHA (22:6 n-3) des globules rouges par un apport d'AGPI n-3 sous la forme de phospholipides extraits d'œufs enrichis en DHA (22:6 n-3) (Alessandri *et al.*, 1998 ; Goustard-Langelier *et al.*, 1999) et de cerveau de porc (Goustard-Langelier *et al.*, 1999).

La **comparaison** de l'impact d'une supplémentation du régime avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson ou des Marinosomes[®] sur les profils des acides gras des globules rouges (Fig. 28A-D) met en évidence que :

- Sur l'ensemble de la cinétique, la diminution des taux des **AGPI n-6** est moins brutale avec les Marinosomes[®]. Ce résultat provient d'une disparition plus lente de l'acide linoléique (18:2 n-6) et du maintien du taux d'acide arachidonique (20:4 n-6) à des valeurs plus élevées avec les Marinosomes[®] ;
- La cinétique d'incorporation des **AGPI n-3** est plus lente avec le régime à base de Marinosomes[®]. Ce résultat provient de l'évolution du taux de l'EPA (20:5 n-3) qui reste toujours inférieur à celui mesuré avec le mélange à base d'huile de poisson et de l'augmentation moins rapide du taux de DHA (22:6 n-3) sur les 4 premiers jours de la cinétique. La présence plus importante d'acide arachidonique (20:4 n-6) dans le groupe des rats alimentés avec le régime à base de Marinosomes[®] pourrait empêcher l'incorporation de l'EPA (20:5 n-3) dans les globules rouges comme cela a été démontré pour un apport simultané d'AGPI n-3 et n-6 dans l'alimentation (Djemli-Shipkoyle *et al.*, 2002) ;
- La conséquence des profils d'évolution des AGPI est une diminution du **rapport des acides gras n-6/n-3** moins brutale et moins importante avec le régime à base de Marinosomes[®].

Tableau XXVII : Evolution en fonction du temps des taux des acides gras majoritaires saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides des globules rouges des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec les Marinosomes®.

Temps (jour)	0 (N = 7)	2 (N = 6)	3 (N = 5)	4 (N = 4)	7 (N = 4)	13 (N = 4)
16:0 DMA	1,6 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,4 ^c	1,6 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	1,8 ± 0,3 ^{ab}	2,0 ± 0,1 ^{bc}
16:0	28,3 ± 1,1 ^a	29,6 ± 0,9 ^a	30,7 ± 1,7 ^b	30,6 ± 0,3 ^b	29,6 ± 1,2 ^{ab}	30,5 ± 1,1 ^b
18:0 DMA	1,1 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,7 ^b	1,1 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,7 ^a	1,2 ± 0,1 ^a
18:0	13,2 ± 0,4 ^c	13,1 ± 1,3 ^{bc}	13,2 ± 0,5 ^c	13,9 ± 1,0 ^c	12,1 ± 0,3 ^b	10,9 ± 0,8 ^{a*}
24:0	2,2 ± 0,2 ^{bc}	2,1 ± 0,2 ^{ab}	2,4 ± 0,3 ^c	2,3 ± 0,1 ^{bc}	2,3 ± 0,3 ^{bc}	1,8 ± 0,2 ^a
Σ AGS	48,9 ± 1,4 ^a	51,6 ± 0,5 ^{abc}	51,3 ± 2,0 ^{bc}	52,1 ± 1,0 ^c	49,7 ± 0,7 ^{ab*}	50,3 ± 1,3 ^{abc}
18:1 n-9	6,8 ± 0,5 ^a	6,7 ± 0,7 ^a	6,6 ± 0,4 ^a	6,9 ± 0,6 ^a	7,4 ± 0,8 ^a	9,4 ± 1,5 ^b
18:1 n-7	3,3 ± 0,3 ^a	3,8 ± 0,4 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	4,1 ± 0,3 ^{b*}	3,4 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,3 ^a
24:1 n-9	1,2 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,2 ^b	1,4 ± 0,2 ^{ab}	1,6 ± 0,1 ^{b*}	1,3 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,1 ^{a*}
Σ AGMI	13,6 ± 0,6 ^a	15,4 ± 0,4 ^b	13,7 ± 0,4 ^a	15,5 ± 0,7 ^b	14,8 ± 1,0 ^{ab}	17,8 ± 2,1 ^c
18:2 n-6	6,6 ± 0,4 ^d	5,2 ± 1,0 ^{cd}	6,1 ± 0,4 ^{cd*}	5,2 ± 0,2 ^{bc}	4,8 ± 0,5 ^{ab}	3,6 ± 0,4 ^{a*}
20:4 n-6	22,7 ± 0,9 ^c	19,4 ± 1,1 ^{b*}	20,3 ± 1,0 ^b	19,5 ± 0,7 ^{b*}	20,5 ± 0,8 ^{b*}	17,7 ± 2,0 ^a
20:5 n-3	0,2 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,1 ^{b*}	0,5 ± 0,1 ^{b*}	0,7 ± 0,1 ^{b*}	1,3 ± 0,2 ^{c*}	2,0 ± 0,3 ^{d*}
22:4 n-6	1,8 ± 0,1 ^e	1,4 ± 0,1 ^{cd*}	1,6 ± 0,2 ^{de*}	1,2 ± 0,1 ^{b*}	1,4 ± 0,1 ^{bc*}	0,9 ± 0,1 ^{a*}
22:5 n-3	2,0 ± 0,2 ^c	1,5 ± 0,2 ^{ab*}	1,9 ± 0,1 ^{bc*}	1,4 ± 0,1 ^{a*}	2,0 ± 0,1 ^c	1,8 ± 0,3 ^{bc*}
22:6 n-3	2,2 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,4 ^{b*}	2,8 ± 0,3 ^{b*}	3,0 ± 0,3 ^b	4,0 ± 0,2 ^c	4,4 ± 0,9 ^c
Σ AGPI	37,5 ± 1,1 ^d	33,0 ± 0,7 ^{abc}	35,0 ± 1,7 ^{bc}	32,4 ± 1,2 ^{ab}	35,6 ± 1,4 ^{cd*}	31,9 ± 3,3 ^a
Σ AGPI n-6	32,8 ± 0,8 ^d	27,4 ± 0,3 ^{bc*}	29,6 ± 1,3 ^c	27,1 ± 0,8 ^{b*}	27,7 ± 1,1 ^{bc*}	23,3 ± 2,1 ^a
Σ AGPI n-3	4,5 ± 0,3 ^a	5,5 ± 0,5 ^{b*}	5,3 ± 0,5 ^{b*}	5,2 ± 0,4 ^{ab*}	7,4 ± 0,4 ^{c*}	8,4 ± 1,4 ^{d*}
n-6/n-3	7,3 ± 0,5 ^{d*}	5,0 ± 0,4 ^{c*}	5,6 ± 0,4 ^{c*}	5,2 ± 0,3 ^{c*}	3,7 ± 0,1 ^{b*}	2,8 ± 0,3 ^{a*}

Seuls les acides gras dont les taux sont supérieurs à 1 % sont présentés. Les résultats complets sont présentés en Annexe 10. Les valeurs des taux des acides gras affectées d'une étoile sont significativement différentes de celles du groupe de rats dont le régime est supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ($\alpha = 5\%$). Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. DMA : diméthylacétal.

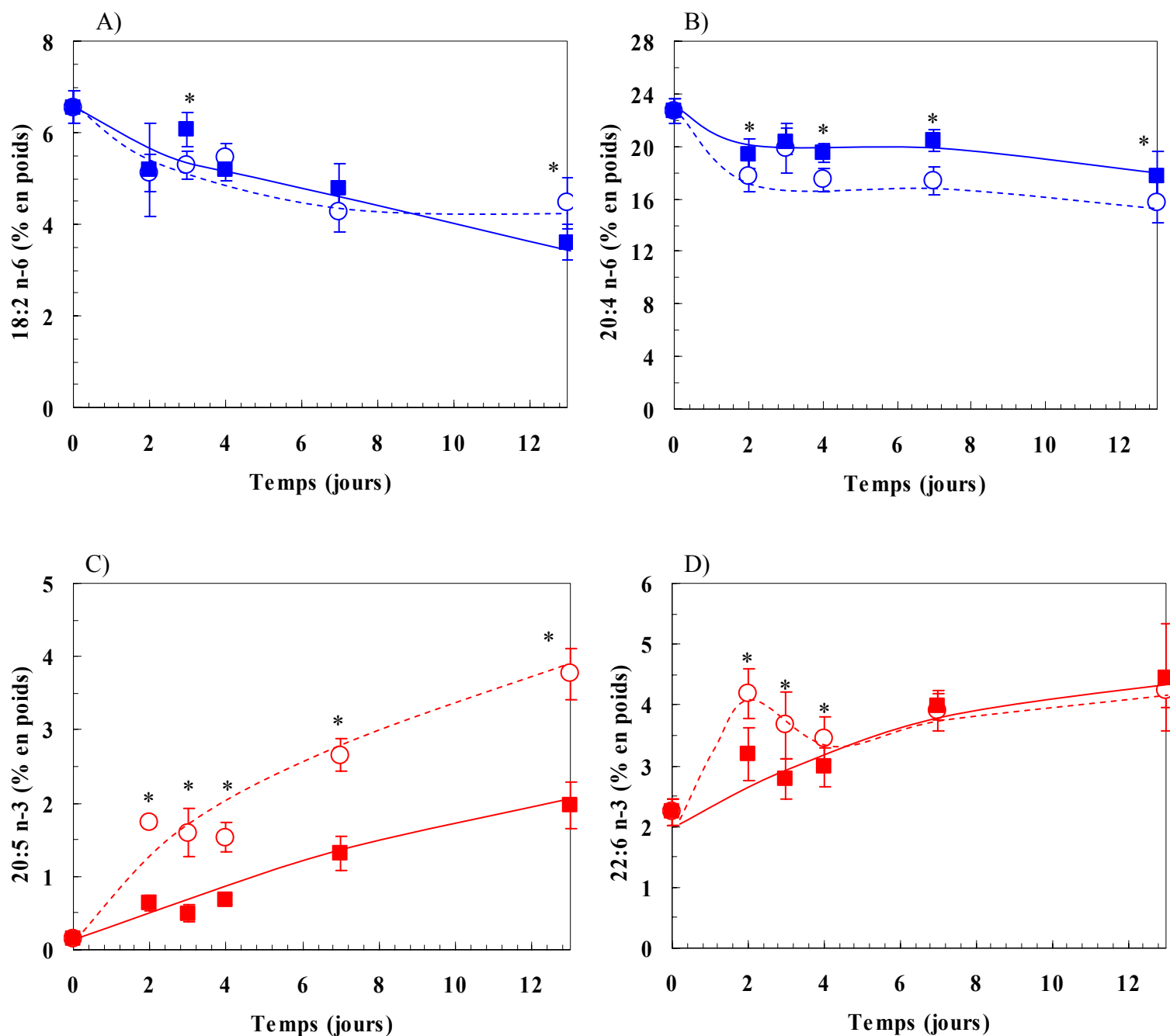


Figure 28 : Evolution des taux des AGPI n-6 et n-3 (% en poids par rapport aux acides gras totaux) dans les lipides totaux des globules rouges des rats en fonction de la durée du régime supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson (O) ou avec les Marinosomes® (■). A : acide linoléique (18:2 n-6) ; B : acide arachidonique (20:4 n-6) ; C : EPA (20:5 n-3) ; D : DHA (22:6 n-3).

Les valeurs affectées d'une étoile, à un temps donné, sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).

Il est intéressant de noter que les cinétiques d'incorporation des AGPI n-3 dans les lipides totaux du plasma et dans les lipides des globules rouges ont des profils superposables. En revanche, les globules rouges résistent davantage à l'appauvrissement en AGPI n-6 du régime. L'incorporation des AGPI n-3 dans les lipides constitutifs des globules rouges a 2 origines possibles (Lund *et al.*, 1999 ; Mabile *et al.*, 2001) : i) les phospholipides enrichis en AGPI n-3 du plasma peuvent être incorporés dans les membranes des globules rouges matures par des phénomènes de transfert entre les globules rouges et les lipoprotéines ; ii) les AGPI n-3 peuvent entrer dans la synthèse des phospholipides participant à l'élaboration de la membrane des globules rouges au cours de l'érythropoïèse. Si seul ce mécanisme était mis en jeu, il faudrait attendre le renouvellement d'une majorité des globules rouges préexistants pour mesurer un impact de la supplémentation des régimes sur le profil des acides gras. L'importance respective de ces deux processus reste à ce jour inconnue. Néanmoins, la corrélation trouvée entre les taux d'EPA (20:5 n-3) des lipides totaux du plasma et des lipides des globules rouges (Fig. 29) suggère que l'impact du renouvellement des érythrocytes serait négligeable devant les échanges au niveau du plasma. Cependant, la faible corrélation des taux de DHA (22:6 n-3) des lipides totaux du plasma et des lipides des globules rouges (Fig. 30) suggère que d'autres mécanismes, en plus des échanges lipidiques avec les globules rouges au niveau du plasma, peuvent influencer les valeurs des taux des AGPI mesurés pour les érythrocytes.

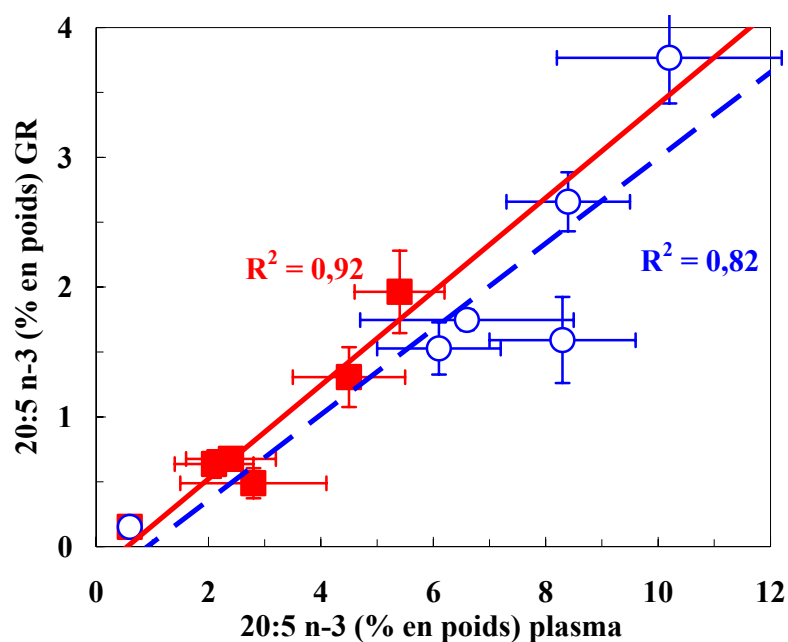


Figure 29: Corrélation entre les taux d'EPA (20:5 n-3) (% en poids par rapport aux acides gras totaux) des lipides totaux du plasma et des globules rouges (GR) pour les rats soumis au régime supplémenté avec les Marinosomes® (■) et pour les rats soumis au régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson (○).

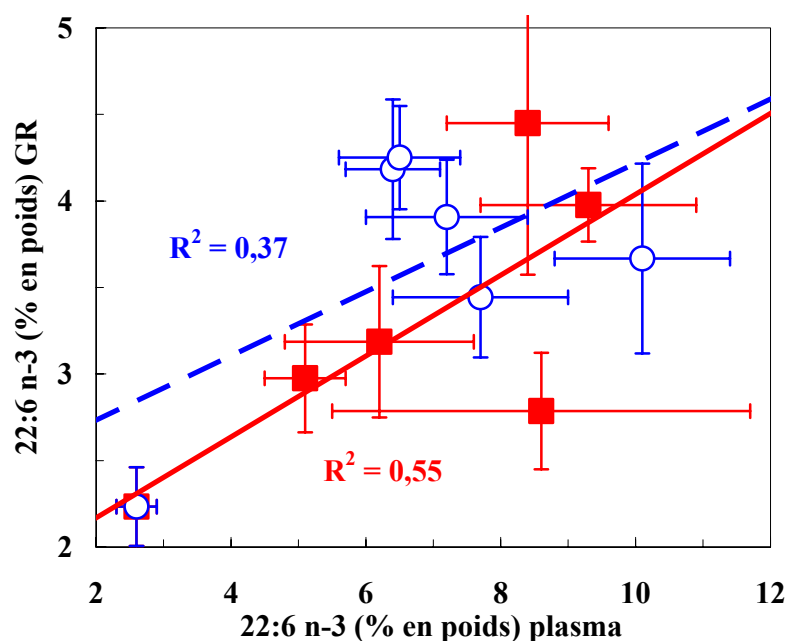


Figure 30: Corrélation entre les taux de DHA (22:6 n-3) (% en poids par rapport aux acides gras totaux) des lipides totaux du plasma et des globules rouges (GR) pour les rats soumis au régime supplémenté avec les Marinosomes® (■) et pour les rats soumis au régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson (○).

III. Etude de la réversibilité des effets des AGPI n-3, in vivo, chez le rat

L'objectif de cette étude est d'évaluer dans quelle mesure les effets bénéfiques de la supplémentation des régimes avec les AGPI n-3, au niveau des lipides totaux du plasma et notamment des acides gras, perdurent après l'arrêt de l'apport des lipides alimentaires.

III.1. Réversibilité du profil des différentes fractions lipidiques du plasma

Le tableau XXVIII présente la modification des concentrations plasmatiques des triglycérides, du cholestérol total et des phospholipides des rats qui, après avoir été soumis pendant 13 jours au régime à base d'huile de poisson ou de Marinosomes[®], reçoivent pendant 4 ou 7 jours un régime alipidique.

Après 4 jours, les concentrations des **triglycérides** et du **cholestérol** ne sont pas significativement différentes de celles mesurées avant supplémentation avec le mélange de lipides à base d'huile de poisson. On observe donc, 4 jours après suppression de l'apport d'huile de poisson, une réversibilité des effets dus à l'huile de poisson. Mais quand le régime alipidique est prolongé jusqu'à 7 jours, le taux plasmatique de triglycérides retrouve la même valeur qu'après le régime à base d'huile de poisson, alors que le taux de cholestérol continue d'augmenter pour devenir supérieur à celui observé avant le régime huile de poisson. Pour le groupe de rats dont le régime a été supplémenté avec les Marinosomes[®], 7 jours de régime alipidique sont nécessaires pour retrouver un taux plasmatique de triglycérides qui ne soit pas statistiquement différent de celui avant l'apport des Marinosomes[®], ce qui n'est pas le cas pour le cholestérol, même après 7 jours de régime alipidique. S'agissant des **phospholipides** plasmatiques, leurs taux ne sont pas statistiquement différents au terme du régime alipidique, chez les 2 groupes de rats (huile de poisson et Marinosomes) et, de plus, ces taux sont supérieurs à ceux observés après l'apport en AGPI n-3 (huile de poisson ou Marinosomes[®]).

A notre connaissance, une seule étude traite de la réversibilité des teneurs en lipides plasmatiques (Maldonado *et al.*, 2002). Elle montre que le retour à l'état stationnaire s'observe d'abord pour les triglycérides, puis pour le cholestérol et enfin pour les phospholipides. Pour les 3 fractions lipidiques, l'effet de la supplémentation du régime en

Tableau XXVIII : Concentrations plasmatiques des triglycérides, du cholestérol total et des phospholipides (mg.dL⁻¹) avant (temps 0) ou après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes[®] suivis de 4 (temps 17) ou 7 jours (temps 20) de régime alipidique.

Temps (jour)	0	13	17	20
Régime huile				
Triglycérides (mg.dL ⁻¹)	112,4 ± 26,8 ^b (N = 7)	53,7 ± 9,7 ^a (N = 8)	117,8 ± 16,1 ^b (N = 5)	52,9 ± 11,4 ^a (N = 7)
Cholestérol total (mg.dL ⁻¹)	71,3 ± 10,6 ^{ab} (N = 7)	60,0 ± 7,0 ^a (N = 8)	74,1 ± 12,9 ^b (N = 5)	88,5 ± 11,6 ^c (N = 7)
Phospholipides (mg.dL ⁻¹)	79,3 ± 9,7 ^b (N = 7)	47,6 ± 5,9 ^a (N = 8)	-	103,4 ± 13,9 ^c (N = 4)
Régime Marinosomes[®]				
Triglycérides (mg.dL ⁻¹)	112,4 ± 26,8 ^b (N = 8)	50,1 ± 17,7 ^a (N = 7)	58,7 ± 13,9 ^{a*} (N = 8)	92,3 ± 17,0 ^{b*} (N = 8)
Cholestérol total (mg.dL ⁻¹)	71,3 ± 10,6 ^c (N = 8)	73,9 ± 13,4 ^c (N = 7)	43,6 ± 5,5 ^{a*} (N = 8)	61,2 ± 5,9 ^{b*} (N = 8)
Phospholipides (mg.dL ⁻¹)	79,3 ± 9,7 ^a (N = 7)	79,2 ± 10,3 ^a (N = 7)	-	112,2 ± 19,0 ^b (N = 4)

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). Les valeurs des concentrations des fractions lipidiques du plasma du groupe de rats dont le régime est supplémenté avec les Marinosomes[®] affectées d'une étoile sont significativement différentes de celles du groupe de rats dont le régime est supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats.

AGPI n-3 est totalement réduit après 7 jours. En ce qui concerne nos propres résultats, les fluctuations observées dans la réversibilité entre 4 et 7 jours de régime alipidique seront discutés ultérieurement en tenant compte de la rémanence, ou non, des AGPI n-3 dans les lipides plasmatiques après le régime alipidique.

III.2. Réversibilité du profil des acides gras du plasma

Le tableau XXIX présente l'évolution des taux des acides gras majoritaires des **lipides totaux du plasma** suite à l'arrêt pendant 7 jours de la supplémentation des régimes avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes[®]. Les résultats complets sont présentés en Annexe 11. L'arrêt de la supplémentation des régimes en AGPI n-3 conduit, dans les 2 cas, à une augmentation des taux des acides gras mono-insaturés et une diminution des taux des AGPI n-3.

