



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

# UNIVERSITE DE LORRAINE

## 2015

---

### FACULTE DE PHARMACIE

#### THESE

Présentée et soutenue publiquement le 25 Septembre 2015

**La Membrane des globules gras du lait :  
Propriétés et applications en santé  
«Milk Fat Globule Membrane (MFGM):  
Properties and health applications»**

pour obtenir  
**le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie**

par Chloé Vallée  
née le 29 Décembre 1989

#### **Membres du Jury**

**Président du jury :** Mme Lartaud Isabelle, Professeur, Laboratoire de pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Nancy.

**Directeur de thèse :** Mr Scher Joël, Professeur, Laboratoire Libio, Ensaia, Vandoeuvre- Lès-Nancy.

#### **Membres du jury :**

Mme Sapin-Minet Anne, Maitre de conférences, Faculté de Pharmacie, Nancy.

Dr Gabriel Annie, Médecin, gastro-entérologie et hépatologie, Nancy.

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**  
**Année universitaire 2014-2015**

***DOYEN***

Francine PAULUS

***Vice-Doyen***

Béatrice FAIVRE

***Directeur des Etudes***

Virginie PICHON

***Conseil de la Pédagogie***

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

***Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier***

Président, Béatrice DEMORE

***Commission Prospective Facultaire***

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

***Commission de la Recherche***

Président, Raphaël DUVAL

***Responsable de la filière Officine***

Béatrice FAIVRE

***Responsables de la filière Industrie***

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

***Responsable de la filière Hôpital***

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

***Responsable Pharma Plus ENSIC***

Raphaël DUVAL

***Responsable Pharma Plus ENSAIA***

Marie-Paule SAUDER

***Responsable de la Communication***

Béatrice FAIVRE

***Responsable de la Cellule de Formation Continue***

*et individuelle*

Béatrice FAIVRE

***Responsable de la Commission d'agrément***

*des maîtres de stage*

Bertrand RIHN

***Responsables des échanges internationaux***

Mihayl VARBANOV

***Responsable ERASMUS***

***DOYENS HONORAIRES***

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

***PROFESSEURS EMERITES***

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

***PROFESSEURS HONORAIRES***

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

***MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES***

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Lucien LALLOZ  
Pierre LECTARD  
Vincent LOPPINET  
Marcel MIRJOLET  
Maurice PIERFITTE  
Janine SCHWARTZBROD  
Louis SCHWARTZBROD

**ASSISTANTS HONORAIRES**

Marie-Catherine BERTHE  
Annie PAVIS

Marie-Claude FUZELLIER  
Françoise HINZELIN  
Marie-Hélène LIVERTOUX  
Bernard MIGNOT  
Jean-Louis MONAL  
Blandine MOREAU  
Dominique NOTTER  
Christine PERDICAKIS  
Marie-France POCHON  
Anne ROVEL  
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**ENSEIGNANTS**

*Section  
CNU\**

*Discipline d'enseignement*

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Danièle BENOUESSAN-LEJZEROVICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

**MAITRES DE CONFÉRENCES**

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>

Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>

<b>ENSEIGNANTS (suite)</b>	<i>Section CNU*</i>	<i>Discipline d'enseignement</i>
----------------------------	-------------------------	----------------------------------

Florence DUMARCAZ	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	85/86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>
Francine KEDZIEREWICZ	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86	<i>Droit en Santé</i>
Faten MERHI-SOUSSI	87	<i>Hématologie</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie environnementale</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Gabriel TROCKLE	86	<i>Pharmacologie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIQU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>
Colette ZINUTTI	85	<i>Pharmacie galénique</i>

**PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>
--------------------	----	-------------------

**PROFESSEUR AGREGE**

Christophe COCHAUD

11 *Anglais*

*\*Disciplines du Conseil National des Universités :*

*80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

*81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

*82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

*85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

*86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

*87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

*32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle*

*11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes*

# **SERMENT DES APOTHICAires**



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'**honorier ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**D**e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER  
AUCUNE APPROBATION, NI  
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES  
DANS LES THESES, CES OPINIONS  
DOIVENT ETRE CONSIDERES COMME  
PROPRES A LEUR AUTEUR ».

## **REMERCIEMENTS**

A mon Président de thèse, Madame Isabelle Lartaud, Professeur des Universités  
Pour la grande aide que vous m'avez apportée dans la réalisation de ce travail, vos  
conseils avisés, votre implication, et votre disponibilité.

A mon Directeur de thèse, Mr Joël Scher, Professeur des Universités  
Pour l'honneur que vous me faites en acceptant la direction de cette thèse.

A mes Juges,  
Madame le Docteur Annie Gabrielle, Médecin Gastroentérologue ainsi que Madame  
Anne Sapin-Minet, Maitre de conférences.  
Pour l'attention que vous avez bien voulu me témoigner en acceptant de juger ce travail.  
Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A Claire Gaiani,  
Pour toute l'aide que vous m'avez apporté tout au long de la rédaction de cette thèse  
ainsi que votre investissement dans ce travail.

A mes parents, mes grands-parents et Genevieve,  
Pour leur présence, leur soutien, leur patience et écoute durant toutes ces années, me  
redonnant sans cesse le courage de persévirer dans mes études.

A ma sœur,  
Pour son aide, son soutien et pour tous les supers moments passés ensemble, en  
particulier au Canada et à New York.

A mes amis,  
Pour votre présence, pour tous les moments passés ensemble et ceux qui nous attendent  
encore.

A mes fidèles glousseuses,

Julie,

Pour avoir toujours gouté mes punchs sans aucun apriori, avoir partagé avec moi tous ces étés de folie et évidemment pour avoir toujours été un caneton à mon écoute !

Helene,

Pour ton écoute et ta présence dans toutes nos aventures plus ou moins extrêmes et bien sûr pour avoir été à mes côtés pendant toutes ces années de fac !

Clémence,

Une période lycéenne mémorable grâce à toi (encore merci pour ton assistance en TP de chimie), mon petit grizzly.

Nanou,

Merci pour ton incroyable énergie qui me requinque dès que je te vois !

A Claire,

Pour tous les bons moments (« chouetteee») passés à Lyon, Paris, L'ile de Ré, St Maxime...

A Eve-Ca,

Pour ton incroyable assistance lors de tous nos moments gloutons, à Québec et en France.

A Marion,

Pour ta joie de vivre et ta folie qui m'a toujours redonné de l'énergie. Merci pour cette 2<sup>ème</sup> année de pharma qui a été l'une des meilleures !

A Mariana et Livia,

Pour votre soutien qui m'a permis de passer cette première année à l'Ensaia dans la joie et la bonne humeur !

A Raphael,

Pour ta précieuse aide tout au long de mes études.

A Xyan,

Pour m'avoir toujours apporté ton soutien pendant nos études et pour nos bons moments à Bruxelles.

A Delphine,

Merci d'avoir accepté d'être mon binôme pendant cette 2<sup>ème</sup> année qui reste mémorable !

Au groupe 5,

Pour toutes ces supers années de fac !

A ma team Rotterdam,

Pour tous les incroyables moments passés pendant ces 6 mois. Fanny, Anaïs, Hugo, Clément ... en espérant encore passer de bons moments ensemble !

## **TABLE DES MATIERE**

<b>FIGURES .....</b>	<b>13</b>
<b>TABLEAUX.....</b>	<b>15</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>17</b>
<b>CHAPITRE I. ....</b>	<b>19</b>
<b>LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS DU LAIT: STRUCTURE ET COMPOSITION ....</b>	<b>19</b>
1. LES LIPIDES DE LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS.....	20
2. LES PROTEINES DE LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS .....	24
3. STRUCTURE DE LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS .....	26
<b>CHAPITRE II.....</b>	<b>30</b>
<b>ROLES BENEFIQUES DES COMPOSANTS DE LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS</b>	
<b>SUR LA SANTE.....</b>	<b>30</b>
1. PRESENTATION DES MALADIES DU TUBE DIGESTIF.....	31
<i>1.1 Les diarrhées.....</i>	<i>33</i>
1.1.1 Les gastroentérites virales, mécanismes d'action du rotavirus.....	34
1.1.2 Les gastroentérites bactériennes .....	37
1.1.2.1 Mécanismes d'action de <i>E. coli</i> .....	37
1.1.2.2 Mécanismes de défense de l'hôte.....	39
<i>1.2 Les maladies gastro-intestinales résultant d'une infection à <i>Helicobacter Pylori</i>.</i>	<i>40</i>
2. ROLES BENEFIQUES DES CONSTITUANTS DE LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS.....	42
<i>2.1 Effets sur les maladies gastro-intestinales : constituants de la membrane des globules gras ayant des propriétés antibactériennes et antivirales.....</i>	<i>42</i>
2.1.1. Effet des phospholipides sur les inflammations intestinales.....	43
2.1.2 Effet des glycoprotéines et de la lactoferrine dans l'inhibition d' <i>Helicobacter Pylori</i> .....	44
2.1.3 Effet de la lactophoricine sur des bactéries Gram + et Gram - .....	47
2.1.4 Effets des constituants lipidiques de la membrane des globules gras sur le caractère infectieux du rotavirus .....	49
2.1.5 Effets antibactériens des constituants de la membrane des globules gras sur <i>E. coli</i> .....	52
2.1.6 Effets de la membrane des globules gras sur l'adhésion des bactéries dans l'estomac.....	53
2.1.7 Rôle de la xanthine oxydase .....	55
<i>2.2 Effets anti-cholestérol de la membrane des globules gras du lait .....</i>	<i>57</i>
<i>2.3 Effets anti-cancéreux de la membrane des globules gras du lait.....</i>	<i>59</i>

3. UTILISATION DES COMPOSANTS DE LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS DU LAIT COMME NOUVEAUX ALICAMENTS ? .....	59
4. QUELLE EST L'IMPLICATION DE LA MUCINE 1 ? .....	63
<b>CHAPITRE III. ....</b>	<b>68</b>
<b>METHODES DE SEPARATION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS DU LAIT .....</b>	<b>68</b>
1. SEPARATION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS DU LAIT BOVIN PAR SDS-PAGE .....	69
2. SEPARATION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE DES GLOBULES GRAS DU LAIT BOVIN PAR LA METHODE AQUA (« ABSOLUTE QUANTIFICATION TECHNIQUE ») .....	71
<b>CHAPITRE IV. AFFINITE DE LA MUCINE AVEC LES PROBIOTIQUES.....</b>	<b>72</b>
1. PRESENTATION ET ROLES DES PROBIOTIQUES .....	73
2. INTERACTIONS ENTRE MUCINES ET PROBIOTIQUES ET ENCAPSULATION : QUEL IMPACT SUR LA PROTECTION DES PROBIOTIQUES LORS DE LA DIGESTION ? .....	77
2.1 Expériences.....	77
2.2 Stabilité de la membrane des globules gras lors de la digestion.....	77
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>80</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>81</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>87</b>

# Figures

<i>Figure 1: Supra structure des globules gras du lait avec une représentation schématique de la membrane des globules gras du lait.</i>	21
<i>Figure 2 : Structure des globules gras avec la disposition détaillée des principales protéines de la membrane des globules gras.</i>	27
<i>Figure 3 : Profil des protéines du babeurre (colonne 2) et de la Milk Fat Globule Membrane (MFGM, colonne 3) isolés à partir du babeurre par microfiltration.</i>	29
<i>Figure 4 : Résumé des différents effets que peuvent exercer les constituants de la membrane des globules gras contre les pathogènes infectant le tractus gastro-intestinal pendant la période de contamination.</i>	31
<i>Figure 5 : Incidence des maladies diarrhéiques selon l'âge</i>	33
<i>Figure 6: Mécanismes d'action du rotavirus sur les cellules de l'épithélium intestinal</i>	36
<i>Figure 7 : Mécanisme infectieux de <i>E. coli</i> O157:H7</i>	38
<i>Figure 8 : Les barrières entériques de défense physiques et chimiques contre les microorganismes pathogènes.</i>	39
<i>Figure 9 : Résumé des facteurs de virulence associés à <i>Helicobacter Pylori</i></i>	41
<i>Figure 10 : Inhibition de la colonisation de <i>H. Pylori</i> (HP) chez les souris par les glycoprotéines de la MFGM et la lactoferrine (LF) du lait bovin.</i>	45
<i>Figure 11 : Inflammation chez les souris infectées par <i>H. Pylori</i> (HP) comparé aux résultats obtenus lors de l'ajout de glycoprotéines de la MFGM et de lactoferrine (LF) du lait bovin.</i>	46
<i>Figure 12 : Effet de l'huile de maïs (en rouge) et du beurre (en bleu) sur le pourcentage de colonisation de <i>Helicobacter Pylori</i> et le nombre de pathogènes adhérents à la muqueuse gastrique de rats infectés avec 109 bactéries/UFC <i>H. Pylori</i>.</i>	47
<i>Figure 13 : Effet de la lactophoricine (selon la concentration du peptide de 23 acides aminés constituant la lactophoricine) sur la croissance des bactéries.</i>	49
<i>Figure 14 : Effets de la membrane des globules gras du lait chauffé et cru.</i>	53
	57
<i>Figure 15 : Effets du lait bovin sur les taux métaboliques de <i>E. coli</i> dépendant de la xanthine oxydase.</i>	57
<i>Figure 16 : Effets de la sphingomyéline sur la diminution de l'absorption intestinale du cholestérol C14 (C14-CH) pendant 8h chez le rat.</i>	58
<i>Figure 17 : Capacité de rétention de l'eau de différents yaourts.</i>	61
<i>Figure 18 : Effet de la MFGM (a) et de la mucine 1 (b) sur l'adhésion des bactéries pathogènes sur les cellules Caco-2 représentatives des cellules épithéliales intestinales humaines.</i>	63
<i>Figure 19 : Effet concentration-dépendant (concentration de mucine 1 en ng/ml) de la mucine 1 sur l'adhésion des bactéries pathogènes <i>E. coli</i> (a), <i>S. Typhimurium</i> (b), <i>S. aureus</i> (c) et <i>B. subtilis</i> (d) sur les cellules Caco-2 représentative des cellules épithéliales intestinales humaines.</i>	64

<i>Figure 20 : Effet de la mucine 1 dans le détachement des bactéries des cellules épithéliales intestinales. Les résultats sont présentés en % de bactéries liées aux cellules Caco-2 par rapport au contrôle qui a été réalisé en l'absence de mucine 1.</i>	65
<i>Figure 21 : Séparation de protéines bovines de la membrane des globules gras du lait par SDS-PAGE.</i>	70
<i>Figure 22 : Situations amenant à conseiller des probiotiques en officine.</i>	74
<i>Figure 23 : Changements dans la structure protéique de la MFGM dépourvue de sa partie lipidique durant la digestion avec la pepsine.</i>	78

# Tableaux

<b>Tableau 1 : Composition estimée de la membrane des globules gras (Dewettinck et al, 2008).</b>	21
<b>Tableau 2 : Résumé des effets bénéfiques sur la santé des lipides polaires de la membrane des globules gras du lait.</b>	23
<b>Tableau 3 : Caractéristiques des protéines de la Milk Fat Globule Membrane.</b>	25
<b>Tableau 4 : Composition en % des différentes poudres utilisées dans la formulation des yaourts.</b>	28
<b>Tableau 5 : Conditions des études citées dans la figure 4 (voir Spong et al, 2012 pour détails et références).</b>	32
<b>Tableau 6 : Effets de l'exposition à la totalité de la membrane des globules gras du lait (isolée soit de la poudre de babeurre soit du lactosérum issu du fromage) sur le caractère infectieux de la souche sensible à la neuraminidase du rotavirus.</b>	50
<b>Tableau 7 : Effets de l'exposition à la partie lipidique extraite de la membrane des globules gras du lait (elle même isolée soit de poudre de babeurre soit du lactosérum issu du fromage) sur le caractère infectieux de la souche sensible à la neuraminidase du rotavirus.</b>	51
<b>Tableau 8 : Caractéristiques des 5 fractions glycoprotéiques de la MFGM extraites de lait bovin frais.</b>	54
<b>Tableau 9 : Fermeté des yaourts formulés à partir de lait écrémé (SM), de babeurre (BM) et de MFGM.</b>	62
<b>Tableau 10 : Effets du traitement de la mucine 1 avec la sialidase sur la capacité de la mucine 1 à inhiber l'attachement des bactéries <i>E. coli</i> et <i>S. Typhimurium</i> aux cellules Caco-2.</b>	66
<b>Tableau 11 : Effets de différents monosaccharides sur l'attachement des bactéries <i>E. coli</i> et <i>S. Typhimurium</i> aux cellules Caco-2.</b>	67
<b>Tableau 12 : Comparaison des concentrations de <math>\beta</math>-Lg dans les deux échantillons de babeurre BPC50 et BPC60 obtenus par deux méthodes différentes : SDS-PAGE et quantification absolue (AQUA).</b>	71
<b>Tableau 13 : Présence de <i>Helicobacter Pylori</i> dans l'estomac de patients après administration des probiotiques <i>Lactobacillus acidophilus</i> (La5) et <i>Bifidobacterium lactis</i> (Bb12) dans différents types de préparations.</b>	75
<b>Tableau 14 : Aspects histologiques d'échantillons gastriques de 14 patients volontaires avant et après traitement avec un yaourt contenant les probiotiques La5 et BB12.</b>	76

# Abréviations

ADPH : Adipophiline

AQUA : Technique de quantification absolue, « Absolute QUAntification »

BRCA : Cancer du sein, « BReast CAncer »

BTN : Butyrophyline

CD 36 : « Cluster of Differentiation 36 »

ECEH : *E. coli* entérohémorragique

FABP : Protéine de liaison des globules gras, « Fat Acid binding Protein »

GGA : GeranylGeranylAcetone

LGG : *Lactobacillus rhamnosus* GG

MFGM : Membrane des globules gras du lait, « Milk Fat Globule Membrane »

MUC 1 : Mucine 1

PAS 3: Acide périodique de Schiff III «Periodic acid Schiff III»

PAS 4 : Acide périodique de Schiff IV «Periodic acid Schiff IV»

PAS 6/7: Acide périodique de Schiff 6/7 «Periodic acid Schiff 6/7»

SDS-PAGE : Électrophorèse sur Gel de PolyAcrylamide en présence de  
DodecylSulfate de Sodium

SNC : Système Nerveux Central

WPI : Isolat de protéines de lactosérum, « Whey Protein Isolate »

XO : Xanthine Oxydase

# Introduction

Les globules gras du lait sont entourés d'une membrane protectrice appelée MFGM, *Milk Fat Globule Membrane* qui provient de la membrane plasmique des cellules épithéliales de la glande mammaire bovine lors de la sécrétion du lait.

Les constituants de la MFGM d'origine protéique et lipidique auraient des effets bénéfiques sur la santé. C'est notamment le cas des phospholipides qui ont un rôle important dans la protection gastro-intestinale chez l'homme. D'autres effets bénéfiques ont été démontrés à travers des facteurs permettant de baisser le cholestérol, des inhibiteurs de cellules cancéreuses, des antibactériens, des agents comme les phospholipides qui permettraient de lutter contre le cancer du côlon mais aussi contre des pathogènes intestinaux (Spitsberg, 2005).

Cette membrane protectrice des globules gras pourrait également améliorer les taux d'encapsulation de probiotiques et ainsi mieux protéger notre système intestinal. Les probiotiques sont définis comme étant des microorganismes viables qui ont un effet bénéfique dans la prévention et le traitement de pathologies gastro-intestinales. Ces pathologies peuvent être par exemple, des infections bactériennes et virales conduisant à des diarrhées, des gastroentérites causées par *Helicobacter Pylori*, des maladies inflammatoires intestinales, etc. Les probiotiques participent à l'inhibition de la prolifération de germes et bactéries pathogènes, ils peuvent augmenter les capacités de notre système immunitaire, aider la flore intestinale à réduire l'absorption de substances toxiques venant des aliments. Ils auraient aussi un rôle dans l'élimination de cellules tumorales ainsi que dans la prévention de certains cancers. Les bactéries lactiques *Lactobacillus sp.* et *Bifidobacterium sp.* sont les probiotiques les plus connus du lait.

Cependant, la plupart des probiotiques perdent de leur efficacité lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal. Il serait donc intéressant de pouvoir encapsuler ces probiotiques afin de garantir leurs effets sur notre organisme. L'encapsulation des probiotiques serait alors possible grâce à la membrane des globules gras du lait qui, d'après plusieurs études menées récemment, serait résistante à la digestion et aurait des capacités d'adhésion à la muqueuse intestinale.

Enfin, il est important de notifier que, d'un point de vue médical, les patients souffrant de maladies du tube digestif sont nombreux. En effet, les ventes de médicaments

associés sont très élevées : d'après la liste des 20 classes de médicaments les plus vendues en quantité (ANSM, 2013), les médicaments pour les troubles de l'acidité se placent en 4<sup>ème</sup> position et ceux pour les troubles fonctionnels gastro-intestinaux en 9<sup>ème</sup> position. La mise sur le marché d'une alternative sous forme d'aliments, donc avec moins de contre-indications ou effets secondaires pour les patients, serait pertinente.

Dans ce travail de thèse, nous avons pu nous appuyer sur de nombreux travaux puisque le sujet de la MFGM est d'actualité et que beaucoup de chercheurs s'intéressent de près à son fonctionnement et sa composition afin de l'utiliser à des fins de nutraceutique. C'est d'ailleurs un géant du marché de l'agroalimentaire, Nestlé, qui détient un brevet sur l'encapsulation de probiotiques à partir de la MFGM (Benyacoub et al, 2010). Ces poudres seraient alors destinées aux nourrissons afin d'augmenter les capacités de défense de leur système immunitaire dès la naissance mais aussi à des enfants ou adultes qui souffriraient de maladies du tube digestif.

Ce travail de thèse a été principalement réalisé sur la base de publications, et sur la base de quelques expériences réalisées dans le cadre d'un cursus en école d'ingénieur agroalimentaire afin de tester l'affinité entre une protéine de la membrane des globules gras, appelée mucine 1 et un probiotique, *Lactobacillus rhamnosus* GG.

