

**UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE AIX-MARSEILLE II**  
**FACULTÉ DE MÉDECINE**

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé  
UMR 476 INSERM / 1260 INRA “Nutrition Humaine et Lipides”

Thèse présentée par **Gaëlle FAVÉ** pour obtenir le grade de

**Docteur en Sciences**  
**de l’Université de la Méditerranée Aix-Marseille II**  
dans la spécialité “Nutrition: aspects Moléculaires et Cellulaires”

**STRATÉGIES D’AMÉLIORATION DE  
LA BIODISPONIBILITÉ DES ACIDES GRAS :  
APPROCHES PHYSICO-CIMIQUES  
ET ENZYMATIQUES**

*Thèse dirigée par Martine ARMAND*  
Soutenue à huis clos le 20 novembre 2006

**Jury :**

M. Michel FONS  
Mme Evelyne VÉRICEL  
M. Yvon CARPENTIER  
M. Luc CYNOBER  
M. Stéphane LUCCHINI  
Mme Martine ARMAND

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directrice de Thèse

Je tiens à remercier,

Monsieur Denis Lairon, directeur, et Madame Marie-Josèphe Amiot-Carlin, co-directrice de l'Unité Mixte de Recherche 476 INSERM / 1260 INRA "Nutrition humaine et lipides", pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire.

Madame Martine Armand, responsable du groupe "Biodisponibilité des acides gras dans les pathologies de déficience", pour avoir dirigé ma thèse. Son dynamisme et sa rigueur scientifique ont rendu ce travail de recherche très (trop ?) dense mais passionnant !

Monsieur Antoine Puigserver, pour m'avoir admise dans la formation doctorale de Nutrition.

Madame Evelyne Véricel et Messieurs Michel Fons, Yvon Carpentier, Luc Cynober et Stéphane Lucchini, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse.

Mesdames Danielle Deveney et Monique Laisney, pour m'avoir guidée avec un indéfectible sourire dans les méandres de l'administration universitaire.

Je tiens à exprimer ma gratitude,

À la Région Provence-Alpes-Côte d'Azur et à l'Institut National pour la Santé Et la Recherche Médicale, pour m'avoir attribué une bourse doctorale.

À la société Syncrosome, pour avoir accepté d'être le partenaire socio-économique de cette bourse de recherche. Je remercie très cordialement Messieurs Richard Mitry (Directeur général) et Stéphane Lucchini (Responsable scientifique) pour leur intérêt.

À la société "Innovation Santé Lipides", pour son soutien financier. Je remercie vivement Monsieur Gérard Pieroni (Directeur général) pour son expertise, son aide (des petits tracas techniques jusqu'aux réflexions scientifiques) et son introduction aux "joies" des films monomoléculaires (malgré l'ingratitude de cette technique!).

Je souhaite remercier celles et ceux qui m'ont conduite jusqu'au Doctorat et ont collaboré à mes travaux de thèse,

Madame Nathalie Gonzalès, Diététicienne et enseignante, pour sa gentillesse extrême et pour m'avoir ouvert les portes de "l'après BTS".

Monsieur Jacques Fantini, pour son enseignement "dépoussiéré" du métabolisme énergétique et pour m'avoir fait le grand plaisir d'accepter de parrainer cette thèse.

Le Docteur Jacques Peyrot, pour son accueil, son humour caustique, sa prévenance sincère, et pour m'avoir donné l'occasion de travailler au son des grands compositeurs classiques.

Messieurs Claude Villard et Daniel Lafitte, l'inénarrable tandem du plateau protéomique de la Faculté de Pharmacie, pour leurs compétences, leurs idées et le grand bol d'air frais que m'ont procuré les visites dans leur laboratoire. Je remercie tout particulièrement Eddy Pasquier, pour sa gentillesse et pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée dans l'urgence.

Le professeur Olle Hernell et son équipe, pour nous avoir généreusement envoyé de Suède échantillons de lipase et commentaires éclairés.

Monsieur Christian Lévêque, pour son expertise dans la technologie du BIAcore.

Madame Sandrine Vieules et Monsieur Laurent Constant de la société Malvern Instruments, pour leur support technique dans les mesures de granulométrie et de potentiel zêta.

Le Docteur Véronique Millet et Monsieur Jean-Yves Gaget, pour nous avoir généreusement donné des échantillons de lait humain et de lait de jument, et Monsieur Yves Boirie pour nous avoir donné tout aussi généreusement des protéines de lait de vache purifiées.

Monsieur André Lanteaume (Laboratoire de "Pathologie respiratoire liée à l'environnement", UPRES EA 3287, Marseille), pour son appui dans le domaine obscur des statistiques.

Madame Brigitte Kahn-Perlès (Unité de Cancérologie Expérimentale, U119 INSERM, Marseille), pour son accueil, sa disponibilité et ses conseils.

Je remercie très amicalement l'ensemble des membres passés et présents du laboratoire, et spécialement,

Paulette Lechêne, pour son expertise en microscopie et Odette Ghiringhelli, pour ses connaissances en culture cellulaire.

Thierry Coste, pour ses conseils scientifiques, sa contribution pertinente à la correction de ce mémoire, son aide solide en informatique et en statistique, et son soutien moral.

Michèle Senft, pour son aide technique, sa franchise et son recul devant les événements.

Béatrice Gleize, pour sa grande disponibilité, son aide particulièrement étendue, nos voyages en train lors des congrès, et son téléphone portable !

Barbara Play, pour son incroyable et inusable bonne humeur et pour son soutien moral.

Marc André et Franck Tourniaire, pour leur vision décalée des Sciences et de la vie.

Emmanuelle Reboul, pour son énergie et sa prévenance.

Myriam de France, pour son implication et sa sensibilité.

Louisa Goumidi-Araria, pour son naturel, et pour notre congrès à Palma de Majorque.

Nicole Domingo, pour ses encouragements et son écoute.

Séverine Pitel, pour le plaisir de nos discussions, hélas trop rares.

Audrey Ridet, pour son extrême gentillesse, et pour son sens de l'organisation qui n'a pas été sans me rappeler quelqu'un...

Je profite de ces pages liminaires pour adresser aussi de chaleureuses pensées aux amis, qui enrichissent ma vie : Véro, Audrey, Marc, Vince, Franck, JB, Vanina, Ger, Cyril, Seb, Sabine, Nico, Marie, DenDen, Isa, Nico de Dragui, Damidou, Peggy, Mickey, Guillaume, et particulièrement,

Béatrice, parce que je bénis cette journée de CE2 où j'ai fait sa connaissance, parce qu'elle a grandi avec moi, et parce qu'elle est la sœur que je n'ai pas,

Christine, Justine et Florence, pour leur gentillesse, leur écoute, et parce qu'elles ont essayé de comprendre et d'alléger les problèmes "existentiels" de leur thésarde de copine !

Je souhaite enfin exprimer tout l'amour que je porte aux membres de ma famille,

Aux Bretons, que je vois trop peu, mais dont j'ai des nouvelles régulières par leur ambassadrice, Gene.

Aux Parisiens, avec un coup de coude aux deux autres Docteurs de la famille et avec une pensée particulière à ma cousine Axël (Caribou !).

Aux Cannois : à Mamie, qui me manque, et à Papy.

Un clin d'œil à ma cousine Julia, qui suit de près mes connaissances en nutrition...même si je sais que c'est intéressé !

À Thomas, parce qu'il existe et qu'il chamboule mon existence si bien organisée (!), d'où un grand merci à Cathy et à Pierre de l'avoir conçu et élevé.

À mes parents, pour leur patience devant mes errements professionnels, leur confiance, leur fierté et leur soutien sans condition.

Ah, la Recherche !  
Quelle source de surprises et d'excitation (DEA, première année de thèse)...  
*"Le commencement de toutes les sciences,  
C'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont."*  
(Aristote)

...D'incompréhensions et de perplexité (deuxième et troisième années de thèse)...  
*"S'il n'y a pas de solution,  
C'est qu'il n'y a pas de problème !"*  
(Jacques Rouxel, Les Shadoks)

...D'insatisfactions et de frustration (dernière année de thèse)...  
*"On ne fait jamais attention à ce qui a été fait,  
On ne voit que ce qui reste à faire..."*  
(Marie Curie)

...Et de projets.

# PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

## BREVETS

**Favé G, Pieroni G et Armand M**; en cours de dépôt par la société Innovation Santé Lipides (Directeur : G. Pieroni), avec l'accord de l'INSERM.

## ARTICLES ORIGINAUX

**Favé G, Coste TC and Armand M**, Physicochemical properties of lipids: new strategies to manage fatty acid bioavailability, *Cell Mol Biol*, 2004, 50(7) : 815-831.

## RESUMES PUBLIES DANS LE CADRE DE CONGRES

**Favé G, Millet V, Ridet A, Pieroni G Coste TC et Armand M**, Lipidomique et protéomique appliquées au lait humain : vecteurs d'acides gras poly-insaturés et nouvelles protéines impliquées dans le développement du nouveau-né, *5èmes Journées Francophones de Nutrition*, 15-17 Décembre 2004, Lyon, France.

Publié dans *Nutrition Clinique et Métabolisme* 2004, 18, S1:S82.

**Favé G, Coste T, Lechêne de la Porte P, Gleize B, Pieroni G et Armand M**, Régulation de l'activité de la lipase gastrique humaine par les phospholipides et les acides gras libres, *4èmes Journées Francophones de Nutrition*, 27-29 Novembre 2002, Dijon, France.

Publié dans *Nutrition Clinique et Métabolisme* 2002, 16, S1:S41.

## COMMUNICATIONS

**Armand M, Tourniaire F, George S, Favé G, Hassan M, Maillot M, Borel P and Amiot MJ** Antioxidants of fruits and vegetables: in vitro stability in gastric and duodenal conditions mimicking the human upper digestive tract. *10<sup>th</sup> Karlsruhe Nutrition Congress*, 15-17 Octobre 2006, Karlsruhe, Allemagne.

**Armand M, Tourniaire F, George S, Favé G, Hassan M, Maillot M, Borel P and Amiot MJ**, Dietary antioxidants behaviour in vitro in a complex test meal submitted to gastric and intestinal conditions mimicking the human upper digestive tract, *Third European Nutrigenomics Conference*, 12-15 Septembre 2006, Oxford, Angleterre.

**Favé G, Mimoun M, Millet V, Oliver P, Ridet A, Gleize B, Miralles O, Picó C, Palou A, Coste TC et Armand M**, Qualité nutritionnelle des laits maternels de femmes méditerranéennes : approches en lipidomique et protéomique, *2<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Nutrition*, 17-19 Novembre 2005, Marseille, France.

**Favé G, Oliver P, Mimoun M, Millet V, Miralles O, Ridet A, Gleize B, Picó C, Palou A, Coste TC and Armand M**, Nutritional quality of human milk from mediterranean lactating women: a preliminary approach towards personalised nutrition, From Nutrigenomics to personalised nutrition, *3<sup>rd</sup> International Nutrigenomics Conference*, 2-4 Novembre 2005, Palma de Majorque, Espagne.

**Favé G and Armand M**, Nutrigenomics and Human Milk Quality, Workpackage on « Life stage nutrition », *Second European Nutrigenomics Conference*, 10-14 Septembre 2005, Toscane, Italie. (communication orale)

**Armand M, Gaget JY, Mimoun M, Favé G, Ridet A, Gleize B, Pieroni G and Coste TC**, Efficiency of different PUFA vectors on the improvement of DHA levels in mare milk, *Second European Nutrigenomics Conference*, 10-14 Septembre 2005, Toscane, Italie.

**Mimoun M, Oliver P, Favé G, Millet V, Miralles O, Ridet A, Gleize B, Pico C, Palou A, Coste TC and Armand M**, Human milk lipidomic and proteomic : a preliminary comparison of milk quality between lactating women living in Marseille and in the Balearic Islands, *Second European Nutrigenomics Conference*, 10-14 Septembre 2005, Toscane, Italie.

**Colin D, Favé G, Sebban-Kreuzer C, Crenon I, Armand M et Kerfélec B**, Amélioration des suppléments pancréatiques par modification du pH optimum d'action de la lipase pancréatique, *6<sup>ème</sup> Colloque des Jeunes Chercheurs de la Mucoviscidose*, 31 mars 2005, Rueil-Malmaison, France.

**Favé G, Millet V, Ridet A, Pieroni G Coste TC et Armand M**, Lipidomique et protéomique appliquées au lait humain : vecteurs d'acides gras poly-insaturés et nouvelles protéines impliquées dans le développement du nouveau-né, *2<sup>ème</sup> Journée de la Recherche de la Faculté de Pharmacie*, 17 mars 2005, Marseille, France.

**Favé G, Coste TC and Armand M**, Physicochemical properties of lipids : new strategies to manage fatty acid bioavailability, *First European Nutrigenomics Conference*, 8-10 Septembre 2004, Wageningen, Pays-Bas.

**Favé G, Millet V, Ridet A, Pieroni G, Coste TC and Armand M**, Human milk lipidomic and proteomic : towards the discovery of PUFA vectors and new proteins involved in premature or term infants development, *First European Nutrigenomics Conference*, 8-10 Septembre 2004, Wageningen, Pays-Bas.

**Favé G, Coste T, Lechêne de la Porte P, Gleize B, Peyrot J, Pieroni G, Hamosh M and Armand M**, Human gastric lipase activity is highly modulated by phospholipid and long-chain free fatty acid species : potential impact on lipid bioavailability in premature infants and Cystic Fibrosis patients, *2003 FASEB Summer Research Conference*, 2-7 Août 2003, Snowmass Village, Colorado, USA.

**Favé G, Aivazian N, Chapus C, Peyrot J, Hamosh M and Armand M**, Trypsin digestion of human gastric lipase under physiological conditions : a consideration in enzyme replacement therapy, *2003 FASEB Summer Research Conference*, 2-7 Août 2003, Snowmass Village, Colorado, USA.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b>	<b>2</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>8</b>
<b>1. Les différentes étapes impliquées dans la biodisponibilité des nutriments lipidiques</b>	<b>8</b>
1.1. L'émulsification des lipides alimentaires	8
1.1.1. Le comportement des lipides en solution aqueuse	8
1.1.2. L'organisation des lipides alimentaires dans l'estomac	9
1.1.3. Les conséquences de l'émulsification des lipides	10
1.2. La digestion des triglycérides	10
1.2.1. La lipase gastrique	11
1.2.1.1. <i>Localisation et sécrétion de la lipase gastrique</i>	12
1.2.1.2. <i>Caractéristiques biochimiques et structurales de la lipase gastrique</i>	14
1.2.1.3. <i>Mécanisme catalytique de la lipase gastrique</i>	20
1.2.2. Le système lipase/colipase pancréatique	26
1.2.2.1. <i>Localisation tissulaire et sécrétion de la lipase pancréatique</i>	26
1.2.2.2. <i>Caractéristiques biochimiques du système lipase/colipase pancréatique</i>	27
1.2.2.3. <i>Structure et mécanisme catalytique du système lipase/colipase pancréatique</i>	29
1.2.3. La lipase stimulée par les sels biliaires ou BSSL	31
1.2.3.1. <i>Localisation tissulaire et sécrétion de la BSSL</i>	31
1.2.3.2. <i>Caractéristiques biochimiques de la BSSL</i>	32
1.2.3.3. <i>Structure et mécanisme catalytique de la BSSL</i>	33
1.2.4. Le rôle particulier de la lipase gastrique dans la digestion et l'absorption des lipides	36
1.3. La solubilisation et l'absorption des nutriments lipidiques	37
1.4. Le transport des différentes molécules lipidiques absorbées	38
<b>2. L'altération de la biodisponibilité des nutriments lipidiques</b>	<b>40</b>
2.1. Les acides gras essentiels et leurs rôles physiologiques	40
2.2. La déficience en acides gras essentiels	40
2.2.1. Altération physiologique de la biodisponibilité des acides gras	41
2.2.1.1. <i>Le nouveau-né</i>	41
2.2.1.2. <i>La personne âgée</i>	41
2.2.2. Altération pathologique de la biodisponibilité des acides gras	42
2.2.2.1. <i>L'insuffisance pancréatique</i>	42
2.2.2.2. <i>Les autres causes</i>	43
2.2.3. Le rôle de la lipase gastrique dans l'insuffisance pancréatique	44
<b>3. Les stratégies d'amélioration de la biodisponibilité des nutriments lipidiques</b>	<b>45</b>

3.1. L'amélioration de la biodisponibilité des nutriments lipidiques par le biais des lipases	45
3.2. L'amélioration de la biodisponibilité des nutriments lipidiques par le biais des propriétés physico-chimiques des lipides	47
3.2.1. La taille des globules lipidiques	47
3.2.2. La structure des globules lipidiques	51
3.2.2.1. <i>La répartition des lipides au sein des globules lipidiques</i>	51
3.2.2.2. <i>L'organisation de la monocouche de surface</i>	52
3.2.3. Les propriétés des molécules constitutives des globules lipidiques	54
3.2.3.1. <i>Les triglycérides</i>	54
3.2.3.2. <i>Les phospholipides</i>	58
<b>4. L'objectif de la thèse</b>	<b>64</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>66</b>
<b>1. Lipidomique</b>	<b>66</b>
1.1. Lipides et produits chimiques utilisés	66
1.2. Préparation des émulsions lipidiques	66
1.2.1. Composition des émulsions	66
1.2.2. Procédure d'émulsification	68
1.2.3. Caractérisation des émulsions	69
1.2.3.1. <i>Granulométrie</i>	69
1.2.3.2. <i>Mesure du potentiel électrocinétique ou potentiel Zêta</i>	69
1.3. Caractérisation des phospholipides	71
1.3.1. Analyse qualitative et quantitative des acides gras des phospholipides par chromatographie en phase gazeuse (CPG)	71
1.3.2. Analyse de la compressibilité de certains lipides par la technique des films monomoléculaires	72
1.3.2.1. <i>Principe de la technique</i>	72
1.3.2.2. <i>Déroulement de la mesure</i>	73
<b>2. Méthodes enzymatiques</b>	<b>74</b>
2.1. Lipides, lipases et produits chimiques utilisés	74
2.2. Mesure de l'activité des différentes enzymes dans les conditions biochimiques	74
2.2.1. La lipase gastrique	74
2.2.2. La lipase pancréatique	75
2.2.3. La lipase stimulée par les sels biliaires (BSSL)	75
2.2.3.1. <i>Mesure sur tributyrine</i>	76
2.2.3.2. <i>Mesure sur trioléine</i>	76
2.3. Mesure de l'activité des différentes enzymes dans les conditions proches de la physiologie: test de digestion	78
2.3.1. Déroulement de la lipolyse en phase gastrique	78
2.3.2. Déroulement de la lipolyse en phase intestinale	79
2.3.2.1. <i>En présence de lipase pancréatique de porc</i>	79
2.3.2.2. <i>En présence de BSSL</i>	80
2.3.3. Extraction, séparation et quantification des produits de la lipolyse	81
2.3.3.1. <i>Chromatographie sur couche mince</i>	81
2.3.3.2. <i>Méthode de Belfrage et Vaughan</i>	81
2.3.4. Évaluation du taux de lipolyse	81

<b>3. Protéomique</b>	<b>82</b>
3.1. Quantification des protéines	82
3.2. Purification de la lipase gastrique humaine native	82
3.3. Séparation et détection de protéines par électrophorèse	82
3.3.1. Électrophorèse (SDS-PAGE)	82
3.3.2. Détection de la lipase gastrique humaine par immuno-empreinte	83
3.4. Analyse de la séquence de la lipase gastrique humaine	83
3.5. Caractérisation de certaines lipases par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	84
3.5.1. Identification de différents variants de la lipase stimulée par les sels biliaires	84
3.5.2. État de dégradation du térapeptide N-terminal de la lipase gastrique humaine	84
3.5.2.1. <i>Identification de la lipase gastrique humaine</i>	84
3.5.2.2. <i>Analyse des différentes formes du peptide N-terminal de la lipase gastrique humaine</i>	85
3.6. <i>Étude de liaison par résonance plasmonique de surface (technologie BIA)</i>	86
3.6.1. Principe de la technique	86
3.6.2. Déroulement des mesures	86
<b>4. Culture cellulaire</b>	<b>88</b>
4.1. Préparation des cellules CaCo2 clone TC7	88
4.2. Étude d'absorption des produits de lipolyse	88
4.2.1. Préparation des particules	88
4.2.2. Déroulement de l'expérience	89
<b>5. Analyse statistique des données</b>	<b>90</b>
<b>RÉSULTATS</b>	<b>91</b>
<b>1. Mise en évidence de l'effet du type de phospholipide et de la présence d'acides gras libres sur les caractéristiques physico-chimiques d'une émulsion lipidique</b>	<b>91</b>
1.1. Effet du type de phospholipide et de la présence d'acides gras libres sur la granulométrie des émulsions lipidiques	91
1.1.1. Données de l'analyse par diffraction laser	91
1.1.1.1. <i>Étude de l'effet du type de phospholipide</i>	91
1.1.1.2. <i>Étude de l'effet du type d'acide gras libre</i>	93
1.1.2. Données de l'observation microscopique	94
1.1.3. Étude de la stabilité au cours du temps	95
1.2. Effet du type de phospholipide et de la présence d'acides gras libres sur le potentiel électrocinétique des émulsions lipidiques	97
1.3. Conclusion	103
<b>2. Étude de l'effet du type de phospholipide, de la présence d'acides gras libres et de la présence de protéines sur la phase gastrique de la lipolyse</b>	<b>104</b>
2.1. Caractérisation de l'effet de différentes molécules lipidiques et protéiques sur la lipolyse gastrique	104
2.1.1. Caractérisation de l'effet des phospholipides	104
2.1.1.1. <i>Le rendement de la lipolyse gastrique dépend du type de phospholipide entrant dans la composition de l'émulsion lipidique</i>	104
2.1.1.2. <i>L'effet du type de phospholipide sur le rendement de la lipolyse gastrique est modulé par la source de lipase gastrique</i>	106
2.1.1.3. <i>L'effet du type de phospholipide est confirmé en présence de protéines</i>	109

2.1.2. Caractérisation de l'effet de la présence d'acides gras libres	112
2.1.3. Caractérisation de l'effet de la présence de protéines liant les acides gras	113
2.1.4. Conclusion	115
2.2. Recherche des mécanismes impliqués dans l'amélioration du rendement de la lipolyse gastrique par le lysophosphatidylinositol	115
2.2.1. La taille des globules lipidiques	116
2.2.2. Le potentiel électrocinétique	118
2.2.3. La compressibilité	121
2.2.4. Les interactions entre les phospholipides et la lipase gastrique humaine : données de la technologie BIA	125
2.2.4.1. <i>Caractérisation des liposomes utilisés</i>	125
2.2.4.2. <i>Mesures de liaison</i>	125
2.2.5. Le térapeptide N-terminal de la lipase gastrique humaine	126
2.2.5.1. <i>Étude de lipases gastriques purifiées : données du séquençage</i>	126
2.2.5.2. <i>Étude de sucs gastriques : données de la spectrométrie de masse</i>	128
2.2.6. La forme lysophospholipide	132
2.2.7. L'inositol	134
2.2.8. Le phénomène « d'inhibition » de la lipase gastrique	136
2.2.9. Conclusion	137
<b>3. Étude de l'effet du type de phospholipide et de la présence de protéines sur la phase intestinale de la lipolyse</b>	<b>138</b>
3.1. La lipase pancréatique	138
3.1.1. Mise au point des conditions expérimentales	138
3.1.2. Étude de l'effet du type de phospholipide sur l'activité de la lipase pancréatique	140
3.1.3. Étude de l'effet du type de phospholipide sur l'activité de la lipase pancréatique en présence de protéines	145
3.1.4. Conclusion	146
3.2. La lipase stimulée par les sels biliaires	147
3.2.1. Mise au point des conditions expérimentales	147
3.2.2. Étude de l'effet du type de phospholipide sur l'activité de la lipase stimulée par les sels biliaires	151
3.2.3. Étude de l'effet du type de phospholipide sur l'activité de la lipase stimulée par les sels biliaires en présence de protéines	153
3.2.4. Étude de différents variants de la lipase stimulée par les sels biliaires	154
3.2.5. Conclusion	159
<b>4. Étude de l'effet du type de phospholipide sur l'absorption intestinale des produits de lipolyse (étude sur modèle cellulaire)</b>	<b>160</b>
4.1. Caractérisation des particules utilisées	160
4.2. Mesure de l'absorption intestinale des produits de lipolyse	161
<b>DISCUSSION</b>	<b>163</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</b>	<b>174</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>175</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>199</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Pour les abréviations désignant les **émulsions** utilisées dans l'ensemble de ces travaux, se reporter au **Tableau 4**.

<b>AA :</b>	Acide arachidonique	<b>L-FABP :</b>	Protéine hépatique de transport des acides gras
<b>AG :</b>	Acide(s) gras	<b>LGH :</b>	Lipase gastrique humaine
<b>AGCL :</b>	Acide(s) gras à chaîne longue	<b>LPA :</b>	Acide lysophosphatidique
<b>AGE :</b>	Acide(s) gras essentiel(s)	<b>LPC :</b>	Lysophosphatidylcholine
<b>AGL :</b>	Acide(s) gras libre(s)	<b>LPE :</b>	Lysophosphatidyléthanolamine
<b>ALA :</b>	Acide alpha-linolénique	<b>LPH :</b>	Lipase pancréatique humaine
<b>AP :</b>	Acide phosphatidique	<b>LPI :</b>	Lysophosphatidylinositol
<b>Apo :</b>	Apoprotéine	<b>LPP :</b>	Lipase pancréatique de porc
<b>AS :</b>	Activité spécifique	<b>LPS :</b>	Lysophosphatidylsérine
<b>BHH :</b>	Bile hépatique humaine	<b>MG :</b>	Monoglycéride(s)
<b>BSA :</b>	Albumine sérique de bœuf	<b>MTP :</b>	Protéine de transfert microsomale
<b>BSSL :</b>	Lipase stimulée par les sels biliaires	<b>N :</b>	Conditions normales
<b>BVP :</b>	Bile vésiculaire de porc	<b>OA :</b>	Acide oléique
<b>CE :</b>	Cholestérol estérifié	<b>PA :</b>	Acide palmitique
<b>CL :</b>	Cholestérol libre	<b>PC :</b>	Phosphatidylcholine
<b>CPG :</b>	Chromatographie en phase gazeuse	<b>PE :</b>	Phosphatidyléthanolamine
<b>DG :</b>	Diglycéride(s)	<b>PI :</b>	Phosphatidylinositol
<b>DHA :</b>	Acide docosahexaénoïque	<b>PL :</b>	Phospholipide(s)
<b>EPA :</b>	Acide éicosapentaénoïque	<b>PS :</b>	Phosphatidylsérine
<b>HDL :</b>	Lipoprotéines de haute densité	<b>SB :</b>	Sels biliaires
<b>I-FABP :</b>	Protéine intestinale de transport des acides gras	<b>SM :</b>	Sphingomyéline
<b>IP :</b>	Conditions d'insuffisant pancréatique	<b>TG :</b>	Triglycéride(s)
<b>J :</b>	Mélange de Jarvenpaa	<b>TO :</b>	Trioléine
<b>LA :</b>	Acide linoléique	<b>VLDL :</b>	Lipoprotéine de très faible densité
<b>LDL :</b>	Lipoprotéine de faible densité		

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 :	Les différentes étapes de la biodisponibilité des nutriments lipidiques	p. 8
Figure 2 :	Représentation schématique d'un globule lipidique	p. 10
Figure 3 :	Représentation en feuillets $\beta$ et hélices $\alpha$ de la lipase gastrique humaine recombinante	p. 18
Figure 4 :	Représentation schématique des processus physico-chimiques impliqués dans l'inhibition de la lipolyse gastrique	p. 22
Figure 5 :	Représentation schématique du complexe ternaire lipase-colipase-micelle de sels biliaires	p. 30
Figure 6 :	Séquence en acides aminés du variant classique de la lipase stimulée par les sels biliaires	p. 34
Figure 7 :	Photographies réalisées à partir de l'observation microscopique de globules lipidiques dans différents laits et préparations pour nourrissons	p. 48
Figure 8 :	Représentation schématique de la formation et de la sécrétion des globules lipidiques du lait	p. 52
Figure 9 :	Représentation schématique d'un globule de lait humain	p. 53
Figure 10 :	Formules des principaux phospholipides	p. 59
Figure 11 :	Schématisation des différentes étapes d'un test de digestion <i>in vitro</i> dans des conditions proches de la physiologie	p. 78
Figure 12 :	Mesure par diffraction laser de la granulométrie d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides	p. 92
Figure 13 :	Mesure par diffraction laser de la granulométrie d'émulsions enrichies avec différents types d'acides gras libres	p. 93
Figure 14 :	Observation microscopique d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides	p. 94
Figure 15 :	Mesure par diffraction laser de la granulométrie d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres	p. 95
Figure 16 :	Pourcentage de trioléine émulsifiée dans des émulsions, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres, après 7 ou 17 jours de conservation à +4°C	p. 96
Figure 17 :	Valeur du potentiel zêta d'échantillons de lait humain et de lait de jument	p. 98
Figure 18 :	Valeur du potentiel zêta d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres	p. 99
Figure 19 :	Valeur du potentiel zêta d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres, en phase gastrique	p. 100
Figure 20 :	Valeur du potentiel zêta d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres, en phase intestinale avec de la bile vésiculaire de porc	p. 101
Figure 21 :	Valeur du potentiel zêta d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres, en phase intestinale avec le mélange de Jarvenpaa	p. 102
Figure 22 :	Rendement de lipolyse gastrique d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides	p. 104
Figure 23 :	Rendements de lipolyse gastrique des émulsions CT, LHO et LPI	p. 106

Figure 24 :	Analyse du profil en protéines de différents sucs gastriques par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 12 %	p. 106
Figure 25 :	Rendements de lipolyse gastrique de l'émulsion CT, obtenus avec différentes sources de lipases gastriques	p. 107
Figure 26 :	Rendements de lipolyse gastrique de l'émulsion LHO, obtenus avec différentes sources de lipases gastriques	p. 107
Figure 27 :	Rendements de lipolyse gastrique de l'émulsion PC P/O, obtenus avec différentes sources de lipases gastriques	p. 108
Figure 28 :	Rendements de lipolyse gastrique de l'émulsion LPI, obtenus avec différentes sources de lipases gastriques	p. 108
Figure 29 :	Effet du type de phospholipide sur le rendements de lipolyse gastrique des émulsions PC P/O et LPI en présence de lactose et de protéines de lait	p. 110
Figure 30 :	Effet de l'ajout de différents acides gras libres sur le rendement de lipolyse gastrique de l'émulsion CT	p. 112
Figure 31 :	Effet de la présence de protéines liant les acides gras dans le milieu réactionnel sur le rendement de lipolyse gastrique des émulsions CT, PC P/O et LHO	p. 114
Figure 32 :	Effet de la présence de protéines liant les acides gras dans le milieu réactionnel sur le rendement de lipolyse gastrique de l'émulsion LHO	p. 114
Figure 33 :	Effet du diamètre moyen des globules lipidiques des émulsions PC P/O et LPCO sur leur rendement de lipolyse gastrique	p. 116
Figure 34 :	Régression linéaire entre le rendement de lipolyse gastrique des émulsions et le diamètre moyen de leurs globules	p. 117
Figure 35 :	Effet de la composition des émulsions lipidiques sur la relation entre leur rendement de lipolyse gastrique et leur granulométrie	p. 118
Figure 36 :	Régression linéaire entre le rendement de lipolyse gastrique des émulsions et leur potentiel électrocinétique	p. 119
Figure 37 :	Relation entre le rendement de lipolyse gastrique des émulsions LPI, LPS et LHO et leur potentiel électrocinétique	p. 119
Figure 38 :	Relation entre le rendement de lipolyse gastrique des émulsions PC P/O et LPI et leur potentiel électrocinétique, lors de l'ajout de lactose et de protéines de lait avant ou après la sonication	p. 120
Figure 39 :	Isothermes de compression de la trioléine et de différents phospholipides	p. 122
Figure 40 :	Compressibilité de différents lipides. Focalisation aux pressions physiologiques entre 20 et 35 mN/m	p. 124
Figure 41 :	Liaison de la lipase gastrique humaine purifiée sur des liposomes préparés avec différents types de phospholipides	p. 126
Figure 42 :	Relation entre l'amélioration du rendement de lipolyse gastrique par LPI et l'état de dégradation de l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique purifiée	p. 127
Figure 43 :	Relation entre l'amélioration du rendement de lipolyse gastrique par l'acide linoléique (LA) et l'état de dégradation de l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique purifiée	p. 128
Figure 44 :	Analyse du suc gastrique AR T3 par spectrométrie de masse (ionisation positive et mode réflectron) après digestion enzymatique à la trypsine	p. 129
Figure 45 :	Analyse du suc gastrique AR T3 par spectrométrie de masse (ionisation positive et mode linéaire) après digestion chimique au bromure de cyanogène	p. 130
Figure 46 :	Analyses des sucs gastriques BAK T3 et GM PG3 par spectrométrie de masse (ionisation positive et mode linéaire) après digestion chimique au bromure de cyanogène	p. 131

Figure 47 :	Relation entre l'amélioration du rendement de lipolyse gastrique par LPI et l'état de dégradation de l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique de certains sucs	p. 132
Figure 48 :	Rendements de lipolyse gastrique d'émulsions de trioléine stabilisées par différents types de lysophospholipides	p. 133
Figure 49 :	Effet des formes phospholipides ou lysophospholipides des différentes espèces	p. 134
Figure 50 :	Effet de la présence d'inositol, apporté sous forme de LPI, sur le rendement de lipolyse gastrique de l'émulsion LHO	p. 135
Figure 51 :	Cinétique d'hydrolyse des émulsions LPCO, LPI et LPE par les sucs gastriques BAK et FP	p. 136
Figure 52 :	Effet du temps d'incubation sur le rendement de lipolyse intestinale de l'émulsion PC P/O	p. 139
Figure 53 :	Effet du pH sur le rendement de lipolyse intestinale de l'émulsion PC P/O	p. 140
Figure 54 :	Rendement de lipolyse intestinale d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides	p. 141
Figure 55 :	Comparaison des rendements de lipolyse intestinale des émulsions PC P/O et LPI dans les conditions d'insuffisance pancréatique	p. 143
Figure 56 :	Rendement de lipolyse intestinale d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, après 60 minutes de lipolyse gastrique	p. 144
Figure 57 :	Rendement de lipolyse intestinale d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, en présence de lactose et de protéines de lait	p. 146
Figure 58 :	Effet de la nature et de la concentration en sels biliaires sur le rendement de lipolyse intestinale des émulsions PC P/O et LPI par la lipase stimulée par les sels biliaires	p. 148
Figure 59 :	Effet de la nature et de la concentration en sels biliaires sur le rendement de lipolyse intestinale des émulsions PC P/O et LPI par la lipase stimulée par les sels biliaires	p. 149
Figure 60 :	Effet du temps d'incubation sur le rendement de lipolyse intestinale par la lipase stimulée par les sels biliaires	p. 150
Figure 61 :	Effet du pH sur le rendement de lipolyse intestinale de l'émulsion LPI par la lipase stimulée par les sels biliaires en présence de bile vésiculaire de porc	p. 151
Figure 62 :	Rendement de lipolyse intestinale d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, par la lipase stimulée par les sels biliaires	p. 152
Figure 63 :	Rendement de lipolyse intestinale d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, par la lipase stimulée par les sels biliaires en présence de lactose et de protéines de lait	p. 153
Figure 64 :	Activité spécifique de différents échantillons de lipase stimulée par les sels biliaires dans des conditions biochimiques, sur substrat à chaîne courte et sur substrat à chaîne longue	p. 155
Figure 65 :	Rendement de lipolyse intestinale des émulsions PC P/O et LPI par différents échantillons de lipase stimulée par les sels biliaires	p. 156
Figure 66 :	Analyse de l'échantillon de BSSL 2 par spectrométrie de masse (ionisation positive et mode réflectron) après digestion enzymatique à la trypsine	p. 157
Figure 67 :	Analyse de l'échantillon de BSSL 1 par spectrométrie de masse (ionisation positive et mode réflectron) après digestion enzymatique à la trypsine	p. 158
Figure 68 :	Absorption cellulaire d'acide oléique (OA) apporté sous forme de liposomes par des cellules Caco-2	p. 161

Tableau 1 : Activité de la lipase gastrique humaine, mesurée à partir de différentes sources et dans différentes conditions de dosage	p. 17
Tableau 2 : Activité spécifique de la lipase stimulée par les sels biliaires, mesurée sur différents substrats	p. 32
Tableau 3 : Diamètre des globules lipidiques dans différents laits, substituts de lait et mélanges destinés à la Nutrition Entérale	p. 49
Tableau 4 : Composition spécifique des différentes émulsions lipidiques préparées	p. 67
Tableau 5 : Séquence, nombre d'acides aminés et masse du peptide N-terminal de la lipase gastrique et de ses différentes formes dégradées, obtenus après digestion chimique au bromure de cyanogène	p. 85
Tableau 6 : Rendements de lipolyse gastrique de l'émulsion LPI avec le suc gastrique GM PG1, en présence de lactose et de différentes sources de protéines de lait	p. 109
Tableau 7 : Rendements de lipolyse gastrique (%) des émulsions PC P/O et LPI avec le suc gastrique GM PG1. Effet de l'ajout du lactose et des protéines de lait après ou avant la mise en émulsion par sonication	p. 111
Tableau 8 : Caractérisation des liposomes utilisés pour mesurer les interactions entre les phospholipides et la lipase gastrique humaine	p. 125
Tableau 9 : Effet de la présence d'inositol libre, ajouté dans le tampon de lipolyse, sur le rendement de lipolyse gastrique (%) des émulsions PC P/O et LPI	p. 135
Tableau 10 : Effet de la nature et de la concentration en sels biliaires sur le rendement de lipolyse intestinale (%) de l'émulsion PC P/O	p. 138
Tableau 11 : Caractérisation des particules utilisées pour l'étude d'absorption intestinale des produits de lipolyse sur modèle cellulaire Caco-2	p. 160

## **AVANT-PROPOS**

En plus des protéines et des glucides, la ration alimentaire occidentale apporte quotidiennement 90 à 150 g de lipides, auxquels sont associées des vitamines liposolubles A, D, E et K. Ils sont répartis sous forme de triglycérides (97 à 98 %), de phospholipides (2 à 3 %) et de cholestérol libre et estérifié. Les triglycérides, notamment à chaînes longues, représentent ainsi la forme principale des lipides de l'alimentation humaine, dont ils constituent une part importante de l'apport énergétique. Ils sont de plus les vecteurs majoritaires des acides gras, notamment essentiels, qui jouent un rôle primordial dans de nombreuses fonctions de l'organisme, en particulier dans le développement et la physiologie de la rétine, du cerveau et du système nerveux, dans la mise en jeu du système immunitaire et de la réponse inflammatoire, et dans la physiologie de l'épiderme.

La biodisponibilité des nutriments lipidiques (acides gras, mais aussi monoglycérides, lysophospholipides, cholestérol), y compris des vitamines liposolubles, dépend d'un processus complexe comportant quatre étapes-clé : 1) l'émulsification des lipides alimentaires dans l'estomac, 2) l'hydrolyse enzymatique des lipides émulsifiés, catalysée principalement par la lipase gastrique dans l'estomac et les enzymes pancréatiques dans l'intestin (système lipase/colipase, carboxyl-ester hydrolase, phospholipase A2 sécrétée), 3) l'absorption des produits de lipolyse par les entérocytes à partir de structures permettant de les solubiliser (micelles mixtes de sels biliaires et vésicules de phospholipides), et 4) le transport des différents nutriments lipidiques vers les différentes cellules utilisatrices de l'organisme via le sang sous forme de lipoprotéines.

Ces différentes étapes physico-chimiques et enzymatiques permettent, malgré leur complexité, une absorption très efficace de 96 à 98 % des triglycérides ingérés chez le sujet sain. En revanche, ce processus se trouve altéré dans certains états physiologiques particuliers (chez le nouveau-né et chez la personne âgée) et dans diverses pathologies atteignant le tractus digestif (mucoviscidose, pancréatite chronique, cholestase, maladie de Crohn, syndrome de l'intestin court), ce qui réduit considérablement la biodisponibilité des nutriments lipidiques chez ces sujets. Cette réduction entraîne notamment une déficience en acides gras essentiels, pouvant engendrer, dans le cas des acides gras de la famille oméga 3 de nombreuses pathologies (cancers digestifs, de la prostate et du sein, maladies cardiovasculaires, dysfonctions des systèmes nerveux et immunitaires, eczéma, alopecie). La mise en place de stratégies pouvant permettre d'augmenter la biodisponibilité des nutriments

lipidiques représente ainsi un challenge important dans les domaines de la Recherche Fondamentale et Appliquée, et constitue l'objectif de ma thèse.

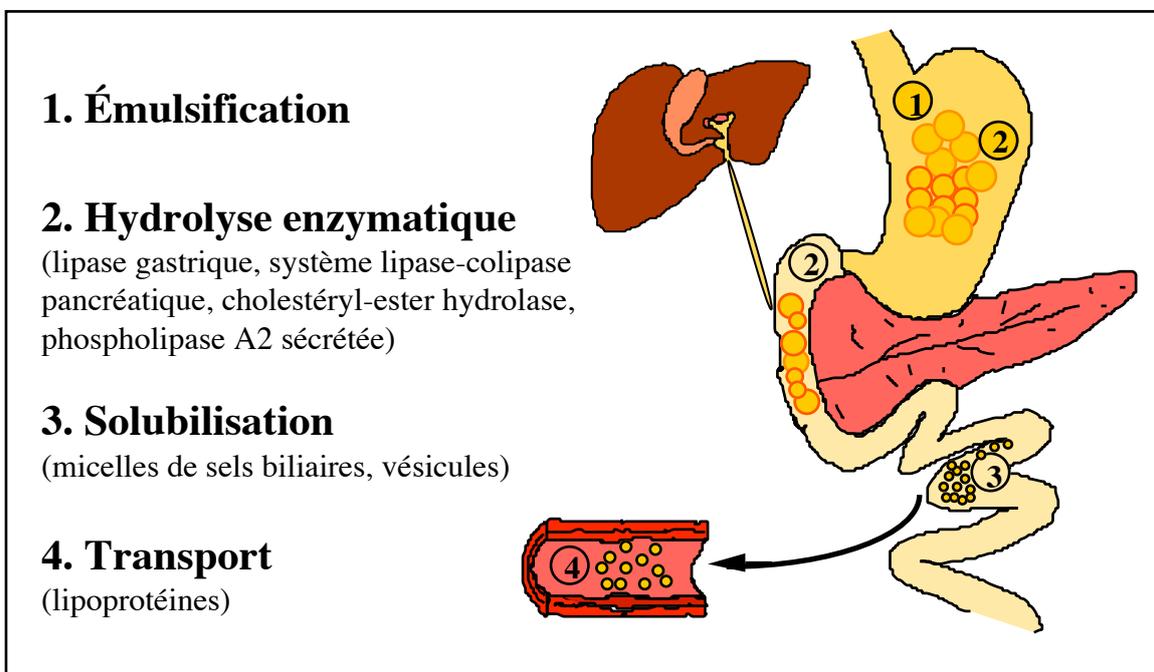
L'introduction bibliographique exposera, dans une première partie, les quatre étapes clés impliquées dans la biodisponibilité des nutriments lipidiques. La seconde étape de ce processus, c'est-à-dire l'hydrolyse enzymatique des lipides, y sera plus particulièrement développée, et décrira de façon plus détaillée la lipase gastrique humaine et le rôle spécifique de la lipolyse gastrique dans la digestion et l'absorption des lipides. La seconde partie de l'introduction bibliographique présentera ensuite les acides gras essentiels, leurs rôles, et les principales situations physiologiques et pathologiques responsables de l'altération de leur biodisponibilité. Nous verrons enfin dans une troisième partie, les stratégies utilisables pour améliorer la biodisponibilité des nutriments lipidiques, basées en particulier sur les propriétés physico-chimiques des lipides, comme la taille et la structure des globules constitutifs des émulsions lipidiques, et les propriétés des molécules qui composent ces globules. Un large éventail de techniques a été mis en œuvre pour réaliser ce travail de thèse : lipidomique, enzymologie, protéomique, culture cellulaire. Elles seront décrites, avant de poursuivre avec l'exposé et la discussion des différents résultats originaux obtenus.

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## 1. Les différentes étapes impliquées dans la biodisponibilité des nutriments lipidiques

Il ne faut pas moins de quatre étapes successives pour permettre la biodisponibilité des lipides alimentaires (Figure 1).

**Figure 1:** Les différentes étapes de la biodisponibilité des nutriments lipidiques (Armand, *Cah Nutr Diét*, 1998, 33, 305-311).



### 1.1. L'émulsification des lipides alimentaires

Cette première étape correspond à la dispersion des lipides alimentaires, insolubles dans l'eau, sous forme de gouttelettes lipidiques dans le milieu digestif aqueux. Ce phénomène crée une interface lipides/eau qui permettra l'action ultérieure des enzymes digestives (Brockman, 1984).

#### 1.1.1. Le comportement des lipides en solution aqueuse

Les lipides représentent un groupe hétérogène d'esters d'acides gras et d'alcools, insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques. Ils sont plus ou moins polaires, ce qui permet de les classer en fonction de leur comportement caractéristique en présence d'une phase aqueuse (Carey et Small, 1970) en:

- **Lipides non polaires**: ils ne se dispersent pas dans l'eau et ne s'étalent pas non plus à la surface pour former une monocouche; ce sont principalement les hydrocarbures et certains esters de cholestérol (cholestéryl-oléate, cholestéryl-linoléate);

- et **lipides polaires**

de classe I: ils ne se dispersent pas dans l'eau, mais forment une monocouche de surface stable, dans laquelle les groupements polaires des lipides sont orientés vers la phase aqueuse; ce sont principalement les triglycérides, les diglycérides, les acides gras à chaîne longue protonés, le cholestérol et les vitamines liposolubles;

de classe II: ils constituent une monocouche de surface stable et se dispersent dans l'eau pure sous forme de cristaux liquides, ces structures lamellaires de bicouches lipidiques, dans lesquelles les groupements polaires sont dirigés vers la phase aqueuse, tandis que les structures hydrocarbonées hydrophobes sont tournées les unes vers les autres; ce sont principalement les phospholipides et les monoglycérides;

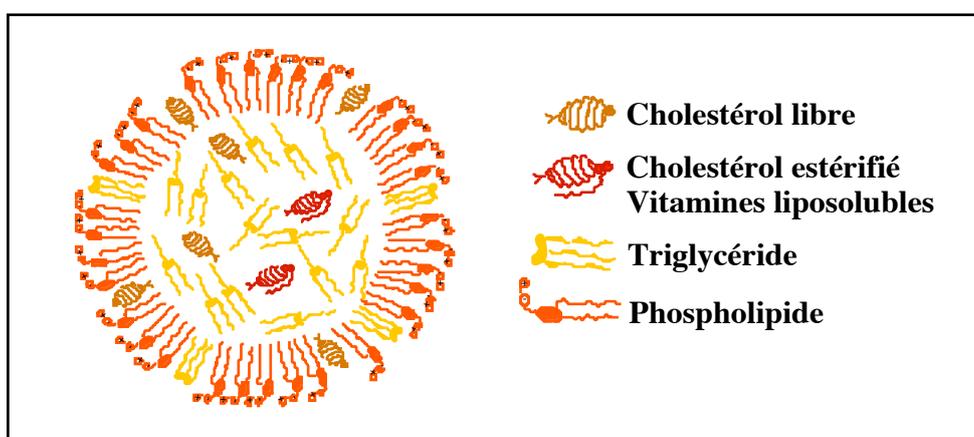
et de classe III: ils constituent une monocouche de surface instable et se dispersent dans l'eau pure sous forme de monomères ou de micelles, lorsque leur concentration dans la phase aqueuse dépasse leur concentration micellaire critique; ce sont principalement les sels biliaires, les acides gras ionisés et les lysophospholipides.

### **1.1.2. L'organisation des lipides alimentaires dans l'estomac**

Les lipides alimentaires sont pratiquement tous des lipides polaires, de classe I principalement (les triglycérides, le cholestérol et les vitamines liposolubles), et de classe II (les phospholipides). Ils sont dispersés dans le milieu aqueux gastrique sous l'action conjuguée de forces mécaniques et de substances aux propriétés émulsifiantes. Les contractions de l'estomac, qui propulsent le contenu gastrique de l'antrum vers le pylore, assurent une dispersion efficace des lipides (Malagelada et Azpiroz, 1989). Cette dispersion peut être renforcée par la présence de substances émulsifiantes et/ou stabilisatrices de l'émulsion, comme les phospholipides, à un rapport molaire favorable triglycérides/phospholipides dans l'alimentation courante de 40/1 (Mansbach *et al.*, 1975), les polysaccharides complexes, également apportés par l'alimentation (Carey *et al.*, 1983), les produits de la lipolyse gastrique (les lysophospholipides, les monoglycérides et les acides gras libres) (Armand *et al.*, 1996a), ainsi que les peptides amphipathiques issus de la digestion des protéines par la pepsine (DiPalma *et al.*, 1991). Grâce à ces différents facteurs, les lipides alimentaires sont organisés dans l'estomac sous la forme de gouttelettes ou globules lipidiques, mesurant environ 20 à 40 µm de diamètre (Armand *et al.*, 1994). Ils sont constitués

d'un cœur hydrophobe, renfermant la majorité des triglycérides (95 à 98 % des triglycérides totaux), la majorité du cholestérol estérifié (au moins 97 % des esters de cholestérol totaux) et les vitamines liposolubles. Ce cœur est stabilisé par une monocouche de surface constituée essentiellement par les phospholipides et le cholestérol libre, mais aussi par quelques molécules de triglycérides (2 à 5 % des triglycérides totaux) (Miller et Small, 1983, Borel *et al.*, 1996, Hamilton, 1989, Hamilton *et al.*, 1996, Pafumi *et al.*, 2002), avec éventuellement des protéines (Figure 2).

**Figure 2:** Représentation schématique d'un globule lipidique (Armand, *Cah Nutr Diét*, 1998, 33, 305-311).



### 1.1.3. Les conséquences de l'émulsification des lipides

L'hydrolyse des lipides, catalysée par les lipases, a la particularité de se dérouler en milieu hétérogène. En effet, ces enzymes sont solubles dans l'eau, tandis que leur substrat y est insoluble. L'émulsification des lipides alimentaires sous forme de gouttelettes lipidiques crée une interface lipides/eau, qui permet alors aux lipases d'agir sur leur substrat (Sarda et Desnuelle, 1958, Brockerhoff et Jensen, 1974). Elle permet également d'augmenter le rapport surface/volume des molécules lipidiques, ce qui met à disposition des lipases une concentration plus importante de substrat, exprimée, non plus en masse de lipides par unité de volume, mais en surface d'interface lipidique par unité de volume (Benzonana et Desnuelle, 1965). L'émulsification des lipides est donc bien la première étape indispensable de leur biodisponibilité. Ce processus se déroule exclusivement dans l'estomac et ne se poursuit pas dans le duodénum (Armand *et al.*, 1996a, Armand *et al.*, 1999), ce qui le rend primordial non seulement pour la lipolyse gastrique, mais aussi pour la lipolyse duodénale.

## **1.2. La digestion des triglycérides**

La seconde étape de la biodisponibilité des lipides alimentaires est leur hydrolyse par des enzymes digestives spécifiques. Chez l'homme, la digestion des triglycérides est un phénomène séquentiel complexe, qui débute dans l'estomac, sous l'action de la lipase gastrique, et se termine dans le duodénum, sous l'action du système lipase/colipase pancréatique et, dans le cas particulier des nouveau-nés allaités, sous l'action conjointe de la lipase stimulée par les sels biliaires, contenue dans le lait maternel. La digestion des autres lipides, phospholipides et esters de cholestérol et de vitamines, se déroule entièrement dans le duodénum, sous l'action, respective, de la phospholipase A2 sécrétée, en présence de calcium et d'un rapport molaire optimal sels biliaires/phospholipides de 2/1, et de la cholestérol estérase, en présence de sels biliaires trihydroxylés (Tso, 1994). Mon exposé sera focalisé sur la digestion des triglycérides, qui nous intéresse ici plus particulièrement, et donc sur les trois lipases impliquées dans ce processus, en insistant sur la présentation de la lipase gastrique, dont l'existence puis l'importance dans la digestion des triglycérides ont été beaucoup discutées dans la littérature.

### **1.2.1. La lipase gastrique**

La lipase gastrique est une lipase préduodénale, comme la lipase linguale et l'estérase prégastrique. Ces enzymes agissent dans l'estomac, ce qui leur vaut des caractéristiques biochimiques particulières, qui les distinguent des lipases sécrétées par le pancréas dans le duodénum, notamment une grande stabilité aux pH acides et une activité maintenue en présence de protéines et de lécithines (Hamosh, 1990). Les premières observations, relatives à l'absorption et à la digestion des lipides au niveau de l'estomac, ont été réalisées dès la deuxième moitié du 19<sup>ème</sup> siècle. Il a été décrit la présence de lipides dans la muqueuse gastrique de chiens, de chats et de souris après un repas (Kolliker, 1857) et la présence d'acides gras libres dans le contenu gastrique de chiens ayant ingéré un repas test contenant de la graisse de mouton (Marcet, 1858). Une activité lipolytique a également été mesurée au niveau de la muqueuse gastrique et dans le suc gastrique chez le chien (Cash, 1880) et le porc (Volhard, 1900, Volhard, 1901). Malgré ces observations, l'existence de lipases préduodénales, et en particulier d'une véritable lipase gastrique, est restée longtemps controversée, de nombreux chercheurs argumentant qu'il s'agissait d'une contamination duodénale. L'existence réelle de la lipase gastrique n'a ainsi été établie qu'en 1917 (Hull et Keeton), par des études chez le chien (suc gastrique), soit après ligature du pylore, afin de prévenir la régurgitation du contenu duodénal, soit à l'aide de la technique chirurgicale de

Pavlov, qui consiste à isoler une portion d'estomac (estomac "pavlovien"). Chez l'homme, les premiers travaux rapportant une activité lipolytique au niveau de l'estomac ont été réalisés en 1946 (Schonheyder et Volqvartz) à partir de suc gastrique prélevé chez l'enfant et l'adulte. Toutefois, la démonstration, que cette activité était bien le fait d'une véritable lipase gastrique, et n'était pas due à la lipase linguale ou à la lipase pancréatique (reflux duodéno-gastrique) n'est intervenue qu'une quarantaine d'années plus tard, avec les études de Salzman-mann et DeNigris, qui ont mis en évidence la présence de lipase gastrique chez des enfants présentant une atrésie de l'oesophage (interruption de l'oesophage entre la cavité buccale et l'estomac) (Salzman-mann *et al.*, 1982) et dans des glandes gastriques isolées à partir d'estomacs humains (DeNigris *et al.*, 1985). Aujourd'hui, l'existence de la lipase gastrique et son rôle dans la biodisponibilité des lipides ne sont plus contestés.