Nous avons montré que l'analyse des résultats des acides gras des lipides totaux du plasma était peu pertinente dans notre cas, du fait des concentrations différentes des fractions lipidiques plasmatiques (triglycérides, esters de cholestérol et phospholipides) pour les 2 types de régime. C'est pourquoi, les profils en concentration des acides gras des triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol du plasma sont déterminés.

Le tableau XXX présente l'évolution des concentrations des acides gras majoritaires des **triglycérides du plasma** suite à l'arrêt pendant 7 jours de la supplémentation des régimes avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes[®]. Les résultats complets sont reportés en Annexe 12. Après substitution du régime alipidique au mélange à base d'huile de poisson, toutes les catégories d'acides gras diminuent de manière importante (67 % et plus), notamment les AGPI n-3 qui enregistrent une diminution de 95 % due à la disparition en égale proportion de l'EPA (20:5 n-3) et du DHA (22:6 n-3). Dans le cas de l'arrêt de la supplémentation du régime avec les Marinosomes[®], il n'y a pas de variation significative des teneurs en acides gras saturés et mono-insaturés. La teneur en AGPI n-3 diminue de 62 % et concerne à la fois l'EPA (20:5 n-3) (75 % de diminution) et le DHA (22:6 n-3) (62 % de diminution). L'apport d'AGPI n-3 sous forme de Marinosomes[®] pourrait conduire à une distribution moléculaire des acides gras particulière et/ou un stockage de ces acides gras dans un tissu particulier qui les libèrerait après l'arrêt de la supplémentation. Il ne s'agit toutefois

Tableau XXIX: Evolution des taux des acides gras majoritaires des lipides totaux du plasma (% en poids des acides gras totaux) des rats avant (temps 0) ou après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes[®] suivis de 7 jours (temps 20) de régime alipidique.

Temps (jour)	Régime huile			Régime Marinosomes [®]	
	0 (N = 7)	13 (N = 7)	20 (N = 5)	13 (N = 6)	20 (N = 5)
16:0	21,7 ± 0,5 ^a	22,3 ± 1,2 ^a	23,3 ± 2,5 ^{ab}	24,7 ± 0,9 ^b	23,3 ± 2,8 ^{ab}
18:0	7,0 ± 0,4 ^a	8,5 ± 0,5 ^b	10,0 ± 1,2 ^c	7,6 ± 0,5 ^a	10,4 ± 0,6 ^c
Σ AGS	31,1 ± 0,9^a	33,5 ± 1,5^b	35,9 ± 1,5^c	34,6 ± 0,8^{bc}	36,0 ± 2,3^c
16:1 n-9	1,1 ± 0,3 ^b	0,7 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,3 ^b
16:1 n-7	4,9 ± 1,1 ^a	6,6 ± 0,9 ^{bc}	7,9 ± 1,3 ^c	5,8 ± 1,1 ^{ab}	7,5 ± 1,2 ^c
18:1 n-9	18,2 ± 1,6 ^a	20,9 ± 3,6 ^a	24,2 ± 2,4 ^b	19,2 ± 1,8 ^a	27,2 ± 1,7 ^b
18:1 n-7	4,1 ± 0,8 ^{ab}	3,8 ± 0,3 ^a	4,9 ± 0,8 ^b	3,3 ± 0,4 ^a	5,1 ± 1,2 ^b
24:1 n-9	0,5 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,3 ^b	0,5 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,3 ^b
Σ AGMI	29,5 ± 3,4^a	33,3 ± 2,8^b	40,2 ± 3,0^c	30,8 ± 2,6^{ab}	43,0 ± 2,2^c
18:2 n-6	15,0 ± 1,7^b	4,6 ± 1,0^a	5,3 ± 1,0^a	6,0 ± 1,4^a	4,6 ± 1,1^a
20:3 n-9	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	1,2 ± 0,4 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	2,4 ± 0,8 ^c
20:4 n-6	17,5 ± 1,5^d	9,5 ± 1,7^b	8,5 ± 1,8^{ab}	12,7 ± 1,8^c	7,2 ± 1,0^a
20:5 n-3	0,6 ± 0,1^a	10,2 ± 2,0^d	2,8 ± 0,7^b	5,4 ± 0,8^c	1,3 ± 0,4^a
22:5 n-3	0,5 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,2 ^c	0,5 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,3 ^a
22:6 n-3	2,6 ± 0,3^a	6,5 ± 0,9^c	4,0 ± 0,9^b	8,4 ± 1,2^d	3,8 ± 1,2^{ab}
Σ AGPI	39,4 ± 3,0^c	33,2 ± 3,1^b	23,8 ± 3,8^a	34,7 ± 2,6^b	21,0 ± 3,3^a
Σ AGPI n-6	34,7 ± 2,8^c	14,8 ± 1,4^a	15,2 ± 2,0^a	19,5 ± 2,6^b	13,1 ± 1,7^a
Σ AGPI n-3	4,5 ± 0,6^a	18,2 ± 2,4^d	7,4 ± 1,7^b	15,0 ± 1,9^c	5,5 ± 1,9^{ab}
n-6/n-3	7,8 ± 1,0^c	0,8 ± 0,1^a	2,1 ± 0,3	1,3 ± 0,3^{ab}	2,5 ± 0,6^b

Seuls les acides gras dont les taux sont supérieurs à 1 % sont présentés. Les résultats complets sont présentés en Annexe 11. Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Tableau XXX : Evolution des concentrations des acides gras majoritaires des triglycérides du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats avant (temps 0) ou après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes[®] suivis de 7 jours (temps 20) de régime alipidique.

Temps (jour)	Régime huile			Régime Marinosomes [®]	
	0	13	20	13	20
14:0	3,8 ± 0,3 ^c	2,6 ± 0,3 ^b	0,8 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,1 ^c	2,5 ± 0,7 ^b
16:0	96,4 ± 6,2 ^c	55,0 ± 1,8 ^b	16,0 ± 2,6 ^a	67,2 ± 11,2 ^b	60,0 ± 7,3 ^b
18:0	8,1 ± 2,3 ^c	6,3 ± 0,6 ^{bc}	1,6 ± 0,3 ^a	6,7 ± 1,8 ^{bc}	5,2 ± 0,8 ^b
Σ AGS	111,4 ± 9,5^c	68,1 ± 3,0^b	19,2 ± 3,4^a	82,3 ± 14,2^b	69,4 ± 8,8^b
16:1 n-9	4,7 ± 0,9 ^c	1,8 ± 0,3 ^{ab}	0,8 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,3 ^b	2,4 ± 1,0 ^b
16:1 n-7	26,1 ± 8,4 ^b	18,3 ± 1,6 ^b	4,7 ± 1,3 ^a	21,6 ± 5,0 ^b	17,7 ± 7,3 ^b
18:1 n-9	118,6 ± 4,9 ^c	67,0 ± 6,3 ^b	23,4 ± 2,9 ^a	76,3 ± 21,5 ^b	84,8 ± 14,1 ^b
18:1 n-7	21,2 ± 5,6 ^c	11,2 ± 0,8 ^{ab}	3,5 ± 1,0 ^a	14,7 ± 4,4 ^{bc}	14,4 ± 6,8 ^{bc}
Σ AGMI	174,2 ± 8,4^c	101,5 ± 4,8^b	33,3 ± 5,8^a	121,2 ± 33,2^b	122,1 ± 29,0^b
18:2 n-6	88,3 ± 3,3^c	3,9 ± 3,5^a	0,1 ± 0,0^a	8,7 ± 1,0^b	0,1 ± 0,1^a
18:3 n-3	3,9 ± 0,5 ^c	0,9 ± 0,4 ^b	0,3 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,0 ^{ab}	0,5 ± 0,1 ^{ab}
20:4 n-6	6,5 ± 0,9^d	1,2 ± 0,3^b	0,1 ± 0,1^a	2,4 ± 0,4^c	0,5 ± 0,3^{ab}
20:5 n-3	1,0 ± 0,1^a	4,5 ± 0,8^c	0,1 ± 0,1^a	3,3 ± 0,4^b	0,8 ± 0,7^a
22:5 n-3	1,2 ± 0,0 ^{ab}	3,3 ± 0,7 ^c	0,2 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,5 ^{bc}	1,1 ± 1,1 ^{ab}
22:6 n-3	3,1 ± 0,5^{ab}	11,7 ± 2,9^c	0,6 ± 0,2^a	19,2 ± 2,7^d	7,2 ± 2,3^b
Σ AGPI	112,2 ± 0,8^e	29,3 ± 6,3^c	3,2 ± 0,6^a	38,0 ± 0,0^d	13,4 ± 2,3^b
Σ AGPI n-6	101,9 ± 1,1^c	8,7 ± 3,6^b	1,6 ± 0,7^a	12,6 ± 3,1^b	2,9 ± 0,1^a
Σ AGPI n-3	9,3 ± 0,1^b	20,3 ± 4,0^c	1,1 ± 0,4^a	25,1 ± 3,6^c	9,6 ± 2,4^b
n-6/n-3	11,0 ± 0,2^c	0,4 ± 0,2^a	1,6 ± 0,9^b	0,5 ± 0,2^a	0,3 ± 0,1^a
Σ AG	397,7 ± 0,4^c	198,8 ± 2,0^b	55,7 ± 9,7^a	241,6 ± 47,4^b	204,9 ± 34,8^b

Seuls les acides gras dont les concentrations rapportées à la concentration totale des acides gras sont supérieures à 1 % sont présentés. Les résultats complets sont présentés en Annexe 12. Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). Nombre de rats = 3. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

pas du tissu adipeux car les analyses réalisées sur ce tissu n'indiquent pas d'enrichissement en AGPI n-3 pour les 2 groupes de rats (Annexe 3). Par contre, le foie pourrait intervenir dans la mesure où, d'une part, cet organe joue un rôle majeur dans le métabolisme des lipides, et d'autre part, les acides gras des lipides totaux du foie mettent en évidence un enrichissement en AGPI n-3 très net mais similaire pour les 2 groupes de rats (Annexe 4).

Le tableaux XXXI présente l'évolution des concentrations des acides gras majoritaires des **phospholipides du plasma** suite à l'arrêt pendant 7 jours de la supplémentation des régimes avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes[®]. Les résultats complets sont reportés en Annexe 13. L'arrêt de la supplémentation des régimes avec les AGPI n-3 conduit pour les 2 groupes de rats à une augmentation de toutes les catégories des acides gras (saturés, mono-insaturés et poly-insaturés). Proportionnellement aux concentrations après 13 jours de supplémentation en AGPI n-3, les diminutions des teneurs en EPA (20:5 n-3) et DHA (22:6 n-3) sont moins importantes dans le cas du régime avec le mélange à base d'huile de poisson (respectivement, 46 et 0 %) par rapport au régime avec les Marinosomes[®] (respectivement, 63 et 15 %). Néanmoins, dans les deux cas, le DHA (22:6 n-3) est mieux conservé dans les phospholipides plasmatiques que l'EPA (20:5 n-3). Concernant les AGPI n-6, on note une augmentation significative de la concentration de l'acide linoléique (18:2 n-6), qui rejoint la valeur des rats témoins, tandis que la concentration de l'acide arachidonique (20:4 n-6) n'est pas significativement modifiée suite à l'arrêt de la supplémentation en AGPI n-3 des 2 régimes. Ces résultats suggèrent une mobilisation de l'acide linoléique (18:2 n-6) à partir du tissu adipeux par exemple, une fraction de la quantité mobilisée de cet acide gras pourrait servir à maintenir le niveau d'acide arachidonique (20:4 n-6) dans les phospholipides.

Le tableau XXXII présente l'évolution des concentrations des acides gras majoritaires des **esters de cholestérol du plasma** suite à l'arrêt pendant 7 jours de la supplémentation des régimes avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes[®]. Les résultats complets sont reportés en Annexe 14. L'arrêt de la supplémentation en AGPI n-3 de l'huile de poisson conduit à une augmentation de la concentration des acides gras saturés, alors que cette concentration reste stable après la substitution des Marinosomes[®] par le régime alipidique. Dans les 2 cas, on observe une augmentation des acides gras mono-insaturés. On note également une diminution très nette de l'EPA (20:5 n-3), par rapport à la concentration

Tableau XXXI : Evolution des concentrations des acides gras majoritaires des phospholipides du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats avant (temps 0) ou après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes[®] suivis de 7 jours (temps 20) de régime alipidique.

Temps (jour)	Régime huile			Régime Marinosomes [®]	
	0	13	20	13	20
16:0	103,6 ± 15,7 ^{ab}	75,8 ± 5,6 ^a	120,3 ± 23,5 ^{bc}	111,5 ± 23,3 ^{bc}	137,5 ± 17,6 ^c
18:0	77,8 ± 14,9 ^a	54,9 ± 5,7 ^a	112,1 ± 27,9 ^b	67,9 ± 3,9 ^a	153,4 ± 19,6 ^b
24:0	7,2 ± 1,2 ^b	4,8 ± 0,4 ^a	7,4 ± 1,2 ^b	6,3 ± 0,8 ^{ab}	7,9 ± 0,7 ^b
Σ AGS	200,4 ± 32,3^b	142,6 ± 10,1^a	250,7 ± 52,1^b	195,3 ± 29,0^{ab}	313,2 ± 14,3^c
16:1 n-7	5,6 ± 1,9 ^a	6,2 ± 0,3 ^a	12,6 ± 4,8 ^{bc}	9,1 ± 2,6 ^{ab}	15,4 ± 3,3 ^c
18:1 n-9	39,4 ± 9,5 ^{ab}	29,5 ± 1,5 ^a	78,7 ± 17,5 ^c	53,2 ± 11,6 ^b	91,5 ± 13,3 ^c
18:1 n-7	17,2 ± 4,8 ^{ab}	10,8 ± 0,9 ^a	23,9 ± 6,7 ^{bc}	13,0 ± 1,9 ^a	31,8 ± 8,5 ^c
24:1 n-9	9,5 ± 2,2 ^b	5,0 ± 0,7 ^a	10,2 ± 3,1 ^{bc}	8,4 ± 1,4 ^{ab}	13,9 ± 2,2 ^c
Σ AGMI	76,4 ± 16,9^a	55,4 ± 1,7^a	132,6 ± 33,7^b	90,2 ± 16,6^a	162,0 ± 25,5^b
18:2 n-6	34,9 ± 3,6^c	12,3 ± 3,5^a	31,8 ± 2,3^c	23,0 ± 2,3^b	36,8 ± 7,3^c
20:3 n-9	4,1 ± 2,0 ^{ab}	0,5 ± 0,3 ^a	9,6 ± 4,4 ^b	1,5 ± 0,2 ^{ab}	22,0 ± 8,8 ^c
20:3 n-6	6,5 ± 1,2 ^b	2,9 ± 0,4 ^a	7,3 ± 0,7 ^b	4,1 ± 0,3 ^a	7,8 ± 1,0 ^b
20:4 n-6	64,5 ± 15,3^c	28,3 ± 2,6^a	41,7 ± 8,9^{ab}	49,8 ± 0,2^{bc}	49,4 ± 10,3^{bc}
20:5 n-3	1,1 ± 0,5^a	20,3 ± 3,2^d	10,9 ± 3,4^c	16,5 ± 2,0^d	6,1 ± 0,9^b
22:5 n-6	4,5 ± 1,5 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a
22:5 n-3	2,1 ± 0,2 ^a	6,0 ± 1,6 ^d	3,7 ± 0,3 ^{bc}	4,6 ± 0,1 ^c	2,5 ± 0,5 ^{ab}
22:6 n-3	19,2 ± 4,3^a	29,2 ± 5,6^b	29,5 ± 6,4^b	40,0 ± 2,0^c	34,1 ± 6,2^{bc}
Σ AGPI	142,8 ± 28,5^b	101,7 ± 11,9^a	137,7 ± 24,7^b	143,1 ± 2,7^b	163,9 ± 18,0^b
Σ n-6	116,1 ± 22,3^c	45,1 ± 6,4^a	83,4 ± 11,7^b	80,1 ± 2,6^b	98,1 ± 16,7^{bc}
Σ n-3	22,7 ± 4,8^a	56,1 ± 9,8^{bc}	44,6 ± 10,1^b	61,6 ± 0,0^c	43,8 ± 7,7^b
n-6/n-3	5,1 ± 0,1^e	0,8 ± 0,2^a	1,9 ± 0,3^c	1,3 ± 0,0^b	2,2 ± 0,2^d
Σ AG	419,7 ± 76,7^b	299,7 ± 23,0^a	521,0 ± 105,4^b	428,6 ± 44,6^b	639,2 ± 3,2^c

Seuls les acides gras dont les concentrations rapportées à la concentration totale des acides gras sont supérieures à 1 % sont présentés. Les résultats complets sont présentés en Annexe 13. Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). Nombre de rats = 3. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Tableau XXXII : Evolution des concentrations des acides gras majoritaires des esters de cholestérol du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats avant (temps 0) ou après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes[®] suivis de 7 jours (temps 20) de régime alipidique.

Temps (jour)	Régime huile			Régime Marinosomes [®]	
	0 ^a	13 ^β	20 ^γ	13 ^γ	20 ^γ
16:0	23,9 ^c	9,1 ± 1,2 ^a	17,0 ± 1,0 ^{bc}	18,5 ± 5,8 ^{bc}	15,6 ± 0,7 ^{ab}
18:0	2,6 ^b	0,7 ± 0,0 ^a	2,0 ± 0,2 ^b	2,0 ± 0,9 ^b	2,0 ± 0,0 ^b
Σ AGS	30,1 ^b	11,1 ± 1,6 ^a	25,1 ± 2,3 ^b	22,2 ± 6,9 ^b	23,6 ± 2,5 ^b
16:1 n-9	5,7 ^b	0,9 ± 0,1 ^a	5,8 ± 0,5 ^b	1,1 ± 0,0 ^a	7,2 ± 0,4 ^c
16:1 n-7	18,6 ^b	10,0 ± 2,1 ^a	28,6 ± 4,2 ^c	11,5 ± 2,1 ^a	21,8 ± 3,4 ^{bc}
18:1 n-9	31,5 ^{bc}	12,5 ± 0,6 ^a	32,6 ± 3,6 ^c	23,6 ± 5,8 ^b	31,9 ± 1,8 ^c
18:1 n-7	5,5 ^c	2,1 ± 0,1 ^a	5,2 ± 0,5 ^c	3,6 ± 0,8 ^b	4,5 ± 0,1 ^{bc}
Σ AGMI	61,5 ^c	25,5 ± 3,0 ^a	72,8 ± 2,0 ^d	40,1 ± 4,7 ^b	65,7 ± 2,1 ^{cd}
18:2 n-6	21,0 ^c	3,6 ± 0,0 ^a	9,6 ± 1,1 ^b	7,2 ± 1,9 ^b	9,0 ± 1,8 ^b
18:3 n-6	2,4 ^c	0,1 ± 0,0 ^a	1,3 ± 0,5 ^b	0,1 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,5 ^a
20:3 n-9	2,2 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	2,8 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	6,8 ± 0,6 ^c
20:4 n-6	122,4 ^c	19,0 ± 0,8 ^a	32,3 ± 3,1 ^b	33,8 ± 7,4 ^b	32,1 ± 6,5 ^b
20:5 n-3	2,3 ^a	23,2 ± 2,9 ^c	11,3 ± 2,0 ^b	15,5 ± 4,2 ^b	4,6 ± 0,7 ^a
22:6 n-3	4,9 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,5 ^a	4,9 ± 1,9 ^a	2,7 ± 0,1 ^a
Σ AGPI	156,6 ^b	49,7 ± 3,5 ^a	61,7 ± 7,3 ^a	62,6 ± 15,7 ^a	56,7 ± 7,6 ^a
Σ AGPI n-6	146,9 ^c	22,9 ± 0,8 ^a	44,0 ± 4,7 ^b	41,4 ± 9,4 ^b	42,2 ± 8,1 ^b
Σ AGPI n-3	7,5 ^a	26,6 ± 2,7 ^c	14,9 ± 2,7 ^{ab}	21,0 ± 6,3 ^{bc}	7,6 ± 1,1 ^a
n-6/n-3	19,6 ^c	0,9 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,1 ^a	5,7 ± 1,9 ^b
Σ AG	248,2 ^c	86,2 ± 8,1 ^a	159,7 ± 7,6 ^b	124,9 ± 27,4 ^b	146,0 ± 8,0 ^b

Seuls les acides gras dont les concentrations rapportées à la concentration totale des acides gras sont supérieures à 1 % sont présentés. Les résultats complets sont présentés en Annexe 14. Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). α : pool de 3 échantillons issus de rats différents avant méthylation. β : moyenne de 2 pools de 3 et 4 échantillons issus de rats différents avant méthylation. γ : moyenne de 2 pools de 2 échantillons issus de rats différents avant méthylation. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

observée au 13^{ème} jour de supplémentation (51 % et 70 %, respectivement, pour le groupe de rats ayant ingéré le mélange à base d'huile de poisson et les Marinosomes[®]). La concentration de DHA (22:6 n-3) n'est pas significativement réduite par l'arrêt des supplémentations en AGPI n-3 des régimes. En ce qui concerne les AGPI n-6, les concentrations d'acide linoléique (18:2 n-6) et d'acide arachidonique (20:4 n-6) augmente de manière significative pour le groupe de rats ayant ingéré le mélange à base d'huile de poisson contrairement au groupe ayant ingéré les Marinosomes[®] pour lequel les concentrations de ces acides gras ne varient pas.