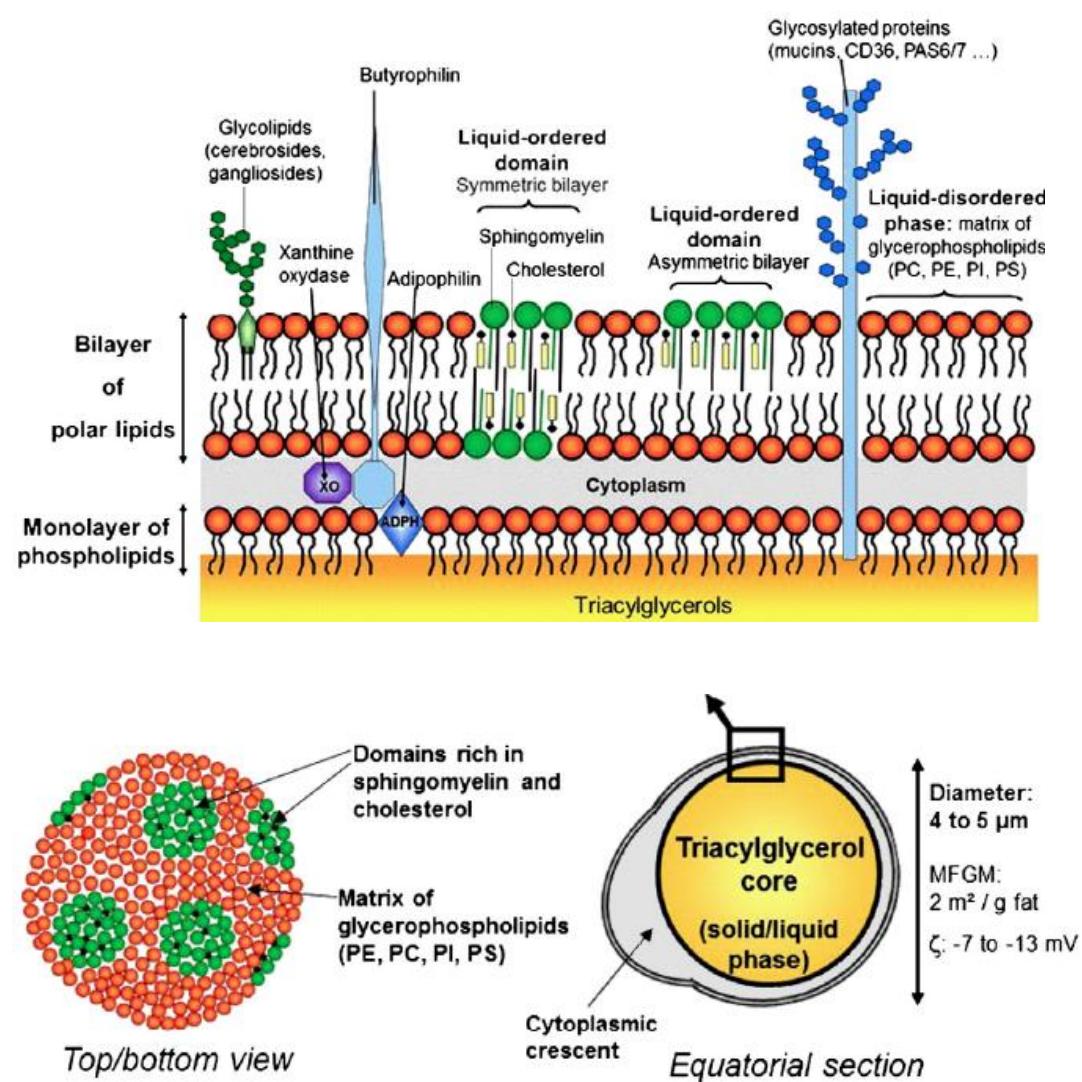
Dans une première partie, la structure et la composition de la membrane des globules gras sera détaillée. Puis les pathologies les plus courantes du tube digestif seront présentées afin de mieux comprendre les possibles effets bénéfiques de l'association MFGM et probiotiques sur notre santé. Les effets bénéfiques sur la santé des composants lipidiques et protéiques de la membrane des globules gras du lait seront aussi détaillés dans ce chapitre. Finalement, les rôles des probiotiques, leurs effets sur les bactéries ainsi que la stabilité de la MFGM lors de la digestion permettant ainsi la protection des probiotiques pendant la digestion seront étudiés.

## **Chapitre I.**

### **La membrane des globules gras du lait: structure et composition**

## 1. Les lipides de la membrane des globules gras

La MFGM est une membrane qui entoure chaque gouttelette lipidique du lait. Elle est constituée d'une monocouche lipidique interne et une bicouche lipidique externe. Ces couches peuvent être constituées de glycérophospholipides, de sphingolipides dont des sphingomyélines et des glycolipides (comme le lactosylcéramide, le galactosylcéramide et les gangliosides), de cholestérol et de triglycérides à haut point de fusion (**Figure 1**).



**Figure 1: Supra structure des globules gras du lait avec une représentation schématique de la membrane des globules gras du lait.**

La triple couche de lipides polaires constitue le pilier de la membrane des globules gras, avec une organisation latérale de la bicouche correspondant à la séparation de phase des domaines riches en sphingomyéline. Les glycérophospholipides sont organisés dans une phase liquide désordonnée et entourée de domaines riches en sphingomyéline et cholestérol. Les protéines transmembranaires et de liaison sont situées le long de la membrane dans la phase liquide désordonnée des phospholipides. Les fractions glycosylées des glycoprotéines sont distribuées au-dessus de la surface de la membrane externe, dans le glycocalyx (Lopez, 2011).

Comme on peut le voir dans le **Tableau 1**, la MFGM est à 90% constituée de protéines et de phospholipides (Dewettinck et al., 2008).

Les phospholipides sont des lipides polaires très présents dans les cellules membranaires. En tant que lipides membranaires, ils présentent des propriétés élevées de perméabilité et de fluidité.

Les phospholipides sont efficaces pour protéger la membrane cellulaire et en particulier la muqueuse du système gastro-intestinal. Ils auraient ainsi un effet équivalent à certains médicaments tels que le Misoprostol et le Sucralfate (Veereman-Wauters et al., 2012). Il a aussi été démontré que les phospholipides auraient un rôle dans la prévention des translocations microbiennes (Veereman-Wauters et al., 2012).

**Tableau 1** : Composition estimée de la membrane des globules gras (Dewettinck et al., 2008).

Composant	mg pour 100 g de globules gras	mg pour 100 g de MFGM (à l'état sec)
Protéines	1800	70
Phospholipides	650	25
Cérebrosides	80	3
Cholestérol	40	2
Monoglycérides	+	?
Eau	+	-

Caroténoides + vitamine A	0,04	0,0
Fe	0,3	0,0
Cu	0,01	0,0
Total	> 2570	100

+ : présent mais quantité inconnue

Le **Tableau 2** résume les effets bénéfiques des lipides polaires constituant la MFGM. Cependant, il est intéressant de détailler l'action de certains de ces lipides polaires.

Les sphingolipides représentent 20 à 50% des lipides polaires de la membrane des globules gras. La MFGM aurait un haut degré de saturation qui lui permettrait de s'associer avec le cholestérol afin de former des « radeaux lipidiques » impliqués dans des processus cellulaires. Des processus d'endocytose et d'échanges du cholestérol permettraient ainsi à la sphingomyéline d'avoir un impact dans l'absorption du cholestérol dans les intestins (Brown et London, 2000; Dewettinck et al., 2008).

Les phospholipides sont des molécules qui participent aussi au transport du cholestérol et des nutriments riches en graisses. Dans les phospholipides, on retrouve la phosphatidylcholine qui était avant appelée « lécithine ». Elle aide le foie à se régénérer après des attaques de substances chimiques toxiques comme c'est le cas de certains médicaments (Anand et al., 1999), de l'alcool ... mais aussi à répondre à des dommages liés à des virus comme dans le cas des hépatites. Des essais cliniques ont été effectués pour les hépatites B et C (Niederau et al., 1998). La phosphatidylcholine protège aussi la muqueuse gastro-intestinale contre les attaques de toxiques et dans une étude menée sur les enfants prématurés, elle réduirait les entérocolites nécrosantes (Carlson et al., 1998).

**Tableau 2 :** Résumé des effets bénéfiques sur la santé des lipides polaires de la membrane des globules gras du lait.

<b>Lipides polaires</b>	<b>Effets bénéfiques sur la santé</b>
Sphingolipides et ses métabolites	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Réduction du nombre de foyers d'anomalies au niveau des cryptes aberrants, apporte notamment une protection envers la carcinogénèse colique (Snow et al., 2010)</li> <li>▪ Activité anti-carcinogène, notamment dans le cas du cancer du côlon pour la sphingomyéline (Spitsberg, 2005)</li> <li>▪ Action anti-cholestérol de la sphingomyéline (Spitsberg, 2005)</li> <li>▪ Diminution des infections gastro-intestinales (Sprong et al., 2012)</li> <li>▪ Comme pour les autres phospholipides, la diminution de sphingolipides est associée avec les maladies liées à l'âge et le développement d'Alzheimer (Horrocks et Farooqui, 2004).</li> </ul>
Phosphatidylsérine	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Effets positifs dans la maladie d'Alzheimer : agit sur la cognition, la mémoire (Crook et al., 1991 ; 1992)</li> <li>▪ Agit aussi sur l'humeur, le stress (Benton et al., 2001)</li> <li>▪ Composé pouvant être intégré dans des préparations alimentaires (mis à part les boissons) (Kidd, 2002)</li> </ul>
Phosphatidylcholine	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Aide le foie à se régénérer après des attaques de substances chimiques toxiques et des dommages causés par les virus (Kidd et al., 2000 ; Niederau et al., 1998)</li> <li>▪ Protège la muqueuse gastro-intestinale contre les attaques de substances toxiques provoquant des entérocolites nécrosantes (Carlson et al., 1998)</li> <li>▪ Composé sûr, bien toléré et abordable économiquement afin de l'intégrer dans des préparations alimentaires (mise à part les boissons) (Kidd, 2002)</li> </ul>

Lysophosphatidylcholine	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agit comme médiateur de médicaments bactériostatiques et bactéricides (Van Rensburg et al., 1992).</li> </ul>
-------------------------	--

## **2. Les protéines de la membrane des globules gras**

La membrane des globules gras est constituée de 25 à 70% de protéines. Les 8 protéines majoritaires de la MFGM sont la mucine 1, la xanthine oxydase, la butyrophiline, l'acide periodique de Schiff 6/7 (PAS 6), l'acide periodique de Schiff III (PAS 3), Cluster de différenciation 36 (CD36), l'adipophiline (ADPH) et la protéine de liaison des globules gras (FABP) (Fong et al., 2007; Struijs et al., 2013).

Cette composition est variable en fonction des techniques mises en œuvre pour extraire ces protéines. Deux de ces techniques seront abordées au chapitre III: SDS-PAGE (Sodium Dodécylsulfate sur gel de Polyacrylamide) et AQUA (Technique de quantification absolue). Cependant, certaines protéines de la membrane des globules gras n'ont pas encore été identifiées, leur structure et séquence en acides aminés est encore floue et des recherches sont en cours à ce propos. Le **tableau 3** ci-après résume les caractéristiques de chacune de ces protéines.

Aussi, grâce à la présence de glycoprotéines, la MFGM possède des propriétés antiadhésives qui lui permettent d'agir comme un récepteururre ou qui lui permettent d'entrer en compétition avec les pathogènes pour les sites récepteurs sur les cellules épithéliales (Le et al., 2012). Ces aspects seront vus au chapitre II.

**Tableau 3 :** Caractéristiques des protéines de la Milk Fat Globule Membrane.

	Masse moléculaire par SDS-PAGE	Degré de glycosylation	Présence d'acide sialique	Rôles	Dénaturation thermique ?
<b>Mucine 1</b>	160-200	50%	oui	Protection des muqueuses contre les dommages physiques et les microorganismes	Un court chauffage à 80°C peut la déplacer de son point d'attache avec la membrane
<b>Xanthine oxydase</b>	146-155	-	Non applicable	Antimicrobien	80°C/10s
<b>Butyrophiline</b>	66-67	+	non	Sécrétion de la membrane des globules gras	58°C
<b>CD36</b>	76-78	24%	oui	Lié au système immunitaire	/
<b>PAS 6/7</b>	43-59	+	oui	Liaison au rotavirus et protection contre les gastroentérites	/
<b>Adipophiline</b>	52	-	Non applicable	Sécrétion des globules gras et transport des acides gras à longue chaîne et des triglycérides	/

<b>FABP</b>	13	-	Non applicable	Contrôle du métabolisme lipidique	/
<b>PAS 3</b>	95-100	++	Non déterminé	/	/

/ : pas d'informations à ce sujet ; + : présente en plus ou moins grande quantité ; - : absence

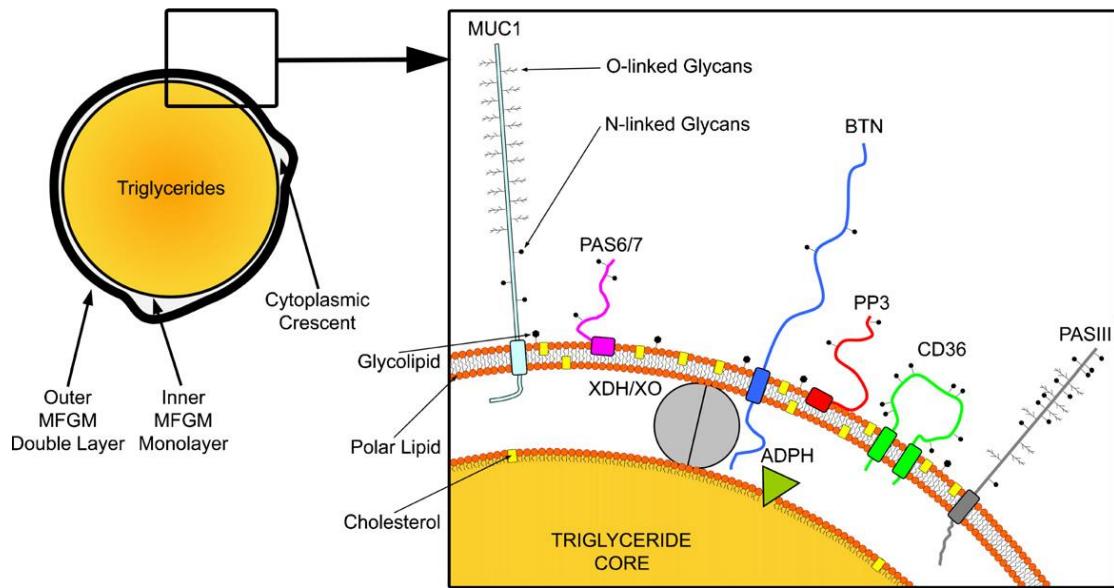
### **3. Structure de la membrane des globules gras**

La bicouche de phospholipides servirait de support à la membrane. On y retrouve le cholestérol, les protéines de la membrane périphérique et transmembranaire et les groupements glucidiques provenant des glycolipides et des glycoprotéines qui sont orientées en avant. La disposition asymétrique des protéines de la membrane des globules gras est présentée **Figure 2**.

L'ADPH est directement en contact avec la couche interne de la membrane puisqu'elle possède une très grande affinité pour les triglycérides. Avec la xanthine oxydase et la butyrophiline, ils forment un complexe permettant la stabilisation de la MFGM.

Certaines protéines comme la MUC1 sont très glycosylées, nous verrons dans le chapitre II.3 quels sont les impacts de cette glycosylation sur les effets bénéfiques de la MFGM. Les groupements glucidiques sont uniformément distribués autour de la membrane externe des globules gras.

Enfin, les lipides comme les protéines sont aussi arrangées de façon asymétrique dans la membrane des globules gras.



**Figure 2 : Structure des globules gras avec la disposition détaillée des principales protéines de la membrane des globules gras.**

XO= Xanthine Oxydase, PAS= Acide periodique de Schiff, PP3= Protéose Peptone 3, CD36= Cluster de Différenciation 36, ADPH= Adipophilin, BTN= Butyrophilin, MUC1= Mucine 1 (Dewettinck et al, 2008).

Après la lactation et la traite, il peut néanmoins y avoir des changements dans la composition et la structure de la MFGM. Des facteurs comme l'âge des vaches, la qualité bactériologique du lait, l'étape de lactation et la saison peuvent avoir une influence sur ces changements (Evers, 2004).

Toutefois, ces facteurs ne sont rien comparé aux procédés de traitement du lait tels que le chauffage, le refroidissement, l'homogénéisation ou encore l'évaporation qui sont connus pour dénaturer les protéines du lait ou modifier les équilibres minéraux.

L'homogénéisation peut créer une nouvelle membrane constituée principalement de caséines et de protéines, le chauffage peut provoquer la dénaturation des protéines de la membrane entraînant la complexation de la xanthine oxydase et de la butyrophiline. Enfin, le refroidissement peut entraîner la migration des phospholipides dans le lactosérum et l'inclusion d'air à travers le pompage peut créer des dommages et des pertes de la MFGM (Singh, 2006).

Les propriétés physiques et la microstructure de yaourts enrichis avec des composants de la MFGM ont été étudiées (Le et al., 2011). Les compositions de la poudre de babeurre, de la MFGM isolée de la poudre de babeurre par microfiltration et de la poudre de lait écrémé seule ont été caractérisées.

Les résultats obtenus sont résumés ci-dessous (**Tableau 4**). On constate que la poudre de MFGM issue de la poudre de babeurre (par microfiltration) contient plus de protéines totales et de lipides polaires (qui protègent les membranes cellulaires) que les deux autres sortes de poudres (Le et al., 2011).

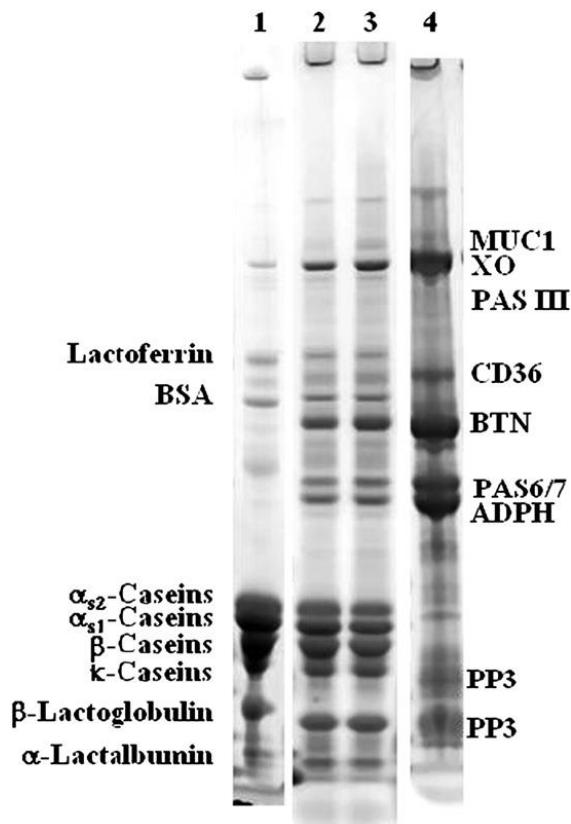
**Tableau 4 :** Composition en % des différentes poudres utilisées dans la formulation des yaourts.

Échantillons	Protéines totales	Lipides totaux	Phospholipides (PLS)	Ratio PLs/ lipides totaux
Poudre de lait écrémé	34,00	1,94	-	-
Poudre de babeurre	33,07	10,43	3,36	32,24
Poudre de MGFM isolée de la poudre de babeurre	64,5	25,2	8,4	33,4

(Les cellules vides indiquent des paramètres qui n'ont pas été mesurés)

Cependant, bien que le procédé de microfiltration permette d'augmenter la concentration des lipides polaires et des protéines totales, lorsque l'on compare ces résultats à une fraction de la MFGM témoin, cette fois-ci isolée du lait cru et non de la poudre de babeurre (**Figure 3**), on constate que ces protéines totales ne sont pas des protéines spécifiques de la membrane des globules gras du lait qui sont connues pour leur effets bénéfiques sur la santé. On peut en effet constater (**Figure 3**) que sur la colonne 4 correspondant à la MFGM isolée du lait cru il y a beaucoup plus de protéines spécifiques de la MFGM ayant un effet bénéfique sur la santé telles que MUC1, XO, PAS, BTN.

Le fait que la MFGM provenant de la poudre de babeurre contienne plus de protéines totales que la MFGM isolée du lait cru serait en fait tout simplement due à l'interaction qu'il y a entre les protéines provenant de la poudre de babeurre et les protéines de la MFGM lors du processus de microfiltration.



**Figure 3** : Profil des protéines du babeurre (colonne 2) et de la Milk Fat Globule Membrane (MFGM, colonne 3) isolés à partir du babeurre par microfiltration.