#### *1.2.1.1. Localisation et sécrétion de la lipase gastrique*

##### Origine tissulaire et distribution cellulaire

L'étude de la localisation et de la sécrétion des lipases préduodénales a commencé à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, par un travail montrant, que, chez le rongeur, toute l'activité lipolytique retrouvée dans l'estomac était due à la présence d'une lipase d'origine linguale (Hamosh et Scow, 1973). Cette observation a ensuite incité les chercheurs à étudier d'autres espèces (Toothill *et al.*, 1976, Nelson *et al.*, 1977, York *et al.*, 1987, Moreau *et al.*, 1988a, DeNigris *et al.*, 1988, Moreau *et al.* 1990, Kirk *et al.*, 1991, Borel *et al.*, 1991, Armand *et al.*, 1992a, Carrière *et al.*, 1992, Descroix-Vagne *et al.*, 1993). Moreau, en particulier, a établi chez onze mammifères, que l'activité des lipases préduodénales est associée principalement à un seul tissu, localisé soit dans la langue (glandes de Von Ebner chez le rat et la souris), soit dans la région pharyngée (mouton, veau), soit dans l'estomac (lapin, cheval, chien, porc, cobaye, babouin et macaque) (Moreau *et al.*, 1988a), d'où les dénominations différentes de lipase linguale, estérase prégastrique et lipase gastrique, respectivement. Ces travaux ont été confirmés et complétés par l'étude parallèle de De Nigris, qui a établi la localisation gastrique de la lipase préduodénale humaine (DeNigris *et al.*, 1988). Chez d'autres espèces que l'homme, la lipase gastrique a été localisée dans le fundus (lapin, cheval, chien, cobaye, babouin, macaque) (Moreau *et al.*, 1988a, Moreau *et al.*, 1990, Borel *et al.*, 1991), le cardia (porc) (Moreau *et al.*, 1988a, Armand *et al.*, 1992a), le fundus et le cardia (lapin, chien) (DeNigris *et al.*, 1988, Kirk *et al.*, 1991), ou dans l'ensemble de l'estomac (cobaye, babouin) (DeNigris *et al.*, 1988). Les différences entre les données rapportées peuvent être imputées aux différentes techniques de prélèvement des tissus. Dans l'estomac humain, la lipase gastrique a été localisée, de façon moins confuse, dans la seule muqueuse fundique (Abrams

*et al.*, 1988, Moreau *et al.*, 1988b), avec une activité plus élevée dans la partie haute de la grande courbure que dans la partie haute de la petite courbure (Abrams *et al.*, 1988). La localisation cellulaire et sub-cellulaire de la lipase gastrique humaine a été déterminée par immunohistochimie (Moreau *et al.*, 1989, Tremblay *et al.*, 1999) : elle est située exclusivement dans les granules de sécrétion des cellules principales situées à la base des glandes fundiques, comme le pepsinogène, et jamais dans les cellules à mucus de la partie supérieure de la glande, comme décrit chez le lapin (Moreau *et al.*, 1990), le chien (Carrière *et al.*, 1992) et le chat (Descroix-Vagne *et al.*, 1993, Knospe et Plendl, 1997).

### Sécrétion

La lipase gastrique humaine est donc sécrétée par les cellules principales de la muqueuse fundique de l'estomac. Des études réalisées chez l'enfant prématuré montrent, qu'elle est détectable à partir de la 26<sup>ème</sup> semaine de grossesse, et que sa sécrétion augmente après la 34<sup>ème</sup> semaine (Hamosh *et al.*, 1978, Hamosh *et al.*, 1981) pour atteindre une concentration proche de celle trouvée chez l'adulte dès la naissance (Fredrikzon et Hernell, 1977). La lipase gastrique est sécrétée sous forme directement active, contrairement à la pepsine, et, dans les conditions physiologiques normales, sa concentration moyenne dans la sécrétion gastrique basale est de 80 à 120 µg/mL (Carrière *et al.*, 1993). Pendant la digestion d'un repas, la quantité totale de lipase gastrique sécrétée est d'environ 20 à 25 mg (Ville *et al.*, 2002), les valeurs rapportées par la littérature étant 21,6 mg, 24,7 mg (Miled *et al.*, 2000) et 22,6 mg (Carrière *et al.*, 1993) pour un repas liquide, et 21,6 mg (Carrière *et al.*, 2000) pour un repas solide. La régulation hormonale de la sécrétion de la lipase gastrique est étudiée depuis la fin des années soixante-dix, et implique principalement quelques médiateurs. La gastrine, et son équivalent synthétique la pentagastrine, augmentent la sécrétion de lipase (quantité d'enzyme et activité lipolytique), mais pas sa concentration dans le suc gastrique (Szafran *et al.*, 1978, Moreau *et al.*, 1988c, Moreau J *et al.*, 1990, Descroix-Vagne *et al.*, 1993, Perret *et al.*, 1993a, Wojdemann *et al.*, 1995, Olsen *et al.*, 1998, Wojdemann *et al.*, 1999). La cholécystokinine (CCK) a une action encore controversée sur la sécrétion de lipase gastrique. Il a été montré, par plusieurs études contradictoires, (1) qu'elle inhibe cette sécrétion: la perfusion intraveineuse d'un antagoniste du récepteur de la CCK (22 µmol/kg/h) augmente la sécrétion de lipase (Borovicka *et al.*, 1997), et une élévation de la concentration plasmatique de CCK (de  $1,2 \pm 0,4$  à  $3,8 \pm 0,9$  pmol/L), obtenue par perfusion intraduodénale de graisses, diminue sa sécrétion (Shiratori *et al.*, 1993, Wojdemann *et al.*, 1999), (2) qu'elle est sans effet (Moreau *et al.*, 1988c), et (3) qu'elle stimule la sécrétion de lipase, comme

décrit à l'aide de glandes gastriques dispersées de lapin (Fink *et al.*, 1985) et d'homme (DeNigris *et al.*, 1985). Cet effet stimulant a été également obtenu avec le carbachol par les mêmes auteurs (Fink *et al.*, 1985, DeNigris *et al.*, 1985), pour la carbamylcholine et l'administration d'un repas chez le lapin (Perret *et al.*, 1993a, Perret *et al.*, 1993b), et pour l'administration d'un repas factice (chewing-gum) chez l'homme (Wojdemann *et al.*, 1998a). La sécrétine, à une concentration post-prandiale, n'influence pas la sécrétion de lipase stimulée par la gastrine (Olsen *et al.*, 1998). Le Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1), enfin, inhibe la sécrétion gastrique de lipase (Wojdemann *et al.*, 1998b, Wojdemann *et al.*, 1999).

#### *1.2.1.2. Caractéristiques biochimiques et structurales de la lipase gastrique*

##### Stabilité

La lipase gastrique, comme les autres lipases préduodénales, est dite « acide » du fait de sa grande stabilité en milieu acide, mais elle présente aussi une grande stabilité à certains pH basiques. Incubée à 37°C, elle résiste à la dénaturation pour des pH compris entre 2,00 et 8,00 (Hamosh, 1990, Ville *et al.*, 2002). Elle est également résistante à l'action de la pepsine (Wicker-Planquart *et al.*, 1999, Ville *et al.*, 2002), ce qui pourrait être dû à son importante glycosylation (Wicker-Planquart *et al.*, 1999). En revanche, elle est sensible à l'action de la trypsine (Hamosh, 1990), qui s'exerce notamment au niveau des deux sites de clivage Lys-4 et Arg-229 (Aoubala *et al.*, 1994). Lorsqu'elle est limitée, l'hydrolyse trypsique de la lipase gastrique humaine libère le térapeptide N-terminal Leu-Phe-Gly-Lys, très conservé chez différentes espèces (Bernbäck et Bläckberg, 1989). Du fait de cette coupure au niveau du site spécifique Lys 4-Leu 5, la lipase devient incapable de fixer et d'hydrolyser les substrats émulsifiés, comme les triglycérides à chaînes longues (perte de l'activité lipasique sur trioléine), mais conserve son action sur les substrats solubles dans l'eau (maintien de l'activité estérasique sur  $\beta$ -naphthyl acétate). Les trois premiers amino-acides de la séquence, qui sont hydrophobes, mais surtout la lysine en position 4, seraient donc essentiels pour la liaison de l'enzyme à son substrat émulsifié. Des études portant sur la phospholipase A2 sécrétée indiquent, que le groupement  $\alpha$ -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> N-terminal de cette enzyme lui permet, soit d'établir des liaisons hydrogènes avec des atomes internes, ce qui permet de la maintenir dans la conformation appropriée, soit d'interagir avec les charges négatives présentes à la surface de l'interface lipidique, ce qui lui permet directement de se fixer à son substrat (Bernbäck et Bläckberg, 1989). On peut alors envisager, par recoupement avec ces données, que la lysine 4 de la lipase gastrique joue un rôle similaire (Bernbäck et Bläckberg, 1989).

### pH optimum

La lipase gastrique est active dans une large gamme de pH allant de 3,00 à 6,00. Son pH optimum d'action dépend du substrat utilisé pour mesurer son activité et de la présence éventuelle de sels biliaires ou d'albumine (Gargouri *et al.*, 1986a). Sur tributyrine, il est compris entre 4,50 (DeNigris *et al.*, 1985) et 6,00 (avec un abaissement à 5,40 en présence de 6 mM de sels biliaires) (Gargouri *et al.*, 1986a). Sur trioctanoïne, le pH optimum d'action de la lipase gastrique est de 6,00 (Cohen *et al.*, 1971). Sur tricapryline, il est de 5,50 (DeNigris *et al.*, 1985). Sur trioléine, il est de 5,30 (Tiruppathi et Balasubramanian, 1982) ou 5,50 (DeNigris *et al.*, 1985) et de toute façon compris entre 3,00 et 5,00 que ce soit chez l'adulte ou le nouveau-né à terme (Hamosh *et al.*, 1981). Sur Intralipid™ (huile de soja émulsifiée par des lécithines d'œuf), il est compris entre 4,50 et 5,50 (Gargouri *et al.*, 1986a). Ces différentes valeurs sont naturellement compatibles avec le pH intragastrique au moment de la digestion. En effet, chez l'adulte, ce pH, très acide à jeun (0,50-2,50), remonte rapidement selon la nature du repas ingéré à pH 4,50-5,80 (James, 1960) voire 6,00-6,50 (Armand *et al.*, 1999) juste après la prise alimentaire et reste à des valeurs allant de 3,50-4,00 (Armand *et al.*, 1994, Armand *et al.*, 1996a) au cours de la digestion. Chez le nouveau-né, le pH intragastrique est compris entre 3,00 et 5,00 juste avant le repas, monte à 5,00-5,50 juste après (Hamosh *et al.*, 1978, Hamosh *et al.*, 1981, Armand *et al.*, 1996b) et conserve ces valeurs pendant trois heures après la prise du repas (Armand *et al.*, 1996b).

### Spécificité de substrat

La lipase gastrique humaine est une triacylglycérol ester hydrolase (EC 3.1.1.3). Elle catalyse donc l'hydrolyse des triglycérides, principalement en acides gras libres et diglycérides, et, dans une moindre proportion, en monoglycérides (Cohen *et al.*, 1971, Fink *et al.*, 1984, Armand *et al.*, 1994). Des études, réalisées *in vivo* sur des globules de lait (Staggers *et al.*, 1981), *in vitro* sur des triglycérides synthétiques (Jensen *et al.*, 1982, Rogalska *et al.*, 1990), ou *in vitro* sur des films monomoléculaires en présence d'inhibiteurs covalents (Cavalier *et al.*, 2000), permettent de convenir que la lipase gastrique humaine hydrolyse préférentiellement la liaison ester en position sn-3. En plus de cette stéréosélectivité, il existe également une spécificité liée à la longueur des chaînes d'acides gras estérifiés sur la molécule de glycérol ; en effet, de nombreux auteurs ont montré, que la lipase gastrique humaine hydrolyse plus rapidement les acides gras à chaîne courte (Cohen *et al.*, 1971, Hamosh *et al.*, 1981, Tiruppathi et Balasubramanian, 1982, Miled *et al.*, 2003). Toutefois, cette spécificité ne semble pas être une propriété intrinsèque de l'enzyme. En effet, si à pH 5-

6, la lipase gastrique humaine purifiée hydrolyse 5 à 10 fois plus vite les triglycérides à chaînes courtes ou moyennes, à pH 3, elle est capable de catalyser à des vitesses comparables l'hydrolyse des triglycérides à chaînes courtes ou à chaînes longues (Gargouri *et al.*, 1986a). Cette « apparente » spécificité vis-à-vis de la longueur des chaînes d'acides gras semble donc être en réalité liée à un phénomène « d'inhibition » dépendant du pH, point qui sera détaillé plus loin.

### Activité

L'activité de la lipase gastrique humaine est très variable, et dépend en particulier des conditions du dosage (nature du substrat, pH), de la source de lipase utilisée (muqueuse gastrique, suc gastrique, lipase purifiée, lipase recombinante) et du sujet considéré (âge, état physiologique, régime alimentaire) (Tableau 1). Mesurée à l'aide de la technique du pH-stationnaire sur tributyrine à pH 5,40-6,00, à partir d'échantillons de suc gastrique prélevés chez des adultes sains en sécrétion basale, l'activité de la lipase gastrique est d'environ 30 à 70 unités par mL (une unité représente une micromole d'acide gras libérée par minute), mais peut varier très largement entre 6 et 239 U/mL (Gargouri *et al.*, 1986a, Moreau *et al.*, 1988b, Moreau *et al.*, 1988c, Carrière *et al.*, 1993, Armand *et al.*, 1994, Armand *et al.*, 1995, Armand *et al.*, 1996a, Wojdemann *et al.*, 1998a, Wojdemann *et al.*, 1999, Armand *et al.*, 1999, Ville *et al.*, 2002). Trois études, réalisées avec le même protocole, mettent en évidence des variations de l'activité de la lipase gastrique suivant le sujet considéré (Armand *et al.*, 1995, Armand *et al.*, 1996b, Armand *et al.*, 2004) : les dosages, effectués sur de la trioléine émulsifiée radiomarquée à pH 5,40, à partir de suc gastrique prélevé en sécrétion basale chez des adultes sains, chez des nouveau-nés prématurés et chez des enfants atteints de mucoviscidose, indiquent des activités respectives de 5,7-9,9 U/mL, 9,1 U/mL et 17-21,9 U/mL. L'activité spécifique de la lipase gastrique, c'est-à-dire son activité exprimée en micromoles d'acide gras libérées par mg d'enzyme, est elle aussi relativement variable. Les valeurs obtenues à l'aide de lipase gastrique purifiée sont comprises entre 540 et 1300 U/mg sur tributyrine à pH 5,40-6,00 (Gargouri *et al.*, 1986a, Moreau *et al.*, 1992, Wicker-Planquart *et al.*, 1999, Carrière *et al.*, 2000, Pafumi *et al.*, 2002), et entre 300 et 600 U/mg sur Intralipid™ à pH 4,50-5,50 (Gargouri *et al.*, 1986a, Wicker-Planquart *et al.*, 1999). Les valeurs obtenues avec de la lipase gastrique recombinante exprimée dans le système Baculovirus/cellules d'insecte varient entre 580 U/mg (Roussel *et al.*, 1999) et 745 U/mg (Wicker-Planquart *et al.*, 1999) sur tributyrine, et restent dans cette fourchette (684 U/mg) sur Intralipid™ (Wicker-Planquart *et al.*, 1999).

**Tableau 1:** Activité de la lipase gastrique humaine, mesurée à partir de différentes sources et dans différentes conditions de dosage <sup>1</sup>.

Source de LGH	Sujet	Activité	Substrat	Référence
Glandes		12,17 ± 0,88 U/mg 4,48 ± 0,64 U/mg 1,18 ± 0,12 U/mg	Tributyryne Tricapryline Trioléine	DeNigris et al., 1985
Muqueuse	Adultes, 23-86 ans	700-4800 U/g TF	Tributyryne	Moreau et al., 1988b
Muqueuse		118 ± 8,8 U/g TS	Trioléine	DeNigris et al., 1988
Muqueuse		1,60 ± 0,14 U/mg	Trioléine	Abrams et al., 1988
Muqueuse	Nouveau-nés, enfants et adultes (3 mois-26 ans)	1,80-5,30 U/mg	Trioléine	DiPalma et al., 1991
Contenu gastrique	Adultes, 22-42 ans	120 U/mL 1200 U/mg	Tributyryne	Carrière et al., 1993
Contenu gastrique	Adultes, 21-22 ans	58,11 ± 6,00 U/mL B 24,40-57,94 U/mL PP	Tributyryne	Armand et al., 1994
Contenu gastrique	Adultes, 19-24 ans	41,11 ± 8,13 U/mL B 11,41-43,91 U/mL PP	Tributyryne	Armand et al., 1996a
Contenu gastrique	Nouveau-nés prématurés	0,0042-0,1400 U/mL	Tripalmitine	Hamosh et al., 1978
Contenu gastrique	Nouveau-nés, 26-41 semaines	0,333-0,558 U/mL	Trioléine	Hamosh et al., 1981
Contenu gastrique	Nouveau-nés prématurés, 24-34 semaines	8,28-10,25 U/mL B 2,05 -5,38 U/mL PP	Trioléine	Armand et al., 1996b
Contenu gastrique	Enfants mucoviscidiques, 2-14 ans	16,05-19,47 U/mL B 3,88-21,45 U/mL PP	Trioléine	Armand et al., 2004
Contenu gastrique	Adultes, 24 ans en moyenne	36,30-64,40 U/mL B 9,98-43,48 U/mL PP	Tributyryne	Armand et al., 1999
Suc gastrique	Adultes, 25-71 ans	63-75 U/mL B 80-112 U/mL PG	Tributyryne	Moreau et al., 1988c
	Enfants, 10-144 mois	68 ± 12 U/mL B		
	Adultes souffrant d'UD, 26-76 ans	60 ± 7 U/mL B 79 ± 12 U/mL PG		
	Adultes souffrant de PCC, 16-72 ans	52 ± 13 U/mL B 76 ± 9 U/mL PG		
	Enfants mucoviscidiques, 1-30 mois	30 ± 6 U/mL B		
Suc gastrique	Adultes, 20-25 ans	28,4- 25,9 U/mL	Tributyryne	Wojdemann et al., 1998a
Suc gastrique	Adultes, 22-28 ans	12,4 ± 4,9 U/mL	Tributyryne	Wojdemann et al., 1999
Suc gastrique		50-239 U/mL B 17-240 U/mL PG	Tributyryne	Ville et al., 2002
Suc gastrique	Adultes, 21-41 ans	5,67-9,89 U/mL B 5,16-7,51 U/mL PG	Trioléine	Armand et al., 1995
Suc gastrique	Adultes souffrant d'ulcère ou d'atrophie gastrique	50-70 U/mL 540-1160 U/mg	Tributyryne	Gargouri et al., 1986a
Lipase purifiée		50-70 U/mL	Intralipide	
Suc gastrique		300-600 U/mg		
Lipase purifiée		1300 U/mg	Tributyryne	Carrière et al., 2000
Suc gastrique		32 U/mg	Repas liquide	
Lipase purifiée		34 U/mg		
Suc gastrique		33 U/mg	Repas solide	
Lipase purifiée		32 U/mg		
Lipase purifiée		400 U/mg 45 U/mg	Tributyryne Trioléine	Tiruppathi et Balasubramanian, 1982
Lipase purifiée		1200 U/mg	Tributyryne	Moreau et al., 1992
Lipase purifiée		1080 U/mg 365 U/mg	Tributyryne Intralipide	Wicker-Planquart et al., 1999
Lipase recombinante		745 U/mg 684 U/mg	Tributyryne Intralipide	
Lipase purifiée	Adultes	910 U/mg	Tributyryne	Pafumi et al., 2002
Lipase recombinante		580 U/mg	Tributyryne	Roussel et al., 1999

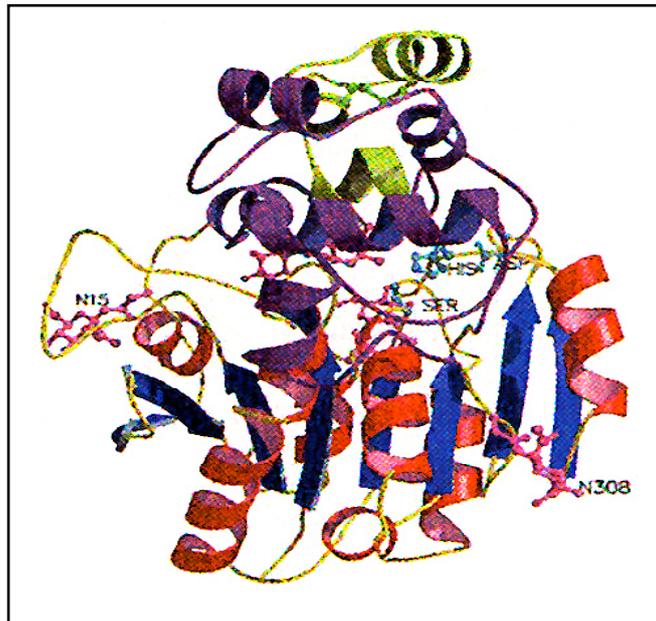
Abréviations: LGH, lipase gastrique humaine; TF, tissu frais; TS, tissu séché; PP, contenu gastrique prélevé en post-prandial; B, suc gastrique collecté dans les conditions basales; PG, suc gastrique collecté sous stimulation à la pentagastrine; UD, ulcères duodénaux; PCC, pancréatite chronique alcoolique. <sup>1</sup> Consulter le tableau 1bis en annexe pour plus de précisions.

La lipase gastrique recombinante produite dans la levure a une activité spécifique de 1450 U/mg sur tributyrine à pH 6,00 et de 1110 U/mg sur émulsion d'huile d'olive à pH 5,20 (Crabbe *et al.*, 1996). La présence d'albumine sérique bovine (10 $\mu$ M) ou de sels biliaires (6 mM) peut être responsable d'écarts d'activité de l'ordre de 25 % (Gargouri *et al.*, 1986a). L'utilisation d'un substrat beaucoup plus physiologique (repas « normal » solide ou liquide) diminue l'activité spécifique de la lipase gastrique à 32-34 U/mg (Carrière *et al.*, 2000).

#### Masse, point isoélectrique et structure

La masse de la lipase gastrique humaine native, purifiée à partir de suc gastrique prélevé chez l'adulte (Cohen *et al.*, 1971, Tiruppathi et Balasubramanian, 1982, Moreau *et al.*, 1992) ou chez le nouveau-né prématuré (Hamosh *et al.*, 1981) varie de 44 à 50 kDa selon les auteurs. La forme recombinante, moins glycosylée (production dans des levures ou des cellules d'insecte) varie de 40 à 43 kDa (Bodmer *et al.*, 1987, Roussel *et al.*, 1999).

**Figure 3:** Représentation en feuillets  $\beta$  et hélices  $\alpha$  de la lipase gastrique humaine recombinante (Roussel *et al.*, *J Biol Chem*, 1999, 274, 16995-17002).



Des techniques de déglycosylation enzymatique ont permis d'estimer sa partie polysaccharidique, importante, à 12-15 % de la masse totale de la protéine (Moreau *et al.*, 1992). Quatre isoformes de la lipase gastrique ont été obtenues par isoélectrofocalisation. Leurs points isoélectriques varient de 6,8 à 7,8, et deux d'entre elles, aux points isoélectriques 7,4 et 7,2, ont été purifiées (Moreau *et al.*, 1992). La lipase gastrique humaine est une protéine globulaire constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 379 acides aminés (Bodmer *et al.*,

1987, Roussel *et al.*, 1999). Plusieurs essais de cristallisation de sa forme native purifiée se sont avérés infructueux (Moreau *et al.*, 1992). Sa structure tridimensionnelle a donc été observée grâce à un cristal obtenu à partir de sa forme recombinante (Roussel *et al.*, 1999) (figure 3). Elle montre, que le domaine principal de la lipase gastrique, situé entre les résidus 9 à 183 et 309 à 379, contient une structure centrale de 8 feuillets  $\beta$ , entourée de 6 hélices  $\alpha$ , qui permet de la classer dans la famille des hydrolases à structure  $\alpha/\beta$ . Les amino-acides 184 à 308 constituent un domaine « coiffant » le domaine principal ; cette zone complexe, appelée « couvercle », est composée de huit hélices  $\alpha$  et d'enroulements non organisés (Roussel *et al.*, 1999). La lipase gastrique possède trois résidus cystéine, dont deux (en positions 227 et 236) sont impliqués dans un pont disulfure (Roussel *et al.*, 1999). Elle possède également quatre sites de glycosylation au niveau des résidus asparagine en positions 15, 80, 252 et 308 (Bodmer *et al.*, 1987). Le rôle de la N-glycosylation de la lipase gastrique n'est pas réellement connu, mais plusieurs hypothèses ont pu être émises à partir de l'utilisation de lipases gastriques recombinantes, exprimées dans le système Baculovirus/cellules d'insecte. Une étude montre, par exemple, que les contacts étroits entre les chaînes glycanes portées par les asparagines 80 et 252, localisées respectivement dans le domaine principal et dans le « couvercle » de la lipase gastrique, renforcent les interactions entre ces deux domaines de l'enzyme (Roussel *et al.*, 1999) ; il s'agit d'ailleurs des deux sites de N-glycosylation parfaitement conservés chez les autres membres de la famille des lipases acides (Wicker-Planquart *et al.*, 1999). L'introduction de mutations au niveau des sites de N-glycosylation de la lipase gastrique recombinante, montre d'autre part, que l'absence de N-glycosylation en position 308, ainsi que l'absence totale de N-glycosylation, entraînent une diminution de l'activité de la lipase gastrique d'environ 50 % sur substrat à chaîne courte ou longue (Wicker-Planquart *et al.*, 1999). Ces mêmes travaux mettent en évidence, que la déglycosylation complète de la lipase gastrique ne modifie pas son adsorption interfaciale, mais abaisse fortement sa biosynthèse et sa sécrétion (Wicker-Planquart *et al.*, 1999). L'étude de recombinants de lipase gastrique produits dans des feuilles de tabac semble indiquer de plus, que la nature des résidus glycanes associés aux différents sites de N-glycosylation serait liée au devenir cellulaire (stockage ou sécrétion) de la lipase gastrique (Mokrzycki-Issartel *et al.*, 2003).

#### Structure du gène codant pour la lipase gastrique

La famille des lipases acides comprend notamment la lipase gastrique humaine, la lipase linguale de rat et la lipase lysosomale acide humaine (Lohse *et al.*, 1997a). Le degré

d'homologie de la séquence protéique entre la lipase gastrique et les deux autres lipases est très élevé, 76 % avec la lipase linguale de rat (Docherty *et al.*, 1985) et 58 % avec la lipase lysosomale acide humaine (Anderson et Sando, 1991), et cette grande similarité se retrouve également au niveau génétique (Lohse *et al.*, 1997a). En effet, si les gènes de ces trois lipases acides sont de tailles différentes à cause de la longueur de leurs introns (14 kb, 18,7 kb et 38,8 kb respectivement pour la lipase gastrique, la lipase linguale et la lipase lysosomale), ils présentent des structures très proches (10 exons séparés par 9 introns). La longueur des exons et la phase des introns sont identiques sur les gènes de la lipase gastrique et de la lipase linguale, et la structure du gène de la lipase lysosomale ne diffère que par la position du premier intron. Cette conservation précise de la structure des introns et des exons, et la similarité dans les séquences codantes, indique, que les gènes des lipases gastrique, linguale et lysosomale proviennent très probablement de la duplication d'un gène ancestral commun (gène de la famille des lipases acides), différent de celui à l'origine des gènes codant pour la lipase pancréatique, la lipoprotéine lipase et la lipase hépatique humaines, qui forment une autre famille de lipases (Lohse *et al.*, 1997a). L'identité complète dans l'organisation des gènes codant pour la lipase gastrique humaine et la lipase linguale de rat confirme, que la lipase linguale de rat est en fait « la lipase gastrique du rat » produite par les glandes séreuses de Von Ebner de la langue (Lohse *et al.*, 1997a). Comme le reste du génome, la séquence du gène codant pour la lipase gastrique (LIPF), localisé sur le chromosome 10 (NCBI), peut subir des mutations conservatrices, portant sur une seule base. Ces mutations ponctuelles isolées constituent un polymorphisme nucléotidique ou SNP (pour Single Nucleotide Polymorphism, c'est-à-dire un polymorphisme d'un seul nucléotide). Très peu d'informations sont actuellement disponibles au sujet du polymorphisme génétique de la lipase gastrique, mais la banque de données NCBI fait état de l'existence de trois mutations non conservatrices au niveau des exons, en positions 161 (Thr/Ala), 224 (Phe/Ile) et 348 (Pro/Thr).

### 1.2.1.3. Mécanisme catalytique de la lipase gastrique

#### Une enzyme à sérine

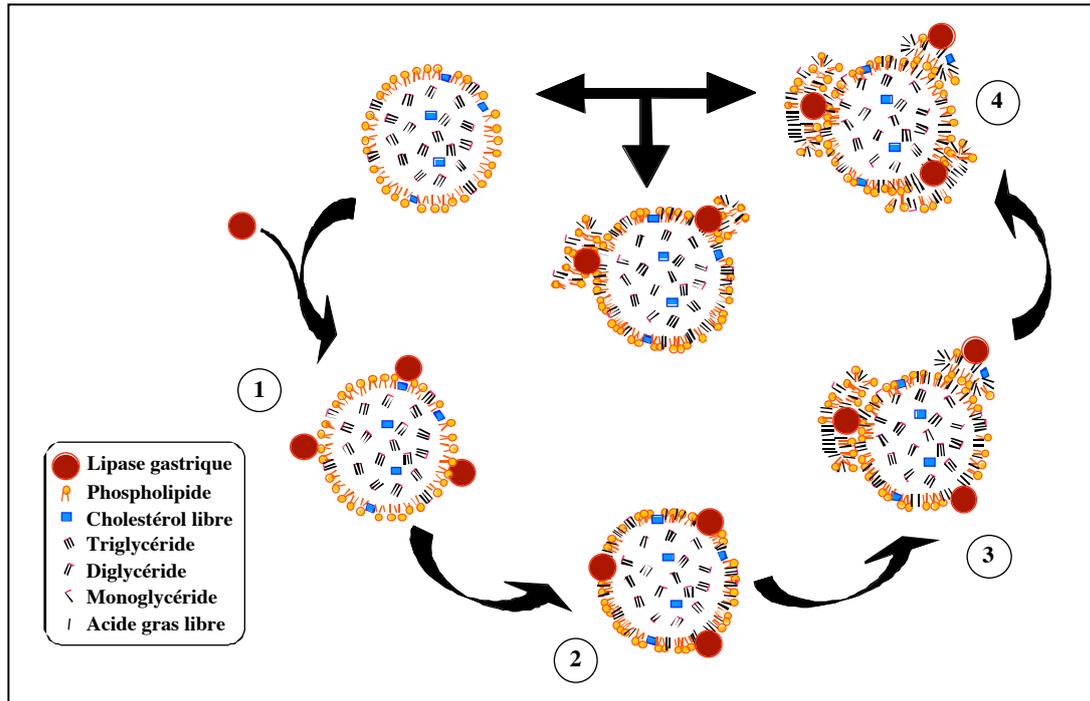
La lipase gastrique humaine possède les éléments classiques des enzymes hydrolytiques à sérine. On trouve ainsi en position 153, au sein de la séquence consensus G-X-S-X-G, la sérine nucléophile de la triade catalytique, dont les autres membres sont l'histidine 353 et l'acide aspartique 324. L'enzyme possède également le trou oxyanion, dont les liaisons hydrogènes stabilisatrices impliquent les groupements NH- de la glutamine 154 et de la leucine 67 (Roussel *et al.*, 1999, Miled *et al.*, 2000). La surface de l'enzyme présente, notamment au niveau de la triade catalytique, plusieurs cavités accessibles aux substrats

solubles dans l'eau (activité estérasique) (Miled *et al.*, 2000). En ce qui concerne l'activité lipasique, un vrai site de liaison de l'enzyme à son substrat est nécessaire, et pourrait être constitué par les résidus 215 à 244, qui forment une large surface hydrophobe autour du site catalytique (Miled *et al.*, 2000). L'importance de cette zone, en particulier des acides aminés 228 à 235 (compris entre les deux résidus de cystéine impliqués dans le pont disulfure de l'enzyme), a été démontrée par mutagenèse dirigée. En effet, la suppression de ces résidus, ou leur substitution par des acides aminés moins hydrophobes, entraîne une diminution drastique de l'activité de la lipase gastrique (Lohse *et al.*, 1997b). Ce domaine pourrait ainsi être rapproché de celui de la lipase pancréatique humaine, constitué par les acides aminés 240 à 252, formant un peptide oblique apparemment impliqué dans l'activité de l'enzyme (Thomas *et al.*, 2005). Le site de liaison du substrat et le site catalytique doivent, bien entendu, être accessibles, ce qui pourrait dépendre du déplacement du « couvercle » (résidus 184 à 308), qui les masque (Miled *et al.*, 2000). Les éléments, pour tenter d'expliquer les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité catalytique de la lipase gastrique, ont été obtenus, notamment, par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la sérine catalytique. Le plus puissant de ces inhibiteurs, la lipstatine, a été décrit par une équipe japonaise (Weibel *et al.*, 1987), et sert de précurseur à la synthèse de son dérivé hydrogéné, la tétrahydrolipstatine (Ro 18-0647) (Hadvary *et al.*, 1988), commercialisé sous le nom d'Orlistat pour le traitement de l'obésité (Drent et Van der Veen, 1993).

#### “Inhibition“ physiologique de la lipase gastrique

Dans l'estomac, l'hydrolyse catalysée par la lipase gastrique humaine permet de dégrader 6 à 16 % (Armand *et al.*, 1996a) ou 10 à 36 % (Hamosh 1990, Carrière *et al.*, 1993, Armand *et al.*, 1999) des triglycérides ingérés, et cette grande variabilité semble liée à un phénomène d'inhibition de la lipolyse gastrique par les acides gras libres générés par la lipase (Gargouri *et al.*, 1986a, Borel *et al.*, 1994a). L'effet de ces acides gras libres sur la lipolyse gastrique varie selon la longueur de leur chaîne, et semble être en relation avec leur état d'ionisation dans les conditions du pH gastrique. Ainsi, les acides gras à chaînes longues, libérés au cours de la lipolyse intragastrique, inhibent fortement l'activité de la lipase gastrique humaine en présence d'excès de substrat (Intralipid™) ( 80% d'inhibition pour 2 mM d'acides gras libres), tandis que les acides gras à chaînes courtes formés au cours de l'hydrolyse de la tributyrine, présente en excès, n'entraînent pas d'inhibition à pH 5,40 (Gargouri *et al.*, 1986a). Le facteur limitant de la lipolyse semble être essentiellement l'élimination des acides gras formés à la surface des particules de triglycérides émulsifiés.

**Figure 4:** Représentation schématique des processus physico-chimiques impliqués dans l'inhibition de la lipolyse gastrique (adapté de Pafumi *et al.*, *J Biol Chem*, 2002, 277, 28070-28079).



① La lipase gastrique se fixe sur la surface du globule lipidique. A  $t=0$ , la surface du globule est composée de phospholipides, de cholestérol libre et de quelques molécules de triglycérides. ② La lipolyse commence, générant principalement des acides gras et des diglycérides, ainsi qu'une faible quantité de monoglycérides. Ces produits de lipolyse se répartissent entre la surface et le cœur du globule lipidique en fonction de leurs propriétés physico-chimiques (balance hydrophile/hydrophobe), c'est-à-dire qu'une plus grande proportion d'acides gras et de monoglycéride se localise dans la surface, alors que les diglycérides sont majoritairement dans le cœur. La surface s'enrichit tandis que la lipolyse se poursuit. ③ Au cours du temps, la pression de surface augmente, si bien que les portions de surface enrichies par les acides gras libres en excès se réorganisent en particules périphériques, qui entrappent la lipase gastrique au cours de leur formation. ④ La lipase gastrique entrappée, bien que toujours présente à la surface du globule lipidique, a maintenant un accès diminué aux triglycérides présents dans les régions de la surface dépourvues de particules riches en acides gras libres. Le processus d'inhibition est achevé au bout de 60 minutes parce que la lipase gastrique, même entrappée dans les particules, semble capable de se déplacer sur la surface dépourvue de particules d'un nouveau globule lipidique.

En effet, les acides gras à chaînes longues, avec un  $pK_a$  de 7,8, sont sous forme protonée à pH 4,00-5,50 dans le milieu gastrique ; ils sont donc très hydrophobes et insolubles en phase aqueuse (Carey *et al.*, 1983) et leur transfert de la surface de l'émulsion vers des vésicules de

phospholipides ou vers l'albumine est alors fortement diminué à pH acide (Spooner *et al.*, 1990) ; ces acides gras libres s'accumulent donc en partie dans la couche de surface des émulsions, même sous forme protonée (Pafumi *et al.*, 2002), tandis que les acides gras à chaînes courtes, avec un pKa autour de 4,8, sont beaucoup plus solubles et sont donc capables de quitter plus facilement la surface des gouttelettes lipidiques (Carey *et al.*, 1983). A pH 3, cependant, les acides gras à chaîne courte sont eux aussi protonés et deviennent alors responsables d'un phénomène « d'inhibition » comparable à celui observé à pH 5,40 avec les acides gras à chaîne longue (Gargouri *et al.*, 1986a). Des travaux, réalisés au laboratoire, ont montré, que ce phénomène « d'inhibition » était dépendant de la surface lipidique disponible, c'est-à-dire du degré d'émulsification des lipides (Borel *et al.*, 1994a, Armand *et al.*, 1999, Pafumi *et al.*, 2002). *In vitro* dans des conditions non physiologiques, la lipase gastrique est inhibée à 50 % pour des concentrations d'acides gras libres de 11 à 19  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$  de surface lipidique disponible (Borel *et al.*, 1994a). La lipolyse est complètement bloquée chez le sujet sain (Armand *et al.*, 1999), chez le sujet insuffisant pancréatique (Armand *et al.*, 2004), ou *in vitro* dans des conditions proches de la physiologie (Pafumi *et al.*, 2002), pour une concentration de 121 à 172  $\mu\text{mol}$  d'acides gras libres/ $\text{m}^2$  de surface. Un modèle expliquant les mécanismes physico-chimiques, par lesquels ces acides gras diminuent l'activité de la lipase gastrique humaine, a été proposé (Figure 4) (Pafumi *et al.*, 2002).

#### Effet de différents facteurs non lipidiques et des sels biliaires sur la lipolyse gastrique

Il est bien évident, que, dans les conditions physiologiques, la lipase gastrique et son substrat, les triglycérides, ne sont pas les seules molécules présentes dans l'estomac. On y trouve d'autres lipides, en particulier des acides gras libres et des phospholipides, dont nous verrons l'influence plus loin dans l'exposé bibliographique, mais aussi des fibres, des protéines alimentaires, et des protéines contenues dans le mucus gastrique (notamment l'albumine, capable de fixer les acides gras). Ces différents facteurs peuvent influencer la lipolyse gastrique en modifiant notamment des caractéristiques du milieu, comme la viscosité, ou de l'interface, comme la pression de surface.

L'effet des fibres alimentaires a été étudié de façon beaucoup plus extensive au niveau de l'intestin qu'au niveau de l'estomac. Il semble toutefois, qu'elles inhibent la lipolyse gastrique, les fibres insolubles par le biais d'interactions protéines-protéines entre la lipase et les protéines solubles associées aux fibres (Borel *et al.*, 1989), et les fibres solubles par le biais d'une réduction de l'émulsification des lipides (Pasquier *et al.*, 1996a), quoique ce dernier effet, observé *in vitro* en présence de gomme de guar très visqueuse (46 mPa.s), n'ait pas été retrouvé *in vivo* chez des rats nourris avec différents régimes contenant des quantités

croissantes de fibres solubles, notamment de la gomme de guar (Fillery-Travis *et al.*, 1997). En fait, l'influence des fibres alimentaires sur la digestion des lipides dans l'estomac et les mécanismes mis en jeu ne sont pas clairement établis, notamment parce que la distinction en fibres solubles et insolubles, qui semblait simplificatrice au départ, a en réalité compliqué l'étude de leur impact, en masquant des paramètres plus pertinents, comme la fermentabilité, la viscosité, et la capacité à établir des liaisons (Schneeman, 1999).

Les protéines alimentaires modulent également la lipolyse gastrique. Indirectement d'une part: les peptides issus de leur hydrolyse par la pepsine constituent à la fois de puissants stimulants de la sécrétion de gastrine (en particulier les acides aminés aromatiques, comme la phénylalanine et le tryptophane) (Taylor *et al.*, 1982, Dockray et Gregory, 1989) et d'efficaces substances émulsifiantes et/ou stabilisatrices du substrat émulsifié (DiPalma *et al.*, 1991). Directement d'autre part: certaines protéines alimentaires, comme la  $\beta$ - lactoglobuline et l'ovalbumine, stimulent l'activité de la lipase gastrique, tandis que d'autres, comme la myoglobine et la protéine inhibitrice des lipases du soja, l'inhibent (Gargouri *et al.*, 1986b, Gargouri *et al.*, 1987). Le mode d'action de ces protéines modulatrices n'est pas encore bien établi, toutefois, il semblerait, qu'elles n'interagissent pas directement avec l'enzyme, mais plutôt avec son substrat lipidique (Gargouri *et al.*, 1987). À pH 6,00 et en présence d'un substrat émulsifié, l'effet activateur des protéines alimentaires semble dépendre de leur capacité à établir une pression de surface à l'interface lipides/eau comprise entre 8 et 13 dynes/cm (Gargouri *et al.*, 1986b). À pH 3,00 et en présence d'un film monomoléculaire de dicaprène, il semble, que les protéines activatrices ( $\beta$ - lactoglobuline et ovalbumine) ne soient pas celles qui modifient la pression de surface vers la fourchette indiquée ci-dessus, mais celles, qui ont un pouvoir de pénétration dans la couche lipidique supérieur à 8 dynes/cm.min<sup>-1</sup>.m<sup>-1</sup> (Gargouri *et al.*, 1987).

D'autres composés amphiphiles que les protéines alimentaires sont susceptibles de moduler la lipolyse gastrique: il s'agit des sels biliaires. Ils ne sont pas présents normalement dans l'estomac, mais l'étude de leur effet sur la lipase gastrique présente l'intérêt de savoir, si cette enzyme peut maintenir son activité dans le duodénum des nouveaux-nés, où le pH est moins élevé que chez l'adulte (Hamosh, 1990). En utilisant des concentrations physiologiques comprises entre 2 et 10 mM (Carey *et al.*, 1983, Armand *et al.*, 1999), il a été montré, que la présence de sels biliaires augmente l'activité de la lipase gastrique purifiée sur tributyrine (Tirupathi et Balasubramanian, 1982, Gargouri *et al.*, 1986a). L'augmentation obtenue varie en fonction du type de sel biliaire testé, de 20 % (taurodésoxycholate) à 140 % (taurocholate)

(Tiruppathi et Balasubramanian, 1982), et pourrait s'expliquer par le fait, que les sels biliaires abaissent la tension interfaciale de 15 à 9 dynes/cm (Gargouri *et al.*, 1986b). Par contre, en présence d'un substrat à chaîne longue (trioléine), les sels biliaires auraient un effet inhibiteur (Tiruppathi et Balasubramanian, 1982, Gargouri *et al.*, 1986a), pouvant diminuer l'activité lipolytique de la lipase gastrique purifiée de 10 % (taurocholate) à 90 % (glycochénodésoxycholate) (Tiruppathi et Balasubramanian, 1982). Elle présente, par exemple, une activité spécifique de 600-700 U/mg sur tributyrine, mais de seulement 90-100 U/mg sur Intralipid™, en présence de 3 à 6 mM d'un mélange de sels biliaires, représentatif de la composition de la bile humaine (Gargouri *et al.*, 1986a). Cependant, cette inhibition n'est plus observée si on utilise de faibles concentrations en sels biliaires, de 1,5 à 2,0 mM, c'est-à-dire proches des valeurs duodénales chez le nouveau-né (Hamosh, 1990), ce qui laisse supposer que la lipase gastrique peut rester active dans ces cas.

L'estomac peut contenir, enfin, des protéines acceptrices d'acides gras, la plus étudiée étant l'albumine. Des études *in vitro* montrent que l'albumine sérique de bœuf (BSA) a des effets variables selon la longueur des chaînes d'acide gras du substrat. Sur substrat à chaînes courtes (tributyrine), la lipase gastrique purifiée n'est pas active en absence de BSA, mais atteint une activité spécifique maximale de 540 U/mg pour 10 µM de BSA (Gargouri *et al.*, 1986a). Sur substrat à chaînes longues (Intralipid™), la lipase gastrique purifiée est active en absence de BSA (300 U/mg), et atteint une activité spécifique maximale de 570 U/mg pour 20 à 50 µM de BSA (Gargouri *et al.*, 1986a). Dans le cas de la tributyrine, l'effet activateur de la BSA ne se manifeste que si elle est ajoutée dans le milieu réactionnel avant la lipase (Gargouri *et al.*, 1986a), ce qui permet de supposer, que l'albumine, dans ces conditions particulières, n'intervient pas comme une protéine acceptrice d'acides gras, mais plutôt comme une protéine tensioactive, qui prévient la dénaturation interfaciale irréversible de la lipase gastrique à l'interface tributyrine/eau (Gargouri *et al.*, 1986a). Dans le cas d'un substrat à chaînes longues, les résultats présentés dans la littérature semblent contradictoires. L'étude cinétique, toujours *in vitro*, de l'activité de la lipase gastrique purifiée indique, d'une part, que l'enzyme est inhibée par les acides gras qu'elle libère au cours de l'hydrolyse, et d'autre part, que la BSA n'est pas capable de contrecarrer cette inhibition (Gargouri *et al.*, 1986a). En revanche, une étude *in vivo* réalisée à partir d'aspirats gastriques d'enfants nés à terme ou prématurément montre qu'à la concentration de 0,5 mM, l'albumine induit une augmentation de l'activité lipolytique de 34 % (Hamosh *et al.*, 1981). La réalité est probablement entre les deux, comme l'explique une autre étude réalisée avec du suc gastrique prélevé chez des

nouveau-nés. Les auteurs ont observé, que l'effet double de la BSA, c'est-à-dire à la fois stimulateur ou inhibiteur, était fonction des quantités relatives de BSA et d'acides gras présents dans le milieu. Ils suggèrent, que la concentration optimale de BSA pour déterminer l'activité de la lipase gastrique, dans le suc gastrique sur les triglycérides à chaîne longue d'une préparation pour nourrissons, serait comprise entre 1,87 et 5 %, en présence de 250 à 500 nmol d'acides gras (Kaminsky *et al.*, 1988).

### **1.2.2. Le système lipase/colipase pancréatique**

La digestion des lipides, qui a débuté dans l'estomac sous l'action de la lipase gastrique, se poursuit dans le duodénum sous l'action du système lipase/colipase pancréatique.

#### *1.2.2.1. Localisation tissulaire et sécrétion de la lipase pancréatique*

La lipase pancréatique est synthétisée par les cellules acineuses du pancréas exocrine, qui la stockent au niveau de leurs granules de zymogènes, et la sécrètent, sous forme directement active, par exocytose au niveau de leur membrane apicale (Miled *et al.*, 2000). Ces mécanismes ne sont pas pleinement fonctionnels chez le nouveau-né, dont le pancréas est encore immature. Ainsi, le suc pancréatique contient des quantités négligeables de lipase au moins jusqu'à 30 jours après la naissance (Lebenthal et Lee, 1980), et l'enzyme, détectable chez le fœtus seulement à partir de la 21<sup>ème</sup> semaine de gestation, n'apparaît que progressivement dans le pancréas, pour être présente dans tous les acini seulement quinze jours après la naissance (Carrere *et al.*, 1992). Chez l'adulte, la concentration duodénale de lipase pancréatique est de 1 à  $2 \cdot 10^{-7}$  M. Dans les conditions physiologiques normales, la masse totale de lipase pancréatique sécrétée au cours d'un repas liquide varie d'environ 88 mg (Carrière *et al.*, 1993) à 245-254 mg (Borovicka *et al.*, 1997, Carrière *et al.*, 2000), et représente environ  $202,9 \pm 96$  mg au cours d'un repas solide (Carrière *et al.*, 2000). La concentration duodénale de lipase pancréatique est plus importante au début de la digestion chez l'adulte. En effet, elle s'élève à 200 µg/mL pendant les 6 premiers 10<sup>ème</sup> de la vidange gastrique, puis redescend à 50 µg/mL ensuite (Carrière *et al.*, 1993). Chez le nouveau-né, en revanche, la concentration duodénale de lipase pancréatique diminue pendant la prise alimentaire, en particulier pendant la première heure, où l'activité lipase mesurée sur tributyrine à partir du contenu duodénal peut être jusqu'à 27 fois moins importante que chez l'adulte (Fredrikzon et Olivecrona, 1978). La sécrétion enzymatique du suc pancréatique est stimulée par la cholécystokinine (Fried *et al.*, 1991), et, dans une moindre mesure, par la

gastrine (Granger *et al.*, 1985). Sa sécrétion hydrominérale est activée par la sécrétine (Granger *et al.*, 1985) et le peptide intestinal vasoactif (VIP).

#### 1.2.2.2. Caractéristiques biochimiques du système lipase/colipase pancréatique

La lipase pancréatique (EC 3.1.1.3) catalyse l'hydrolyse des triglycérides et des diglycérides en acides gras libres et monoglycérides, spécifiquement au niveau des liaisons ester externes (Brockerhoff, 1970, Yang *et al.*, 1990), et son action permet de dégrader 40 à 50 % des triglycérides ingérés (Carrière *et al.*, 1993, Armand *et al.*, 1996a). Elle peut cliver des acides gras de longueur de chaîne très variable. L'hydrolyse est plus rapide pour les acides gras à chaîne courte et moyenne (Brockerhoff, 1970), et réduite envers les liaisons esters impliquant des acides gras polyinsaturés à chaîne longue (Hernell *et al.*, 1993). Parmi les acides gras à chaîne longue (C14 à C22), le taux d'hydrolyse peut varier d'un facteur 6 (Yang *et al.*, 1990). Dans l'hypothèse où la lipase pancréatique serait sécrétée en large excès, ces différences de taux seraient insignifiantes, et tous les acides gras à chaîne longue seraient efficacement libérés par l'action de la lipase pancréatique (Lowe, 2002). Cependant, l'idée généralement admise dans la littérature que le pancréas sécrèterait plus de lipase que nécessaire est actuellement discutée (Carrière *et al.*, 2005). L'activité de la lipase pancréatique est estimée à 150-300 unités par millilitre de suc pancréatique sur substrat à chaîne longue (Carey *et al.*, 1983), et augmente de façon variable pendant le début de la digestion. Sur tributyrine, les travaux de Carrière et collaborateurs indiquent une activité de 1600 U/mL pendant les deux premiers tiers de la vidange gastrique (repas liquide), puis de 400 U/mL pendant le dernier tiers (Carrière *et al.*, 1993), et les travaux d'Armand et collaborateurs décrivent une activité plus élevée de 4000 U/mL deux heures après l'ingestion d'une émulsion entérale, pour une valeur à jeun de 250 U/mL (Armand *et al.*, 1999). *In vitro*, les activités spécifiques optimales obtenues avec 4 mM de taurodésoxycholate et un excès de colipase sont de 8000 à 12000 U/mg à pH 8,00 sur tributyrine (Carrière *et al.*, 1993, Carrière *et al.*, 2000, Miled *et al.*, 2000), 6000 U/mg à pH 7,80 sur tricapyryline (Miled *et al.*, 2000) et 4600 U/mg à pH 8,00 sur Intralipid™ (Miled *et al.*, 2000). Lorsqu'on se rapproche des conditions physiologiques en utilisant un repas standardisé comme substrat (cf. Tableau 1), l'activité spécifique de la lipase pancréatique est beaucoup plus faible : 47 U/mg (repas liquide) et 12 U/mg (repas solide) avec du suc, et 43 U/mg (repas liquide) et 15 U/mg (repas solide) avec de la lipase purifiée (Carrière *et al.*, 2000). La lipase pancréatique est plus active sur substrat émulsifié, d'où la notion d'« activation interfaciale » (Sarda et Desnuelle, 1958).