III.3. Conclusion : influence de la forme physico-chimique des lipides alimentaires sur la réversibilité du profil des lipides du plasma

L'étude de réversibilité du profil des **lipides du plasma** montre l'importance de la forme physico-chimique sous laquelle sont préalablement apportés les AGPI n-3 lors de la supplémentation des régimes des rats. Il existe un effet rémanent des AGPI n-3 sur la concentration du **cholestérol** total plasmatique lorsqu'ils sont apportés dans l'alimentation des rats sous forme de Marinosomes[®] qui n'est pas observé dans le cadre de la supplémentation du régime avec le mélange de lipides à base d'huile de poisson. Avec les Marinosomes[®], non seulement on n'atteint pas la valeur initiale après 7 jours de régime alipidique, mais encore l'augmentation de la concentration plasmatique est progressive puisqu'après 4 jours d'arrêt, cette concentration est environ 2 fois plus faible que celle mesurée dans le groupe de rats ayant ingéré l'huile de poisson. Cet effet pourrait résulter de la meilleure incorporation des AGPI n-3 observée avec les Marinosomes[®] (cf. § C.II.2.) qui révélait l'impact de la forme physique sur la biodisponibilité de ces acides gras. Les résultats concernant les **triglycérides** plasmatiques sont plus difficiles à interpréter. L'effet bénéfique de la supplémentation du régime des rats avec les Marinosomes[®] est clairement démontré après 4 jours d'un régime alipidique puisque la concentration des triglycérides est environ 2 fois plus faible que celle mesurée dans le groupe de rats ayant ingéré l'huile de poisson. Cependant, la diminution inexplicée de la concentration des triglycérides plasmatiques après 7 jours pour ce groupe de rats oblige à nuancer l'effet rémanent des Marinosomes[®].

Il est intéressant de comparer les **compositions des acides gras** des classes lipidiques du plasma (triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol). L'arrêt des apports alimentaires en lipides conduit l'organisme à mettre en place des systèmes pour maintenir l'homéostasie lipidique. Ces systèmes sont, d'une part, la mobilisation des lipides du tissu adipeux pour des acides gras qui auraient été stockés pendant la phase de supplémentation (comme les acides gras saturés et monoinsaturés (Annexe 4)), et d'autre part, la synthèse d'acides gras saturés et mono-insaturés à partir d'autres nutriments, notamment les glucides. Une étude préliminaire de la composition des acides gras libres du plasma montre une augmentation des acides gras saturés, mono-insaturés et des AGPI n-6 après l'arrêt de la supplémentation des 2 régimes, suggérant la mobilisation des acides gras du tissu adipeux. On peut noter que dans le cas des AGPI n-6, cette mobilisation avait déjà eu lieu dans la phase de supplémentation en AGPI n-3 des régimes. L'absence de lipides d'origine alimentaire devrait donc avoir plusieurs conséquences au niveau du profil des acides gras des fractions des lipides plasmatiques : i) une diminution des AGPI n-3 suite à leur retrait des régimes ; ii) une augmentation des acides gras saturés synthétisés par l'organisme ; iii) une augmentation des acides gras mono-insaturés synthétisés par l'organisme, notamment ceux de la série n-9 qui révèlent par leur accumulation une carence en acides gras indispensables. Ces tendances sont effectivement observées dans les fractions phospholipides et esters de cholestérol plasmatiques. L'hypothèse qui peut être avancée pour expliquer que ces enrichissements en acides gras saturés et mono-insaturés ne sont pas observés dans la fraction triglycéridique est que ces enrichissements ont eu lieu avant mais ne sont plus mesurables après 7 jours d'arrêt des régimes en raison d'un turnover des triglycérides plus rapide que celui des phospholipides et des esters de cholestérol. Cette hypothèse s'appuie, d'une part, sur le fait que la concentration des triglycérides est maximale 4 jours après l'arrêt du régime à base d'huile de poisson, et d'autre part, que la teneur en ces acides gras est supérieure dans le groupe de rats ayant été soumis au régime à base de *Marinosomes*[®] en association avec une concentration des triglycérides plasmatiques également plus élevée.

Conclusion et perspectives

La communauté scientifique préconise, dans son rapport sur les apports nutritionnels conseillés, une augmentation de la part des acides gras poly-insaturés n-3 dans l'alimentation « *via* la promotion des aliments qui en contiennent naturellement et un enrichissement éventuel » en raison de leur intervention bénéfique dans de nombreuses pathologies. C'est pourquoi, depuis quelques années, des aliments enrichis en AGPI n-3 ou des nutraceutiques contenant des AGPI n-3 se sont largement développés. Jusqu'à présent la plupart de ces produits étaient formulés à base d'huile de poisson, mais d'autres sources d'acides gras, et notamment les phospholipides d'origine marine, pourraient être intéressantes à plusieurs titres, en termes de valorisation de produits extraits d'organismes marins, de comportement physico-chimique de la matière première formulée et, enfin, en termes d'efficacité des AGPI n-3.

L'objectif de ce travail de thèse consistait à étudier l'efficacité des Marinosomes[®] en tant que vecteurs d'AGPI n-3 par la voie topique et par la voie orale et, lorsque cela était judicieux, de comparer les effets biologiques obtenus avec ceux classiquement reportés pour l'huile de poisson.

Dans le cadre de la **voie topique**, nous avons adopté une démarche qui permettait de répondre à des préoccupations cosmétiques tout en abordant des problématiques plus fondamentales, liées à la compréhension du comportement physico-chimique des liposomes dans les conditions de l'application topique. L'approche physico-chimique a donc consisté à caractériser les Marinosomes[®] confrontés aux différents facteurs d'instabilité trouvés au niveau de l'épiderme (pH, température, concentration des ions calcium) et a permis de valider l'utilisation *in vitro* et *in vivo* de ce type de structures. En effet, pour des temps courts correspondants à ceux de l'application topique, les Marinosomes[®] présentent une **stabilité physique et chimique** (en termes d'hydrolyse chimique des phospholipides et d'oxydation des acides gras) satisfaisante. Nous avons mis en évidence que les Marinosomes[®] ne présentent **pas ou peu de potentiel irritant** au niveau cutané et oculaire et qu'il est possible d'attribuer aux Marinosomes[®] des **propriétés anti-inflammatoires** dans la mesure où ils inhibent la formation de marqueurs de l'inflammation.

Dans le cadre de la **voie orale**, des études préalables avaient validé le comportement physico-chimique des liposomes à base de lipides marins *in vitro* dans les conditions de la

digestion et montré une meilleure biodisponibilité digestive, chez le rat, des AGPI n-3 présentés sous forme de phospholipides (liposomes) par rapport aux mêmes AGPI estérifiés dans des triglycérides (huile de sardine). Il s'est agi d'élargir ce dernier résultat dans le cadre d'études de supplémentation de régimes alimentaires. L'étude, *in vivo* chez le rat, avait pour objectif d'évaluer les effets de la forme physico-chimique des AGPI n-3, *i.e.*, sous forme de **Marinosomes**[®] ou sous forme d'un mélange lipidique à base d'huile de poisson, sur le métabolisme des lipides du sang. La stratégie adoptée a consisté, d'une part, à utiliser un mélange de matières grasses de manière à obtenir une composition qualitative et quantitative en AGPI similaire pour les 2 régimes et, d'autre part, à intuber les animaux pour s'assurer qu'ils assimilaient tous la même quantité de lipides. Au niveau des **lipides sanguins**, sur des temps courts de supplémentation, les 2 régimes conduisent à des résultats similaires. Sur des temps longs, le régime à base de **Marinosomes**[®] se différencie du régime à base d'huile de poisson par une augmentation des concentrations du cholestérol total et des phospholipides plasmatiques, provenant sans doute de l'apport en composés phosphorylés par les **Marinosomes**[®]. Au niveau de la composition en **acides gras** des lipides plasmatiques, les différentes analyses effectuées ont mis en évidence le biais de travailler sur les lipides totaux et les pourcentages en poids par rapport aux acides gras totaux quand les régimes induisent des variations différentes des concentrations des fractions lipidiques plasmatiques. Ainsi, sur la base des concentrations des acides gras, les résultats mettent en évidence une incorporation similaire de l'EPA (20:5 n-3) dans les triglycérides et les phospholipides et une meilleure incorporation du DHA (22:6 n-3) chez les rats soumis au régime supplémenté avec les **Marinosomes**[®] par rapport à celui supplémenté avec le mélange lipidique à base d'huile de poisson. Ces résultats vont dans le sens de la biodisponibilité lymphatique accrue du DHA (22:6 n-3), démontrée dans les travaux antérieurs. Les différences au niveau de la cinétique d'incorporation et des quantités circulantes pour l'EPA (20:5 n-3) et le DHA (22:6 n-3) mettent en évidence le devenir métabolique distinct de ces 2 AGPI qui pourrait résulter d'une biodisponibilité et/ou d'une utilisation cellulaire différentes. Il est intéressant de noter que de tels résultats n'ont jamais été obtenus dans les études de supplémentation des régimes avec des phospholipides reportées dans la littérature. Ainsi, plus que la forme chimique (triglycérides ou phospholipides), la présentation physique permettrait d'obtenir cette meilleure biodisponibilité *in vivo*. Nous avons également montré que le régime à base de **Marinosomes**[®] permet de conserver les effets des AGPI n-3 dans le temps après l'arrêt de la supplémentation. Ce résultat est intéressant car il suggère qu'une partie des AGPI n-3

apportés par les Marinosomes[®] serait stockée de manière plus importante ou différente par rapport à l'huile de poisson.

En conclusion, si les liposomes sont couramment utilisés pour la vectorisation de molécules actives dans les domaines cosmétique et, dans une moindre mesure, pharmaceutique, l'ensemble des résultats obtenus confirme l'intérêt des Marinosomes[®] en tant que supports d'AGPI n-3 pour la cosmétique et permet d'élargir leur champ d'application au domaine de la nutrition orale.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses et variées. Au niveau **physico-chimique**, il reste à valider la stabilité des Marinosomes[®] en formulation et au cours du stockage. Au niveau de l'**application topique**, il serait intéressant de comprendre les mécanismes d'interaction des Marinosomes[®] avec les kératinocytes et avec l'épiderme, de manière générale. D'un point de vue plus appliqué, il reste maintenant à valider l'utilisation des Marinosomes[®] chez l'Homme. Les premiers résultats obtenus *in vivo* ont mis en évidence l'effet hydratant des Marinosomes[®] présentés dans une formulation cosmétique. Il faut encore approfondir les études concernant leur effet apaisant. De plus, l'absence d'irritabilité oculaire est une propriété intéressante des Marinosomes[®] qui leur permettrait d'être considérés comme des systèmes vecteurs pertinents pour délivrer des principes actifs par voie ophtalmique.

Au niveau de l'utilisation des Marinosomes[®] par **voie orale**, une analyse approfondie de la structure des triglycérides et des phospholipides pourrait permettre de mieux comprendre les différences de biodisponibilité des acides gras obtenues pour les 2 régimes. Il faudrait également poursuivre les analyses sur d'autres organes, et notamment, au niveau des tissus pour lesquels les AGPI n-3 présentent une importance physiologique importante (cerveau, rétine). Une étude préliminaire d'incorporation des AGPI n-3 dans la peau des rats a montré que 13 jours de régime supplémenté avec les Marinosomes[®] permettent l'incorporation de ces AGPI dans cet organe. Néanmoins, des analyses plus précises doivent être réalisées pour différencier les 2 régimes. Une étude dose-réponse permettrait également de différencier les 2 régimes au niveau de la concentration minimale des AGPI n-3 à administrer pour obtenir des différences d'effet hypotriglycéridémiant par exemple. Enfin, dans la mesure où le rat n'est pas un bon modèle pour l'étude du métabolisme des lipoprotéines, ces travaux pourraient être reconduits chez le hamster, modèle animal plus approprié, ou mieux chez l'Homme ce qui permettrait de confirmer l'intérêt des Marinosomes[®] en nutrition humaine.

Publications personnelles

Publications :

N. Moussaoui, M. Cansell, A. Denizot. (2002). *Marinosomes, marine lipid-based liposomes: physical characterization and potential application in cosmetics.* **International Journal of Pharmaceutics**, 242, 361-365.

M. Cansell, N. Moussaoui, C. Lefrançois. (2001). *Stability of marine lipid based-liposomes under acid conditions. Influence of xanthan gum.* **Journal of Liposomes Research**, 11, 229-242.

M. Cansell, N. Moussaoui, P. Petit, A. Denizot, N. Combe. *Effects of Dietary Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in the Form of Triacylglycerols or Phospholipids on Lipid Metabolism and Fatty Acid Tissue Content in Rats.* **En preparation.**

Publication dans des actes de congrès :

M. Cansell, N. Moussaoui, C. Lefrançois, B. Entressangles (2000). *Influence of hydrocolloids on liposome stability under osmotic stress.* In “**Biopolymers: food and cosmetic applications**”, **Polymerix 2000, CBB Développement**, 195-201.

Conférences orales :

N. Moussaoui, A. Denizot, N. Combe, M. Cansell. *Comparative effects of dietary supplementation with marine lipid-based liposomes and fish oil on fatty acid composition and plasma lipids in rats.* **25th World Congress of the International Society for Fat Research (ISF)**, Bordeaux, 12-15 October 2003.

M. Cansell, N. Moussaoui, A. Denizot, N. Combe. *Influence of the physico-chemical form of polyunsaturated fatty acids on their in vivo bioavailability.* **94th AOCS Annual Meeting**, Kansas City, 4-7 May 2003.

M. Cansell, N. Moussaoui, C. Lefrançois, B. Entressangles (2000). *Influence of hydrocolloids on liposome stability under osmotic stress.* **Polymerix 2000**, Rennes, 7-8 Juin 2000.

Communication par affiche dans des congrès :

N. Moussaoui, M. Cansell, A. Denizot. *Marinosomes[®], marine lipid - based liposomes: characterization and potential application in cosmetics.* **13th International Symposium on Microencapsulation**, Angers, 5-7 Septembre 2001.

Références bibliographiques

Adonaylo V.N., Oteiza P.I. (1999). *Pb²⁺ promotes lipid oxidation and alterations in membrane physical properties*. *Toxicology*, **132**, 19-32.

Alessandri J.M., Goustard B., Guesnet P., Durand G. (1998). *Docosahexaenoic acid concentration in retinal phospholipids of piglets fed an infant formula enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids: effects of egg phospholipids and fish oils with different ratios of eicosapentaenoic acid to docosahexaenoic acid*. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **67**, 377-385.

Allen Zhang J.A., Pawelchak J. (2000). *Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions Part 1: Lipid hydrolysis*. *European Journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **50**, 357-364.

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*. *The Journal of Nutrition*, **131**, 1250-1255.

Ames B.N. (1966). *Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase*. *Methods in Enzymology*, **18**, 115-118.

Anderson J.M., Dietschy J.M. (1977). *Regulation of sterol synthesis in 15 tissues of rat. II Role of rat and human high and low density plasma lipoproteins and of rat chylomicron remnants*. *The Journal of Biological Chemistry*, **252**, 3652-3659.

Aranda F.J., Sánchez-Migallón M.P., Gómez-Fernández J.C. (1996). *Influence of α -tocopherol incorporation on Ca^{2+} -induced fusion of phosphatidylserine vesicles*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **333**, 394-400.

Araseki M., Yamamoto K., Miyashita K. (2002). *Oxidative stability of polyunsaturated fatty acid in phosphatidylcholine liposomes*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **66**, 2573-2577.

Arnold A., Labrot T., Oda R., Dufourc E.J. (2002). *Cation modulation of bicelle size and magnetic alignment as revealed by solid-state NMR and electron microscopy*. *Biophysical Journal*, **83**, 2667-2680.

Averbakh A., Lobyshev V.I. (2000). *Adsorption of polyvalent cations to bilayer membranes from negatively charged lipid: estimating the lipid accessibility in the case of complete binding*. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **45**, 23-44.

Barker J.N., Jones M.L., Mitra R.S., Crockett-Torabe E., Fantone J.C., Kunkel S.L., Warren J.S., Dixit V.M., Nickoloff B.J. (1991). *Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes*. *American Journal of Pathology*, **139**, 869-876.

Bental M., Wilschut J., Scholma J., Nir S. (1987). *Ca²⁺-induced fusion of large unilamellar phosphatidylserine/cholesterol vesicles.* **Biochimica et Biophysica Acta**, **898**, 239-247.

Berge R.K., Madsen L., Vaagenes H., Tronstad K.J., Göttlicher M., Rustan A.C. (1999). *In contrast with docosahexaenoic acid, eicosapentaenoic acid and hypolipidaemic derivatives decrease hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreased diacylglycerol acyltransferase activity and stimulation of fatty acid oxidation.* **The Journal of Biochemistry**, **343**, 191-197.

Betz G., Imboden R., Imanidis G. (2001) *Interaction of liposome formulations with human skin in vitro.* **International Journal of Pharmaceutics**, **229**, 117-129.

Bézar J., Blond J.P., Bernard A., Clouet P. (1994). *The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues.* **Reproduction, Nutrition, Development**, **34**, 539-568.

Blonk M.C., Bilo H.J., Nauta J.J., Popp-Snijders C., Mulder C., Donker A.J. (1990). *Dose-response effects of fish-oil supplementation in healthy volunteers.* **The American Journal of Clinical Nutrition**, **52**, 120-127.

Boelsma E., Tanojo H., Boddé H.E., Ponc M. (1997). *An in vivo-in vitro study of the use of a human skin equivalent for irritancy screening of fatty acids.* **Toxicology in vitro**, **11**, 365-376.

Boelsma E., Hendriks H.F.J., Roza L. (2001). *Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids.* **The American Journal of Clinical Nutrition**, **73**, 853-864.

Bondia-Martinez E., Lopez-Sabater M.MC., Castellote-Bargallo A.I., Rodriguez-Palmero M., Gonzalez-Corbella M.J., Rivero-Urgell M., Campoy-Folgozo C. Bayes-Garcia R. (1998). *Fatty acid composition of plasma and erythrocytes in term infants fed human milk and formulae with and without docosahexaenoic and arachidonic acids from egg yolk lecithin.* **Early Human Development**, **53**, S109-S119.

Bonté F., Saunois A., Pinguet P., Meybeck A. (1997). *Existence of a lipid gradient in the upper stratum corneum and its possible biological significance.* **Archives of Dermatology Research**, **289**, 78-82.

Boue-Grabot M., Bernardin G., Chaumont S., Pinon J.F. (1995). *Alternative methods: Hen's egg chorioallantoic membrane and in vitro cytotoxicity – a complementary approach.* **International Journal of Cosmetic Science**, **17**, 207-215.

Bouwstra J.A., Hofland H.E.J., Ponc M., Bodde H.E., Spies F., Junginger H.E. (1990). *Niosomes, preparation, characterization and interactions with human skin.* **APV course on liposomes and niosomes in pharmacy and cosmetics, 14-16 may 1990**, Nurnberg.

Bouwstra J.A., Gooris G.S., Cheng K., Weerheim A., Bras W., Ponc M. (1996). *Phase behavior of isolated skin lipids.* **Journal of Lipid Research**, **37**, 999-1011.

Bouwstra J.A., Honeywell-Nguyen P.L. (2002). *Skin structure and mode of action of vesicles.* **Advanced Drug delivery Reviews**, *54*, S41-S55.

Bouwstra J.A., Honeywell-Nguyen P.L., Gooris G.S., Ponc M. (2003). *Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations.* **Progress in Lipid Research**, *42*, 1-36.

Bowen R.A.R., Clandinin M.T. (2000). *High dietary 18:3 n-3 increases the 18:3 n-3 but not the 22:6 n-3 content in the whole body, brain, skin, epididymal fat pads, and muscles of suckling rat pups.* **Lipids**, *35*, 389-394.

Burr G.O., Burr M.M. (1930). *On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition.* **The Journal of Biological Chemistry**, *86*, 587-621.

Cansell M., Nacka F., Combe N. (2003) *Marine lipid-based liposomes increase in vivo fatty acid bioavailability.* **Lipids**, *38*, 551-559.

Carnielli V., Verlato G., Perderzini F., Luijendijk I., Boerlage A., Pedrotti D., Sauer P. (1998). *Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula.* **The American Journal of Clinical Nutrition**, *67*, 97-103.

Cevc G., Blume G. (1992). *Lipid vesicles penetrate into the skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force.* **Biochimica et Biophysica Acta**, *1104*, 226-232.

Cevc G., Schätzlein A., Richardsen H. (2002). *Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements.* **Biochimica et Biophysica Acta**, *1564*, 21-30.

Chapkin R.S., Ziboh V.A., Marcelo C.L., Voorhees J.J. (1986). *Metabolism of essential fatty acids by human epidermal enzyme preparations: evidence of chain elongation.* **Journal of Lipid Research**, *27*, 945-954.

Chapkin R.S., Ziboh V.A., McCullough J.L. (1987). *Dietary influences of evening primrose and fish oil on the skin of essential fatty acid-deficient guinea pigs.* **The Journal of Nutrition**, *117*, 1360-1370.

Chen H.C., Mendelsohn R., Rerek M.E., Moore D.J. (2001). *Effect of cholesterol on miscibility and phase behavior in binary mixtures with synthetic ceramide 2 and octadecanoic acid. Infrared studies.* **Biochimica et Biophysica Acta**, *1512*, 345-356.

Chung S., Kong S., Seong K., Cho Y. (2002). *γ -Linolenic acid in borage oil reverses epidermal hyperproliferation in guinea pigs.* **The Journal of Nutrition**, *132*, 3090-3097.

Claudy A. (2003). *Les lipides cutanés : de la physiologie à la clinique. Cutaneous lipids: from physiology to clinics.* **Pathologie Biologie**, *51*, 260-263.

Coderch L., De Pera M., Fonollosa J., de la Maza A., Parra J. (2002). *Efficacy of stratum corneum lipid supplementation on human skin.* **Contact Dermatitis**, *47*, 139-146.

Coderch L., Lopez O., de la Maza A., Parra J.L. (2003). *Ceramides and skin function*. **American Journal of Clinical Dermatology**, *4*, 107-129.

Combe N., Judde A., Billeaud C., Boué C., Turon F., Entressangles B., Dallay D., Leng J.J. (1997). *Distribution of dietary trans isomers of essential fatty acids in blood classes*, Proceeding of the Fourth American Oil Chemists' Congress on Essential Fatty Acids and Eicosanoïds, Armstrong R.A., Kelly R.W. and Wilson R. (Eds), **AOCS Press**, P. 239-242.

Corsini E., Galli C.L. (1998). *Cytokines and irritant contact dermatitis*. **Toxicology Letters**, *102-103*, 277-282.

Cunnane S.C., Anderson M.J. (1997). *The majority of dietary linoleate in growing rats is β -oxidized or stored in visceral fat*. **Journal of Nutrition**, *127*, 146-152.

de Pera M., Coderch L., Fonollosa J., de la Maza A., Parra J.L. (2000). *Effect of internal wool lipid liposomes on skin repair*. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, *13*, 188-195.