La colonne 1 traduit le profil protéique du lait écrémé et la colonne 4 d'un échantillon de MFGM isolé à partir de lait cru (MUC1 et PAS III sont très glycosylées et n'apparaissent donc pas clairement après coloration au bleu de Coomassie) (Le et al., 2011)

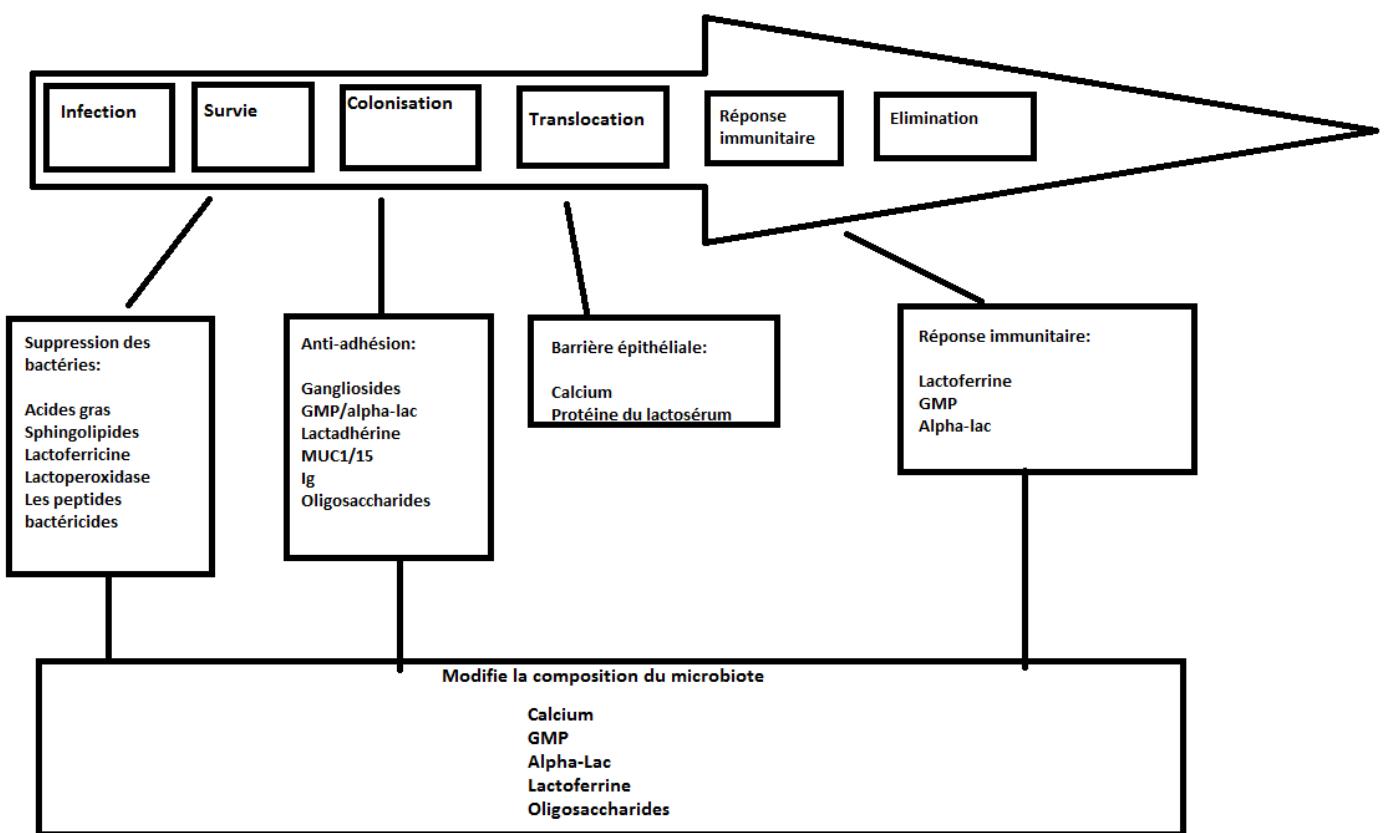
## **Chapitre II.**

### **Rôles bénéfiques des composants de la membrane des globules gras sur la santé**

## **1. Présentation des maladies du tube digestif**

Il est important de comprendre le fonctionnement des principales maladies du tube digestif afin de bien saisir l'effet bénéfique que pourrait avoir la membrane des globules gras du lait seule ou associée avec un probiotique. En effet, dans les nombreuses publications étudiées sur la membrane des globules gras, on constate que les effets bénéfiques sur la santé de la MFGM sont très nombreux et que les plus importants et les plus étudiés sont les effets sur le tractus gastro-intestinal.

La **Figure 4** et le **Tableau 5** permettent de comprendre plus largement quel réel impact ont les lipides et les protéines constituant le lait sur les infections gastro-intestinales (Sprong et al., 2012)



**Figure 4 :** Résumé des différents effets que peuvent exercer les constituants de la membrane des globules gras contre les pathogènes infectant le tractus gastro-intestinal pendant la période de contamination.

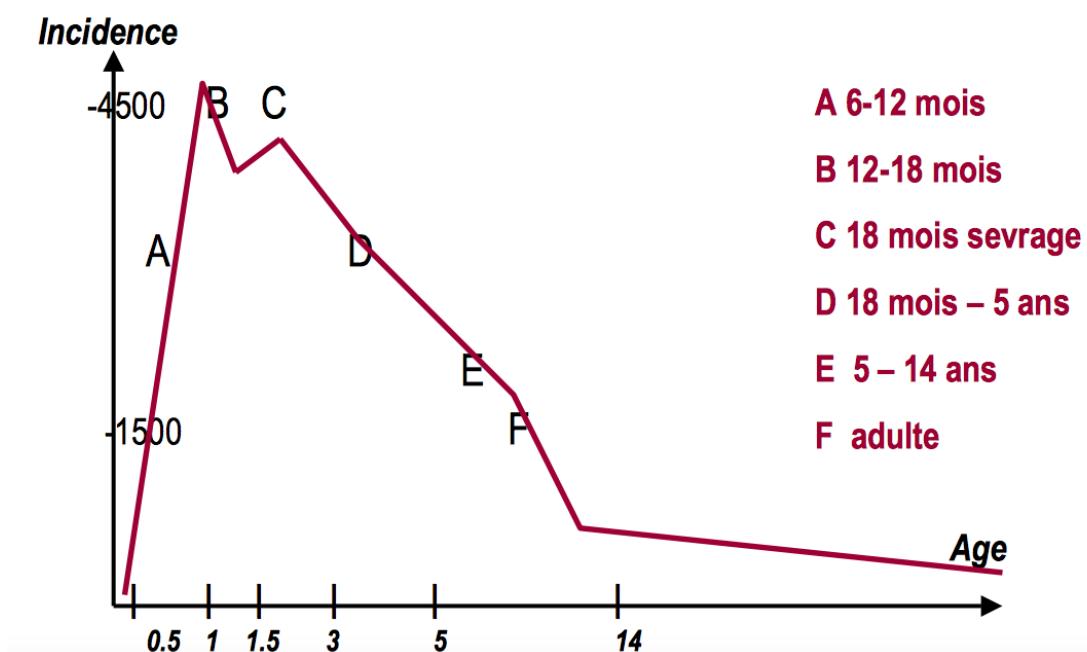
(Adapté de Sprong et al., 2012)

**Tableau 5** : Conditions des études citées dans la figure 4 (voir Spong et al., 2012 pour détails et références).

Études réalisées sur	In vitro	animaux	Homme
<b>Caséines</b>	oui	✗	✗
<b>Concentré de protéines de lactosérum</b>	oui	souris et rats	✗
<b><math>\alpha</math>-lactoglobuline</b>	oui	singe rhésus	✗
<b>Immunoglobuline G</b>	oui	souris	✗
<b>Lactoperoxidase</b>	oui	souris	✗
<b>GMP</b>	oui	singe Rhésus	✗
<b>Lactoferrine</b>	oui	rats	Humains atteints d'hépatite C et de moins de 5 ans
<b>MFGM</b>	oui	rats	enfants
<b>Lactadhérine</b>	oui	souris	✗
<b>MUC1</b>	oui	souris	✗
<b>Sphingolipides</b>	oui	✗	enfants
<b>Calcium</b>	✗	souris	Sujets sains
<b>Triglycérides des globules gras du lait</b>	oui	rats	enfants
<b>Sialyl lactose</b>	oui	Singe rhésus	Patients dyspeptiques

## 1.1 Les diarrhées

La majorité des maladies diarrhéiques sont des gastroentérites infectieuses. Les gastroentérites sont le résultat d'une inflammation du tractus gastro-intestinal, elles touchent à la fois l'estomac et l'intestin et provoquent des diarrhées aigües. Cette maladie est très dangereuse chez les enfants de moins de 5 ans et est encore plus grave dans les pays en voie de développement. D'après l'OMS, il s'agit de la deuxième cause de mortalité dans le monde (environ 1 épisode/an/habitant dans le monde) et elle toucherait 4 à 5 fois plus les enfants de moins de 5 ans (**Figure 5**). La plupart des causes mortelles de diarrhées sont dues à la déshydratation.



**Figure 5** : Incidence des maladies diarrhéiques selon l'âge

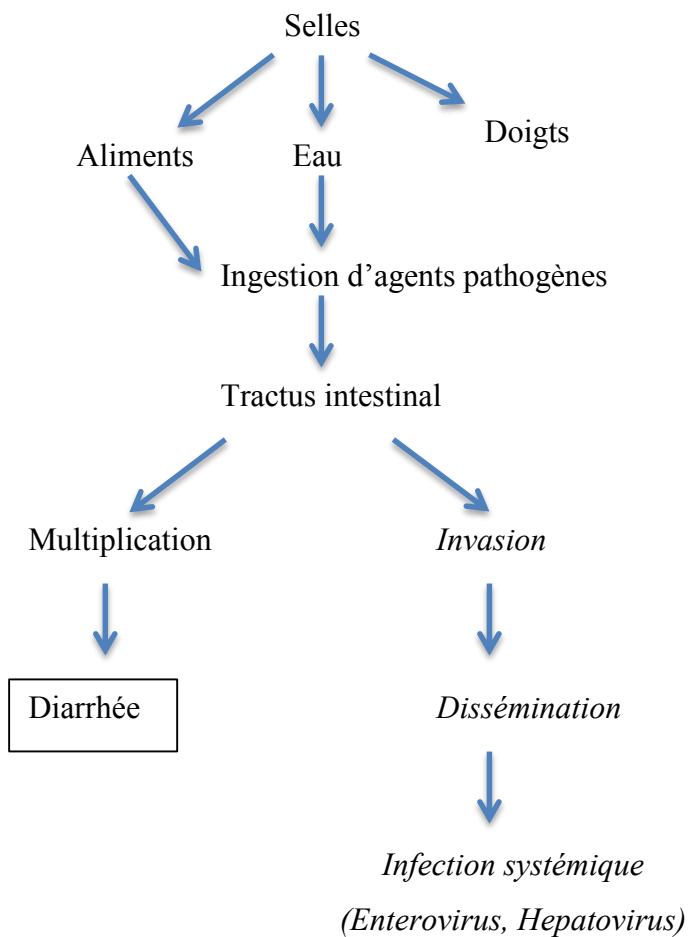
(IFMT « Institut de la Francophonie pour les Maladies Tropicales », 2015).

Les causes les plus communes de ces diarrhées seraient en fait des agents peu virulents comme la bactérie *E.coli* ou un virus, le rotavirus. On peut retrouver ces microorganismes dans notre quotidien comme lors d'un mauvais lavage des mains, d'un manque d'hygiène ou dans l'eau de boisson et dans les aliments dans le cas des pays en voie de développement.

### 1.1.1 Les gastroentérites virales, mécanismes d'action du rotavirus

La transmission du rotavirus se fait notamment par voie oro-fécale, le virus résiste au pH acide de l'estomac. Ce virus provoque de la fièvre et des vomissements suivis de diarrhées aqueuses pendant 4 à 5 jours conduisant à une sévère déshydratation qui peut être létale chez l'enfant.

En épidémiologie, on retrouve 7 sérogroupes (A à G) pour distinguer les types de rotavirus : la plupart des souches humaines correspondent au groupe A, les grandes épidémies sont associées au sérogroupe B (en Chine) et les épidémies décrites avec le groupe C sont minoritaires (en Europe, Asie et en Amérique).



Le rotavirus est un virion non enveloppé avec un ARN bicaténaire. Il comporte 11 segments d'ARN et chaque segment code pour une protéine virale avec 6 protéines de structure VP « Viral Protein » et 5 protéines fonctionnelles NSP « Non-Structural

Protein ». Le mécanisme d'action précis du rotavirus n'a pas encore été totalement élucidé, voici ce qui ressort des dernières études :

Le rotavirus infecte les cellules des villosités de l'intestin grêle en s'attachant aux cellules grâce à deux protéines de la capsid virale : VP4 et VP7 et grâce à l'Intégrine  $\alpha$ -V  $\beta$ -3 et la protéine HSP70 qui agissent comme des récepteurs cellulaires pour le virus. Ces molécules sont associées à des micro-domaines riches en cholestérol et en glycosphingolipides, leur désorganisation pourrait donc inhiber l'infectiosité du rotavirus. A ce stade, les villosités intestinales sont atrophiées et le virus peut pénétrer dans les cellules afin de répliquer son matériel génétique. Au niveau des bordures en brosse des villosités intestinales, l'attachement du virus entraîne une diminution de l'activité enzymatique (de la lactase et des dissacharidases) donc une réduction de l'absorption et une perte de fluide osmotique (Kvistgaard et al., 2004 ; Parashar et al., 2013 ; Qiagen 2015).

La diarrhée peut être causée par 4 mécanismes différents (**figure 6**) :

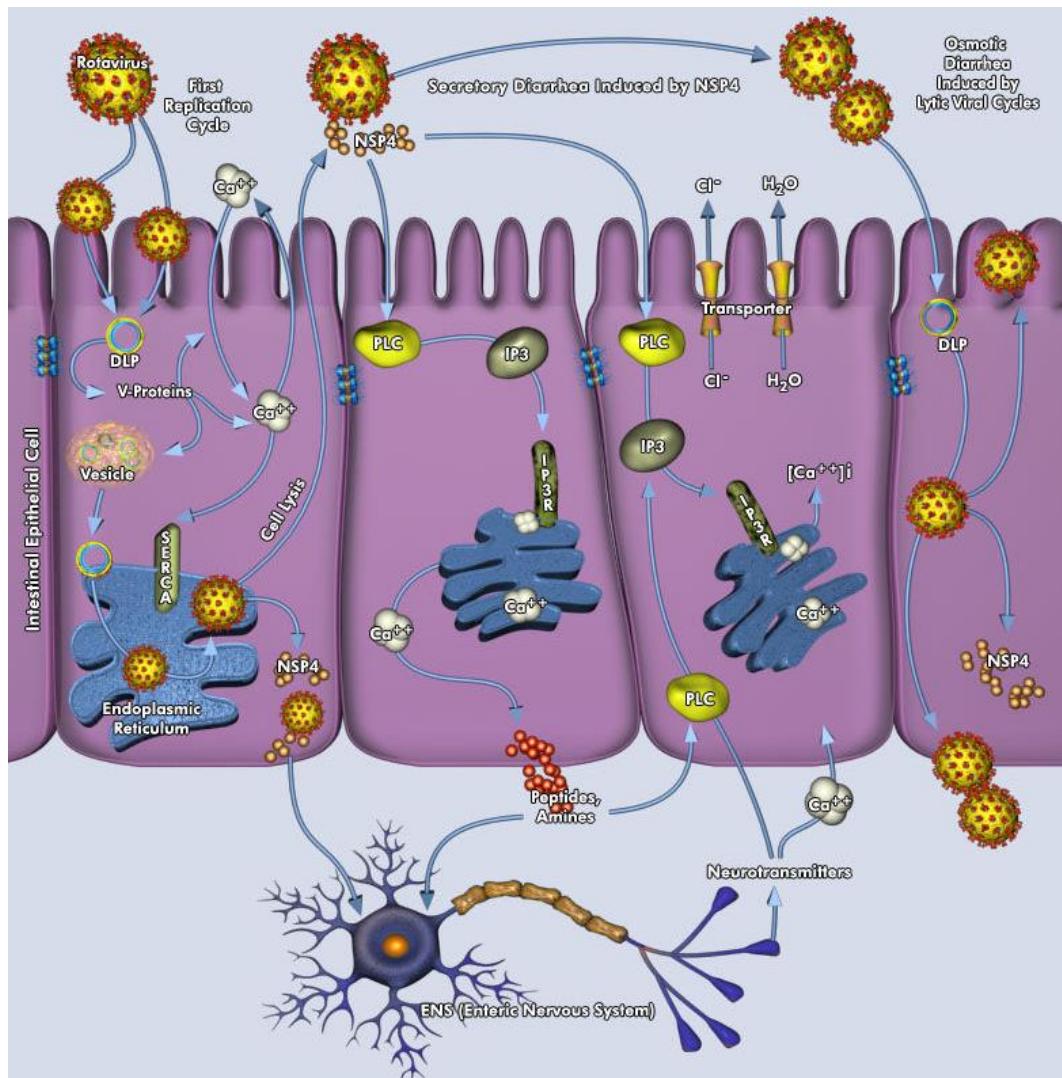
- un syndrome de malabsorption due à la destruction des entérocytes,
- une ischémie des villosités intestinales,
- une activation du système nerveux entérique après libération par les cellules infectées d'agents vasoactifs,
- une induction de la protéine non-structurelle 4 (NSP4).

Lors du premier cycle de réplication du rotavirus, la sécrétion des protéines virales VP entraîne une augmentation de la perméabilité de la membrane au  $\text{Ca}^{2+}$  et donc une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le réticulum endoplasmique à travers le *Sarco- et Endoplasmique Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase* (SERCA). Ce mécanisme entraîne alors la lyse cellulaire et la libération des protéines virales.

La glycoprotéine non structurelle 4 (NSP4) du rotavirus est une entérotoxine virale qui a la capacité d'induire la diarrhée sécrétoire à travers des mécanismes augmentant la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , cette forte concentration est nécessaire à la solubilisation des protéines virales. Ce mécanisme se fait grâce à la phospholipase C (PLC) et l'Inositol 1, 4,5-triphosphate (IP3). L'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieur des cellules infectées va aussi entraîner la sécrétion accrue d'ion chlorure et d'eau.

Il en résulte alors une diminution des entérocytes à fonction d'absorption, une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale et une augmentation des

mouvements sécrétoires. Ce qui conduit à l'apparition d'une diarrhée osmotique (Parashar et al., 2013 ; Qiagen 2015).



**Figure 6:** Mécanismes d'action du rotavirus sur les cellules de l'épithélium intestinal

(Qiagen)

PLC : phospholipase

IP3 : Inositol 1, 4,5-triphosphate

NSP4 : glycoprotéine non structurelle 4

SERCA: Sarco- et Endoplasmique Réticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase

V-Protein : Protéine Virale

## 1.1.2 Les gastroentérites bactériennes

### 1.1.2.1 Mécanismes d'action de *E. coli*

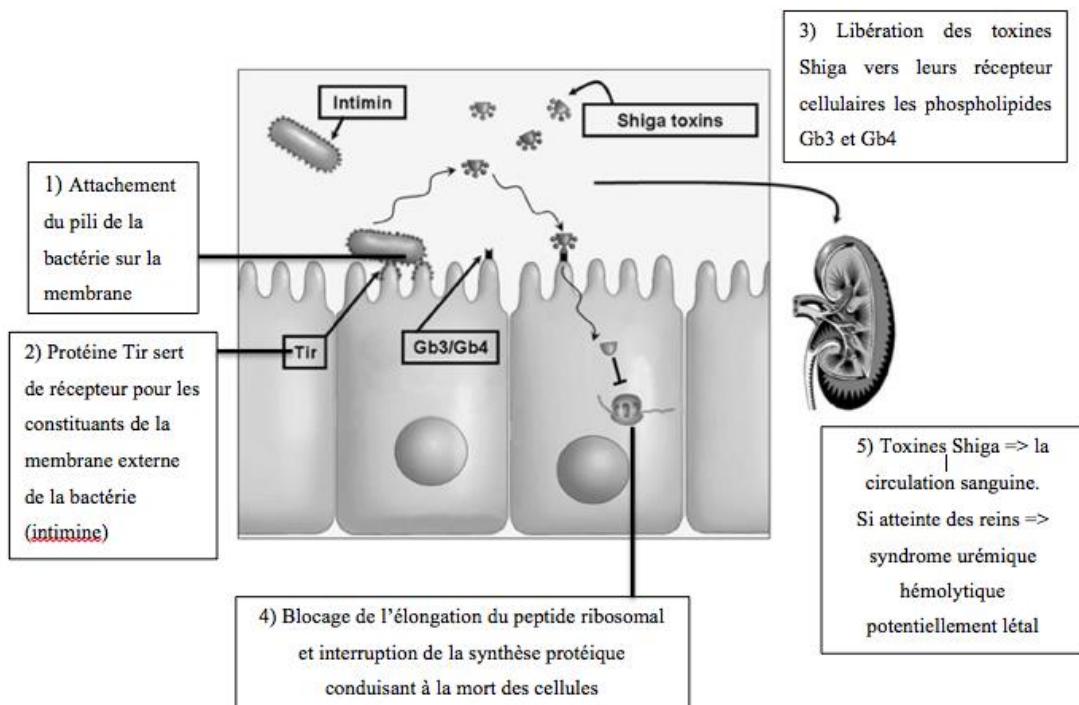
*E. coli* est la cause d'un quart des cas de diarrhées dans les pays développés. Les formes pathogènes de *E. coli* ont été classés en 6 groupes : entéropathogénique (EPEC), entéroinvasive (EIEC), entérotoxigénique (ETEC), entéroaggrégative (EAEC), diffusément adhérente (DAEC) et entérohémorragique (EHEC).

Le sérotype O157:H7 de *E. coli* est la forme la plus importante pour la santé publique, c'est pourquoi nous allons principalement discuter des effets physiopathologiques et cliniques de *E. coli* O157:H7.

« *E. coli* est une bactérie que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud. La transmission à l'homme passe principalement par la consommation d'aliments contaminés, comme de la viande hachée crue ou mal cuite, du lait cru, des légumes crus et des graines germées contaminés.

L'importance du problème pour la santé publique a été reconnue en 1982, à la suite d'une flambée épidémique aux États-Unis (notamment dans la viande d'hamburgers). ECEH produit des toxines, appelées vérotoxines ou toxines de type Shiga (Shiga like) en raison de leur ressemblance avec celles élaborées par *Shigella dysenteriae*. ECEH se multiplie à des températures comprises entre 7 °C et 50 °C, la température optimale étant de 37 °C. Certaines souches se développent dans des aliments acides, jusqu'à un pH de 4,4, ainsi que dans les aliments dont l'activité de l'eau est au minimum de 0,95 (c'est la disponibilité de l'eau d'un produit pour des réactions chimiques, biochimiques, un changement d'état ou le développement de micro-organismes). La cuisson détruit ECEH si l'aliment est cuit à cœur, la température atteignant au moins 70 °C en toute part » (OMS, 2015). De plus, la transmission de la bactérie d'une personne à l'autre se fait très facilement, ce qui veut dire que la dose infectieuse est basse (Griffin et Tauxe, 1991).