Son action dépend fortement de la présence des sels biliaires, retrouvés dans la lumière intestinale soit sous forme de micelles, pour ceux dont la concentration est supérieure à leur concentration micellaire critique (5 mM pour le taurocholate, 2 mM pour taurodésoxycholate, 3 mM pour le taurochénodésoxycholate et 4 mM pour le glycocholate, Wickham *et al.*, 1998), soit sous forme de monomères. Sous forme de micelles, les sels biliaires favorisent l'activité enzymatique de la lipase pancréatique en stabilisant sa conformation active, mais inhibent son adsorption à l'interface lipidique en s'accumulant autour des globules (Verger, 1984). L'accumulation des micelles agit alors soit en limitant la surface d'interface disponible pour la lipase (Borgström et Erlanson, 1973), soit en augmentant la pression interfaciale au-delà de la zone des pressions compatibles avec l'adsorption de la lipase (23-30 dynes/cm) (Verger *et al.*, 1977), soit en créant une barrière de charges négatives repoussant la lipase de façon électrostatique (Chapus *et al.*, 1975). Sous forme de monomères, les sels biliaires pourraient également inhiber l'adsorption de la lipase pancréatique, en s'associant à une partie des molécules d'enzyme et en diminuant ainsi la quantité de lipase disponible pour s'adsorber à l'interface lipidique (Lairon *et al.*, 1978, Wickham *et al.*, 2002). L'inhibition de l'adsorption de la lipase pancréatique à l'interface lipidique par les sels biliaires est levée grâce à un partenaire protéique spécifique: la colipase. En effet, en présence d'un excès de colipase, il n'existe pas de corrélation entre la durée de la période de latence avant le début de la lipolyse, mesurée sur une émulsion d'huile d'olive, et la charge électrique à la surface des globules lipidiques en présence de sels biliaires (déterminée par la mesure du potentiel zêta) (Wickham *et al.*, 2002). La colipase est une petite protéine, d'environ 10 kDa et 95 acides aminés (Egloff *et al.*, 1995). Elle est sécrétée en proportion équimolaire avec la lipase pancréatique (Carey *et al.*, 1983), sous forme de procolipase, puis activée par clivage trypsique au niveau de la liaison Arg 5-Gly 6. Elle appartient à la famille des molécules riches en résidus cystéines, puisqu'elle en contient 10, tous impliqués dans des ponts disulfures stabilisateurs (Egloff *et al.*, 1995). Sa structure à quatre « doigts » est très bien adaptée à sa fonction, puisque ses deux « doigts » hydrophobes lui permettent de se fixer au substrat lipidique de la lipase (Egloff *et al.*, 1995), tandis que les deux autres, hydrophiles, lui permettent d'interagir au niveau de son site de liaison Glu 64-Arg 65 avec les acides aminés Asn 366, Gln 369 et Lys 400 du domaine C-terminal de la lipase pancréatique (Crandall et Lowe, 2001, Lowe, 2002). Le pH optimum d'action de la lipase pancréatique, situé entre 7,00 et 9,00, est abaissé à 6,50 en présence de ce cofacteur (Borgström et Erlanson, 1971).

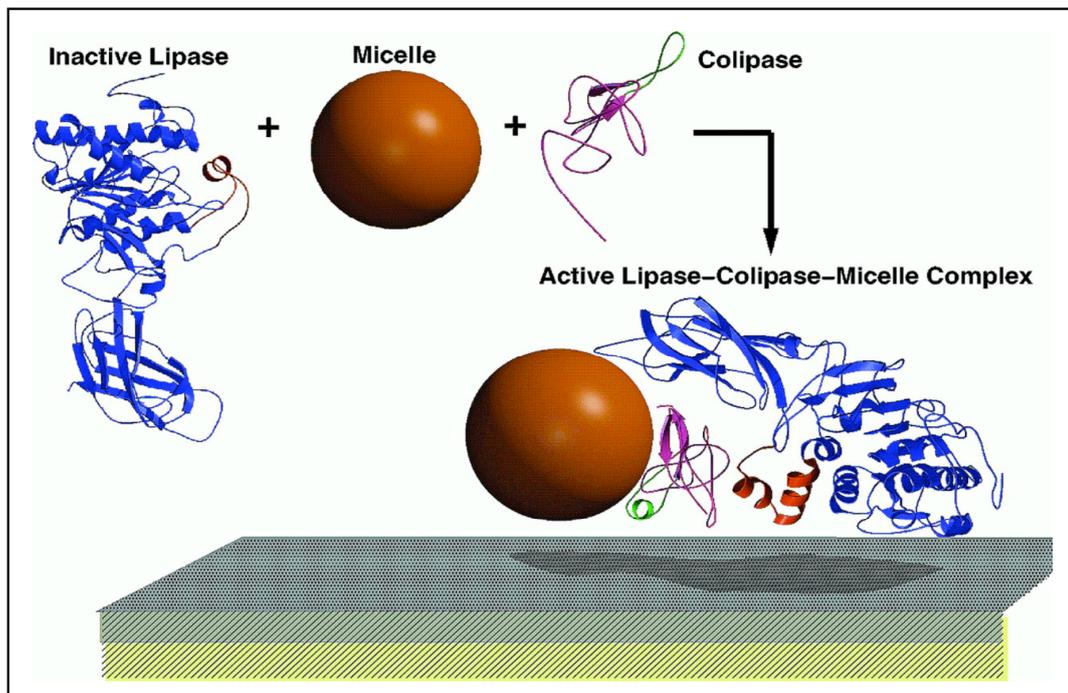
### 1.2.2.3. Structure et mécanisme catalytique du système lipase/colipase pancréatique

La lipase pancréatique humaine, cristallisée pour la première fois en 1990 (Winkler *et al.*), est une glycoprotéine de 50 kDa, constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 449 acides aminés. Elle présente un vaste domaine N-terminal (résidus 1 à 336), qui possède la structure  $\alpha/\beta$  caractéristique des lipases (Ollis *et al.*, 1992), et un domaine C-terminal (résidus 337 à 449) beaucoup plus petit constitué exclusivement de feuillets  $\beta$  (Lowe, 2002). Elle comporte 6 ponts disulfures, dont la disposition, non usuelle, lui confère une grande flexibilité, favorisant les modifications conformationnelles (Verger, 1984, Winkler *et al.*, 1990). Elle possède également un site unique de N-glycosylation (Asn 166) (Hide *et al.*, 1992) ; sa partie polysaccharidique représente seulement 2 % environ de la masse totale de la protéine (De Caro *et al.*, 1977), et n'est pas indispensable à son activité (Verger, 1984). La lipase pancréatique appartient à la même famille que la lipoprotéine lipase et la lipase hépatique (Lohse *et al.*, 1997a), avec lesquelles elle partage environ 35 % d'homologie (Hide *et al.*, 1992). On trouve notamment huit résidus de cystéine alignés à la même position dans la séquence de ces trois lipases (Hide *et al.*, 1992) et une localisation des principales structures et fonctions identiques (Wong et Schotz, 2002). Le gène codant pour la lipase pancréatique, PNLIP, est situé sur le chromosome 10 et comporte 13 exons répartis sur une longueur de 21,9 kb (Sims *et al.*, 1993). Il partage des similarités structurales avec les gènes codant pour la lipoprotéine lipase (10 exons) et la lipase hépatique (9 exons). Ces trois gènes dérivent d'un gène ancestral commun. Cependant, la conservation plus forte de l'organisation des exons et des introns, et de certains sites (comme les deux sites de N-glycosylation différents de celui de la lipase pancréatique) entre la lipoprotéine lipase et la lipase hépatique suggère que ces deux lipases ont divergé plus récemment que la lipase pancréatique (Hide *et al.*, 1992). Trois polymorphismes silencieux ont d'ores et déjà été identifiés sur le gène PNLIP : 96 A/C sur l'exon 3, 486 C/T sur l'exon 6 et 1359 C/T sur l'exon 13 (Hegele *et al.*, 2001). Une étude très récente, menée sur deux cohortes allemandes, a permis de mettre en évidence un polymorphisme du gène codant pour la colipase pancréatique (109 Arg/Cys) impliqué dans la susceptibilité au diabète de type II (Lindner *et al.*, 2005).

Le mécanisme catalytique du système lipase/colipase pancréatique est assez complexe. La triade catalytique, constituée des résidus sérine 153, aspartate 177 et histidine 263 (Winkler *et al.*, 1990) et située dans le domaine N-terminal de la lipase pancréatique, est masquée par une boucle, appelée « couvercle », délimitée par le pont disulfure établi entre les

résidus cystéine 238 et 262. En effet, en association, par des liaisons de Van der Waals, avec les boucles voisines  $\beta 5$  (résidus 76 à 85) et  $\beta 9$  (résidus 204 à 224), elle recouvre le site catalytique et le rend inaccessible (Lowe, 2002). En présence du substrat de la lipase, le « couvercle » et la boucle  $\beta 5$  changent de conformation, ce qui démasque le site catalytique et permet la mise en place du trou oxyanion stabilisateur, formé par les résidus phénylalanine 78 et leucine 154 (Lowe, 2002). Le domaine C-terminal, de son côté, permet la fixation de la colipase (Miled *et al.*, 2000, Lowe, 2002). Dans un premier temps, la lipase, la colipase et les micelles de sels biliaries se mélangent au niveau de l'ampoule de Vater (qui recueille simultanément les sécrétions pancréatique et biliaire), et forment un complexe ternaire (Figure 5) (Hermoso *et al.*, 1997). Puis, dans un second temps, ce complexe s'adsorbe sur son substrat lipidique, au niveau duquel se produit l'activation interfaciale, c'est-à-dire le déplacement du « couvercle » et de la boucle  $\beta 5$  (Lowe, 2002).

**Figure 5:** Représentation schématique du complexe ternaire lipase-colipase-micelle de sels biliaries (Hermoso *et al.*, *EMBO J*, 1997, 16, 5531-5536).



Le « couvercle » ouvert et les « doigts » hydrophobes de la colipase délimitent alors un vaste plateau hydrophobe de plus de  $50\text{\AA}$ , capable d'interagir fortement avec l'interface lipidique (Miled *et al.*, 2000). Des études récentes suggèrent, que le domaine C-terminal de la lipase pancréatique pourrait lui aussi participer à la liaison de l'enzyme à son substrat. En effet, il présente une boucle hydrophobe, baptisée boucle  $\beta 5'$  (résidus 405 à 414), dont la surface

n'est pas masquée par la colipase et se retrouve orientée dans le même plan que le couvercle ouvert, la boucle  $\beta 9$  et les "doigts" de la colipase (Chahinian *et al.*, 2002).

### **1.2.3. La lipase stimulée par les sels biliaries ou BSSL**

Les taux de lipase pancréatique et de sels biliaries, qui constituent les éléments essentiels de la digestion-absorption intraduodénale des triglycérides chez l'adulte, sont faibles chez le nouveau-né en général, et le nouveau-né prématuré en particulier (Hernell et Bläckberg, 1994, Hamosh, 1995). Il en résulte fréquemment, chez les enfants alimentés avec du lait artificiel ou du lait maternel ayant subi un traitement thermique, une malabsorption des lipides, très significativement compensée chez les enfants nourris avec du lait maternel frais (Hamosh, 1995). Cette amélioration s'explique en grande partie par la présence dans le lait humain d'une lipase spécifique: la lipase stimulée par les sels biliaries (BSSL) (Hamosh, 1990, Hernell et Bläckberg, 1994), encore appelée « Lipase Activée par les Sels Biliaries » (BAL), « Lipase Dépendante des Sels Biliaries » (BSDL), « Lipase digestive du lait », ou « Estérase stimulée par les sels biliaries » (Hamosh, 1995).

#### *1.2.3.1. Localisation tissulaire et sécrétion de la BSSL*

Comme les autres protéines du lait, la BSSL est synthétisée et stockée dans les cellules des glandes mammaires (Bläckberg *et al.*, 1987). Le gène codant pour cette lipase est également exprimé dans les cellules acineuses du pancréas exocrine (Nilsson *et al.*, 1990). Cet équivalent pancréatique de la BSSL, baptisé carboxyl ester hydrolase ou cholestérol estérase, est présent dans le suc pancréatique de nombreuses espèces, tandis que la BSSL du lait n'est retrouvée que chez un nombre beaucoup plus limité d'entre elles (Hamosh, 1995): elle existe chez l'homme, le gorille, le chien, le chat, le furet et le phoque (Hernell et Bläckberg, 1994), mais pas chez la vache, l'âne, le lapin, le rat, le porc et le singe rhésus (Hernell et Bläckberg, 1994, Hamosh, 1995). Dans le lait humain, la BSSL, qui représente 1% des protéines totales (Hamosh, 1990), est sécrétée dans le lactosérum (Strömqvist *et al.*, 1997). Elle est incapable de pénétrer à l'intérieur des globules lipidiques du lait, ce qui prévient vraisemblablement l'hydrolyse des triglycérides dans la glande mammaire avant leur sécrétion (Hamosh, 1990). Le lait humain contient généralement entre 100 et 200 mg de BSSL par litre (en moyenne 133 mg/L) (Strömqvist *et al.*, 1997), et on la détecte dans les sécrétions précoces de la glande mammaire, jusqu'à plus de deux mois avant l'accouchement (Hamosh, 1995).

### 1.2.3.2. Caractéristiques biochimiques de la BSSL

L'activité enzymatique de la BSSL est remarquablement stable durant une conservation prolongée dans le lait (un à deux ans) à  $-20$  ou  $-70^{\circ}\text{C}$  (Hamosh, 1995). La chaleur, en revanche, détruit la lipase: elle est rapidement inactivée pour des températures supérieures à  $55^{\circ}\text{C}$  (Hamosh, 1990), mais son activité enzymatique est maintenue et reste stable pendant au moins 24 heures à 15, 25 et  $38^{\circ}\text{C}$  (Hamosh, 1995). La lipase stimulée par les sels biliaires est également stable plus d'une heure à pH 3,50 (Hamosh, 1990). Son pH optimum d'action est compris entre 7,50 et 9,00. Elle n'est pas dégradée au cours de son passage dans l'estomac dans le lait, et elle est protégée de l'action des protéases pancréatiques comme la trypsine et la chymotrypsine, grâce à ses interactions avec les sels biliaires primaires et secondaires (Hamosh, 1990, Nilsson *et al.*, 1990). Ces différentes caractéristiques suggèrent donc, que la BSSL n'est pas inactivée lorsqu'elle arrive dans un estomac vide, et peut maintenir son activité dans l'intestin du nouveau-né 1 à 2 heures, c'est-à-dire pendant presque toute la période estimée du transit intestinal (Hamosh, 1990). Son point isoélectrique est bas (3,7), ce qui pourrait être lié à la richesse de la région C-terminale de l'enzyme en acides glutamique et asparagique (Baba *et al.*, 1991). L'activité de la BSSL n'est pas limitée aux substrats émulsifiés, puisqu'elle hydrolyse des substrats micellaires (1(3)-monooléine, 2-monooléine, cholestérylester) et solubles (p-Nitrophényl acétate) (Hernell et Bläckberg, 1994). Elle a également une faible spécificité de substrat, puisqu'elle hydrolyse aussi bien des esters de vitamines et de cholestérol, que des mono-, di- et triglycérides (Tableau 2).

**Tableau 2:** Activité spécifique de la lipase stimulée par les sels biliaires, mesurée sur différents substrats (Hernell et Bläckberg, *J Pediatr*, 1994, 125, S56-61).

Substrat	Activité $\mu\text{mol de produit formé}/\text{min}/\text{mg de protéine}$	État physique
Trioléine	100	Émulsion
Sn-1(3) monooléine	21	Solution micellaire
Sn-2 monooléine	16	Solution micellaire
Cholestéryl ester	0,5	Solution micellaire
Rétinyl palmitate	6-8	Émulsion
p-Nitrophényl acétate	30	Solution aqueuse
Diocanoyl-phosphatidyl choline	80	Solution micellaire

Elle n'est d'ailleurs spécifique, ni de la nature des chaînes d'acides gras, ni de leur position sur la molécule de glycérol (Hernell et Bläckberg, 1994, Hamosh, 1995), ni de leur longueur (Hamosh, 1990). Concernant ce dernier paramètre, il semblerait aussi, que toutes les espèces, qui sécrètent de la BSSL dans leur lait, produisent également des triglycérides estérifiés par plus de 90 % d'acides gras à longue chaîne (Hamosh, 1995), ce qui pourrait être un

phénomène adaptatif permettant de compenser l'activité enzymatique réduite des lipases gastrique et pancréatique vis-à-vis de ces acides gras. La BSSL n'est pas non plus spécifique du degré d'insaturation des acides gras (Hernell *et al.*, 1993), et jouerait donc un rôle majeur dans la biodisponibilité des acides gras polyinsaturés à longue chaîne, considérés comme essentiels durant la période néonatale (Hernell et Bläckberg, 1994). La faible spécificité de substrat de la BSSL lui permet ainsi d'assurer, du moins *in vitro*, l'hydrolyse complète de 20 à 40 % des triglycérides du lait humain, en glycérol et acides gras libres à partir des diglycérides et des monoglycérides libérés respectivement par les lipases gastrique et pancréatique (Bernbäck *et al.*, 1990, Hamosh, 1995). Elle lui permet également d'améliorer la biodisponibilité des acides gras, puisque l'absorption de ces acides gras libres est meilleure que celle des monoglycérides, dans les conditions de faible concentration en sels biliaires au niveau de l'intestin du nouveau-né (Hamosh, 1995). En effet, l'absorption des lipides est corrélée à la concentration intestinale en sels biliaires chez les enfants alimentés au lait artificiel, mais pas chez ceux nourris au sein (Hamosh, 1995). L'activité enzymatique de la BSSL, mesurée sur une émulsion de trioléine, peut varier entre 10 et 80 unités par millilitre de lait (une unité représente une micromole d'acide gras libérée par minute) (Freed *et al.*, 1986a), mais elle est en général plutôt comprise entre 20 et 45 U/mL (Freed *et al.*, 1986b, Freed *et al.*, 1989, Armand *et al.*, 1996b). Elle varie d'une femme à l'autre, mais reste constante chez chaque femme (Hamosh, 1995). Le niveau de son activité enzymatique n'est pas corrélé avec la survenue à terme ou prématurément de l'accouchement (Hamosh, 1990), ni avec le volume de lait sécrété durant les différents stades de la lactation (Hamosh, 1995). Par contre, il est plus faible dans le colostrum (produit du premier au quatrième jour de lactation) que dans le lait mature (produit au-delà du quatorzième jour de lactation) (Hamosh, 1995), et plus faible chez les mères souffrant de malnutrition, chez lesquelles il diminue de 80 à 90 % durant les quatre premiers mois de lactation, que chez les mères ayant un bon état nutritionnel, et dont l'activité lipasique est plus élevée et reste constante, même dans le cas d'un allaitement prolongé (Hamosh, 1995).

#### 1.2.3.3. Structure et mécanisme catalytique de la BSSL

La BSSL du lait humain a été purifiée et sa migration sur gel de polyacrylamide indique une masse apparente de 100 à 140 kDa (Bläckberg et Hernell, 1981, Hamosh, 1990). Un variant de masse moléculaire plus élevée (160 kDa) et un variant de masse moléculaire moins élevée (90-100 kDa), ont été identifiés (Swan *et al.*, 1992, Strömqvist *et al.*, 1997). Ce dernier est deux fois moins concentré dans le lait, et semble avoir une activité spécifique sur émulsion de trioléine stabilisée par de la gomme arabique (Freed *et al.*, 1986a) deux fois

inférieure à celle de la BSSL classique (Strömqvist *et al.*, 1997). Cette lipase a également été clonée (Nilsson *et al.*, 1990), et deux variants de son ADN complémentaire ont été mis en évidence (Baba *et al.*, 1991). La forme classique de la BSSL est constituée de 722 acides aminés, précédés par les 20 résidus supplémentaires du peptide signal (Nilsson *et al.*, 1990, Baba *et al.*, 1991). Avec ses feuilletts  $\beta$  antiparallèles, qui constituent l'intérieur de la partie N-terminale de la molécule, elle appartient à la famille des  $\alpha/\beta$  hydrolases (Hernell et Bläckberg, 1994). C'est une enzyme à sérine: comme les autres lipases et estérases, elle contient en position 194, au sein d'une séquence consensus G-X-S-X-G, la sérine nucléophile de la triade catalytique (Baba *et al.*, 1991), dont les autres membres sont l'aspartate 320 et l'histidine 435 (Hernell et Bläckberg, 1994). Elle contient deux ponts disulfure, impliquant pour l'un les cystéines 64 et 80, et pour l'autre, les cystéines 246 et 257, et un site de liaison à l'héparine, qui pourrait être localisé au niveau de la région très basique comprise entre les résidus 56 et 63 (Baba *et al.*, 1991). Elle possède un site de N-glycosylation au niveau de sa partie N-terminale (Asparagine 187) et plusieurs sites de O-glycosylation au niveau de son domaine C-terminal (Nilsson *et al.*, 1990, Baba *et al.*, 1991).

**Figure 6:** Séquence en acides aminés du variant classique de la lipase stimulée par les sels biliaires.

10	20	30	40	50	60	70
AKLGA VYTEG	GFVEGVNKKL	GLLGDSVDIF	KGIPFAAPT K	ALENPQHPG	WQGTKLAKNF	KKRCLQATIT
80	90	100	110	120	130	140
QDSTYGEDDC	LYLNIWVPQG	RKQVSRDLPV	MIWIYGG AFL	MGS GHGANFL	NNYLYDGEEI	ATRGNVIVVT
150	160	170	180	190	200	210
FNYRVGPLGF	LSTGDANLPG	NYGLRDQHMA	IAWVKRNIAA	FGGDPNITL	FGESAGGASV	SLQTLSPYNK
220	230	240	250	260	270	280
GLIRRAISQS	GVALSPWVIQ	KNPLFWAKKV	AEKVGCPVGD	AARMAQCLKV	TDPRALTLAY	KVPLAGLEY P
290	300	310	320	330	340	350
MLHYVGFVPV	IDGDFIPADP	INLYANAADI	DYIAGTNNID	GHIFASIDMP	AINKGNKKVT	EEDFYKLVSE
360	370	380	390	400	410	420
FTITKGLRGA	KTTFDVYTES	WAQDPSQENK	KKTVVDFETD	VLFLVPTEIA	LAQHRANAKS	AKTYAYLFSH
430	440	450	460	470	480	490
PSRMPVYPKW	VGADHADDIQ	YVFGKPFATP	TGYRQDRTV	SKAMIA YWTN	FAKTGDPNMG	DSAVPTHWEP
500	510	520	530	540	550	560
YTTENSGYLE	ITKKGSSSM	KRSLRTNFLR	YWTLTYLALP	TVT DQEATPV	PPTGDSEATP	VPPTGDSETA
570	580	590	600	610	620	630
PVPPTGDSGA	PPVPPTGDSG	APPVPPTGDS	GAPPVPPTGD	SGAPPVPPTG	DSGAPPVPPT	GDSGAPPVPP
640	650	660	670	680	690	700
TGDSGAPPVP	PTGDAGPPP V	PPTGDSGAPP	VPPTGDSGAP	PVPTGDSSET	APVPPTGDSG	APPVPPTGDS
710	720					
EAAPVPPTDD	SKEAQMPAVI	RF				
	16					

La triade catalytique est encadrée en rouge, les ponts disulfures sont matérialisés en bleu, le site de fixation à l'héparine et le site de N-glycosylation sont soulignés en vert et en vert clair, respectivement, et les 16 séquences répétées sont surlignées alternativement en orange et rose; les sites de O-glycosylation, très nombreux, ne sont pas indiqués sur la séquence (D'après Hernell and Bläckberg, *J Pediatr*, 1994, 125, S56-61 et Baba *et al.*, *Biochemistry*, 1991, 30, 500-510).

Ce dernier est très particulier, parce qu'il est constitué de 16 répétitions d'une séquence de 11 acides aminés, riche en proline (environ le tiers des résidus), et dont la structure de base, modifiée par seulement quelques substitutions mineures, est la suivante: Pro-Val-Pro-Pro-Thr-Gly-Asp-Ser-Gly-Ala-Pro (Nilsson *et al.*, 1990, Baba *et al.*, 1991) (Figure 6). Le nombre de répétitions de cette séquence varie d'une espèce à l'autre, et chez l'homme, cette variation est à l'origine de l'existence des BSSL de différentes masses: le variant de masse moléculaire élevée possède 28 séquences répétées, et celui de faible masse moléculaire seulement 13 (Strömqvist *et al.*, 1997). C'est un polymorphisme au niveau de l'exon 11, codant pour le domaine C-terminal de la lipase, qui explique les variations dans le nombre de ces séquences répétées (Lindquist *et al.*, 2002). Plusieurs variants peuvent être sécrétés dans un seul échantillon de lait humain, certaines mères exprimant simultanément le variant de faible masse moléculaire et le variant classique, ou les variants de masse faible et de masse élevée (Strömqvist *et al.*, 1997). Le domaine C-terminal de la BSSL est également le site de fixation de la majorité de la partie saccharidique importante de l'enzyme, qui représente 15 à 30 % de la masse totale de la protéine (Nilsson *et al.*, 1990, Strömqvist *et al.*, 1997). En considérant seulement la partie protéique, la masse de la lipase varie de 73 à 88 kDa en fonction du nombre de séquences répétées (76 kDa pour le variant classique à 16 répétitions) (Baba *et al.*, 1991). La glycosylation dépend du tissu au niveau duquel est exprimée la BSSL, à savoir la glande mammaire ou le pancréas (Strömqvist *et al.*, 1997). Elle est plus importante dans le variant de masse moléculaire élevée, puisqu'il contient davantage de séquences répétées, donc davantage de sites de O-glycosylation (Strömqvist *et al.*, 1997). Son rôle, qu'elle soit N- ou O-liée, n'est pas clairement établi. Il semblerait que la N-glycosylation intervienne dans le repliement et la sécrétion de l'enzyme (Abouakil *et al.*, 1993). La O-glycosylation, quant à elle, permettrait de stabiliser la chaîne polypeptidique (Wang *et al.*, 1995), de favoriser la liaison de la BSSL à la muqueuse intestinale via l'héparine (Spilburg *et al.*, 1995), et/ou de masquer la séquence PEST (signal d'adressage pour une dégradation rapide des protéines par les protéasomes) identifiée dans le domaine C-terminal de la lipase (Bruneau *et al.*, 1997). Toutefois, une autre étude conclut, au contraire, que la glycosylation de l'enzyme n'est indispensable ni à son activité enzymatique, ni à sa stabilité, ni à sa liaison à l'héparine (Strömqvist *et al.*, 1997).

Le mécanisme exact de l'activation de la BSSL n'est pas non plus complètement établi, mais il semble nécessiter la présence de 5 à 12,5 mM de sels biliaires (Freed *et al.*, 1986b, Hamosh, 1990, Strömqvist *et al.*, 1997). Un modèle, dans lequel l'enzyme présente deux sites de fixation des sels biliaires à l'aide d'interactions avec des résidus de tyrosine et

d'arginine, a été proposé (Hernell et Bläckberg, 1994). Le premier site serait non spécifique, fixant aussi bien les sels biliaires primaires (cholate et chénodésoxycholate) que secondaires (désoxycholate), et permettrait la liaison de l'enzyme à son substrat. Le second site serait spécifique du groupement hydroxyle en position  $7\alpha$  des sels biliaires primaires, et permettrait la dimérisation et l'activité catalytique de la BSSL (Hernell et Bläckberg, 1994, Aubert *et al.*, 2002). Toutefois, si l'activation par les sels biliaires primaires semble nécessaire à l'hydrolyse des triglycérides et du cholestérol émulsifiés, elle ne l'est pas pour les substrats solubles comme le p-Nitrophényl acétate (Bläckberg et Hernell, 1993). De plus, il a été montré, que la BSSL était capable d'hydrolyser les triglycérides du lait humain ou d'une préparation pour nourrisson en l'absence de sels biliaires lorsque l'hydrolyse a été initiée par la lipase gastrique, avec un rendement deux à trois fois plus important (Hamosh, 1990). Il a également été mesuré, qu'elle pouvait hydrolyser des micelles de monooléine en présence de 2 mM de taurocholate de sodium (activité spécifique de 13 à 22 U/mg), alors que la présence d'au moins 5 mM de ce sel biliaire est nécessaire pour voir apparaître une activité sur émulsion de trioléine (activité spécifique de 48 à 53 U/mg) (Hernell et Bläckberg, 1982). Ce modèle doit donc être complété, et une étude récente suggère l'existence d'un mécanisme plus « classique », impliquant une boucle masquant le site catalytique (résidus 115 à 126) et des changements conformationnels (Moore *et al.*, 2001).

#### **1.2.4. Le rôle particulier de la lipase gastrique dans la digestion et l'absorption des lipides**

Chez l'homme, l'activité lipolytique trouvée dans la muqueuse fundique de l'estomac (en moyenne 100 000 à 300 000 unités de lipase) représente 10 à 30 % de l'activité lipolytique totale du pancréas (Moreau *et al.*, 1988b). Cette donnée quantitative ne reflète cependant pas l'importance qualitative de la lipolyse gastrique. En effet, dans les conditions physiologiques normales, la lipolyse gastrique permet trois phénomènes très importants dans la digestion des lipides:

- 1) Elle génère des produits tensioactifs (acides gras et monoglycérides), qui, soit renforcent le processus gastrique d'émulsification des lipides (Armand *et al.*, 1996a), soit sont responsables du réarrangement des globules issus d'émulsions préformées (Armand *et al.*, 1999).
- 2) Elle apporte une source d'énergie rapidement utilisable lorsqu'elle libère des acides gras à chaîne courte et moyenne: ces acides gras sont hydrophiles, qu'ils soient ionisés ou non (Carey *et al.*, 1983), et sont donc capables de quitter la surface des globules lipidiques pour

être absorbés par diffusion passive directement à travers la muqueuse gastrique (Hamosh *et al.*, 1989) ou très rapidement au niveau de la muqueuse duodénale (Mu et Hoy, 2000).

3) Elle conditionne l'activité ultérieure de la lipase pancréatique (Hamosh, 1990). En effet :

- l'émulsification des lipides ne se poursuit pas dans l'intestin; les globules lipidiques, formés ou réarrangés dans l'estomac, y acquièrent une granulométrie de 20 à 2  $\mu\text{m}$ , qu'ils conserveront une fois arrivés dans le duodénum (Armand *et al.*, 1996a, Armand *et al.*, 1999); les lipides biliaires présents dans le contenu duodénal ne jouent en effet aucun rôle dans l'émulsification des lipides, mais permettront plutôt de stabiliser les globules lipidiques issus de la phase gastrique (Fillery-Travis *et al.*, 1995).

- les acides gras générés dans l'estomac stimulent la sécrétion de cholécystokinine lorsqu'ils se retrouvent au contact de la muqueuse duodénale, ce qui ralentit la vidange gastrique et active la sécrétion des enzymes pancréatiques (Hunt et Knox, 1968, Raybould *et al.*, 1998).

- les acides gras libérés au cours de la lipolyse gastrique réduisent la durée de la période de latence qui précède l'activation du complexe lipase-colipase pancréatique ; adsorbés à l'interface lipidique, ils agissent soit en favorisant l'adsorption de la colipase et de la lipase à l'interface (Borgström, 1980, Larsson et Erlanson-Albertsson, 1986), soit en interagissant directement avec l'enzyme au niveau d'un site de liaison spécifique, entraînant un changement conformationnel de la lipase (Van Kuiken et Behnke, 1994) ; l'effet des acides gras sur cette période de latence dépend de leur nature : les acides laurique, caprique, oléique, linoléique et *cis*-insaturés la réduisent, mais pas les acides butyrique et caproïque qui sont sans effet, ni les acides gras saturés à 14 atomes de carbone et plus qui la ralongent (Hamosh, 1990).

- les diglycérides, formés sous l'action de la lipase gastrique, sont plus facilement et plus rapidement hydrolysés par la lipase pancréatique (Hamosh, 1990); en effet, ils sont davantage localisés à la surface des globules lipidiques que les triglycérides: on trouve 5,03 % de triglycérides et aucun diglycéride à la surface des globules lipidiques avant l'action de la lipase gastrique, contre 0,15 et 3,85 %, respectivement, après 10 min de lipolyse gastrique (Pafumi *et al.*, 2002).

### **1.3. La solubilisation et l'absorption des nutriments lipidiques**

Dans les conditions physiologiques normales, l'action combinée des lipases gastrique et pancréatique a permis l'hydrolyse d'environ les deux tiers de l'ensemble des liaisons ester des triglycérides, libérant au final des acides gras libres et des monoglycérides (Bernbäck *et al.*, 1990). Ces nutriments lipidiques, le cholestérol libre et les vitamines, sont ensuite

solubilisés dans la lumière intestinale par au moins deux types de particules, dont l'importance relative n'est pas clairement établie, les micelles de sels biliaires (Wilson *et al.*, 1971), et les vésicules unilamellaires de phospholipides (Hernell *et al.*, 1990). Ces structures permettent d'accroître la concentration en nutriments directement au niveau de la membrane apicale des entérocytes, et donc de favoriser leur absorption (Wilson *et al.*, 1971). Cette dernière peut se dérouler, soit par diffusion passive à travers la bicouche phospholipidique de la membrane entérocytaire (Hamilton, 2003), soit par un transport facilité voire actif impliquant des protéines spécifiques de la bordure en brosse des entérocytes (Nutting *et al.*, 2002).

#### **1.4. Le transport des différentes molécules lipidiques absorbées**

Après les avoir captés, les entérocytes assurent le transport intracellulaire des différents nutriments lipidiques. Leurs déplacements dans le cytoplasme mettent en jeu des protéines cytosoliques spécifiques, comme la I- et la L-FABP pour les acides gras (Corsico *et al.*, 2004), la L-FABP pour les lysophospholipides, les rétinoïdes et les 2-monoglycérides (Storch, 2001), la Sterol Carrier Protein 2 pour le cholestérol, et la Cellular Retinol Binding Protein II pour la vitamine A (Nutting *et al.*, 2002, Tso, 1994). Les entérocytes resynthétisent ensuite des triglycérides, des phospholipides et du cholestérol ester (Tso, 1994). Les 2-monoglycérides et les acides gras sont ré-estérifiés sous forme de triglycérides principalement par la voie du 2-monoglycérol, impliquant plusieurs enzymes qui constituent le complexe "triglycéride synthétase". Lorsque l'apport en 2-monoglycérol est diminué ou supprimé, une seconde voie, celle du glycérol-3-phosphate, devient alors majoritaire. Les diglycérides spécifiquement formés au cours de cette seconde voie peuvent être utilisés pour la biosynthèse de phosphatidylcholines par la voie de Kennedy, qui fait intervenir une glycérophospholipide synthétase. Une partie des lysophosphatidylcholines absorbées est également réacylée pour former des phosphatidylcholines. Le cholestérol, quant-à lui, est principalement estérifié sous l'action de l'acyl-CoA cholestérol acyltransférase. Pour finir, ces différents lipides sont assemblés avec des protéines spécifiques (les apoprotéines) pour former des lipoprotéines (Tso, 1994). Les molécules lipidiques (re)synthétisées dans la cellule sont assemblées au niveau du réticulum endoplasmique, par un mécanisme complexe, conduisant principalement à la formation de chylomicrons après un repas. Les triglycérides formés à l'extérieur du réticulum endoplasmique, pénètrent dans la citerne de ce réticulum et forment des gouttelettes lipidiques, qui s'associent progressivement à des phospholipides, du cholestérol et des apoprotéines (en particulier les Apo B48, Apo A-I, Apo A-IV et Apo A-II) à l'aide de la protéine de transfert microsomale (MTP). On obtient alors des préchylomicrons,

qui subissent dans l'appareil de golgi les dernières modifications conduisant à leur maturation. Les entérocytes sécrètent également des VLDL à Apo B48, en période de jeûne et par une voie différente de celle de l'assemblage des chylomicrons (d'où une composition en triglycérides différente entre les deux lipoprotéines), et contribuent de façon importante à la formation des HDL par le biais du métabolisme des chylomicrons (Young *et al.*, 1995). Toutes ces lipoprotéines permettront alors la distribution des lipides aux différentes cellules utilisatrices, via le système lymphatique, puis la circulation systémique (Tso, 1994).

## **2. L'altération de la biodisponibilité des nutriments lipidiques**

### **2.1. Les acides gras essentiels et leurs rôles physiologiques**

Parce qu'ils ne peuvent pas être synthétisés *de novo* par l'homme et doivent être apportés par l'alimentation, l'acide linoléique (C18:2n-6) et l'acide alpha-linolénique (C18:3n-3) sont considérés comme des acides gras essentiels (AGE). Une fois ingérés et absorbés, l'élongation et la désaturation de la chaîne carbonée de ces précurseurs permettent la synthèse des acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la famille oméga 6, l'acide arachidonique (AA, C20:4n-6) et de la famille oméga 3, l'acide éicosapentaénoïque (EPA, C20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6n-3) (Legrand *et al.*, 2001). Ces acides gras indispensables au bon fonctionnement de l'organisme ont trois fonctions physiologiques principales. Sous forme estérifiée dans les phospholipides des tissus, ils sont les constituants universels des membranes biologiques (Legrand *et al.*, 2001). Ils sont les précurseurs des médiateurs oxygénés, les éicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes et leucotriènes), impliqués dans l'inflammation et la vasomotricité (Legrand *et al.*, 2001). Ils jouent un rôle bien spécifique dans l'expression de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides et des glucides par l'intermédiaire de l'activation des PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) (Lapillonne *et al.*, 2004). Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la famille oméga 6 permettent en particulier le maintien de la fonction reproductrice (via les prostaglandines E et F), la différenciation des cellules épidermiques (via un leucotriène dérivé de l'AA), le maintien de la fonction plaquettaire (via le thromboxane A2), l'abaissement du cholestérol plasmatique transporté par les LDL, et la mise en jeu du système immunitaire et de la réponse inflammatoire (Legrand *et al.*, 2001). Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la famille oméga 3 interviennent quant à eux plus particulièrement dans le développement et la physiologie de la rétine (Uauy *et al.*, 1990, Birch *et al.*, 1992), du cerveau et du système nerveux (Bourre *et al.*, 1989), dans la physiologie vasculaire et les phénomènes d'anti-agrégation plaquettaire (via les prostaglandines issues de l'EPA et par un effet de compétition avec la famille oméga 6) (Lagarde *et al.*, 2003), et dans la régulation de la lipémie (effet hypotriglycéridémiant) (Legrand *et al.*, 2001).

### **2.2. La déficience en acides gras essentiels**

Du fait des rôles importants joués par les acides gras essentiels dans de nombreuses fonctions de l'organisme, leur déficience peut engendrer divers troubles cliniques comme le développement de maladies cardiovasculaires et de certains cancers, des dysfonctions des systèmes nerveux et immunitaire, une diminution de la fertilité, des lésions eczémateuses, et

une alopécie (Minich *et al.*, 1997). La déficience en acides gras essentiels peut être la conséquence d'un apport alimentaire insuffisant en lipides. Toutefois, son incidence particulièrement élevée chez les nouveaux-nés prématurés ou à terme, chez les sujets souffrant de cholestase ou de pathologies intestinales chroniques comme la maladie de Crohn (Minich *et al.*, 1997), et chez les sujets mucoviscidosiques (Cawood *et al.*, 2005), laisse penser que la déficience en acides gras essentiels est plus souvent associée à une malabsorption lipidique. La couverture des besoins en ces acides gras est ainsi principalement gouvernée par le bon déroulement des étapes enzymatiques et physico-chimiques successivement impliquées dans la biodisponibilité des nutriments lipidiques. Ce processus complexe, permettant une absorption très efficace de 96 à 98 % des triglycérides ingérés chez le sujet sain (Carey *et al.*, 1983) est plus ou moins altérée dans certains états physiologiques particuliers ou dans certaines pathologies atteignant le tractus digestif.

### **2.2.1. Altération physiologique de la biodisponibilité des acides gras**

#### *2.2.1.1. Le nouveau-né*

La période du développement périnatal, période d'élaboration intense de structures cellulaires, est la plus sensible au niveau et à la qualité des apports en acides gras polyinsaturés (Innis, 2004). Ce développement concerne tout particulièrement le cerveau, dont l'accélération de croissance se manifeste dès les trois derniers mois de la vie fœtale jusqu'à l'âge de deux ans (Legrand *et al.*, 2001). Les nouveau-nés, prématurés ou à terme, ont de plus un besoin élevé en acides gras polyinsaturés du fait d'une activité moins efficace de leurs désaturases (Carlson, 2001, Larque *et al.*, 2002). Le besoin spécifique en acides gras essentiels du nouveau-né est encore renforcé par l'immatunité pancréatique et hépatique qu'il présente. En effet, le nouveau-né en général, et le nouveau-né prématuré en particulier, souffre d'un défaut de sécrétion de lipase pancréatique et de sels biliaires, qui conduit à une moins bonne efficacité de l'étape intestinale, en termes de digestion et d'absorption (Hamosh, 1990). Dans ce cas d'insuffisance pancréatique transitoire, la biodisponibilité des nutriments lipidiques dépend alors des activités de la lipase gastrique du nouveau-né et de la lipase stimulée par les sels biliaires, apportée par le lait maternel lorsque l'enfant est allaité (Hamosh, 1990).

#### *2.2.1.2. La personne âgée*

La fréquence des altérations cognitives au fur et à mesure de l'avancée de l'âge, et la grande fréquence des pathologies thrombotiques et des processus inflammatoires, dysimmunitaires et tumoraux chez la personne âgée, justifient l'importance particulière des acides gras essentiels chez ces sujets (Cynober *et al.*, 2001). On sait notamment, que la

déficience en acides gras essentiels chez les personnes âgées accélère la détérioration des fonctions cérébrales (Yehuda *et al.*, 2005). De plus, l'avancée de l'âge, selon une hypothèse déjà ancienne, pourrait être responsable d'une diminution de l'activité des enzymes de la désaturation ( $\Delta 5$  et  $\Delta 6$  désaturases) et de l'élongation (élongases) de la chaîne carbonée des acides gras, posant le problème du caractère essentiel des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AA, EPA et DHA) chez le sujet âgé (Cynober *et al.*, 2001). Les modifications du goût et de l'odorat, loin d'être négligeables avec l'avancée de l'âge, induisent des altérations importantes de la détection des saveurs. La diminution consécutive du plaisir perçu au cours de l'acte alimentaire, associée à des problèmes de dentition et d'acuité visuelle, favorise la diminution de la prise alimentaire (Cynober *et al.*, 2001). Le besoin spécifique en acides gras du sujet âgé et la baisse éventuelle de leur apport, sont renforcés par l'altération de plusieurs fonctions digestives impliquées dans leur biodisponibilité. En effet, l'âge est associé à une diminution d'un facteur 7 des unités de lipase gastrique mesurées sur tributyrine par milligramme de muqueuse gastrique fraîche, chez des sujets de plus de 60 ans (Moreau *et al.*, 1988b). L'avancée de l'âge, qui ne semble pas avoir d'influence sur la sécrétion acide de l'estomac chez les individus ne présentant pas de pathologie gastrique, devient cependant corrélée positivement à une diminution de la sécrétion acide chez les sujets, dont l'estomac est touché par *Helicobacter pylori* (Haruma *et al.*, 2000). Enfin, l'âge altère aussi et surtout la sécrétion pancréatique, avec une diminution du volume de la sécrétion et une diminution de la quantité d'ions bicarbonate et d'enzymes sécrétés (Ishibashi *et al.*, 1991, Laugier *et al.*, 1991), certains auteurs faisant état de cas pour lesquels on pourrait parler d'insuffisance pancréatique exocrine liée à l'âge (Laugier *et al.*, 1991).

## **2.2.2. Altération pathologique de la biodisponibilité des acides gras**

### *2.2.2.1. L'insuffisance pancréatique*

Contrairement à l'insuffisance pancréatique transitoire du nouveau-né ou à l'insuffisance pancréatique « physiologique » de la personne âgée, l'altération de la biodisponibilité des acides gras peut être la conséquence d'une insuffisance pancréatique pathologique, causée par diverses atteintes du pancréas, principalement la mucoviscidose et la pancréatite chronique. La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques dans la population caucasienne, avec une incidence de 1/2500 (Mishra *et al.*, 2005). Elle est causée par la mutation du gène situé sur le chromosome 7 codant pour la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Factor). Cette glycoprotéine transmembranaire de 168 kDa se trouve dans la membrane apicale des cellules épithéliales des glandes exocrines de

l'appareil respiratoire, de la peau (glandes sudoripares) et du tractus digestif (canal biliaire, intestin, canal pancréatique), où elle assure principalement le transport des ions chlore (Mishra *et al.*, 2005). Dans la mucoviscidose, les glandes produisent une quantité anormale d'un mucus visqueux, qui bouche les canaux excréteurs et entraîne parfois la formation de kystes. L'atteinte pulmonaire est la complication la plus sérieuse de cette maladie, mais on constate la présence d'une insuffisance du pancréas exocrine chez 85 % des sujets mucoviscidosiques (Mishra *et al.*, 2005).

La pancréatite chronique est causée en très grande majorité par la consommation d'alcool (80 à 90 % des cas). Le risque de développer une pancréatite chronique débute dès les faibles consommations d'alcool à condition que la consommation soit prolongée (plus de 10 à 15 ans pour la femme et plus de 15 à 20 ans pour l'homme). La dégénérescence des cellules acineuses du pancréas évolue en insuffisance pancréatique exocrine (stéatorrhée) et endocrine (diabète). Dans ces deux cas d'insuffisance pancréatique, l'atteinte du pancréas engendre un défaut de sécrétion des enzymes pancréatiques et des ions bicarbonates, et la lipase gastrique devient la seule enzyme lipolytique présente et active. La phase intestinale de la digestion des lipides est alors aussi assurée en partie par des enzymes pancréatiques exogènes, apportées sous forme de suppléments. Cependant leur efficacité est très variable, parce qu'elle dépend de leur libération dans la lumière intestinale et de leur stabilité dans un environnement acide défavorable (Keller et Layer, 2003).

#### 2.2.2.2. Les autres causes

En dehors des atteintes pancréatiques responsables d'une insuffisance du pancréas exocrine (mucoviscidose, pancréatite chronique, mais aussi cancer du pancréas et pancréatectomie), l'altération pathologique de la biodisponibilité des acides gras peut résulter de toute autre affection touchant le tractus digestif. On peut citer parmi elles, et de façon non exhaustive, de nombreuses pathologies hépatiques et intestinales. Les atteintes du foie (calculs biliaires, cholestase hépatique, cancer) entraînent une diminution de la sécrétion des sels et des phospholipides biliaires, impliqués dans le fonctionnement du système lipase/colipase pancréatique (stabilisation de la conformation active de la lipase pancréatique par les sels biliaires) (Wickham *et al.*, 2002) et dans la solubilisation des produits de lipolyse dans les micelles de sels biliaires et les vésicules unilamellaires de phospholipides (Tso, 1994). Les atteintes intestinales chroniques (maladie de Crohn, recto-colite hémorragique, syndrome de l'intestin court) entraînent, du fait de la maladie ou de l'exérèse chirurgicale, une diminution plus ou moins importante de la surface d'absorption (Minich *et al.*, 1997). La malabsorption sévère avec déficience en acides gras essentiels associée à ces pathologies

intestinales est souvent l'indication d'une nutrition entérale (Minich *et al.*, 1997) ou parentérale (Jeppesen *et al.*, 1998). La voie entérale présente l'avantage de réduire la survenue des complications infectieuses, ainsi que la durée et le coût de l'hospitalisation (Meier et Beglinger, 2006). On notera cependant, que la composition des émulsions destinées à une alimentation entérale n'est pas toujours suffisamment adaptée aux besoins spécifiques de chaque patient (Freed *et al.*, 1981) et que de nombreuses interrogations subsistent encore quant au choix des vecteurs lipidiques (phospholipides, triglycérides structurés, esters éthyliques) à incorporer (Minich *et al.*, 1997) pour restaurer le statut en AGE.

### **2.2.3. Le rôle de la lipase gastrique dans l'insuffisance pancréatique**

Lorsque l'altération de la biodisponibilité des acides gras est la conséquence d'une insuffisance pancréatique, la lipase gastrique joue un rôle primordial, parce qu'elle dispose dans ces situations de conditions d'activité optimales. En effet, l'absence de sécrétion de bicarbonates par le pancréas rend le pH intraduodéal compatible avec son activité (Abrams *et al.*, 1984) et le défaut de sécrétion de trypsine évite sa dégradation. Chez le nouveau-né et chez le sujet mucoviscidosique, l'immaturation et l'atteinte hépatiques entraînent de plus une diminution de la sécrétion des sels biliaires, ce qui ralentirait l'inhibition de la lipase gastrique. En outre, son activité est normale, voire augmentée (Roulet *et al.*, 1980, Abrams *et al.*, 1984, Armand *et al.*, 1995), probablement grâce à un phénomène d'adaptation nutritionnelle. En effet, il a été montré chez l'homme, qu'un régime riche en lipides augmente l'activité de la lipase dans le suc gastrique de 51 à 67 % dans les conditions basales et après stimulation à la pentagastrine, respectivement (Armand *et al.*, 1995). Ainsi, même lorsque la lipase pancréatique est complètement absente, les lipides alimentaires sont tout de même absorbés à des taux variant de 26 à 81 % chez des enfants souffrant de mucoviscidose (Hamosh, 1990). L'excrétion fécale des lipides est d'ailleurs corrélée négativement au niveau de lipase gastrique chez ces sujets (Abrams *et al.*, 1984). Dans le cas particulier du nouveau-né allaité, la lipolyse gastrique est primordiale pour deux autres raisons supplémentaires. Premièrement, les acides gras à chaîne moyenne des triglycérides du lait maternel (acides octanoïque et décanoïque), directement absorbables par la muqueuse gastrique, sont estérifiés en position sn-3 sur la molécule de glycérol, c'est-à-dire au niveau du site d'action spécifique de la lipase gastrique (Faber *et al.*, 1988, Hamosh, 1990). Deuxièmement, l'action préalable de la lipase gastrique permet l'initiation de l'activité de la lipase stimulée par les sels biliaires (Hamosh, 1990) et de la lipase pancréatique (Bernbäck *et al.*, 1990), lorsqu'elle est présente, en rendant les molécules de substrat plus accessibles ; en effet, l'enveloppe des globules de lait empêche l'hydrolyse des triglycérides par ces lipases, même en présence de sels biliaires.

### **3. Les stratégies d'amélioration de la biodisponibilité des nutriments lipidiques**

La biodisponibilité des nutriments lipidiques est considérablement diminuée dans certains états physiologiques particuliers (chez le nouveau-né et chez la personne âgée) ou dans diverses pathologies affectant le tractus digestif (mucoviscidose, pancréatite chronique, cholestase, maladie de Crohn). D'autres lipases (lipase gastrique et lipase stimulée par les sels biliaires) permettent d'assurer la couverture d'une partie des besoins en acides gras essentiels dans certains cas d'insuffisance pancréatique, mais leur action n'est pas toujours suffisante. La mise en place de stratégies permettant d'améliorer la biodisponibilité des nutriments lipidiques, en particulier des acides gras essentiels, est donc indispensable et représente de fait un enjeu majeur en terme de Santé Publique. Ces stratégies peuvent être développées autour des enzymes qui assurent l'hydrolyse des triglycérides ou autour du substrat lipidique lui-même.

#### **3.1. L'amélioration de la biodisponibilité des nutriments lipidiques par le biais des lipases**

Cette option consiste à apporter des suppléments enzymatiques exogènes. Les traitements actuels utilisent de la lipase pancréatique, apportée classiquement sous la forme d'extraits pancréatiques d'origine animale, principalement de porc (Keller et Layer, 2003). Afin d'obtenir une activité enzymatique suffisante, l'administration de 25 000 à 40 000 unités de lipase pancréatique par repas est recommandée. Cette posologie peut être doublée, voire triplée lorsque le traitement ne s'avère pas suffisamment efficace (Keller et Layer, 2003). En effet, la poudre de pancréas de porc doit être encapsulée dans des microsphères sensibles au pH, afin d'éviter l'inactivation de la lipase pancréatique par l'acidité gastrique, puis de permettre sa libération dans le duodénum par délitement de l'enveloppe à un pH en général supérieur à 5,5 (Delchier *et al.*, 1991, Keller et Layer, 2003). Or un tel pH n'est pas toujours atteint dans le duodénum même en période de repas, et quand il est atteint, il reste acide, ce qui n'est pas favorable à l'action optimale de la lipase pancréatique. Le problème posé par le pH gastrique est parfois résolu par l'administration de traitements visant à réduire la sécrétion acide de l'estomac, ce qui pose la question d'une éventuelle modification de la sécrétion et de l'activité de la lipase gastrique. Une étude réalisée avec un inhibiteur de la pompe à protons (Lansoprazole) chez six adultes ne présentant pas de pathologie gastro-intestinale n'a montré aucune modification de la sécrétion de lipase gastrique ni du rendement de lipolyse intragastrique (Renou *et al.*, 2001). Les analyses réalisées avec un autre anti-acide (Zantac)

chez un enfant atteint de mucoviscidose n'ont pas montré non plus de baisse du rendement de lipolyse gastrique, mais indiquent cependant une diminution d'un facteur 2 de la sécrétion de lipase gastrique (Armand et Hamosh, résultats non publiés). Pour ces diverses raisons, la digestion des lipides n'est toujours pas normalisée par les traitements actuels chez beaucoup de patients (Keller et Layer, 2003) et les recherches se sont orientées vers l'utilisation d'autres sources de lipases. Les lipases bactériennes notamment font preuve d'une meilleure stabilité que la lipase pancréatique de porc. Un nouveau substitut d'enzymes pancréatiques, à base de lipase microbienne cristallisée, vient d'être mis au point et testé en phase I avec une bonne tolérance chez 23 sujets présentant une insuffisance pancréatique associée à la mucoviscidose (Borowitz *et al.*, 2006). Il a permis une augmentation de l'absorption des lipides de 55 à 44 % à l'administration respective de 500 à 5000 unités/kg par repas, et sera très prochainement testé en phase II (Borowitz *et al.*, 2006). D'autres auteurs ont suggéré d'envisager plutôt l'utilisation d'une lipase naturellement adaptée aux conditions de pH de l'insuffisance pancréatique exocrine : la lipase gastrique (Hamosh, 1990). L'ADN complémentaire codant pour la lipase gastrique humaine a été cloné et exprimé dans une levure pour la première fois par l'équipe de Bodmer (Bodmer *et al.*, 1987). Leur objectif était de trouver une source pratique pour étudier la structure et le mécanisme enzymatique de la lipase gastrique, encore peu connue alors. Depuis, plusieurs progrès ont permis de produire dans *Saccharomyces cerevisiae* de la lipase gastrique humaine recombinante sécrétée jusqu'à 11 mg/L dans le milieu de culture (Crabbe *et al.*, 1996). Ce recombinant a conservé toutes les caractéristiques de la lipase gastrique native (en particulier son pH d'action optimum, sa stabilité aux pH acides et sa résistance à l'action de la pepsine), ce qui permet d'espérer que des suppléments enzymatiques à base de lipase gastrique humaine recombinante pourront être utilisés dans le traitement de l'insuffisance pancréatique exocrine (Crabbe *et al.*, 1996). La question du rendement de production étant incontournable dans le domaine thérapeutique, une autre technique a été mise en œuvre plus récemment. Il s'agit de la production de lipase gastrique de chien recombinante dans des plants de tabac transgénique (Gruber *et al.*, 2001). La lipase gastrique de chien a été choisie par Meristem Therapeutics, parce que c'est la lipase préduodénale acide de mammifère la plus active sur triglycérides à longue chaîne (Gruber *et al.*, 2001). Le recombinant obtenu présente les mêmes propriétés que l'enzyme native et ouvre une nouvelle perspective dans le traitement de la malabsorption lipidique. La procédure pilote de purification de la lipase gastrique recombinante à partir des plants de tabac frais a été validée (Gruber *et al.*, 2001) et les tests pharmacologiques sont en cours (<http://www.meristem-therapeutics.com>). Le potentiel thérapeutique d'une lipase acide

d'origine fongique, préparée à partir d'*Aspergillus niger*, a aussi été évalué (Zentler-Munro *et al.*, 1992). Malgré son pH optimum d'action compris entre 2,5 et 5,5 et sa résistance à l'action de la pepsine et de la trypsine, cette lipase n'a pas permis d'améliorer significativement le coefficient d'absorption des lipides par rapport au placebo (59,0 % versus 52,3 % respectivement) chez des adultes mucoviscidosiques (Zentler-Munro *et al.*, 1992). Une enzymothérapie de substitution, plus efficace que les extraits pancréatiques de porc gastro-protégés, n'est donc pas encore opérationnelle, malgré des avancées très prometteuses. Le développement de stratégies alternatives doit donc être mené en parallèle.