Djemli-Shipkolye A., Raccah D., Pieroni G., Vague P., Coste T.C., Gerbi A. (2002). *Differential effect of ω 3 PUFA supplementations on Na,K-ATPase and Mg-ATPase activities: possible role of the membrane ω 6/ ω 3 ratio*. **Journal of Membrane Biology**, *191*, 37-47.

Dreher F., Walde P., Luisi P.L., Elsner P. (1996). *Human skin irritation studies of lecithin microemulsion gel and lecithin liposomes*. **Skin Pharmacology**, *9*, 124-129.

Duzgunes N., Wilschut J., Fraley R., Papahadjopoulos D. (1981). *Studies on the mechanism of membrane fusion. Role of head-group composition in calcium- and magnesium-induced fusion of mixed phospholipid vesicles*. **Biochimica et Biophysica Acta**, *642*, 182-195.

Fartasch M. (1996). *The nature of the epidermal barrier: structural aspects*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, *18*, 273-282.

Feingold K.R., Wiley, M.H., Moser A.H., Lau, D.T., Lear S.R., Siperstein, M.D. (1982). *De novo sterologenesis in intact primates*. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, *100*, 405-410.

Feingold K.R., Brown B.E., Lear S.R., Moser A.H. (1983). *Localization of de novo sterologenesis in mammalian skin*. **The Journal of Investigative Dermatology**, *81*, 365-369.

Fickova M., Hubert P., Crémel G., Leray C. (1998). *Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes*. **The Journal of Nutrition**, *128*, 512-519.

Fiume Z. (2001). *Final report on the safety assessment of lecithin and hydrogenated lecithin*. **International Journal of Toxicology**, *20*, 21-45.

Fogh K., Kragballe K. (2000). *Eicosanoids in inflammatory skin diseases. Prostaglandins & other Lipid Mediators*, **63**, 43–54.

Folch J., Lees M., Sloanes-Stanley G.H. (1957). *A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. The Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497-509.

Foldvari M. (2000). *Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. Pharmaceutical Science & Technology Today*, **3**, 417-425.

Frankel E.N. (1984). *Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. Journal of the American Oil Chemists' Society*, **61**, 1908-1917.

Frankel E.N., Tappel A.L. (1991). *Headspace gas chromatography of volatile lipid peroxidation products from human red blood cell membranes. Lipids*, **26**, 479-484.

Frøyland L., Vaagenes H., Asiedu D.K., Garras A., Lie Ø., Berge R.K. (1996). *Chronic administration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid as ethyl esters reduced plasma cholesterol and changed the fatty acid composition in rat blood and organs. Lipids*, **31**, 169-178.

Fu Z., Sinclair A.J. (2000). *Increased α -linolenic acid intake increases tissue α -linolenic acid content and apparent oxidation with little effect on tissue docosahexaenoic acid in the guinea pig. Lipids*, **35**, 395-400.

Fukuzawa K., Inokami Y., Tokumura A., Terao J., Suzuki A. (1998). *Rate constant for quenching singlet oxygen and activities lipid peroxidation of carotenoid and α -tocopherol in liposomes. Lipids*, **33**, 751-756.

Furumoto H., Aral H., Kuramitsu Y., Saoki Y., Gondo T., Ishihara T., Shimizu T., Fujimoto M., Nakamura K. (2002). *Lipoproteins modulate growth and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes. Electrophoresis*, **23**, 161-166.

Gaiva M.H., Couto R.C., Oyama L.M., Couto G.E.C., Silveira V.L.F., Ribeiro E.B., Nascimento C.M.O. (2003). *Diets rich in polyunsaturated fatty acids: effect on hepatic metabolism in rats. Nutrition*, **19**, 144-149.

Ge L., Gordon J.S., Hsuan C., Stenn K., Prouty S.M. (2003). *Identification of the Δ -6 desaturase of human sebaceous glands: expression and enzyme activity. The Journal of Investigative Dermatology*, **120**, 707-714.

Geilen G.C., Wieder T., Orfanos C.E. (1997). *Ceramide signalling: regulatory role in cell proliferation, differentiation and apoptosis in human epidermis. Archives of Dermatological Research*, **289**, 559-566.

Gniadecki R., Gajkowska B. (2003). *Intracellular calcium pool emptying induces DNA synthesis in HaCaT keratinocytes. Experimental Dermatology*, **12**, 453-459.

Goldyne M.E., Evans C.B. (1994). *12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the induction of prostaglandin E2 generation by human keratinocytes: a re-evaluation.* **Carcinogenesis**, *15*, 141-143.

Goustard-Langelier B., Guesnet P., Durand G. Antoine J.M., Alessandri J.M. (1999). *n-3 and n-6 fatty acid enrichment by dietary fish oil and phospholipid sources in brain cortical areas and nonneural tissues of formula-fed piglets.* **Lipids**, *34*, 5-16.

Grit M., Crommelin D.J.A. (1993) *Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability.* **Chemistry and Physics of Lipids**, *64*, 3-18.

Grubauer G., Feingold K.R., Elias P.M. (1987). *Relationship of epidermal lipogenesis to cutaneous barrier function.* **Journal of Lipid Research**, *28*, 746-752.

Hadgraft J. (2001). *Skin, the final frontier.* **International Journal of Pharmaceutics**, *224*, 1-18.

Hansen S., Jensen B. (1985). *Essential function of linoleic acid esterified in acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal water permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, columbinic and α -linolenate.* **Biochimica et Biophysica Acta**, *834*, 357-363.

Hansen J.B., Berge R.K., Nordoy A., Bonaa K.H. (1998). *Lipid peroxydation of isolated chylomicrons and oxidative status in plasma after intake of highly purified eicosapentaenoic or docosahexaenoic acids.* **Lipids**, *33*, 1123-1129.

Harris W.S. (1989). *Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review.* **Journal of Lipid Research**, *30*, 785-807.

Harris W.S. (1996). *n-3 fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies.* **Lipids**, *31*, 243-252.

Harris I.R., Farrell A.M., Grunfeld C., Holleran W.M., Elias P.M., Feingold K.R. (1997). *Permeability barrier disruption coordinately regulates mRNA levels for key enzymes of cholesterol, fatty acid, and ceramide synthesis in the epidermis.* **The Journal of Investigative Dermatology**, *109*, 783-787.

Hatziantoniou S., Rallis M., Demetzos C., Papaioannou G.T. (2000). *Pharmacological activity of natural lipids on a skin barrier disruption model.* **Pharmacological Research**, *42*, 55-59.

Heurtault B., Saulnier P., Pach B., Proust J.E., Benoit J.P. (2003). *Physico-chemical stability of colloidal lipid particles.* **Biomaterials**, *24*, 4283-4300.

Holleran W.M., Feingold K.R., Mao-Qiang M., Gao W.N., Lee J.M., Elias P.M. (1991). Regulation of epidermal sphingolipid synthesis by permeability barrier function. *Journal of Lipid Research*, **32**, 1151-1158.

Holleran W.M., Gao W.N., Feingold K.R., Elias P.M. (1995). Localization of epidermal sphingolipid synthesis and serine palmitoyl transferase activity: alterations imposed by permeability barrier requirements. *Archives of Dermatology Research*, **287**, 254-258.

Holub B.J., Bakker D.J., Skeaff C.M. (1987). Alterations in molecular species of cholesterol esters formed via plasma lecithin-cholesterol acyltransferase in humans consuming fish oil. *Atherosclerosis*, **66**, 11-18.

Honeywell-Nguyen P.L., H.W.W Groenink, de Graaff A.M., Bouwstra J.A. (2003). The in vivo transport of elastic vesicles into human skin: effects of occlusion, volume and duration of application. *Journal of Controlled Release*, **90**, 243-255.

Horrobin D.F. (2000). Essential fatty acid metabolism and its modification in atopic eczema. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **71**, 367S-372S.

Humbert P. (2003). Conséquences fonctionnelles des perturbations des lipides cutanés. Functional consequences of perturbation of cutaneous lipids. *Pathologie Biologie*, **51**, 271-274.

Ide T., Kobayashi H., Ashakumary L., Rouyer I.A., Takahashi Y., Aoyama T., Hashimoto T., Mizugaki M. (2000). Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1485**, 23-35.

Ikai K. (1999). Psoriasis and the arachidonic acid cascade. *Journal of Dermatological Science*, **21**, 135-146.

Ikeda I., Yoshida H., Tommoka M., Yosef A., Imaisumi K., Tsuji H., Seto A. (1998). Effects of long-term feeding of marine oils with different positional distribution of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on lipid metabolism, eicosanoid production, and platelet aggregation in hypercholesterolemic rats. *Lipids*, **33**, 897-904.

Jonas A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1529**, 245-256.

Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, **31**, 671-701.

Kast R., Furstenberger G., Marks F. (1993). Phorbol ester TPA- and bradykinin-induced arachidonic acid release from keratinocytes is catalyzed by a cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂). *The Journal of Investigative Dermatology*, **101**, 567-572.

Kelley D.S., Branch L.B., Love J.E., Taylor P.C., Rivera Y.M., Iacona J.M. (1991). Dietary α -linolenic acid and immunocompetence in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **53**, 40-46.

Kirjavainen M, Urtti A., Jääskeläinen I., Suhonen T.M., Paronen P., Valjakka-Koskela R., Kiesvaara J., Mönkkönen J. (1996). *Interaction of liposomes with human skin in vitro – the influence of lipid composition and structure.* **Biochimica et Biophysica Acta**, *1304*, 179-189.

Kraayenhof R., Sterk G.J., Wong Fong Sang H.W., Krab K., Epand R.M. (1996). *Monovalent cations differentially affect membrane surface properties and membrane curvature, as revealed by fluorescent probes and dynamic light scattering.* **Biochimica et Biophysica Acta**, *1282*, 293-302.

Lampe M.A., Burlingame A.L., Whitney J.A., Williams M.L., Brown B.E., Roitman E., Elias P.M. (1983a). *Human stratum corneum lipids: Characterization and regional variations.* **Journal of Lipid Research**, *24*, 120-130.

Lampe M.A., Williams M.L., Elias P.M. (1983b). *Human epidermal lipids: characterization and modulations during differentiation.* **Journal of Lipid Research**, *24*, 131-140.

Lampen P., Pitterman W., Heise H.M., Schmitt M., Jungmann H., Kietzmann M. (2003). *Penetration studies of vitamin E acetate applied from cosmetic formulations to the stratum corneum of an in vitro model using quantification by tape stripping, UV spectroscopy, and HPLC.* **Journal of Cosmetic Science**, *54*, 119-131.

Lasch J., Bouwstra J. (1995). *Interactions of external lipids (lipid vesicles) with the skin.* **Journal of Liposome Research**, *5*, 543-569.

Lasic D.D. (1993). *Liposomes: from physics to applications.* Elsevier, Amsterdam, 570 p.

Lieckfeldt R., Villalain J., Gomez-Fernandez J.C., Lee G. (1995). *Apparent pKa of fatty acids within ordered mixtures of model human stratum corneum lipids.* **Pharmaceutical Research**, *12*, 1614-1617.

Liu K.L., Belury M.A. (1998). *Conjugated linoleic acid reduces arachidonic acid content and PGE2 synthesis in murine keratinocytes.* **Cancer Letters**, *127*, 15-22.

Liu M., Subramanian V.S., Subbaiah P.V. (1998). *Modulation of the positional specificity of lecithin-cholesterol acyltransferase by the acyl group composition of its phosphatidylcholine substrate: role of the sn-1-acyl group.* **Biochemistry**, *37*, 13626-13633.

Loden M., Andersson A.C. (1996). *Effect of topically applied lipids on surfactant-irritated skin.* **The British Journal of Dermatology**, *134*, 215-220.

Loftsson T., Gunnarsdottir T., Magnúsdóttir L.M., Friðrikdóttir H., Guomundsdóttir T.K., Ólafsson J.H., Haraldsson G.G., Guomundsson G., Hjaltason B. (1997). *Effect of various marine lipids on transdermal drug delivery - in vitro evaluation.* **Bollettino Chimico Farmaceutico**, *136*, 640-645.

Lottenberg A.M.P., Oliveira H.C.F., Nakandakare E.R., Quintao E.C.R. (1992). *Effect of dietary fish oil on the rate of very low density lipoprotein triacylglycerol formation and on the metabolism of chylomicrons.* **Lipids**, *27*, 326-330.

Lu L., Okada N., Nakatani S., Yoshikawa K. (1995). *Eicosapentaenoic acid-induced changes in membrane fluidity and cell adhesion molecules in cultured human keratinocytes.* **The British Journal of Dermatology**, *133*, 217-222.

Lund E.K., Harvey L.J., Ladha S., Clark D.C., Johnson I.T. (1999). *Effects of dietary fish oil supplementation on the phospholipid composition and fluidity of cell membranes from human volunteers.* **Annual Nutrition Metabolism**, *43*, 290-300.

Lynde C.W. (2001). *Moisturizers: what they are and how they work.* **Skin Therapy Letter**, *6*, 3-5.

Mabile L., Piolot A., Boulet L., Fortin L.J., Doyle N., Rodriguez C., Davignon J., Blache D., Lussier-Cacan S. (2001). *Moderate intake of n-3 fatty acids is associated with stable erythrocyte resistance to oxidative stress in hypertriglyceridemic subjects.* **The American Journal of Clinical Nutrition**, *74*, 449-456.

Maldonado E.N., Furland N.E., Pennacchiotti G.L., Avelano M.I. (2002). *Reversibility of the changes induced by n-3 fatty acids in mouse plasma, liver and blood cell lipids.* **The Journal of Nutritional Biochemistry**, *13*, 36-46.

Mao-Qiang M., Elias P.M., Feingold K.R. (1993a). *Fatty acids are required for epidermal permeability barrier function.* **Journal of Clinical Investigation**, *92*, 791-798.

Mao-Qiang M., Feingold K.R., Elias P.M. (1993b). *Inhibition of cholesterol and sphingolipid synthesis causes paradoxical effects on permeability barrier homeostasis.* **The Journal of Investigative Dermatology**, *101*, 185-190.

Mao-Qiang M., Feingold K.R., Jain M., Elias P.M. (1995). *Extracellular processing of phospholipids is required for permeability barrier homeostasis.* **Journal of Lipid Research**, *36*, 1925-1935.

Marcelo C.L., Dunham W.R. (1993). *Fatty acid metabolism studies of human epidermal cell cultures.* **Journal of Lipid Research**, *34*, 2077-2090.

Martini M.C. (2003). *Analyse biochimique des lipides épidermiques.* **Biochemical analysis of epidermal lipids.** **Pathologie Biologie**, *51*, 267-270.

Mathews S.A., Oliver W.T., Phillips O.T., Odle J., Diersen-Schade D.A., Harrell R.J. (2002). *Comparison of triglycerides and phospholipids as supplemental sources of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids in piglets.* **The Journal of Nutrition**, *132*, 3081-3089.

Matsumura H., Watanabe K., Furusawa K. (1995). *Flocculation behavior of egg phosphatidylcholine liposomes caused by Ca²⁺ ions.* **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, *98*, 175-184.

Matsuzaki K., Murase O., Sugishita K., Yoneyama S., Akada K., Ueha M., Nakamura A., Kobayashi S. (2000). *Optical characterization of liposomes by right angle light scattering and turbidity measurement.* **Biochimica et Biophysica Acta**, *1467*, 219-226.

Maury E., Prévost M.C., Nauze M., Redoulès D., Tarroux R., Charvéron M., Salles J.P., Perret B., Chap H., Gassama-Diagne A. (2002). *Human epidermis is a novel site of phospholipase B expression.* **Biochemical and Biophysical Research Communications**, *295*, 362-369.

Mayhew E., Ito M., Lazo R. (1987). *Toxicity of non-drug-containing liposomes for cultured human cells.* **Experimental Cell Research**, *171*, 195-202.

Mazière J.C. (1997). *Structure de l'épiderme et particularités du métabolisme des lipides en relation avec la fonction de barrière hydrique de la peau.* **Oléagineux Corps gras Lipides**, *4*, 258-265.

Melton J.L., Wertz P.W., Swartzendruber D.C., Downing D.T. (1987). *Effects of essential fatty acid deficiency on epidermal O-acylsphingolipids and transepidermal water loss in young pigs.* **Biochimica et Biophysica Acta**, *921*, 191-197.

Menon G.K., Feingold K.R., Moser A.H., Brown B.E., Elias P.M. (1985). *De novo sterologenesi in the skin. II. Regulation by cutaneous barrier requirements.* **Journal of Lipid Research**, *26*, 418-427.

Mizushima H., Fukasawa J.I., Suzuki T. (1996). *Phase behavior of artificial stratum corneum lipids containing a synthetic pseudo-ceramide: a study of the function of cholesterol.* **Journal of Lipid Research**, *37*, 361-367.

Morgan C., Davies L., Corcoran F., Stammers J., Colley J. Spenser S.A., Hull D. (1998). *Fatty acid balance studies in term infants fed formula milk containing long-chain polyunsaturated fatty acids.* **Acta Paediatrica**, *87*, 136-142.

Morrisson W.R., Smith L.M. (1964). *Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol.* **Journal of Lipid Research**, *5*, 600-608.

Murata M., Sano Y., Ishihara K., Uchida M. (2002). *Dietary fish oil and *Undaria pinnatifida* (Wakame) synergistically decrease rat serum and liver triacylglycerol.* **The Journal of Nutrition**, *132*, 742-747.

Nacka F. (2001). *Mise au point de liposomes riches en acides gras polyinsaturés n-3 et en vitamine E, adaptés pour l'alimentation.* **Thèse, Université Bordeaux 1.**

Nacka F., Cansell M., Gouygou J. P., Gerbeaud C., Méléard P., Entressangles B. (2001a). *Physical and chemical stability of marine lipid-based liposomes under acid conditions.* **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, *20*, 257-266.

Nacka F., Cansell M., Entressangles B. (2001b). *In vitro* behavior of marine lipid-based liposomes. Influence of pH, temperature, bile salts and phospholipase A₂. **Lipids**, **36**, 35-42.

Nacka F., Cansell M., Méléard P., Combe N. (2001c). Incorporation of α -tocopherol in marine lipid-based liposomes. *In vitro* and *in vivo* studies. **Lipids**, **36**, 1313-1320.

Nara E., Miyashita K., Ota T. (1997). Oxidative stability of liposomes prepared from soybean PC, chicken egg PC and salmon egg PC. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, **61**, 1736-1738.

Norlén L., Nicander I., Lundsjö A., Cronholm T., Forslind B. (1998). A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction. **Archives of Dermatology Research**, **290**, 508-516.

Norlén L., Nicander I., Rozell B.L., Ollmar S., Forslind B. (1999). Inter- and intra-individual differences in human stratum corneum lipid content related to physical parameters of skin barrier function *in vivo*. **The Journal of Investigative Dermatology**, **112**, 72-77.

Ohyashiki T., Karino T., Matsui K. (1993). Stimulation of Fe²⁺-induced lipid peroxidation in phosphatidylcholine liposomes by aluminium ions at physiological pH. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1170**, 182-188.

Ohyashiki T., Nunomura M. (2000). A marked stimulation of Fe³⁺-dependent lipid peroxidation in phospholipid liposomes under acidic conditions. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1484**, 241-250.

Oram J.F., Shafrir E., Bierman E.L. (1980). Triacylglycerol metabolism and triacylglycerol lipase activities of cultured human skin fibroblasts. **Biochimica et Biophysica Acta**, **619**, 214-227.

Osmundsen H., Braud H., Beauseigneur F., Gresti J., Tsoko M., Clouet P. (1998). Effects of dietary treatment of rats with eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid on hepatic metabolism. **Biochemical Journal**, **331**, 153-160.

Parnham M.J., Wetzig H. (1993). Toxicity screening of liposomes. **Chemistry and Physics of Lipids**, **64**, 263-274.

Pei Y., Barber L.A., Murphy R.C., Johnson C.A., Kelley S.W., Dy L.C., Fertel R.H., Nguyen T.M., Williams D.A., Travers J.B. (1998). Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis. **The Journal of Immunology**, **161**, 1954-1961.

Pentland A.P., Mahoney M.G. (1990). Keratinocyte prostaglandin synthesis is enhanced by IL-1. **The Journal of Investigative Dermatology**, **94**, 43-46.

Ponec M., Weerheim A., Kempenaar J., Mommaas A.M., Nugteren D. (1988). *Lipid composition of cultured human keratinocytes in relation to their differentiation.* **Journal of Lipid Research**, *29*, 949-961.

Ponec M., te Pas M.F., Havekes L., Boonstra J., Mommaas A.M., Vermeer B.J. (1992). *LDL receptors in keratinocytes.* **The Journal of Investigative Dermatology**, *98*, 50S-56S.

Popa I., Portoukalian J. (2003). *Relationship between lipids and cutaneous immunity: example of the gangliosides.* **Pathologie Biologie**, *51*, 253-255.

Proksch E., Elias P.M., Feingold K.R. (1990). *Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity in murine epidermis. Modulation of enzyme content and activation state by barrier requirements.* **Journal of Clinical Investigation**, *85*, 874-882.

Pupe A., Moison R., De Haes P., van Henegouwen G.B., Rhodes L., Degreef H., Garmyn M. (2002). *Eicosapentaenoic acid, a n-3 polyunsaturated fatty acid differentially modulates TNF- α , IL-1 α , IL-6 and PGE₂ expression in UVB-irradiated human keratinocytes.* **The Journal of Investigative Dermatology**, *118*, 692-698.

Rambjør G.S., Wålen A.I., Windsor S.L., Harris W.S. (1996). *Eicosapentaenoic acid is primarily responsible for hypotriglyceridemic effect of fish oil in humans.* **Lipids**, *31*, S45-S49.

Ramirez M., Amate L., Gil A. (2001). *Absorption and distribution of dietary fatty acids from different sources.* **Early Human Development**, *65*, S95-S101.

Ranganathan S., Matsuura H., Kottke B.A. (1988). *Studies on the effect of storage of normolipidemic plasma on the metabolism of very-low-density lipoprotein cholesterol in human skin fibroblasts.* **Biochimica et Biophysica Acta**, *959*, 125-129.