Une infection à *E. coli* O157:H7 peut se manifester par une diarrhée (non sanguine), une colite hémorragique, un syndrome urémique hémolytique ou par un purpura thrombopénique (Rahal et al., 2012). Les mécanismes infectieux sont présentés **Figure 7.**



**Figure 7 :** Mécanisme infectieux de E. coli O157:H7

(Adapté de Rahal et al., 2012)

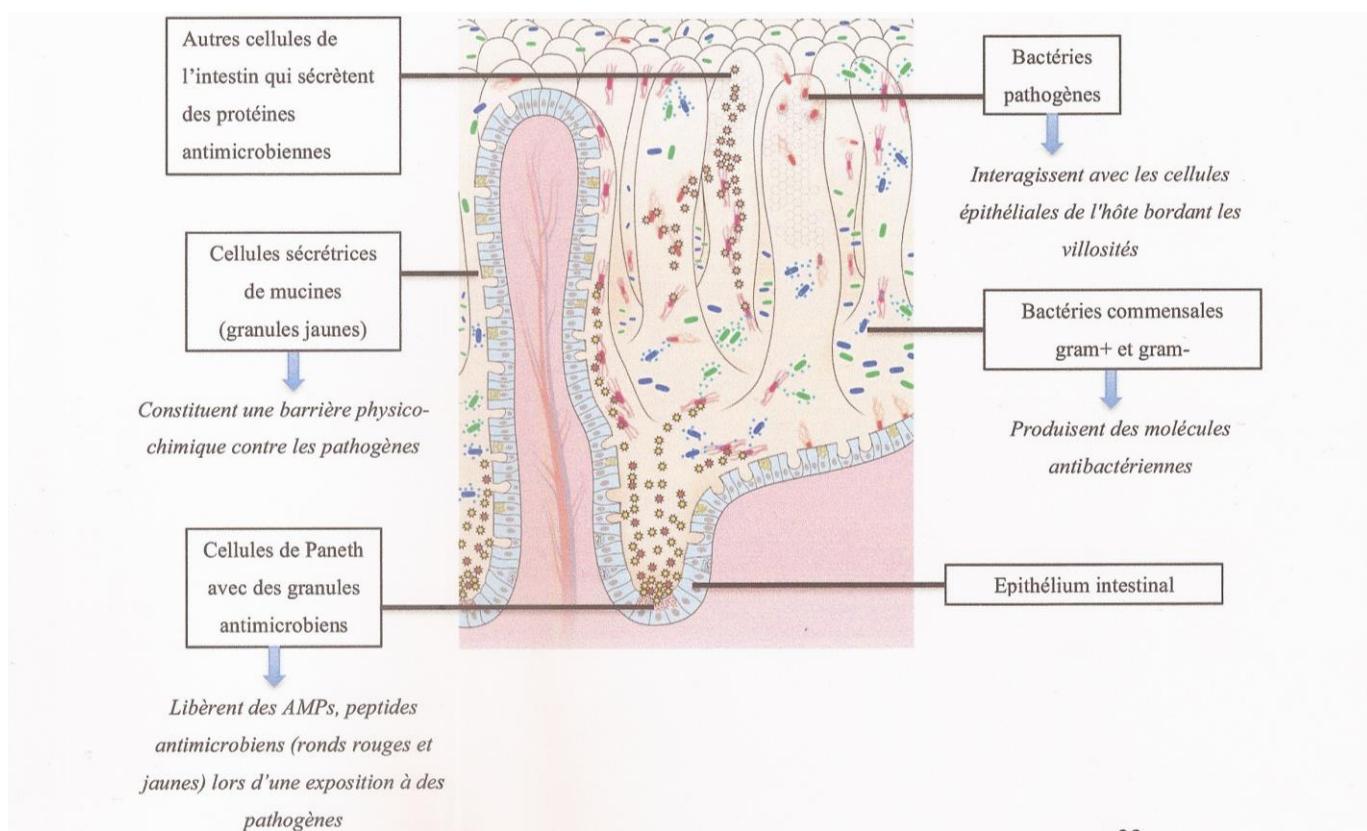
En ce qui concerne les traitements, les antibactériens n'auraient, ici, pas d'effet curatif puisqu'apparemment ils provoqueraient la lyse cellulaire et donc la libération des toxines stockées dans la membrane. Il faudrait alors peut être effectuer un « prétraitement » permettant d'inhiber l'expression de ces toxines (antibiotique bactéricide, inhibiteur de l'ARN Polymérase comme la Rifampicine et la Gentamicine) et seulement ensuite administrer un traitement antibactérien (Rahal et al., 2012).

De nouvelles approches de traitements possibles grâce à des produits naturels comme les probiotiques (*Lactobacillus casei*), certaines herbes, des composants du thé vert et des cranberries sont détaillées par Rahal et al., (2012).

La deuxième partie de ce chapitre démontre que certains constituants de la MFGM pourraient aussi aider à contrer ces bactéries (Tellez et al., 2012).

### 1.1.2.2 Mécanismes de défense de l'hôte

L'organisme possède plusieurs mécanismes de défense qui lui permettent, dans un premier temps, de lutter contre les intrusions de microorganismes. La surface du tractus intestinal est la plus grande surface du corps humain soumise à l'environnement extérieur (200 à 300 m<sup>2</sup>). Ces mécanismes de défense sont définis par des barrières chimiques comme l'acidité gastrique, la présence d'enzymes pancréatiques, de lysozymes et de sécrétions intestinales et bactériennes et des barrières physiques principalement constitués par des jonctions serrées ou adhérentes mais aussi par la bordure en brosse des entérocytes (**Figure 8**) (Lievin-LeMoal et Servin, 2006).



**Figure 8 :** Les barrières entériques de défense physiques et chimiques contre les microorganismes pathogènes.

(Adapté de Lievin-LeMoal et Servin, 2006).

L'épithélium intestinal contient donc une flore intestinale très diverse qui constitue une première défense importante face aux pathogènes, c'est « l'effet barrière ». Il hébergerait environ  $10^{13}$  à  $10^{14}$  bactéries viables.

Le microbiote du tractus gastro-intestinal peut donc agir contre les infections des pathogènes par production d'agents antibactériens dans l'intestin, par compétition pour les nutriments afin de contrer la croissance bactérienne ou aussi en modifiant la réponse immunitaire.

Aussi, certains composants de la membrane des globules gras du lait pourraient agir en modifiant la composition du microbiote intestinal. C'est donc l'ensemble de ces mécanismes qui permet à la MFGM de diminuer à la fois les effets infectieux des pathogènes et les phénomènes de diarrhées (Sprong et al., 2012).

## **1.2 Les maladies gastro-intestinales résultant d'une infection à *Helicobacter Pylori***

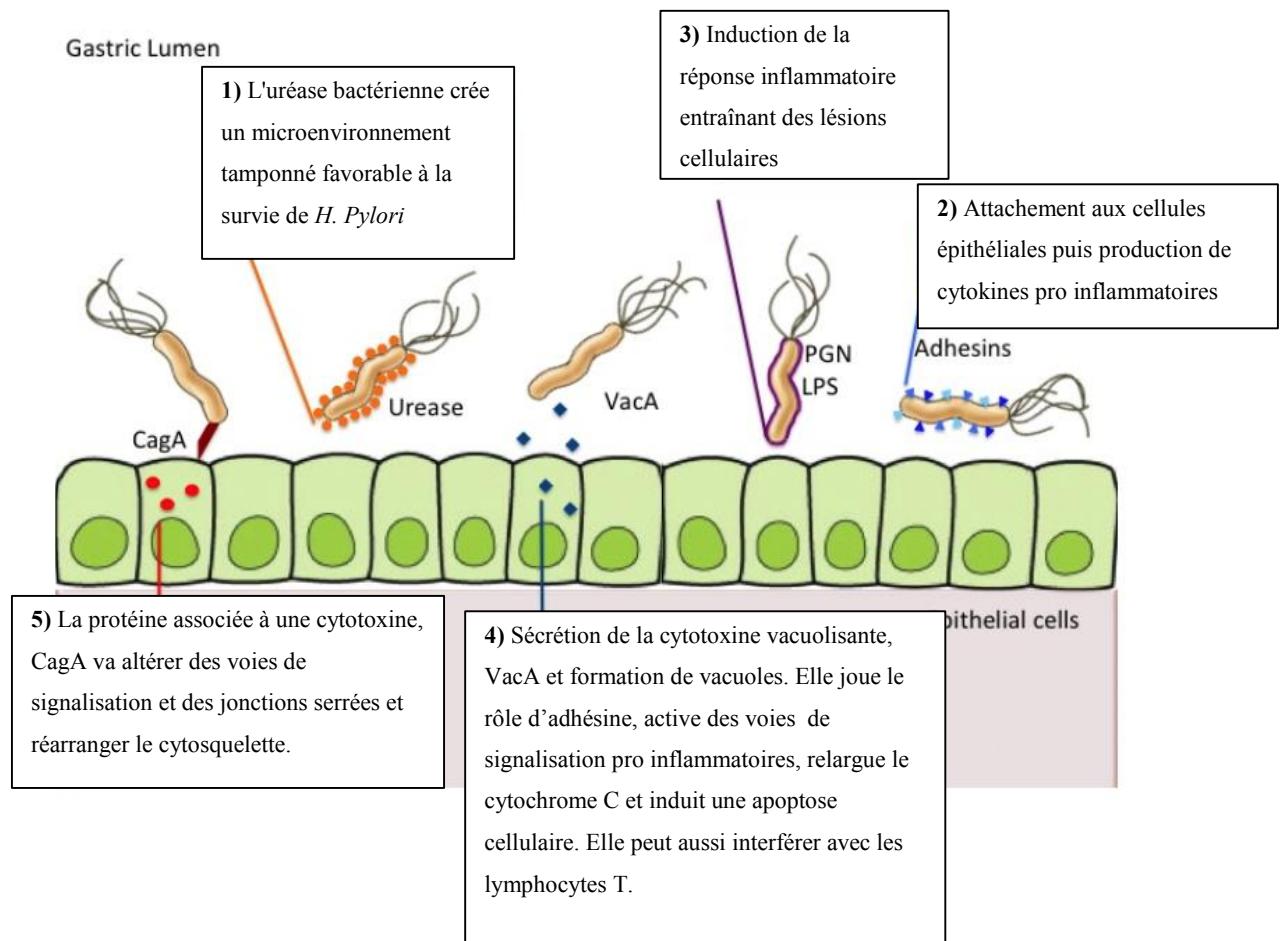
*Helicobacter Pylori* est une bactérie en forme de spirale, gram négative et qui colonise les cellules épithéliales de l'estomac. La particularité d'*H. Pylori* est qu'elle résiste à l'acidité de l'estomac et qu'elle peut même s'y développer.

*H. Pylori* est la cause de gastrites de type B, d'ulcères et elle peut être responsable du développement d'un cancer de l'estomac (Wang et al., 2001).

Le procédé d'attachement d'*H. Pylori* à la muqueuse gastrique inclut des structures spécifiques qui sont reconnues par la mucine gastrique et les récepteurs de surface. *H. Pylori* possède notamment des hémagglutinines de surfaces qui jouent le rôle d'adhésine et se lient aux acides sialiques, constituants de la muqueuse de l'estomac (Wang et al., 2004). Les glycoprotéines de la membrane des globules gras du lait seraient capable d'inhiber cette hémagglutination (Wang et al., 2001 ; Sprong et al., 2012).

Après avoir pénétré au sein de l'épithélium intestinal, les bactéries stimulent la production d'interleukines 1 et 8 (IL-1 et IL-8) par les macrophages. La libération de médiateurs de l'inflammation augmente la perméabilité vasculaire et la surexpression

de molécules d'adhésion aux leucocytes. Ensuite, le système immunitaire ne pourra plus faire face aux bactéries, les cellules inflammatoires vont s'accumuler et une gastrite apparaîtra (Morales-Guerrero et al., 2012) (**Figure 9**).



**Figure 9 :** Résumé des facteurs de virulence associés à *Helicobacter Pylori*

(Adapté de Morales-Guerrero et al, 2012)

*H. Pylori* peut donc induire l'apparition d'une gastrite. La gastrite se manifeste au niveau de l'estomac par des douleurs de type brûlures, crampes et parfois ces symptômes sont accompagnés de vomissements. Le diagnostic se fait par le biais d'une endoscopie digestive avec réalisation de biopsies (prélèvement de muqueuse pour étude anatomo-pathologique).

*Helicobacter Pylori* est souvent le facteur favorisant l'apparition de gastrite en cas de consommation d'aspirine, d'anti-inflammatoires, d'autres médicaments, en cas de stress, de consommation de tabac et d'alcool.

## **2. Rôles bénéfiques des constituants de la membrane des globules gras**

La MFGM est associée à de nombreux effets bénéfiques pour la santé justifiant ainsi son statut de substance bioactive. Il serait alors intéressant de l'intégrer dans des aliments et ainsi l'utiliser comme un nutraceutique.

### **2.1 Effets sur les maladies gastro-intestinales : constituants de la membrane des globules gras ayant des propriétés antibactériennes et antivirales**

Les constituants de la membrane des globules gras pourraient prévenir des infections gastro-intestinales et leurs conséquences cliniques comme les diarrhées ou les inflammations de la muqueuse comme expliqué dans la partie précédente ; ceci en réduisant le nombre de pathogènes viables mais aussi en ayant une action bactériostatique afin d'empêcher leur prolifération dans le tractus gastro-intestinal. Nous allons donc voir dans cette partie les effets antibactériens et bactéricides des constituants de la MFGM. Nous verrons aussi que certains de ces composants peuvent agir comme des récepteurs leurre évitant ainsi l'adhésion des pathogènes sur les récepteurs de la membrane épithéliale.

La surface de la muqueuse digestive est connue comme étant une barrière critique entre la lumière intestinale constituée de substances immunogènes et de la muqueuse du système immunitaire. Il est donc tout d'abord essentiel de préserver et renforcer cette muqueuse afin qu'elle puisse contrer les phénomènes invasifs de pathogènes (Sprong et al., 2012).

### **2.1.1. Effet des phospholipides sur les inflammations intestinales**

Ce sont les lipides polaires, comme les phospholipides, principaux constituants de la MFGM (cf. chapitre I), qui ont un rôle primordial dans la modulation de l'inflammation intestinale.

Une étude a été menée sur des enfants entre 2 et 6 ans, en bonne santé (sans intolérance au lactose, allergie au lait de vache ni de maladies chroniques intestinales) et consommateurs réguliers de lait (Veereman-Wauters et al., 2012). Ces enfants ont ingéré tous les jours pendant 4 mois une boisson enrichie ou non en composants de la membrane des globules gras notamment en phospholipides (étude en double aveugle et au hasard). Les paramètres suivis sont : administration du produit d'étude, quantité restante dans la bouteille (en mL), acceptabilité du produit d'étude, fièvre, diarrhée, constipation, toux, visites chez le médecin, prise de médicaments et type de médicaments, jours d'école manqués pour cause de maladie, sorties du pays, besoins d'hospitalisation (pour effets secondaires sérieux) ainsi que tout autre effet secondaire. Les parents ont rempli ce journal tous les jours et celui-ci a été collecté toutes les deux semaines par le coordinateur de l'étude. De plus, afin d'évaluer les changements comportementaux des enfants, des questionnaires (validés pour l'utilisation en recherche) ont été envoyés aux parents à la fin de l'étude.

Toutes ces données ont été soumises à des tests statistiques tels que le t test lorsqu'une distribution normale de la population a été démontrée et par des tests non-paramétriques pour les autres (Mann-Whitney). Les réponses aux questions spécifiques ont été analysées par un test du chi 2.

Le changement de nutrition a eu un effet sur les épisodes fiévreux des enfants qui ont diminué, de même pour les épisodes fébriles de courte durée. L'effet protecteur dû à la consommation régulière de cette boisson a pu être constaté après 6 semaines.

Il existe tout de même certains biais dans cette étude. Environ  $\frac{1}{4}$  des enfants ont abandonné l'étude dès le début à cause du goût chocolaté de la boisson et 13 ont été exclus car ils n'avaient pas suivi l'étude jusqu'au bout (moins de 80% des jours). De plus, l'origine des épisodes fébriles apparus chez certains enfants n'a pas été démontrée. Il peut en effet, juste s'agir d'infections virales bénignes.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence les effets protecteurs de la barrière gastro-intestinale par la MFGM ainsi que ses effets sur les troubles intestinaux et les infections comme la fièvre, la diarrhée, la toux.

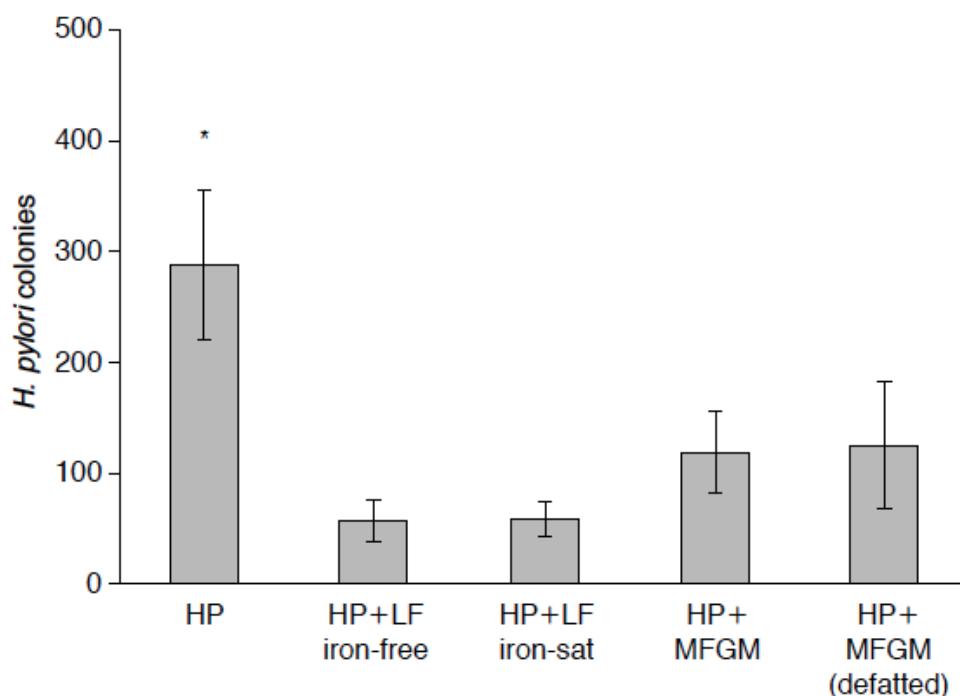
La formule enrichie en composants de la MFGM a été considérée comme sûre pour la santé et bien tolérée par les enfants. Il a aussi été constaté dans cette étude que l'administration de la formule enrichie en MFGM permettait de mieux réguler les comportements comme l'humeur et le stress chez les enfants. Ceci a pu être mesuré grâce à un questionnaire remis aux parents à la fin de la période d'essai (donc après 120 jours). Ce questionnaire est validé afin de mesurer le comportement des enfants entre 1 an et demi et 5 ans ou bien sous la forme d'un questionnaire ASEBA « Achenbach System of Empirically Based Assessment » pour les enfants plus âgés. Ces deux questionnaires sont des références dans le domaine de la recherche pour les maladies mentales et les problèmes émotionnels et de comportement des enfants et adolescents. Ils sont constitués de 100 questions se référant au comportement avec 3 types de réponses possibles (non, un peu, souvent). L'interprétation se fait selon deux groupes, un interne (émotion, anxiété/dépression, retrait et troubles somatique) et un externe (attention et agressivité). C'est ensuite un programme informatique qui calcule les scores qui sont standardisés selon le genre et l'âge.

### **2.1.2 Effet des glycoprotéines et de la lactoferrine dans l'inhibition d'*Helicobacter Pylori***

Wang et al., (2001) ont démontré un rôle possible des glycoprotéines de la MFGM ainsi que de la lactoferrine dans l'inhibition de l'hémagglutination de *Helicobacter Pylori*. Dans cette expérience, 50 souris ont été inoculés avec une sonde gastrique 3 fois à deux jours d'intervalle avec 0.1 mL de suspension contenant  $10^9$  cfu/ml d'*H. pylori*. Un groupe contrôle négatif de 10 souris a été nourris seulement avec une solution de tampon Phosphate Salin, PBS. Le reste des souris inoculées ont ensuite été divisées au hasard en 4 groupes qui ont reçu de la lactoferrine sans fer ou 20% de lactoferrine saturé en fer et de la MFGM avec ou sans graisse à une dose de 400 mg/kg selon le poids de la souris, par voie orale, une fois par jour pendant 10 jours après les 4 semaines d'inoculation. Leur estomac a ensuite été récupéré afin de pratiquer des biopsies et de mesurer l'infectivité d'*H. pylori*.

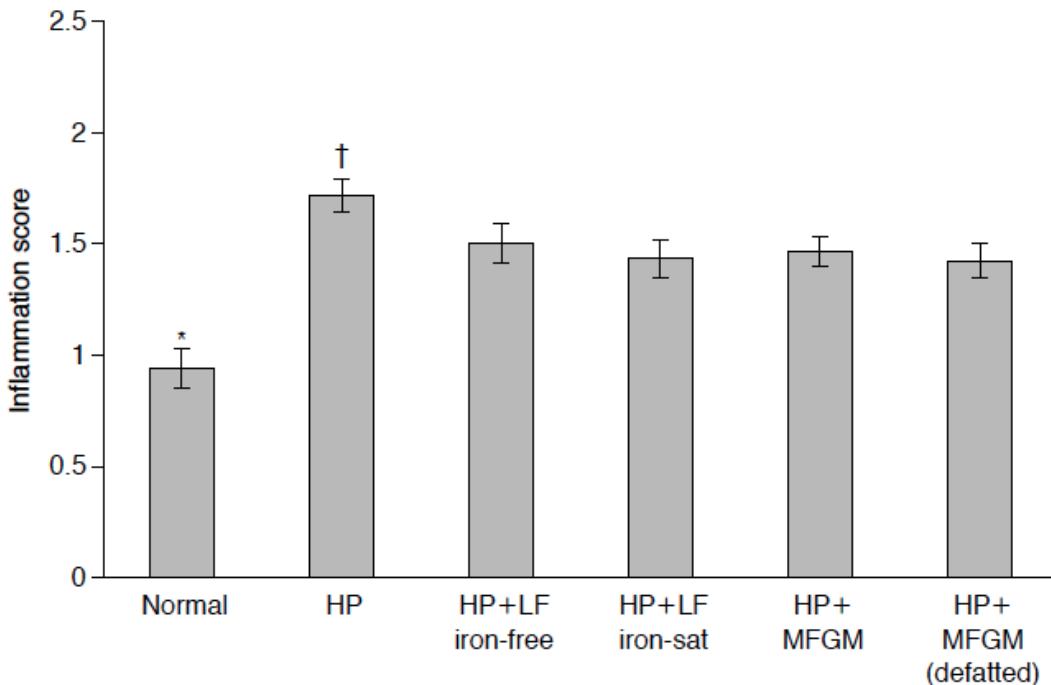
Sur la **Figure 10**, la colonisation de *H. pylori* dans l'estomac des souris traitées avec la MFGM et la lactoferrine diminue nettement comparé aux souris contrôle infectées par *H. pylori* mais sans traitement adjuvant. Sur la **Figure 11**, l'effet des glycoprotéines de la MFGM et de la lactoferrine sur l'inflammation de la muqueuse de l'estomac est nettement visible.

Les glycoprotéines de la MFGM et la lactoferrine pourraient donc diminuer les effets de *H. Pylori*, notamment les gastrites. Cependant, les lipides de la MFGM ne semblent pas avoir d'action sur l'inhibition de *H. Pylori* puisque sur les deux graphiques on obtient des résultats similaires lorsqu'on enlève la partie lipidique de la MFGM.



**Figure 10 :** Inhibition de la colonisation de *H. Pylori* (HP) chez les souris par les glycoprotéines de la MFGM et la lactoferrine (LF) du lait bovin.