### **3.2. L'amélioration de la biodisponibilité des nutriments lipidiques par le biais des propriétés physico-chimiques des lipides**

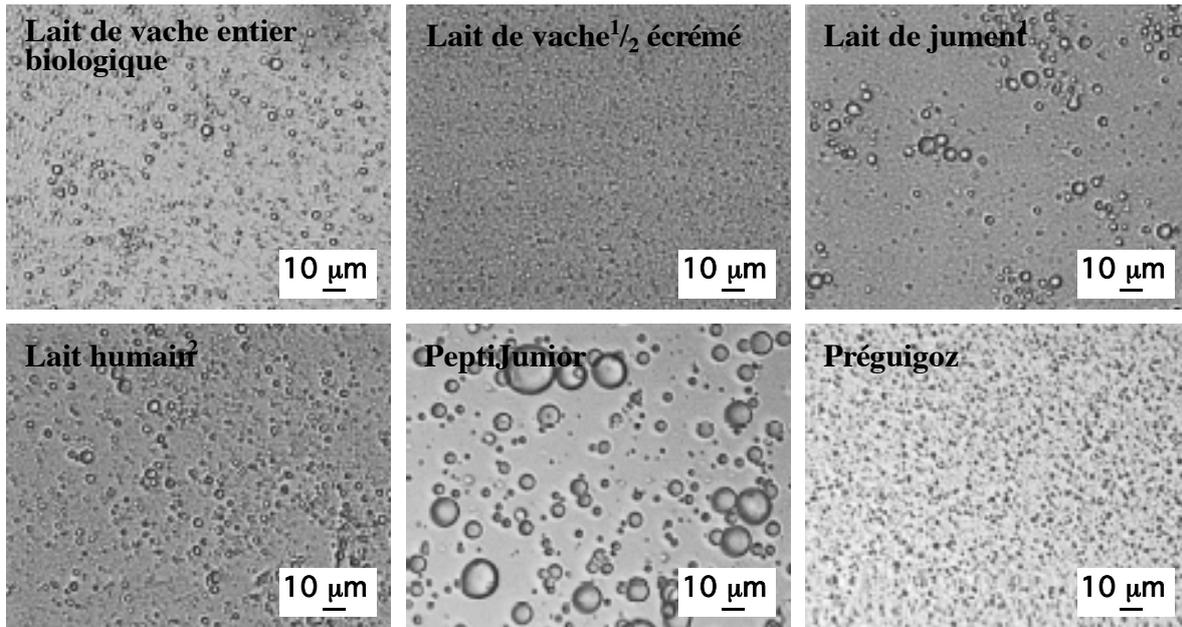
Cette stratégie consiste à intervenir au niveau du substrat des lipases, avec l'objectif final de concevoir différents produits de Nutrition Clinique, tels que compléments alimentaires, émulsions entérales, substituts du lait, permettant d'améliorer la biodisponibilité des nutriments lipidiques. Cette amélioration serait réalisée en choisissant de façon plus judicieuse les lipides entrant dans la composition de ces produits. En l'état actuel de nos connaissances, on peut concrètement envisager de se baser pour cela sur les propriétés physico-chimiques des lipides. En effet, ce sont ces propriétés physico-chimiques qui déterminent les caractéristiques de l'interface lipidique au niveau de laquelle se déroule l'hydrolyse enzymatique. Ces caractéristiques vont donc avoir un impact fort sur la digestion, et par conséquent l'absorption, des lipides. Parmi les différentes caractéristiques de l'interface lipidique, on peut citer la taille des globules lipidiques (granulométrie), la structure de ces globules (répartition cœur/surface des molécules lipidiques, organisation de la monocouche de surface), et les propriétés des molécules qui les constituent (triglycérides, phospholipides).

#### **3.2.1. La taille des globules lipidiques**

Les lipides sont organisés principalement sous la forme de globules lipidiques, aussi bien dans les produits alimentaires comme le lait, les préparations pour nourrissons et les émulsions entérales, que dans le système digestif aqueux, c'est-à-dire dans le contenu gastrique et duodéal après l'ingestion de matières grasses (Armand *et al.*, 1994, Borel *et al.*, 1994b, Armand *et al.*, 1996a, Armand *et al.*, 1996b, Armand *et al.*, 1999) (Figure 7). Selon le type de lait, de substitut de lait ou d'émulsion destiné à la nutrition entérale, on peut trouver un large éventail de diamètres, avec des globules lipidiques variants de 0,3 à 20 micromètres (Tableau 3). Dans le système digestif aqueux, la taille des globules lipidiques peut être plus élevée et dépend notamment, dans le cas de l'ingestion d'émulsions préformées, de la

granulométrie initiale. Des études réalisées chez des adultes sains ont montré que le diamètre moyen des globules lipidiques trouvés dans l'estomac et le duodénum variait de 17,2 à 52,4  $\mu\text{m}$ , de 8,1 à 15,4  $\mu\text{m}$  et de 2,1 à 6,9  $\mu\text{m}$  pour des émulsions ingérées de granulométrie initiale respective 60, 10 et 0,7  $\mu\text{m}$  (Armand *et al.*, 1996a, Armand *et al.*, 1999).

**Figure 7:** Photographies réalisées à partir de l'observation microscopique de globules lipidiques dans différents laits et préparations pour nourrissons (Favé *et al.*, *Cell Mol Biol*, 2004, 50, 815-831).



Les observations ont été réalisées avec l'aide de P. Lechêne (UMR Inserm 476/Inra 1260, Marseille, France) en utilisant un microscope optique Leitz dialux 20 (Leica) à un grandissement final de 400. <sup>1</sup>Échantillon généreusement donné par J.Y. Gaget, Haras de Haflinger, Bourgogne, France. <sup>2</sup>Échantillon généreusement donné par V. Millet, Hôpital de la Conception, Marseille, France.

Comme les lipases digestives ont la spécificité d'agir sur des substrats insolubles émulsifiés (Brockman, 1984), la granulométrie des globules lipidiques est un des facteurs physico-chimiques clés de la biodisponibilité des acides gras. Plusieurs études menées dans notre laboratoire ont permis de montrer, que la taille des globules lipidiques gouverne l'activité des lipases gastrique (Borel *et al.*, 1994a, Pafumi *et al.*, 2002) et pancréatique (Armand *et al.*, 1992b), *in vitro* aussi bien qu'*in vivo* chez le rat (Borel *et al.*, 1994b) et chez l'homme (Armand *et al.*, 1999).

**Tableau 3:** Diamètre des globules lipidiques dans différents laits, substituts de lait et mélanges destinés à la Nutrition Entérale (D'après Favé *et al.*, *Cell Mol Biol*, 2004, 50, 815-831).

<i>Échantillon</i>	<i>Diamètre moyen (µm)</i>	<i>Diamètre médian (µm)</i>	<i>Référence</i>
<b>Laits</b>			
<i>Laits humains</i> <sup>1</sup>			
B	6,67 ± 0,63	4,44 ± 0,13	Favé <i>et al.</i> , 2004
BV	3,74 ± 0,17	3,46 ± 0,10	Favé <i>et al.</i> , 2004
RC	6,04 ± 0,11	4,04 ± 0,06	Favé <i>et al.</i> , 2004
SC	4,96 ± 0,31	4,11 ± 0,08	Favé <i>et al.</i> , 2004
<i>Laits de vache</i>			
Demi-écrémé UHT	0,46 ± 0,01	0,35 ± 0,00	Favé <i>et al.</i> , 2004
Demi-écrémé UHT Candia	1,02 ± 0,11	0,34 ± 0,01	Armand <i>et al.</i> , 2002
Demi-écrémé ω3 Candia	0,71 ± 0,13	0,29 ± 0,02	Armand <i>et al.</i> , 2002
Entier pasteurisé biologique	4,36 ± 0,35	0,86 ± 0,02	Favé <i>et al.</i> , 2004
<i>Laits de jument</i> <sup>2</sup>			
Matin	9,15 ± 1,90	1,67 ± 0,11	Armand <i>et al.</i> , 2002
Soir	5,34 ± 1,04	2,06 ± 0,12	Armand <i>et al.</i> , 2002
Lyophilisé	4,28 ± 0,33	0,73 ± 0,33	Armand <i>et al.</i> , 2002
<b>Substituts de lait</b> <sup>3</sup>			
<i>Destinées aux nouveaux-nés prématurés</i>			
Preaptamil	0,66 ± 0,15	0,30 ± 0,03	Favé <i>et al.</i> , 2004
	0,46 ± 0,01	0,35 ± 0,02	Favé <i>et al.</i> , 2004
Pregallia	0,33 ± 0,01	0,31 ± 0,01	Favé <i>et al.</i> , 2004
	0,37 ± 0,01	0,34 ± 0,01	Favé <i>et al.</i> , 2004
Pregestimil	14,00 ± 3,53	0,32 ± 0,02	Favé <i>et al.</i> , 2004
	1,04 ± 0,16	0,27 ± 0,00	Favé <i>et al.</i> , 2004
Preguigoz	11,22 ± 0,72	2,39 ± 0,36	Favé <i>et al.</i> , 2004
	0,39 ± 0,01	0,28 ± 0,01	Favé <i>et al.</i> , 2004
Premodilac	5,18 ± 0,14	4,60 ± 0,02	Favé <i>et al.</i> , 2004
	1,83 ± 0,26	0,28 ± 0,00	Favé <i>et al.</i> , 2004
Prenidal <sup>4</sup>	2,72 ± 0,06	0,53 ± 0,02	Favé <i>et al.</i> , 2004
Similac special care 20 kcal <sup>5, 8</sup>	nd	1,83 ± 0,30	Armand <i>et al.</i> , 1996b
Similac special care 24 kcal <sup>5, 8</sup>	nd	3,97 ± 0,49	Armand <i>et al.</i> , 1996b
SMA super preemie <sup>5, 8</sup>	nd	0,63 ± 0,15	Armand <i>et al.</i> , 1996b
<i>Destinées aux nouveaux-nés à terme</i>			
Alma	1,84 ± 0,41	0,33 ± 0,01	Favé <i>et al.</i> , 2004
	10,44 ± 0,82	0,80 ± 0,07	Favé <i>et al.</i> , 2004
Aptamil <sup>6</sup>	0,34 ± 0,00	0,28 ± 0,00	Non publié
Enfamil	11,21 ± 0,44	0,51 ± 0,10	Favé <i>et al.</i> , 2004
Gallia	3,11 ± 0,34	0,34 ± 0,00	Favé <i>et al.</i> , 2004
	3,94 ± 0,26	0,36 ± 0,00	Favé <i>et al.</i> , 2004
Guigoz <sup>4</sup>	2,16 ± 0,35	0,49 ± 0,04	Favé <i>et al.</i> , 2004
Modillac	7,65 ± 1,05	1,00 ± 0,12	Favé <i>et al.</i> , 2004
	3,78 ± 1,34	0,48 ± 0,01	Favé <i>et al.</i> , 2004
Nidal	12,99 ± 1,77	0,61 ± 0,01	Favé <i>et al.</i> , 2004
	10,51 ± 0,93	0,47 ± 0,01	Favé <i>et al.</i> , 2004
Peptijunior 15% <sup>4</sup>	15,04 ± 1,10	9,35 ± 0,25	Favé <i>et al.</i> , 2004
<i>Destinées aux sujets atteints de mucoviscidose</i>			
Ensure <sup>5, 8</sup>	nd	0,52 ± 0,03	Armand <i>et al.</i> , 2004
<b>Mélanges semi-élémentaires liquides complets destinés à la Nutrition Entérale</b> <sup>7</sup>			
<i>Adaptés aux enfants de 1 à 12 ans souffrant de malabsorption digestive</i>			
Peptamen junior	15,08 ± 0,66	6,10 ± 0,66	Non publié
<i>Adaptés aux adolescents et aux adultes souffrant de malabsorption digestive</i>			
Peptamen	10,60 ± 0,30	9,70 ± 0,26	Non publié

<sup>1</sup> Échantillons généreusement donnés par V. Millet, Hôpital de la Conception, Marseille, France. <sup>2</sup> Échantillons généreusement donnés par J.Y. Gaget, Haras de Haflinger, Bourgogne, France. <sup>3</sup> La première valeur concerne une préparation de 2001 et la seconde de 2002, sauf <sup>4</sup> préparation de 2000, <sup>5</sup> préparation de 1993 et <sup>6</sup> préparation de 2006. <sup>7</sup> Préparations de 2004. Les mesures ont été réalisées avec un granulomètre à diffraction laser (Mastersizer microplus, Malvern), sauf pour les échantillons <sup>8</sup>, où il s'agissait d'un granulomètre à sédimentation (Capa-700, Horiba).

Le taux d'hydrolyse des triglycérides est alors très variable et s'étend de 5 à 37 % dans l'estomac et de 30 à 75 % dans le duodénum selon la taille de ces globules (Armand *et al.*, 1994, Armand *et al.*, 1996a, Armand *et al.*, 1999). De façon plus précise, l'activité des lipases gastrique et pancréatique est d'autant plus importante, que la taille des globules lipidiques est petite: une émulsion constituée de globules de petit diamètre (environ 0,7  $\mu\text{m}$ ) par rapport à une émulsion constituée de globules de plus grand diamètre (environ 10  $\mu\text{m}$ ) mène à une lipolyse plus élevée des triglycérides par la lipase gastrique dans l'estomac, c'est-à-dire 37 % contre 16 % après 4 heures de digestion chez des volontaires sains (Armand *et al.*, 1999). En effet, la granulométrie des globules lipidiques affecte directement la surface de l'interface lipides/eau: pour la même quantité de lipide, les globules de petite taille créent une surface d'interface beaucoup plus élevée que les globules de grande taille (138 à 672  $\text{m}^2/\text{L}$  pour l'émulsion fine et 30 à 126  $\text{m}^2/\text{L}$  pour l'émulsion de granulométrie plus élevée). L'augmentation de cette surface entraîne alors au moins deux conséquences: 1) dans les conditions physiologiques, les lipases sont en excès par rapport au substrat; une surface plus élevée d'interface lipides/eau permet donc à davantage de molécules de lipase de s'y fixer, 2) la lipolyse gastrique est inhibée par les acides gras protonés à longue chaîne qu'elle libère; ils s'accumulent à la surface des globules lipidiques, et, dès que leur concentration atteint 121-172  $\mu\text{moles}/\text{m}^2$  d'interface, ils forment des particules spécifiques, qui entrappent la lipase gastrique et empêchent son action (Pafumi *et al.*, 2002, Armand *et al.*, 2004); une plus grande surface d'interface retarde donc ce phénomène d'inhibition (Armand *et al.*, 1999, Pafumi *et al.*, 2002).

Qu'il s'agisse d'émulsions lipidiques préformées ou de lipides émulsifiés au niveau de l'estomac, la taille des globules dépend de la qualité du processus d'émulsification. Ainsi, au niveau du tractus digestif, par exemple, la présence de fibres alimentaires solubles (gomme de guar) perturbe ce processus, ce qui entraîne la formation de globules lipidiques de diamètre plus important, donc une diminution de la surface de l'interface lipides/eau et, par conséquent, une diminution du pourcentage de triglycérides hydrolysés par les lipases gastrique (6 au lieu de 10 %) (Pasquier *et al.*, 1996a) et pancréatique (44 au lieu de 56 %) (Pasquier *et al.*, 1996b). Pour des raisons non encore élucidées, la granulométrie d'une émulsion lipidique peut rester constante ou évoluer pendant son séjour dans le tube digestif. Par exemple, une émulsion constituée de globules d'environ 10  $\mu\text{m}$  de diamètre conserve cette taille dans l'estomac puis le duodénum, tandis qu'une émulsion, de composition lipidique identique mais formée de globules de 0,7  $\mu\text{m}$  de diamètre, est réarrangée dans l'estomac, suite à la fusion des

globules entre eux, jusqu'à atteindre une granulométrie de 2 à 6  $\mu\text{m}$  (Armand *et al.*, 1999). Pour autant, une émulsion fine n'est pas systématiquement réarrangée, puisqu'une préparation pour nouveau-nés prématurés constituée de globules lipidiques d'un diamètre médian d'environ 0,6  $\mu\text{m}$  (SMA Super Preemie, Wyeth-Ayerst) conserve cette granulométrie dans l'estomac des prématurés (Armand *et al.*, 1996b).

### **3.2.2. La structure des globules lipidiques**

#### *3.2.2.1. La répartition des lipides au sein des globules lipidiques*

Le mécanisme d'action des lipases sur les triglycérides organisés en globules lipidiques n'est pas encore bien connu. En ce qui concerne la lipase gastrique, Hamosh et collaborateurs ont suggéré que cette lipase de nature très hydrophobe puisse, grâce à cette propriété, entrer dans la monocouche ou la bicouche de phospholipides pour hydrolyser les molécules de triglycérides situées dans le cœur du globule lipidique (Hamosh, 1990). Concernant la lipase pancréatique, il a été proposé l'existence de peptides obliques, pouvant pénétrer dans la couche de phospholipides et permettre ainsi le recrutement des molécules de triglycérides à la surface (Thomas *et al.*, 2005), et on peut supposer, qu'il puisse en être de même pour la lipase gastrique et peut-être d'autres lipases. Toutefois, sachant que ces enzymes agissent à l'interface lipides/eau, on peut en déduire, qu'elles hydrolysent leur substrat seulement lorsqu'il se trouve à la surface des globules (Brockman, 1984). Ainsi, la répartition des triglycérides entre le cœur et la surface des globules lipidiques, est également un facteur physico-chimique clé de la biodisponibilité des acides gras. L'étude de lipoprotéines riches en triglycérides (Miller et Small, 1983) et d'émulsions alimentaires (Borel *et al.*, 1996) a montré, que les molécules de triglycérides représentent 2 à 5 moles % des lipides localisés à la surface des globules lipidiques, permettant ainsi l'action des lipases. Celle-ci serait entretenue par un renouvellement des triglycérides à l'interface lipidique, à partir du pool entrappé dans le globule.

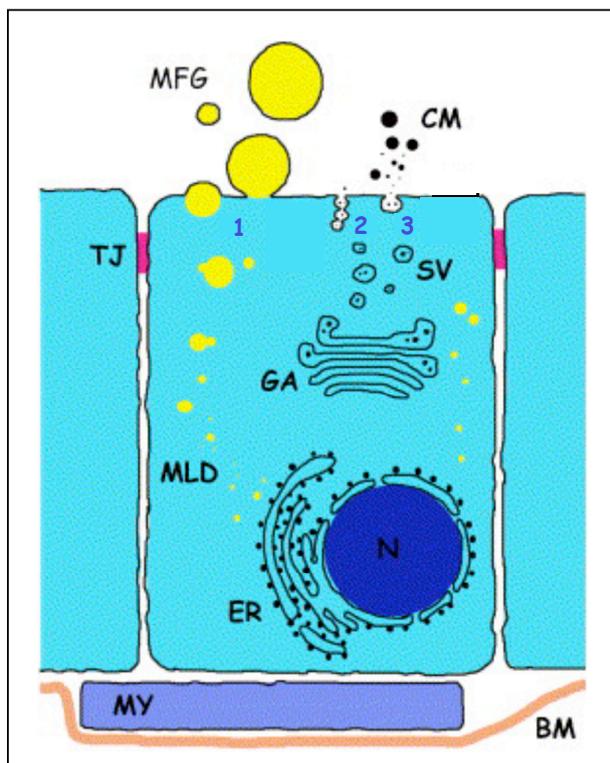
La distribution cœur/surface à l'intérieur des globules lipidiques n'affecte pas seulement la biodisponibilité des acides gras estérifiés sur les triglycérides alimentaires. Elle exerce également une influence directe sur la biodisponibilité de molécules lipophiles, comme les vitamines (Armand, 1998). En effet, les molécules majoritairement solubilisées dans le cœur sont entrappées à l'intérieur des globules lipidiques et ne peuvent être directement absorbées par l'entérocyte; leur libération en phase aqueuse dépend obligatoirement de la lipolyse des triglycérides. Par contre, les molécules majoritairement localisées en surface, sont plus vite libérées en phase aqueuse. Une étude, portant sur les carotènes, a établi une relation

entre leur localisation au sein des globules lipidiques et leur biodisponibilité (Borel *et al.*, 1996). Les émulsions de triglycérides et de phospholipides testées contenaient du  $\beta$ -carotène, molécule apolaire et donc localisée préférentiellement dans le cœur des globules, et de la zéaxanthine, plus polaire et donc distribuée majoritairement en surface. Cette distribution a effectivement eu une incidence sur la libération de ces molécules. En effet, après incubation en présence d'eau distillée ou d'un milieu renfermant des sels biliaries, la zéaxanthine commence à passer en phase aqueuse alors que le  $\beta$ -carotène n'est pas libéré. Puis, la libération de la zéaxanthine se poursuit rapidement après lipolyse pancréatique, tandis que le  $\beta$ -carotène est libéré séquentiellement au fur et à mesure de la lipolyse (Borel *et al.*, 1996).

### 3.2.2.2. L'organisation de la monocouche de surface

La présence et la quantité relative de certaines molécules dans la monocouche de surface des globules lipidiques (protéines, phospholipides, acides gras libres...) sont susceptibles de créer des conditions environnementales (concentration, pression, charges électrostatiques...), pouvant fortement moduler la conformation, la fixation, et de ce fait l'activité, des lipases. Un exemple peut être donné à travers les globules de lait humain. Ces derniers possèdent une organisation très particulière, du fait de leur synthèse et de leur sécrétion par la glande mammaire (Figures 8).

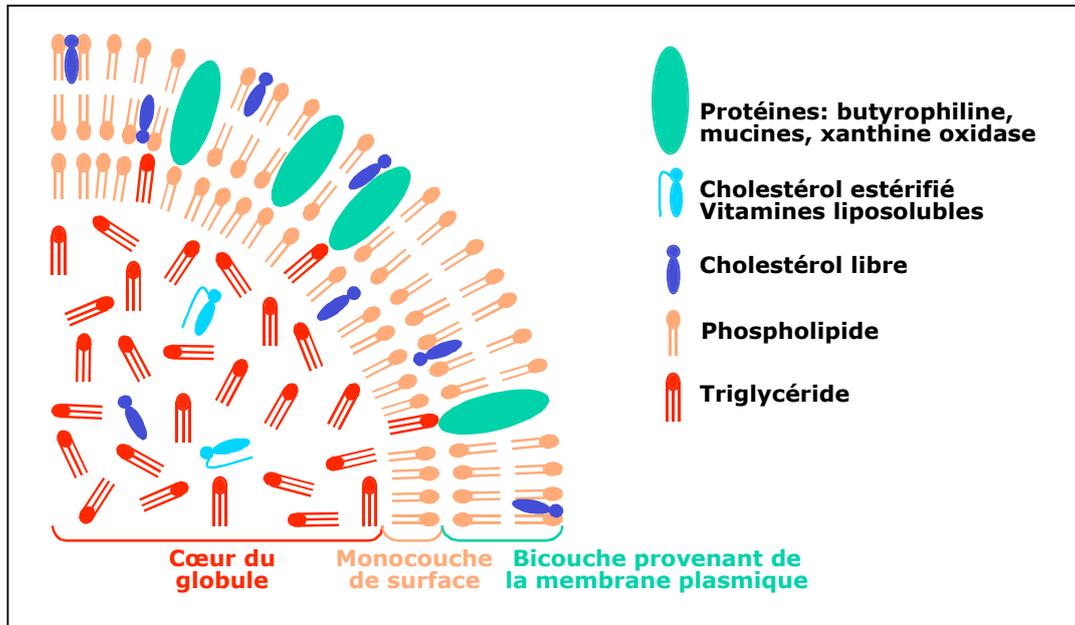
**Figure 8:** Représentation schématique de la formation et de la sécrétion des globules lipidiques du lait (D'après Heid et Keenan, *Eur J Cell Biol*, 2005, 84, 245-258).



(1) Sécrétion d'un globule lipidique par enveloppement dans la membrane apicale. (2) Sécrétion du sérum (phase non lipidique) du lait par exocytose des composés. (3) Sécrétion du sérum du lait par exocytose simple. Abréviations: CM, micelle de caséine; ER, réticulum endoplasmique; GA, Appareil de Golgi; MLD, micro-gouttelette lipidique; MFG, globule lipidique du lait; N, noyau; SV, vésicule de sécrétion; TJ, jonction serrée; MY, cellule myoépithéliale; BM, membrane basale.

Leur surface est constituée d'une monocouche de phospholipides, elle-même recouverte d'une bicouche phospholipidique contenant des protéines, provenant de la membrane apicale des cellules glandulaires au cours de l'exocytose (Keenan et Patton, 1995) (Figure 9).

**Figure 9:** Représentation schématique d'un globule de lait humain.



Il a été montré, chez l'enfant prématuré, que la digestion intragastrique des globules de lait humain est plus efficace (25 %) que celle des globules lipidiques d'une émulsion artificielle (13 %) (pour un apport lipidique identique de 6 g/kg de poids corporel/jour et pour des compositions en acides gras proches), et qu'il s'en suit une meilleure absorption des lipides (Armand *et al.*, 1996b). Ce résultat ne peut pas s'expliquer par une sécrétion plus élevée de lipase gastrique, ni par la composition en acides gras des triglycérides. Il ne peut pas non plus s'expliquer par la taille des globules lipidiques, puisque le diamètre des globules de lait humain (environ 4  $\mu\text{m}$ ) est supérieur à celui des globules de l'émulsion artificielle testée (environ 0,6  $\mu\text{m}$ ) (Armand *et al.*, 1996b), ce qui, étant donné l'impact de la granulométrie sur la digestion des lipides, aurait dû produire des résultats opposés à ceux obtenus. La meilleure digestibilité du lait humain pourrait donc être liée, au moins en partie, à l'ultrastructure particulière de ses globules, dont la monocouche de surface, constituée de trois couches de phospholipides et de protéines, présenterait une quantité plus importante de triglycérides accessibles aux lipases.

L'effet de la composition de la monocouche de surface des globules lipidiques sur la lipolyse peut également être illustré par l'impact de la présence d'acides gras libres sur

l'activité de la lipase gastrique. En effet, si les acides gras libres endogènes, c'est-à-dire ceux libérés par l'action de la lipase gastrique, entraînent une inhibition physiologique de cette enzyme (Pafumi *et al.*, 2002), il n'en va pas de même pour les acides gras libres exogènes. Il a été montré, que l'ajout d'acide oléique exogène à des émulsions préformées de trioléine et de phospholipides ne modifie pas notablement les paramètres cinétiques de leur hydrolyse *in vitro* dans des conditions proches de la physiologie, mais qu'en revanche, l'addition d'acide oléique au mélange trioléine-phospholipides à la concentration de 2 à 7 % avant l'émulsification augmente de 70 % le taux d'hydrolyse des émulsions (Pafumi *et al.*, 2002). Cet effet activateur, comme dans le cas du lait humain, ne peut pas être attribué à des différences dans la taille des globules lipidiques des émulsions sans et avec acide oléique (2, 2,5 et 1,3  $\mu\text{m}$  pour les émulsions contenant respectivement 0, 2 et 7 % d'acide oléique), mais pourrait s'expliquer par une modification de la composition de l'interface lipidique, due à l'incorporation des acides gras libres dans la monocouche de surface.

### **3.2.3. Les propriétés des molécules constitutives des globules lipidiques**

#### *3.2.3.1. Les triglycérides*

Les triglycérides, encore appelés triacylglycérols, sont constitués, comme cette seconde dénomination l'indique, par une molécule de glycérol, dont chacune des trois fonctions alcool est estérifiée par un acide gras. Ces trois acides gras, portés en position sn-1, sn-2 ou sn-3, peuvent être identiques ou différents, en terme de longueur et de degré d'insaturation de la chaîne hydrocarbonée. La nature et la position des acides gras estérifiés sur la molécule de glycérol, c'est-à-dire la structure des triglycérides, influence très fortement la biodisponibilité des acides gras, qui les constituent (Kritchevsky, 1995, Bell *et al.*, 1997). En effet, la structure des triglycérides joue un rôle déterminant à tous les niveaux du processus d'assimilation des acides gras, c'est-à-dire leur digestion, leur absorption et leur métabolisme.

#### Effet de la structure des triglycérides sur leur digestion

Premièrement, la structure des triglycérides gouverne la granulométrie des émulsions dans le tube digestif (Kimura *et al.*, 1994, Borel *et al.*, 1996b). La capacité des triglycérides à former des émulsions augmente avec le nombre d'atomes de carbone et le degré d'insaturation de la chaîne d'acide gras (Kimura *et al.*, 1994). Ces deux paramètres sont d'égale importance lorsqu'il s'agit de triglycérides d'une seule espèce moléculaire. En effet, le coefficient d'émulsification de la tricaproïne (acide caproïque: C6:0) est de 0,69 contre 0,74 pour la tricapyline (acide caprylique: C8:0), 1,00 pour la trioléine (acide oléique: C18:1), et

1,13 pour la trilinoléine (acide linoléique: C18:2) (Kimura *et al.*, 1994). Le degré d'insaturation prévaut lorsqu'il s'agit d'huiles. Le coefficient d'émulsification de l'huile de coprah, riche en acides myristique (C14:0) et laurique (C12:0), est de 0,87 et peut être augmenté à 1,02 en élevant le degré d'insaturation de cette huile par interestérisation enzymatique avec de l'acide linoléique, et le coefficient de l'huile de carthame est de 1,10 et peut être diminué à 1,00 par interestérisation avec de l'acide laurique (Kimura *et al.*, 1994). On peut ainsi, en modifiant le degré d'insaturation d'une huile, moduler ses propriétés émulsionnantes. Récemment, on a montré *in vitro* l'existence d'une corrélation négative entre la longueur des chaînes des acides gras et le diamètre médian de l'émulsion et, par conséquent, l'interface lipidique disponible. Il en est de même avec le degré d'insaturation (Borel *et al.*, 1996b). Cela pourrait éventuellement expliquer pourquoi une émulsion complexe fine (0,8 µm) de trioléine possède un caractère émulsionnant moins important dans le tube digestif (Borel *et al.*, 1994b) qu'une émulsion complexe fine (0,7 µm) constituée d'un mélange d'huile d'olive et d'huile de poisson (Armand *et al.*, 1999) (respectivement 13-19 µm versus 2-6 µm).

Deuxièmement, la structure des triglycérides influence la structure des globules lipidiques. En effet, elle détermine la quantité de molécules de triglycérides présentes dans la monocouche de surface des globules, ce qui est primordial si on considère que l'hydrolyse des triglycérides se déroule à la surface des globules lipidiques. Ainsi, en extrapolant des résultats obtenus avec des structures de type lipoprotéines, vésicules et micelles (Hamilton, 1989, Hamilton *et al.*, 1996), on peut avancer, que la proportion de triglycérides capables de se localiser à la surface des globules lipidiques varie en fonction de la longueur des chaînes d'acides gras estérifiées, et qu'elle augmente lorsque la longueur des chaînes diminue. À titre d'exemple, des triglycérides à chaînes moyennes (trioctanoïne) sont incorporés dans la monocouche de surface environ 4 fois plus que des triglycérides à chaînes longues (tripalmitine) (Hamilton *et al.*, 1996).

Troisièmement, la structure des triglycérides influence directement l'activité des lipases. En effet, les acides gras estérifiés en positions sn-1 et sn-3 sur la molécule de glycérol sont plus rapidement libérés lorsque leur chaîne est courte ou moyenne que lorsqu'elle est longue (Jandacek *et al.*, 1987).

#### Effet de la structure des triglycérides sur leur absorption

La structure des triglycérides joue également un rôle primordial sur leur absorption. Dans les conditions physiologiques normales, l'hydrolyse d'une molécule de triglycéride

libère une molécule de 2-monoglycéride, portant l'acide gras restant en position sn-2, et deux acides gras libres, provenant des positions sn-1 et sn-3. L'acide gras véhiculé par le 2-monoglycéride est plus efficacement absorbé que sous forme libre et reste ensuite estérifié en position sn-2 dans environ 75 % des triglycérides nouvellement synthétisés par les entérocytes puis relargués dans la circulation lymphatique (Mattson et Volpenhein, 1964, Innis et Dyer, 1997). En revanche, l'efficacité d'absorption des acides gras libérés par l'action des lipases va dépendre de leur capacité, soit à former au pH alcalin de l'intestin des savons insolubles en se complexant avec les cations divalents (calcium, magnésium), soit à être solubilisés dans les micelles de sels biliaires et les vésicules unilamellaires de phospholipides. Cette capacité des acides gras dépend directement de la longueur et du degré d'insaturation de leur chaîne, et d'après les données actuellement disponibles, on peut dire que les acides gras saturés à chaîne longue sont mal absorbés en présence de fortes concentrations de calcium ou de magnésium, lorsqu'ils sont estérifiés en position externe sur la molécule de glycérol (Tomarelli *et al.*, 1968, Filer *et al.*, 1969, Mattson *et al.*, 1979, Barnes *et al.*, 1974, Innis *et al.*, 1994). C'est ainsi qu'à granulométrie et ultrastructure similaires, le lait humain, qui contient de l'acide palmitique (C16:0) majoritairement estérifié en position sn-2 dans les triglycérides, est plus digeste pour l'enfant que le lait de vache, dont les acides palmitiques sont portés par les liaisons externes des molécules de glycérol (Tomarelli *et al.*, 1968, Chappell *et al.*, 1986, Bracco, 1994). Ces observations ont donné naissance aux triglycérides structurés, c'est-à-dire à des triglycérides synthétiques, dont l'estérification (nature et position des acides gras) a été contrôlée par interestérification chimique entre différents triglycérides naturels sélectionnés. On trouve, par exemple, les Betapol, dont 74 % des acides palmitique totaux sont estérifiés en position sn-2 (Lucas *et al.*, 1997). Leur utilisation dans un substitut de lait, par comparaison avec deux autres substituts présentant le même profil en acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés mais avec seulement 8 et 28 % des acides palmitiques totaux estérifiés en position interne, permet une meilleure absorption de l'acide palmitique, une meilleure absorption des lipides totaux, une moindre formation de sels de calcium dans l'intestin et une meilleure absorption du calcium (Lucas *et al.*, 1997). En utilisant des triglycérides structurés, renfermant de l'acide docosahexaénoïque (DHA) ou éicosapentaénoïque (EPA) en position sn-2 et des acides gras à chaînes moyennes en positions sn-1 et sn-3, on peut augmenter considérablement l'absorption et l'incorporation dans les chylomicrons de ces deux acides gras polyinsaturés essentiels, non seulement dans les conditions physiologiques normales (Christensen *et al.*, 1994 et 1995a), mais aussi dans l'insuffisance pancréatique et biliaire (Christensen *et al.*, 1995b) et dans le syndrome de l'intestin court (Tso *et al.*, 1999). De façon

similaire, des triglycérides structurés, renfermant de l'acide linoléique en position sn-2 et des acides gras à chaînes moyennes en positions sn-1 et sn-3, ont permis d'augmenter l'absorption de l'acide linoléique chez le rat (Jensen *et al.*, 1994, Mu et Hoy, 2000) et chez des patients atteints de mucoviscidose (McKenna *et al.*, 1985). Inversement, des triglycérides structurés ont également été conçus pour diminuer la biodisponibilité des acides gras dans les cas de désordres métaboliques (obésité, hyperlipidémies) pouvant entraîner la survenue de maladies cardiovasculaires, comme l'athérosclérose. En effet, des travaux ont montré, que l'acide stéarique, comme les autres acides gras à chaîne longue, est nettement moins bien absorbé lorsqu'il est estérifié en position externe sur la molécule de glycérol, toujours à cause de la tendance forte de ces acides gras à former des savons insolubles avec des cations divalents comme le calcium (Mattson *et al.*, 1979). Ces travaux ont permis au groupe Nabisco (East Hanover, NJ, USA) de mettre au point les Salatrim, qui constituent une famille hétérogène de triglycérides, composés d'au moins un acide stéarique en position externe sur le glycérol et d'un acide gras à chaîne courte (acide acétique, butyrique ou propionique), et qui apportent seulement 5 kcal/g au lieu de 9, à cause de la diminution de l'absorption des acides gras (Hayes *et al.*, 1994).

#### Effet de la structure des triglycérides sur leur métabolisme

La structure des triglycérides influence enfin de façon non négligeable leur métabolisme. En effet, la vitesse d'épuration des chylomicrons dans la circulation systémique est régulée par la nature de l'acide gras en position sn-2 des triglycérides; elle est plus lente pour l'acide palmitique, l'acide stéarique et les acides gras à 20 atomes de carbone, avec un effet particulièrement prononcé pour l'acide arachidique (Redgrave *et al.*, 1988). Des études menées chez le lapin et le singe soulignent également le rôle de la structure des triglycérides sur leur métabolisme (Kritchevsky *et al.*, 1982, Kritchevsky, 1995). Ces travaux montrent que l'huile d'arachide, malgré une faible proportion d'acides gras saturés (environ 19 %, contre 56 % d'acides gras monoinsaturés et 25 % d'acides gras polyinsaturés), est athérogène chez ces espèces, mais que sa randomisation réduit son pouvoir athérogène de 37 % chez le lapin (Kritchevsky, 1995) et diminue l'incidence de l'athérosclérose de 90 à 33 % chez le singe (Kritchevsky *et al.*, 1982). Les mécanismes impliqués dans ces effets restent inconnus, toutefois ils pourraient être liés à la position des acides gras sur la molécule de glycérol. En effet, l'huile d'arachide native possède davantage de triglycérides estérifiés par de l'acide linoléique en position sn-2 et par des acides gras saturés en position sn-1 et sn-3, que l'huile d'arachide randomisée.

### Modification de la structure des triglycérides dans les produits alimentaires

Ainsi, il est très clairement établi dans la littérature, que la structure des triglycérides influence très fortement la biodisponibilité des acides gras qui les constituent. Cette propriété a d'ores et déjà été largement confirmée, puis mise à profit à l'aide des triglycérides structurés. Il n'est donc pas surprenant, que l'étape suivante ait été d'essayer de modifier la structure des triglycérides directement dans les produits alimentaires. Et de fait, plusieurs types de supplémentation nutritionnelle (apportant davantage d'acides gras polyinsaturés à chaînes longues sous la forme d'huiles de poissons ou de céréales riches en ces acides gras) ont été mises en œuvre récemment pour modifier la nature et/ou la position des acides gras constitutifs des triglycérides, particulièrement dans les viandes de porc (Leskanich *et al.*, 1997), de bœuf (Mandell *et al.*, 1997) et de poulet (Howe *et al.*, 2002), dans les œufs (Van Elswyk, 1997), dans le lait de vache (Ward *et al.*, 2002) et dans le lait humain (Fidler *et al.*, 2000). Les différentes supplémentations alimentaires utilisées ont en général comme objectifs spécifiques de diminuer les teneurs en acides gras à chaînes moyennes, d'augmenter les teneurs en acides gras à chaînes longues, notamment en acide linoléique conjugué (dérivé de l'acide linoléique supposé réduire la masse adipeuse) et en acides gras polyinsaturés de la famille oméga 3 (en particulier le DHA), et de réduire les teneurs en acides gras saturés et de forme *trans* (athérogènes).

#### 3.2.3.2. *Les phospholipides*

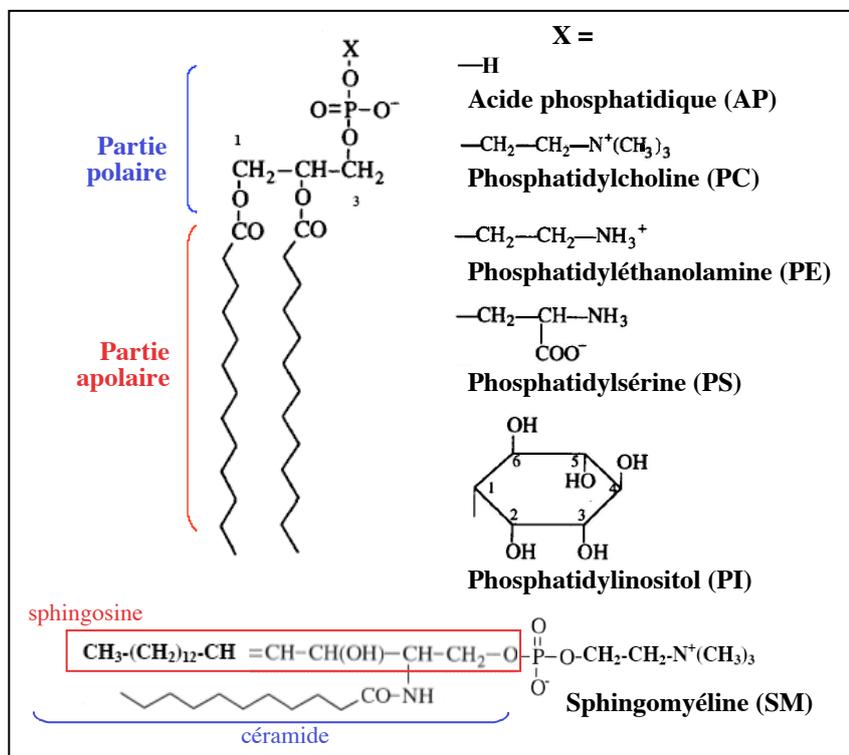
Le processus de digestion-absorption des triglycérides se déroule en présence de phospholipides d'origine alimentaire et biliaire (Figure 10). Le régime occidental apporte quotidiennement 2 à 8 g de phospholipides, sous forme de phosphatidylcholines et de phosphatidyléthanolamines (respectivement 70 et 30 % environ), et la sécrétion biliaire en apporte 7 à 22 g supplémentaires, sous la forme quasiment exclusive de phosphatidylcholines (Carey *et al.*, 1983, Homan et Jain, 2001). Contrairement aux triglycérides, il n'a pas encore été vraiment recherché, si le type et/ou la quantité de ces phospholipides est un facteur à prendre en compte dans la biodisponibilité des acides gras, que ce soit au niveau de l'estomac et du duodénum pour l'étape de digestion, ou au niveau des entérocytes pour les étapes d'absorption, de resynthèse et de sécrétion. Plusieurs travaux permettent néanmoins de penser, que le rôle des phospholipides devrait être étudié avec davantage d'intérêt.

#### Le choix du type de phospholipide

Nous avons vu, que chez l'enfant prématuré, la digestion intragastrique des globules de lait humain était plus efficace que celle des globules lipidiques d'une émulsion artificielle (Armand *et al.*, 1996b), et que cela pourrait s'expliquer par la présence de protéines et de trois

couches de phospholipides, au lieu d'une, à la surface des globules lipidiques. Cependant, cela pourrait également être expliqué par la composition en phospholipides de ces deux types de globules lipidiques. En effet, les globules d'émulsion artificielle ne renferment que des phosphatidylcholines, tandis que les globules de lait humain ont une composition spécifique en phospholipides, avec environ 20-37 % de phosphatidyléthanolamines, 27-30 % de phosphatidylcholines, 26-39 % de sphingomyélines, 5 % de phosphatidylinositols et 1-8 % de phosphatidylsérines (Jensen *et al.*, 1995, Keenan et Patton, 1995).

**Figure 10:** Formules des principaux phospholipides (d'après Schechter E, Dans: *Biochimie et biophysique des membranes*, 2<sup>nd</sup> édition, Masson, 1997).



Le type de phospholipide (sphingomyéline ou groupement porté par l'acide phosphorique —choline, inositol, éthanolamine, sérine- et profil en acides gras) semble également moduler l'action de la lipoprotéine lipase et de la lipase hépatique sur les lipoprotéines circulantes, en régulant l'interaction de ces enzymes avec la surface des lipoprotéines (Saito *et al.*, 2000, Abia *et al.*, 2003, Duong *et al.*, 2003). Par recoupement avec l'étude cinétique du mécanisme catalytique d'une lipase d'origine fongique (*Thermomyces lanuginosa*) en présence de phosphatidylglycérols ou de phosphatidylcholines, on peut supposer que le type d'interactions électrostatiques et hydrophobes entre le domaine liant les lipides de la lipase et les phospholipides de la surface des globules lipidiques module l'activité de l'enzyme (Cajal *et*

*al.*, 2000). En effet, l'activation interfaciale de cette lipase se produit sur des liposomes anioniques (stabilisés par les phosphatidylglycérols) de petit diamètre (40 nm), mais pas sur des liposomes zwitterioniques (stabilisés par les phosphatidylcholines) ou sur des liposomes anioniques de grand diamètre (100 nm), malgré une fixation sur toutes ces interfaces (Cajal *et al.*, 2000).

#### Le choix de la quantité de phospholipide

Alors que la présence de phospholipides inhibe l'hydrolyse des triglycérides par la lipase pancréatique, elle ne semble pas gêner l'action de la lipase gastrique (Hamosh, 1990). En effet, aux rapports triglycérides/phospholipides de 2,5/1 et 12,5/1, c'est-à-dire pour une quantité de phospholipides supérieure à celle trouvée dans l'alimentation (40/1) et le duodénum (10/1) (Armand *et al.*, 1996a), on n'observe pas de diminution de l'hydrolyse des triglycérides à chaîne longue (trioléine) ou à chaîne courte (trioctanoïne) par la lipase gastrique apportée sous forme de suc gastrique prélevé chez le nouveau-né (Hamosh, 1990). Concernant l'absorption, il a été montré chez le rat, qu'une supplémentation en phosphatidylcholine augmente la sécrétion des triglycérides dans la lymphe lorsque le rapport triglycérides/phospholipides dans la lumière duodénale est proche de 3/1 (environ 75 mg de triglycérides et 25 mg de phospholipides), et qu'on obtient le même effet lorsqu'on supplémente avec des lysophosphatidylcholines, c'est-à-dire le produit d'hydrolyse des phosphatidylcholines par les phospholipases pancréatiques (Nishimukai *et al.*, 2003). Cette étude confirme, que l'apport en phospholipides alimentaires et biliaires dans le duodénum est un facteur limitant de l'absorption intraluminaire des acides gras et de la formation des chylomicrons (Tso, 1994). Mais il ne semble pas, que la nature de l'acide gras estérifié sur les phosphatidylcholines joue un rôle dans ces deux phénomènes (Tso, 1994). L'effet bénéfique d'une supplémentation en phospholipides sur l'absorption des lipides a également été démontré dans une autre étude récente montrant, qu'une infusion entérale de liposomes riches en phospholipides et en cholestérol corrige partiellement la malabsorption lipidique chez des rats souffrant d'insuffisance biliaire (Nishioka *et al.*, 2004).

#### Les phospholipides comme vecteurs d'acides gras essentiels

Un dernier aspect, relatif au rôle des phospholipides dans la biodisponibilité des acides gras, retient de plus en plus l'intérêt des chercheurs actuellement. Il s'agit de considérer les phospholipides, non plus seulement comme des molécules susceptibles d'améliorer la digestion des triglycérides et par conséquent l'absorption des acides gras estérifiés sur ces derniers, mais comme des vecteurs à part entière des acides gras. Quelques études ont commencé à traiter de ce nouvel aspect, et prouvent que la biodisponibilité des acides gras

dépend aussi de la nature de leur vecteur lipidique, et que l'efficacité des différentes formes de vectorisation n'est pas la même selon l'acide gras considéré. Ainsi, tandis que la sécrétion lymphatique des acides gras monoinsaturés est la même, qu'ils soient vectorisés par des phospholipides ou des triglycérides (Cansell *et al.*, 2003), l'acide arachidonique (AA), quant à lui, est deux fois mieux incorporé puis maintenu dans le cerveau, le foie, les poumons, le plasma et les érythrocytes de babouins nouveaux-nés, quand il est apporté sous la forme de phospholipides plutôt que sous la forme de triglycérides (Wijendran *et al.*, 2002). Pour l'acide éicosapentaénoïque (EPA), il semble que la forme ester éthylique soit plus efficace que les formes triglycéride ou phospholipide pour augmenter les teneurs en EPA des phospholipides et des esters de cholestérol plasmatiques (Hamazaki *et al.*, 1987). L'absorption intestinale de l'EPA, mesurée par les teneurs retrouvées dans les phospholipides sériques, semble en tout cas de même efficacité sous la forme d'esters éthyliques que sous la forme d'esters de glycérol (naturellement présents dans l'huile de poisson), bien que les esters éthyliques soient responsables parallèlement d'une diminution de la teneur en AA dans ces mêmes phospholipides (Krokan *et al.*, 1993). Concernant l'acide docosahexaénoïque (DHA), il semble que sa biodisponibilité soit améliorée lorsqu'il est vectorisé par des phospholipides. En effet, il a été montré chez des nouveaux-nés prématurés, que l'absorption du DHA était augmentée avec un substitut de lait contenant cet acide gras essentiel sous la forme de phospholipides, par rapport au lait maternel ou à un autre substitut apportant le DHA sous la forme de triglycérides (Carnielli *et al.*, 1998). Une étude réalisée chez le rat montre, que l'administration intragastrique de liposomes à base de phospholipides marins, par comparaison avec de l'huile de poisson non émulsifiée et pour laquelle les acides gras sont estérifiés sur des triglycérides, permet d'améliorer l'absorption lymphatique des acides gras en général, et du DHA en particulier (Cansell *et al.*, 2003). Toutefois, l'utilisation simultanée des phospholipides et de l'administration sous la forme de liposomes, au lieu de triglycérides non émulsifiés, ne permet pas de déterminer, si l'effet obtenu est plutôt dû 1) à une meilleure digestion des liposomes par la phospholipase A2 sécrétée par rapport à la moins bonne hydrolyse des triglycérides de l'huile de poisson par la lipase pancréatique (Bottino *et al.*, 1967, Ikeda *et al.*, 1995), 2) à la meilleure stabilité oxydative du DHA estérifié sur des phospholipides et associé à la membrane de liposomes (Saito et Ishihara, 1997, Song *et al.*, 1997, Nara *et al.*, 1998), ou 3) au fait que l'administration de quantités importantes de phospholipides (environ 1 mg de phospholipides par kilogramme d'animal) favorise, comme nous l'avons déjà évoqué, l'absorption intraluminaire des acides gras et la formation des chylomicrons (Tso, 1994). Il est à noter d'ailleurs, à propos des chylomicrons, que si la

biodisponibilité du DHA dépend du type de vecteur utilisé (phospholipide ou triglycéride), son incorporation dans les phospholipides et les triglycérides des chylomicrons s'avère indépendante de ce facteur (Cansell *et al.*, 2003). Une étude récente a été conduite chez des sujets âgés supplémentés quotidiennement avec du DHA sous forme de glycérophospholipides d'œuf de poule (phosphatidylcholines et phosphatidyléthanolamines) à la dose recommandée en France par les Apports Nutritionnels Conseillés (Legrand *et al.*, 2001) d'environ 100 mg par jour (Payet *et al.*, 2004). Elle a permis d'obtenir une augmentation de la teneur en DHA des phospholipides de la membrane des érythrocytes, ainsi qu'une augmentation associée des teneurs en acide arachidonique dans ces mêmes membranes érythrocytaires, alors que le taux d'AA est habituellement très diminué lorsque le DHA est administré sous la forme de triglycérides (Nelson *et al.*, 1997, Rodriguez-Palmero *et al.*, 1997, Vidgren *et al.*, 1997, Wensing *et al.*, 1999). En plus d'une amélioration de la biodisponibilité de certains acides gras, les phospholipides semblent aussi pouvoir permettre un adressage spécifique de ces acides gras, en particulier du DHA, vers certains tissus cibles (Carrie *et al.*, 2000, Lagarde *et al.*, 2001, Mathews *et al.*, 2002), modulant ainsi à la fois la cinétique d'absorption de l'acide gras et son devenir métabolique (Lemaitre-Delaunay *et al.*, 1999). En effet, il a été montré chez des rats, dont la composition en acides gras du cerveau a été altérée par un régime déficient en acide alpha-linolénique, que l'apport de DHA sous la forme de phospholipides (jaune d'œuf ou cervelle de porc) permettait de rétablir très efficacement le statut en acides gras polyinsaturés (Carrie *et al.*, 2000). Le taux d'incorporation des acides palmitique et docosahexaénoïque alimentaires dans le cerveau des rats est plus élevé lorsque ces acides gras sont estérifiés sur des lysophosphatidylcholines que lorsqu'ils sont sous forme libre, même en présence d'une protéine transporteur des acides gras comme l'albumine (Thies *et al.*, 1992 et 1994). Cette captation des acides gras estérifiés sur les lysophosphatidylcholines semble de plus être spécifique au cerveau, puisqu'elle ne se produit pas pour d'autres organes comme le cœur, les reins ou le foie (Thies *et al.*, 1994). Cette spécificité semble elle-même liée à une spécificité de la barrière hémato-méningée, qui pourrait contenir un système facilitant le transport des lysophosphatidylcholines depuis le sang jusqu'au cerveau (Bernoud *et al.*, 1999). Une étude de l'incorporation du DHA dans les différentes classes de lipides du plasma, des plaquettes et des érythrocytes a permis de montrer, que le DHA estérifié sur des lysophosphatidylcholines s'accumulait dans les érythrocytes mais pas dans les plaquettes (Lemaitre-Delaunay *et al.*, 1999), ce qui permet de penser que l'accumulation du DHA dans les érythrocytes pourrait être un biomarqueur de l'accrétion des teneurs en DHA dans le cerveau (Innis, 1992, Brossard *et al.*, 1996).