Rassner U., Feingold K.R., Crumrine D.A., Elias P.M. (1999). *Coordinate assembly of lipids and enzyme proteins into epidermal lamellar bodies.* **Tissue & Cell**, *31*, 489-498.

Redondo P., Garcia-Foncillas J., Espana A., Cuevillas F., Quintanilla E. (1997). *Differential modulation of IL-8 and TNF-alpha expression in human keratinocytes by buflo-medil chlorhydrate and pentoxifylline.* **Experimental Dermatology**, *6*, 186-194.

Rhodes L.E., O'Farrell S., Jakson M.J., Friedmann P.S. (1994). *Dietary fish-oil supplementation in humans reduces UVB-erythematous sensitivity but increases epidermal lipid peroxidation.* **The Journal of Investigative Dermatology**, *103*, 151-154.

Roche H.M., Gibney M.J. (2000). *Effect of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on fasting and postprandial triacylglycerol metabolism.* **The American Journal of Clinical Nutrition**, *71*, 232S-237S.

Rogers J., Harding C., Mayo A., Banks J., Rawlings A. (1996). *Stratum corneum lipids: the effect of ageing and the seasons.* **Archives of Dermatology Research**, **288**, 765-770.

Saito H., Ishihara K. (1997). *Antioxidant activity and active sites of phospholipids as antioxidants.* **Journal of the American Oil Chemists' Society**, **74**, 1531-1536.

Samuni A.M., Lipman A., Barenholz Y. (2000). *Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration.* **Chemistry and Physics of Lipids**, **105**, 121-134.

Schäfer L., Kragballe K. (1991). *Supplementation with evening primrose oil in atopic dermatitis: effect on fatty acids in neutrophils and epidermis.* **Lipids**, **26**, 557-560.

Schmid M.H., Korting H.C. (1996). *Therapeutic progress with topical liposome drugs for skin disease.* **Advanced Drug Delivery Reviews**, **18**, 335-342.

Song J.H., Fujimoto K., Miyazawa T. (2000). *Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils.* **The Journal of Nutrition**, **130**, 3028-3033.

Sprecher H., Luthria D.L., Mohammed B.S., Baykousheva S.P. (1995). *Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids.* **Journal of Lipid Research**, **36**, 2471-2477.

Subbaiah P.V., Kaufman D., Bagdade J.D. (1993). *Incorporation of dietary n-3 fatty acids into molecular species of phosphatidylcholine and cholesteryl ester in normal human plasma.* **The American Journal of Clinical Nutrition**, **58**, 360-368.

Tanaguchi K., Yamamoto Y., Itakura K., Miichi H., Hayashi S. (1988). *Assessment of ocular irritability of liposome preparations.* **Journal of Pharmacobiodynamics**, **11**, 607-611.

Tocanne J.F., Teissié J. (1990). *Ionization of phospholipids and phospholipid-supported interfacial lateral diffusion of protons in membrane model systems.* **Biochimica et Biophysica Acta**, **1031**, 111-142.

Touitou E., Dayan N., Bergelson L., Godin B., Eliaz M. (2000). *Ethosomes – novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties.* **Journal of Controlled Release**, **65**, 403-418.

Uchiyama N., Yamamoto A., Kameda K., Yamaguchi H., Ito M. (2000). *The activity of fatty acid synthase of epidermal keratinocytes is regulated in the lower stratum spinosum and the stratum basale by local inflammation rather than by circulating hormones.* **Journal of Dermatology Science**, **24**, 134-141.

van den Bergh B., Salomons-de Vries I., Bouwstra J.A. (1998). *Interactions between liposomes and human stratum corneum studied by freeze-substitution electron microscopy.* **International Journal of Pharmaceutics**, **167**, 57-67.

van den Bergh B., Vroom J., Gerritsen H., Junginger H.E., Bouwstra J.A. (1999). *Interactions of elastic and rigid vesicles with human skin in vitro: electron microscopy and two-photon excitation microscopy*. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1461**, 155-173.

Vernooij E.A.A.M., Kettenes-van den Bosch J.J., Underberg W.J.M., Crommelin D.J.A. (2002). *Chemical hydrolysis of DOTAP and DOPE in a liposomal environment*. **Journal of Controlled Release**, **79**, 299-303.

Verstraeten S.V., Oteiza P.I. (1995). *Sc³⁺, Ga³⁺, In³⁺, Y³⁺, and Be²⁺ promote changes in membrane physical properties and facilitate Fe²⁺-initiated lipid peroxidation*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **322**, 284-290.

Verstraeten S.V., Nogueira L.V., Schreier S., Oteiza P.I. (1997). *Effect of trivalent metal ions on phase separation and membrane lipid packing: Role in lipid peroxidation*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **338**, 121-127.

Vicanova J., Weerheim A.M., Kempenaar J.A., Ponc M. (1999). *Incorporation of linoleic acid by cultured human keratinocytes*. **Archives of Dermatology Research**, **291**, 405-412.

Vidgren H.M., Agren J.J., Schwab U., Rissanen T., Hänninen O., Uusitupa M.I.J. (1997). *Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men*. **Lipids**, **32**, 697-705.

Vognild E., Elvevoll E.O., Brox J., Olsen R.L., Barstad H., Aursand M., Østerud B. (1998). *Effects of dietary marine oils and olive oil on fatty acid composition, platelet responses, and serum lipids in healthy humans*. **Lipids**, **33**, 427-436.

Wells T., Basketter D.A., Schröder K.R. (2004). *In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models*. **Toxicology in Vitro**, **18**, 231-243.

Wertz P.W., van den Bergh B. (1998). *The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers*. **Chemistry and Physics of Lipids**, **91**, 85-96.

Wilschut J., Papahadjopoulos D. (1979). *Ca²⁺-induced fusion of phospholipid vesicles monitored by mixing of aqueous contents*. **Nature**, **281**, 690-692.

Wolff R., Combe N., Entressangles B. (1984). *Incorporation et élimination de l'acide élaïdique dans les différents phospholipides des mitochondries ou de leurs membranes chez le rat. Incidence de l'organe et de l'âge*. **Revue Française des Corps Gras**, **31**, 161-170.

Wu D., Meydani M., Leka L.S., Nightingale G., Handelman G.J., Blumberg J.B., Meydani S.N. (1999). *Effect of dietary supplementation with black currant seed oil on the immune response of healthy elderly subjects*. **The American Journal of Clinical Nutrition**, **70**, 536-543.

Xi S., Pham H., Ziboh V.A. (2000). *15-Hydroxyeicosatrienoic acid (15-HETrE) suppresses epidermal hyperproliferation via the modulation of nuclear transcription factor (AP-1) and apoptosis. Archives of Dermatology Research, 292, 397–403.*

Yang B., Kalimo K.O., Tahvonen R.L., Mattila L.M., Katajisto J.K., Kallio H.P. (2000). *Effect of dietary supplementation with sea buckthorn (Hippophaë rhamnoides) seed and pulp oils on the fatty acid composition of skin glycerophospholipids of patients with atopic dermatitis. Journal of Nutrition Biochemistry, 11, 338-340.*

Yoshida H., Kumamaru J., Mawatari M., Ikeda I., Imaizumi K., Tsuji H., Seto A. (1996). *Lymphatic absorption of seal and fish oils and their effect on lipid metabolism and eicosanoid production in rats. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 60, 1293-1298.*

Yoshikawa W., Akutsu H., Kyogoku Y. (1983) *Light-scattering properties of osmotically active liposomes. Biochimica et Biophysica Acta, 735, 397-406.*

Zellmer S., Lasch J. (1997). *Individual variation of human plantar stratum corneum lipids, determined by automated multiple development of high-performance thin-layer chromatography plates. Journal of Chromatography B, 691, 321-329.*

Zellmer S., Reissig D., Lasch J. (1998). *Reconstructed human skin as model for liposome-skin interaction. Journal of Controlled Release, 55, 271-279.*

Ziboh V.A., Cohen K.A., Ellis C.N., Miller C., Hamilton T.A., Kragballe K., Hydrick G.R., Voorhees J.J. (1986). *Effects of dietary supplementation of fish oil on neutrophil and epidermal fatty acids. Archives of Dermatology, 122, 1277-1282.*

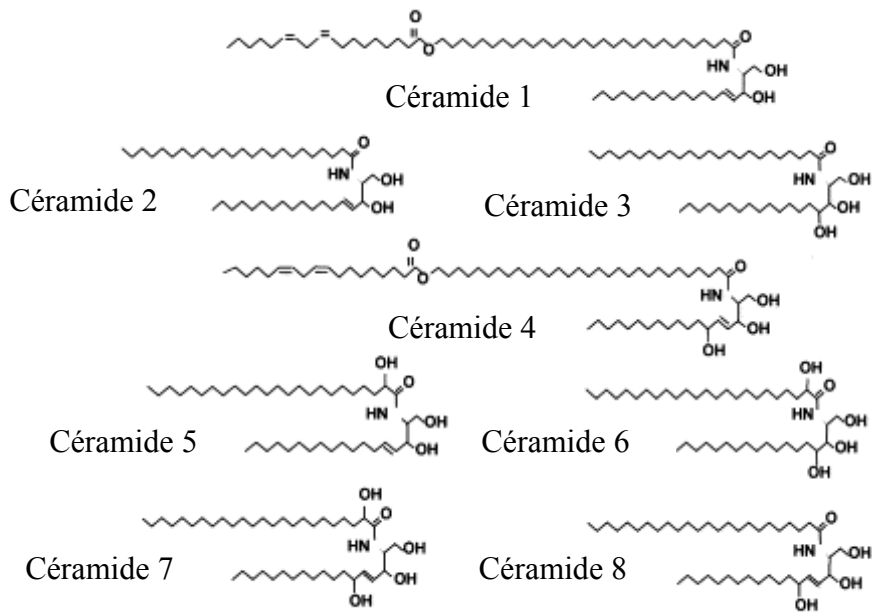
Ziboh V.A. (1996). *The significance of polyunsaturated fatty acids in cutaneous biology. Lipids, 31, S249-S253.*

Ziboh V.A., Miller C.C., Cho Y. (2000). *Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of anti-inflammatory and antiproliferative metabolites. The American Journal of Clinical Nutrition, 71, 361S-366S.*

Zuidam N.J., Crommelin D.J.A. (1995). *Differential scanning calorimetric analysis of dipalmitoylphosphatidylcholine-liposomes upon hydrolysis. International Journal of Pharmaceutics, 126, 209-217.*

Zuidam N.J., Gouw H.K.M.E., Barenholz Y., Crommelin D.J.A. (1995). *Physical (in) stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids. Biochimica et Biophysica Acta, 1240, 101-110.*

Annexes

Annexe 1 : Formules des différents céramides retrouvés au niveau du *stratum corneum*.

Annexe 2 : Evolution en fonction du temps des taux des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides totaux du plasma des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson.

Temps (jour)	0 (N = 7)	1 (N = 6)	2 (N = 5)	3 (N = 7)	4 (N = 6)	7 (N = 4)	13 (N = 7)
14:0	0,9 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,3 ^b	0,8 ± 0,1 ^{ab}	0,9 ± 0,1 ^{ab}	0,7 ± 0,2 ^a
15:0	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1
16:0	21,7 ± 0,5 ^a	24,2 ± 1,3 ^{bc}	27,0 ± 1,8 ^d	22,8 ± 2,6 ^{abc}	24,8 ± 2,6 ^c	23,4 ± 1,6 ^{abc}	22,3 ± 1,2 ^{ab}
17:0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
18:0	7,0 ± 0,4 ^a	10,8 ± 1,6 ^d	9,8 ± 1,3 ^{cd}	8,9 ± 1,1 ^{bc}	10,3 ± 1,8 ^{cd}	8,7 ± 0,8 ^{bc}	8,5 ± 0,5 ^b
20:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
22:0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0
23:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0
24:0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Σ AGS	31,1 ± 0,9^a	37,3 ± 3,1^{cd}	39,2 ± 3,2^d	35,0 ± 3,8^{bc}	37,8 ± 4,2^{cd}	34,9 ± 2,7^{abc}	33,5 ± 1,5^{ab}
14:1 n-5	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0
15:1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
16:1 n-9	1,1 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2
16:1 n-7	4,9 ± 1,1 ^b	5,0 ± 0,7 ^{bc}	5,5 ± 0,9 ^{bc}	3,2 ± 1,3 ^a	4,6 ± 0,6 ^b	5,7 ± 1,1 ^{bc}	6,6 ± 0,9 ^c
17:1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0
18:1 n-9	18,2 ± 1,6 ^{cd}	18,1 ± 1,0 ^c	19,8 ± 2,6 ^{cd}	11,2 ± 2,0 ^a	14,5 ± 1,1 ^b	19,4 ± 2,4 ^{cd}	20,9 ± 3,6 ^d
18:1 n-7	4,1 ± 0,8 ^c	3,9 ± 0,5 ^{bc}	3,7 ± 0,4 ^{bc}	2,5 ± 0,6 ^a	3,1 ± 0,3 ^{ab}	3,7 ± 0,8 ^{bc}	3,8 ± 0,3 ^{bc}
20:1 n-9	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1
20:1 n-7	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1
24:1 n-9	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1
Σ AGMI	29,5 ± 3,4^c	28,9 ± 1,7^c	31,1 ± 3,1^{cd}	18,9 ± 3,4^a	24,1 ± 0,8^b	31,3 ± 3,4^{cd}	33,3 ± 2,8^d

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. Suite du tableau p 173.

Temps (jour)	0 (N = 7)	1 (N = 6)	2 (N = 5)	3 (N = 7)	4 (N = 6)	7 (N = 4)	13 (N = 7)
18:2 n-6	15,0 ± 1,7 ^e	7,2 ± 0,9 ^{cd}	3,8 ± 0,3 ^a	8,4 ± 3,2 ^d	6,1 ± 1,4 ^{bc}	4,9 ± 0,4 ^{ab}	4,6 ± 1,0 ^{ab}
18:3 n-6	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
18:3 n-3	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:2 n-6	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:3 n-9	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0
20:3 n-6	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,1
20:3 n-3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:4 n-6	17,5 ± 1,5 ^c	13,9 ± 1,8 ^b	10,7 ± 1,6 ^a	15,3 ± 2,0 ^b	15,4 ± 0,8 ^{bc}	10,5 ± 1,6 ^a	9,5 ± 1,7 ^a
20:5 n-3	0,6 ± 0,1 ^a	3,5 ± 0,9 ^b	6,6 ± 1,9 ^{cd}	8,3 ± 1,3 ^d	6,1 ± 1,1 ^c	8,4 ± 1,1 ^d	10,2 ± 2,0 ^e
22:4 n-6	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
22:5 n-6	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
22:5 n-3	0,5 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,2 ^{bc}	0,8 ± 0,2 ^{ab}	2,1 ± 0,5 ^e	1,3 ± 0,3 ^{cd}	1,4 ± 0,3 ^d	1,3 ± 0,2 ^{cd}
22:6 n-3	2,6 ± 0,3 ^a	6,1 ± 0,9 ^b	6,4 ± 0,7 ^b	10,1 ± 1,3 ^d	7,7 ± 1,3 ^c	7,2 ± 1,2 ^{bc}	6,5 ± 0,9 ^b
Σ AGPI	39,4 ± 3,0 ^d	33,8 ± 2,7 ^b	29,7 ± 3,5 ^a	46,1 ± 3,7 ^e	38,1 ± 3,8 ^{cd}	33,8 ± 2,2 ^{abc}	33,2 ± 3,1 ^{ab}
Σ n-6	34,7 ± 2,8 ^c	22,4 ± 1,9 ^b	15,4 ± 2,0 ^a	24,9 ± 3,7 ^b	22,4 ± 2,0 ^b	16,3 ± 1,4 ^a	14,8 ± 1,4 ^a
Σ n-3	4,5 ± 0,6 ^a	11,0 ± 1,4 ^b	13,9 ± 2,6 ^c	21,0 ± 2,4 ^f	15,4 ± 2,6 ^{cd}	17,3 ± 2,2 ^{de}	18,2 ± 2,4 ^e
n-6/n-3	7,8 ± 1,0 ^d	2,1 ± 0,3 ^c	1,1 ± 0,3 ^{ab}	1,2 ± 0,2 ^{ab}	1,5 ± 0,2 ^b	1,0 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,1 ^a

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. N : nombre de rats.

Annexe 3 : Evolution des taux des acides gras des lipides totaux du tissu adipeux (% en poids des acides gras totaux) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.

Acides gras	Rats		
	Témoin (N = 7)	Régime huile (N = 3)	Régime Marinosomes (N = 5)
14:0	1,6 ± 0,2 ^a	2,1 ± 0,1 ^c	1,8 ± 0,1 ^b
15:0	0,3 ± 0,0 ^c	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^b
16:0 iso	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^b
16:0	23,0 ± 0,6 ^a	33,5 ± 0,9 ^c	30,3 ± 1,7 ^b
17:0	0,2 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
18:0 DMA	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^b
18:0	3,0 ± 0,2 ^a	4,9 ± 0,8 ^c	3,7 ± 0,6 ^b
20:0	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^a
Σ AGS	28,1 ± 0,8 ^a	40,7 ± 0,6 ^c	36,2 ± 2,2 ^b
14:1 n-5	0,2 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,0 ^b	0,2 ± 0,0 ^{ab}
16:1 n-9	0,3 ± 0,0 ^c	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^b
16:1 n-7	6,3 ± 0,4 ^a	10,8 ± 1,1 ^b	11,9 ± 0,9 ^b
17:1	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^b
18:1 n-9	23,5 ± 1,3 ^a	32,9 ± 2,7 ^b	32,1 ± 1,4 ^b
18:1 n-7	2,9 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,2 ^a	3,8 ± 0,4 ^b
20:1 n-9	0,3 ± 0,1 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^b
20:1 n-7	0,2 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^{ab}
Σ AGMI	33,8 ± 1,8 ^a	47,8 ± 2,4 ^b	48,9 ± 2,8 ^b
18:2 n-6	32,9 ± 2,0 ^c	9,1 ± 1,0 ^a	13,2 ± 1,6 ^b
18:3 n-6	0,2 ± 0,1 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
18:3 n-3	3,0 ± 0,2 ^b	0,6 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,2 ^a
20:2 n-6	0,3 ± 0,1 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
20:3 n-6	0,2 ± 0,1 ^b	0,0 ± 0,0 ^{ab}	0,0 ± 0,0 ^a
20:4 n-6	0,9 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,1 ^a
20:5 n-3	0,0 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,2 ^c	0,1 ± 0,1 ^b
22:4 n-6	0,2 ± 0,1 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
22:5 n-3	0,1 ± 0,1 ^{ab}	0,2 ± 0,1 ^b	0,0 ± 0,0 ^a
22:6 n-3	0,3 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,5 ^b	0,4 ± 0,1 ^a
Σ AGPI	38,1 ± 2,3 ^c	11,4 ± 2,0 ^a	14,9 ± 1,9 ^b
Σ AGPI n-6	34,7 ± 2,1 ^c	9,5 ± 1,0 ^a	13,5 ± 1,6 ^b
Σ AGPI n-3	3,4 ± 0,3 ^b	2,0 ± 1,0 ^a	1,4 ± 0,4 ^a
n-6/n-3	10,3 ± 0,7 ^b	5,7 ± 2,6 ^a	9,9 ± 1,5 ^b

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. DMA : diméthylacétal.

Annexe 4 : Evolution des taux des acides gras des lipides totaux du foie (% en poids des acides gras totaux) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.

Acides gras	Rats		
	Témoin (N = 6)	Régime huile (N = 5)	Régime Marinosomes® (N = 4)
14:0	0,5 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a
15:0	0,1 ± 0,0 ^{ab}	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^b
16:0 DMA	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^b	0,2 ± 0,0 ^b
16:0	24,9 ± 3,2 ^a	26,2 ± 0,6 ^a	25,2 ± 1,2 ^a
17:0 iso	0,1 ± 0,0 ^c	0,1 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^a
17:0	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
18:0 DMA	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,1 ^{ab}
18:0	14,9 ± 1,2 ^a	14,9 ± 1,0 ^a	15,4 ± 1,3 ^a
20:0	0,1 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
22:0	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^a
23:0	0,1 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^a
24:0	0,4 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,1 ^c	0,1 ± 0,1 ^a
Σ AGS	41,5 ± 3,2 ^a	43,2 ± 0,7 ^a	42,0 ± 0,7 ^a
15:1	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^b
16:1 n-9	0,5 ± 0,2 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,1 ^a
16:1 n-7	3,7 ± 0,7 ^a	5,8 ± 0,9 ^b	4,2 ± 1,1 ^a
17:1	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
18:1 DMA	0,1 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^a
18:1 n-9	13,4 ± 5,0 ^a	13,3 ± 1,4 ^a	13,0 ± 1,6 ^a
18:1 n-7	4,7 ± 0,5 ^b	4,5 ± 0,4 ^b	3,6 ± 0,5 ^a
20:1 n-9	0,1 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^{ab}
20:1 n-7	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,1 ^b
22:1 n-9	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^b
24:1 n-9	0,3 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^a
Σ AGMI	23,0 ± 5,6 ^a	24,7 ± 1,6 ^a	21,8 ± 3,3 ^a
18:2 n-6	8,9 ± 2,7 ^b	3,2 ± 0,5 ^a	5,3 ± 0,9 ^a
18:3 n-6	0,2 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
18:3 n-3	0,2 ± 0,1 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
20:2 n-6	0,6 ± 0,2 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
20:3 n-9	0,2 ± 0,1 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
20:3 n-6	0,9 ± 0,2 ^b	0,5 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^a
20:4 n-6	16,9 ± 3,3 ^c	8,2 ± 0,7 ^a	12,0 ± 1,3 ^b
20:3 n-3	0,1 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
20:5 n-3	0,4 ± 0,1 ^a	6,8 ± 0,5 ^c	3,8 ± 0,5 ^b
22:4 n-6	0,5 ± 0,2 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
22:5 n-6	0,7 ± 0,2 ^c	0,1 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1 ^b
22:5 n-3	0,6 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,2 ^c	1,3 ± 0,2 ^b
22:6 n-3	5,4 ± 0,9 ^a	10,8 ± 1,3 ^b	12,3 ± 1,5 ^b
Σ AGPI	35,5 ± 7,1 ^a	32,0 ± 1,7 ^a	36,2 ± 3,2 ^a
Σ AGPI n-6	28,6 ± 6,0 ^c	12,2 ± 1,1 ^a	18,6 ± 2,3 ^b
Σ AGPI n-3	6,7 ± 1,2 ^a	19,7 ± 1,7 ^b	17,5 ± 1,7 ^b
n-6/n-3	4,3 ± 0,2 ^c	0,6 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,1 ^b

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).
 N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ;
 Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. DMA : diméthylacétal.