(Wang et al., 2001)



**Figure 11 :** Inflammation chez les souris infectées par *H. Pylori* (HP) comparé aux résultats obtenus lors

de l'ajout de glycoprotéines de la MFGM et de lactoferrine (LF) du lait bovin.

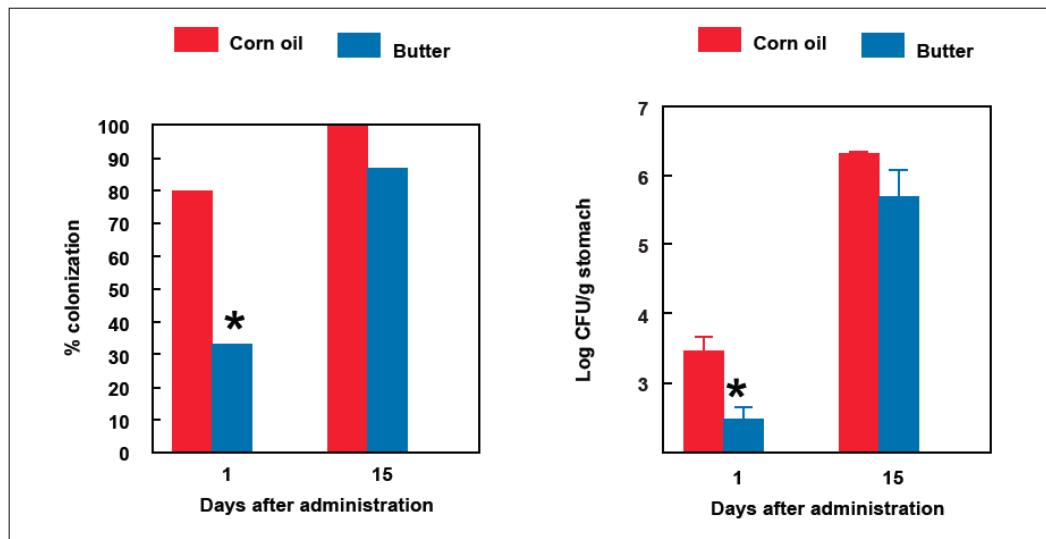
(Wang et al., 2001)

Il est aussi démontré un rôle d'inhibition à court terme de *H. Pylori* (Sprong et al., 2012). En effet, on apprend ici que *H. Pylori* serait aussi sensible à l'action bactéricide d'acides gras que l'on retrouve dans le lait, les acides gras C<sub>10:0</sub> et C<sub>12:0</sub>. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la **Figure 12**. Certains rats ont été nourris à base de beurre riche en acides gras C<sub>10:0</sub> et C<sub>12:0</sub> et d'autres ont été nourris à base d'huile de maïs (qui ne contient pas d'acides gras C<sub>10:0</sub> et C<sub>12:0</sub>).

Il y a bien un effet des acides gras C<sub>10:0</sub> et C<sub>12:0</sub> sur la colonisation gastrique d'*H. Pylori*. Après le 1<sup>er</sup> jour, pour les rats ayant été nourris avec du beurre, la colonisation d'*H. Pylori* dans la muqueuse gastrique a diminué par rapport aux résultats constatés chez les rats nourris simplement avec de l'huile de maïs. Cependant, cette inhibition ne serait valable qu'à court terme puisqu'après 15 jours, le taux d'*H. Pylori* dans l'estomac revient à des valeurs élevées et presque similaires chez les rats nourris avec de l'huile de maïs et chez les rats nourris avec du beurre.

La consommation de beurre n'aurait donc qu'un effet à court terme sur l'inhibition d'*H. Pylori*. Cela pourrait s'expliquer par le fait qu'au début, les interactions en milieu acide entre les acides gras du lait et *H. Pylori* peuvent être optimales mais par la suite,

*H. Pylori* adhère à l'épithélium gastrique. L'épaisse couche de mucus sur l'épithélium gastrique pourrait alors empêcher l'interaction entre les acides gras du lait et *H. Pylori*. De plus, l'activité de l'uréase d'*H. Pylori* augmente localement le pH et ainsi diminue l'action bactéricide des acides gras qui ont besoin d'un milieu protoné pour agir efficacement.



**Figure 12 :** Effet de l'huile de maïs (en rouge) et du beurre (en bleu) sur le pourcentage de colonisation de *Helicobacter Pylori* et le nombre de pathogènes adhérents à la muqueuse gastrique de rats infectés avec 109 bactéries/UFC *H. Pylori*.

(Sprong et al., 2012)

L'équipe de Wang et al (2004) a aussi étudié l'inhibition d'*Helicobacter Pylori* au cours d'une étude sur des patients infectés par *H. Pylori* qui ont ingéré des yaourts enrichis en probiotiques : *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. Nous analyserons cette étude dans le chapitre IV traitant des probiotiques.

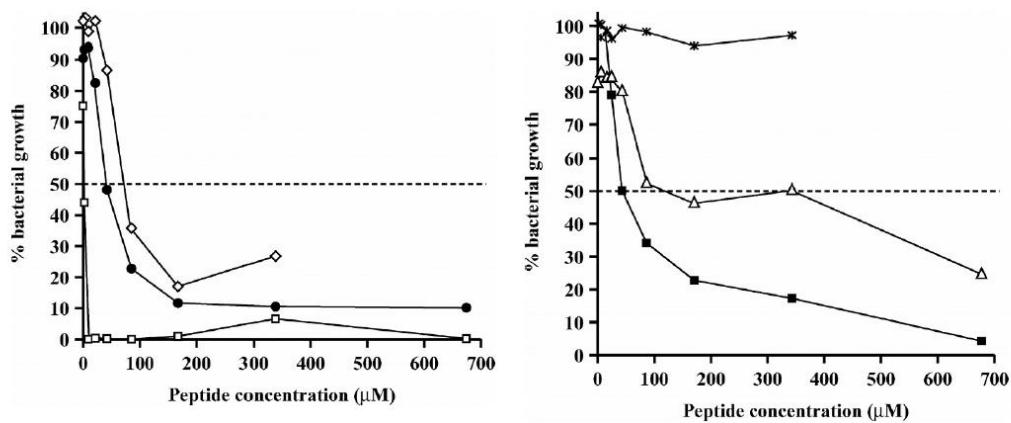
### 2.1.3 Effet de la lactophorine sur des bactéries Gram + et Gram -

La lactophorine, autre protéine majoritaire de la MFGM est dérivée de la lactoferrine appelée aussi 3 protéose peptone, PP3. C'est une phosphoglycoprotéine constituée de 23 acides aminés qui serait responsable de l'inhibition de la croissance de plusieurs bactéries Gram positive comme *Streptococcus thermophilus*, *Listeria innocua*,

*Staphylococcus aureus* et Gram-négative comme *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (Campagna et al., 2004).

Cette étude a été réalisée *in vitro* avec deux peptides correspondant respectivement aux régions 119 à 135 et 113 à 135 de PP3. L'activité antibactérienne de ces régions peptidiques a été testée en les diluant avec de l'eau stérile afin d'atteindre une concentration entre 0.14 à 678  $\mu$ M. Les différentes bactéries Gram+ et Gram- inoculés ont été ajouté à une concentration finale de  $10^5$  cfu/mL. Les contrôles contiennent tous les composants excepté la lactophorécine. Après incubation à 37 °C pendant 24h, l'absorbance à 620 nm a été déterminée. La concentration minimale inhibitrice (MIC) a été définie comme étant la plus petite concentration de peptide pouvant inhiber la croissance bactérienne après une incubation à 37 °C pendant 24h. Cela correspond à la concentration de peptide pour laquelle il y a moins de 10% d'augmentation d'absorbance à 620 nm. Pour les cas où l'inhibition n'était pas complète, la concentration en peptide induisant une inhibition de 50% de la croissance bactérienne a été mesurée par spectrophotomètre.

D'après les résultats, la lactophorécine aurait beaucoup plus d'effet sur les bactéries Gram + et notamment sur *Streptococcus thermophilus* (**Figure 13**). La lactophorécine a quand même un effet sur les bactéries Gram – comme *Salmonella* et *Pseudomonas aeruginosa* mais pas sur *E. coli*. Aussi, on constate (**Figure 13**) que la lactophorécine n'inhibe jamais complètement la croissance des bactéries.



**Figure 13 :** Effet de la lactophoricine (selon la concentration du peptide de 23 acides aminés constituant la lactophoricine) sur la croissance des bactéries.

(Campagna et al., 2004)

- à gauche : les bactéries Gram + dont *Listeria innocua* (◊), *Streptococcus thermophilus* (○), *Staphylococcus aureus* (●)

- à droite : les bactéries Gram- dont *Salmonella* (■), *Pseudomonas aeruginosa* (Δ), *Escherichia coli* (□).

Des concentrations élevées de lactophoricine sont nécessaires pour voir une nette inhibition de la croissance bactérienne. Cela peut s'expliquer par l'action des protéases des bactéries sur la fraction peptidique de la lactophoricine.

A la vue de ces expériences, il a été conclu que la lactophoricine aurait bien un effet antibactérien sur certaines souches (Campagna et al., 2004).

#### **2.1.4 Effets des constituants lipidiques de la membrane des globules gras sur le caractère infectieux du rotavirus**

Les glycoprotéines et les carbohydrates constituant la MFGM seraient capables d'inhiber le caractère infectieux du rotavirus. Des études précédentes ont déjà démontré que les glycoprotéines de la MFGM ont un effet sur le caractère infectieux du rotavirus (Le et al., 2012). Le rôle de la portion lipidique de la MFGM a été étudié plus en détail (Fuller et al., 2013). La poudre de babeurre qui est connue pour pouvoir être intégrée facilement dans des aliments, être peu chère et très facilement disponible a été utilisée pour cette étude. Deux types d'expériences *in vitro* ont été réalisés sur des cellules rénales de singes. La première expérience a permis de tester le potentiel inhibiteur du rotavirus avec du babeurre et la deuxième avec du lactosérum. Dans cette étude, c'est la souche du rotavirus sensible à la neuraminidase qui est ciblée.

A la vue des résultats de cette étude, les composants du babeurre et du lactosérum inhiberaient le caractère infectieux du rotavirus (**Tableaux 6 et 7**). En effet, avec une concentration de 0,1 mg/mL de MFGM isolée du babeurre, le pourcentage d'infectivité du rotavirus est diminué de 31% et concernant le lactosérum isolé du fromage, une concentration de 0,1 mg/mL permet de diminuer l'infectivité du rotavirus de 37%.

Lorsque l'on compare ces derniers résultats (**Tableau 6**) avec ceux obtenus sur la fraction lipidique extraite de la MFGM (**Tableau 7**) ; on constate que l'infectivité du rotavirus diminue presque autant que lorsque celui-ci était soumis à la totalité des composants de la MFGM. Cette expérience montre aussi que la partie aqueuse dans laquelle se trouvent les protéines de la MFGM n'agit presque pas sur l'infectivité du rotavirus (**Tableau 7**). Fuller et al., (2013) déduisent de ces résultats que ce sont les lipides de la MFGM qui ont une action sur le caractère infectieux du rotavirus.

**Tableau 6** : Effets de l'exposition à la totalité de la membrane des globules gras du lait (isolée soit de la poudre de babeurre soit du lactosérum issu du fromage) sur le caractère infectieux de la souche sensible à la neuraminidase du rotavirus.

(Adapté de Fuller et al., 2013)

	% d'infectivité du rotavirus
<b>Milieu de contrôle</b>	100 %
<b>Concentration de Babeurre extrait de la MFGM</b>	% d'infectivité du rotavirus
0.1 mg/mL	69%
0.7 mg/mL	38%
1.4 mg/mL	30%
3.4 mg/mL	11%
10.0 mg/mL	6%
17.0 mg/mL	5%
<b>Concentration de lactosérum extrait de la MFGM</b>	% d'infectivité du rotavirus
0.1 mg/mL	63%
0.5 mg/mL	42%
1.2 mg/mL	38%
2.6 mg/mL	30%
7.8 mg/mL	25%
13.0 mg/mL	19%

**Tableau 7** : Effets de l'exposition à la partie lipidique extraite de la membrane des globules gras du lait (elle même isolée soit de poudre de babeurre soit du lactosérum issu du fromage) sur le caractère infectieux de la souche sensible à la neuraminidase du rotavirus.

(Adapté de Fuller et al., 2013).

	% d'infectivité du rotavirus
<b>Milieu de contrôle</b>	100 %
<b>Concentration de babeurre extrait de la MFGM (fraction lipidique)</b>	% d'infectivité du rotavirus
0.2 mg/mL	82%
5.0 mg/mL	26%
<b>Concentration de babeurre extrait de la MFGM (fraction aqueuse avec les protéines)</b>	% d'infectivité du rotavirus
20 mg/mL	63%
<b>Concentration de lactosérum extrait de la MFGM (fraction lipidique)</b>	% d'infectivité du rotavirus
0.8 mg/mL	99%
2.0 mg/mL	34%
6.0 mg/mL	13%
10.0 mg/mL	13%
<b>Concentration de lactosérum extrait de la MFGM (fraction aqueuse avec les protéines)</b>	% d'infectivité du rotavirus
0.8 mg/mL	113%
2.0 mg/mL	81%
6.0 mg/mL	109%
10.0 mg/mL	86%

## 2.1.5 Effets antibactériens des constituants de la membrane des globules gras sur *E. coli*

L'étude de Tellez et al., (2012) porte sur la souche la plus rencontrée d'*Escherichia coli* lors de gastro-entérites (cf. partie 1, chapitre II), la souche O157:H7. L'effet antibactérien de la membrane des globules gras du lait chauffée ou conservée à l'état cru est comparé.

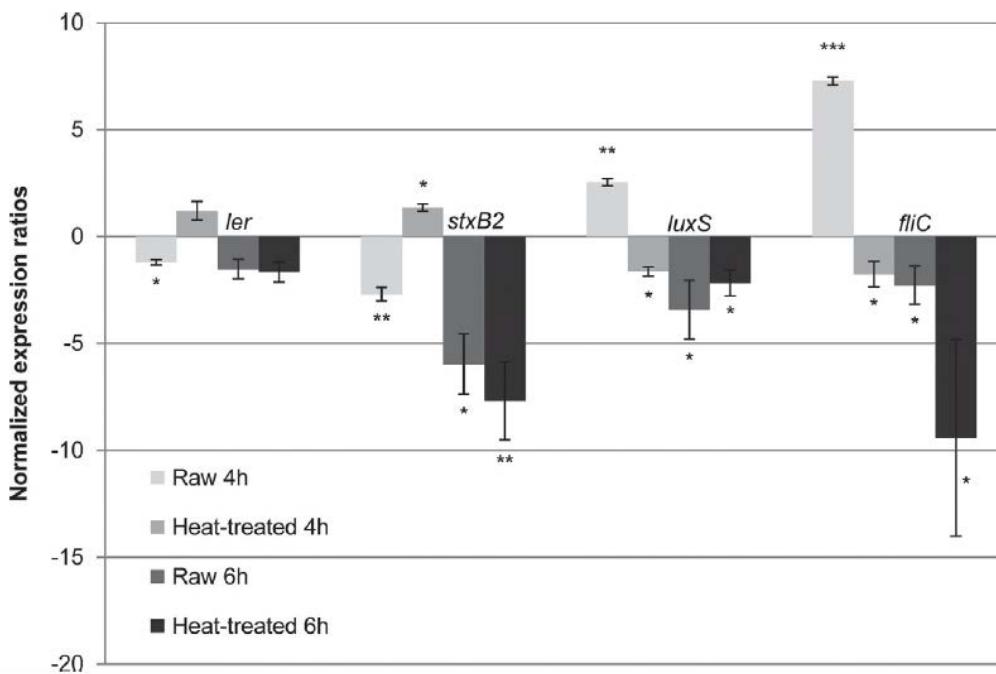
Plusieurs gènes de virulence de *E. coli* ont été testés au cours de cette expérience :

- La toxine *Shiga* 2 (StxB2, c'est la forme la plus impliquée dans les maladies gastro-intestinales chez l'homme),
- *ler* impliqué dans le mécanisme d'attachement-effacement,
- *fliC* nécessaire à la motilité de *E. coli*,
- *luxS* impliqué dans le « quorum sensing » et donc dans l'expression de certains gènes bactériens.

L'analyse de l'expression de ces gènes a été réalisée par réaction de polymérisation en chaîne par transcriptase inverse.

La **Figure 14** met en évidence le fait que la MFGM du lait chauffé et cru induit dans les deux cas une forte diminution de l'expression de la toxine *Shiga* (StxB2) et du gène *fliC* d'*E. coli*. Toutefois, cet effet est encore plus important lorsque la MFGM a été préalablement chauffée. Cela pourrait s'expliquer par une modification de la composition en protéines lors du chauffage de la MFGM, les protéines ont été dénaturées et la composition de la MFGM change. Elle contient plus de phospholipides que de protéines après le chauffage (Tellez et al., 2012).

En conclusion, des composants de la MFGM auraient bien un effet sur les facteurs de virulence de *Escherichia coli* O157:H7 mais des études sont en cours afin de préciser quels sont les composants de la MFGM responsables de ces effets.



**Figure 14** : Effets de la membrane des globules gras du lait chauffé et cru.

(avec une concentration de 100 µg/mL) sur l'expression de gènes de virulence de *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC) O157:H7 après 4h et 6H d'incubation.

Les valeurs négatives représentent une diminution de l'expression des gènes et les valeurs positives une augmentation de l'expression des gènes en présence de MFGM chauffée ou crue. L'expression des gènes a été analysée par RT-qPCR à partir de cultures d'*E. coli* entérohémorragique O157:H7 (Tellez et al., 2012).

En gris foncé est représenté l'effet de la **MFGM chauffée** et en gris clair l'effet de la **MFGM crue**.

## 2.1.6 Effets de la membrane des globules gras sur l'adhésion des bactéries dans l'estomac

Les bactéries pathogènes peuvent interagir avec des récepteurs situés sur la membrane épithéliale du tractus digestif. Ces récepteurs sont similaires à ceux que l'on retrouve sur la membrane des globules gras du lait. Ceux-ci pourraient alors agir comme des leurres pour éviter que les bactéries se lient à leur première cible.

Par exemple, les sphingolipides peuvent, tout comme les bactéries pathogènes ou les virus, soit entrer en compétition pour les sites de fixation cellulaire soit agir comme un site de fixation cellulaire. Ceci permettrait ainsi aux sphingolipides d'empêcher les bactéries pathogènes ou les virus d'adhérer à la muqueuse intestinale et donc d'éliminer les pathogènes de l'intestin.

Struijs et al., (2013) ont étudié les effets des glycoprotéines de la MFGM dans l'inhibition de l'adhésion des bactéries pathogènes dans le tractus gastro-intestinal. Ils ont réalisé plusieurs expériences afin de démontrer les effets de la MFGM sur la diminution de l'adhérence de certaines bactéries comme les bactéries coliformes, *Clostridia*, *Bifidobacteria* et *Lactobacilli*. Ils ont pour cela utilisé 5 fractions glycoprotéiques différentes de la MFGM (**Tableau 8**).

**Tableau 8** : Caractéristiques des 5 fractions glycoprotéiques de la MFGM extraites de lait bovin frais.

(Struijs et al., 2013)

Fraction	% Glycoprotéines	Type de glycoprotéines
C-MFGM	30.9	MUC1, XDH/XO, CD36, BTN, PAS 6/7 (ou ADPH)
PD-MFGM	28.9	MUC1, CD36, BTN, PAS 6/7 (ou ADPH)
DPD-MFGM	87.0	MUC1, CD36, BTN, PAS 6/7 (ou ADPH)
D-MFGM	83.8	MUC1, XDH/XO, CD36, BTN, PAS 6/7 (ou ADPH)
TDD-MFGM	82.7	MUC1

MUC1 : Mucine 1 ; XDH/XO : xanthine déshydrogénase/oxydase ; CD36 : Cluster de différenciation 36 ; BTN : Butyrophiline ; PAS 6/7 : Acide périodique de Schiff 6/7 ; ADPH : Adipophiline.

D'après les résultats des expériences *in vitro* menées par Struijs et al., (2013) sur du mucus d'estomac de porc, les fractions D-MFGM et TDD-MFGM diminuent l'adhésion des bactéries coliformes sur le mucus du colon (de respectivement 81% et 76% par rapport à la valeur de contrôle de 100%). La fraction C-MFGM induit aussi une diminution de l'adhésion des coliformes mais celle-ci est un peu plus faible (57%). En général, c'est la fraction D-MFGM (avec les protéines : MUC1, XDH/XO, CD36, BTN, PAS 6/7 ou ADPH) qui aurait le plus d'influence sur l'adhésion des bactéries notamment dans le cas de *Bifidobacteria* (92%), *Lactobacilli* (62%) et des coliformes (81%). Cependant, il a été constaté que lorsque PAS 6/7 était présent, l'action des

glycoprotéines et notamment de MUC1 était diminuée. Struijs et al., (2013) ont aussi émis l'hypothèse qu'il devrait y avoir une autre protéine que MUC1 ayant des propriétés anti-adhésives envers les bactéries. Dans des études précédentes, il a été suggéré que les acides sialiques auraient un impact dans la prévention de l'adhésion des bactéries or CD36 contient des groupes acides sialiques. Les glycoprotéines responsables de la prévention de l'adhésion des bactéries seraient alors MUC1 et CD36 (à confirmer par des études en cours).

Un autre point important est de regarder si ces bactéries ont effectivement un rôle d'attachement au mucus du tractus gastro-intestinal. Par exemple, dans le cas de la bifidobactérie, seulement 1 à 2% sont connus pour adhérer au mucus. Par contre, l'adhésion de *lactobacilli* et *clostridia* est plus élevée (respectivement >10% et 0.5-8%) mais d'un point de vue physiologique on sait que *bifidobacteria* et *lactobacilli* ne sont pas des bactéries pathogènes mais justement favorables pour l'hôte, il n'y aurait donc pas d'intérêt à essayer de diminuer leur concentration (Struijs et al., 2013).

En conclusion, ces travaux ont pu démontrer qu'il était possible de prévenir l'adhésion de certaines bactéries au mucus gastro-intestinal grâce à certaines protéines de la MFGM mais qu'il faudrait approfondir ces recherches afin de connaître le véritable mécanisme d'action des protéines de la MFGM et confirmer leurs actions sur des bactéries connues comme pathogènes.

### **2.1.7 Rôle de la xanthine oxydase**

Un autre mécanisme pouvant conduire à un effet antibactérien est la production d'espèces réactives de l'oxygène, de superoxydes et de peroxydes d'hydrogène par la xanthine oxydase.