L'adressage spécifique des acides gras par les phospholipides n'existe pas seulement pour le DHA, mais se produit aussi pour d'autres acides gras tels que l'acide linoléique (LA), comme l'a montré une étude de supplémentation (2,5 mg de LA par jour) menée chez des rats souffrant d'une déficience en acides gras essentiels suite à une cholestase hépatique (Werner *et al.*, 2004). Les acides linoléique et alpha-linolénique (respectivement 56-53 et 8 % des acides gras totaux) ont été administrés par voie orale, soit sous forme de phospholipides (5,8 g par jour), soit sous forme de triglycérides (5,6 g par jour), purifiés dans les deux cas à partir d'huile de soja crue. Au niveau du plasma et des érythrocytes, les deux formes de supplémentation se sont avérées d'une efficacité égale, en revanche, au niveau du cerveau et du foie, seule la forme phospholipide a permis de rétablir des concentrations satisfaisantes en acides arachidonique et docosahexaénoïque (Werner *et al.*, 2004).

## 4. L'objectif de la thèse

En l'état actuel de nos connaissances, il apparaît donc, que la biodisponibilité des nutriments lipidiques, et des acides gras en particulier, dépend d'un processus physico-chimique et enzymatique complexe, comprenant l'émulsification ou le réarrangement des lipides dans l'estomac, l'hydrolyse enzymatique par les lipases gastrique et pancréatique, la solubilisation des produits d'hydrolyse pour permettre leur absorption par les entérocytes, et, enfin, après resynthèse entérocytaire, le transport des nutriments lipidiques vers les différentes cellules utilisatrices de l'organisme. Ce processus, très efficace chez l'homme sain, peut conduire en cas de pléthore lipidique à des désordres métaboliques graves (hyperlipidémies, obésité), et plusieurs travaux sont orientés vers le développement de stratégies permettant de le réduire.

En revanche, ce processus se trouve altéré dans certains états physiologiques particuliers (nouveau-né et personne âgée) et dans diverses pathologies affectant le tractus digestif (mucoviscidose, pancréatite chronique, cholestase, maladie de Crohn). Cette altération réduit fortement la biodisponibilité des acides gras essentiels, indispensables au bon développement et au fonctionnement correct des cellules de l'organisme. La mise en évidence de stratégies pouvant permettre d'améliorer la biodisponibilité des nutriments lipidiques chez ces sujets a donc constitué l'objectif original de ma thèse.

Étant donné, que l'hydrolyse enzymatique des lipides alimentaires se déroule au niveau d'une interface lipidique, il était judicieux de focaliser mon travail au niveau des caractéristiques physico-chimiques de cette interface. Les deux propriétés de l'interface, que nous avons sélectionnées, à cause de leur impact fort sur l'activité des lipases digestives, sont la taille et la structure des globules lipidiques. L'objectif a été de modifier la superficie et la composition de la monocouche de surface des globules lipidiques en utilisant différentes molécules de type protéique et lipidique. En ce qui concerne ces dernières, notre choix s'est porté sur les acides gras libres, sur la base de travaux antérieurs réalisés au laboratoire (Pafumi *et al.*, 2002), et sur les phospholipides, sur la base d'études comparant la digestibilité gastrique des triglycérides du lait maternel et de substituts de lait ; en effet, nous avons émis l'hypothèse que la digestion du lait maternel était plus efficace grâce à la composition en phospholipides (nature, quantité et organisation) de la surface des globules lipidiques (Armand *et al.*, 1996b). Plus concrètement, nous avons voulu rechercher des molécules susceptibles de permettre la fabrication de globules lipidiques de très petite taille, qui conserveraient cette taille dans le tube digestif, et susceptibles d'assurer une conformation

structurale optimale des lipases digestives (lipases gastrique, pancréatique et stimulée par les sels biliaires) à l'interface lipidique, dans le but d'obtenir un rendement de lipolyse maximal, avec pour conséquence attendue une absorption plus efficace des nutriments lipidiques.

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 1. Lipidomique

### 1.1. Lipides et produits chimiques utilisés

Les phospholipides et les acides gras utilisés pour préparer les émulsions lipidiques ont été fournis par Sigma (références indiquées dans le Tableau 4), sauf les phosphatidylcholines et les phosphatidyléthanolamines estérifiées par du DHA (PC DHA et PE DHA) fournis par G. Pieroni (ISL, Valbonne, France) et les acides lysophosphatidiques estérifiées par des acides palmitiques ou oléiques (LPAp et LPAo) généreusement donnés par A. Tokumura (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University, Japon). Nous avons également acheté chez Sigma la trioléine (T-7140) et le cholestérol libre (C-8667). Les lipides radiomarqués ont été fournis par Perkin Elmer Life Sciences : trioléine tritiée (NET-431), acides oléique (NEC-317) et  $\alpha$ -linoléique (NEC-779) marqués au carbone 14, et par NEN Products : acides linoléique (NEC-501) et palmitique (NEC-075H) également marqués au carbone 14. Les différents solvants ont été commandés chez SDS : chloroforme (02437A21), méthanol (0933721) et hexane (052373021), chez Carlo Erba : éther (447541) et acide acétique (401391), et chez Merck : trifluorure de bore (8.01663.0100). Les tampons et solutions ont été préparés à l'aide de produits fournis par Sigma : acétate de sodium (S-3272), acide phosphomolybdique (P-7390), lactose (L-1768), taurocholate (T-4009), glycocholate (G-7132), taurochénodésoxycholate (T-6260) et glyochénodésoxycholate (G-0759), par Prolabo : chlorures de sodium (27 800.360) et de calcium (22 317.297), et par SDS : tris (1560517). La bile vésiculaire de porc (235 mM de sels biliaires et 19 mM de phospholipides) a été récupérée aux abattoirs de l'Estaque (Marseille, France) et la bile hépatique humaine (17-23 mM de sels biliaires) nous a été donnée généreusement par N. Domingo (INSERM-U476, Marseille, France). Les caséines et les protéines du lactosérum purifiées à partir de lait de vache ont été généreusement données par Y. Boirie (UMR Université/INRA-CRNH Clermont-Ferrand, France).

### 1.2. Préparation des émulsions lipidiques

#### 1.2.1. Composition des émulsions

Différentes émulsions, de composition lipidique proche de celle du lait humain (Jensen *et al.*, 1995), ont été préparées (Tableau 4).

**Tableau 4:** Composition spécifique des différentes émulsions lipidiques préparées.

Désignation de l'émulsion	Type et composition en acides gras des phospholipides utilisés, type d'acide gras libre éventuellement ajouté
CT	Mélange standard de phosphatidylcholines (PC) extraites du jaune d'œuf (38 % de $\beta$ -palmitoyl- $\gamma$ -linoléyl PC, 9 % de $\beta$ -stéaroyl- $\gamma$ -linoléyl PC, 22 % de $\beta$ -palmitoyl- $\gamma$ -linoléyl PC et 11 % de $\beta$ -stéaroyl- $\gamma$ -linoléyl PC) (P-3556)
AP	Acides phosphatidiques préparés à partir de phosphatidylcholines extraites du jaune d'œuf (P-9511)
PC L/P	$\beta$ -linoléyl- $\gamma$ -palmitoyl phosphatidylcholines (P-9648)
PC P/O	$\beta$ -palmitoyl- $\gamma$ -oléoyl phosphatidylcholines (P-4142)
PC O/P	$\beta$ -oléoyl- $\gamma$ -palmitoyl phosphatidylcholines (P-3017)
PC DHA <sup>1</sup>	Phosphatidylcholines extraites du jaune d'œuf, estérifiées par 35,0 % d'acide palmitique et 3,7 % d'acide docosahexaénoïque
PC DHA/S	$\beta$ -DHA- $\gamma$ -stéaroyl phosphatidylcholines, estérifiées par 54,9 % d'acide stéarique et 31,8 % d'acide docosahexaénoïque (P-5829)
SM	Sphingomyélines extraites du jaune d'œuf, estérifiées par 85,6 % d'acide palmitique et 8,2 % d'acide stéarique (S-0756)
PI	Phosphatidylinositols extraits du soja, estérifiés par 47,2 % d'acide palmitique, 32,0 % d'acide linoléique et 10,8 % d'acide stéarique (P-0639)
PE DHA <sup>1</sup>	Phosphatidyléthanolamines extraites du jaune d'œuf, estérifiées par 30 % d'acide docosahexaénoïque
PEO	Phosphatidyléthanolamines extraites du jaune d'œuf (P-6386)
PES	Phosphatidyléthanolamines extraites du soja, estérifiées majoritairement par de l'acide linoléique (P-8193)
PS	Phosphatidylsérines extraites du soja, estérifiées par 67,4 % d'acide linoléique, 15,8 % d'acide palmitique, 7,0 % d'acide $\alpha$ -linoléique et 6,4 % d'acide oléique (P-0474)
LHO	Mélange de phospholipides proche de celui des globules de lait humain : 27,5 % de PC (dont 1/3 de PC L/P, 1/3 de PC P/O et 1/3 de PC O/P), 8,4 % de PS, 19,9 % de PE (extraites du jaune d'œuf), 5,3 % de PI et 38,9 % de SM
LHS	Même mélange que LHO, mais avec des PE extraites du soja
LPAP <sup>2</sup>	Acides lysophosphatidiques, estérifiés majoritairement par de l'acide palmitique
LPAO <sup>2</sup>	Acides lysophosphatidiques, estérifiés majoritairement par de l'acide oléique
LPCO	Lysophosphatidylcholines extraites du jaune d'œuf, estérifiées par 66,7 % d'acide palmitique, 27,2 % d'acide stéarique et 1,3 % d'acide oléique (L-4129)
LPCS	Lysophosphatidylcholines extraites du soja, estérifiées par 51,7 % d'acide linoléique, 31,3 % d'acide palmitique, 5,0 % d'acide oléique, 4,5 % d'acide $\alpha$ -linoléique et 3,5 % d'acide stéarique (L-0906)
LPI	Lysophosphatidylinositols, estérifiés par 68,8 % d'acide palmitique, 16,6 % d'acide stéarique, 8,5 % d'acide linoléique et 0,9 % d'acide $\alpha$ -linoléique (L-7635)
LPE	Lysophosphatidyléthanolamines, estérifiées par 65,6 % d'acide stéarique, 31,7 % d'acide palmitique et 1,3 % d'acide oléique (L-4754)
LPS	Lysophosphatidylsérines estérifiées par 97 % d'acide palmitique (P-3401)
CT+OA	Mélange lipidique CT émulsifié en présence d'acide oléique (O-1008)
CT+LA	Mélange lipidique CT émulsifié en présence d'acide linoléique (L-1376)
CT+ALA	Mélange lipidique CT émulsifié en présence d'acide alpha-linolénique (L-2376)
CT+DHA	Mélange lipidique CT émulsifié en présence d'acide docosahexaénoïque (D-2534)
CT+PA	Mélange lipidique CT émulsifié en présence d'acide palmitique (P-0500)
PI+LA	Mélange lipidique PI émulsifié en présence d'acide linoléique
LHO+LA	Mélange lipidique LHO émulsifié en présence d'acide linoléique
LPI+LA	Mélange lipidique LPI émulsifié en présence d'acide linoléique

Phospholipides et acides gras fournis par Sigma (référence du produit indiquée entre parenthèses), sauf

<sup>1</sup> fournis par G. Pieroni, ISL, Valbonne, France et <sup>2</sup> généreusement donnés par A. Tokumura, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima University, Japon.

Les émulsions stabilisées par des phospholipides (CT, AP, PC L/P, PC P/O, PC O/P, PC DHA, PC DHA/S, SM, PI, PE DHA, PEO, PES, PS, LHO et LHS) contenaient 98,7 % de trioléine (TO), 0,5 % de cholestérol libre (CL) et 0,8 % de différents phospholipides (PL), employés seuls ou mélangés dans les proportions retrouvées dans le lait humain (mélanges LHO et LHS). L'émulsion CT correspondait à une émulsion contrôle utilisée en routine au laboratoire pour doser des activités de lipases (Pafumi *et al.*, 2002) ; elle a permis de comparer un mélange standard de phosphatidylcholines avec différents types isolés (PC P/O, PC O/P, PC DHA, PC DHA/S). L'insuffisance pancréatique étant caractérisée par une carence sévère en phospholipase A2 sécrétée, nous avons également testé des émulsions stabilisées par des lysophospholipides (LPAP, LPAo, LPCO, LPCS, LPI, LPE et LPS). Elles ont été préparées de telle sorte que le rapport molaire lysophospholipides/trioléine soit le même que le rapport molaire phospholipides/trioléine et contenaient donc 98,9 à 99 % de TO, 0,5 % de CL et 0,5 à 0,6 % de différents lysophospholipides. D'autre part, il a été montré au laboratoire, que l'ajout d'acide oléique exogène avant l'émulsification, en quantité proche de celle générée physiologiquement au cours de la lipolyse gastrique d'une émulsion de trioléine (environ 0,063  $\mu\text{mol}$  d'acide oléique par  $\mu\text{mol}$  de trioléine), stimulait l'action de la lipase gastrique (Pafumi *et al.*, 2002). Des émulsions enrichies avec différents types d'acides gras libres (AGL) ont donc été préparées, en ajoutant avant l'émulsification, dans certains des mélanges lipidiques déjà décrits, 2 % d'acide oléique (OA), d'acide linoléique (LA), d'acide alpha-linolénique (ALA), d'acide palmitique (PA), ou d'acide docosahexaénoïque (DHA).

### 1.2.2. Procédure d'émulsification

Les différents mélanges lipidiques ont été mis en solution dans du chloroforme/méthanol 2:1 (v/v). Afin de pouvoir quantifier le rendement de lipolyse, de la trioléine marquée au tritium (triolein [ $9,10\text{-}^3\text{H(N)}$ ], 22 Ci/mmol de TO) a été ajoutée en quantité suffisante pour obtenir une activité spécifique de 30 000 ou 90 000 dpm/ $\mu\text{mol}$  de TO, suivant les besoins de l'étude. Des acides gras marqués au carbone 14 (0,1 mCi/mL d'éthanol ou de méthanol) ont été ajoutés dans les émulsions enrichies en acides gras libres à raison de 12 000 dpm/ $\mu\text{mol}$  d'AGL. Les émulsions ont été fabriquées avec 100 mg de mélange lipidique, après évaporation du solvant sous flux d'azote et ajout de 3 mL d'eau distillée, pour obtenir 3,33 g de lipides pour 100 mL d'émulsion, puisque le lait humain contient entre 2,5 et 4 g de lipides pour 100 mL (Jensen *et al.*, 1995). L'émulsification a été réalisée par sonication à 20 décibels pendant 5 minutes (Microsonde et générateur de puissance Sonifier 250, Branson).

### 1.2.3. Caractérisation des émulsions

#### 1.2.3.1. Granulométrie

La taille et l'homogénéité des différentes émulsions ont été analysées, d'une part en mesurant les diamètres moyen et médian des globules lipidiques par diffraction laser, et d'autre part en observant les émulsions au microscope optique.

##### Analyse par diffraction laser

Les mesures ont été réalisées avec un Mastersizer microplus (Malvern), qui fonctionne selon la technique de la granulométrie laser. Les particules devant être mesurées sont diluées dans 100 à 120 mL d'eau distillée, puis mises en circulation dans une cellule traversée par un faisceau laser. Les particules sont éclairées par ce faisceau, qui est alors dévié de son axe. La quantité de lumière déviée et l'importance de l'angle de déviation permettent ensuite de mesurer avec précision la taille des particules. La lumière diffusée par l'échantillon est modélisée pour des sphères sur la base de la théorie de Mie, issue des équations de l'électromagnétisme de Maxwell. Cette théorie intègre que la lumière laser n'est pas seulement diffractée par la particule, mais qu'elle est aussi réfléchiée et diffusée, et pose que 1) la lumière incidente est une onde plane monochromatique, 2) la particule est sphérique, homogène, isotrope et d'indice de réfraction connu et 3) le milieu est transparent et ne présente pas d'absorption. Les intensités reçues aux différents angles par des photodiodes en silicium sont numérisées puis analysées par calcul sur des matrices inverses. Le résultat du calcul est présenté sous la forme d'une courbe de distribution en volume ou en aire, caractérisée par un diamètre moyen ( $D [4, 3]$ , moyenne algébrique de tous les diamètres mesurés), un diamètre médian ( $D (v, 0.5)$ , valeur du diamètre pour laquelle 50 % des globules lipidiques ont un diamètre supérieur et 50 % un diamètre inférieur) et un coefficient de variation. La gamme des diamètres mesurables avec notre appareil s'étend de 50 nm à 500  $\mu\text{m}$ .

##### Observation microscopique

Les émulsions (3  $\mu\text{l}$  d'émulsion placés extemporanément entre lame et lamelle) ont toutes été observées au même grossissement (objectif  $\times 32$ ) à l'aide d'un microscope DIALUX 20 (Leitz) et photographiées avec une caméra digitale LEICA DC100 associée au logiciel de stockage et d'analyse d'images LEICA IM500.

#### 1.2.3.2. Mesure du potentiel électrocinétique ou potentiel zêta

Une particule immergée dans un liquide se voit enveloppée dans une double couche de solvation. La première couche est définie par le plan de Stern et la seconde couche par le

plan glissant. Le potentiel électrocinétique ou potentiel zêta ( $\zeta$ ) est à la charge du plan glissant de la particule. Il est déduit de la mesure de la mobilité électrophorétique  $u$  de la particule, calculée à partir de sa vitesse de migration électrophorétique  $v$  dans un champ électrique  $E$  ( $u = v / E$ ). La mobilité électrophorétique  $u$  dépend du rayon, de la charge, de la force ionique de la solution et des particules présentes, ainsi que de la viscosité, et donc de la température ; elle est liée au potentiel zêta par la loi de Henry (1931):

$$\zeta = ( u 6 \pi \eta / \varepsilon ) / f(\kappa a)$$

où  $\zeta$  est le potentiel électrocinétique de la solution,  $u$  la mobilité électrophorétique des particules,  $\eta$  la viscosité de la solution,  $\varepsilon$  la constante diélectrique de la solution,  $a$  le rayon des particules et  $\kappa$  la force ionique de la solution d'après Debye.

Afin de s'assurer que les vitesses de migration électrophorétique mesurées sont uniquement l'effet du champ électrique appliqué, à l'exclusion de tout phénomène parasite, comme les réactions aux électrodes, les mouvements de convection dus à l'échauffement de l'échantillon par effet Joule et l'électro-osmose, la mesure de la mobilité électrophorétique doit s'effectuer au plan stationnaire, où la vitesse des particules tend vers une limite pour laquelle la somme des forces coulombiennes et de frottement est nulle. Cette précaution n'est plus nécessaire avec le Zetasizer Nano ZS (Malvern) que nous avons employé, qui utilise la technique de l'électrophorèse laser Doppler. La conversion en potentiel zêta des mobilités électrophorétiques mesurées a été paramétrée avec le modèle de couche de solvation de Smoluchowski (Michalski *et al.*, 2002), qui correspond au cas où la couche de solvation est fortement comprimée suivant une épaisseur très faible devant le rayon de la particule (cas d'un échantillon dispersé dans un milieu de potentiel chimique élevé, avec  $\kappa a$  proche de 1,5).

Le potentiel zêta des émulsions lipidiques a été mesuré le jour de leur préparation en double et à 37°C. Dix-sept conditions différentes ont été testées :

- condition 1 : émulsion non diluée ;
- condition 2 : émulsion diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau du robinet ;
- conditions 3 à 5 : émulsion mélangée à du tampon de lipolyse gastrique (acétate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 150 mM, chlorure de calcium 6 mM, pH 5,40) en absence ou en présence de lactose et de protéines de lait (caséines ou protéines du lactosérum) dans les proportions d'un test de digestion mais dilué au 1/3 dans de l'eau distillée ;
- conditions 6 à 17 : émulsion mélangée à du tampon de lipolyse intestinale (tris 80 mM, chlorure de sodium 150 mM, chlorure de calcium 10 mM, pH 7,00) contenant 2 ou 8 mM de sels biliaires (sous forme de bile vésiculaire de porc ou d'une solution contenant 84 mM de taurocholate, 44 mM de glycocholate, 52 mM de taurochenodésoxycholate et 20 mM de

glycochénodésoxycholate) en absence ou en présence de lactose et de protéines de lait (caséines ou protéines du lactosérum) dans les proportions d'un test de digestion mais également dilué au 1/3 dans de l'eau distillée.

La dilution des échantillons permettait de supprimer les phénomènes d'encombrement stérique, qui limitent la migration électrophorétique des particules. Afin de pouvoir comparer nos émulsions lipidiques avec une autre émulsion artificielle, le potentiel zéta d'une préparation pour nourrisson (lait Gallia 1<sup>er</sup> âge, Danone, reconstitué selon les instructions du fabricant) a été mesuré dans les différentes conditions précédentes.

Afin de pouvoir faire aussi des comparaisons avec des émulsions naturelles, des mesures de potentiel électrocinétique ont été effectuées sur différents laits humains (échantillons généreusement donnés par le Dr V. Millet, Service de Néonatalogie, Hôpital de la Conception, Marseille, France) et différents laits de jument (échantillons généreusement donnés par J.Y Gaget, Haras de Haflinger, Bourgogne, France). Ces échantillons, décongelés le jour de la mesure, ont été analysés dans trois conditions différentes: 1) sans dilution, 2) dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée, et 3) dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans une solution de chlorure de sodium à 9 ‰.

### **1.3. Caractérisation des phospholipides**

#### **1.3.1. Analyse qualitative et quantitative des acides gras des phospholipides par chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

Cette analyse a été réalisée afin de caractériser plus précisément le type d'acide gras estérifié sur quelques uns des phospholipides du commerce utilisés pour la préparation de nos émulsions. Les acides gras ont été rendus volatiles par méthylation en présence de trifluorure de bore (BF<sub>3</sub>-méthanol) (Ohta *et al.*, 1990) et le bon déroulement de la méthylation a été vérifié en chromatographie sur couche mince (feuilles d'aluminium 5x7,5 cm recouvertes de gel de silice Kieselgel, Merck) par migration dans un mélange d'hexane/éther/acide acétique 80:20:1 (v/v/v), puis révélation par immersion dans une solution éthanolique d'acide phosphomolybdique à 10 %, puis chauffage quelques minutes à 150°C pour carboniser les spots. Les esters méthyliques ont été extraits par ajout de 2 mL d'hexane et 2 mL d'eau distillée, suivi d'une centrifugation 5 minutes à 2000 rotations par minute (rpm), et du prélèvement de la phase hexane supérieure. Après évaporation du solvant sous flux d'azote, les esters méthyliques ont été resolubilisés dans de l'hexane à une concentration comprise entre 1 et 10 mg/mL pour procéder à l'analyse par CPG. Cette technique de chromatographie de partage met en jeu une phase mobile gazeuse et une phase stationnaire contenue dans une

colonne. Les échantillons vaporisés sont transportés par le gaz vecteur le long de la colonne, sur laquelle ils sont retenus par des interactions hydrophobes, puis de laquelle ils sont élués en fonction de leur masse et de leur polarité. L'appareil utilisé au laboratoire est un modèle Autosystem XL de Perkin Elmer, équipé d'une colonne capillaire de 30 m de long pour un diamètre extérieur de 0,25 mm recouverte d'une couche de polyéthylène glycol de 0,25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Le gaz vecteur est de l'hydrogène à la pression de 0,6 bar. Les différents esters méthyliques ont été élués suivant un programme de température (température initiale de 160°C augmentant d'1°C par minute jusqu'à 200°C) et détectés par ionisation de flamme (les molécules éluées sont brûlées en cations hydrocarbonés, qui génèrent un signal électrique converti en pic sur le chromatogramme de résultats). Du point de vue qualitatif, chaque composé possède un temps de rétention spécifique, et du point de vue quantitatif, la proportion du composé par rapport aux acides gras totaux est définie par l'aire de son pic (intégrée et normalisée).

### **1.3.2. Analyse de la compressibilité de certains lipides par la technique des films monomoléculaires**

#### *1.3.2.1. Principe de la technique*

La technique des films monomoléculaires, encore appelée technique des monocouches, découle des travaux du physicien américain Langmuir et de son assistante Miss Blodgett, qui mirent en évidence le fait qu'une goutte d'huile (molécule amphiphile) déposée sur une surface statique d'eau s'étale jusqu'à former un film monomoléculaire. La préparation d'une monocouche consiste donc à étaler des molécules lipidiques dissoutes dans un solvant organique volatil sur une solution tampon (appelée subphase), afin d'obtenir, après évaporation du solvant, des molécules libres à l'interface eau/air. Leur compressibilité peut alors être étudiée à l'aide d'une balance de Langmuir. Celle-ci est constituée d'une cuve et de deux barrières mobiles entièrement recouvertes de téflon, seul matériau capable d'assurer l'uniformité du film. La force exercée par la monocouche sur les barrières qui limitent son étalement est transmise à un galvanomètre par l'intermédiaire d'une lamelle, mobile dans le plan vertical, plongée dans la monocouche. Le galvanomètre envoie alors un courant qui permet de compenser exactement la force exercée par la monocouche, et la valeur du courant donne la valeur de la pression de surface de la monocouche. En resserrant lentement les barrières mobiles de la balance, on compacte les molécules lipidiques les unes sur les autres, ce qui entraîne une augmentation de la pression de surface et force les molécules à s'orienter dans l'axe vertical afin qu'elles minimisent l'aire occupée individuellement. En représentant

l'évolution de la pression de surface en fonction de l'aire accessible à chaque molécule amphiphile (appelée aire moléculaire) durant la compression de la monocouche, on obtient une isotherme de compression.

### 1.3.2.2. Déroulement de la mesure

La balance de Langmuir a été placée dans une enceinte thermostatée à 37°C. Entre chaque mesure, la cuve, les barrières et la lamelle du galvanomètre ont été soigneusement nettoyées par rinçages successifs à l'eau distillée, à l'éthanol, puis à nouveau à l'eau distillée (le téflon, très fragile, ne doit pas être rayé). L'utilisation de la technique des monocouches ayant pour objectif d'élucider les mécanismes par lesquels les phospholipides modulent la lipolyse gastrique, la subphase utilisée était du tampon de lipolyse gastrique (acétate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 150 mM, chlorure de calcium 6 mM, pH 5,40). Ce tampon a été chauffé à 37°C, puis filtré (filtre Express™ PLUS 0,22 µm, Millipore). Après avoir nettoyé la surface de la subphase au moyen d'une des barrières, 10 à 30 µg des lipides choisis (solutions à 10 mg/mL dans du chloroforme/méthanol 2:1) ont été déposés très délicatement avec une seringue Hamilton (rincée trois fois dans l'éthanol, trois fois dans l'eau distillée et trois fois dans le chloroforme/méthanol 2:1 avant chaque dépôt). La quantité de lipide déposée devait être suffisamment grande pour atteindre l'affaissement du film lipidique avant que les barrières mobiles n'aient terminé leur course, mais suffisamment petite pour que les molécules ne soient pas d'emblée compactées. Le dépôt adéquat correspondait à une pression de surface initiale comprise entre 0,2 et 1,5 mN/m selon la molécule lipidique. La compression (à la vitesse de 10 mm par minute) était lancée après stabilisation de cette pression de surface initiale. Le logiciel associé à notre balance de Langmuir indiquait l'évolution de la pression de surface en fonction de l'aire totale occupée par la monocouche. Les isothermes de compression ont été obtenues en calculant l'aire moléculaire avec la formule suivante :

$$\text{Aire moléculaire (Å}^2\text{/molécule)} = \frac{\text{Aire totale occupée par la monocouche (Å}^2\text{)}}{\text{Nombre de molécules déposées}}$$

où

$$\text{Nombre de molécules déposées} = \text{Nombre d'Avogadro} \times \frac{\text{Masse de lipide déposée (g)}}{\text{Masse moléculaire du lipide (g/mol)}}$$

A partir de ces isothermes de compression, la compressibilité des différents lipides testés a été déterminée en représentant l'évolution de l'inverse de la pente de l'isotherme de compression en fonction de la pression.

## 2. Méthodes enzymatiques

### 2.1. Lipides, lipases et produits chimiques utilisés

Lorsque nécessaires, les lipides et produits chimiques déjà utilisés en lipidomique ont été commandés chez les fournisseurs déjà indiqués au paragraphe 1.1. La tributyrine a été achetée chez MP Biomedicals (103111), la soude chez Carlo Erba (480921), et le taurodésoxycholate (T-0875) et l'albumine sérique bovine (A-6003) chez Sigma. Sigma nous a également fourni la pancréatine (P-7545) et la colipase de porc (C-3028), tandis que la lipase pancréatique de porc a été achetée chez Boehringer-Mannheim (644 072). SDS nous a fourni l'acide chlorhydrique (1010515) et l'heptane (0500516), Prolabo le véronal (23 401.182), Acros Organics la gomme arabique (40 000-5 000) et Sigma le carbonate de potassium (P-5833), l'acide borique (P-7660) et les pastilles à dissoudre pour obtenir le tampon phosphate (P-4417). Packard Biosciences nous a, enfin, fourni les scintillants pour compter la radioactivité : Emulsifier Safe (6013389) et Insta-fluor Plus (6013127).

### 2.2. Mesure de l'activité des différentes enzymes dans les conditions biochimiques

#### 2.2.1. La lipase gastrique

Les sucs gastriques ont été recueillis chez des patients par tubage naso-gastrique, dans des conditions basales et après stimulation par la pentagastrine, à raison de 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids corporel (Dr J. Peyrot, Service d'Hépatogastroentérologie, Laboratoire d'exploration fonctionnelle, Hôpital Nord, Marseille, France). La lipase gastrique de différents sujets, pour lesquels l'exploration fonctionnelle n'a pas montré de pathologie gastro-intestinale, a été purifiée au laboratoire en suivant la procédure de Tirupathi et Balasubramanian (1985). La mesure de l'activité lipolytique des sucs gastriques et des lipases purifiées a été réalisée par la technique du pH stationnaire à l'aide d'un pH-stat Metrohm (Roucaire), en se plaçant à 37°C, pH 5,40 (pH optimum d'action de l'enzyme), et en présence d'un excès de substrat à chaîne courte (la tributyrine). Au cours de l'hydrolyse des triglycérides, les acides gras générés s'ionisent plus ou moins en fonction de leur pKa et libèrent ainsi des protons qui acidifient le milieu réactionnel ; la diminution du pH est alors compensée par l'ajout de soude (N/50) versée automatiquement par une pompe dans le milieu réactionnel ; la mesure graphique du volume de soude versé, faite par un enregistreur, indique directement la quantité de micromoles d'acides gras libérés par minute, qui est ensuite traduite en activité lipase exprimée en unités U (1U = 1  $\mu\text{mol}$  d'AG libérée/min). Sachant qu'à pH 5,40 seulement 70 % des acides gras libérés sont ionisés et donc titrables, on réalise une titration en point final des

acides gras restants en ajoutant de la soude jusqu'à atteindre un pH de 9,40. Il faut donc réaliser, avant le dosage proprement dit, un contrôle pour évaluer la quantité de soude nécessaire pour augmenter le pH de 5,40 à 9,40 en dehors de toute lipolyse. Le milieu réactionnel contenait 0,5 mL de tributyrine, 333  $\mu$ L de taurodésoxycholate à 90 mM (soit 2 mM final), 50  $\mu$ l d'albumine sérique bovine (BSA) dépourvue d'acides gras à 3% (soit 1,5  $\mu$ M final) (Gargouri *et al.*, 1986a) et du tampon acétate de sodium 5 mM, chlorure de sodium 150 mM, chlorure de calcium 6 mM, pH 5,40 (qsp 15 mL).

### **2.2.2. La lipase pancréatique**

La pancréatine (poudre de pancréas de porc) a été préparée en solubilisant 1 g de poudre dans 10 mL d'eau distillée. Les débris insolubles ont été éliminés par quatre centrifugations successives 5 minutes à 2000 rpm. La lipase pancréatique de porc purifiée lyophilisée a été reprise dans de l'eau distillée, et la concentration en protéines a été déterminée avec le kit de dosage BCA Protein Assay Kit (Pierce). Une solution de lipase pancréatique purifiée par les soins de G. Pieroni (Roverly *et al.*, 1978) a également été utilisée. La mesure de l'activité enzymatique de ces différentes sources de lipase pancréatique avec un pH-stat Metrohm (Roucaire) a été réalisée à 37°C, pH 7,00 (pH physiologique d'action de l'enzyme), et en présence d'un excès de substrat à chaîne courte (la tributyrine) selon le même principe titrimétrique que la lipase gastrique, mais sans dosage en point final, et en adaptant le milieu réactionnel: 0,5 mL de tributyrine, 1,35 mL de taurodésoxycholate à 90 mM (soit 8 mM final), et du tampon tris 2 mM, chlorure de sodium 150 mM, chlorure de calcium 10 mM, pH 7,00 (qsp 15 ml). Pour la lipase purifiée, l'activité a été mesurée en rajoutant dans le milieu réactionnel, 5 minutes avant l'enzyme, de la colipase de porc au rapport molaire lipase/colipase 1:1. La colipase lyophilisée a été reprise dans du tampon tris 2 mM, chlorure de sodium 150 mM, chlorure de calcium 10 mM, pH 8,00 et sa concentration a été déterminée avec le kit de dosage BCA Protein Assay Kit.

### **2.2.3. La lipase stimulée par les sels biliaires (BSSL)**

Les différents échantillons de BSSL utilisés ont été généreusement fournis par le Professeur Olle Hernell dans le cadre d'une collaboration avec son équipe (Pr O. Hernell, Dr S. Lindquist et Dr L. Bläckberg, Department of Clinical Sciences, Umea University, Umea, Suède). Les lipases, purifiées à partir de lait humain selon la technique mise au point dans leur laboratoire (Bläckberg et Hernell, 1981) ou recombinantes (produites dans des cellules CHO, Chinese Hamster Ovary), ont été reprises dans du tampon phosphate à 10 mM et leur

concentration en protéines a été déterminée avec le kit de dosage BCA Protein Assay Kit, Pierce).

#### 2.2.3.1. Mesure sur tributyrine

La mesure de l'activité enzymatique des différents échantillons de BSSL sur substrat à chaîne courte (tributyrine) a été réalisée par titrimétrie avec un pH-stat Metrohm (Roucaire), à 37°C, pH 7,00 (pH physiologique d'action de l'enzyme), et en présence d'un excès de substrat. Le milieu réactionnel contenait 0,5 mL de tributyrine, 333 µL de taurodésoxycholate à 90 mM (soit 2 mM final) et du tampon tris 2 mM, chlorure de sodium 150 mM, chlorure de calcium 10 mM, pH 7,00 (qsp 15 mL).

#### 2.2.3.2. Mesure sur trioléine

La mesure de l'activité enzymatique des différents échantillons de BSSL sur substrat à chaîne longue (trioléine) a été réalisée selon le protocole de Freed *et al.* (1986a) adapté de la technique originale décrite par Hernell et Olivecrona (1974). Ce protocole, établi pour du lait humain, a été adapté par nos soins pour de la lipase purifiée.

#### Préparation de l'émulsion substrat

Une solution contenant 26 µl de trioléine et 60 µl de trioléine marquée au tritium (triolein [9,10-<sup>3</sup>H(N)], 1 mCi dans 2 mL de toluène/éthanol 1:1) a été préparée dans 500 µl de chloroforme/méthanol 2:1 (v/v). Le mélange a été vortexé soigneusement, avant évaporation complète des solvants sous flux d'azote, et ajout d'1 mL de gomme arabique à 10% et 1 mL de tris-HCl 1M pH 9,00. La mise en émulsion a été réalisée en soniquant le mélange deux fois deux minutes (position: 3 et fréquence de pulsation: 50%) avec une minute d'arrêt entre les deux (sonicateur Sonifier 250, Branson), puis l'émulsion obtenue a été caractérisée par un comptage de la radioactivité (scintillant Emulsifier Safe et Compteur Tri-Carb 1600 TR, Packard) et une mesure de la granulométrie (Mastersizer microplus, Malvern).

#### Composition du milieu réactionnel

Chaque milieu réactionnel contenait:

- 25 µL d'émulsion substrat;
- 30 µL de chlorure de sodium 1M;
- 6 µL de taurocholate à 400 mM;
- 30 µL d'albumine sérique bovine (BSA) à 18,7% pH 9,00;
- 59 µL d'eau distillée (qsp 150 µL);

- et une prise d'essai de 33,25 ou 16,625 ng de BSSL solubilisés dans 50 µL volume final d'eau distillée (ce qui correspond respectivement à la quantité de BSSL présente en moyenne dans 50 et 25 µL de lait humain dilué au 1/200<sup>e</sup> dans du tampon véronal).

Au final, les 200 µL de milieu réactionnel contenaient ainsi 1,6 mM de trioléine, 60 mM de tris-HCl, 150 mM de chlorure de sodium, 12 mM de taurocholate et 2,8% de BSA.

#### Déroulement du dosage

Les échantillons de BSSL ont été ajoutés extemporanément dans le milieu réactionnel et les dosages ont été menés pendant 15 minutes à 37°C dans un bain-marie thermostaté agitant réglé à 140 rpm/min. Pour les dosages blancs, l'échantillon a été remplacé par du tampon véronal 5 mM pH 7,40. Les réactions ont été stoppées par l'ajout de 3,25 mL d'une solution d'heptane/chloroforme/méthanol 100:125:141 (v/v/v) et 1,05 mL de tampon carbonate de potassium 50 mM, acide borique 50 mM, pH 10,50 (Belfrage et Vaughan, 1969). Après centrifugation 15 minutes à 1000 rpm et 22°C (extraction de 70 % des acides gras), 600 µL des 2,45 mL totaux de la phase surnageante contenant les acides gras ont été récupérés dans un pot de comptage, pour quantification de la radioactivité dans un compteur Tri-Carb 1600 TR (Packard), après ajout de scintillant (Emulsifier Safe) et homogénéisation. Pour déterminer la radioactivité totale de départ, 150 µl de milieu réactionnel mélangés à 600 µL de phase supérieure d'une extraction sans échantillon (c'est-à-dire seulement 3,25 mL de la solution d'heptane/chloroforme/méthanol et 1,05 mL du tampon carbonate de potassium) ont été comptés selon le même protocole.

#### Évaluation de l'activité de la BSSL

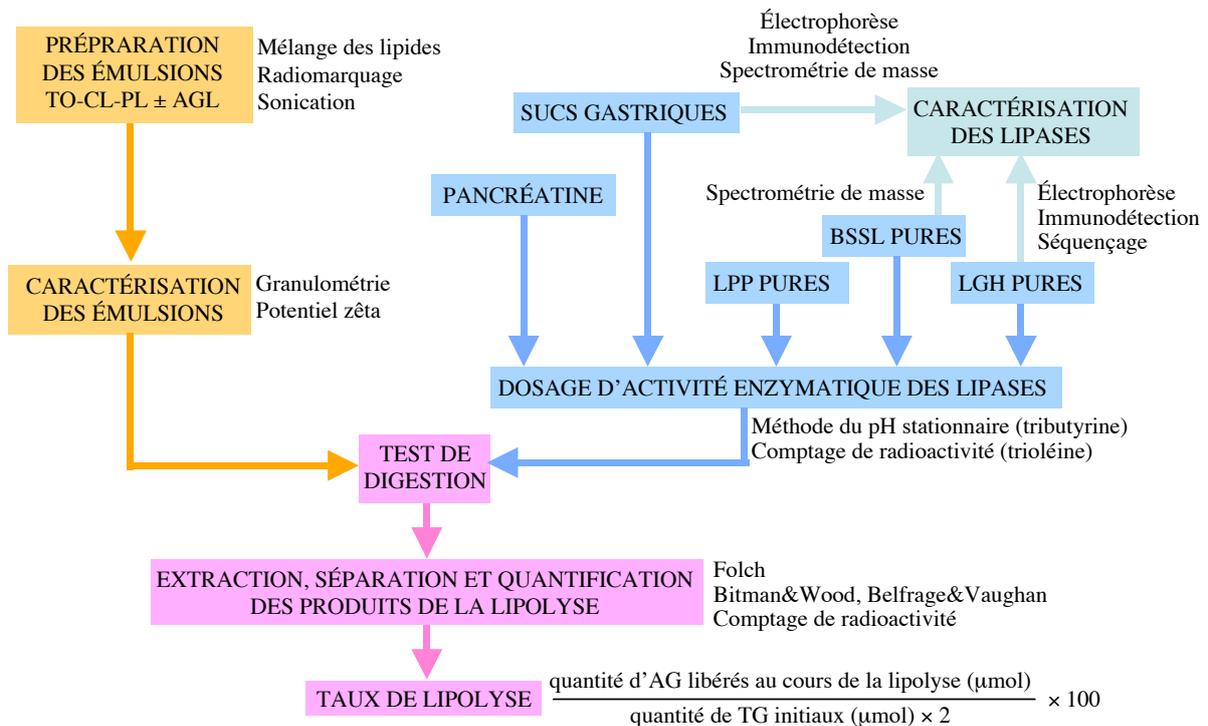
L'activité de la lipase, exprimée en µmol d'AG libérées par minute par mL de solution (c'est-à-dire en U/mL), a été calculée à partir des résultats de comptage de radioactivité, exprimés en désintégrations par minute (DPM), en appliquant la formule suivante:

$$\frac{(\text{DPM échantillon} - \text{DPM dosage blanc}) \times 2,45 \text{ mL} \times 100 \times 0,99 \text{ } \mu\text{mol} \times 1000}{0,600 \text{ mL} \times 70 \times \text{DPM totale de départ} \times 15 \text{ min} \times \text{prise d'essai en } \mu\text{L}} = \mu\text{mol AG libérée/min/mL}$$

## 2.3. Mesure de l'activité des différentes enzymes dans les conditions proches de la physiologie: test de digestion

La figure 11 résume les différentes étapes impliquées dans un test de digestion.

**Figure 11:** Schématisation des différentes étapes d'un test de digestion *in vitro* dans des conditions proches de la physiologie.



Abréviations : TO, trioléine ; CL, cholestérol libre ; PL, phospholipide ; AGL, acide gras libre ; LGH, lipase gastrique humaine ; LPP, lipase pancréatique de porc ; BSSL, lipase stimulée par les sels biliaires ; AG, acide gras ; TG, triglycéride.

### 2.3.1. Déroulement de la lipolyse en phase gastrique

Le protocole utilisé mimait les conditions physiologiques de l'adulte sain dans la première heure de digestion et celles de l'enfant prématuré durant l'ensemble de la phase gastrique : 37°C (au moyen d'un bain-marie thermostaté agitant réglé à 140 rpm/min), pH 5,40 (en effet, chez l'enfant prématuré, le pH gastrique se maintient à 5-6 sur trois heures de digestion) et rapport lipase/substrat physiologique [lipase gastrique (en U mesurées sur tributyrine)] / [TO (en  $\mu\text{mol}$ )] égal à 2 (Carrière *et al.*, 1993, Armand *et al.*, 1994).

Le milieu réactionnel dans les tubes eppendorf (500  $\mu\text{L}$  de volume final) comprenait:

- 9,25 U d'enzyme, soit un volume déterminé d'après le dosage d'activité sur tributyrine ;

- 4,625  $\mu\text{mol}$  de TO, soit un volume calculé d'après l'activité spécifique du mélange lipidique et la mesure de la radioactivité totale de l'émulsion ;

- et du tampon à pH 5,40 permettant d'obtenir une concentration finale de 50 mM d'acétate de sodium, 150 mM de chlorure de sodium et 6 mM de chlorure de calcium.

La lipase gastrique (sous forme de suc gastrique ou purifiée) a été ajoutée extemporanément et la lipolyse a été stoppée au bout de 60 minutes.

### **2.3.2. Déroulement de la lipolyse en phase intestinale**

#### *2.3.2.1. En présence de lipase pancréatique de porc*

Les réactions ont été menées dans des conditions physiologiques, c'est-à-dire à 37°C (au moyen d'un bain-marie thermostaté agitant réglé à 140 rpm/min) et avec un rapport lipase/substrat physiologique [lipase gastrique (en U mesurées sur tributyrine)] / [TO (en  $\mu\text{mol}$ )] égal à 20. Différentes valeurs de pH ont été testées (3, 4, 5, 6 et 7), ainsi que différentes concentrations en sels biliaires, pour mimer les conditions physiologiques normales (8 mM) ou de l'insuffisance pancréatique (2 et 3,5 mM). Différentes sources de sels biliaires ont également été utilisées: de la bile vésiculaire de porc et de la bile hépatique humaine (concentrée 10 fois, pour se rapprocher de la concentration totale de la bile vésiculaire humaine).

Le milieu réactionnel dans les tubes eppendorf (500  $\mu\text{L}$  de volume final) comprenait:

- 92,5 U d'enzyme, soit un volume déterminé d'après le dosage d'activité sur tributyrine ;  
- 4,625  $\mu\text{mol}$  de TO, soit un volume calculé d'après l'activité spécifique du mélange lipidique et la mesure de la radioactivité totale de l'émulsion ;

- 2, 3,5 ou 8 mM de sels biliaires ;

- et du tampon à pH 7,00 permettant d'obtenir une concentration finale de 80 mM de tris, 150 mM de chlorure de sodium et 10 mM de chlorure de calcium (ou de 80 mM d'acétate de sodium à la place du tris pour les pH 3, 4, 5 et 6).

Ont été ajoutées extemporanément, soit la pancréatine, soit la colipase de porc, en quantité suffisante pour obtenir un rapport molaire lipase/colipase de 1:1, puis la lipase. La lipolyse a été stoppée au bout de 15 minutes, soit après un temps d'incubation suffisant pour obtenir un rendement de lipolyse maximal (d'après plusieurs essais préliminaires réalisés sur 15, 30 et 60 minutes).

Dans certaines expérimentations, la lipolyse duodénale a été menée immédiatement après les 60 minutes de lipolyse gastrique. Dans ces cas, aux 500  $\mu\text{L}$  de milieu réactionnel de la phase gastrique précédente ont été ajoutés:

- 100 µl d'un tampon permettant d'obtenir une concentration finale de 80 mM de tris, 150 mM de chlorure de sodium et 10 mM de chlorure de calcium;
- 2, 3,5 ou 8 mM de sels biliaires ;
- de l'eau distillée qsp 700 µl (volume réactionnel final);
- et 92,5 U de pancréatine, déterminées d'après le dosage d'activité sur tributyrine.

A la fin des 60 minutes de digestion gastrique, on ajoute le tampon de lipolyse intestinale et le mélange bile/eau, puis on attend 5 minutes avant d'ajouter la pancréatine, pour permettre au pH de remonter de 5,40 à 7,00.

#### 2.3.2.2. En présence de BSSL

Comme pour les deux autres lipases, les lipolyse se sont déroulées à 37°C, au moyen d'un bain-marie thermostaté agitant réglé à 140 rpm/min. La quantité physiologique d'enzyme purifiée utilisée à été déterminée par la quantité de BSSL (en µg) présente par µmol de triglycérides dans le lait humain, sachant qu'on trouve dans 100 mL de lait environ 13,3 mg de BSSL (Strömquist *et al.*, 1997) et 3,5 g de lipides (Jensen, 1995). Différentes valeurs de pH (5, 6 et 7) et différentes concentrations en sels biliaires ont été testées (2, 5 et 8 mM), ainsi que différentes sources de sels biliaires: de la bile vésiculaire de porc, de la bile hépatique humaine (concentrée 10 fois) et une solution contenant 84 mM de taurocholate, 44 mM de glycocholate, 52 mM de taurochenodésoxycholate et 20 mM de glycochénodésoxycholate, correspondant à la composition physiologique retrouvée chez l'enfant prématuré (mélange de Jarvenpaa, Jarvenpaa *et al.*, 1983).

Le milieu réactionnel dans les tubes eppendorf (500 µL de volume final) comprenait:

- 15 µg d'enzyme;
- 4,625 µmol de TO, soit un volume calculé d'après l'activité spécifique du mélange lipidique et la mesure de la radioactivité totale de l'émulsion ;
- 2, 5 ou 8 mM de sels biliaires;
- et du tampon à pH 7,00 permettant d'obtenir une concentration finale de 80 mM de tris, 150 mM de chlorure de sodium et 10 mM de chlorure de calcium (ou de 80 mM d'acetate de sodium à la place du tris pour les pH 5 et 6).

L'enzyme a été ajoutée extemporanément et la lipolyse a été stoppée au bout de 15 minutes, soit un temps d'incubation permettant d'obtenir un rendement de lipolyse maximal (d'après plusieurs essais préliminaires réalisés sur 15 et 30 minutes).

### 2.3.3. Extraction, séparation et quantification des produits de la lipolyse

Après 15, 30 ou 60 minutes de digestion, la totalité des lipides a été extraite par la méthode de Folch *et al.* (1957) modifiée par Hernell *et al.* (1990), c'est-à-dire par l'ajout au milieu réactionnel de 20 volumes de chloroforme/méthanol 2:1 (v/v), puis 20 % d'une solution tampon à pH 3,00 composée de 150 mM de chlorure de sodium, 2 % d'acide acétique glacial. La phase chloroformique sous-nageante contenant les lipides a été récupérée après centrifugation 10 minutes à 2000 rpm, et évaporée sous flux d'azote. Deux techniques différentes ont ensuite été utilisées pour séparer les acides gras des lipides totaux, et les quantifier.

#### 2.3.3.1. Chromatographie sur couche mince

Les lipides séchés ont été repris dans un volume connu de chloroforme/méthanol 2:1 (v/v), puis déposés sur des plaques de silice prêtes à l'emploi (Macherey-Nagel, Polygram) et entraînés par une phase mobile de chloroforme/méthanol/acide acétique 98:2:1 (v/v/v) (Bitman et Wood, 1981). Après migration, les différents spots ont été révélés par exposition à l'iode, puis grattés et récupérés dans des pots de comptage. La radioactivité a été quantifiée dans un compteur Tri-Carb 1600 TR (Packard), après ajout de scintillant (Insta-fluor Plus) et homogénéisation.

#### 2.3.3.2. Méthode de Belfrage et Vaughan

Les lipides séchés ont été repris dans exactement 1,5 mL de chloroforme, et 300 µL de ce volume ont été mélangés à 6,50 mL d'une solution d'heptane/chloroforme/méthanol 100:125:141 (v/v/v) et 2,10 mL de tampon carbonate de potassium 50 mM, acide borique 50 mM, pH 10,50 (Belfrage et Vaughan, 1969). Après centrifugation 15 minutes à 1000 rpm et 22°C (extraction de 70 % des acides gras), 2 mL des 4,90 mL totaux de la phase surnageante contenant les acides gras ont été récupérés dans un pot de comptage, pour quantification de la radioactivité dans un compteur Tri-Carb 1600 TR (Packard), après ajout de scintillant (Emulsifier Safe) et homogénéisation.

### 2.3.4. Évaluation du taux de lipolyse

Sachant que physiologiquement l'hydrolyse des triglycérides conduit à la formation d'acides gras libres et de 2-monoglycérides, le pourcentage de lipolyse a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\frac{\text{AG générés au cours de la lipolyse } (\mu\text{mol})}{\text{TG initiaux } (\mu\text{mol}) \times 2} \times 100$$

### 3. Protéomique

#### 3.1. Quantification des protéines

Les protéines ont été dosées, soit à l'aide du kit de dosage BCA Protein Assay Kit (Pierce), qui combine la réduction des ions cuivriques par les protéines en milieu alcalin (réaction de Biuret) et la détection des ions cuivreux générés, par l'acide bicinchoninique (Smith *et al.*, 1985), soit par la méthode de Lowry *et al.* (1951), qui combine la réaction de Biuret et la détection des ions cuivreux générés, par la réduction du réactif de Folin (solution phénolique contenant des composés de tungstène et de molybdène).

#### 3.2. Purification de la lipase gastrique humaine native

La lipase gastrique humaine native a été isolée à partir du suc gastrique humain collecté après stimulation hormonale (pentagastrine, 6 µg/kg de poids corporel) (Dr Peyrot, service d'Hépatogastroentérologie, Hôpital Nord, Marseille) en utilisant une colonne phényl sépharose CL 4B (10 x 1,3 cm, 7 mL de gel, capacité de fixation des protéines de 20 mg/ml de gel, Pharmacia). Le suc gastrique a été dialysé toute la nuit contre un tampon phosphate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 150 mM, pH 6,00, qui a également servi à équilibrer la colonne. Après fixation, la lipase a été éluée selon la méthode décrite par Tiruppathi et Balasubramanian (1985), modifiée au laboratoire afin d'obtenir un meilleur rendement. Après le passage d'une solution de phosphate de sodium 10 mM, chlorure de sodium 150 mM, éthylène glycol 20%, pH 6,00, qui permet de décrocher les protéines autres que la lipase, la lipase gastrique a été éluée à son tour à l'aide d'un gradient continu d'éthylène glycol (tampon phosphate de sodium 10 mM, chlorure de sodium 150 mM contenant 35 à 80 % d'éthylène glycol). Toute la purification s'est déroulée à 4°C et à un débit maximal de 180 mL/heure. Les fractions, qui présentaient une activité enzymatique importante, ont été dialysées contre du tampon de purification à travers une membrane cellulose Spectra/Por retenant les peptides supérieurs à 12-14 kDa. La pureté de l'enzyme a été vérifiée par électrophorèse et la solution a été concentrée par ultrafiltration sur Amicon 30 kDa (centrifugation à 4000 rpm et 4°C). A chaque étape, l'activité enzymatique sur tributyrine a été mesurée au pH-Stat, et la quantité de protéines a été déterminée par lecture de la densité optique (DO) (l'absorbance à 280 nm [ $\epsilon = 15,8$ ]) et par la méthode de Lowry *et al.* (1951).