Annexe 5 : Evolution en fonction du temps des taux des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides totaux du plasma des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec les Marinosomes®.

Temps (jour)	0 (N = 7)	1 (N = 6)	2 (N = 6)	3 (N = 6)	4 (N = 8)	7 (N = 12)	13 (N = 6)
14:0	0,9 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,2 ^{ab}	0,9 ± 0,2 ^{ab}	1,0 ± 0,1 ^b	0,9 ± 0,2 ^{ab}	0,8 ± 0,1 ^a
15:0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
16:0	21,7 ± 0,5 ^{ab}	21,2 ± 2,5 ^a	24,2 ± 3,2 ^{bc}	24,8 ± 3,9 ^c	26,5 ± 1,9 ^c	24,6 ± 1,9 ^c	24,7 ± 0,9 ^c
17:0	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,6	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,0
18:0	7,0 ± 0,4 ^a	9,2 ± 0,9 ^c	8,9 ± 2,0 ^{bc}	7,8 ± 1,4 ^{ab}	8,6 ± 0,9 ^{bc}	7,8 ± 1,2 ^{ab}	7,6 ± 0,5 ^{ab}
20:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
22:0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
23:0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
24:0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1
ΣAGS	31,1 ± 0,9^a	33,7 ± 2,6^{ab}	35,6 ± 4,4^{bc}	35,2 ± 3,9^{bc}	38,0 ± 2,0^c	35,2 ± 2,6^b	34,6 ± 0,8^b
14:1 n-5	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
15:1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
16:1 n-9	1,1 ± 0,3 ^c	0,7 ± 0,2 ^b	0,8 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,3 ^b	0,6 ± 0,1 ^b
16:1 n-7	4,9 ± 1,1 ^{ab}	4,2 ± 1,1 ^a	5,2 ± 1,6 ^{ab}	5,8 ± 2,0 ^b	7,8 ± 1,8 ^c	5,7 ± 1,4 ^b	5,8 ± 1,1 ^{ab}
17:1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0
18:1 n-9	18,2 ± 1,6 ^{bc}	16,0 ± 3,3 ^{ab}	14,9 ± 2,2 ^a	16,0 ± 2,1 ^{ab}	17,0 ± 1,0 ^{abc}	17,9 ± 2,9 ^{bc}	19,2 ± 1,8 ^c
18:1 n-7	4,1 ± 0,8 ^{bcd}	3,9 ± 1,0 ^{abc}	4,1 ± 0,6 ^{bcd}	4,4 ± 1,1 ^{cd}	4,9 ± 0,8 ^d	3,3 ± 0,7 ^a	3,3 ± 0,4 ^{ab}
20:1 n-9	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0
20:1 n-7	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2
24:1 n-9	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,0
ΣAGMI	29,5 ± 3,4^{abc}	26,3 ± 4,8^a	26,6 ± 3,7^{ab}	28,9 ± 3,6^{abc}	32,3 ± 2,9^c	29,7 ± 4,5^{abc}	30,8 ± 2,6^{bc}

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. Suite du tableau p 177.

Temps (jour)	0 (N = 7)	1 (N = 6)	2 (N = 6)	3 (N = 6)	4 (N = 8)	7 (N = 12)	13 (N = 6)
18:2 n-6	15,0 ± 1,7^d	11,1 ± 2,3^c	8,0 ± 1,9^b	7,2 ± 3,4^{ab}	5,2 ± 1,0^a	7,0 ± 2,2^{ab}	6,0 ± 1,4^{ab}
18:3 n-6	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
18:3 n-3	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,4	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1
20:2 n-6	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0
20:3 n-9	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:3 n-6	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
20:3 n-3	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0
20:4 n-6	17,5 ± 1,5^c	19,1 ± 3,6^c	18,7 ± 2,8^c	13,9 ± 0,6^{ab}	14,6 ± 2,1^b	11,8 ± 2,9^a	12,7 ± 1,8^{ab}
20:5 n-3	0,6 ± 0,1^a	1,5 ± 0,3^{ab}	2,1 ± 0,7^{bc}	2,8 ± 1,3^c	2,4 ± 0,8^c	4,5 ± 1,0^d	5,4 ± 0,8^d
22:4 n-6	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
22:5 n-6	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
22:5 n-3	0,5 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^{ab}	0,9 ± 0,2 ^{bc}	1,1 ± 0,5 ^c	0,6 ± 0,1 ^{ab}	0,9 ± 0,2 ^c	1,0 ± 0,1 ^c
22:6 n-3	2,6 ± 0,3^a	5,1 ± 0,6^b	6,2 ± 1,4^b	8,6 ± 3,1^c	5,1 ± 0,6^b	9,3 ± 1,6^c	8,4 ± 1,2^c
ΣAGPI	39,4 ± 3,0^{bc}	39,9 ± 5,3^c	37,8 ± 5,3^{bc}	35,9 ± 6,9^{bc}	29,7 ± 2,3^a	35,1 ± 3,8^b	34,7 ± 2,6^b
Σ n-6	34,7 ± 2,8^c	31,6 ± 4,6^{bc}	28,1 ± 4,1^b	22,6 ± 3,8^a	20,9 ± 2,2^a	19,9 ± 3,7^a	19,5 ± 2,6^a
Σ n-3	4,5 ± 0,6^a	8,1 ± 1,1^b	9,5 ± 2,0^b	12,9 ± 4,8^c	8,3 ± 1,2^b	15,1 ± 2,4^c	15,0 ± 1,9^c
n-6/n-3	7,8 ± 1,0^e	3,9 ± 0,5^d	3,0 ± 0,6^c	1,9 ± 0,5^b	2,6 ± 0,5^c	1,4 ± 0,4^a	1,3 ± 0,3^{ab}

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Annexe 6a : Evolution de la concentration des acides gras des triglycérides du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes[®].

Acides gras	Rats		
	Témoin	Régime huile	Régime Marinosomes [®]
14:0	3,8 ± 0,3 ^b	2,6 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,1 ^b
15:0	1,8 ± 0,4 ^a	1,7 ± 0,8 ^a	2,2 ± 0,5 ^a
16:0	96,4 ± 6,2 ^b	55,0 ± 1,8 ^a	67,2 ± 11,2 ^a
17:0	0,9 ± 0,4 ^a	1,1 ± 0,4 ^a	0,9 ± 0,2 ^a
18:0	8,1 ± 2,3 ^a	6,3 ± 0,6 ^a	6,7 ± 1,8 ^a
20:0	0,3 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,6 ^{ab}	1,5 ± 0,0 ^b
22:0	0,1 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
23:0	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,3 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
24:0	0,1 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,8 ^a	0,2 ± 0,4 ^a
Σ AGS	111,4 ± 9,5^b	68,1 ± 3,0^a	82,3 ± 14,2^a
14:1 n-5	0,3 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,8 ^a	0,2 ± 0,2 ^a
15:1	0,1 ± 0,2 ^a	0,2 ± 0,3 ^a	0,3 ± 0,3 ^a
16:1 n-9	4,7 ± 0,9 ^b	1,8 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,3 ^a
16:1 n-7	26,1 ± 8,4 ^a	18,3 ± 1,6 ^a	21,6 ± 5,0 ^a
17:1	1,0 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,0 ^a
18:1 n-9	118,6 ± 4,9 ^b	67,0 ± 6,3 ^a	76,3 ± 21,5 ^a
18:1 n-7	21,2 ± 5,6 ^b	11,2 ± 0,8 ^a	14,7 ± 4,4 ^{ab}
20:1 n-9	1,0 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,6 ^a	1,5 ± 0,4 ^a
20:1 n-7	1,3 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,4 ^a	3,0 ± 1,0 ^b
24:1 n-9	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
Σ AGMI	174,2 ± 8,4^b	101,5 ± 4,8^a	121,2 ± 33,2^a
18:2 n-6	88,3 ± 3,3 ^b	3,9 ± 3,5 ^a	8,7 ± 1,0 ^a
18:3 n-6	2,8 ± 1,3 ^b	0,3 ± 0,4 ^a	0,3 ± 0,0 ^a
18:3 n-3	3,9 ± 0,5 ^b	0,9 ± 0,4 ^a	0,6 ± 0,0 ^a
20:2 n-6	0,7 ± 0,3 ^a	0,3 ± 0,3 ^a	0,2 ± 0,2 ^a
20:3 n-9	1,0 ± 0,3 ^a	0,2 ± 0,4 ^a	0,4 ± 0,5 ^a
20:3 n-6	2,0 ± 1,0 ^a	2,4 ± 1,1 ^a	1,0 ± 1,4 ^a
20:4 n-6	6,5 ± 0,9 ^b	1,2 ± 0,3 ^a	2,4 ± 0,4 ^a
20:5 n-3	1,0 ± 0,1 ^a	4,5 ± 0,8 ^b	3,3 ± 0,4 ^b
22:4 n-6	1,0 ± 0,7 ^a	0,3 ± 0,3 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
22:5 n-6	0,5 ± 0,0 ^b	0,2 ± 0,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
22:5 n-3	1,2 ± 0,0 ^a	3,3 ± 0,7 ^b	2,0 ± 0,5 ^{ab}
22:6 n-3	3,1 ± 0,5 ^a	11,7 ± 2,9 ^b	19,2 ± 2,7 ^c
Σ AGPI	112,2 ± 0,8^b	29,3 ± 6,3^a	38,0 ± 4,9^a
Σ n-6	101,9 ± 1,1^b	8,7 ± 3,6^a	12,6 ± 3,1^a
Σ n-3	9,3 ± 0,1^a	20,3 ± 4,0^b	25,1 ± 3,6^b
n-6/n-3	11,0 ± 0,2^b	0,4 ± 0,2^a	0,5 ± 0,2^a
Σ AG	397,7 ± 0,4^b	198,8 ± 2,0^a	241,6 ± 47,4^a

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).
 Nombre de rats = 3. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ;
 Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Annexe 6b : Evolution du taux des acides gras des triglycérides du plasma (% en poids par rapport aux acides gras totaux) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes®.

Acides gras	Rats		
	Témoin	Régime huile	Régime Marinosomes®
14:0	1,0 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,2 ^{ab}	1,5 ± 0,2 ^b
15:0	0,4 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,4 ^a	0,9 ± 0,0 ^a
16:0	24,2 ± 1,5 ^a	27,7 ± 0,8 ^b	27,9 ± 0,8 ^b
17:0	0,2 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,2 ^a	0,4 ± 0,0 ^a
18:0	2,0 ± 0,6 ^a	3,1 ± 0,3 ^b	2,8 ± 0,2 ^{ab}
20:0	0,1 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,3 ^a	0,6 ± 0,1 ^a
22:0	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
23:0	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
24:0	0,0 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,4 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
Σ AGS	28,0 ± 2,4^a	34,2 ± 1,3^b	34,2 ± 0,8^b
14:1 n-5	0,1 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,4 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
15:1	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
16:1 n-9	1,2 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,1 ^a
16:1 n-7	6,6 ± 2,1 ^a	9,2 ± 0,8 ^a	8,9 ± 0,3 ^a
17:1	0,3 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
18:1 n-9	29,8 ± 1,2 ^a	33,7 ± 3,0 ^a	31,3 ± 2,8 ^a
18:1 n-7	5,3 ± 1,4 ^a	5,6 ± 0,4 ^a	6,0 ± 0,6 ^a
20:1 n-9	0,3 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,3 ^a	0,6 ± 0,1 ^a
20:1 n-7	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,2 ^b
24:1 n-9	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
Σ AGMI	43,8 ± 2,1^a	51,0 ± 2,0^b	49,8 ± 4,0^{ab}
18:2 n-6	22,2 ± 0,8^b	2,0 ± 1,8^a	3,6 ± 0,3^a
18:3 n-6	0,7 ± 0,3 ^b	0,2 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
18:3 n-3	1,0 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,2 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
20:2 n-6	0,2 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
20:3 n-9	0,2 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,2 ^a
20:3 n-6	0,5 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,5 ^a	0,4 ± 0,5 ^a
20:4 n-6	1,6 ± 0,2^b	0,6 ± 0,2^a	1,0 ± 0,0^a
20:5 n-3	0,2 ± 0,0^a	2,3 ± 0,4^b	1,4 ± 0,4^b
22:4 n-6	0,3 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
22:5 n-6	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
22:5 n-3	0,3 ± 0,0 ^a	1,6 ± 0,4 ^b	0,9 ± 0,4 ^{ab}
22:6 n-3	0,8 ± 0,1^a	5,9 ± 1,5^b	8,2 ± 2,7^b
Σ AGPI	28,2 ± 0,2^b	14,7 ± 3,3^a	16,0 ± 3,1^a
Σ n-6	25,6 ± 0,3^b	4,4 ± 1,8^a	5,2 ± 0,3^a
Σ n-3	2,3 ± 0,0^a	10,2 ± 2,1^b	10,7 ± 3,6^b
n-6/n-3	11,0 ± 0,2^b	0,4 ± 0,2^a	0,5 ± 0,2^a

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).
 Nombre de rats = 3. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ;
 Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Annexe 7a : Evolution de la concentration des acides gras des phospholipides du plasma (en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.

Acides gras	Rats		
	Témoin	Régime huile	Régime Marinosomes®
14:0	1,7 ± 0,6 ^a	1,0 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,1 ^a
15:0	0,9 ± 0,1 ^{ab}	0,6 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,2 ^b
16:0 DMA	0,7 ± 0,2 ^b	0,5 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,0 ^c
16:0	103,6 ± 15,7 ^{ab}	75,8 ± 5,6 ^a	111,5 ± 23,3 ^b
17:0 iso	0,2 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,1 ^a
17:0	1,2 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,3 ^a	1,3 ± 0,1 ^a
18:0 DMA	1,8 ± 1,3 ^a	0,3 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,2 ^a
18:0	77,8 ± 14,9 ^b	54,9 ± 5,7 ^a	67,9 ± 3,9 ^{ab}
20:0	0,8 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,3 ^a
22:0	3,0 ± 0,3 ^b	1,8 ± 0,1 ^a	2,2 ± 0,3 ^a
23:0	1,6 ± 0,2 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,7 ^a
24:0	7,2 ± 1,2 ^b	4,8 ± 0,4 ^a	6,3 ± 0,8 ^{ab}
Σ AGS	200,4 ± 32,3^b	142,6 ± 10,1^a	195,3 ± 29,0^b
14:1 n-5	0,1 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,2 ^a
15:1	0,2 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,3 ^a
16:1 n-9	1,1 ± 0,3 ^a	0,8 ± 0,3 ^a	1,0 ± 0,2 ^a
16:1 n-7	5,6 ± 1,9 ^a	6,2 ± 0,3 ^a	9,1 ± 2,6 ^a
17:1	0,3 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a
18:1 DMA	0,8 ± 0,3 ^{ab}	0,7 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,2 ^b
18:1 n-9	39,4 ± 9,5 ^{ab}	29,5 ± 1,5 ^a	53,2 ± 11,6 ^b
18:1 n-7	17,2 ± 4,8 ^b	10,8 ± 0,9 ^a	13,0 ± 1,9 ^{ab}
20:1 n-9	0,8 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,3 ^c
20:1 n-7	1,5 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,6 ^a
24:1 n-9	9,5 ± 2,2 ^b	5,0 ± 0,7 ^a	8,4 ± 1,4 ^b
Σ AGMI	76,4 ± 16,9^{ab}	55,4 ± 1,7^a	90,2 ± 16,6^b
18:2 n-6	34,9 ± 3,6 ^c	12,3 ± 3,5 ^a	23,0 ± 2,3 ^b
18:3 n-6	0,3 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,2 ^a
18:3 n-3	0,3 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a
20:2 n-6	1,6 ± 0,4 ^b	0,4 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,2 ^a
20:3 n-9	4,1 ± 2,0 ^b	0,5 ± 0,3 ^a	1,5 ± 0,2 ^a
20:3 n-6	6,5 ± 1,2 ^b	2,9 ± 0,4 ^a	4,1 ± 0,3 ^a
20:4 n-6	64,5 ± 15,3 ^b	28,3 ± 2,6 ^a	49,8 ± 0,2 ^b
20:5 n-3	1,1 ± 0,5 ^a	20,3 ± 3,2 ^b	16,5 ± 2,0 ^b
22:4 n-6	3,7 ± 1,2 ^b	0,5 ± 0,0 ^a	1,4 ± 0,2 ^a
22:5 n-6	4,5 ± 1,5 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,1 ^a
22:5 n-3	2,1 ± 0,2 ^a	6,0 ± 1,6 ^b	4,6 ± 0,1 ^b
22:6 n-3	19,2 ± 4,3 ^a	29,2 ± 5,6 ^b	40,0 ± 2,0 ^c
Σ AGPI	142,8 ± 28,5^b	101,7 ± 11,9^a	143,1 ± 2,7^b
Σ n-6	116,1 ± 22,3^c	45,1 ± 6,4^a	80,1 ± 2,6^b
Σ n-3	22,7 ± 4,8^a	56,1 ± 9,8^b	61,6 ± 1,9^b
n-6/n-3	5,1 ± 0,1^c	0,8 ± 0,2^a	1,3 ± 0,0^b
Σ AG	419,7 ± 76,7^b	299,7 ± 23,0^a	428,6 ± 44,6^b

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). Nombre de rats = 3. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. DMA : diméthylacétal.

Annexe 7b : Evolution du taux des acides gras des phospholipides du plasma (% en poids par rapport aux acides gras totaux) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.

Acides gras	Rats		
	Témoin	Régime huile	Régime Marinosomes®
14:0	0,4 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a
15:0	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
16:0 DMA	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
16:0	24,8 ± 0,9 ^a	25,3 ± 1,2 ^a	25,8 ± 2,9 ^a
17:0 iso	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
17:0	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a
18:0 DMA	0,5 ± 0,4 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
18:0	18,5 ± 0,7 ^b	18,3 ± 0,7 ^b	15,9 ± 0,8 ^a
20:0	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,1 ^a
22:0	0,7 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,1 ^{ab}	0,5 ± 0,0 ^a
23:0	0,4 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1 ^a
24:0	1,7 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,3 ^a	1,5 ± 0,1 ^a
Σ AGS	47,9 ± 1,7^a	47,6 ± 0,7^a	45,5 ± 2,5^a
14:1 n-5	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
15:1	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
16:1 n-9	0,3 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
16:1 n-7	1,3 ± 0,3 ^a	2,1 ± 0,2 ^b	2,1 ± 0,4 ^b
17:1	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
18:1 DMA	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^{ab}	0,3 ± 0,0 ^b
18:1 n-9	9,4 ± 1,0 ^a	9,9 ± 0,6 ^{ab}	12,4 ± 2,2 ^b
18:1 n-7	4,1 ± 0,6 ^b	3,6 ± 0,3 ^{ab}	3,0 ± 0,1 ^a
20:1 n-9	0,2 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^b
20:1 n-7	0,4 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,1 ^a
24:1 n-9	2,2 ± 0,1 ^b	1,7 ± 0,4 ^a	2,0 ± 0,1 ^{ab}
Σ AGMI	18,1 ± 0,8^a	18,5 ± 1,0^a	21,0 ± 2,4^a
18:2 n-6	8,4 ± 0,8^b	4,1 ± 1,0^a	5,4 ± 0,2^a
18:3 n-6	0,1 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
18:3 n-3	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^{ab}
20:2 n-6	0,4 ± 0,1 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
20:3 n-9	0,9 ± 0,4 ^b	0,2 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a
20:3 n-6	1,6 ± 0,1 ^b	1,0 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,0 ^a
20:4 n-6	15,3 ± 1,5^b	9,5 ± 0,6^a	11,7 ± 1,2^a
20:5 n-3	0,3 ± 0,1^a	6,8 ± 0,9^c	3,9 ± 0,8^b
22:4 n-6	0,9 ± 0,2 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^a
22:5 n-6	1,0 ± 0,2 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
22:5 n-3	0,5 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,5 ^c	1,1 ± 0,1 ^b
22:6 n-3	4,5 ± 0,3^a	9,7 ± 1,3^b	9,4 ± 0,6^b
Σ AGPI	34,0 ± 1,4^a	33,9 ± 1,6^a	33,6 ± 2,8^a
Σ n-6	27,7 ± 1,3^c	15,0 ± 1,5^a	18,8 ± 1,3^b
Σ n-3	5,4 ± 0,3^a	18,7 ± 2,5^c	14,5 ± 1,5^b
n-6/n-3	5,1 ± 0,1^c	0,8 ± 0,2^a	1,3 ± 0,0^b

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). Nombre de rats = 3. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. DMA : diméthylacétal.

Annexe 8a: Evolution des taux des acides gras des esters de cholestérol du plasma (% en poids des acides gras totaux) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes®.