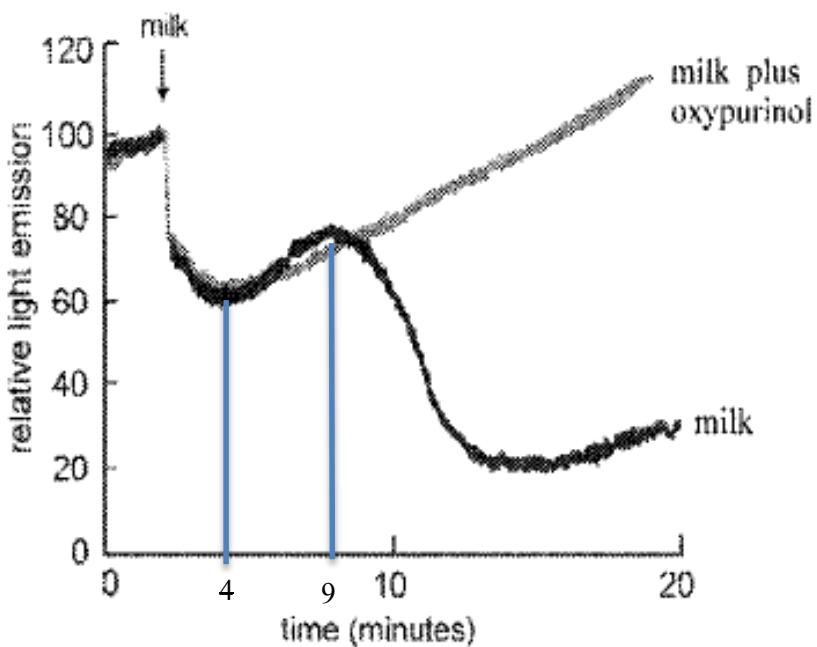
En plus de faire partie des protéines majoritaires de la MFGM, la xanthine oxydase est très présente au niveau du foie et de l'intestin. Elle est notamment présente dans les cellules épithéliales et agirait alors comme une barrière antimicrobienne. C'est grâce aux antigènes de membrane épithéliale (EMA, « Epithelial Membrane Antigen ») de la MFGM que celle-ci peut agir comme un récepteur leurre afin de contrer les bactéries entériques pathogènes. Une fois le rapprochement fait entre les bactéries pathogènes et

la xanthine oxydase, cette dernière pourra produire des espèces réactives de l'oxygène très bactéricides. Les espèces réactives de l'oxygène sont produites tout d'abord par la réduction des nitrates en nitrites formant ainsi des nitrites inorganiques qui, en présence de nitrite oxydase et d'oxygène formeront des peroxynitrites (Harrison et al., 2004).

Ces produits d'oxydation permettraient ainsi d'inhiber la croissance de bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, *E. coli* et *Salmonella enteritidis* (Hancock et al., 2002). Ils ont alors transformé des souches d'*E. coli* avec un plasmide porteur d'un opéron « lux operon » qui émet une lumière permettant de constater l'activité antimicrobienne de la membrane des globules gras du lait dépendant de la xanthine oxydase, de l'oxygène et de la présence de nitrite.

La **Figure 15** montre une chute de la luminescence d'*E. coli* suite à l'ajout de lait. Cependant, au bout de 4 min, la hausse de la courbe de luminescence laisse paraître une récupération des bactéries. Puis à 9 min, il y a une deuxième chute de la courbe de luminescence suivie d'une très faible récupération des bactéries. Les auteurs ont tout d'abord déduit de cette première expérience que les brutales chutes et augmentations de la luminescence, juste après l'addition de lait, étaient dues directement au lait bouilli qui a atténué l'effet de luminescence des bactéries. Ces variations de courbe brutales sont donc indépendantes de l'activité de la xanthine oxydase.

Une seconde expérience a été réalisée en mettant en jeu l'oxypurinol qui est un inhibiteur de la xanthine oxydase et qui n'a pas d'effets directs sur la luminescence des bactéries. En comparaison avec la première expérience, où il n'y avait pas d'inhibiteur de la xanthine oxydase, il est démontré ici que c'est bien la xanthine oxydase qui a un effet sur la diminution de la courbe de luminescence et qui a donc un effet antibactérien.



**Figure 15 :** Effets du lait bovin sur les taux métaboliques de *E. coli* dépendant de la xanthine oxydase.  
(Hancock et al., 2002)

La souche *E. coli* 16906 a été transformée avec l'opéron luxCDABE et a été remis en suspension dans une cuve de luminomètre avec 0,63% d'oxygène. 10  $\mu$ M de Ptérine et 20 mM de nitrite de sodium ont été ajoutés, et les émissions de lumière ont été enregistrées avant et après l'addition de 1 ml de lait bovin. Les mesures ont été répétées après prétraitement du lait avec 25  $\mu$ M d'oxypurinol, inhibiteur de xanthine oxydase. Ces résultats sont représentatifs d'au moins six expériences.

## **2.2 Effets anti-cholestérol de la membrane des globules gras du lait**

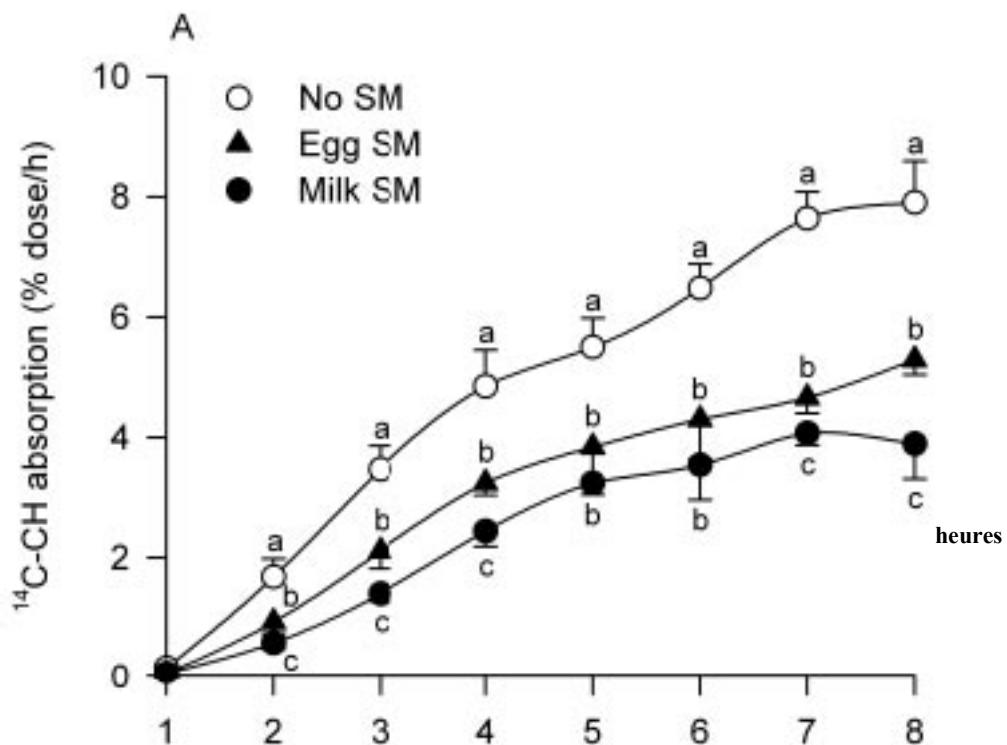
Les sphingolipides font partie des lipides majoritaires de la MFGM. Ils ont un impact dans l'absorption de lipides permettant par exemple de contrer des maladies comme celles correspondant au syndrome métabolique : résistance à l'insuline, troubles de l'assimilation du cholestérol, de l' $\alpha$ -tocophérol et des triglycérides. Les sphingolipides sont aussi impliqués dans les maladies cardio-vasculaires lorsqu'ils sont présents en trop grandes quantités dans l'organisme et dans des mécanismes inflammatoires (ex : athérosclérose).

Concernant l'assimilation du cholestérol, une étude sur les rats (Noh et Koo, 2004) a démontré que la sphingomyéline pouvait diminuer, selon la dose, l'absorption intestinale du cholestérol et des graisses (**Figure 16**).

**Figure 16 : Effets de la sphingomyéline sur la diminution de l'absorption intestinale du cholestérol C14 (C14-CH) pendant 8h chez le rat.**

(Noh et Koo, 2004)

- sphingomyéline (SM) du lait,  sphingomyéline (SM) des œufs,  pas de sphingomyéline (SM). Ces valeurs sont des moyennes et lorsque celles-ci ont des exposants sans lettre commune c'est qu'elles diffèrent des autres avec  $p < 0.05$ .



Ce serait en effet les groupes acyl gras des longues chaînes saturées de la sphingomyéline du lait qui seraient responsables de l'inhibition directe de la lipolyse lumineuse, de la solubilisation des micelles et qui auraient une action sur le transfert des lipides micellaires vers les entérocytes. Ce serait aussi la saturation importante des groupes acyle de la sphingomyéline de la MFGM qui favoriserait son effet inhibiteur

par rapport à la sphingomyéline issue d'autres sources que le lait (ici nous avons l'exemple de la sphingomyéline des œufs) (Noh et Koo, 2004).

### **2.3 Effets anti-cancéreux de la membrane des globules gras du lait**

Des études *in vitro* ont démontrées que d'autres constituants de la MFGM tels que les acides gras des protéines de liaisons et les protéines BRCA1/BRCA2 (impliqués généralement dans le cancer du sein) auraient un rôle dans des mécanismes d'inhibition de croissance de cellules cancéreuses et des processus de réparation de l'ADN (Spitsberg, 2005 ; Singh, 2006).

De plus, les phospholipides de la MFGM comme la sphingomyéline possèderaient aussi des propriétés anti-cancéreuses (notamment dans le cancer du côlon). Surtout grâce à deux de ses métabolites, la sphingosine et la céramide, ils s'interposeraient dans les mécanismes de signalisation transmembranaires qui contrôlent la croissance, le développement et la différenciation des cellules (Spitsberg, 2005 ; Singh, 2006).

Enfin, une enzyme, la glucuronyl transférase serait aussi impliquée dans la prévention des cancers du côlon grâce à son activité inhibitrice de la  $\beta$ -glucuronidase. La glucuronyl transférase neutralise les composés toxiques se trouvant dans les cellules du foie par la formation de glucuronides or la  $\beta$ -glucuronidase dégrade ces glucuronides. Après la consommation de composants de la MFGM, certains peptides ayant une activité inhibitrice pourraient être relâchés et absorbés dans le tractus digestif. Ils pourraient alors exercer leur activité inhibitrice sur les cellules subissant une transformation carcinogène (Spitsberg, 2005 ; Singh, 2006).

### **3. Utilisation des composants de la membrane des globules gras du lait comme nouveaux alicaments ?**

Les composants de la MFGM ont été caractérisés dans plusieurs études comme des ingrédients pouvant être incorporés dans des produits alimentaires. Toutefois, il est nécessaire de prendre en compte certains processus comme le chauffage, l'agitation et

l’homogénéisation qui pourraient alors complètement détruire les composants de la MFGM ayant des effets bénéfiques sur la santé ou bien, changer la structure de la MFGM et modifier ainsi ses propriétés technologiques.

Plusieurs études ont montré que la MFGM possédait des propriétés technologiques permettant d’assurer l’incorporation de ses composants bénéfiques pour la santé dans des produits laitiers tels que les yaourts ou les poudres de lait.

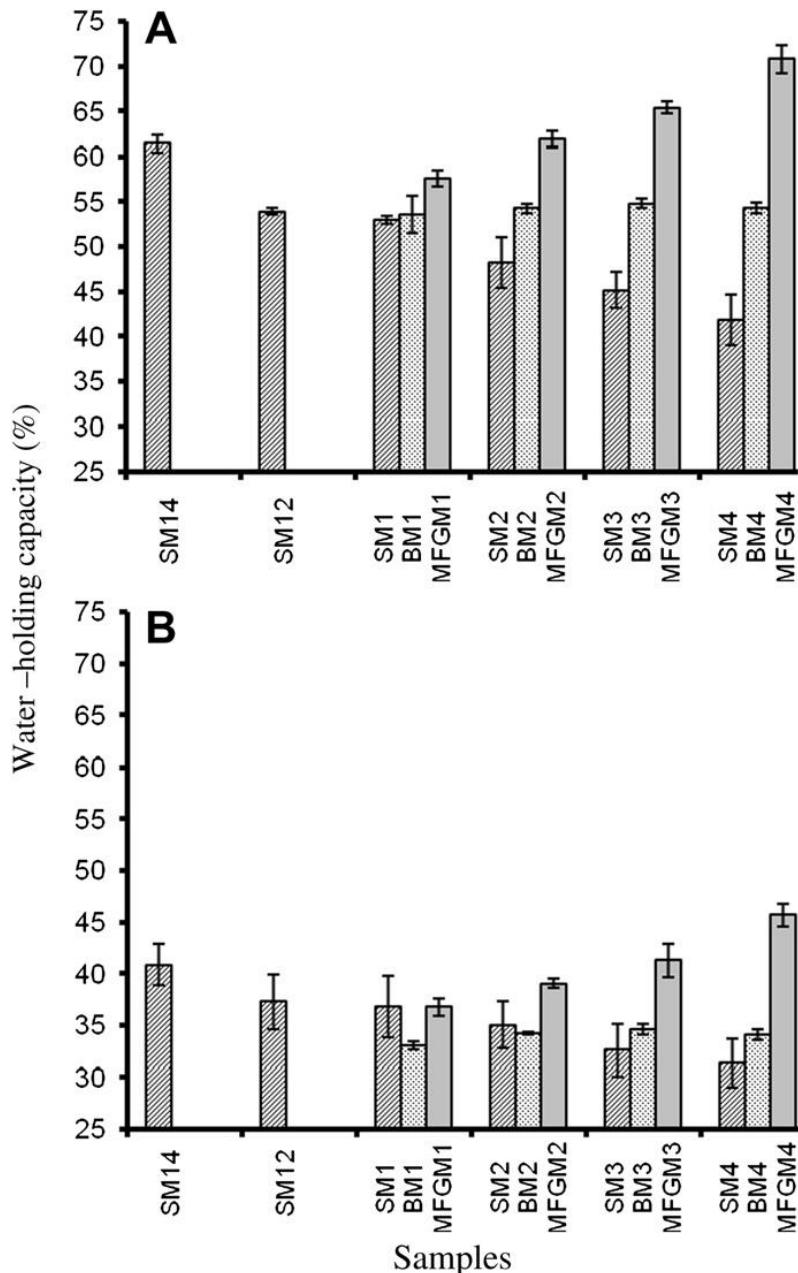
L’impact de l’ajout de MFGM en poudre sur la structure des yaourts a été déterminé (Le et al., 2011). Trois types de yaourts ont été testés : enrichi avec de la poudre de la MFGM extraite du babeurre, enrichi seulement avec de la poudre de babeurre et enfin un témoin ne contenant que de la poudre de lait écrémé.

Dans cette partie nous allons tout d’abord nous intéresser aux propriétés texturantes de la MFGM, la principale étant sa capacité à retenir l’eau. En effet, ce sont les phospholipides de la membrane des globules gras qui grâce à leur caractère amphiphile ont cette capacité à retenir l’eau. Cette propriété est indispensable pour une bonne tenue du yaourt et pour éviter le phénomène de synérèse<sup>1</sup>.

On constate effectivement (**Figure 17**), que comparé aux échantillons de yaourts formulés à partir de la poudre de babeurre (BMP) et de la poudre de lait (SMP), la poudre de MFGM a un réel impact sur la rétention de l’eau dans le yaourt.

---

<sup>1</sup> C’est le phénomène qui entraîne la sortie du lactosérum du gel formant le yaourt.



**Figure 17 :** Capacité de rétention de l'eau de différents yaourts.

Celle-ci est déterminée par centrifugation à 1250g (A) et 5000g (B) de yaourts formulés à partir de 14,12,11,10,9 et 8% de poudre de lait écrémé (SM14, SM12, SM1, SM2, SM3 and SM4) et de 11, 10, 9 et 8% de poudre de lait écrémé supplémentée par 1,2,3 et 4 % de poudre de babeurre (BM1, BM2, BM3 and BM4) ou de poudre de membrane des globules gras du lait (MFGM1, MFGM2, MFGM3 and MFGM4) (Le et al., 2011).

L'effet de l'ajout de poudre de MFGM sur la fermeté du yaourt a ensuite été évalué. L'ajout de MFGM diminuerait la consistance du yaourt (**Tableau 9**) mais si l'on incorpore plus de 4% des constituants de la MFGM dans le produit alors l'importante quantité de protéines totales et de caséines permettra de retrouver la fermeté initiale du

yaourt c'est à dire lorsqu'il contenait de la poudre de babeurre ou du lait écrémé à la place des composants de la MFGM (Le et al., 2011).

**Tableau 9** : Fermeté des yaourts formulés à partir de lait écrémé (SM), de babeurre (BM) et de MFGM.

(Le et al., 2011)

Échantillons	Lait écrémé (SM)	Babeurre (BM)	MFGM
14	1.47	-	-
12	1.25	1.25	1.25
1	1.06	1.09	0.92
2	0.81	1.02	0.99
3	0.65	1.04	1.06
4	0.55	0.98	1.23

Les données sont exprimées en Newton et sont des moyennes (pour la précision des moyennes cf. publication de Le et al, 2011).

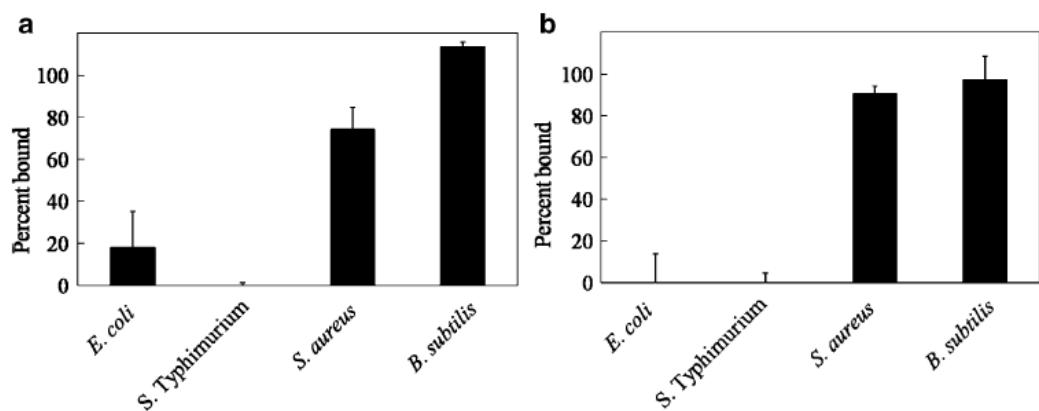
SM12 et SM14 contiennent 12% et 14% de poudre de lait écrémé. Respectivement ; SM1, SM2, SM3, et SM4 contiennent 11, 10, 9 et 8% de poudre de lait écrémé, respectivement ; BM1, BM2, BM3, et BM4 remplacent 1, 2, 3, et 4% de la poudre de lait écrémé SM12 avec la poudre de babeurre. Respectivement ; MFGM1, MFGM2, MFGM3, et MFGM4 remplacent 1, 2, 3, et 4% de la poudre de lait écrémé SM12 avec la poudre de MFGM.

Il serait donc envisageable d'inclure certains constituants de la MFGM dans des produits alimentaires comme les yaourts sachant que ses constituants auraient aussi des effets bénéfiques sur la santé.

#### **4. Quelle est l'implication de la mucine 1 ?**

Le rôle de la mucine 1 ou MUC 1 du lait bovin dans l'inhibition de l'adhésion des bactéries entériques a été étudié (Parker et al., 2010). Des composants connus de la mucine 1 et une lignée cellulaire Caco-2 représentative des cellules épithéliales intestinale humaines ont été utilisés. Le caractère antiadhésif de la mucine 1 envers quatre bactéries pathogènes a été testé : *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* et *B. subtilis* (Parker et al., 2010).

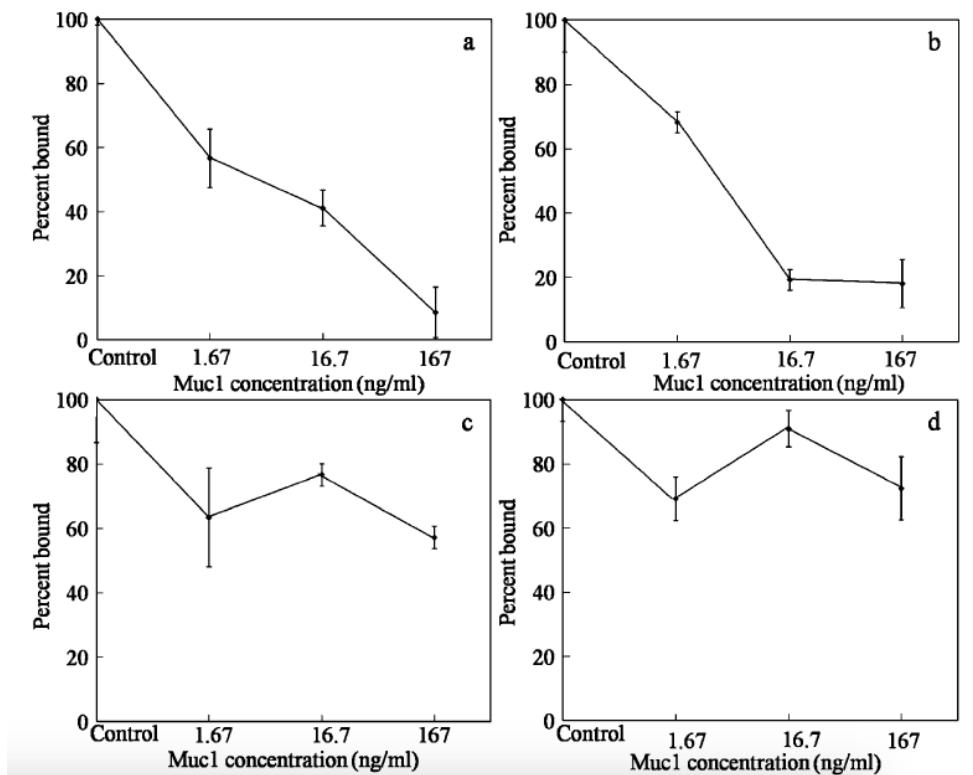
Sur la **Figure 18**, on peut voir un net effet antiadhésif de la MFGM et de la mucine 1 sur *E. coli*, *S. typhimurium*. Mais la mucine 1 n'a pas d'effets sur la bactérie *B. subtilis* et très peu d'effet sur *S. aureus*.