#### 3.3. Séparation et détection de protéines par électrophorèse

##### 3.3.1. Électrophorèse (SDS-PAGE)

La lipase gastrique purifiée, afin de contrôler sa pureté, et certains sucs gastriques, afin d'en analyser la composition en protéine et pour les besoins d'une analyse ultérieure en

spectrométrie de masse, ont été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 12 % dans un tampon tris 0,25 M, glycine 1 M, sodium dodécylsulfate 35 mM, pH 8,50 (conditions dénaturantes) selon Laemmli (1970). Après migration (45 mA, 600 V, 1 heure), les gels ont été révélés par coloration au bleu de Coomassie (0,25 %) et décoloration dans un mélange d'éthanol (5 %) et d'acide acétique (7,5 %).

### **3.3.2. Détection de la lipase gastrique humaine par immuno-empreinte**

Afin de vérifier l'état de dégradation des différents échantillons de lipase gastrique, nous avons procédé à une détection immunologique juste après migration (Burnette, 1981). Pour ce faire, elles ont été transférées sur une membrane polyvinylidène difluoride (PVDF) préalablement activée dans un bain d'éthanol à 95° en utilisant un tampon tris-HCl 50 mM, acide borique 50 mM, pH 8,30. Après transfert (100 mA, 100 V, 1h30), le gel a été coloré puis décoloré afin de vérifier le bon déroulement de cette étape, tandis que la membrane a été traitée selon le protocole suivant : saturation pendant 30 minutes dans du tampon TBS Tween (0,1 %) contenant 5 % de lait écrémé, 2 rinçages dans du TBS Tween (0,1 %), incubation 15 minutes sous agitation avec des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre la lipase gastrique humaine déjà disponibles au laboratoire (dilution : 1/5000°), trois rinçages successifs dans du TBS Tween (0,1 %), incubation 15 minutes sous agitation avec des anticorps anti-IgG de lapin couplés à la phosphatase alcaline (Sigma) (dilution: 1/5000°), trois nouveaux rinçages dans du TBS Tween (0,1 %), puis révélation du complexe lipase-anticorps primaire-anticorps secondaire dans du tampon Tris-NaCl 0,1 M, pH 9,50 contenant 10 µL de chlorure de magnésium et 100 µL de deux substrats chromogènes de la phosphatase alcaline : le NBT (Nitro-Blue-Tetrazonium à 20 mg/mL) et le BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate à 20 mg/mL).

### **3.4. Analyse de la séquence de la lipase gastrique humaine**

Cette analyse a été réalisée selon la technique de dégradation d'Edman à l'aide d'un microséquençeur Applied BioSystems Sequencer (Procise) au service de microséquençage du CNRS (Marseille, France). L'enzyme pure a été donnée directement à séquencer sous forme liquide ; pour les sucs, après migration sur gel de polyacrylamide à 12 % et transfert sur membrane PVDF, la lipase gastrique humaine a été révélée par coloration au rouge Ponceau (acide trichloroacétique 5 %, rouge Ponceau 0,2 %) et la bande correspondante a été découpée et donnée à séquencer pour les six premiers acides aminés.

### **3.5. Caractérisation de certaines lipases par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)**

Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec C. Villard, D. Lafitte et E. Pasquier au plateau protéomique UMR FRE 2737 de la Faculté de Pharmacie (Université de la Méditerranée, Marseille, France) à l'aide d'un MALDI-TOF Ettan pro (Amersham Biosciences). Les échantillons de BSSL ont simplement été dilués au 1/5<sup>e</sup> avant l'analyse. Pour les sucs gastriques (AR T3, BAK T3 et GM PG3), après migration sur gel de polyacrylamide à 12 % et coloration au bleu de Coomassie (PageBlue™ Protein Staining Solution, Fermentas), la bande correspondant à la lipase gastrique a été excisée et récupérée dans un eppendorf d'eau distillée (plusieurs bandes par échantillon de suc ont été préparées).

#### **3.5.1. Identification de différents variants de la lipase stimulée par les sels biliaires**

Après digestion à 37°C pendant au moins 12 heures avec de la trypsine de porc modifiée (Promega), le mélange de peptides obtenu a été désalé et concentré sur mini-colonne C18 (ZipTip®, Millipore) et déposé sur la cible du MALDI-TOF par élution avec une matrice acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (3 mg/mL d' $\alpha$ -CHCA dans de l'acétonitrile/eau 50:50). Les échantillons ont été analysés en ionisation positive en mode réflectron.

#### **3.5.2. État de dégradation du térapeptide N-terminal de la lipase gastrique humaine**

##### *3.5.2.1. Identification de la lipase gastrique humaine*

Afin de nous assurer, que la lipase gastrique était la protéine majoritaire dans les bandes de gel d'acrylamide découpées à 50 kDa, nous avons d'abord procédé à une digestion enzymatique à la trypsine. Les bandes de gel ont été digérées à 37°C pendant au moins 12 heures et avec de la trypsine de porc modifiée (Promega). Les peptides ont été extraits du gel, séchés sous vide, centrifugés et resuspendus dans 10-20  $\mu$ L d'une solution d'acide trifluoroacétique à 0,1 %. Le mélange de peptides a été désalé et concentré sur mini-colonne C18 (ZipTip®, Millipore) et déposé sur la cible du MALDI-TOF par élution avec une matrice acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (5 mg/mL d' $\alpha$ -CHCA dans de l'acétonitrile/eau 50:50). Les échantillons ont été analysés en ionisation positive en mode réflectron.

### 3.5.2.2. Analyse des différentes formes du peptide N-terminal de la lipase gastrique humaine

Nous avons réalisé pour cela une digestion chimique au bromure de cyanogène. Cette technique originale, proposée par C. Villard, constitue une alternative au séquençage de la partie N-terminale de la lipase gastrique par la technique d'Edman. En effet, le premier site de clivage au bromure de cyanogène sur la séquence de la lipase gastrique se trouve après la méthionine 14. Il permet donc la libération d'un peptide N-terminal de taille parfaitement adaptée à l'analyse au MALDI-TOF (1465,7 Dalton) et permettra le cas échéant de détecter aussi les formes dégradées de ce peptide (Tableau 5).

**Tableau 5:** Séquence, nombre d'acides aminés et masse du peptide N-terminal de la lipase gastrique humaine et de ses différentes formes dégradées, obtenus après digestion chimique au bromure de cyanogène.

<i>Séquence du peptide N-terminal</i>	<i>Nombre d'AA</i>	<i>Masse (daltons)</i>
Leu-Phe-Gly-Lys-Leu-His-Pro-Gly-Ser-Pro-Glu-Val-Thr-Met	14	1465,7
Phe-Gly-Lys-Leu-His-Pro-Gly-Ser-Pro-Glu-Val-Thr-Met	13	1352,5
Gly-Lys-Leu-His-Pro-Gly-Ser-Pro-Glu-Val-Thr-Met	12	1205,5
Lys-Leu-His-Pro-Gly-Ser-Pro-Glu-Val-Thr-Met	11	1148,1
Leu-His-Pro-Gly-Ser-Pro-Glu-Val-Thr-Met	10	1119,1

L'hydrolyse au bromure de cyanogène a été réalisée directement sur les bandes de gel d'acrylamide. Après trois rinçages dans une solution d'acétonitrile à 50 % et séchage 5 minutes à l'air libre, les bandes de gel ont été plongées dans 200 µL d'une solution de bromure de cyanogène à environ 1,3 M (dans de l'acide formique à 70 %) pour une digestion d'environ 18-19 heures à l'abri de la lumière. A la fin de l'incubation, les peptides, solubilisés dans la solution de bromure de cyanogène, ont été récupérés, séchés sous flux d'azote, rincés trois fois dans une solution d'acétonitrile à 50 %, et resuspendus dans 20 µL d'une solution à 50 % d'acétonitrile et 0,3 % d'acide trifluoroacétique. Le mélange de peptides a été désalé et concentré sur mini-colonne C18 (ZipTip®, Millipore) et déposé sur la cible du MALDI-TOF par élution avec une matrice acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (5 mg/mL d' $\alpha$ -CHCA dans de l'acétonitrile/eau 50:50). Les échantillons ont été analysés en ionisation positive en mode linéaire (plus sensible que le mode réflectron).

### 3.6. Étude de liaison par résonance plasmonique de surface (technologie BIA)

Cette étude préliminaire a été réalisée à l'aide d'un BIAcore® 3000 en collaboration avec C. Lévêque (Centre d'Analyse Protéomique de Marseille, Institut Jean Roche, Faculté de Médecine secteur Nord, Marseille, France).

#### 3.6.1. Principe de la technique

La technologie BIA (Analyse d'Interactions Biospécifiques) associe le principe optique de la résonance plasmonique de surface (SPR) à l'utilisation de biocapteurs, pour permettre de mesurer en temps réel la formation de complexes moléculaires sur une interface biospécifique. Les interactions moléculaires sont mesurées dans un débit continu de tampon. Un des réactifs, le ligand, est retenu de manière spécifique sur une interface appelée *sensor chip*. Les autres partenaires de l'interaction, les analytes, sont injectés à un débit constant par un circuit microfluidique au contact de l'interface. Les *sensor chip* sont constituées d'un support de verre recouvert d'une fine couche d'or de 50 nm d'épaisseur, elle-même recouverte d'une matrice de dextran carboxylé, pour retenir les ligands hydrophiles (protéines, glycoprotéines, acides nucléiques, etc...), ou d'une matrice constituée de chaînes aliphatiques en C18, pour retenir les ligands hydrophobes (molécules lipidiques, généralement associées en liposomes). La formation, puis la dissociation des complexes moléculaires à la surface de la *sensor chip* est détectée par résonance plasmonique. Les photons d'un faisceau de lumière polarisée dirigé vers la *sensor chip* entrent en résonance avec les nuages électroniques (plasmons) de l'or, ce qui crée une absorption d'énergie dans le faisceau réfléchi analysé par une barrette de diodes. L'appareil mesure en temps réel la position de l'angle pour lequel cette baisse d'énergie a lieu (angle de résonance). Les processus d'interactions se produisant à l'interface de la *sensor chip*, induisent des modifications de l'indice de réfraction du milieu (directement proportionnelles à la masse d'analytes liées à l'interface) et décalent la position de l'angle de résonance. Le signal, dont l'enregistrement est appelé un sensorgramme, est quantifié au cours du temps en unités de résonance RU. Une variation de 1000 RU correspond à la fixation de 1 ng de protéine par mm<sup>2</sup> de surface et à une déviation de l'angle de résonance de 0,1 degré.

#### 3.6.2. Déroulement des enregistrements

Les mesures ont été réalisées dans du tampon de lipolyse gastrique (acétate de sodium 50 mM, chlorure de sodium 150 mM, chlorure de calcium 6 mM, pH 5,40), l'analyte étant la lipase gastrique humaine purifiée LGH2 et les ligands immobilisés étant des liposomes. Les

liposomes PC P/O ont été préparés avec 1 mg de PC P/O, et les liposomes PS, SM et LPI avec 0,9 mg de PC P/O et 0,1 mg de PS, SM ou LPI. Les différents phospholipides ont été mis en solution dans du chloroforme/méthanol 2:1 (v/v) à la concentration de 10 mg/mL, prélevés dans des tubes en verre, puis resuspendus dans 1 mL de tampon de lipolyse gastrique à la concentration finale de 1,2 mM, après évaporation des solvants sous flux d'azote pendant 30 minutes. Les liposomes ont été obtenus par extrusion des phospholipides en suspension (19 allers et 18 retours à travers un filtre de 100 nm de porosité) après 30 min de chauffage à 37°C (en vortexant trois fois 1 minute toutes les 10 minutes). Ils ont été caractérisés par la mesure de leur granulométrie et de leur potentiel zéta (échantillons dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée) à l'aide d'un Zétasizer Nano ZS (Malvern).

## 4. Culture cellulaire

### 4.1. Préparation des cellules Caco-2 clone TC7

Les cellules Caco-2 clone TC7 ont été cultivées à 37°C, dans une atmosphère à 10 % de CO<sub>2</sub>, et dans un milieu filtré (filtre Express™ PLUS 0,22 µm, Millipore) complet (changé tous les deux jours) contenant 78 % de milieu minimum essentiel modifié par Dubelcco (D-MEM) (Gibco™, Invitrogen), 20 % de sérum de veau fœtal (Sigma), 1 % d'acides aminés non essentiels (Biowhittaker®, Cambrex) et 1 % d'un mélange d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline, Gibco™ Invitrogen). En période d'entretien, les cellules étaient maintenues dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon®, Becton Dickinson), et le tapis cellulaire était dissocié à confluence, tous les 7 jours pour un nouvel ensemencement, avec de la trypsine diluée au 1/250<sup>ème</sup> dans une solution d'EDTA (Biowhittaker®, Cambrex). Pour les expérimentations, les cellules ont été ensemencées sur des plaques 6 puits (Falcon®, Becton Dickinson) munies d'inserts avec membrane microporeuse transparente en polyéthylène téréphtalate (PET) (porosité 1µm, Falcon®, Becton Dickinson), et cultivées pendant 21 jours dans du milieu complet (changé tous les jours), remplacé les 14 derniers jours, pour les compartiments apicaux, par du milieu sans sérum de veau fœtal.

### 4.2. Étude d'absorption des produits de lipolyse

Les tests d'absorption ont été menés après 21 jours de culture sur filtre. Afin de se placer dans des conditions proches de l'insuffisance pancréatique, les acides gras libres ont été apportés aux cellules par le biais des structures générées au cours de la lipolyse gastrique, à savoir des particules d'environ 200 nm composées de 73,7 g d'acides gras libres, 15,6 g de phospholipides, 5 g de monoglycérides, 3,5 g de diglycérides, 1,2 g de cholestérol libre et 0,8 g de triglycérides pour 100 g de lipides (Pafumi *et al.*, 2002). La quantité totale d'acide gras devant être incubée dans le compartiment apical des cellules a été déterminée d'après les quantités d'acides gras récupérées dans le milieu réactionnel après un test de digestion par la lipase gastrique, soit une concentration d'environ 1,5 mM lorsque le rendement de lipolyse a été moyen (8-8,5 %) et d'au moins 3 mM lorsque le rendement a été bon (16-17 %).

#### 4.2.1. Préparation des particules

Trois types de particules (PC P/O, LPCO et LPI) ont été préparés avec les glycérides de la famille de l'acide oléique et l'acide oléique. Les différentes espèces lipidiques ont été mises en solution dans du chloroforme/méthanol 2:1 (v/v) à la concentration de 10 mg/mL, puis mélangées dans les proportions *ad hoc*. Afin de pouvoir suivre l'absorption cellulaire, de l'acide oléique marqué au tritium (oleic acid [9,10-<sup>3</sup>H(N)]), 5 Ci/mmol d'acide oléique, Perkin

Elmer Life Sciences) a été ajouté au mélange lipidique, en quantité suffisante pour obtenir une activité spécifique de 333 333 dpm/ $\mu$ mol d'oléate. Une quantité de 5 mg de ce mélange lipidique radiomarqué a été resuspendu dans 1,5 mL de tampon phosphate à 10 mM, après évaporation du chloroforme/méthanol sous flux d'azote. Les particules ont été fabriquées par sonication à 20 décibels pendant cinq fois 2 minutes avec 1 minute d'arrêt entre chaque fois (Microsonde et générateur de puissance Sonifier 250, Branson). Elles ont été caractérisées par la mesure de leur granulométrie et de leur potentiel zéta (échantillons dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau distillée) à l'aide d'un Zétasizer Nano ZS (Malvern).

#### **4.2.2. Déroulement de l'expérience**

Au niveau de chaque puits, le milieu basal et le milieu apical ont été aspirés et remplacés respectivement par 2 mL de milieu complet frais et 900  $\mu$ L de milieu réactionnel, contenant les particules (qsp 1,5 ou 3 mM d'acide oléique), 145  $\mu$ L de suc gastrique BAK le cas échéant (volume habituellement utilisé dans un test de digestion gastrique), et du milieu complet (qsp 900  $\mu$ L). Afin de détecter d'éventuelles pertes de matériel, la radioactivité totale déposée dans chaque compartiment apical a été immédiatement mesurée sur 10 et 20  $\mu$ L de milieu réactionnel restant par comptage (scintillant Emulsifier Safe et Compteur Tri-Carb 1600 TR, Packard). Après 1 heure d'incubation à 37°C, le milieu apical et le milieu basal ont été récupérés, et le compartiment apical a été rincé avec 1 mL de D-PBS (Gibco™, Invitrogen), également récupéré. La couche cellulaire a été grattée dans 1 mL de D-PBS (Gibco™, Invitrogen) à l'aide d'une spatule en plastique et la suspension a été récupérée avec une pipette pasteur. La radioactivité a été quantifiée dans tous ces prélèvements (scintillant Emulsifier Safe et Compteur Tri-Carb 1600 TR, Packard), les milieux cellulaires ayant été soumis au préalable à trois cycles de congélation/décongélation/sonication (15 minutes dans un bain à sonication, modèle 3510, Branson), afin de bien dissocier les cellules. Il a été contrôlé pour chaque puits, que la radioactivité totale déposée en apical correspondait bien à la somme des radioactivités retrouvées au niveau de chacun des compartiments (milieu apical + rinçage du milieu apical + milieu cellulaire + milieu basal), et l'absorption cellulaire de l'acide oléique a été exprimée par le nombre de micromoles d'acide oléique détectées dans le compartiment cellulaire.

## **5. Analyse statistique des données**

Les mesures ont été effectuées au minimum en double. Les moyennes et les écarts standard par rapport à la moyenne (SEM) ont été calculés avec le logiciel StatView (version 1.03 ou version 5.0) ou avec le logiciel Excel. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel StatView (version 1.03 ou version 5.0). Lorsque la distribution en fréquence des données (nombre d'intervalles :10) répondait à une loi normale et que les variances (déterminées avec le test paramétrique ANOVA) étaient homogènes, le test a posteriori de Scheffé (probabilité  $p < 0,05$ ) a été utilisé. Dans le cas contraire, l'existence de différences entre les groupes a été déterminée avec le test non paramétrique de Kruskal Wallis, et lorsqu'il y avait effectivement des différences entre les groupes, la significativité des écarts a été déterminée en comparant tous les groupes deux par deux avec le test non paramétrique de Mann-Whitney (groupes non appariés).

# RÉSULTATS

## 1. Mise en évidence de l'effet du type de phospholipide et de la présence d'acides gras libres sur les caractéristiques physico-chimiques d'une émulsion lipidique

Les deux principaux paramètres physico-chimiques permettant de caractériser une émulsion lipidique sont la granulométrie, c'est-à-dire la taille des globules lipidiques, et le potentiel électrocinétique dit potentiel zêta, c'est-à-dire la charge électrique mesurable à la surface des globules. Nous avons recherché si le type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion de trioléine ou si la présence d'acides gras libres dans une telle émulsion peuvent modifier l'un ou l'autre de ces paramètres.

### 1.1. Effet du type de phospholipide et de la présence d'acides gras libres sur la granulométrie des émulsions lipidiques

#### 1.1.1. Données de l'analyse par diffraction laser

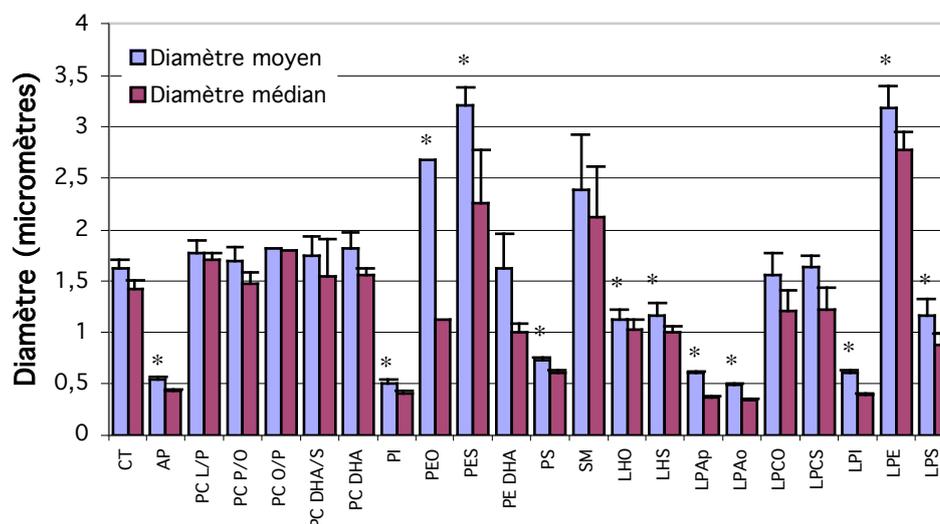
##### 1.1.1.1. Étude de l'effet du type de phospholipide

L'utilisation de différents types de phospholipides dans le mélange lipidique permet d'obtenir des émulsions, dont le diamètre moyen varie très largement de 0,5 à 3,2 micromètres (variations fortement significatives:  $p < 0,0001$ ) (Figure 12), sachant que la méthodologie mise en place l'a été dans le but d'obtenir des émulsions stabilisées par des PC d'environ  $2\mu\text{m}$  (Pafumi *et al.*, 2002). On peut classer les émulsions, obtenues avec ces différents phospholipides, en trois groupes en fonction de la valeur de leur diamètre moyen:

- quatre émulsions peuvent être qualifiées de "grossières", du fait d'un diamètre moyen supérieur à  $2\mu\text{m}$ : PES ( $3,21 \pm 0,18\mu\text{m}$ ), LPE ( $3,19 \pm 0,21\mu\text{m}$ ), PEO ( $2,68\mu\text{m}$ ) et SM ( $2,39 \pm 0,53\mu\text{m}$ );
- la majorité des émulsions, avec un diamètre moyen compris entre 1 et  $2\mu\text{m}$ , sont de granulométrie moyenne: PC DHA ( $1,82 \pm 0,15\mu\text{m}$ ), PC O/P ( $1,82\mu\text{m}$ ), PC L/P ( $1,77 \pm 0,12\mu\text{m}$ ), PC DHA/S ( $1,75 \pm 0,18\mu\text{m}$ ), PC P/O ( $1,69 \pm 0,15\mu\text{m}$ ), LPCS ( $1,63 \pm 0,12\mu\text{m}$ ), CT ( $1,62 \pm 0,09\mu\text{m}$ ), PE DHA ( $1,62\mu\text{m}$ ), LPCO ( $1,56 \pm 0,21\mu\text{m}$ ), à fine: LPS ( $1,16 \pm 0,16\mu\text{m}$ ), LHS ( $1,16 \pm 0,13\mu\text{m}$ ) et LHO ( $1,13 \pm 0,09\mu\text{m}$ );

- et six émulsions, enfin, sont très fines avec un diamètre moyen inférieur à  $1\mu\text{m}$ : PS ( $0,73 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ), LPI ( $0,60 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ), LPAp ( $0,60 \pm 0,02$ ), AP ( $0,54 \pm 0,03$ ), PI ( $0,50 \pm 0,04 \mu\text{m}$ ) et LPAo ( $0,49 \pm 0,02$ ).

**Figure 12:** Mesure par diffraction laser de la granulométrie d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides (moyenne  $\pm$  SEM).



\* Diamètre moyen significativement différent de celui de l'émulsion CT (n=2 pour PC O/P et PEO, n=4 pour PC DHA/S et PES, n=6 pour PC L/P, PC DHA, PS et LHS, n=8 pour AP, PE DHA, LPAp et LPAo, n=10 pour PI et LPS, n=12 pour LPCS et LPE, n=14 pour SM, n=16 pour LPCO, n=18 pour LHO, n=20 pour CT, n=52 pour PC P/O, n=54 pour LPI).

Le diamètre moyen des six émulsions les plus fines (PS, LPI, LPAp, AP, PI et LPAo) est significativement plus petit ( $p < 0,05$  et  $p < 0,005$ ) que celui de toutes les autres émulsions, et celui des deux émulsions les plus grosses (PES et LPE) est significativement plus grand ( $p < 0,05$  et  $p < 0,005$ ) que celui des émulsions moyennes, fines et très fines.

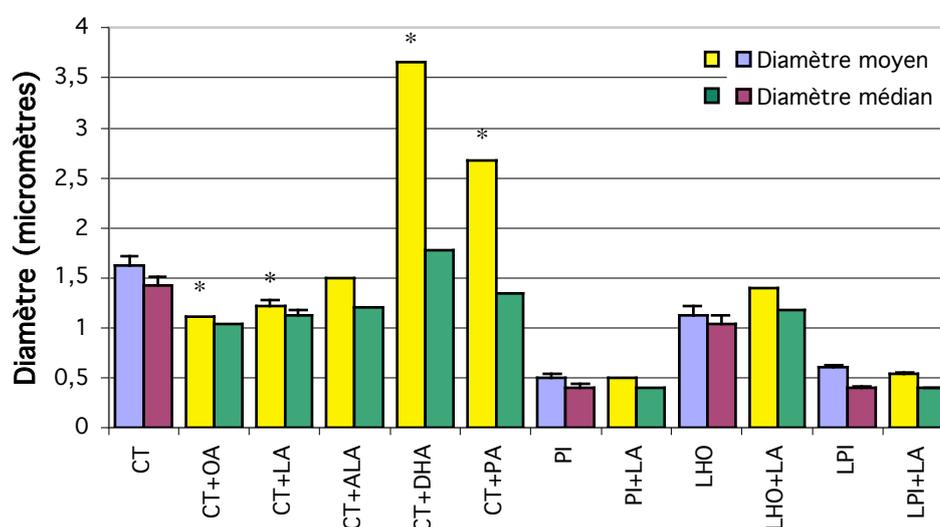
La plupart des émulsions possèdent une seule population, plus ou moins disparate, de globules lipidiques, représentée, sur l'histogramme en volume de la mesure, par un pic unique plus ou moins évasé à la base. C'est la largeur de ce pic, qui crée un écart entre la valeur du diamètre médian et celle du diamètre moyen. Cet écart, qui nous renseigne sur l'homogénéité de la distribution des globules lipidiques, dépend lui aussi du type de phospholipide employé. Il est supérieur à 20 % et se traduit par une différence en micromètre supérieure à 0,40 pour les émulsions PEO (58,2%), PE DHA (38,3%), PES (29,9%) et LPCS (25,2%), qui peuvent alors être considérées comme hétérogènes. Certains phospholipides, comme PC L/P ou PC P/O, permettent d'obtenir des émulsions possédant deux populations distinctes mais plus

uniformes de globules lipidiques (deux pics relativement étroits), sans que cela se traduise par un écart significatif entre leurs diamètres moyen et médian. Dans ce cas, les émulsions ne peuvent pas être considérées comme hétérogènes d'après le résultat de la mesure par diffraction laser. L'importance de cette précision sera discutée avec les résultats de l'observation microscopique.

### 1.1.1.2. Étude de l'effet du type d'acide gras libre

Nous avons enrichi quatre mélanges lipidiques (CT, PI, LHO et LPI) avec 2% de différents acides gras libres, ajoutés avant l'émulsification (Figure 13).

**Figure 13:** Mesure par diffraction laser de la granulométrie d'émulsions enrichies avec différents types d'acides gras libres (moyenne  $\pm$  SEM).



\* Diamètre moyen significativement différent de celui de l'émulsion non enrichie avec l'acide gras libre (n=2 pour CT+OA, CT+ALA, CT+DHA, CT+PA, PI+LA et LHO+LA, n=4 pour CT+LA et LPI+LA, n=10 pour PI, n=18 pour LHO, n=20 pour CT, n=54 pour LPI).

L'ajout d'acide linoléique ne modifie pas de façon significative les diamètres moyen et médian des émulsions PI, LHO et LPI. Ces émulsions restent fines (LHO+LA) à très fines (PI+LA et LPI+LA) et homogènes. En revanche, on observe une modification significative de la taille des globules lipidiques de l'émulsion CT. Son diamètre moyen diminue de 31% en présence d'acide oléique (OA) et de 25% en présence d'acide linoléique (LA), mais augmente très fortement de 126 et 65% respectivement en présence des acides docosahexaénoïque (DHA) et palmitique (PA) ( $p < 0,05$ ). La présence de ces deux derniers acides gras transforme une émulsion moyenne ( $1,62 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ) et homogène (écart entre les diamètres moyen et médian d'environ 12% et  $0,2 \mu\text{m}$ ) en une émulsion "grossière" ( $3,66 \mu\text{m}$  avec le DHA et  $2,68$

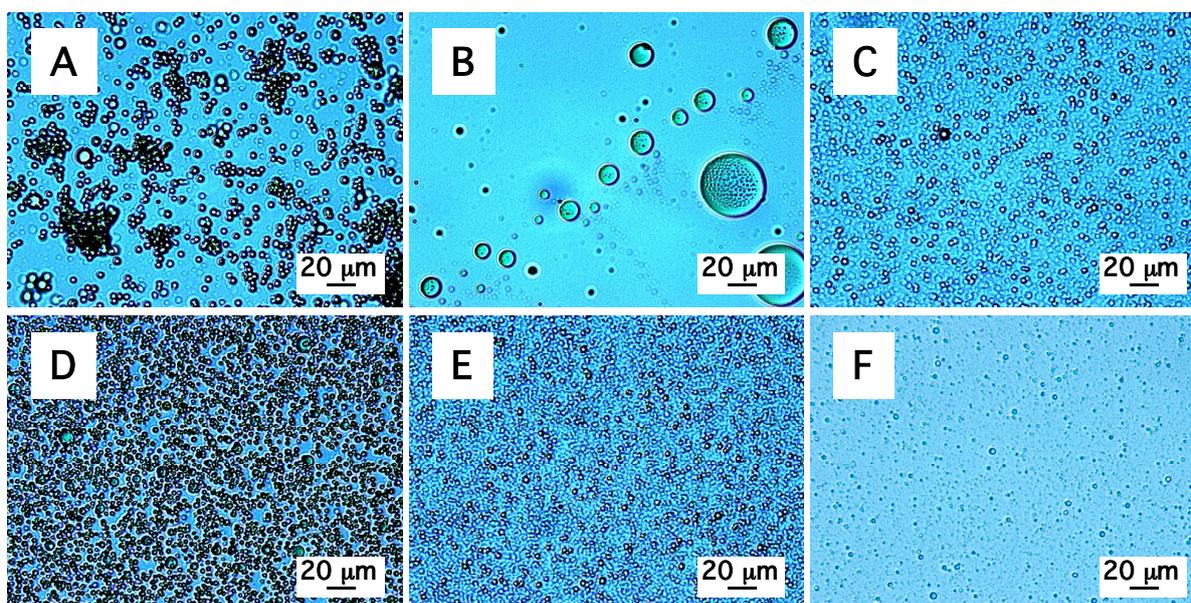
$\mu\text{m}$  avec le PA) et hétérogène (écart entre les diamètres moyen et médian supérieur à 50% et  $1,3 \mu\text{m}$ ), tandis que la présence des acides oléique et linoléique permet d'obtenir une émulsion fine ( $1,11$  et  $1,22 \mu\text{m}$  respectivement) et légèrement plus homogène (écart entre les diamètres moyen et médian proche de 7% et inférieur à  $0,1 \mu\text{m}$ ).

### 1.1.2. Données de l'observation microscopique

L'étude morphologique des émulsions, obtenues avec différents types de phospholipides ou en présence d'acides gras libres, permet de les classer en trois groupes:

- émulsions "grossières" : SM (émulsion homogène, dont les globules lipidiques s'associent en grappe) et PEO (très hétérogène) ;
- émulsions moyennes : CT, PC P/O, PC O/P, PC DHA/S, PC DHA, PES (homogènes) et PC L/P (hétérogène) ;
- et émulsions fines à très fines : AP, PI, PS, LHO, LHS, LPI+LA (homogènes) et LPI, LPAp, LPAo (hétérogènes).

**Figure 14:** Observation microscopique (grandissement  $\times 32$ ) d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides.



A: émulsion SM, "grossière et homogène"; B: émulsion PEO, "grossière et hétérogène"; C: émulsion PC DHA, moyenne et homogène; D: émulsion PC L/P, moyenne et hétérogène; E: émulsion PI, fine et homogène; F: émulsion LPI, très fine et hétérogène.

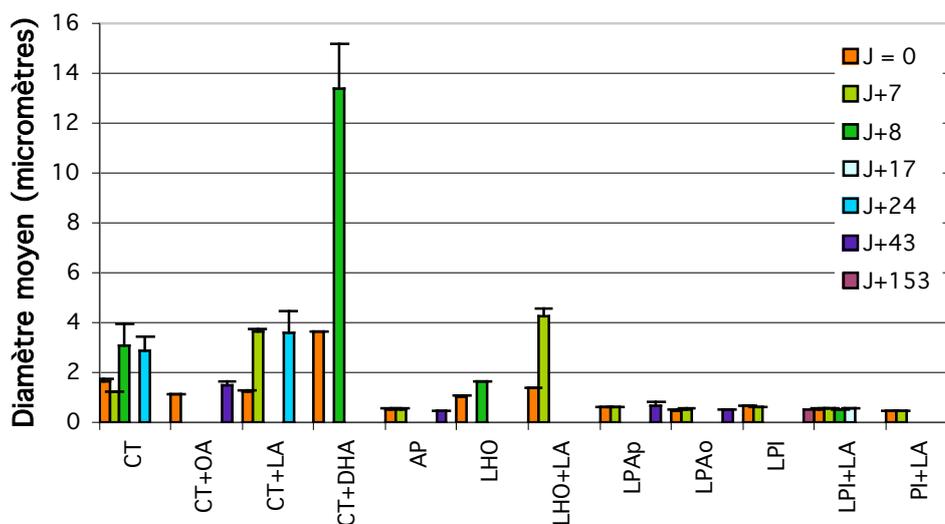
L'influence du type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion ou de l'ajout d'un acide gras libre dans le mélange lipidique avant l'émulsification est confirmée par l'observation microscopique (Figure 14). Les émulsions observées présentent globalement les

mêmes caractéristiques, que celles établies grâce aux mesures par diffraction laser. Concernant la taille, seule l'émulsion PES apparaît moyenne en microscopie au lieu de "grossière", et concernant l'homogénéité, l'observation microscopique montre plutôt que PES est homogène tandis que PC L/P, LPI, LPAp et LPAo sont hétérogènes. Cette différence peut être expliquée par le fait que l'observation microscopique permet probablement de distinguer plus nettement deux populations distinctes de globules lipidiques (PC L/P) qu'une seule population de globules moyennement disparate (PES). Les critères d'évaluation de l'homogénéité des émulsions ne sont pas complètement équivalents pour ces deux techniques d'analyse de la granulométrie.

### 1.1.3. Étude de la stabilité au cours du temps

La stabilité de certaines émulsions a été déterminée à partir de l'évolution de leur granulométrie au cours du temps (Figure 15).

**Figure 15:** Mesure par diffraction laser de la granulométrie d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres.



Les mesures ont été effectuées le jour de la fabrication de l'émulsion (J=0) puis après 7 jours (J+7), 8 jours (J+8), 17 jours (J+17), 24 jours (J+24), 43 jours (J+43) et/ou 153 jours (J+153) de conservation à +4°C (moyenne ± SEM; n=2 pour CT à J+7, CT+OA à J=0, CT+DHA à J=0, LHO à J+8, LHO+LA à J=0, LPI à J+7, LPI à J+153, LPI+LA à J+8, LPI+LA à J+17 et PI+LA à J=0, n=4 pour CT+OA à J+43, CT+LA à J=0, CT+LA à J+7, CT+DHA à J+8, LHO+LA à J+7, LPI+LA à J=0, LPI+LA à J+7 et PI+LA à J+7, n=6 pour CT à J+8, CT à J+24, CT+LA à J+24, AP à J+7, AP à J+43, LPAp à J+7, LPAp à J+43, LPAo à J+7 et LPAo à J+43, n=8 pour AP à J=0, LPAp à J=0 et LPAo à J=0, n=12 pour LHO à J=0, n=14 pour LPI à J=0, n=16 pour CT à J=0).

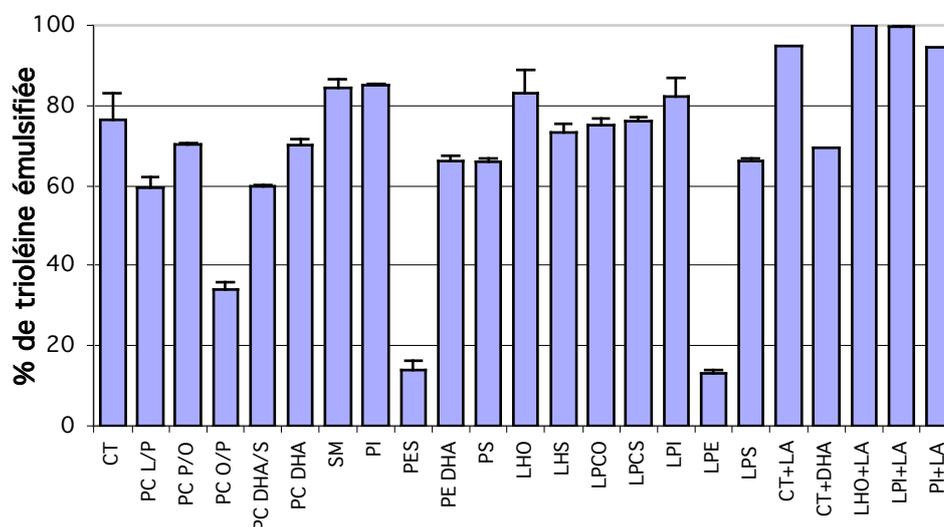
En considérant les variations maximales des diamètres moyens par rapport à leur valeur initiale à  $J = 0$ , on peut classer les émulsions testées en trois catégories :

- les émulsions très stables (variation < 25%) : LPI, LPAo, LPI+LA, PI+LA, LPAp et AP ;
- les émulsions moyennement stables (25% < variation < 100%) : CT+OA, LHO et CT;
- et les émulsions instables (variation > 200%) : CT+LA, LHO+LA CT+DHA.

Les émulsions très stables sont des émulsions très fines au départ et les émulsions moyennement stables des émulsions moyennes à fines. L'instabilité la plus importante est observée pour l'émulsion initialement "grossière" (CT+DHA). La présence d'acide linoléique entraîne une augmentation d'un facteur 3 du diamètre moyen initial des émulsions fines (CT+LA et LHO+LA), mais ne modifie pas celui des émulsions très fines (LPI+LA et PI+LA).

La stabilité de certaines émulsions a également été appréciée avec le pourcentage de trioléine encore émulsifiée après 7 à 17 jours de conservation (déterminé par comptage de la radioactivité) (Figure 16).

**Figure 16:** Pourcentage de trioléine émulsifiée dans des émulsions, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres, après 7 ou 17 jours de conservation à +4°C (moyenne ± SEM).



La quantité de trioléine émulsifiée a été calculée d'après l'activité spécifique du mélange lipidique et la mesure de la radioactivité totale de l'émulsion. n=6, sauf n=2 pour CT+LA, CT+DHA, LHO+LA et PI+LA, n=8 pour LHO et LPI, n=12 pour CT.

On peut à nouveau classer les émulsions en trois catégories:

- les émulsions très stables (+ de 80 % de TO émulsifiée) : CT+LA, LHO+LA, LPI+LA, PI+LA, SM, PI, LHO, LPI ;
- les émulsions relativement stables (de 60 à 80 % de TO émulsifiée) : CT, PC L/P, PC P/O, PC DHA/S, PC DHA, PE DHA, PS, LHS, LPCO, LPCS, LPS et CT+DHA ;
- et les émulsions instables (- de 40 % de TO émulsifiée) : PC O/P, PES et LPE.

Globalement, les émulsions très stables sont à nouveau des émulsions fines à très fines, les émulsions relativement stables, des émulsions moyennes à fines, et les émulsions instables, des émulsions “grossières“. On notera cependant, que SM et CT+DHA, pourtant “grossières“, sont des émulsions respectivement très stable et relativement stable. La présence de DHA libre dans le mélange lipidique CT conduit à une granulométrie plus élevée au cours du temps, mais n’altère pas le degré d’émulsificabilité de la TO. Ce dernier paramètre est plutôt fortement diminué par la présence d’éthanolamine (PES et LPE).

Quel que soit le paramètre choisi (granulométrie ou émulsificabilité de la trioléine), il apparaît, que le type de phospholipide ou l’ajout d’un acide gras libre influence la stabilité au cours du temps des émulsions. Cette influence est indirecte, puisque la stabilité est d’autant plus importante que l’émulsion est initialement fine, et que la granulométrie de l’émulsion est elle-même modulée par les phospholipides utilisés ou les acides gras libres éventuellement ajoutés. Elle est également directe, puisque certains phospholipides et acides gras libres permettent aussi de stabiliser certaines émulsions initialement “grossières“.

## **1.2. Effet du type de phospholipide et de la présence d’acides gras libres sur le potentiel électrocinétique des émulsions lipidiques**

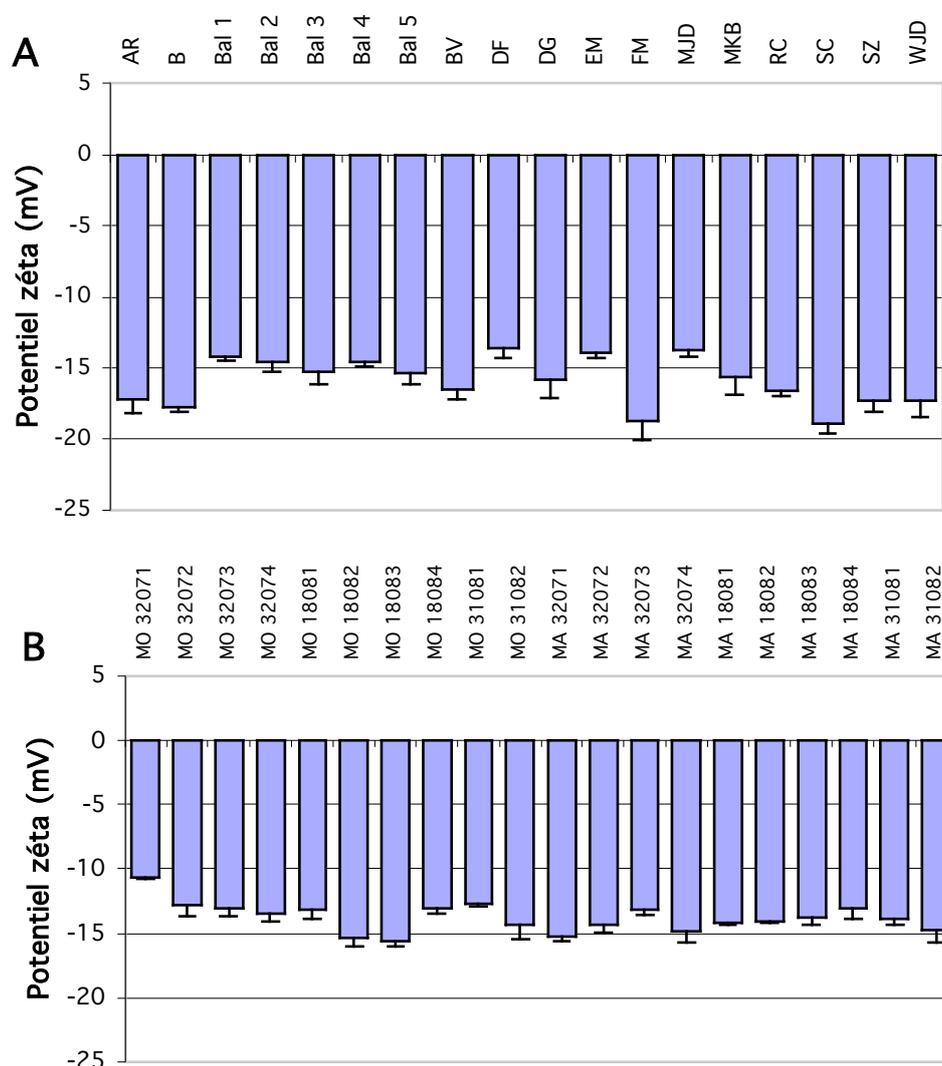
Afin d’établir une référence, nous avons tout d’abord déterminé la valeur du potentiel zêta de quelques émulsions lipidiques naturelles (lait humain et lait de jument) (Figures 17) et artificielles (préparation pour nourrissons). Le potentiel électrocinétique du lait humain varie de  $-18,9$  à  $-13,6$  mV, avec une valeur moyenne de  $-16,0 \pm 0,4$  mV. Le potentiel électrocinétique du lait de jument est moins négatif; il varie de  $-15,7$  à  $-10,6$  mV, avec une valeur moyenne de  $-13,8 \pm 0,3$  mV. Le potentiel électrocinétique du Lait Gallia 1<sup>er</sup> âge, mesuré après une dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  dans de l’eau du robinet, est proche de celui du lait humain avec une valeur de  $-15,3 \pm 0,7$  mV.

Nous avons ensuite mesuré le potentiel électrocinétique d’émulsions de trioléine stabilisées par différents types de phospholipides et acides gras libres (Figure 18). Les valeurs obtenues sont très différentes selon l’émulsion considérée ( $p < 0,05$ ). Elles varient de  $-41,8$

mV (LPI) à  $-2,1$  mV (SM). Les émulsions peuvent être classées en trois catégories en fonction de la valeur de leur potentiel électrocinétique:

- les émulsions fortement négatives (potentiel  $< -25$  mV): LPI, LPS, PI, PE DHA et PS;
- les émulsions moyennement négatives ( $-15$  mV  $<$  potentiel  $< -25$  mV): LHS, LHO, LPE, CT+DHA et CT+LA;
- et les émulsions légèrement négatives ( $0$  mV  $<$  potentiel  $< -15$  mV): CT, PC L/P, PC O/P, PC DHA, PC P/O, LPCS, LPCO et SM.

**Figure 17:** Valeur du potentiel zéta d'échantillons de lait humain (A) et de lait de jument (B).

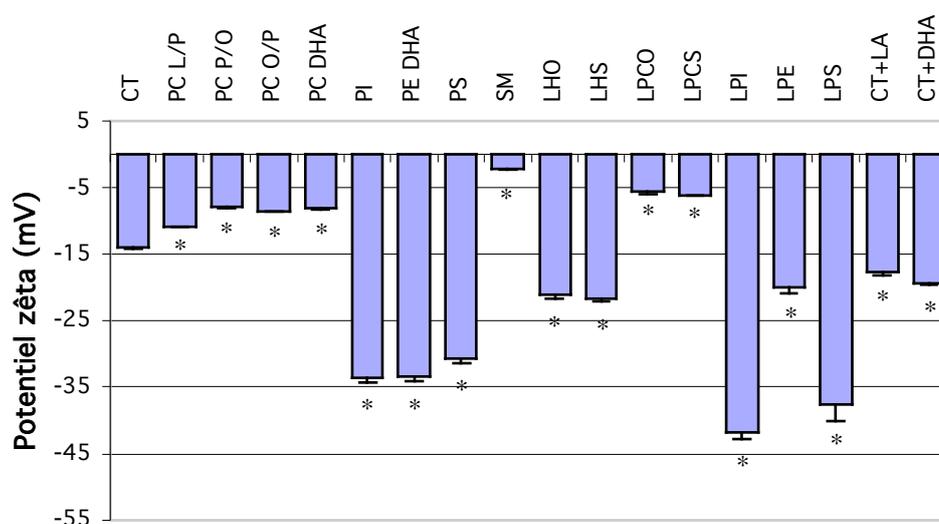


Les mesures ont été effectuées après dilution au  $1/10^{\text{ème}}$  dans de l'eau distillée (moyenne  $\pm$  SEM; n=4).

Les émulsions les plus négatives sont celles qui contiennent un phospholipide acide, c'est-à-dire estérifié par un groupement sérine ou inositol (LPI, LPS, PI et PS), et les moins négatives celles qui contiennent un groupement choline, zwitterionique (CT, PC L/P, PC O/P, PC DHA,

PC P/O, LPCS, LPCO). Cette observation s'explique tout naturellement par la localisation à l'interface lipidique de ces molécules, qui constituent les principales charges électriques mesurables à la surface des globules. Il est à noter, que les émulsions LHO et LHS font partie des émulsions moyennement négatives, avec un potentiel zêta proche de celui du lait humain, probablement grâce à une composition en phospholipides représentative de celle du lait humain.

**Figure 18:** Valeur du potentiel zêta d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres (moyenne  $\pm$  SEM; n=4).



Les mesures ont été effectuées après dilution au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau du robinet. \* Potentiel zêta significativement différent de celui de l'émulsion CT.

Afin de mesurer le plus judicieusement possible le potentiel électrocinétique, il faut tenir compte du fait, qu'il s'agit d'une valeur relative. En effet, elle dépend de la nature du milieu dans lequel se trouvent les particules considérées, c'est-à-dire dans notre cas les globules lipidiques. Nous avons donc mesuré le potentiel électrocinétique des différentes émulsions dans différents tampons reproduisant les conditions physiologiques gastriques et intestinales.

En phase gastrique (Figure 19), le potentiel électrocinétique des différentes émulsions varie de -35,7 mV (PS) à +1,5 mV (LPE). La présence de sels et l'abaissement du pH de 7,00 à 5,40 entraîne une diminution importante du potentiel électrocinétique de la plupart des émulsions. On peut à nouveau classer ces dernières en trois groupes:

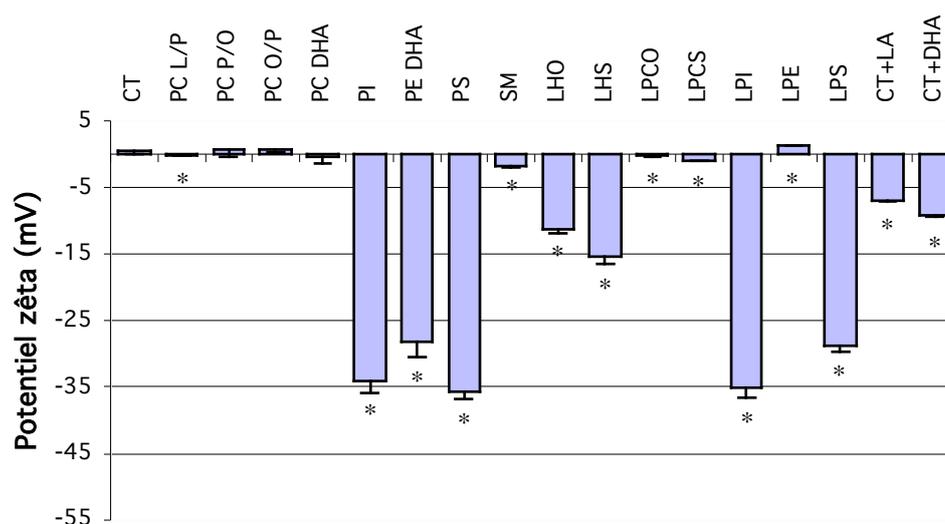
- les émulsions fortement négatives (potentiel < -25 mV): PS, LPI, PI, LPS et PE DHA;

- les émulsions peu négatives ( $-5 \text{ mV} < \text{potentiel} < -15 \text{ mV}$ ): LHS, LHO, CT+DHA et CT+LA;

- et les émulsions plus ou moins neutres ( $5 \text{ mV} < \text{potentiel} < -5 \text{ mV}$ ): SM, LPCS, PC DHA, LPCO, PC L/P, CT, PC O/P, PC P/O et LPE.

Excepté pour LPE, dont le potentiel zêta remonte brusquement de  $-20$  à  $1,5 \text{ mV}$ , les émulsions se répartissent dans les trois groupes selon le même schéma que lorsque la mesure est effectuée dans l'eau du robinet. On notera cependant que les émulsions fortement négatives dans l'eau du robinet conservent un potentiel zêta inférieur à  $-25 \text{ mV}$  dans le tampon de lipolyse gastrique, tandis que les émulsions moyennement et légèrement négatives dans l'eau du robinet se retrouvent avec des potentiels électrocinétiques globalement remontés de  $10 \text{ mV}$ .

**Figure 19:** Valeur du potentiel zêta d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres, en phase gastrique.

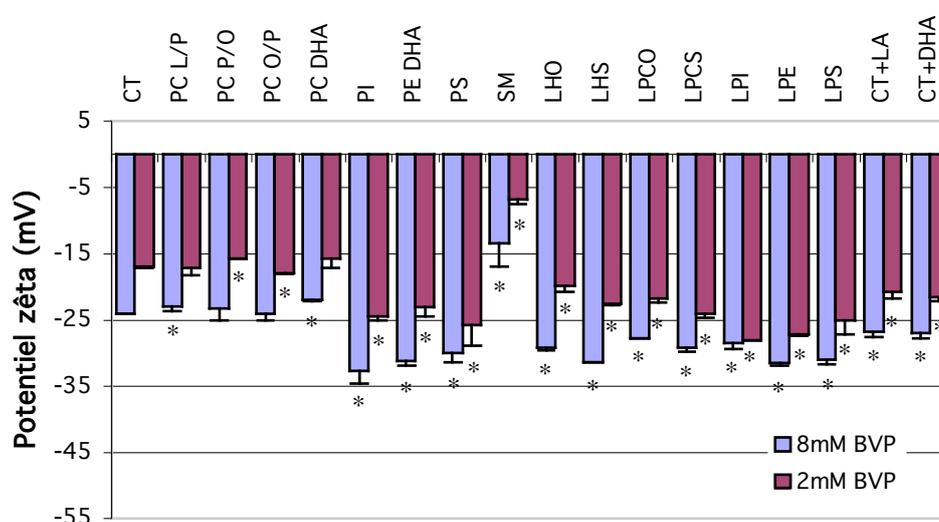


Les mesures ont été effectuées dans du tampon de lipolyse gastrique, dans les conditions d'un test de digestion dilué au 1/3 dans de l'eau distillée (moyenne  $\pm$  SEM;  $n=4$ ). \* Potentiel zêta significativement différent de celui de l'émulsion CT.