Acides gras	Rats		
	Témoin ^α	Régime huile ^β	Régime Marinosomes ^γ
14:0	0,6 ^a	0,6 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^a
15:0	0,4 ^a	0,4 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,0 ^a
16:0 iso	0,2 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a
16:0	9,6 ^a	10,6 ± 0,4 ^a	14,6 ± 1,4 ^b
17:0	0,1 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
18:0	1,1 ^a	0,8 ± 0,0 ^a	1,6 ± 0,4 ^b
24:0	0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
Σ AGS	12,1 ^b	12,8 ± 0,7 ^a	17,6 ± 1,7 ^a
16:1 n-9	2,3 ^a	1,0 ± 0,0 ^a	0,9 ± 0,2 ^b
16:1 n-7	7,5 ^b	11,5 ± 1,3 ^a	9,6 ± 3,8 ^a
17:1	0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,2 ^a
18:1 n-9	12,7 ^a	14,5 ± 0,6 ^a	18,8 ± 0,5 ^a
18:1 n-7	2,2 ^a	2,4 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,0 ^c
20:1 n-9	0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^b
Σ AGMI	24,8 ^a	29,5 ± 0,7 ^a	32,5 ± 3,3 ^a
18:2 n-6	8,5 ^a	4,2 ± 0,3 ^{ab}	5,7 ± 0,3 ^b
18:3 n-6	1,0 ^c	0,2 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^b
18:3 n-3	0,1 ^b	0,1 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,3 ^a
20:3 n-9	0,9 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
20:3 n-6	0,5 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
20:4 n-6	49,3 ^b	22,1 ± 1,2 ^a	27,1 ± 0,0 ^a
20:5 n-3	0,9 ^c	26,8 ± 0,9 ^a	12,3 ± 0,7 ^b
22:5 n-3	0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^c	0,1 ± 0,2 ^b
22:6 n-3	2,0 ^a	3,8 ± 0,5 ^a	3,9 ± 0,6 ^a
Σ AGPI	63,1 ^a	57,7 ± 1,3 ^b	49,9 ± 1,6 ^b
Σ AGPI n-6	59,2 ^c	26,7 ± 1,5 ^b	33,1 ± 0,3 ^a
Σ AGPI n-3	3,0 ^c	30,9 ± 0,2 ^a	16,6 ± 1,4 ^b
n-6/n-3	19,6 ^a	0,9 ± 0,1 ^c	2,0 ± 0,1 ^b

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. α : pool de 3 échantillons avant méthylation. β : moyenne de 2 pools de 3 et 4 échantillons avant méthylation. γ : moyenne de 2 pools de 2 échantillons avant méthylation. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Annexe 8b: Evolution des concentrations des acides gras des esters de cholestérol du plasma (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats témoins et des rats après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou les Marinosomes[®].

Acides gras	Rats		
	Témoin ^α	Régime huile ^β	Régime Marinosomes ^{®γ}
14:0	1,4 ^b	0,5 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,0 ^a
15:0	1,0 ^b	0,3 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1 ^a
16:0 iso	0,5 ^b	0,3 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,0 ^{ab}
16:0	23,9 ^b	9,1 ± 1,2 ^a	18,5 ± 5,8 ^{ab}
17:0	0,2 ^{ab}	0,1 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^b
18:0	2,6 ^b	0,7 ± 0,0 ^a	2,0 ± 0,9 ^{ab}
24:0	0,4 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
Σ AGS	30,1 ^b	11,1 ± 1,6 ^a	22,2 ± 6,9 ^{ab}
16:1 n-9	5,7 ^c	0,9 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,0 ^b
16:1 n-7	18,6 ^b	10,0 ± 2,1 ^a	11,5 ± 2,1 ^a
17:1	0,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,3 ^a
18:1 n-9	31,5 ^b	12,5 ± 0,6 ^a	23,6 ± 5,8 ^b
18:1 n-7	5,5 ^c	2,1 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,8 ^b
20:1 n-9	0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
Σ AGMI	61,5 ^c	25,5 ± 3,0 ^a	40,1 ± 4,7 ^b
18:2 n-6	21,0 ^c	3,6 ± 0,0 ^a	7,2 ± 1,9 ^b
18:3 n-6	2,4 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
18:3 n-3	0,3 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,4 ^a
20:3 n-9	2,2 ^c	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^b
20:3 n-6	1,1 ^c	0,2 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,0 ^b
20:4 n-6	122,4 ^c	19,0 ± 0,8 ^a	33,8 ± 7,4 ^b
20:5 n-3	2,3 ^a	23,2 ± 2,9 ^b	15,5 ± 4,2 ^b
22:5 n-3	0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,2 ^a
22:6 n-3	4,9 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	4,9 ± 1,9 ^a
Σ AGPI	156,6 ^b	49,7 ± 3,5 ^a	62,6 ± 15,7 ^a
Σ AGPI n-6	146,9 ^c	22,9 ± 0,8 ^a	41,4 ± 9,4 ^b
Σ AGPI n-3	7,5 ^a	26,6 ± 2,7 ^b	21,0 ± 6,3 ^b
n-6/n-3	19,6 ^c	0,9 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,1 ^b
Σ AG	248,2 ^b	86,2 ± 8,1 ^a	124,9 ± 27,4 ^a

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. α : pool de 3 échantillons avant méthylation. β : moyenne de 2 pools de 3 et 4 échantillons avant méthylation. γ : moyenne de 2 pools de 2 échantillons avant méthylation. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Annexe 9 : Evolution en fonction du temps des taux des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides des globules rouges des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec un mélange lipidique à base d'huile de poisson.

Temps (jour)	0 (N = 7)	2 (N = 4)	3 (N = 6)	4 (N = 5)	7 (N = 4)	13 (N = 7)
14:0	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,9 ± 0,2
15:0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0
16:0 DMA	1,6 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,4 ^b	1,7 ± 0,2 ^a	1,9 ± 0,6 ^{ab}	1,8 ± 0,3 ^{ab}	1,8 ± 0,2 ^{ab}
16:0	28,3 ± 1,1 ^a	29,5 ± 1,2 ^{abc}	29,0 ± 1,9 ^{ab}	30,6 ± 1,6 ^{bc}	31,0 ± 1,0 ^c	29,9 ± 0,8 ^{bc}
17:0 iso	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
17:0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1
18:0 DMA	1,1 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,8 ^b	1,2 ± 0,1 ^{ab}	1,5 ± 0,8 ^{ab}	1,2 ± 0,4 ^{ab}	1,1 ± 0,1 ^{ab}
18:0	13,2 ± 0,4 ^{bc}	11,9 ± 0,3 ^a	13,5 ± 0,5 ^c	12,9 ± 0,4 ^b	12,7 ± 0,5 ^b	11,9 ± 0,3 ^a
20:0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
22:0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1
23:0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
24:0	2,2 ± 0,2 ^b	2,2 ± 0,1 ^b	2,2 ± 0,4 ^b	2,2 ± 0,3 ^b	2,4 ± 0,3 ^b	1,8 ± 0,3 ^a
Σ AGS	48,9 ± 1,4 ^a	50,5 ± 1,2 ^{abc}	50,2 ± 2,0 ^{ab}	52,1 ± 1,4 ^c	51,9 ± 0,9 ^{bc}	49,1 ± 0,8 ^a
14:1 n-5	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
15:1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
16:1 n-9	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1
16:1 n-7	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,3	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,4 ± 0,2
17:1	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,0
18:1 DMA	0,1 ± 0,0	1,0 ± 0,5	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0
18:1 n-9	6,8 ± 0,5 ^a	7,3 ± 0,4 ^{ab}	7,0 ± 0,5 ^{ab}	8,1 ± 1,0 ^b	7,4 ± 0,5 ^{ab}	10,6 ± 1,6 ^c
18:1 n-7	3,3 ± 0,3 ^a	3,3 ± 0,4 ^a	3,7 ± 0,4 ^b	3,6 ± 0,2 ^{ab}	3,8 ± 0,2 ^b	3,7 ± 0,2 ^b
20:1 n-9	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0
20:1 n-7	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
22:1 n-9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
24:1 n-9	1,2 ± 0,1 ^b	1,5 ± 0,1 ^c	1,4 ± 0,2 ^{bc}	1,4 ± 0,1 ^{bc}	1,4 ± 0,3 ^{bc}	1,0 ± 0,2 ^a
Σ AGMI	13,6 ± 0,6 ^a	15,7 ± 0,6 ^b	14,4 ± 0,9 ^{ab}	15,6 ± 1,2 ^b	15,6 ± 1,2 ^b	18,5 ± 1,6 ^c

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. DMA : diméthylacétal. Suite du tableau p 185.

Temps (jour)	0 (N = 7)	2 (N = 4)	3 (N = 6)	4 (N = 5)	7 (N = 4)	13 (N = 7)
18:2 n-6	6,6 ± 0,4 ^c	5,1 ± 0,4 ^b	5,3 ± 0,3 ^b	5,4 ± 0,3 ^b	4,3 ± 0,4 ^a	4,5 ± 0,6 ^a
18:3 n-6	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
18:3 n-3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:2 n-6	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0
20:3 n-9	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:3 n-6	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,1
20:4 n-6	22,7 ± 0,9 ^d	17,7 ± 1,2 ^b	19,9 ± 1,9 ^c	17,5 ± 0,9 ^b	17,3 ± 1,1 ^{ab}	15,8 ± 1,5 ^a
20:3 n-3	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:5 n-3	0,2 ± 0,0 ^a	1,7 ± 0,1 ^b	1,6 ± 0,3 ^b	1,5 ± 0,2 ^b	2,7 ± 0,2 ^c	3,8 ± 0,4 ^d
22:4 n-6	1,8 ± 0,1 ^d	0,9 ± 0,1 ^b	1,2 ± 0,1 ^c	1,0 ± 0,1 ^b	1,0 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,1 ^a
22:5 n-6	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0
22:5 n-3	2,0 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,1 ^c	2,3 ± 0,3 ^{bc}	2,0 ± 0,4 ^{ab}	2,2 ± 0,3 ^{abc}	2,3 ± 0,2 ^{bc}
22:6 n-3	2,2 ± 0,2 ^a	4,2 ± 0,4 ^c	3,7 ± 0,5 ^b	3,4 ± 0,3 ^b	3,9 ± 0,3 ^{bc}	4,3 ± 0,3 ^c
Σ AGPI	37,5 ± 1,1 ^c	33,9 ± 1,6 ^{ab}	35,4 ± 2,7 ^b	32,3 ± 1,3 ^a	32,5 ± 1,9 ^a	32,3 ± 1,5 ^a
Σ AGPI n-6	32,8 ± 0,8 ^d	25,2 ± 1,2 ^b	27,6 ± 1,7 ^c	25,1 ± 0,9 ^b	23,6 ± 1,6 ^b	21,7 ± 1,1 ^a
Σ AGPI n-3	4,5 ± 0,3 ^a	8,5 ± 0,4 ^{cd}	7,7 ± 0,9 ^{bc}	7,1 ± 0,7 ^b	8,8 ± 0,4 ^d	10,5 ± 0,6 ^e
n-6/n-3	7,3 ± 0,5 ^d	3,0 ± 0,1 ^b	3,6 ± 0,2 ^c	3,5 ± 0,3 ^c	2,7 ± 0,1 ^b	2,1 ± 0,1 ^a

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Annexe 10 : Evolution en fonction du temps des taux des acides gras saturés (AGS), mono-insaturés (AGMI) et poly-insaturés (AGPI) (% en poids des acides gras totaux) des lipides des globules rouges des rats soumis à un régime alimentaire supplémenté avec les Marinosomes®.

Temps (jour)	0 (N = 7)	2 (N = 6)	3 (N = 5)	4 (N = 4)	7 (N = 4)	13 (N = 4)
14:0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,2
15:0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
16:0 DMA	1,6 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,4 ^c	1,6 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a	1,8 ± 0,3 ^{ab}	2,0 ± 0,1 ^{bc}
16:0	28,3 ± 1,1 ^a	29,6 ± 0,9 ^a	30,7 ± 1,7 ^b	30,6 ± 0,3 ^b	29,6 ± 1,2 ^{ab}	30,5 ± 1,1 ^b
17:0 iso	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
17:0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,9 ± 0,3
18:0 DMA	1,1 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,7 ^b	1,1 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,7 ^a	1,2 ± 0,1 ^a
18:0	13,2 ± 0,4 ^c	13,1 ± 1,3 ^{bc}	13,2 ± 0,5 ^c	13,9 ± 1,0 ^c	12,1 ± 0,3 ^b	10,9 ± 0,8 ^a
20:0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
22:0	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0
23:0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
24:0	2,2 ± 0,2 ^{bc}	2,1 ± 0,2 ^{ab}	2,4 ± 0,3 ^c	2,3 ± 0,1 ^{bc}	2,3 ± 0,3 ^{bc}	1,8 ± 0,2 ^a
Σ AGS	48,9 ± 1,4^a	51,6 ± 0,5^{abc}	51,3 ± 2,0^{bc}	52,1 ± 1,0^c	49,7 ± 0,7^{ab}	50,3 ± 1,3^{abc}
14:1 n-5	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
15:1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
16:1 n-9	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,1
16:1 n-7	0,6 ± 0,1	1,1 ± 0,3	0,7 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,4 ± 0,5
17:1	0,5 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,0
18:1 DMA	0,1 ± 0,0	1,1 ± 0,4	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,7	0,2 ± 0,0
18:1 n-9	6,8 ± 0,5 ^a	6,7 ± 0,7 ^a	6,6 ± 0,4 ^a	6,9 ± 0,6 ^a	7,4 ± 0,8 ^a	9,4 ± 1,5 ^b
18:1 n-7	3,3 ± 0,3 ^a	3,8 ± 0,4 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	4,1 ± 0,3 ^b	3,4 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,3 ^a
20:1 n-9	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
20:1 n-7	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1
22:1 n-9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
24:1 n-9	1,2 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,2 ^b	1,4 ± 0,2 ^{ab}	1,6 ± 0,1 ^b	1,3 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,1 ^a
Σ AGMI	13,6 ± 0,6^a	15,4 ± 0,4^b	13,7 ± 0,4^a	15,5 ± 0,7^b	14,8 ± 1,0^{ab}	17,8 ± 2,1^c

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés. DMA : diméthylacétal. Suite du tableau p 187.

Temps (jour)	0 (N = 7)	2 (N = 6)	3 (N = 5)	4 (N = 4)	7 (N = 4)	13 (N = 4)
18:2 n-6	6,6 ± 0,4 ^d	5,2 ± 1,0 ^{cd}	6,1 ± 0,4 ^{cd}	5,2 ± 0,2 ^{bc}	4,8 ± 0,5 ^{ab}	3,6 ± 0,4 ^a
18:3 n-6	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
18:3 n-3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:2 n-6	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0
20:3 n-9	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0
20:3 n-6	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0
20:4 n-6	22,7 ± 0,9 ^c	19,4 ± 1,1 ^b	20,3 ± 1,0 ^b	19,5 ± 0,7 ^b	20,5 ± 0,8 ^b	17,7 ± 2,0 ^a
20:3 n-3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
20:5 n-3	0,2 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,1 ^b	0,5 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,1 ^b	1,3 ± 0,2 ^c	2,0 ± 0,3 ^d
22:4 n-6	1,8 ± 0,1 ^e	1,4 ± 0,1 ^{cd}	1,6 ± 0,2 ^{de}	1,2 ± 0,1 ^b	1,4 ± 0,1 ^{bc}	0,9 ± 0,1 ^a
22:5 n-6	0,6 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,1
22:5 n-3	2,0 ± 0,2 ^c	1,5 ± 0,2 ^{ab}	1,9 ± 0,1 ^{bc}	1,4 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,1 ^c	1,8 ± 0,3 ^{bc}
22:6 n-3	2,2 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,4 ^b	2,8 ± 0,3 ^b	3,0 ± 0,3 ^b	4,0 ± 0,2 ^c	4,4 ± 0,9 ^c
Σ AGPI	37,5 ± 1,1 ^d	33,0 ± 0,7 ^{abc}	35,0 ± 1,7 ^{bc}	32,4 ± 1,2 ^{ab}	35,6 ± 1,4 ^{cd}	31,9 ± 3,3 ^a
Σ AGPI n-6	32,8 ± 0,8 ^d	27,4 ± 0,3 ^{bc}	29,6 ± 1,3 ^c	27,1 ± 0,8 ^b	27,7 ± 1,1 ^{bc}	23,3 ± 2,1 ^a
Σ AGPI n-3	4,5 ± 0,3 ^a	5,5 ± 0,5 ^b	5,3 ± 0,5 ^b	5,2 ± 0,4 ^{ab}	7,4 ± 0,4 ^c	8,4 ± 1,4 ^d
n-6/n-3	7,3 ± 0,5 ^d	5,0 ± 0,4 ^c	5,6 ± 0,4 ^c	5,2 ± 0,3 ^c	3,7 ± 0,1 ^b	2,8 ± 0,3 ^a

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Annexe 11 : Evolution des taux des acides gras des lipides totaux du plasma (% en poids des acides gras totaux) des rats avant (temps 0) et après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes® (temps 13) suivie d'un régime alipidique de 7 jours (temps 20).

Temps (jour)	Régime huile			Régime Marinosomes®	
	0 (N = 7)	13 (N = 7)	20 (N = 5)	13 (N = 6)	20 (N = 5)
14:0	0,9 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,1 ^a
15:0	0,4 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,0 ^a	0,4 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,0 ^a
16:0	21,7 ± 0,5 ^a	22,3 ± 1,2 ^a	23,3 ± 2,5 ^{ab}	24,7 ± 0,9 ^b	23,3 ± 2,8 ^{ab}
17:0	0,2 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
18:0	7,0 ± 0,4 ^a	8,5 ± 0,5 ^b	10,0 ± 1,2 ^c	7,6 ± 0,5 ^a	10,4 ± 0,6 ^c
20:0	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
22:0	0,2 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^{ab}	0,4 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^b
23:0	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^c	0,2 ± 0,1 ^d	0,1 ± 0,0 ^{ab}	0,1 ± 0,1 ^{bc}
24:0	0,4 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,1 ^c	0,8 ± 0,1 ^d	0,5 ± 0,1 ^{ab}	0,6 ± 0,1 ^{bc}
Σ AGS	31,1 ± 0,9 ^a	33,5 ± 1,5 ^b	35,9 ± 1,5 ^c	34,6 ± 0,8 ^{bc}	36,0 ± 2,3 ^c
14:1 n-5	0,1 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^a
15:1	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^b	0,2 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^{ab}
16:1 n-9	1,1 ± 0,3 ^b	0,7 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,3 ^b
16:1 n-7	4,9 ± 1,1 ^a	6,6 ± 0,9 ^{bc}	7,9 ± 1,3 ^c	5,8 ± 1,1 ^{ab}	7,5 ± 1,2 ^c
17:1	0,2 ± 0,0 ^{ab}	0,2 ± 0,0 ^b	0,2 ± 0,1 ^{ab}	0,2 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^a
18:1 n-9	18,2 ± 1,6 ^a	20,9 ± 3,6 ^a	24,2 ± 2,4 ^b	19,2 ± 1,8 ^a	27,2 ± 1,7 ^b
18:1 n-7	4,1 ± 0,8 ^{ab}	3,8 ± 0,3 ^a	4,9 ± 0,8 ^b	3,3 ± 0,4 ^a	5,1 ± 1,2 ^b
20:1 n-9	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,1 ^{ab}	0,2 ± 0,0 ^{ab}	0,3 ± 0,0 ^b	0,2 ± 0,1 ^{ab}
20:1 n-7	0,0 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,0 ^c	0,6 ± 0,2 ^c	0,5 ± 0,1 ^c
24:1 n-9	0,5 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,3 ^b	0,5 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,3 ^b
Σ AGMI	29,5 ± 3,4 ^a	33,3 ± 2,8 ^b	40,2 ± 3,0 ^c	30,8 ± 2,6 ^{ab}	43,0 ± 2,2 ^c
18:2 n-6	15,0 ± 1,7 ^b	4,6 ± 1,0 ^a	5,3 ± 1,0 ^a	6,0 ± 1,4 ^a	4,6 ± 1,1 ^a
18:3 n-6	0,5 ± 0,1 ^c	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^{ab}
18:3 n-3	0,7 ± 0,2 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
20:2 n-6	0,3 ± 0,0 ^{ab}	0,1 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,2 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,3 ^{ab}
20:3 n-9	0,2 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,0 ^a	1,2 ± 0,4 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	2,4 ± 0,8 ^c
20:3 n-6	0,7 ± 0,0 ^c	0,4 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,1 ^{bc}	0,4 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,1 ^b
20:3 n-3	0,1 ± 0,0 ^c	0,1 ± 0,0 ^{bc}	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^a
20:4 n-6	17,5 ± 1,5 ^d	9,5 ± 1,7 ^b	8,5 ± 1,8 ^{ab}	12,7 ± 1,8 ^c	7,2 ± 1,0 ^a
20:5 n-3	0,6 ± 0,1 ^a	10,2 ± 2,0 ^d	2,8 ± 0,7 ^b	5,4 ± 0,8 ^c	1,3 ± 0,4 ^a
22:4 n-6	0,4 ± 0,1 ^c	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^{ab}	0,1 ± 0,0 ^b	0,1 ± 0,0 ^a
22:5 n-6	0,4 ± 0,1 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
22:5 n-3	0,5 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,2 ^c	0,5 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ^b	0,4 ± 0,3 ^a
22:6 n-3	2,6 ± 0,3 ^a	6,5 ± 0,9 ^c	4,0 ± 0,9 ^b	8,4 ± 1,2 ^d	3,8 ± 1,2 ^{ab}
Σ AGPI	39,4 ± 3,0 ^c	33,2 ± 3,1 ^b	23,8 ± 3,8 ^a	34,7 ± 2,6 ^b	21,0 ± 3,3 ^a
Σ AGPI n-6	34,7 ± 2,8 ^c	14,8 ± 1,4 ^a	15,2 ± 2,0 ^a	19,5 ± 2,6 ^b	13,1 ± 1,7 ^a
Σ AGPI n-3	4,5 ± 0,6 ^a	18,2 ± 2,4 ^d	7,4 ± 1,7 ^b	15,0 ± 1,9 ^c	5,5 ± 1,9 ^{ab}
n-6/n-3	7,8 ± 1,0 ^c	0,8 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,3	1,3 ± 0,3 ^{ab}	2,5 ± 0,6 ^b

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). N : nombre de rats. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Annexe 12 : Evolution des concentrations des acides gras des triglycérides du plasma ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de plasma) des rats avant (temps 0) et après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes® (temps 13) suivie d'un régime alipidique de 7 jours (temps 20).