**Figure 18 :** Effet de la MFGM (a) et de la mucine 1 (b) sur l'adhésion des bactéries pathogènes sur les cellules Caco-2 représentatives des cellules épithéliales intestinales humaines.

Les résultats sont présentés en % de bactéries liées aux cellules Caco-2 par rapport au contrôle qui a été réalisé en l'absence de mucine 1.

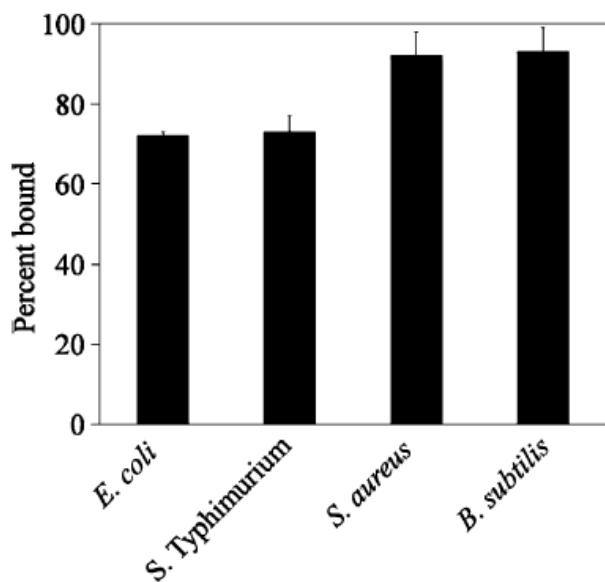
L'activité inhibitrice de la mucine 1 est aussi concentration-dépendante lorsqu'il s'agit de l'inhibition de l'adhésion des bactéries Gram négative (groupe auquel appartient une majorité de bactéries pathogènes) telles que *E. coli* (a) et *S. Typhimurium* (b) (**Figure 19**). Cependant, lorsque l'on ajoute une forte concentration en mucine 1 (167 ng/ml), l'attachement des bactéries Gram+ *S. aureus* (c) et *B. subtilis* (d) aux cellules Caco-2 devient aussi un peu moins important.



**Figure 19 :** Effet concentration-dépendant (concentration de mucine 1 en ng/ml) de la mucine 1 sur l'adhésion des bactéries pathogènes *E. coli* (a), *S. Typhimurium* (b), *S. aureus* (c) et *B. subtilis* (d) sur les cellules Caco-2 représentative des cellules épithéliales intestinales humaines.

Les résultats sont présentés en % de bactéries liées aux cellules Caco-2 par rapport au contrôle qui a été réalisé en l'absence de mucine 1.

La mucine 1 aurait aussi un rôle dans le détachement des bactéries pathogènes des cellules intestinales. Au début de l'expérience (**Figure 20**), les bactéries sont libres de s'attacher aux cellules Caco-2. Puis, la mucine est ajoutée afin de vérifier un effet sur le détachement des bactéries pathogènes. La mucine a un léger effet sur les bactéries Gram- telles que *E. coli* (a) et *S. Typhimurium* (b) mais elle ne semble avoir aucun effet sur le détachement des bactéries Gram + comme *S. aureus* (c) et *B. subtilis* (d). Cette différence pourrait être due à la différence de composition de la paroi des bactéries Gram- et Gram+. En effet, les bactéries Gram+ ne possèdent pas de membrane externe et leur paroi est lisse, souple, et constituée de peu de lipides ; ces critères pourraient en effet constituer un obstacle à l'activité inhibitrice de la mucine 1 envers l'adhésion des bactéries Gram+ aux cellules Caco-2.



**Figure 20 :** Effet de la mucine 1 dans le détachement des bactéries des cellules épithéliales intestinales. Les résultats sont présentés en % de bactéries liées aux cellules Caco-2 par rapport au contrôle qui a été réalisé en l'absence de mucine 1.

Il est possible que ce soit la présence de résidus d'acide sialique sur la mucine 1 qui lui permette d'inhiber le mécanisme d'adhésion bactérienne aux cellules intestinales. Pour vérifier cela, une étude a été réalisée sur la désialylation enzymatique par *Clostridium perfringens*, ce qui a permis de retirer tous les acides sialiques de la mucine 1 et ainsi évaluer si celle-ci aurait toujours le même effet sur l'adhésion bactérienne sans ses résidus d'acide sialique.

Il apparaît en effet que la mucine 1 dépourvue des résidus d'acides sialiques a beaucoup moins d'effets dans l'inhibition de l'adhésion des bactéries *E. coli* et *S. Typhimurium* aux cellules Caco-2 (**Tableau 10**).

**Tableau 10** : Effets du traitement de la mucine 1 avec la sialidase sur la capacité de la mucine 1 à inhiber l'attachement des bactéries *E. coli* et *S. Typhimurium* aux cellules Caco-2.

	% d'attachement d' <i>E. coli</i> aux cellules Caco-2	% d'attachement de <i>S. Typhimurium</i> aux cellules Caco-2
Mucine 1	36	0
Mucine 1 dépourvue des résidus acides sialiques	70	38

La présence d'acides sialiques sur la mucine 1 aurait donc une importance pour son activité inhibitrice envers l'attachement des bactéries *E. coli* et *S. Typhimurium* aux cellules Caco-2.

Cependant, le traitement de la mucine 1 avec la sialidase n'a pas totalement éliminé sa capacité à inhiber l'attachement des bactéries aux cellules Caco-2. Cela voudrait donc dire que d'autres composants de la mucine 1 seraient aussi responsables de l'inhibition de l'adhésion bactérienne.

D'autres constituants de la mucine 1 avec un rôle dans l'inhibition de l'adhésion des bactéries ont été recherchés. L'implication d'oligosaccharides sialylés caractéristiques de la mucine 1 et les monosaccharides ont aussi été testés par Parker et al., (2010) (**Tableau 11**). L'acide sialique, le fucose (Fuc) et le mannose (Man) ont bien un effet sur l'attachement des deux types de bactéries Gram-. Le galactose (Gal) a aussi une grande importance dans l'inhibition spécifique de la bactérie *S. Typhimurium*. Enfin, les monosaccharides N-acetylgalactosamine (GalNAc) et N-acetylglucosamine (GlcNAc) diminuent aussi l'attachement d'*E. coli* aux cellules Caco-2.

**Tableau 11 :** Effets de différents monosaccharides sur l'attachement des bactéries *E. coli* et *S. Typhimurium* aux cellules Caco-2.

Monosaccharides	% d'attachement d' <i>E. coli</i> aux cellules Caco-2	% d'attachement de <i>S. Typhimurium</i> aux cellules Caco-2
Fuc	68	29
Gal	82	0
GalNAc	72	94
GlcNAc	48	122
Acide Sialique	74	11
Man	46	15

Plusieurs constituants de la mucine 1 semblent donc avoir un rôle dans l'inhibition de l'attachement des bactéries Gram- aux cellules Caco-2 mais il reste des points à approfondir afin de comprendre les effets de tous les composants de la mucine 1 et à tester son rôle *in vivo*.

Après avoir mis en évidence le rôle de la mucine 1 dans l'inhibition de l'adhésion bactérienne sur les parois du tractus gastro-intestinal, il est intéressant de se pencher sur les possibilités d'inclure la mucine 1 dans des produits alimentaires. Le et al., (2012) ont d'ailleurs démontré la résistance de la mucine 1 lors de la digestion. Ils ont réalisé des tests *in vitro* sur l'effet de la digestion par contact avec de la pepsine pendant 20 minutes sur les constituants de la MFGM. Il apparaît que la mucine 1 est la plus résistante à la digestion.

En conclusion, il a été démontré que la mucine 1 avait un rôle important dans les effets antibactériens de la MFGM du lait bovin et que de plus, elle possèderait des propriétés permettant de l'intégrer dans des produits alimentaires.

## **Chapitre III.**

### **Méthodes de séparation des protéines de la membrane des globules gras du lait**

La capacité à quantifier les protéines qui constituent la MFGM est nécessaire afin de pouvoir utiliser cette membrane spécifique du lait comme nutraceutique.

Cependant cette quantification est difficile, notamment du fait que la plupart des protéines de la MFGM sont très glycosylées et donc présentes sous de multiples isoformes.

Il existe d'après la littérature plusieurs méthodes permettant d'extraire les protéines de la MFGM : par SDS-PAGE, sur gel d'électrophorèse ou par la méthode AQUA, technique de quantification absolue.

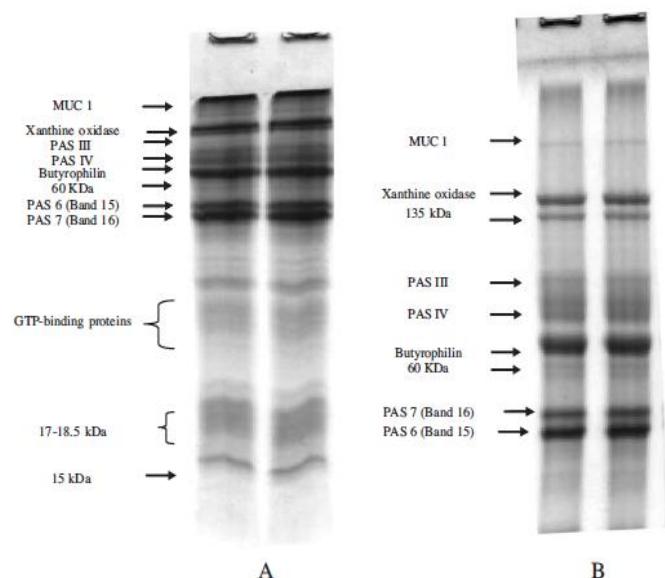
## **1. Séparation des protéines de la membrane des globules gras du lait bovin par SDS-PAGE**

La méthode de détection des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de DodécyLSulfate de Sodium (SDS) est utilisée depuis longtemps. Cette technique a permis de détecter la composition en protéines de la MFGM. En effet, les protéines de la MFGM sont très mobiles dans le SDS et elles se fixent bien sur le bleu de Coomasie ou sur le réactif acide périodique/Schiff (PAS) spécifique des glycoprotéines (Singh et al., 2006)

La méthode PAGE (Électrophorèse sur Gel de PolyAcrylamide) connue pour séparer des constituants selon leur mobilité électrophorétique et leur taille. Cette méthode peut être réalisée en conditions dénaturantes, c'est alors la méthode de séparation SDS-PAGE. Dans ce cas, l'agent dénaturant est le SDS et le complexe protéine/SDS a la même mobilité dans le liquide, la séparation sera donc essentiellement due à la différence de taille entre les protéines. C'est donc par la comparaison avec des molécules étalons qu'on pourra déterminer la taille des protéines.

Une fois que les protéines ont été séparées, on peut les visualiser en les colorant avec le bleu de Coomassie ou le Nitrate d'argent. On pourra ainsi voir toutes les protéines dont la concentration dépasse les limites de détection de la coloration (Techniques de l'ingénieur). Sur la **Figure 21**, on peut voir les résultats de la séparation des protéines de la MFGM par la méthode SDS-PAGE. Une quarantaine de protéines de la MFGM ont pu ainsi être détectées par les chercheurs pour être ensuite isolées et caractérisées

par une analyse de leur séquence ADN (Singh et al., 2006). Les protéines majoritaires de la MFGM représentées sur la **figure 21** ont été énumérées et détaillées dans le chapitre I.



**Figure 21 :** Séparation de protéines bovines de la membrane des globules gras du lait par SDS-PAGE.

(Singh et al., 2006)

Muc1= Mucine 1, XO= xanthine oxydase, BTN= butyrophiline, PAS 6/7= acide periodique de Schiff 6/7, PAS III= acide periodique de Schiff III, PAS IV= acide periodique de Schiff IV.

## **2. Séparation des protéines de la membrane des globules gras du lait bovin par la méthode AQUA (« Absolute Quantification technique »)**

L'étude de Fong et al., (2009) consiste à quantifier les protéines suivantes de la MFGM : la butyrophilin, PAS 6/7, l'adipophilin, la xanthine oxydase, la mucine 1 et la protéine de liaison aux acides gras à l'aide de la technique de quantification absolue. C'est une méthode très sensible et sélective qui permet de quantifier indirectement plusieurs protéines en même temps. Cette méthode repose sur la mesure de clivages peptidiques spécifiques réalisés avec des enzymes.

Deux échantillons de babeurre riche en protéines, respectivement 50 et 60% pour les échantillons BPC50 et BPC60 ont été choisis. Une fois l'hydrolyse des protéines effectuée et analysée, des résultats permettant de connaître la quantité de chaque protéine de la MFGM ont été obtenus. Cependant, cette méthode de quantification AQUA a été validée en la comparant à la méthode SDS-PAGE. Pour cela, la protéine  $\beta$ -Lg qui est présente dans les deux échantillons de babeurre et facilement quantifiable par SDS-PAGE a été utilisée.

D'après le **Tableau 12**, les résultats obtenus avec les deux méthodes sont équivalents. La technique de quantification absolue est donc validée.

**Tableau 12** : Comparaison des concentrations de  $\beta$ -Lg dans les deux échantillons de babeurre BPC50 et BPC60 obtenus par deux méthodes différentes : SDS-PAGE et quantification absolue (AQUA).

(Fong et al., 2009)

	AQUA (mg/g)	SDS-PAGE (mg/g)
BPC50	72+/- 6	69+/- 3
BPC60	78+/- 7	74+/- 5

## **Chapitre IV. Affinité de la mucine avec les probiotiques**

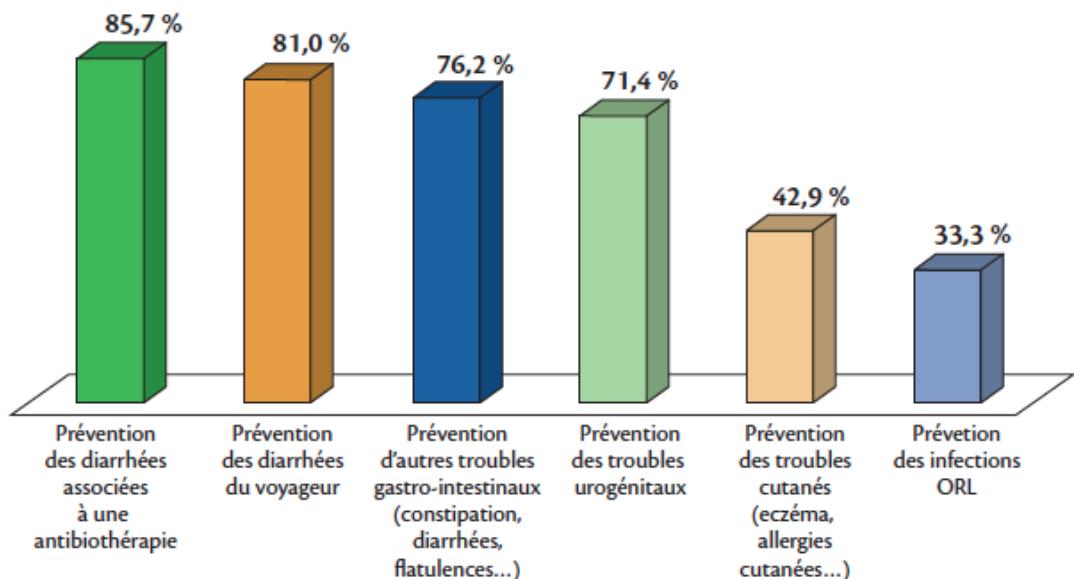
## **1. Présentation et rôles des probiotiques**

Les probiotiques sont des bactéries vivantes qui peuvent, à partir d'une certaine concentration et selon la souche utilisée, prévenir ou même guérir certaines maladies. C'est Elie Metchnikoff qui a effectué les premières recherches sur les probiotiques au début du XXème siècle en étudiant la corrélation entre la longévité de la population Bulgare et leur consommation de lait fermenté. Un pédiatre français a aussi effectué des recherches portant sur l'analyse de selles d'enfants ayant eu un épisode diarrhéique et celles d'enfants en bonne santé. Il s'est avéré qu'il y avait, dans les selles des enfants en bonne santé, une bactérie Gram positive dominante qui était beaucoup moins présente dans les selles des enfants malades (Butel, 2014).

Il existe plusieurs hypothèses concernant les modes d'action des probiotiques. Un des modes d'action serait sa capacité à agir comme une barrière et ainsi éviter ou limiter la colonisation des bactéries pathogènes. Ce mécanisme pourrait se faire grâce à des bactériocines, des acides gras à courte chaîne induisant une diminution du pH donc défavorable à la croissance des bactéries pathogènes ou encore grâce à des biosurfactants ayant une activité antimicrobienne. D'autres mécanismes d'action des probiotiques seraient en relation avec leur structure telle que l'ADN (spécifiquement grâce au motif CpG), des peptidoglycans, des lipopolysaccharides ou des flagellines. Les probiotiques peuvent aussi améliorer l'efficacité de la barrière naturelle de la muqueuse gastrique en agissant au niveau des protéines des jonctions serrées ou en augmentant la production de défensines. Enfin, les probiotiques peuvent agir en modulant le système immunitaire gastro-intestinal (par exemple, avec la stimulation de la sécrétion d'IgA).

Il faut également noter que les probiotiques sont reconnus comme étant des bactéries non dangereuses pour la santé. Les lactobacilles, les bifidobactéries, les lactococcus et les levures sont dits « Généralement reconnus sans caractère dangereux » (GRAS, « Generally Regarded As Safe ») (Butel, 2014).

En pharmacie, les probiotiques sont conseillés dans le cadre de mesures préventives et notamment pour la prévention de maladies digestives comme on peut le voir sur la **Figure 22**. Une enquête a en effet été réalisée auprès de 67 % de pharmaciens et 33 % de préparateurs en pharmacie (9 % des pharmacies concernées sont situées en campagne et 48 % en centre-ville).



**Figure 22** : Situations amenant à conseiller des probiotiques en officine.

(Faure et al, 2013)

Certains probiotiques comme *Lactobacillus casei* sont connus pour leur action protectrice contre les toxines d'*E.coli* 0157 :H7. Beaucoup d'autres probiotiques ont aussi un effet sur la croissance et l'effet pathogène d'*E.coli* (Rahal et al, 2012).

L'effet des probiotiques a notamment été étudié par l'équipe de Wang et al (2004). Ils ont étudié l'effet de probiotiques sur l'inhibition d'*Helicobacter Pylori* au cours d'un essai clinique dans lequel 70 patients avec une infection asymptomatique à *Helicobacter Pylori* ont ingéré des yaourts enrichis en probiotiques : *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* (ces bactéries peuvent tolérer un environnement avec un pH allant jusqu'à 3 et des concentrations en acides biliaires allant de 2 à 8%).

Les premiers résultats *in vitro* de cet essai sont résumés dans le **Tableau 13**. On ne constate que seul *Bifidobacterium* à un effet inhibiteur sur *Helicobacter Pylori*. Lorsque

l'on ajoute 0.125 mL de ce probiotique seul on observe déjà une diminution de la présence d'*H.Pylori*. S'il est ajouté à un yaourt l'effet est encore plus important. Aussi, lorsque *Bifidobacterium* est ajouté en plus grande quantité (0.25 mL), il inhibe complètement *H.Pylori* et ce, qu'il soit ingéré seul ou avec un yaourt.

**Tableau 13** : Présence de *Helicobacter Pylori* dans l'estomac de patients après administration des probiotiques *Lactobacillus acidophilus* (La5) et *Bifidobacterium lactis* (Bb12) dans différents types de préparations.

(Wang et al, 2004)

Type de préparation à base de probiotiques	Quantité de probiotiques ajoutée (en mL)				
	0.06	0.08	0.10	0.125	0.25
La5	3	3	3	3	3
Bb12	3	3	3	2	0
La5-yaourt	3	3	3	3	3
La5-Bb12-yaourt	3	3	3	1	0

\*La quantité d'*Helicobacter Pylori* au départ était de  $3 \cdot 10^8$  UFC/mL

Ils ont ensuite réalisé des essais *in vivo* grâce à des endoscopies réalisées deux fois (une au début du traitement et une après 4 semaines de traitement). Les résultats montrent (**Tableau 14**) que l'intensité d'*H.Pylori* et l'intensité de la gastrite ont diminué après un traitement de 6 semaines avec les probiotiques *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium lactis*.

Après l'étude de publications d'autres chercheurs à ce sujet, ils ont émis l'hypothèse que ce serait certainement la capacité de *Bifidobacterium* à diminuer la production de gaz hydrogène qui induirait la diminution de l'infectivité d'*H.Pylori*.

**Tableau 14 :** Aspects histologiques d'échantillons gastriques de 14 patients volontaires avant et après traitement avec un yaourt contenant les probiotiques La5 et BB12.

(Adapté de Wang et al, 2004)

Aspects et site de la biopsie	Avant traitement (semaine 0)	Après traitement (semaine 12)
<b>Intensité d'<i>H.Pylori</i></b>	6.00 +/- 0.65	3.86 +/- 0.54
<i>Antre de l'estomac</i>		
<i>Tubérosité de l'estomac</i>	3.25 +/- 0.82	2.00 +/- 0.35
<b>Intensité de la gastrite</b>	3.43 +/- 0.27	2.36 +/- 0.17
<i>Antre de l'estomac</i>		
<i>Tubérosité de l'estomac</i>	1.83 +/- 0.32	1.67 +/- 0.26
<b>Inflammation gastrique</b>	4.57 +/- 0.17	5.14 +/- 0.29
<i>Antre de l'estomac</i>		
<i>Tubérosité de l'estomac</i>	3.67 +/- 0.38	3.33 +/- 0.28

Toutes les valeurs sont des moyennes obtenues sur 14 échantillons. Le traitement a duré 6 semaines et la période « d'après-traitement » a duré 12 semaines. Les notes accordées à la gastrite sont en accord avec le système de Sydney.

L'ingestion de yaourts constitués des probiotiques *Lactobacillus acidophilus* et *Bifidobacterium lactis* aurait donc bien un effet sur l'inhibition d'*H.Pylori* mais seulement lorsque l'ingestion de yaourts se fait de manière continue et sur une longue période.

## **2. Interactions entre mucines et probiotiques et encapsulation : quel impact sur la protection des probiotiques lors de la digestion ?**

L'analyse des précédentes études montre qu'il serait intéressant d'étudier l'affinité entre les mucines et les probiotiques. En effet, s'il existait une bonne affinité entre les mucines des protéines de lait et les probiotiques, on serait alors ensuite capable d'encapsuler les probiotiques dans des membranes des globules gras du lait (constituées de mucines). Ce système permettrait alors aux probiotiques de résister à la digestion et exercer leur action protectrice sur le système gastro-intestinal.