En phase intestinale, et en présence de bile vésiculaire de porc (BVP) (Figure 20), le potentiel électrocinétique moyen des émulsions diminue de façon importante par rapport à la phase gastrique. On obtient  $-32,7$  à  $-13,5 \text{ mV}$  avec une concentration de  $8 \text{ mM}$  (concentration physiologique chez le sujet sain) et  $-28,0$  à  $-6,8 \text{ mV}$  avec une concentration en sels biliaires de  $2 \text{ mM}$  (concentration physiologique chez le sujet insuffisant pancréatique). L'émulsion SM devient la seule, dont le potentiel zêta reste supérieur à  $-15 \text{ mV}$ . On observe également par

rapport à la phase gastrique une réduction des écarts entre les différentes émulsions (diminution des écarts standard à la moyenne et du nombre de différences statistiquement significatives). Si on compare les deux concentrations en BVP, on peut noter, que la diminution de la concentration en sels biliaire entraîne une augmentation du potentiel zêta en moyenne d'environ 36 % pour toutes les émulsions, sauf LPI, qui conserve un potentiel très négatif de  $-28$  mV.

**Figure 20:** Valeur du potentiel zêta d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres, en phase intestinale avec de la bile vésiculaire de porc (moyenne  $\pm$  SEM; n=4).

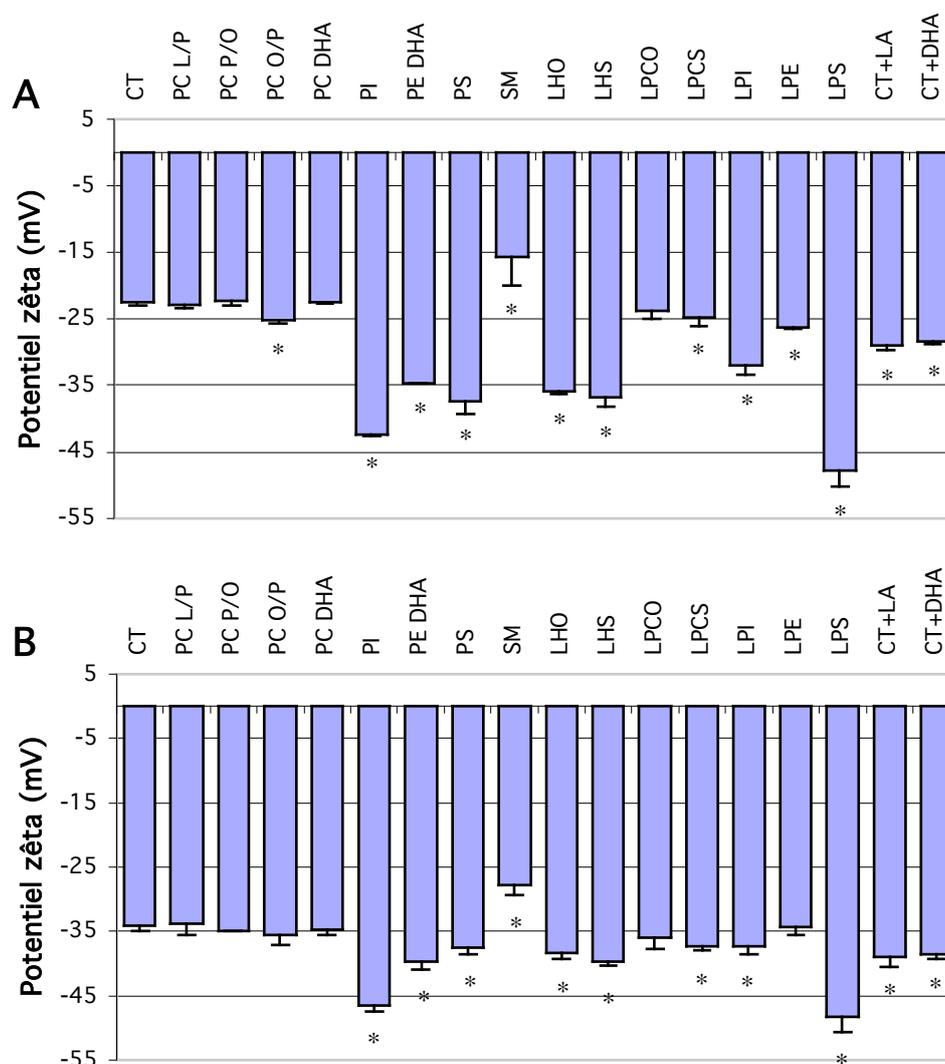


Les mesures ont été effectuées dans du tampon de lipolyse intestinale en présence de 2 ou 8 mM de bile vésiculaire de porc, dans les conditions d'un test de digestion dilué au 1/3 dans de l'eau distillée. \* Potentiel zêta significativement différent de celui de l'émulsion CT.

En phase intestinale, et en présence du mélange de sels biliaires purs Jarvenpaa (J) (Figure 21), le potentiel électrocinétique moyen des émulsions diminue encore, par rapport à la phase gastrique et aussi par rapport à la phase intestinale avec BVP. Il varie de  $-48,3 \pm 2,3$  (émulsion LPS) à  $-27,8 \pm 1,5$  mV (émulsion SM) avec une concentration en sels biliaires de 8 mM et de  $-47,7 \pm 2,5$  (émulsion LPS) à  $-15,7 \pm 4,3$  mV (émulsion SM) avec une concentration en sels biliaires de 2 mM. En présence de 8mM de J, toutes les émulsions ont un potentiel zêta inférieur à  $-25$  mV (même SM), et les écarts entre les différentes émulsions sont très nettement réduits. L'influence sur le potentiel électrocinétique du type de phospholipide utilisé ou de l'ajout d'un acide gras libre est atténuée par la présence d'une

concentration normale de sels biliaires, et les différences réapparaissent lorsqu'on passe de 8 à 2 mM de J.

**Figure 21:** Valeur du potentiel zêta d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, et enrichies ou non avec différents types d'acides gras libres, en phase intestinale avec le mélange Jarvenpaa (moyenne  $\pm$  SEM; n=4).



Les mesures ont été effectuées dans du tampon de lipolyse intestinale en présence de 2mM (A) ou 8 mM (B) du mélange de Jarvenpaa, dans les conditions d'un test de digestion dilué au 1/3 dans de l'eau distillée. \* Potentiel zêta significativement différent de celui de l'émulsion CT.

Quelle que soit la concentration en sels biliaires, il apparaît que les valeurs de potentiel zêta des émulsions est moins négatif en présence de BVP qu'en présence de J (respectivement -28,0 à -6,8 versus -47,7 à -15,7 mV à 2 mM et -32,7 à -13,5 versus -48,3 à -27,8 mV à 8 mM). Une différence d'environ 10 mV est observée et peut être expliquée par le potentiel zêta propre de ces deux sources de sels biliaires. En effet, sans dilution, c'est-à-dire à une

concentration en sels biliaires de 235 mM pour BVP et de 200 mM pour J, on mesure un potentiel électrocinétique moins négatif d'une dizaine de mV pour BVP ( $-14,2 \pm 0,5$  mV pour BVP et  $-26,2 \pm 1,4$  mV pour J).

### 1.3. Conclusion

Ces résultats mettent en évidence, que le type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion ou l'ajout d'un type donné d'acide gras libre dans le mélange lipidique avant l'émulsification est capable de modifier les deux principales caractéristiques physico-chimiques d'émulsions de trioléine. En effet, nous avons montré, que la granulométrie des émulsions peut être modifiée d'un facteur 6. Les phospholipides, permettant d'obtenir les émulsions les plus fines, sont LPAo, PI, AP, LPAp, LPI et PS, et ceux, permettant d'obtenir les émulsions les plus grosses, sont LPE, PEO, PES et SM. Les acides oléique et linoléique diminuent la granulométrie d'une émulsion contrôle, tandis que les acides docosahexaénoïque et palmitique l'augmentent. Les phospholipides et les acides gras libres sont également responsables d'une modulation de l'homogénéité et de la stabilité des émulsions, PES et LPE étant les émulsions les plus hétérogènes et instables. Concernant le potentiel électrocinétique des émulsions, nos résultats mettent en avant un effet modulateur très important, causant des variations de plus d'un facteur 30. Les phospholipides responsables des potentiels les plus négatifs sont LPI, LPS, PI, PS et PE DHA, et ceux, responsables des potentiels les plus neutres, sont les esters de choline PC, LPC et CT (seule ou avec acide gras libre). L'impact des phospholipides et des acides gras libres sur le potentiel zêta est plus marqué dans un milieu reproduisant la phase gastrique de la digestion. Dans les conditions de lipolyse intestinale, leur effet est plus important pour des concentrations en sels biliaires mimant l'insuffisance pancréatique.

## 2. Étude de l'effet du type de phospholipide, de la présence d'acides gras libres et de la présence de protéines sur la phase gastrique de la lipolyse

Après avoir caractérisé l'impact du type de phospholipide et de la présence d'acides gras libres sur la granulométrie et le potentiel électrocinétique d'émulsions de trioléine, la seconde étape a été d'étudier leur effet propre sur l'hydrolyse enzymatique des globules lipidiques par les lipases, et pour commencer par la lipase gastrique.

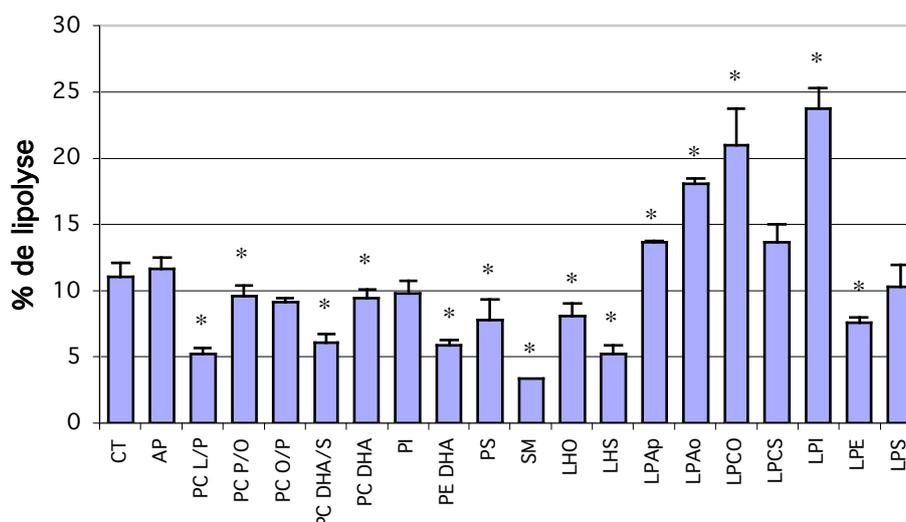
### 2.1. Caractérisation de l'effet de différentes molécules lipidiques et protéiques sur la lipolyse gastrique.

#### 2.1.1. Caractérisation de l'effet des phospholipides

##### 2.1.1.1. Le rendement de la lipolyse gastrique dépend du type de phospholipide entrant dans la composition de l'émulsion lipidique

Nous avons mesuré le rendement de la lipolyse d'émulsions de trioléine stabilisées par différents types de phospholipides en utilisant comme source de lipase du suc gastrique humain. La première expérience a été réalisée avec le suc gastrique d'un patient ne présentant pas de désordre gastro-intestinal (code BAK) (Figure 22).

**Figure 22:** Rendement de lipolyse gastrique d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides (moyenne  $\pm$  SEM).



Les tests de digestion ont été réalisés avec le suc gastrique BAK. \* Rendement de lipolyse gastrique significativement différent de celui de l'émulsion CT (n=2 pour SM, n=4 pour AP, PE DHA, PS, LPAP et LPAO, n=6 pour PC L/P, PC O/P, PC DHA/S, PC DHA, LHS et LPS, n=8 pour CT, n=10 pour PI et LHO, n=12 pour LPCO et LPCS, n=14 pour LPE, n=18 pour PC P/O, n=28 pour LPI).

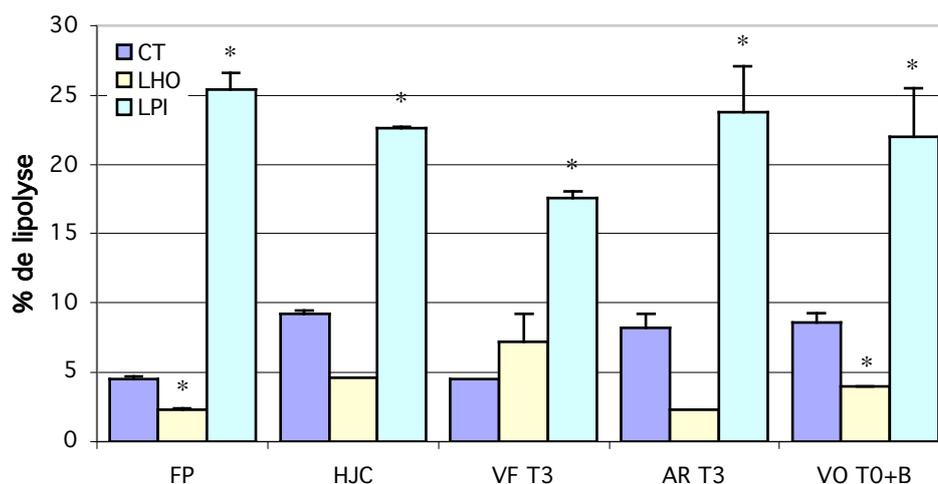
Les rendements de lipolyse obtenus varient très largement de 3,3 à 23,8 % en fonction du type de phospholipide utilisé. La majorité des phospholipides permettent une hydrolyse comprise entre 5 et 15 %. Le plus mauvais rendement est obtenu pour l'émulsion SM (3,34 %), et deux phospholipides permettent une lipolyse de plus de 20 %: LPI (23,82 ± 1,50 %) et LPCO (21,01 ± 2,77 %).

Si on choisit l'émulsion CT comme référence, on peut classer les différents phospholipides testés en fonction de leur impact relatif:

- une augmentation très importante (supérieure à 80 %) et très significative ( $p < 0,005$ ) pour LPI (+115 %) et LPCO (+90 %);
- une augmentation importante (supérieure à 60 %) pour LPAo (+64 %) ( $p < 0,01$ );
- une modification peu importante (augmentation ou diminution de moins de 25 %) pour LPCS (+23 %), LPAp (+23 %), AP (+5%), LPS (-7 %), PI (-11 %), PC P/O (-13 %), PC DHA (-15 %) et PC O/P (-18 %) (les écarts ne sont pas significatifs pour les deux tiers de ces valeurs);
- une diminution notable de 25 à 60 % ( $p < 0,05$ ) pour LHO (-27 %), PS (-30 %), LPE (-31 %), PC DHA/S (-45 %), PE DHA (-47 %), PC L/P (-53 %) et LHS (-53 %);
- et une diminution importante de plus de 60 % ( $p < 0,05$ ) pour SM (-70 %).

Nous avons ensuite renouvelé l'expérience en utilisant des sucs gastriques d'autres patients ne présentant pas non plus de désordre gastro-intestinal (FP, HJC, VF, AR, et VO) pour hydrolyser un nombre limité d'émulsions: CT (pour servir de référence), LHO (parce que sa composition en phospholipides est proche de celle du lait humain) et LPI (à cause de son effet activateur très important) (Figure 23). Les résultats obtenus confirment, que le type de phospholipide incorporé dans une émulsion influence l'activité de la lipase gastrique. En effet, quel que soit le suc gastrique considéré, il existe un écart de 48 à 466 % (en valeur absolue) entre le rendement de lipolyse de l'émulsion CT et celui des émulsions LHO et LPI. On peut noter que l'émulsion LPI entraîne systématiquement une augmentation très importante du rendement de lipolyse, avec une amélioration variant de +147 % (HJC) à +466 % (FP). Cette fourchette dévoile un aspect intéressant de nos expérimentations. En effet, alors que nous avons utilisé une quantité fixe de lipase gastrique (9,25 unités d'enzyme mesurées sur tributyrine dans chaque expérience), le rendement de la lipolyse de chaque émulsion diffère d'un suc gastrique à l'autre.

**Figure 23:** Rendements de lipolyse gastrique des émulsions CT, LHO et LPI (moyenne ± SEM).

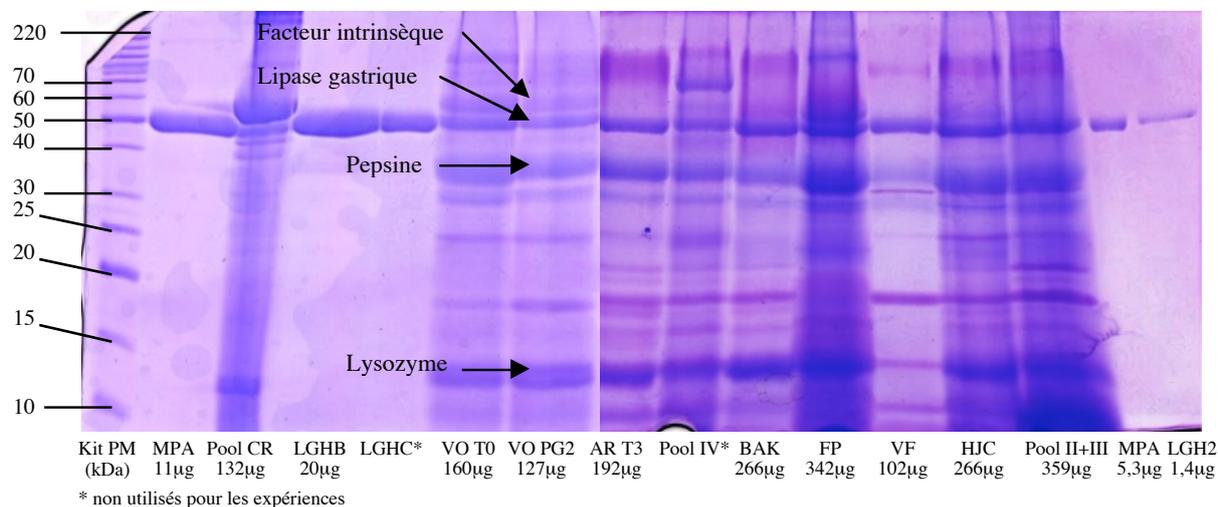


Les tests de digestion ont été réalisés avec les sucs gastriques FP (n=4 pour CT et LHO, n=10 pour LPI), HJC (n=2 pour LHO, n=4 pour CT et LPI), VF T3 (n=2 pour CT, n=6 pour LHO et LPI), AR T3 (n=2 pour LHO, n=4 pour CT et LPI) et VO T0+B (n=4 pour LHO, n=8 pour LPI, n=10 pour CT). \* Rendement de lipolyse gastrique significativement différent de celui de l'émulsion CT pour un même suc gastrique.

### 2.1.1.2. L'effet du type de phospholipide sur le rendement de la lipolyse gastrique est modulé par la source de lipase gastrique

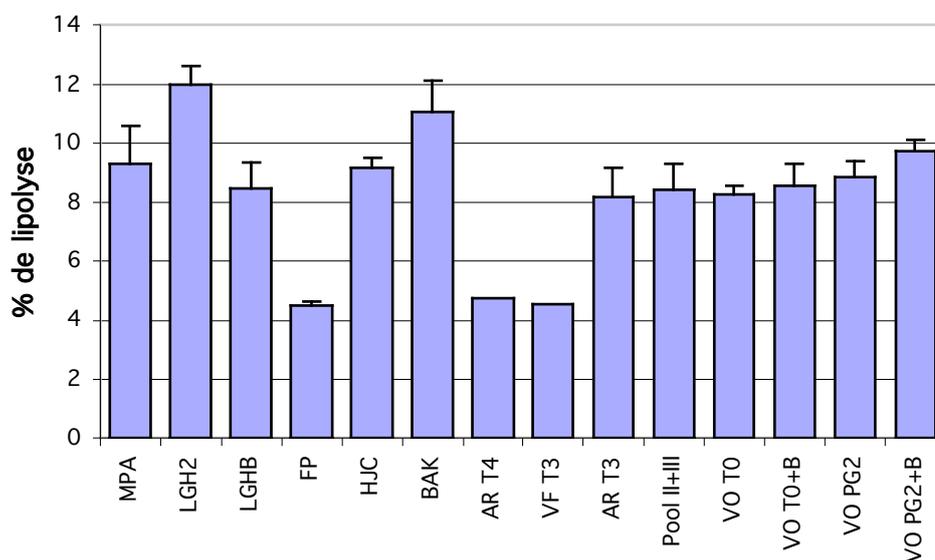
Les résultats précédents ont semblé dévoiler aussi que l'effet du type de phospholipide sur le rendement de lipolyse gastrique varie selon l'origine du suc gastrique utilisé. L'impact de la source de lipase gastrique pourrait être lié à la composition du suc, à l'état de dégradation de la lipase gastrique (intégrité de l'extrémité N-terminale de l'enzyme), ou à un polymorphisme génétique (synthèse de formes plus ou moins actives de la lipase).

**Figure 24:** Analyse du profil en protéines de différents sucs gastriques par électrophorèse sur gel d'acrylamide à 12 %.

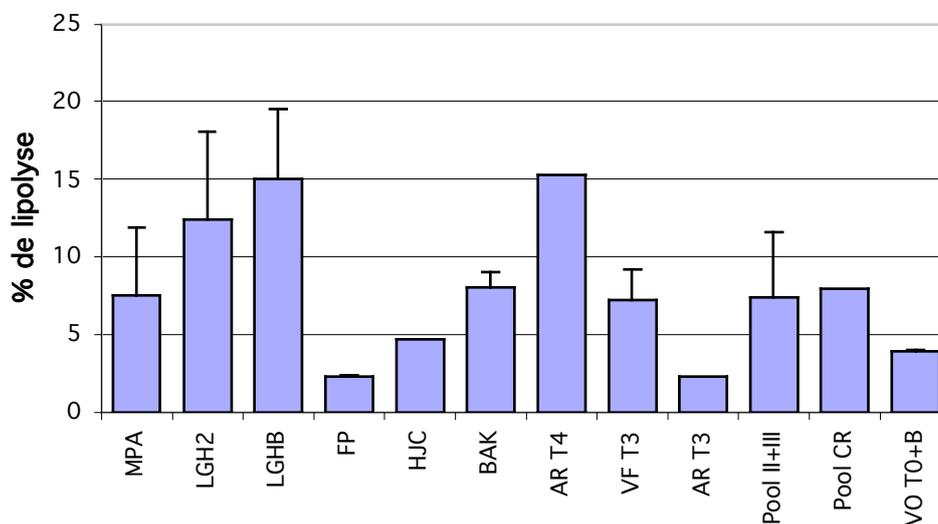


Concernant la composition du suc gastrique, nous avons notamment montré par électrophorèse, qu'il existe une variation inter-individuelle non négligeable dans la composition en protéines du suc gastrique, avec des différences qualitatives et quantitatives (Figure 24). Si d'ores et déjà le facteur intrinsèque, la lipase gastrique, la pepsine et le lysozyme ont été caractérisés, d'autres protéines sont encore non identifiées et pourraient peut-être jouer un rôle dans la modulation de l'activité de la lipase gastrique humaine.

**Figure 25:** Rendements de lipolyse gastrique de l'émulsion CT, obtenus avec différentes sources de lipases gastriques (moyenne  $\pm$  SEM; n=2 pour AR T4 et VF T3, n=4 pour FP, HJC, AR T3 et Pool II+III, n=8 pour BAK, n=10 pour VO T0+B et VO PG2, n=12 pour LGH2, VO T0 et VO PG2+B, n=14 pour MPA, n=20 pour LGHB).

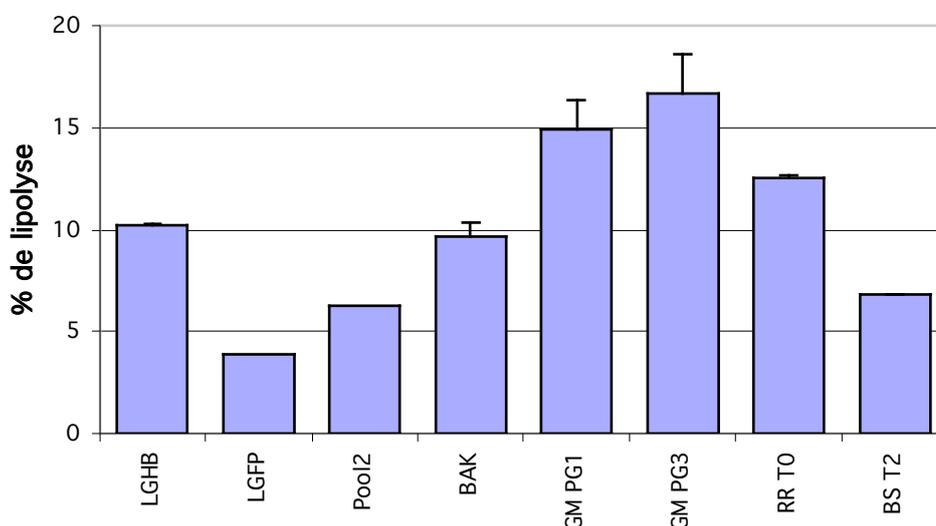


**Figure 26:** Rendements de lipolyse gastrique de l'émulsion LHO, obtenus avec différentes sources de lipases gastriques (moyenne  $\pm$  SEM; n=2 pour HJC, AR T4, AR T3 et Pool CR, n=4 pour MPA, LGH2, FP Pool II+III et VO T0+B, n=6 pour LGHB et VF T3, n=10 pour BAK).

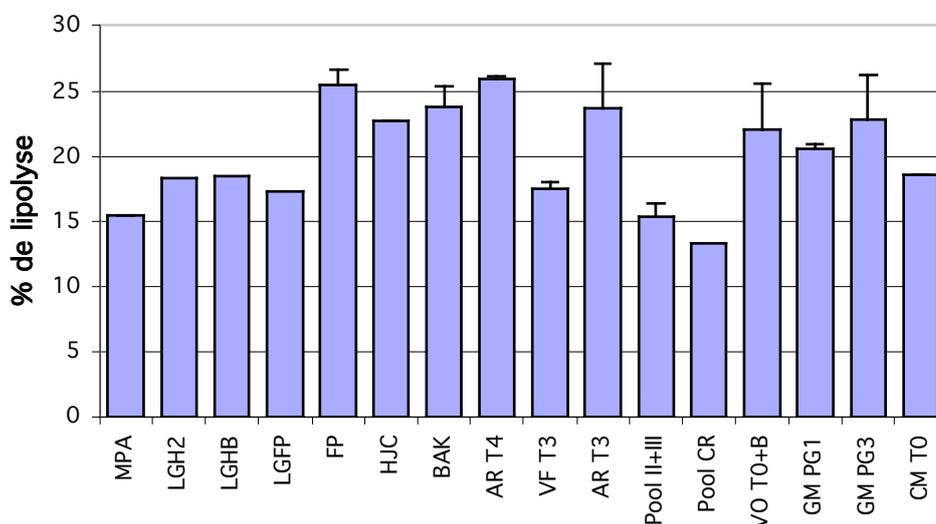


Afin de vérifier si le choix d'un suc gastrique en particulier peut moduler l'effet du type de phospholipide sur le rendement de la lipolyse gastrique, nous avons déterminé le profil lipolytique de quatre émulsions (CT, LHO, PC P/O et LPI) (Figures 25 à 28) avec plusieurs sucs gastriques. Les émulsions CT, LHO et LPI ont été choisies pour les mêmes raisons que précédemment et l'émulsion PC P/O a été utilisée, afin de comparer un type isolé de phosphatidylcholine avec un mélange standard (CT). Nous avons également utilisé différentes lipases gastriques purifiées (MPA, LGH2, LGHB, LGFP et Pool2), afin d'écartier l'influence éventuelle de la composition du suc gastrique.

**Figure 27:** Rendements de lipolyse gastrique de l'émulsion PC P/O, obtenus avec différentes sources de lipases gastriques (moyenne  $\pm$  SEM; n=2 pour LGFP et Pool2, n=4 pour LGHB, RR T0 et BS T2, n=10 pour GM PG1, n=12 pour GM PG3, n=18 pour BAK).



**Figure 28:** Rendements de lipolyse gastrique de l'émulsion LPI, obtenus avec différentes sources de lipases gastriques (moyenne  $\pm$  SEM; n=2 pour LGH2, LGHB, LGFP et Pool CR, n=4 pour MPA, HJC, AR T4, AR T3 et CM T0, n=6 pour VF T3 et Pool II+III, n=8 pour VO T0+B et GM PG3, n=10 pour FP, n=14 pour GM PG1, n=28 pour BAK).



D'une manière générale, les quatre profils lipolytiques obtenus montrent clairement que la source de lipase gastrique interfère avec l'effet du type de phospholipide incorporé dans une émulsion de trioléine. En effet, malgré une quantité de lipase gastrique fixe (9,25 U mesurées sur tributyrine), l'émulsion CT est hydrolysée avec un rendement de 4,5 à 11,1 % selon le suc gastrique ou la lipase purifiée considéré (variation d'un facteur 2,5), l'émulsion LHO avec un rendement de 2,3 à 15,3 % (facteur 6,7), l'émulsion PC P/O de 3,9 à 16,7 % (facteur 4,3) et l'émulsion LPI de 13,3 à 25,9 % (facteur 1,9). De plus, les lipases gastriques responsables des rendements de lipolyse minimaux et maximaux pour chaque émulsion ne sont jamais les mêmes: respectivement FP et LGH2 pour l'émulsion CT, AR T3 et AR T4 pour LHO, LGFP et GM PG3 pour PC P/O et Pool CR et AR T4 pour LPI. Il semble donc, que l'effet activateur ou inhibiteur d'un phospholipide donné dépende de l'environnement gastrique dans lequel se trouve l'émulsion. De ce point de vue, il apparaît alors que l'émulsion LPI, dont l'écart, entre les rendements de lipolyse minimal et maximal, est le plus faible, soit la moins sensible à ce paramètre.

*2.1.1.3. L'effet du type de phospholipide est confirmé en présence de protéines*

Les lipides n'étant pas les seuls nutriments apportés par l'alimentation, nous avons voulu travailler dans des conditions encore plus physiologiques, en rajoutant des glucides et des protéines dans le tampon de lipolyse gastrique. Nous avons choisi d'utiliser des ingrédients souvent utilisés en nutrition artificielle : du lactose et différentes source de protéines d'origine bovine, sous forme de lait écrémé en poudre, de protéine du lactosérum (protéines associées à la fraction aqueuse du lait), de caséines (protéines associées à la membrane des globules lipidiques) et d'un mélange équimassique de protéines du lactosérum et de caséines (appelé « mélange »). Les premiers tests avec ces émulsions complexes ont été réalisés en utilisant le suc gastrique GM PG1 et l'émulsion LPI (Tableau 6).

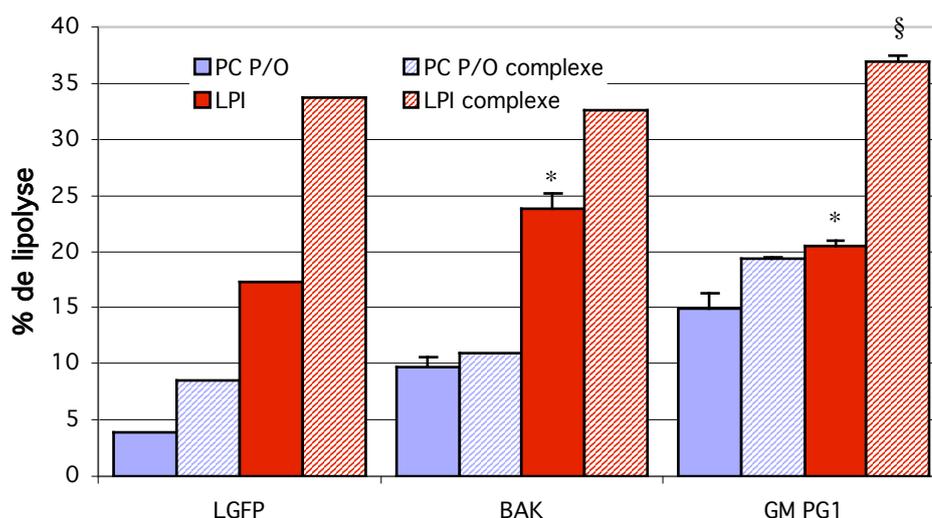
**Tableau 6:** Rendements de lipolyse gastrique de l'émulsion LPI avec le suc gastrique GM PG1, en présence de lactose et de différentes sources de protéines de lait (moyenne ± SEM).

<i>Source de protéine</i>	<i>Rendement de lipolyse gastrique (%)</i>
Aucune	20,53 ± 0,45 (n=14)
Lait de vache écrémé en poudre	31,81 ± 0,17 * (n=4)
Protéines du lactosérum (purifiées)	41,77 * (n=2)
Caséines (purifiées)	31,06 * (n=2)
Mélange de protéines du lactosérum et de caséines	36,99 ± 0,56 * (n=4)

\* Rendement de lipolyse gastrique significativement différent de celui obtenu sans protéines.

Toutes conditions confondues, le rendement de la lipolyse gastrique varie de 21 à 42 %. Par rapport au milieu réactionnel contenant seulement l'émulsion, on observe, que l'ajout de lactose et de protéines permet d'améliorer ce rendement d'au moins 50 % ( $p < 0,05$ ) : 55 % en présence de lait écrémé en poudre, 103 % en présence de protéines du lactosérum, 51 % en présence de caséines, et 80 % en présence du mélange équimassique de protéines du lactosérum et de caséines (c'est-à-dire une amélioration exactement intermédiaire entre celle due aux protéines du lactosérum et celle due aux caséines). Nous avons donc choisi ce mélange pour tester l'effet du type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion sur l'activité de la lipase gastrique, apportée sous forme purifiée (LGFP) ou sous forme de suc gastrique (BAK et GM PG1). Nous nous sommes limités à deux types de phospholipides représentatifs: PC P/O et LPI (Figure 29).

**Figure 29:** Effet du type de phospholipide sur le rendement de lipolyse gastrique des émulsions PC P/O et LPI en présence de lactose et de protéines de lait (moyenne  $\pm$  SEM).



n=2 avec LGFP et pour PC P/O complexe et LPI complexe avec BAK, n=4 pour PC P/O complexe et LPI complexe avec GM PG1, n=10 pour PC P/O avec GM PG1, n=14 pour LPI avec GM PG1, n=18 pour PC P/O avec BAK, n=28 pour LPI avec BAK). Rendement de lipolyse gastrique significativement différent de celui obtenu avec l'émulsion PC P/O (\*) et de celui obtenu avec l'émulsion PC P/O complexe (§).

D'une manière générale, on constate tout d'abord, que l'ajout de lactose et de protéines de lait purifiées améliore le rendement de la lipolyse pour toutes les combinaisons d'émulsion et de lipase testées. Pour l'émulsion PC P/O, cette amélioration est de 121 % avec LGFP, 13 % avec BAK et 30 % avec GM PG1. Pour l'émulsion LPI, l'amélioration est de 95 % avec LGFP, 37 % avec BAK et 80 % avec GM PG1. Ainsi, en présence de lactose et de protéines

de lait, et quelle que soit la source de lipase gastrique utilisée, l'émulsion LPI permet encore d'obtenir un meilleur rendement de lipolyse, avec une augmentation d'un facteur 2 à 4 par rapport à l'émulsion PC P/O. On peut noter, que dans le cas de l'utilisation d'un suc gastrique, l'amélioration obtenue par rapport à PC P/O grâce à LPI est encore plus marquée en présence de lactose et de protéines de lait: +200 % versus +147 % pour BAK et +91 % versus +38 % pour GM PG1. Ce renforcement de l'effet activateur de LPI en présence des deux sucs gastriques (mais pas en présence de la lipase purifiée), résulte du fait que l'ajout de lactose et de protéines de lait améliore moins le rendement de la lipolyse de l'émulsion PC P/O que celui de l'émulsion LPI. En effet, en présence de suc gastrique, dans le cas de l'émulsion PC P/O, l'ajout du lactose et des protéines alimentaires n'active pas ou active faiblement la lipase gastrique, alors que dans le cas de l'émulsion LPI un fort effet activateur est observé, qui permet d'atteindre, quelle que soit la source de lipase utilisée, un rendement de lipolyse gastrique optimal d'environ 33 à 37 %. Afin de mieux comprendre le mode d'action du lactose et des protéines de lait, nous avons également étudié leur effet en les ajoutant, non pas dans le tampon de lipolyse, mais dans le tampon d'émulsification du mélange lipidique. Les lipolyses ont été réalisées avec le suc gastrique GM PG1 et les émulsions PC P/O et LPI (Tableau 7).

**Tableau 7:** Rendements de lipolyse gastrique (%) des émulsions PC P/O et LPI avec le suc gastrique GM PG1. Effet de l'ajout du lactose et des protéines de lait après ou avant la mise en émulsion par sonication (moyenne  $\pm$  SEM; n=4 sauf n=10 pour PC P/O et n=14 pour LPI sans protéines ni lactose).

<i>Conditions expérimentales</i>	<i>Émulsion PC P/O</i>		<i>Émulsion LPI</i>	
	% de lipolyse	Granulométrie ( $\mu$ m)	% de lipolyse	Granulométrie ( $\mu$ m)
Sans protéines ni lactose	14,92 $\pm$ 1,44	1,95	20,53 $\pm$ 0,45 *	0,56
Ajout des protéines et du lactose après sonication	19,40 $\pm$ 0,11	2,95	36,99 $\pm$ 0,56 *	0,54
Ajout des protéines et du lactose avant sonication	35,63 $\pm$ 0,81	0,49	35,53 $\pm$ 0,22	0,57

\* Rendement de lipolyse gastrique significativement différent de celui obtenu avec l'émulsion PC P/O.

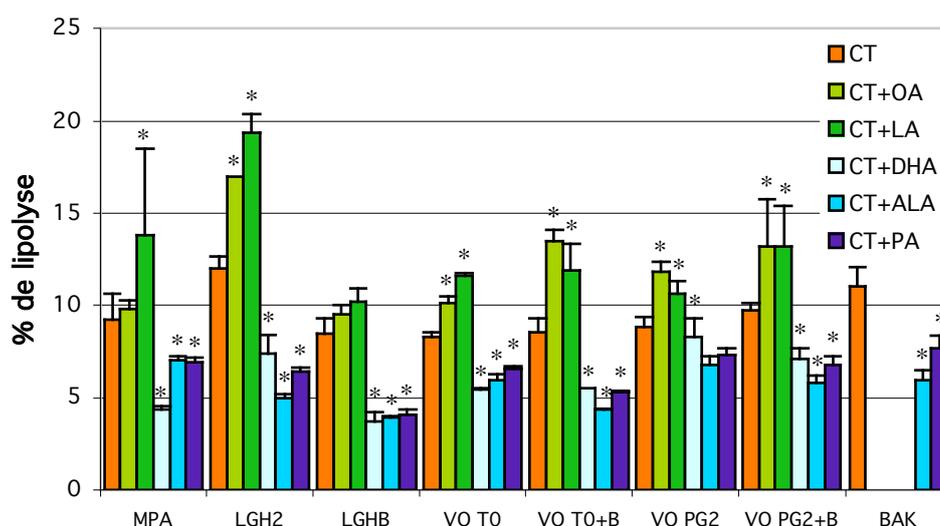
Les résultats obtenus montrent, que dans ces conditions le rendement de la lipolyse de l'émulsion PC P/O atteint celui obtenu avec l'émulsion LPI (environ 35 %). Il apparaît également, que le lactose et les protéines de lait renforcent l'effet de LPI quelle que soit la façon dont ils sont ajoutés dans le milieu réactionnel, mais qu'ils n'améliorent véritablement le rendement de la lipolyse de l'émulsion PC P/O que s'ils sont apportés par le biais du

tampon d'émulsification. On peut donc penser, que les protéines du lait ajoutées après la sonication se fixent de façon différente sur l'interface contenant PC P/O par rapport à celle contenant LPI. L'effet activateur de l'ajout de lactose et de protéines de lait dépend donc fortement de l'étape d'émulsification dans le cas de l'émulsion PC P/O, ce qui signifie que l'arrangement des protéines à l'interface lipidique est différent lorsqu'elles sont ajoutées avant la sonication. Le diamètre des globules lipidiques de l'émulsion PC P/O est d'ailleurs affecté très différemment en fonction du mode d'ajout des protéines du lait : il est augmenté lorsqu'elles sont ajoutées après la sonication (2,95 au lieu de 1,95  $\mu\text{m}$ ), mais diminué lorsqu'elles sont ajoutées avant (0,49  $\mu\text{m}$ ). Dans le cas précis de l'émulsion PC P/O, on pourrait attribuer l'effet observé à la granulométrie.

### 2.1.2. Caractérisation de l'effet de la présence d'acides gras libres

Après l'effet du type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion lipidique, nous avons regardé l'effet de l'ajout d'un type donné d'acides gras libres. Pour cela, nous avons enrichi le mélange lipidique contrôle avec 2% de différents acides gras libres (acides oléique, linoléique, alpha-linolénique, docosahexaénoïque et palmitique) ajoutés avant l'émulsification, et utilisé différentes lipases purifiées (MPA, LGH2 et LGHB) et différents sucs gastriques (VO T0, VO T0+B, VO PG2, VO PG2+B et BAK) (Figure 30).

**Figure 30:** Effet de l'ajout de différents acides gras libres sur le rendement de lipolyse gastrique de l'émulsion CT (moyenne  $\pm$  SEM).



n=4 pour CT+OA sauf avec LGH2 (n=2), pour CT+LA sauf avec LGHB (n=8), pour CT+DHA sauf avec VO T0+B (n=2), pour CT+ALA et pour CT+PA; pour CT, n=8 avec BAK, n=10 avec VO T0+B et VO PG2, n=12 avec LGH2, VO T0 et VO PG2+B, n=14 avec MPA, n=20 avec LGHB. \* Rendement de lipolyse gastrique significativement différent de celui obtenu avec l'émulsion CT.

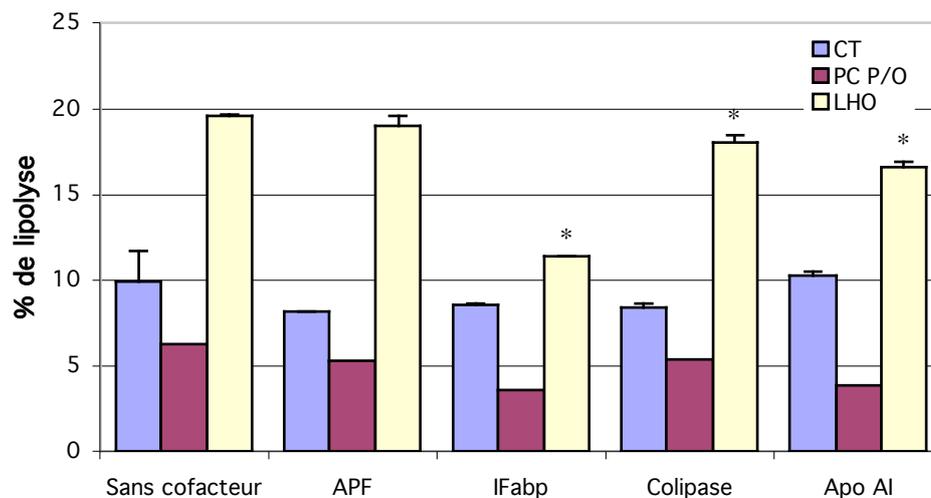
Globalement, nos résultats indiquent, que le rendement de la lipolyse de l'émulsion CT est modifié par la présence d'acide gras libres, quelle que soit la source de lipase gastrique utilisée ( $p < 0,05$  dans plus de 86 % des cas). On obtient une modulation différente en fonction de l'acide gras considéré : les acides oléique et linoléique améliorent le rendement de la lipolyse de l'émulsion CT, tandis que les acides alpha-linolénique, docosahexaénoïque et palmitique le diminuent. L'ampleur de la modulation obtenue est toujours dépendante de la source de lipase gastrique utilisée. L'amélioration de la lipolyse obtenue avec l'acide linoléique (+19,9 à +61,4 %) est plus importante que celle obtenue avec l'acide oléique (+5,7 à + 56,8 %). L'effet inhibiteur des autres acides gras libres varie de -6,4 à -58,4 % et il est légèrement plus marqué pour l'acide alpha-linolénique (-40,5 % en moyenne), que pour l'acide docosahexaénoïque (-35,7 % en moyenne) et l'acide palmitique (-32,7 % en moyenne). Il est intéressant de remarquer, que les acides gras activateurs (OA et LA) sont les acides gras libres ayant également entraîné une diminution de la granulométrie de l'émulsion CT, et que, inversement, deux des trois acides gras inhibiteurs (DHA et PA) sont les acides gras libres ayant entraîné une augmentation de la granulométrie de l'émulsion CT (Figure 13).

### **2.1.3. Caractérisation de l'effet de la présence de protéines liant les acides gras**

Nous avons regardé l'effet de la présence dans le milieu réactionnel de plusieurs protéines capables de fixer les acides gras ou de jouer éventuellement un rôle de partenaire protéique pour la lipase gastrique humaine. Il est en effet possible, que certaines de ces protéines puissent favoriser l'action de la lipase gastrique en éliminant de l'interface lipidique les acides gras inhibiteurs libérés au cours de la lipolyse.

Pour cela, nous avons hydrolysé trois émulsions différentes (CT, PC P/O et LHO) avec une lipase purifiée dans les conditions habituelles ou en présence d'APF (Anionic Peptide Factor), d'IFabp (Intestinal Fatty acid binding protein), de colipase pancréatique ou d'Apoprotéine AI (Figure 31). Les résultats obtenus montrent, que la présence d'APF, d'IFabp, de colipase ou d'Apo AI est sans effet sur le rendement de la lipolyse gastrique des émulsions CT et PC P/O (pas d'écart significatif entre les différents rendements). Concernant l'émulsion LHO, on constate, que l'APF ne modifie pas non plus le rendement de la lipolyse, mais que les trois autres protéines entraînent une diminution significative ( $p < 0,05$ ) de 8 % pour la colipase, 15 % pour l'Apo AI et 42 % pour l'IFabp.

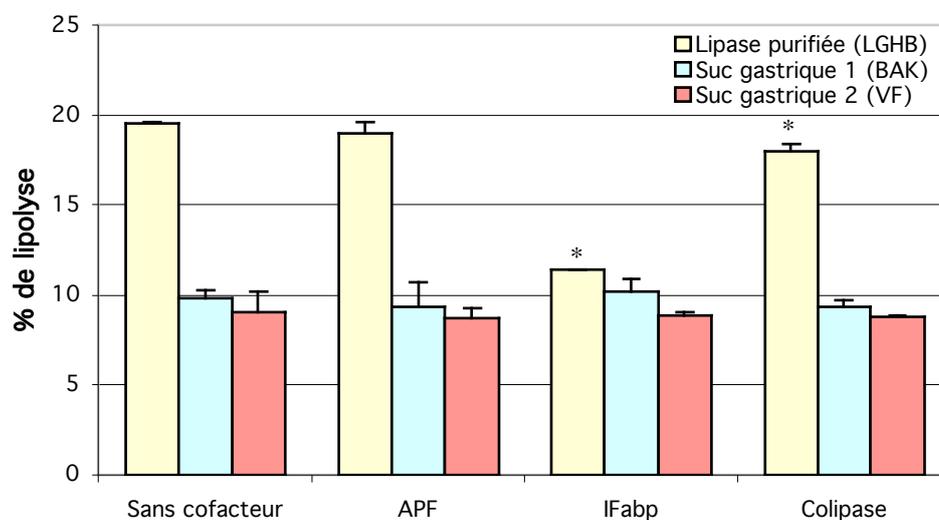
**Figure 31:** Effet de la présence de protéines liant les acides gras dans le milieu réactionnel sur le rendement de lipolyse gastrique des émulsions CT, PC P/O et LHO (moyenne  $\pm$  SEM).



Les tests de digestion ont été réalisés avec la lipase purifiée LGHB pour les émulsions CT et LHO (n=4), et la lipase purifiée Pool2 pour l'émulsion PC P/O (n=2). \* Rendement de lipolyse gastrique significativement différent de celui obtenu sans cofacteur.

Nous avons cherché à confirmer cet effet, a priori contraire à notre hypothèse, en comparant deux sucs gastriques avec une lipase purifiée (Figure 32). Les rendements de lipolyse déterminés à l'aide des sucs gastriques BAK et VF ne font ressortir aucun effet lié à la présence de l'APF, de l'IFabp ou de la colipase. Aucun effet n'a pu être mis en évidence non plus à l'aide des mêmes sucs et de deux autres émulsions : PI et LPI (résultats non présentés).

**Figure 32:** Effet de la présence de protéines liant les acides gras dans le milieu réactionnel sur le rendement de lipolyse gastrique de l'émulsion LHO (moyenne  $\pm$  SEM; n=4).



\* Rendement de lipolyse gastrique significativement différent de celui obtenu sans cofacteur.

#### 2.1.4. Conclusion

Les résultats obtenus au cours de l'étude de l'effet du type de phospholipide, de la présence d'acides gras libres et de la présence de protéines sur la phase gastrique de la lipolyse sont nombreux. Concernant la caractérisation de l'effet des phospholipides, nos travaux montrent, que le rendement de la lipolyse gastrique est fortement influencé par le type de phospholipide entrant dans la composition de l'émulsion lipidique. Ce rendement est amélioré de façon très importante en présence de LPI et de LPCO, et diminué drastiquement en présence de SM. Nous avons également mis en évidence, que l'effet du type de phospholipide était modulé par la source de lipase gastrique utilisée, et que LPI semblait capable de compenser les disparités liées au choix de la source de lipase gastrique. En ajoutant du lactose et des protéines de lait dans le tampon de lipolyse gastrique, nous avons pu confirmer l'effet du type de phospholipide dans des conditions encore plus proches de la physiologie. Il est apparu notamment, que la présence de LPI permettait, quelle que soit la source de lipase gastrique utilisée, d'obtenir un meilleur rendement de lipolyse, avec une amélioration relative encore plus marquée par rapport à PC P/O. En outre, l'ajout de lactose et de protéines de lait dans le tampon d'émulsification, a permis d'identifier l'effet spécifique d'une interface contenant LPI sur le recrutement de protéines environnantes, pouvant être responsable de l'amélioration observée. Concernant la caractérisation de l'effet des acides gras libres, nos résultats soulignent, que les acides oléique (OA) et linoléique (LA) améliorent la lipolyse de l'émulsion CT, tandis que les acides alpha-linolénique (ALA), docosahexaénoïque (DHA) et palmitique (PA) la diminuent. Concernant, enfin, la caractérisation de l'effet de protéines liant les acides gras ou susceptible de jouer le rôle de cofacteur (APF, IFabp, colipase, Apo AI), nous avons pu observer, seulement pour l'émulsion LHO et avec une lipase gastrique purifiée, une inhibition de la lipolyse, en particulier en présence d'IFabp, mais la diminution obtenue n'a pas été confirmée avec du suc gastrique.

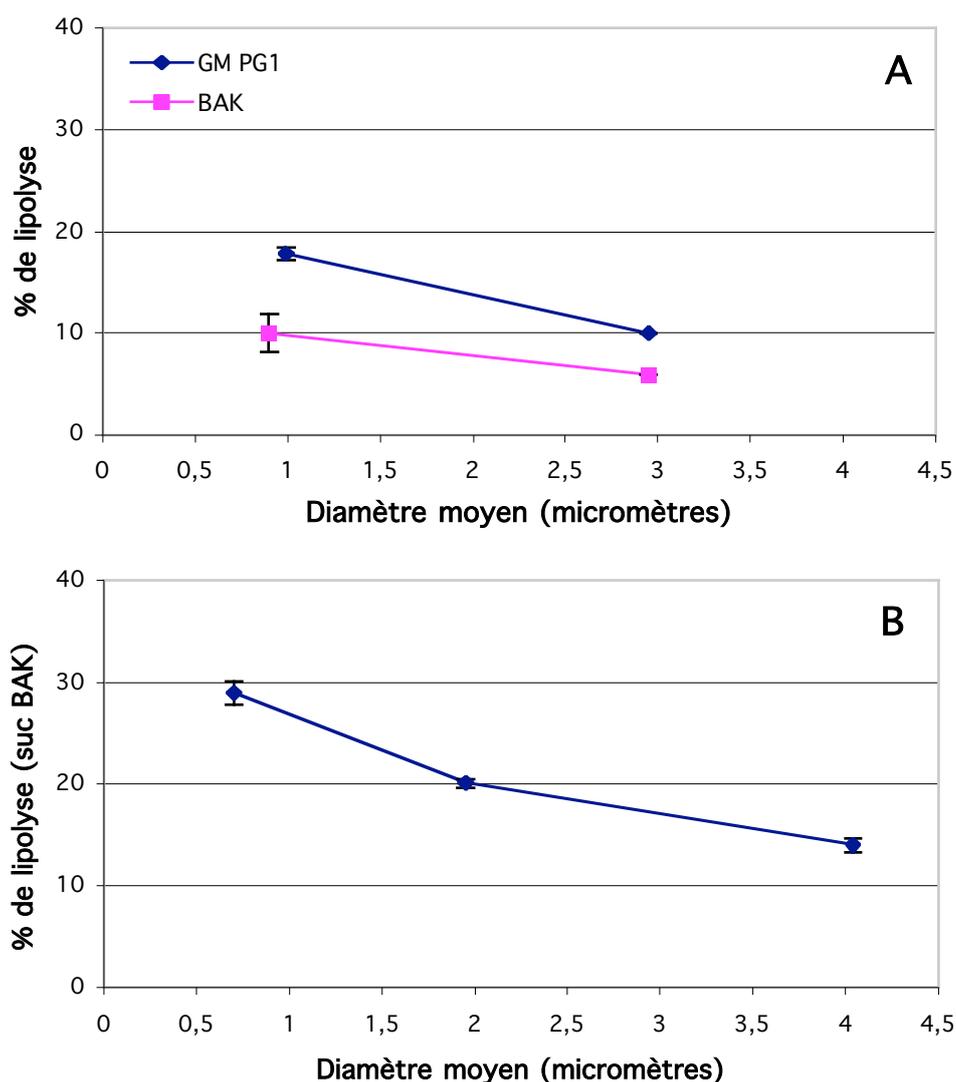
#### 2.2. Recherche des mécanismes impliqués dans l'amélioration du rendement de la lipolyse gastrique par le lysophosphatidylinositol

Parmi les différentes molécules de type lipidique et protéique testées, c'est le lysophosphatidylinositol (LPI), qui permet d'obtenir le meilleur rendement de lipolyse gastrique. Nous avons donc cherché à identifier le(s) mode(s) d'action de ce lysophospholipide particulièrement efficace, en étudiant plusieurs mécanismes possibles.