Temps (jour)	Régime huile			Régime Marinosomes®	
	0	13	20	13	20
14:0	3,8 ± 0,3 ^c	2,6 ± 0,3 ^b	0,8 ± 0,3 ^a	3,5 ± 0,1 ^c	2,5 ± 0,7 ^b
15:0	1,8 ± 0,4 ^c	1,7 ± 0,8 ^{bc}	0,4 ± 0,2 ^a	2,2 ± 0,5 ^c	0,8 ± 0,2 ^{ab}
16:0	96,4 ± 6,2 ^c	55,0 ± 1,8 ^b	16,0 ± 2,6 ^a	67,2 ± 11,2 ^b	60,0 ± 7,3 ^b
17:0	0,9 ± 0,4 ^{bc}	1,1 ± 0,4 ^c	0,3 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,2 ^{bc}	0,4 ± 0,1 ^{ab}
18:0	8,1 ± 2,3 ^c	6,3 ± 0,6 ^{bc}	1,6 ± 0,3 ^a	6,7 ± 1,8 ^{bc}	5,2 ± 0,8 ^b
20:0	0,3 ± 0,1 ^{ab}	0,7 ± 0,6 ^b	0,1 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,0 ^c	0,2 ± 0,0 ^{ab}
22:0	0,1 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
23:0	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,3 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
24:0	0,1 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,8 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,4 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
Σ AGS	111,4 ± 9,5^c	68,1 ± 3,0^b	19,2 ± 3,4^a	82,3 ± 14,2^b	69,4 ± 8,8^b
14:1 n-5	0,3 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,8 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,2 ^a	0,2 ± 0,0 ^a
15:1	0,1 ± 0,2 ^a	0,2 ± 0,3 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,3 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
16:1 n-9	4,7 ± 0,9 ^c	1,8 ± 0,3 ^{ab}	0,8 ± 0,3 ^a	2,9 ± 0,3 ^b	2,4 ± 1,0 ^b
16:1 n-7	26,1 ± 8,4 ^b	18,3 ± 1,6 ^b	4,7 ± 1,3 ^a	21,6 ± 5,0 ^b	17,7 ± 7,3 ^b
17:1	1,0 ± 0,1 ^d	0,7 ± 0,2 ^c	0,1 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,0 ^{bc}	0,3 ± 0,1 ^{ab}
18:1 n-9	118,6 ± 4,9 ^c	67,0 ± 6,3 ^b	23,4 ± 2,9 ^a	76,3 ± 21,5 ^b	84,8 ± 14,1 ^b
18:1 n-7	21,2 ± 5,6 ^c	11,2 ± 0,8 ^{ab}	3,5 ± 1,0 ^a	14,7 ± 4,4 ^{bc}	14,4 ± 6,8 ^{bc}
20:1 n-9	1,0 ± 0,2 ^b	0,9 ± 0,6 ^b	0,2 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,4 ^b	0,7 ± 0,3 ^{ab}
20:1 n-7	1,3 ± 0,0 ^{bc}	0,6 ± 0,4 ^{ab}	0,3 ± 0,0 ^a	3,0 ± 1,0 ^d	1,5 ± 0,3 ^c
24:1 n-9	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
Σ AGMI	174,2 ± 8,4^c	101,5 ± 4,8^b	33,3 ± 5,8^a	121,2 ± 33,2^b	122,1 ± 29,0^b
18:2 n-6	88,3 ± 3,3 ^c	3,9 ± 3,5 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	8,7 ± 1,0 ^b	0,1 ± 0,1 ^a
18:3 n-6	2,8 ± 1,3 ^b	0,3 ± 0,4 ^a	0,0 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
18:3 n-3	3,9 ± 0,5 ^c	0,9 ± 0,4 ^b	0,3 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,0 ^{ab}	0,5 ± 0,1 ^{ab}
20:2 n-6	0,7 ± 0,3 ^b	0,3 ± 0,3 ^{ab}	0,1 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
20:3 n-9	1,0 ± 0,3 ^a	0,2 ± 0,4 ^a	0,4 ± 0,4 ^a	0,4 ± 0,5 ^a	0,9 ± 0,6 ^a
20:3 n-6	2,0 ± 1,0 ^{ab}	2,4 ± 1,1 ^b	0,4 ± 0,2 ^a	1,0 ± 1,4 ^{ab}	0,5 ± 0,1 ^a
20:4 n-6	6,5 ± 0,9 ^d	1,2 ± 0,3 ^b	0,1 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,4 ^c	0,5 ± 0,3 ^{ab}
20:5 n-3	1,0 ± 0,1 ^a	4,5 ± 0,8 ^c	0,1 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,4 ^b	0,8 ± 0,7 ^a
22:4 n-6	1,0 ± 0,7 ^{bc}	0,3 ± 0,3 ^{ab}	0,9 ± 0,5 ^{bc}	0,0 ± 0,0 ^a	1,4 ± 0,4 ^c
22:5 n-6	0,5 ± 0,0 ^c	0,2 ± 0,2 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^{ab}
22:5 n-3	1,2 ± 0,0 ^{ab}	3,3 ± 0,7 ^c	0,2 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,5 ^{bc}	1,1 ± 1,1 ^{ab}
22:6 n-3	3,1 ± 0,5 ^{ab}	11,7 ± 2,9 ^c	0,6 ± 0,2 ^a	19,2 ± 2,7 ^d	7,2 ± 2,3 ^b
Σ AGPI	112,2 ± 0,8^e	29,3 ± 6,3^c	3,2 ± 0,6^a	38,0 ± 0,0^d	13,4 ± 2,3^b
Σ AGPI n-6	101,9 ± 1,1^c	8,7 ± 3,6^b	1,6 ± 0,7^a	12,6 ± 3,1^b	2,9 ± 0,1^a
Σ AGPI n-3	9,3 ± 0,1^b	20,3 ± 4,0^c	1,1 ± 0,4^a	25,1 ± 3,6^c	9,6 ± 2,4^b
n-6/n-3	11,0 ± 0,2^c	0,4 ± 0,2^a	1,6 ± 0,9^b	0,5 ± 0,2^a	0,3 ± 0,1^a
Σ AG	397,7 ± 0,4^c	198,8 ± 2,0^b	55,7 ± 9,7^a	241,6 ± 47,4^b	204,9 ± 34,8^b

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).
 Nombre de rats = 3. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ;
 Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Annexe 13 : Evolution des concentrations des acides gras des phospholipides du plasma ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de plasma) des rats avant (temps 0) et après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes[®] (temps 13) suivie d'un régime alipidique de 7 jours (temps 20).

Temps (jour)	Régime huile			Régime Marinosomes [®]	
	0	13	20	13	20
14:0	1,7 ± 0,6 ^a	1,0 ± 0,2 ^a	1,7 ± 0,6 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,7 ^b
15:0	0,9 ± 0,1 ^{ab}	0,6 ± 0,0 ^a	1,2 ± 0,3 ^{bc}	1,1 ± 0,2 ^{abc}	1,4 ± 0,4 ^c
16:0 DMA	0,7 ± 0,2 ^{bc}	0,5 ± 0,1 ^{ab}	0,0 ± 0,0 ^a	1,0 ± 0,0 ^c	0,6 ± 0,6 ^{bc}
16:0	103,6 ± 15,7 ^{ab}	75,8 ± 5,6 ^a	120,3 ± 23,5 ^{bc}	111,5 ± 23,3 ^{bc}	137,5 ± 17,6 ^c
17:0 iso	0,2 ± 0,1 ^{bc}	0,2 ± 0,2 ^{bc}	0,0 ± 0,0 ^a	0,3 ± 0,1 ^c	0,1 ± 0,1 ^{ab}
17:0	1,2 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,3 ^a	1,3 ± 0,3 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	1,3 ± 0,2 ^a
18:0 DMA	1,8 ± 1,3 ^b	0,3 ± 0,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,7 ^a
18:0	77,8 ± 14,9 ^a	54,9 ± 5,7 ^a	112,1 ± 27,9 ^b	67,9 ± 3,9 ^a	153,4 ± 19,6 ^b
20:0	0,8 ± 0,1 ^{ab}	0,5 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,2 ^{bc}	0,8 ± 0,3 ^{ab}	1,3 ± 0,1 ^c
22:0	3,0 ± 0,3 ^{bc}	1,8 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,7 ^{cd}	2,2 ± 0,3 ^{ab}	4,4 ± 0,7 ^d
23:0	1,6 ± 0,2 ^{ab}	1,2 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,4 ^b	1,4 ± 0,7 ^{ab}	2,0 ± 0,7 ^{ab}
24:0	7,2 ± 1,2 ^b	4,8 ± 0,4 ^a	7,4 ± 1,2 ^b	6,3 ± 0,8 ^{ab}	7,9 ± 0,7 ^b
Σ AGS	200,4 ± 32,3^b	142,6 ± 10,1^a	250,7 ± 52,1^b	195,3 ± 29,0^{ab}	313,2 ± 14,3^c
14:1 n-5	0,1 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,2 ^a	0,1 ± 0,0 ^a
15:1	0,2 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,2 ^{ab}	0,4 ± 0,1 ^{ab}	0,5 ± 0,3 ^b	0,5 ± 0,1 ^{ab}
16:1 n-9	1,1 ± 0,3 ^a	0,8 ± 0,3 ^a	1,9 ± 0,5 ^b	1,0 ± 0,2 ^a	2,4 ± 0,6 ^b
16:1 n-7	5,6 ± 1,9 ^a	6,2 ± 0,3 ^a	12,6 ± 4,8 ^{bc}	9,1 ± 2,6 ^{ab}	15,4 ± 3,3 ^c
17:1	0,3 ± 0,1 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,3 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,3 ^a
18:1 DMA	0,8 ± 0,3 ^{ab}	0,7 ± 0,2 ^{ab}	0,0 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,2 ^b	1,0 ± 0,9 ^b
18:1 n-9	39,4 ± 9,5 ^{ab}	29,5 ± 1,5 ^a	78,7 ± 17,5 ^c	53,2 ± 11,6 ^b	91,5 ± 13,3 ^c
18:1 n-7	17,2 ± 4,8 ^{ab}	10,8 ± 0,9 ^a	23,9 ± 6,7 ^{bc}	13,0 ± 1,9 ^a	31,8 ± 8,5 ^c
20:1 n-9	0,8 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,2 ^{bc}	1,3 ± 0,3 ^c	1,1 ± 0,4 ^{bc}
20:1 n-7	1,5 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,8 ^a	2,0 ± 0,6 ^b	3,6 ± 1,0 ^b
24:1 n-9	9,5 ± 2,2 ^b	5,0 ± 0,7 ^a	10,2 ± 3,1 ^{bc}	8,4 ± 1,4 ^{ab}	13,9 ± 2,2 ^c
Σ AGMI	76,4 ± 16,9^a	55,4 ± 1,7^a	132,6 ± 33,7^b	90,2 ± 16,6^a	162,0 ± 25,5^b
18:2 n-6	34,9 ± 3,6^c	12,3 ± 3,5^a	31,8 ± 2,3^c	23,0 ± 2,3^b	36,8 ± 7,3^c
18:3 n-6	0,3 ± 0,0 ^{ab}	0,1 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,2 ^{ab}	0,6 ± 0,2 ^b
18:3 n-3	0,3 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	1,1 ± 0,5 ^b
20:2 n-6	1,6 ± 0,4 ^c	0,4 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ^b	0,7 ± 0,2 ^{ab}	1,0 ± 0,1 ^b
20:3 n-9	4,1 ± 2,0 ^{ab}	0,5 ± 0,3 ^a	9,6 ± 4,4 ^b	1,5 ± 0,2 ^{ab}	22,0 ± 8,8 ^c
20:3 n-6	6,5 ± 1,2 ^b	2,9 ± 0,4 ^a	7,3 ± 0,7 ^b	4,1 ± 0,3 ^a	7,8 ± 1,0 ^b
20:4 n-6	64,5 ± 15,3^c	28,3 ± 2,6^a	41,7 ± 8,9^{ab}	49,8 ± 0,2^{bc}	49,4 ± 10,3^{bc}
20:3 n-3	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,2 ± 0,2 ^b	0,0 ± 0,0 ^a
20:5 n-3	1,1 ± 0,5^a	20,3 ± 3,2^d	10,9 ± 3,4^c	16,5 ± 2,0^d	6,1 ± 0,9^b
22:4 n-6	3,7 ± 1,2 ^b	0,5 ± 0,0 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	1,4 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,2 ^a
22:5 n-6	4,5 ± 1,5 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a
22:5 n-3	2,1 ± 0,2 ^a	6,0 ± 1,6 ^d	3,7 ± 0,3 ^{bc}	4,6 ± 0,1 ^c	2,5 ± 0,5 ^{ab}
22:6 n-3	19,2 ± 4,3^a	29,2 ± 5,6^b	29,5 ± 6,4^b	40,0 ± 2,0^c	34,1 ± 6,2^{bc}
Σ AGPI	142,8 ± 28,5^b	101,7 ± 11,9^a	137,7 ± 24,7^b	143,1 ± 2,7^b	163,9 ± 18,0^b
Σ n-6	116,1 ± 22,3^c	45,1 ± 6,4^a	83,4 ± 11,7^b	80,1 ± 2,6^b	98,1 ± 16,7^{bc}
Σ n-3	22,7 ± 4,8^a	56,1 ± 9,8^{bc}	44,6 ± 10,1^b	61,6 ± 0,0^c	43,8 ± 7,7^b
n-6/n-3	5,1 ± 0,1^e	0,8 ± 0,2^a	1,9 ± 0,3^c	1,3 ± 0,0^b	2,2 ± 0,2^d
Σ AG	419,7 ± 76,7^b	299,7 ± 23,0^a	521,0 ± 105,4^b	428,6 ± 44,6^b	639,2 ± 3,2^c

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$).
Nombre de rats = 3. DMA : diméthylacétal.

Annexe 14 : Evolution des concentrations des acides gras des esters de cholestérol du plasma ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de plasma) des rats avant (temps 0) et après 13 jours de régime supplémenté avec le mélange à base d'huile de poisson ou avec les Marinosomes[®] (temps 13) suivie d'un régime alipidique de 7 jours (temps 20).

Temps (jour)	Régime huile			Régime Marinosomes [®]	
	0 ^a	13 ^β	20 ^γ	13 ^γ	20 ^γ
14:0	1,4 ^b	0,5 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,0 ^b	1,3 ± 0,1 ^b
15:0	1,0 ^d	0,3 ± 0,0 ^a	0,7 ± 0,1 ^c	0,4 ± 0,1 ^{ab}	0,6 ± 0,0 ^{bc}
16:0 iso	0,5 ^{abc}	0,3 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,0 ^{bc}	0,4 ± 0,0 ^{ab}	0,8 ± 0,3 ^c
16:0	23,9 ^c	9,1 ± 1,2 ^a	17,0 ± 1,0 ^{bc}	18,5 ± 5,8 ^{bc}	15,6 ± 0,7 ^{ab}
17:0	0,2 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	3,5 ± 0,8 ^b	0,3 ± 0,1 ^a	3,3 ± 1,6 ^b
18:0	2,6 ^b	0,7 ± 0,0 ^a	2,0 ± 0,2 ^b	2,0 ± 0,9 ^b	2,0 ± 0,0 ^b
24:0	0,4 ^b	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a
Σ AGS	30,1 ^b	11,1 ± 1,6 ^a	25,1 ± 2,3 ^b	22,2 ± 6,9 ^b	23,6 ± 2,5 ^b
14:1 n-5	0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,2 ^a
16:1 n-9	5,7 ^b	0,9 ± 0,1 ^a	5,8 ± 0,5 ^b	1,1 ± 0,0 ^a	7,2 ± 0,4 ^c
16:1 n-7	18,6 ^b	10,0 ± 2,1 ^a	28,6 ± 4,2 ^c	11,5 ± 2,1 ^a	21,8 ± 3,4 ^{bc}
17:1	0,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,5 ± 0,2 ^a	0,2 ± 0,3 ^a	0,1 ± 0,2 ^a
18:1 n-9	31,5 ^{bc}	12,5 ± 0,6 ^a	32,6 ± 3,6 ^c	23,6 ± 5,8 ^b	31,9 ± 1,8 ^c
18:1 n-7	5,5 ^c	2,1 ± 0,1 ^a	5,2 ± 0,5 ^c	3,6 ± 0,8 ^b	4,5 ± 0,1 ^{bc}
20:1 n-9	0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
Σ AGMI	61,5 ^c	25,5 ± 3,0 ^a	72,8 ± 2,0 ^d	40,1 ± 4,7 ^b	65,7 ± 2,1 ^{cd}
18:2 n-6	21,0 ^c	3,6 ± 0,0 ^a	9,6 ± 1,1 ^b	7,2 ± 1,9 ^b	9,0 ± 1,8 ^b
18:3 n-6	2,4 ^c	0,1 ± 0,0 ^a	1,3 ± 0,5 ^b	0,1 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,5 ^a
18:3 n-3	0,3 ^a	0,1 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,2 ^a	0,4 ± 0,4 ^a	0,3 ± 0,5 ^a
20:3 n-9	2,2 ^b	0,1 ± 0,0 ^a	2,8 ± 0,1 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	6,8 ± 0,6 ^c
20:3 n-6	1,1 ^c	0,2 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,0 ^b	0,3 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,2 ^b
20:4 n-6	122,4 ^c	19,0 ± 0,8 ^a	32,3 ± 3,1 ^b	33,8 ± 7,4 ^b	32,1 ± 6,5 ^b
20:5 n-3	2,3 ^a	23,2 ± 2,9 ^c	11,3 ± 2,0 ^b	15,5 ± 4,2 ^b	4,6 ± 0,7 ^a
22:5 n-3	0,0 ^a	0,1 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,2 ^a	0,0 ± 0,0 ^a
22:6 n-3	4,9 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,5 ^a	4,9 ± 1,9 ^a	2,7 ± 0,1 ^a
Σ AGPI	156,6 ^b	49,7 ± 3,5 ^a	61,7 ± 7,3 ^a	62,6 ± 15,7 ^a	56,7 ± 7,6 ^a
Σ AGPI n-6	146,9 ^c	22,9 ± 0,8 ^a	44,0 ± 4,7 ^b	41,4 ± 9,4 ^b	42,2 ± 8,1 ^b
Σ AGPI n-3	7,5 ^a	26,6 ± 2,7 ^c	14,9 ± 2,7 ^{ab}	21,0 ± 6,3 ^{bc}	7,6 ± 1,1 ^a
n-6/n-3	19,6 ^c	0,9 ± 0,1 ^a	3,0 ± 0,2 ^a	2,0 ± 0,1 ^a	5,7 ± 1,9 ^b
Σ AG	248,2 ^c	86,2 ± 8,1 ^a	159,7 ± 7,6 ^b	124,9 ± 27,4 ^b	146,0 ± 8,0 ^b

Les valeurs affectées de lettres différentes dans une même ligne sont significativement différentes ($\alpha = 5\%$). α : pool de 3 échantillons avant méthylation. β : 2 pools de 3 et 4 échantillons avant méthylation. γ : 2 pools de 2 échantillons avant méthylation. Σ AGS : somme des acides gras saturés ; Σ AGMI : somme des acides gras mono-insaturés ; Σ AGPI : somme des acides gras poly-insaturés.

Résumé

L'efficacité biologique de liposomes riches en acides gras poly-insaturés (AGPI) de la série n-3, les **Marinosomes**[®], est évaluée pour la voie topique et en voie orale.

Dans le cadre de l'**application topique**, l'étude du comportement des Marinosomes[®] placés dans des conditions physico-chimiques mimant celles de la peau met en évidence : i) l'existence de modifications morphologiques qui évoluent dans le temps, ii) une stabilité des structures vis-à-vis de l'hydrolyse et de l'oxydation, sur des temps courts. Au niveau de leur activité biologique *in vivo* et *in vitro*, les Marinosomes[®] présentent une très faible cytotoxicité et induisent peu ou pas de phénomènes d'irritation oculaire et cutanée. Par ailleurs, ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires en inhibant la formation de deux biomarqueurs de l'inflammation.

En **administration orale**, la supplémentation du régime des rats avec les Marinosomes[®], pendant 13 jours, conduit à un enrichissement des lipides plasmatiques en AGPI n-3, un effet hypolipémiant et une persistance des AGPI n-3 après l'arrêt de la supplémentation. Comparativement à un apport sous forme d'huile de poisson, les Marinosomes[®] permettent : i) une meilleure incorporation de l'acide docosahexaénoïque (22:6 n-3) dans les triglycérides et les phospholipides du plasma, ii) une augmentation significative des concentrations des phospholipides et du cholestérol après 4 jours, iii) une rémanence accrue des AGPI n-3 après l'arrêt de la supplémentation. Ces résultats révèlent l'importance de la forme physico-chimique sous laquelle sont apportés les AGPI dans l'alimentation, vis-à-vis de leur devenir métabolique.

Mots clés : acides gras poly-insaturés n-3, liposome, oxydation, kératinocyte, activité anti-inflammatoire, rat, supplémentation de régime alimentaire, biodisponibilité plasmatique, paramètres lipidiques sanguins, réversibilité.

Abstract

The biological activity of liposomes rich in poly-unsaturated fatty acids (PUFA) of the n-3 series, namely **Marinosomes**[®], is evaluated for the topic route and in oral delivery.

In the case of **topic application**, the study of the physicochemical behavior of Marinosomes[®] placed under conditions that mimic those of the skin highlights: i) the existence of morphological changes evolving with time, ii) a stability of the structures with respect to hydrolysis and oxidation, over short times. Concerning the *in vivo* and *in vitro* biological activity, Marinosomes[®] present a very weak toxicity on fibroblasts and induce no or small ocular and skin irritation. In addition, they exhibit anti-inflammatory properties by inhibiting the formation of two biomarkers.

In the case of **oral delivery**, rats fed Marinosomes[®], during 13 days, show an enrichment of the plasmatic lipids in n-3 PUFA, and a persistence of the n-3 PUFA when rats are placed on a fat free diet. This enrichment is also accompanied by a significant hypolipemic effect at a plasma level. Compared to n-3 PUFA supply in the form of fish oil, Marinosomes[®] allow: i) a better docosahexaenoic acid (22:6 n-3) incorporation in triglycerides and phospholipids of plasma, ii) a significant increase in the concentrations of phospholipids and cholesterol after 4 days, iii) a lower reversibility of the AGPI n-3 in rats fed fat free diet. These results show the importance of the physicochemical form in which the AGPI are present in the diet, with respect to their metabolic fate.