### **2.1 Expériences**

J'ai réalisé des expériences avec des échantillons d'un probiotique, le *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) et des isolats de protéines de lactosérum, WPI (« Whey Protein Isolate). Le protocole détaillé des expériences se trouve en **Annexe I**.

J'ai tout d'abord tenté de déterminer la capacité de précipitation des LGG et des protéines WPI à différentes vitesses de centrifugation puis j'ai réalisé des expériences afin de déterminer l'affinité (par technique de dénombrement après culture) des LGG avec le WPI. Ces expériences n'ont pas permis d'apporter de résultats concluants. Les étapes suivantes seraient alors de tester d'avantage de conditions de centrifugations et répéter plusieurs fois la même expérience.

### **2.2 Stabilité de la membrane des globules gras lors de la digestion**

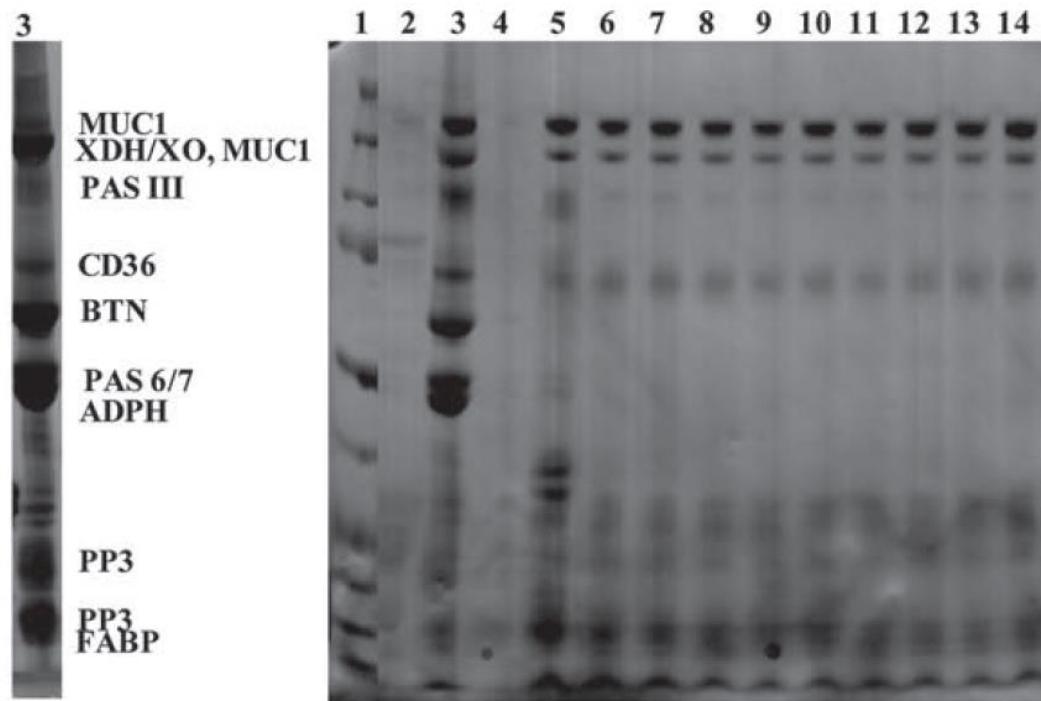
Les publications étudiées tout au long de ce travail de thèse ont montré que l'encapsulation de probiotiques dans la membrane des globules gras du lait pourrait être possible grâce à l'interaction qui existerait entre les mucines et les probiotiques. En effet, la digestion aurait un effet sur la destruction des probiotiques avant qu'ils puissent agir au niveau de la barrière gastro-intestinale. Il serait alors nécessaire de les encapsuler avec la membrane des globules gras du lait afin d'éviter au maximum leur destruction et donc leur inefficacité.

Cependant, avant de pouvoir utiliser les propriétés fonctionnelles et nutraceutiques de la membrane des globules gras pour protéger les probiotiques, il est important de connaître l'impact des mécanismes de la digestion sur celle-ci.

Dans l'étude de Le et al (2012), l'effet des protéases gastro-intestinales sur l'hydrolyse des protéines de la MFGM a été analysé.

Un premier test a été effectué en mettant en contact les protéines de la MFGM avec de la pepsine puis en les incubant sans pepsine pendant 2h à pH 2. Toutes les protéines ont été hydrolysées après 20 minutes de digestion mais n'ont pas été sensibles à la digestion en milieu acide.

On peut cependant voir sur la **Figure 23** que la Mucine 1 a bien résistée tout au long de la digestion.



**Figure 23 :** Changements dans la structure protéique de la MFGM dépourvue de sa partie lipidique durant la digestion avec la pepsine.

(Le et al, 2012)

Ce résultat a été obtenu après une séparation par SDS-PAGE et une coloration avec l'Acide periodique de Schiff (PAS). Les colonnes 1 à 14 correspondent respectivement à: 1 = poids moléculaire standard de chaque protéine indiquée sur la gauche, 2 = lait écrémé, 3 = mélange de protéines membranaires dépourvues de lipides et n'ayant pas subi de digestion, 4 = pepsine (6 µg), 5 à 14 = échantillons digérées par la pepsine après respectivement 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 et 180 minutes.

Ces résultats concernant les échantillons de MFGM de lait entier sont assez équivalents à ceux présentés ci-dessus bien qu'en plus, on observe un maintien plus important des protéines PAS 6/7 et CD36 lors de la digestion.

D'autres expériences ont été réalisées pour évaluer l'effet d'autres protéases telles que la trypsine et l'α-chymotrypsine sur les protéines de la MFGM. Dans ce cas, la Mucine 1 qui avait résisté à la pepsine a encore été résistante à ces deux protéases et de même pour les protéines CD36 et PAS 6/7 dans les échantillons de MFGM de lait entier.

Les raisons de la résistance de certaines protéines de la MFGM envers la pepsine seraient alors :

- Les pepsines n'hydrolysent pas les liaisons entre les groupes carbohydrates et les polypeptides. Ces groupes pourraient même empêcher l'activité de la pepsine gastro-intestinale. C'est pourquoi les protéines les plus glycosylées auraient le plus de capacité à résister à la digestion peptidique.
- La fraction lipidique de la MFGM servirait de protection des protéines lors de la digestion (Le et al. 2012).

D'après cette étude, la MFGM aurait un impact bénéfique sur notre santé grâce d'une part à sa capacité à résister à la digestion et donc à assurer le bon fonctionnement du procédé d'encapsulation des probiotiques et d'autre part grâce à son action bénéfique sur notre flore intestinale.

# Conclusion

La membrane des globules gras du lait apparaît être un bon moyen pour encapsuler les probiotiques qui seraient ainsi libérés dans un état presque intact et pourraient ainsi agir bénéfiquement sur notre système gastro-intestinal.

De plus, une revue de diverses études publiées récemment ont permis de démontrer qu'il serait utile d'utiliser les propriétés des constituants de la MFGM permettant notamment de réduire les maladies gastro-intestinales, de diminuer l'absorption du cholestérol et ayant un effet anti-cancéreux afin de promouvoir une utilisation de la membrane des globules gras du lait comme un nutraceutique bénéfique pour la flore gastro-intestinale.

La résistance de la membrane des globules gras du lait à la digestion ainsi que sa capacité à ne pas détériorer la consistance et la qualité des produits laitiers en fait deux atouts essentiels pour sa potentielle utilisation en tant que produit nutraceutique ou additif dans des produits laitiers utilisés au quotidien.

Bien que les expériences réalisées pour démontrer l'affinité entre les protéines de la MFGM et les probiotiques n'aient pas permis d'apporter de résultats concluants, plusieurs publications prouvent déjà qu'il existe une bonne affinité et qu'une encapsulation des probiotiques dans une membrane des globules gras du lait serait alors possible. C'est pourquoi il serait intéressant de poursuivre ces expériences avec davantage de conditions (de centrifugation et de dilutions) afin de prouver avec certitude cette affinité.

## BIBLIOGRAPHIE

Anand BS, Romero JJ, Sanduja SK, Lichtenberger LM. *Phospholipid association reduces the gastric mucosal toxicity of aspirin in human subjects*. The American Journal of Gastroenterology 1999 ; 94(7): 1818-22.

Benton D, Donohoe RT, Sillance B, Nabb S. *The influence of phosphatidylserine supplementation on mood and heart rate when faced with an acute stressor*. Nutritional Neuroscience 2001; 4(3):169-78.

Benyacoub J, Blum-Sperisen S, Nabil Bosco M, Bovetto LJR, Bureau-Franz I, Donnet-Hughes A, Schiffrin E, Favre L. *Lait maternisé comprenant des probiotiques et des composants de membrane de globule gras du lait*. Nestec S.A, WO 2011069987 A1, 2010.

Brown DA, London E. *Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts*. Journal of Biological Chemistry 2000; 275: 17221–17224.

Butel MJ. *Probiotiques, microbiote intestinal et santé*, Médecine et maladies infectieuses 2014; 1-8.

Campagna, S, Mathot AG, Fleury Y, Girardet JM, Gaillard JL. *Antibacterial activity of lactophorin, a synthetic 23-residues peptide derived from the sequence of bovine milk component-3 of proteose peptone*, Journal of Dairy Science 2004; 87:1621–1626.

Carlson SE, Montalto MB, Ponder DL, Werkman SH, Korones SB. *Lower incidence of necrotizing enterocolitis in infants fed a preterm formula with egg phospholipids*, Pediatric Research 1998; 44(4): 491-498.

Crook TH, Tinklenberg J, Yesavage J, Petrie W, Nunzi MG, Massari DC. *Effects of phosphatidylserine in age-associated memory impairment*. Neurology 1991; 41: 644-649.

Crook TH, Petrie W, Wells C, Massari DC. *Effects of phosphatidylserine in Alzheimer's disease*. Psychopharmacol Bull 1992; 28: 61-66.

Dewettinck K, Rombauta R, Thienponta N, Lea TT, Messensb K, Van Camp J. *Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material*, International Dairy Journal 2008; 18: 436-457.

Evers JM. *The milk fat globule membrane—compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell*, International Dairy Journal 2004; 14: 661–674.

Faure S, Pubert C, Rabiller J, Taillez J, Yvain AL. *Les probiotiques en pratique à l'officine*, Elsevier-Masson 2013; actualités pharmaceutiques (528).

Fong BY, Norris CS, Mac Gibbon AKH. *Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane*, International Dairy Journal 2007; 17: 275–288.

Fong BY, Norris CS. *Quantification of Milk Fat Globule Membrane proteins using selected reaction monitoring mass spectrometry*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 2009; p. 6021–6028.

Fuller KL, Kuhlenschmidt TB, Kuhlenschmidt MS, Jiménez-Flores R, Donovan SM. *Milk fat globule membrane isolated from buttermilk or whey cream and their lipid components inhibit infectivity of rotavirus in vitro*, Journal of Dairy Science 2013; 96: 3488–3497.

Griffin PM, Tauxe RV. *The epidemiology of infections caused by Escherichia coli O157:H7, other enterohemorrhagic E. coli, and the associated hemolytic uremic syndrome*. Epidemiologic Reviews 1991; 13: 60-98.

Hancock TJ, Salisbury V, Ovejero-Boglione MC, Cherry R, Hoare C, Eisenthal R, Harrison R. *Antimicrobial Properties of Milk: Dependence on Presence of Xanthine*

*Oxidase and Nitrite*, Antimicrobial agents and chemotherapy 2002; 46 (10): 3308-3310.

Harrison, R. *Physiological roles of xanthine oxidoreductase*, Drug Metabolism Reviews 2004; 36: 363-375.

Horrocks LA, Farooqui AA. *Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function*, Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2004; 70: 361-372.

IFMT. *Institut de la francophonie pour la médecine tropicale; séminaire sur les diarrhées de l'OMS-Août 2005*. [www.ifmt.auf.org/IMG/pdf/maladies-diarrheiques-2.pdf](http://www.ifmt.auf.org/IMG/pdf/maladies-diarrheiques-2.pdf), consulté le 2 Avril 2015.

Kvistgaard AS, Pallesen LT, Arias CF, Lopez S, Petersen TE, Heegaard CW, Rasmussen JT. *Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections*. Journal of Dairy Science 2004; 87: 4088-4096.

Kidd PM, Klatz RA, Goldman R. *Dietary phospholipids as anti-aging nutraceuticals*. Anti-Aging Medical Therapeutics 2000; 4: 282-300.

Kidd PM. *Phospholipids: Versatile nutraceutical ingredients for functional foods*. Functional Foods and Nutraceuticals 2002; 12: 30-40.

Le TT, Pascual PAL, Meesen G, Thienpont N, Messens K, Dewettinck K. *Physical properties and microstructure of yoghurt enriched with milk fat globule membrane material*, International Dairy Journal 2011; 21: 798-805.

Le TT, Van de wiele T, Do TNH, Debyser G, Struijs K, Devreese B, Dewettinck K. *Stability of milk fat globule membrane proteins toward human enzymatic gastrointestinal digestion*, Journal of Dairy Science 2012; 95 (5).

Lievin-Le Moal V, Servin AL. *The Front Line of Enteric Host Defense against Unwelcome Intrusion of Harmful Microorganisms: Mucins, Antimicrobial Peptides, and Microbiota*, Clinical Microbiology Reviews 2006; p. 315–337.

Lopez C. *Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure*, Current Opinion in Colloid & Interface Science 2011; 16: 391–404.

Morales-Guerrero SE, Mucito-Varela E, Aguilar-Gutiérrez GR, Lopez-Vidal Y, Castillo-Rojas G. *The Role of CagA Protein Signaling in Gastric Carcinogenesis*, Current Topics in Gastritis 2012, chapitre 11.

Niederau C, Strohmeyer G, Heintges T, Peter K, Göpfert E. *Polyunsaturated phosphatidyl-choline and interferon alpha for treatment of chronic hepatitis B and C: a multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial*, Leich Study Group 1998; 45(21): 797-804.

Noh SK, Koo SI. *Milk sphingomyelin is more effective than egg sphingomyelin in inhibiting intestinal absorption of cholesterol and fat in rats*, Journal of Nutrition 2004; 134: 2611–2616.

OMS. *Aide mémoire n°125: Escherichia coli entérohémorragique (ECEH)*, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/fr/>, consulté le 3 avril 2015.

Parashar UD, Nelson EAS, Kang G. *Diagnosis, management, and prevention of rotavirus gastroenteritis in children*, British Medical Journal 2013; 347:f7204 doi: 10.1136/bmj.f7204.

Parker P, Sando L, Pearson R, Kongsuwan K, Tellam RL, Smith S. *Bovine Muc1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells*, Glycoconjugate Journal 2010; 27: 89–97.

Qiagen. *Rotavirus Induced Diarrhea*.

<https://www.qiagen.com/fr/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details.aspx?pwid=399>, consulté le 2 avril 2015.

Rahal EA, Kazzi N, Nassar FJ, Matar GM. *Escherichia coli O157:H7- Clinical aspects and novel treatment approaches*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2012; 138 (2).

Singh H. *The milk fat globule membrane-a biophysical system for food applications*. Current Opinion in Colloid & Interface Science 2006; p. 154 – 163.

Snow DR, Jimenez-Flores R, Ward RE, Cambell J, Young MJ, Nemere I et al. *Dietary milk fat globule membrane reduces the incidence of aberrant crypt foci in Fischer-344 rats*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2010; 58(4): 2157-63.

Spitsberg VL. *Invited Review: Bovine Milk Fat Globule Membrane as a Potential Nutraceutical*, Journal of Dairy Science 2005; 88 (7): 2289–2294.

Sprong RC, Snel J, Bovee-Oudenhoven IMJ. *The anti-infective potential of milk products: Positive effects of milk to prevent gastrointestinal infection and inflammation*. Bulletin of the International Dairy Federation 2012; 457: 94–110.

Struijs K, Van de Wiele T, Le TT, Debyser G, Dewettinck K, Devreese B et al. *Milk fat globule membrane glycoproteins prevent adhesion of the colonic microbiota and result in increased bacterial butyrate production*, International Dairy Journal 2013; 32: 99-109.

Techniques de l'ingénieur. *Électrophorèse préparative - Procédés préparatifs directement dérivés des techniques analytiques*. <http://www.techniques-ingenieur.fr>, consulté le 13 Avril 2015.

Tellez A, Corredig M, Guri A, Zanabria R, Griffiths MW, Delcenserie V. *Bovine milk fat globule membrane affects virulence expression in Escherichia coli O157:H7*, Journal of Dairy Science 2012; 95: 6313–6319.

Van Rensburg CE, Jooné GK, O'Sullivan JF, Anderson R. *Antimicrobial activities of clofazimine and B669 are mediated by lysophospholipids*, Antimicrob Agents Chemother 1992, 36(12) : 2729-35.

Veereman-Wauters G, Staelens S, Rombaut R, Dewettinck K, Deboutte D, Brummer RJ et al. *Milk fat globule membrane (INPULSE) enriched formula milk decreases febrile episodes and may improve behavioral regulation in young children*, Nutrition journal 2012, 28: 749–752.

Wang X, Hirmo S, Willén R, Wadström T. *Inhibition of Helicobacter pylori infection by bovine milk glycoconjugates in a BALb/cA mouse model*, Journal of Medical Microbiology 2001 May; 50(5): 430-435.

Wang KY, Li SN, Liu CS, Perng DS, Su YC, Wu DC et al. *Effects of ingesting Lactobacillus- and Bifidobacterium-containing yogurt in subjects with colonized Helicobacter pylori 1–3*, The American Journal Of Clinical Nutrition 2004; 80: 737–741.

# ANNEXES

## Annexe I : Protocole expérimental permettant la détermination de l'affinité entre un probiotique le *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) et des isolats de protéines de lactosérum, WPI.

1. Protocole permettant la détermination de la capacité de précipitation des LGG et des protéines WPI à différentes vitesses de centrifugation :

### ➤ Réhydratation

- Des LGG préalablement lyophilisées avec une solution tampon PBS ou de l'eau purifiée à 0,03g pour 15 mL d'eau.
- Du WPI à 1g pour 100 mL.

### ➤ Centrifugation

- 1,5 mL de LGG à 1000g, 1500g et 3000g pendant 90 sec.
- 1,5 mL de WPI à 1000g, 1500g et 3000g pendant 90 sec.

LGG	WPI
<u>Dénombrement des LGG sur milieu MRS :</u>  - Préparation du milieu MRS  - Réalisation des dilutions :  1°) <u>Témoin</u>	<u>Mesure de l'absorbance du WPI à 280 nm :</u>  Mesurer l'absorbance de la solution de LGG n'ayant pas subi de centrifugation.  2°) <u>Solution LGG après centrifugations</u>

<p>Prise de 0,5 ml de la solution de LGG n'ayant pas subi de centrifugation puis ajout de 4,5 mL de solution tampon ou eau distillée afin de réaliser les dilutions à <math>10^{-1}</math> <math>10^{-2}</math> <math>10^{-3}</math> <math>10^{-4}</math> <math>10^{-5}</math> <math>10^{-6}</math>.</p>	<p>Mesurer l'absorbance des solutions de LGG aux différentes centrifugations 3000g, 1500g et 1000g.</p>
<p>Etalement de 0,5 mL de chaque dilution sur boite de pétri puis ajout du milieu MRS.</p>	
<p><b>2°) <u>Solution LGG après centrifugations</u></b></p> <p>Prise de 0,5 ml du surnageant de la solution de LGG après centrifugation à 3000g, 1500g et 1000g puis ajout de 4,5 mL de solution tampon ou eau distillée afin de réaliser les dilutions à <math>10^{-1}</math> <math>10^{-2}</math> <math>10^{-3}</math> <math>10^{-4}</math> <math>10^{-5}</math> <math>10^{-6}</math>.</p> <p>Etalement de 0,5 mL de chaque dilution sur boite de pétri puis ajout du milieu MRS.</p>	

**Résultats :** Par mesure de l'absorbance du WPI à 280 nm.

## 2. Protocole permettant la détermination de l'affinité des LGG avec le WPI :

De même que précédemment, mis à part que :

- La vitesse de centrifugation est de 3000g.
- On teste deux temps de centrifugation : 90 secondes et 5 minutes.
- la solution témoin et les solutions centrifugées seront toutes constituées d'un mélange de LGG/WPI à 1ml/1mL.
- Les dilutions ne se font que jusqu'à  $10^{-4}$ .

**Résultats :** Par dénombrement sur milieu MRS et mesure de l'absorbance de LGG+WPI à 280 nm.

N° d'identification :

**TITRE**

**La Membrane des globules gras du lait : Propriétés et applications en santé.**

**Thèse soutenue le 25 Septembre 2015**

**Par Chloé VALLEE**

**RESUME :**

Beaucoup de patients souffrent de maladies du tube digestif et les ventes de médicaments associés sont très élevées. La mise sur le marché sous forme d'alicaments, donc avec moins de contre-indications ou effets secondaires pour les patients, seraient alors une bonne alternative. L'objectif de ce travail a été de démontrer les effets bénéfiques sur la santé et en particulier sur la flore intestinale de la Membrane des Globules Gras du lait (« MFGM »). En effet, la Membrane des Globules Gras du lait permettrait de réduire les maladies gastro-intestinales, de diminuer l'absorption du cholestérol et agirait dans l'inhibition de cellules cancéreuses. Ceci grâce à des lipides et protéines (notamment la mucine 1) constituant la Membrane des Globules Gras du lait. Des expériences ont été réalisées pour démontrer l'affinité entre les protéines de la MFGM et les probiotiques et donc la possibilité d'encapsuler les probiotiques dans la Membrane des Globules Gras du lait. Malgré les résultats non-concluant obtenus, plusieurs publications prouvent déjà qu'il existe une bonne affinité et qu'une encapsulation des probiotiques dans une membrane des globules gras du lait serait alors possible.

**MOTS CLES :**

**Membrane des globules gras du lait, MFGM, lait, Mucine1, probiotiques, maladies gastro-intestinales.**

<b>Directeur de thèse</b>	<b>Intitulé du laboratoire</b>	<b>Nature</b>
<b>Monsieur Joël SCHER</b>	<b>Laboratoire Libio, ENSAIA, Nancy</b>	<b>Expérimentale</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Bibliographique</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Thème</b> <input type="checkbox"/>

**Thèmes**

**1 – Sciences fondamentales**

**2 – Hygiène/Environnement**

**3 – Médicament**

**4 – Alimentation – Nutrition**

**5 - Biologie**

**6 – Pratique professionnelle**