### 2.2.1. La taille des globules lipidiques

Plusieurs études menées au laboratoire ont permis de montrer, que la taille des globules lipidiques gouverne l'activité de la lipase gastrique. De fait, en obtenant des émulsions de compositions identiques mais de granulométries différentes, nous avons pu confirmer à l'aide de notre microsysteme de lipolyse, que le rendement de la lipolyse gastrique d'une émulsion donnée augmente lorsque le diamètre moyen de ses globules diminue (Figure 33). Pour l'émulsion LPCO, par exemple, on améliore le rendement de la lipolyse d'environ 50 % lorsque le diamètre moyen des globules lipidiques est divisé par deux, et de 100 % lorsqu'il est divisé par quatre. Pour l'émulsion PC P/O, une diminution d'un facteur 3 de la granulométrie permet quasiment de doubler le rendement de la lipolyse, que ce soit avec le suc gastrique GM PG1 ou le suc gastrique BAK.

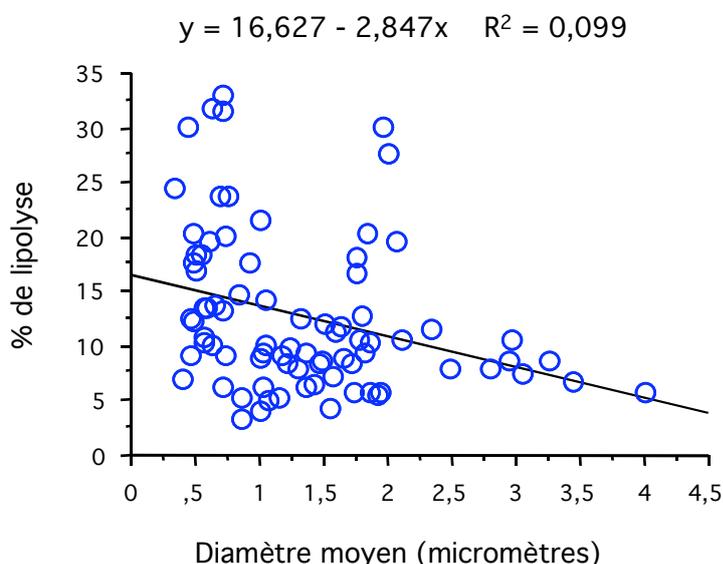
**Figure 33:** Effet du diamètre moyen des globules lipidiques des émulsions PC P/O (A) et LPCO (B) sur leur rendement de lipolyse gastrique (moyenne  $\pm$  SEM; n=4, sauf n=2 pour PC P/O de granulométrie 2,95  $\mu\text{m}$  et n=8 pour PC P/O de granulométrie 0,99  $\mu\text{m}$  avec GM PG1).



Nous avons établi d'autre part, que la présence de LPI dans une émulsion de trioléine permet la fabrication de globules lipidiques de petit diamètre ( $0,60 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ). L'émulsion obtenue est par ailleurs extrêmement reproductible, avec un écart standard à la moyenne de seulement  $0,03 \mu\text{m}$  pour 27 émulsions ayant permis d'établir la moyenne, et particulièrement stable au cours du temps, au regard de l'évolution de sa granulométrie et du pourcentage de trioléine émulsifié après une semaine de conservation.

Sachant que l'activité de la lipase gastrique est d'autant plus importante que les globules lipidiques sont petits, on peut penser que le LPI favorise l'activité de la lipase gastrique en permettant d'obtenir des globules de petit diamètre. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cherché l'existence d'une relation entre le rendement de la lipolyse des émulsions et leur granulométrie (Figure 34). Après régression linéaire, on obtient un  $R^2$  de seulement 0,099, ce qui indique que des globules lipidiques de petit diamètre ne sont pas systématiquement mieux hydrolysés.

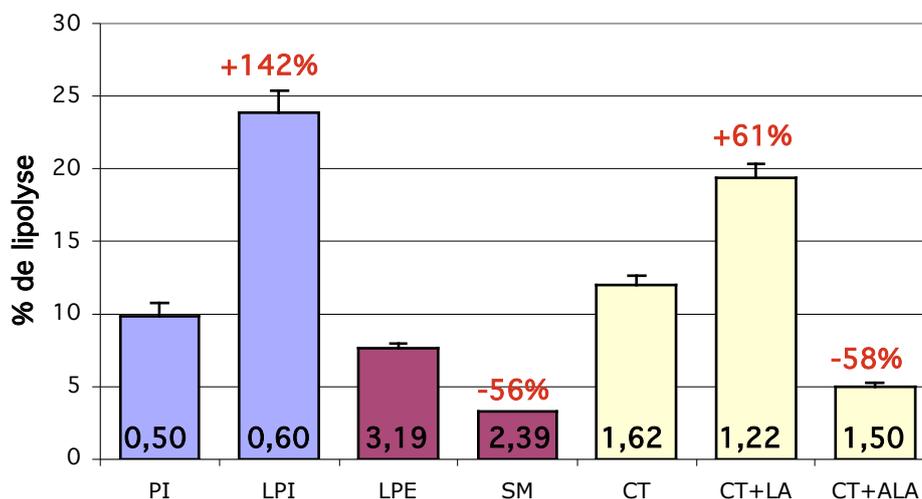
**Figure 34:** Régression linéaire entre le rendement de lipolyse gastrique des émulsions et le diamètre moyen de leurs globules.



À titre d'exemples, les émulsions très fines PI et LPI sont de granulométrie très proches ( $0,50$  et  $0,60 \mu\text{m}$  respectivement), mais ne sont pas lipolysées à des taux comparables (environ 10 et 24 % respectivement). Les globules lipidiques de l'émulsion "grossière" SM, légèrement moins gros que ceux de l'émulsion LPE ( $2,39$  versus  $3,19 \mu\text{m}$  respectivement), sont pourtant deux fois moins bien hydrolysés par la lipase gastrique. L'ajout d'acide linoléique ou d'acide alpha-linolénique dans le mélange lipidique CT permet de conserver ou de diminuer le

diamètre des globules lipidiques (1,22 et 1,50  $\mu\text{m}$  respectivement versus 1,62  $\mu\text{m}$ ), ce qui se traduit par une augmentation du rendement de la lipolyse pour l'émulsion CT+LA (+61 %) mais par une diminution de ce rendement pour l'émulsion CT+ALA (-58 %) (Figure 35). On peut donc en conclure, que le rendement de la lipolyse gastrique dépend principalement de la taille des globules lipidiques lorsqu'on considère deux mélanges lipidiques identiques, mais que pour des compositions différentes, la granulométrie ET la composition de la surface des globules lipidiques entrent en ligne de compte. L'effet activateur du LPI peut donc être associé à l'impact de ce phospholipide sur la granulométrie de l'émulsion obtenue, mais ne peut pas être entièrement expliqué par ce seul paramètre.

**Figure 35:** Effet de la composition des émulsions lipidiques sur la relation entre leur rendement de lipolyse gastrique et leur granulométrie (diamètre moyen indiqué en micromètres à l'intérieur de chaque histogramme).



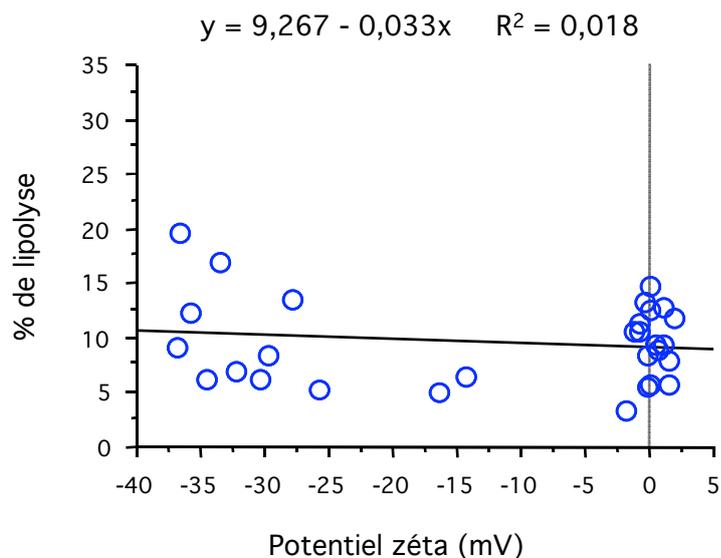
Les émulsions PI, LPI, LPE et SM ont été hydrolysées avec le suc gastrique BAK, et les émulsions CT, CT+LA et CT+ALA avec la lipase gastrique purifiée LGH2 (moyenne  $\pm$  SEM; n=2 pour SM, n=4 pour CT+LA et CT+ALA, n=10 pour PI, n=12 pour CT, n=14 pour LPE, n=28 pour LPI). \* Rendement de lipolyse gastrique significativement différent de celui de l'émulsion comparée (LPI pour PI, SM pour LPE, et CT pour CT+LA et CT+ALA).

### 2.2.2. Le potentiel électrocinétique

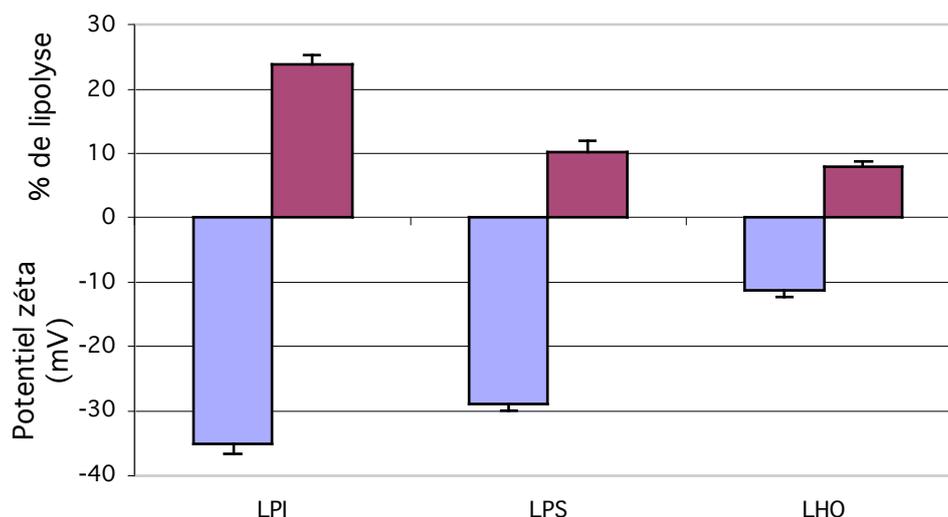
Afin de déterminer l'implication éventuelle du potentiel électrocinétique dans l'amélioration de la lipolyse gastrique par le LPI, nous avons tout d'abord recherché l'existence d'une relation entre le rendement de la lipolyse des émulsions et leur potentiel zêta (Figure 36). Après régression linéaire, on obtient un  $R^2$  de seulement 0,018, qui ne permet pas d'établir qu'une relation simple unit ces deux paramètres. Toutefois, l'exclusion des

émulsions de potentiel électrocinétique proche de zéro (CT, PC L/P, PC P/O, PC O/P, PC DHA, SM, LPCO, LPCS et LPE), augmente le  $R^2$  à 0,27 (avec  $p < 0,01$ ). Il semble alors, que les émulsions puissent être d'autant mieux hydrolysées que leur potentiel zêta est négatif (Figure 37).

**Figure 36:** Régression linéaire entre le rendement de lipolyse gastrique des émulsions et leur potentiel électrocinétique.



**Figure 37:** Relation entre le rendement de lipolyse gastrique (moyenne  $\pm$  SEM) des émulsions LPI

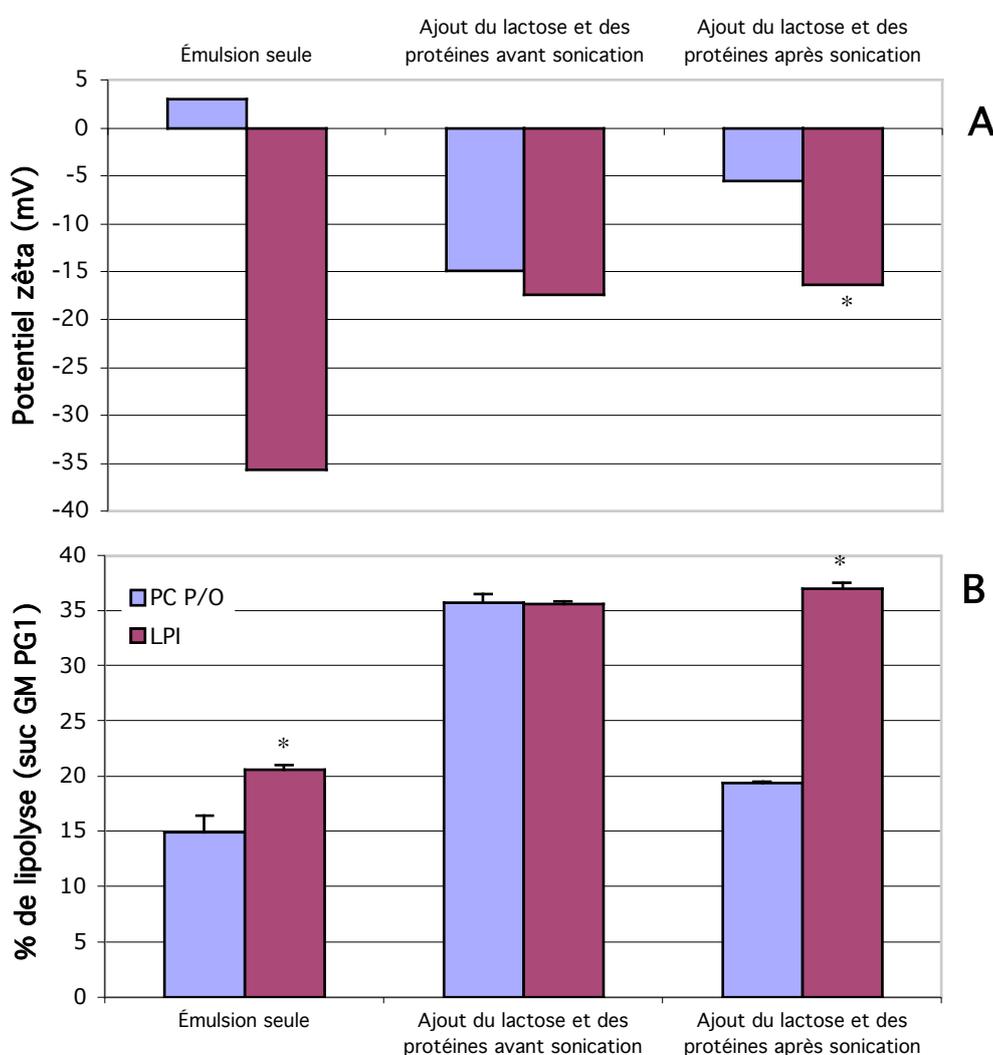


( $n=28$ ), LPS ( $n=6$ ) et LHO ( $n=10$ ) et leur potentiel électrocinétique (moyenne  $\pm$  SEM;  $n=4$ ).

Les tests de digestion ont été réalisés avec le suc gastrique BAK.

Malheureusement, de nombreuses émulsions font exception à cette tendance, en particulier PS, PI et PE DHA, qui présentent des potentiels zêta très négatifs (respectivement  $-35,7$ ,  $-34,1$  et  $-28,2$  mV) pour des rendements de lipolyse gastrique moyens à faibles (respectivement 7,81, 9,83 et 5,83 %). Il semble, que la notion de potentiel électrocinétique intervienne en fait de façon plus subtile. En effet, l'ajout de lactose et de protéines de lait dans les émulsions PC P/O et LPI (par le biais du tampon d'émulsification ou par le biais du tampon de lipolyse nous a permis de remarquer une relation particulièrement intéressante entre le potentiel électrocinétique de ces deux émulsions et leur rendement de lipolyse par le suc gastrique GM PG1 (Figure 38).

**Figure 38:** Relation entre le rendement de lipolyse gastrique des émulsions PC P/O et LPI et leur potentiel électrocinétique, lors de l'ajout de lactose et de protéines de lait avant ou après la sonication.



\* Valeur significativement différente de celle de l'émulsion PC P/O (moyenne ± SEM; figure A: n=2, figure B: n=4).

En l'absence de lactose et de protéines, les potentiels électrocinétiques des émulsions PC P/O et LPI sont très éloignés (respectivement +2,96 et -35,64 mV). Ces deux émulsions présentent également des rendements de lipolyse par le suc gastrique GM PG1 très différents (respectivement 14,92 et 20,53 %), avec un écart très significatif ( $p < 0,005$ ) d'environ 38 %. Lorsqu'on ajoute du lactose et des protéines de lait dans les deux mélanges lipidiques avant l'émulsification, on entraîne une diminution du potentiel zêta de l'émulsion PC P/O (de +2,96 à -14,9 mV) et une augmentation du potentiel zêta de l'émulsion LPI (de -35,64 à -17,38 mV). Les potentiels électrocinétiques des émulsions PC P/O et LPI sont alors très proches, et on observe un rapprochement comparable de leurs rendements de lipolyse gastrique à 35 %. Lorsqu'on ajoute le lactose et les protéines de lait dans le tampon de lipolyse, l'émulsion LPI réagit de la même façon : son potentiel zêta remonte à -16,27 mV et son rendement de lipolyse augmente pour atteindre environ 37 %. En revanche, le potentiel zêta de l'émulsion PC P/O diminue de façon moins importante (-5,58 au lieu de -14,9 mV) et son rendement de lipolyse est aussi augmenté de façon moins importante (19,4 au lieu de 35,63 %). On constate donc, que les modifications du potentiel zêta suivent celles du rendement de la lipolyse, ce qui permet d'envisager, que les molécules qui favorisent la lipolyse gastrique agissent en permettant aux globules lipidiques d'offrir un environnement électrostatique adéquat au niveau de leur surface. Le potentiel zêta le plus intéressant serait compris entre -14 et -18 mV (ce qui correspond justement à la fourchette de potentiel zêta des laits humains). Il est obtenu pour l'émulsion LPI en présence de lactose et de protéines de lait quelle que soit leur forme d'apport, et pour l'émulsion PC P/O en présence de lactose et de protéines de lait apportés avant l'émulsification. La charge électrique de surface des globules lipidiques de l'émulsion LPI (- 36 mV) permet peut-être aux protéines de lait ajoutés après l'émulsification de modifier favorablement l'interface lipidique par des interactions protéines/phospholipides, ce que ne permettent pas les globules de l'émulsion PC P/O, trop peu chargés.

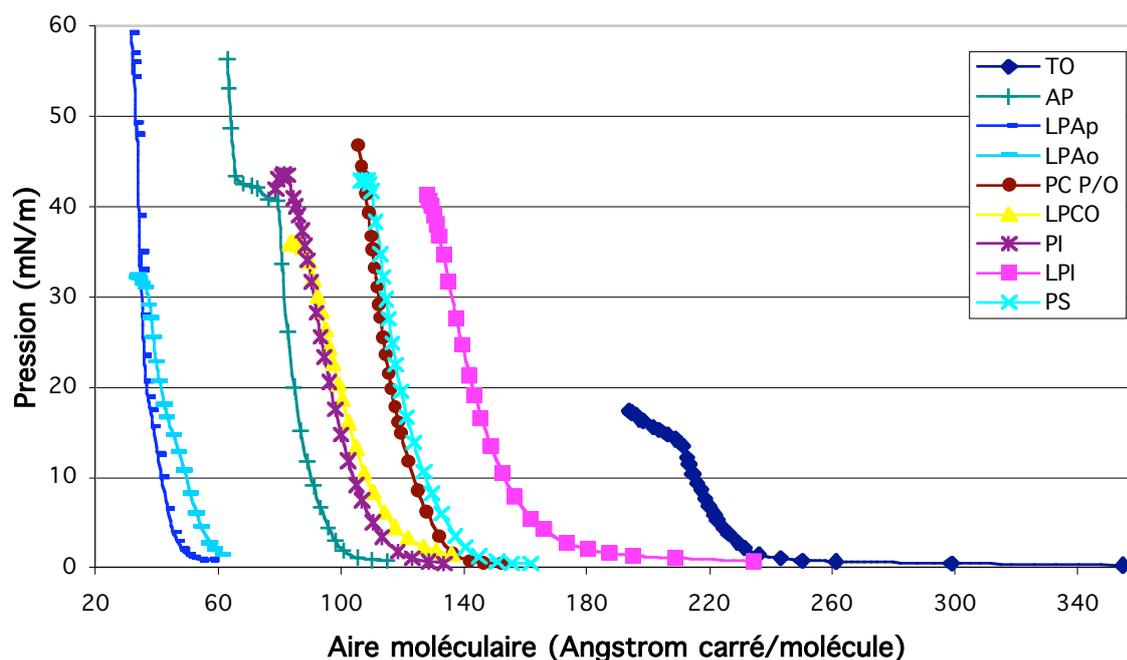
Il semble donc, que le potentiel électrocinétique, à l'instar de la granulométrie, ne puisse expliquer que partiellement l'effet activateur du LPI. On notera d'ailleurs qu'il existe une corrélation entre la charge des globules lipidiques et leur diamètre moyen, avec un  $R^2$  de 0,387 ( $p < 0,0001$ ), qui monte à 0,565 ( $p < 0,0001$ ) si on exclut les deux émulsions "grossières" LPE et SM.

### **2.2.3. La compressibilité**

Après la superficie et la charge, nous nous sommes intéressés à la compressibilité de l'interface lipidique. Nous avons utilisé pour cela la technique des films monomoléculaires.

L'objectif de l'étude n'était pas de reproduire une monocouche complexe de composition semblable à celle des globules lipidiques (dont l'élaboration et l'analyse dépasseraient largement le cadre de cette thèse), mais de regarder le comportement de phospholipides purs pendant une compression. Nous avons déterminé dans un premier temps les isothermes de compression de la trioléine (TO) et de huit phospholipides (AP, LPAp, LPAo, PC P/O, LPCO, PI, LPI et PS) (Figure 39).

**Figure 39:** Isothermes de compression de la trioléine et de différents phospholipides.



Abréviations : TO, trioléine ; AP, acide phosphatidique ; LPAo et LPAp, acides lysophosphatidiques ; PC P/O, phosphatidylcholine ; LPCO, lysophosphatidylcholine ; PI, phosphatidylinositol ; LPI, lysophosphatidylinositol ; PS, phosphatidylsérine.

À 2mN/m de pression, l'aire moléculaire occupée par nos différentes espèces lipidiques varie largement de 240 à 40 Å²/molécule. Elle est d'environ 231 Å²/molécule pour TO, 181 Å²/molécule pour LPI, 140 Å²/molécule pour PS, 135 Å²/molécule pour PC P/O, 128 Å²/molécule pour LPCO, 119 Å²/molécule pour PI, 101 Å²/molécule pour AP, 59 Å²/molécule pour LPAo et 48 Å²/molécule pour LPAp. La trioléine, estérifiée par trois encombrants acides gras, occupe l'aire moléculaire la plus importante. Le AP, estérifié par deux acides gras, occupe une aire moléculaire plus importante que le LPA (un seul acide gras). Le LPAp estérifié par du palmitate (16 atomes de carbone) est même légèrement moins encombrant que le LPAo, estérifié par un acide gras un peu plus long (l'oléate, à 18 atomes de

carbone). De la même façon, le PC P/O présente une aire moléculaire plus élevée que le LPCO. Par contre, l'aire moléculaire du couple PI/LPI ne suit pas cette règle, puisque dans leur cas, c'est le LPI qui occupe une aire moléculaire plus importante que le PI. Si on compare les différents phospholipides entre eux, on constate que le AP, qui ne porte aucun groupement sur son acide phosphorique, occupe la plus petite aire moléculaire, et que viennent ensuite le PI, le PC P/O et le PS, avec des aires moléculaires assez proches (de 140 à 119 Å<sup>2</sup>/molécule). Si on compare maintenant les différents lysophospholipides entre eux, on constate que le LPAp et le LPAo sont moins encombrants que le LPCO et le LPI, mais on constate aussi que l'aire moléculaire du LPI est beaucoup plus importante que celle du LPCO. L'écart entre le LPI et le LPCO est aussi grand qu'entre le LPI et la TO. Le LPI présente donc un comportement particulièrement atypique, puisqu'il occupe une aire moléculaire qui semble disproportionnée par rapport à sa structure.

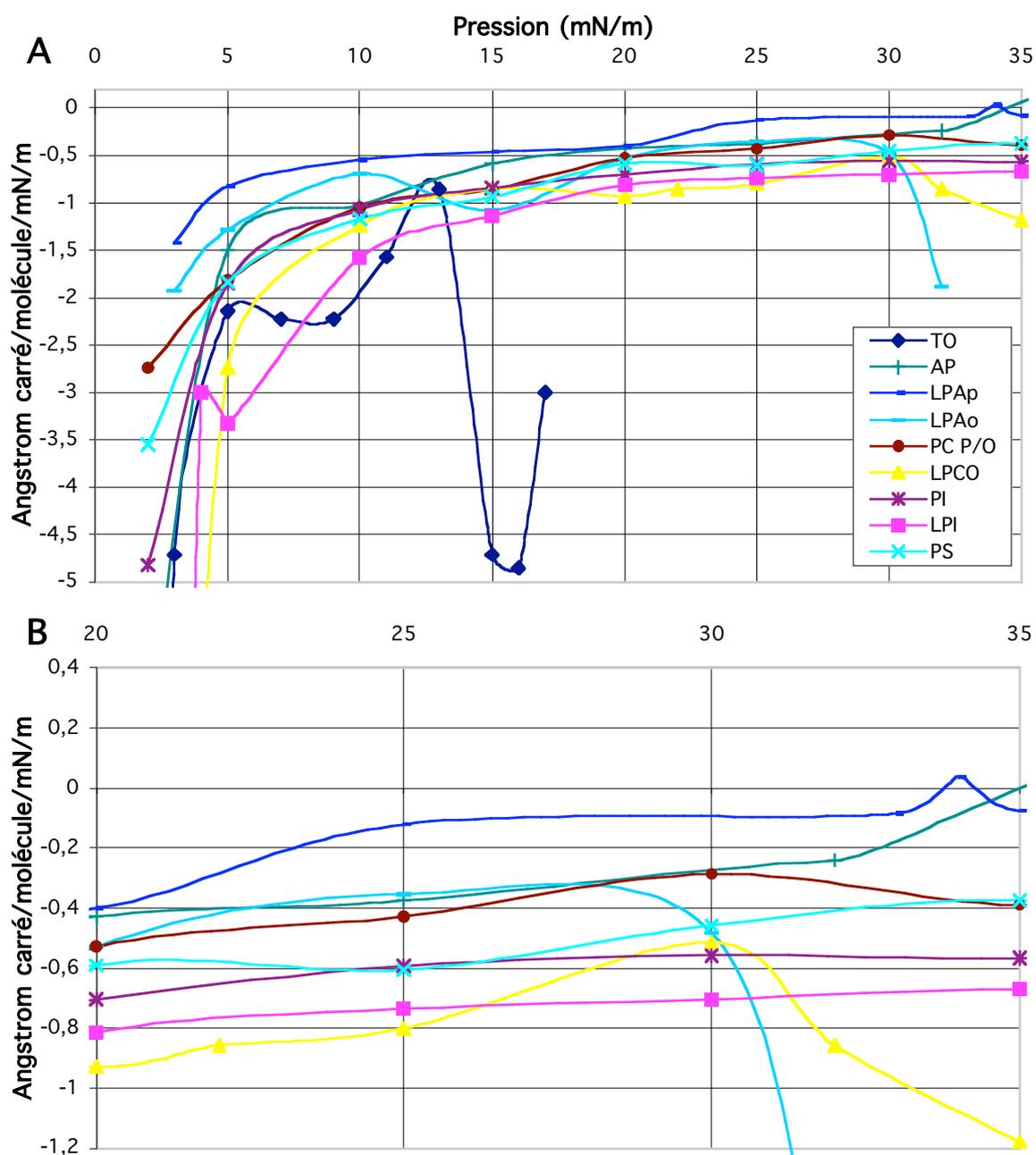
À partir des isothermes de compression, nous avons ensuite déterminé la compressibilité de nos différentes molécules lipidiques (Figure 40). On constate, sans surprise, que le film monomoléculaire de trioléine collapse très rapidement entre 5 et 10 mN/m, tandis que les monocouches de phospholipides collapseront après 30 mN/m de pression.

Afin de comparer leur comportement aux pressions physiologiques, qui nous intéressent, nous avons focalisé notre analyse entre 20 et 35 mN/m (Figure 40B). À 20 mN/m, on peut classer les différents phospholipides par compressibilité décroissante : LPCO, LPI, PI, PS, PC P/O et LPAo, AP et LPAp. Les phospholipides les moins compressibles sont donc ceux contenant l'acide phosphatidique, sous forme de phospholipide ou de lysophospholipide. On peut remarquer, que si AP et LPAo ont des comportements très proches (particulièrement entre 23 et 28 mN/m), la présence de l'acide gras saturé sur la molécule de LPAp suffit à la rendre encore moins compressible. Les phospholipides les plus compressibles sont LPCO, LPI et PI. On notera tout de même, que la compressibilité de LPCO diminue très rapidement à partir de 25 mN/m, et devient moins importante que celle de LPI dès 26 mN/m et que celle de PI à partir de 29-30 mN/m (où se produit le collapse du film de LPCO). LPI et PI présentent d'ailleurs les compressibilités les plus régulières entre 20 et 35 mN/m.

La grande compressibilité de LPI, associée à son aire moléculaire particulièrement étendue, permet probablement à ce phospholipide de réaliser à l'interface lipidique des changements conformationnels pouvant faciliter l'activité de la lipase gastrique. L'aire moléculaire atypique du LPI joue probablement un rôle important, puisque le PI, très compressible mais d'aire moléculaire nettement inférieure, produit les mêmes effets que LPI en termes de granulométrie et de potentiel électrocinétique, mais pas en termes de rendement

de lipolyse. Cette observation souligne, que la régulation de la lipolyse gastrique par certaines molécules lipidiques ou protéiques, en particulier le LPI, n'implique pas seulement des mécanismes liés à la qualité de l'interface lipidique (superficie, charge, compressibilité), mais implique aussi certainement des interactions directes entre la lipase gastrique et les molécules régulatrices, en particulier au niveau de domaines spécialisés de l'enzyme.

**Figure 40:** Compressibilité de différents lipides (A). Focalisation aux pressions physiologiques entre 20 et 35 mN/m (B).



### 2.2.4. Les interactions entre les phospholipides et la lipase gastrique humaine : données de la technologie BIA

Nous avons étudié la fixation d'une lipase gastrique humaine purifiée (LGH2) sur des liposomes constitués de différents types de phospholipides (PC P/O, PS, SM et LPI) par mesure de résonance plasmonique de surface.

#### 2.2.4.1. Caractérisation des liposomes utilisés

Les liposomes testés ont été caractérisés par mesure de la granulométrie et du potentiel zêta (Tableau 8). Ils présentent des diamètres très proches, compris entre 122 et 127 nm. Ils présentent en revanche des potentiels électrocinétiques beaucoup moins homogènes. En effet, il est légèrement négatif pour les liposomes PC P/O et SM (-3,0 et -3,3 mV respectivement) mais moyennement négatif pour les liposomes PS (-14,4 mV) et LPI (-18,9 mV). On peut noter, que comme dans le cas des émulsions, le potentiel zêta le plus négatif est obtenu avec l'utilisation de LPI.

**Tableau 8:** Caractérisation des liposomes utilisés pour mesurer les interactions entre les phospholipides et la lipase gastrique humaine (moyenne; n=2).

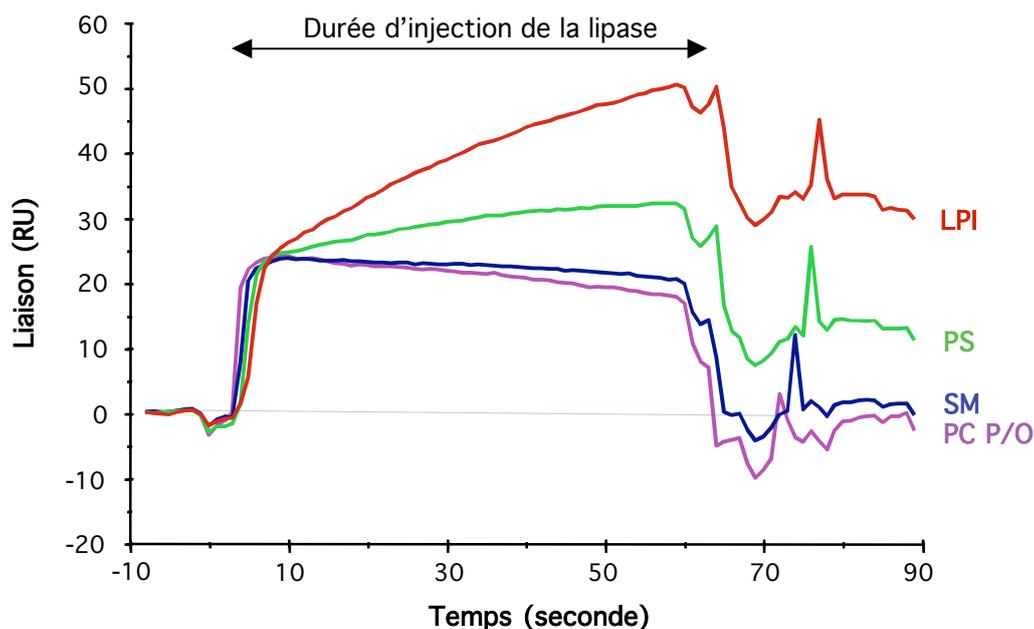
Type de liposome	Granulométrie (nm)	Potentiel zêta (mV)
PC P/O	122,18	- 3,0
SM	127,13	- 3,3
PS	125,25	- 14,4
LPI	125,28	- 18,9

#### 2.2.4.2. Mesures de liaison

Les sensorgrammes obtenus avec les quatre types de liposomes en présence de 3 nM de lipase gastrique humaine purifiée sont présentés sur la figure 41. Ces mesures préliminaires indiquent, que la lipase gastrique humaine se fixe différemment sur les quatre types de phospholipides constituant l'interface. En effet, pendant la durée d'injection de l'enzyme, on n'observe pas d'augmentation de masse (exprimée en RU) en présence des liposomes PC P/O et SM. En revanche, on observe une augmentation de masse modérée en présence des liposomes PS et plus importante en présence des liposomes LPI, indiquant que la lipase gastrique humaine se fixe sur ces deux phospholipides. D'après cette première expérimentation, qui devra être approfondie, il semble donc que la lipase gastrique se fixe préférentiellement sur les phospholipides chargés négativement (PS et LPI), et que la liaison soit d'autant plus forte que le phospholipide est chargé négativement (LPI). Le potentiel zêta

de l'interface lipidique pourrait donc moduler davantage la liaison de la lipase gastrique à son substrat que son activité lipolytique, ce qui pourrait expliquer la complexité des résultats obtenus concernant la relation entre le potentiel zêta des émulsions et leur rendement de lipolyse gastrique.

**Figure 41:** Liaison de la lipase gastrique humaine purifiée (LGH2) sur des liposomes préparés avec différents types de phospholipides.



Le type de phospholipide présent à l'interface lipidique ayant montré un impact sur la fixation de la lipase gastrique, nous avons cherché quel domaine de l'enzyme pouvait être impliqué dans ces interactions.

### 2.2.5. Le térapeptide N-terminal de la lipase gastrique humaine

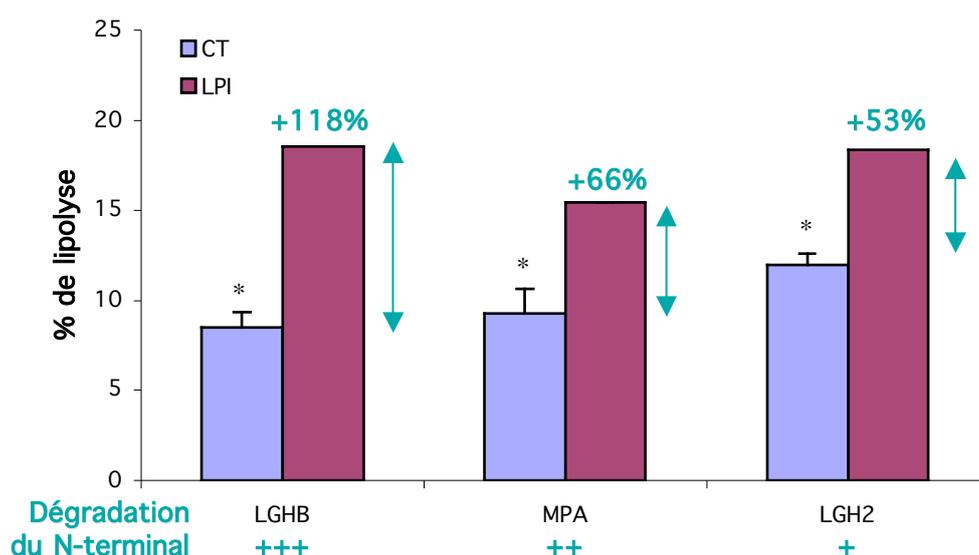
L'extrémité N-terminale de la lipase gastrique semble être l'un des domaines spécialisés les plus intéressants de l'enzyme. En effet, d'après les travaux de Bernbäck et Bläckberg (1989), les quatre amino-acides N-terminaux de la lipase gastrique humaine, Leu-Phe-Gly-Lys, sont essentiels pour la fixation de l'enzyme à son substrat physiologique (une émulsion de triglycérides à chaînes longues stabilisée par des phospholipides).

#### 2.2.5.1. Étude de lipases gastriques purifiées: données du séquençage

Le séquençage de trois des lipases gastriques purifiées à notre disposition (LGHB, MPA et LGH2) nous a permis de mettre en évidence, que ce térapeptide peut être altéré de façon plus ou moins importante. LGH2 est composée de 70 % de protéines avec un N-terminal intact et de 30 % de protéines avec un N-terminal tronqué des cinq premiers acides

aminés. MPA présente un N-terminal auquel il manque les deux ou trois premiers acides aminés (80 et 20 % des protéines respectivement). LGHB est la lipase purifiée la plus dégradée avec plusieurs séquences possibles au niveau du N-terminal, dont une majoritaire pour laquelle il manque les deux premiers acides aminés. Cette dégradation n'altère pas l'activité de ces lipases sur substrat à chaîne courte, puisqu'elles présentent toutes les trois des activités spécifiques proches sur tributyrine (663 à 756 U/mg de protéine). En revanche, la dégradation plus ou moins étendue du N-terminal se traduit par des activités différentes sur trioléine émulsifiée (émulsion CT), avec un rendement de lipolyse d'autant plus faible que l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique est dégradée (12 % pour LGH2, 9,3 % pour MPA et 8,5 % pour LGHB) (Figure 42).

**Figure 42:** Relation entre l'amélioration du rendement de lipolyse gastrique par LPI et l'état de dégradation de l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique purifiée.

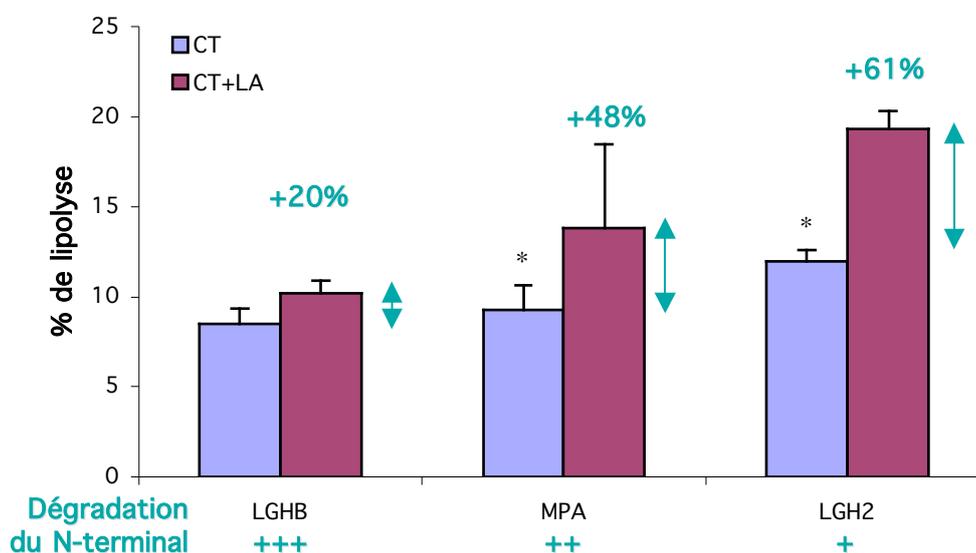


\* Valeur significativement différente de celle de l'émulsion LPI (moyenne  $\pm$  SEM; CT: n=20 avec LGHB, n=14 avec MPA et n=12 avec LGH2; LPI: n=2).

Néanmoins, lorsqu'on hydrolyse l'émulsion LPI avec ces trois lipases purifiées, on ne retrouve pas les différences d'activité observées avec l'émulsion CT. Les rendements de lipolyse sont tous compris entre 15 et 19 %, parce que le LPI permet une amélioration du rendement de la lipolyse d'autant plus élevée que la dégradation du N-terminal de la lipase est étendue : 118 % pour LGHB, 66 % pour MPA et 53 % pour LGH2. Il semble donc, que le LPI soit capable de compenser la dégradation du térapeptide N-terminal de la lipase gastrique, et que son effet activateur puisse être, au moins en partie, un effet « restaurateur »

de la perte d'activité liée à l'altération de l'extrémité N-terminale de la lipase. Ce mécanisme semble également spécifique au LPI, puisque l'amélioration de la lipolyse de l'émulsion CT, obtenue grâce à l'ajout d'acide linoléique (LA) dans le mélange lipidique avant l'émulsification, ne présente pas du tout les mêmes caractéristiques (Figure 43). En effet, dans le cas de CT+LA, on peut voir, que le rendement de la lipolyse gastrique est davantage augmenté lorsque la lipase gastrique purifiée n'est pas trop dégradée. Il semble donc, qu'ici l'amélioration obtenue soit plutôt liée à la diminution de la taille des globules lipidiques, qui permettrait à davantage de lipases fonctionnelles de se fixer à l'interface (d'où une amélioration proportionnelle à la part de lipase purifiée non dégradée).

**Figure 43:** Relation entre l'amélioration du rendement de lipolyse gastrique par l'acide linoléique (LA) et l'état de dégradation de l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique purifiée.



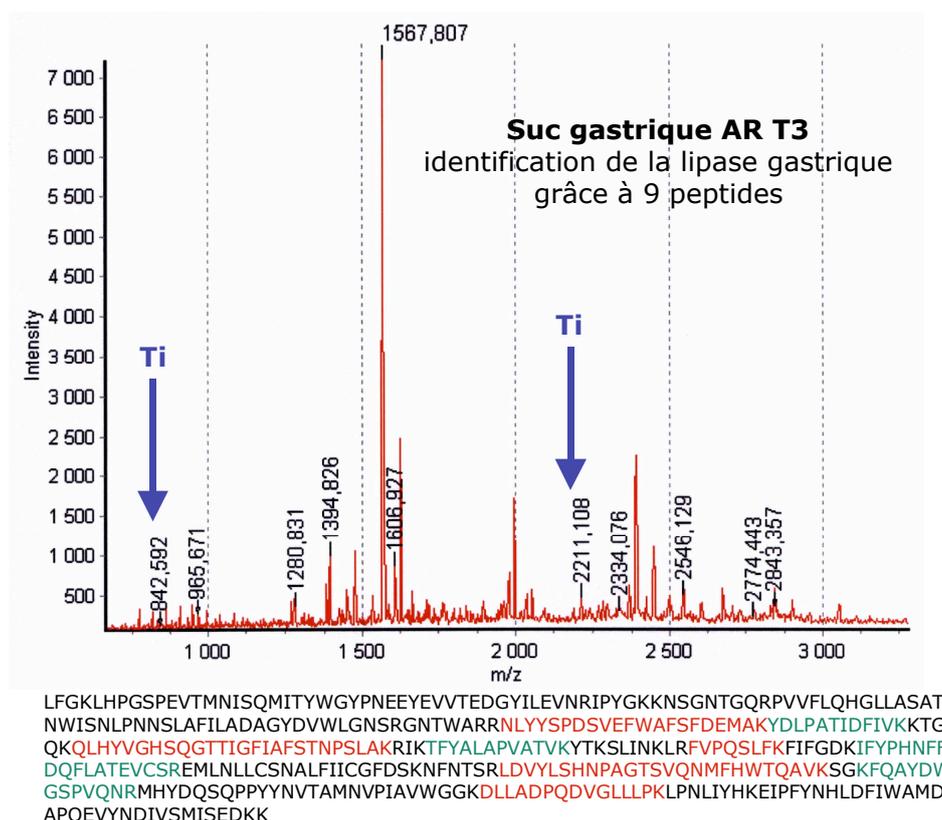
\* Valeur significativement différente de celle de l'émulsion CT+LA (moyenne  $\pm$  SEM; CT: n=20 avec LGHB, n=14 avec MPA et n=12 avec LGH2; CT+LA: n=8 avec LGHB et n=4 avec MPA et LGH2).

#### 2.2.5.2. Étude de sucs gastriques: données de la spectrométrie de masse

Afin de regarder, si le mécanisme mis en évidence avec des lipases purifiées, existe aussi en présence de sucs gastriques, nous avons cherché à analyser le térapeptide N-terminal de la lipase gastrique directement dans le suc. Le séquençage après transfert sur membrane PVDF n'ayant pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants (la lipase gastrique, très hydrophobe, restait majoritairement dans le gel d'acrylamide, d'où une faible quantité d'enzyme sur la membrane de transfert donnée pour le séquençage), nous avons utilisé la

spectrométrie de masse. L'analyse au MALDI-TOF après digestion enzymatique à la trypsine du suc gastrique AR T3 montre, que la lipase gastrique est la protéine majoritaire dans la bande de gel découpée à 50 kDa (Figure 44).

**Figure 44:** Analyse du suc gastrique AR T3 par spectrométrie de masse (ionisation positive et mode réflectron) après digestion enzymatique à la trypsine.

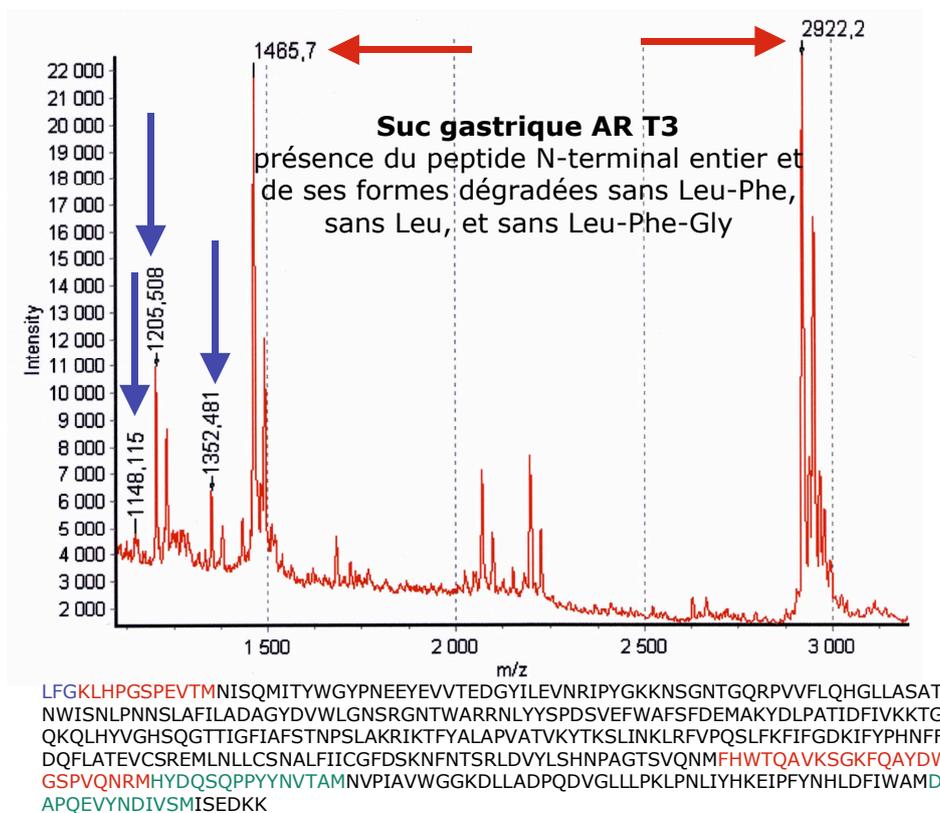


Les flèches bleues indiquent les valeurs de calibration avec la trypsine (Ti). Les acides aminés en rouge et en vert forment les 9 peptides ayant permis d'identifier la lipase gastrique.

Nous avons obtenu 9 peptides (en rouge et en vert dans la séquence de la lipase gastrique, et indiqués par leur masse sur le spectre) ayant permis d'identifier la lipase gastrique, avec un taux de recouvrement d'environ 40 %.

L'analyse après digestion chimique au bromure de cyanogène a permis d'identifier deux des quatre peptides attendus, dont le peptide N-terminal à 1465,7 Da (Figure 45). L'état de dégradation de ce peptide a pu être établi grâce à la détection de trois formes tronquées : celle à 1205,5 Da (absence des deux premiers acides aminés), celle à 1352,5 Da (absence du premier acide aminé) et celle à 1148,1 Da (absence des trois premiers acides aminés).

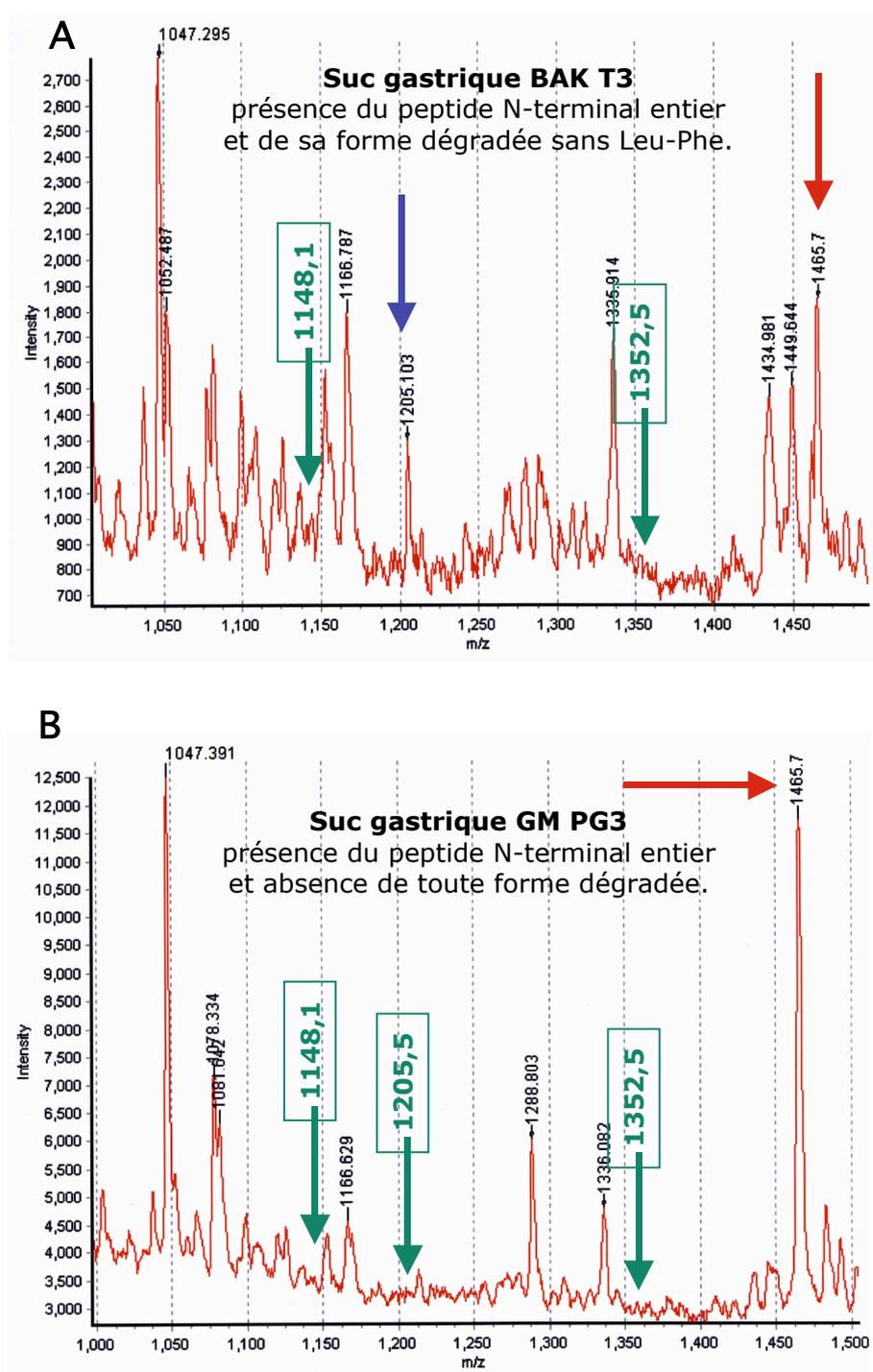
**Figure 45:** Analyse du suc gastrique AR T3 par spectrométrie de masse (ionisation positive et mode linéaire) après digestion chimique au bromure de cyanogène.



Les flèches rouges désignent les deux peptides permettant d'identifier la lipase gastrique humaine (les acides aminés correspondants sont également en rouge dans la séquence de la lipase). Les flèches bleues désignent les formes dégradées du peptide N-terminal à 1465,7 Dalton. Les acides aminés en vert forment les deux peptides non identifiés parmi les quatre attendus.

L'analyse du peptide N-terminal de la lipase gastrique de deux autres sucs (BAK T3 et GM PG3) montre, que leur état de dégradation est différent (Figure 46). La lipase gastrique du suc BAK (figure 46A) est moins dégradée que celle du suc AR T3 : on trouve le peptide N-terminal entier et seulement la forme à 1205,5 Da. La lipase gastrique du suc GM PG3 (figure 46B) est la mieux conservée, puisqu'on ne trouve aucune forme dégradée du peptide à 1465,7 Da.

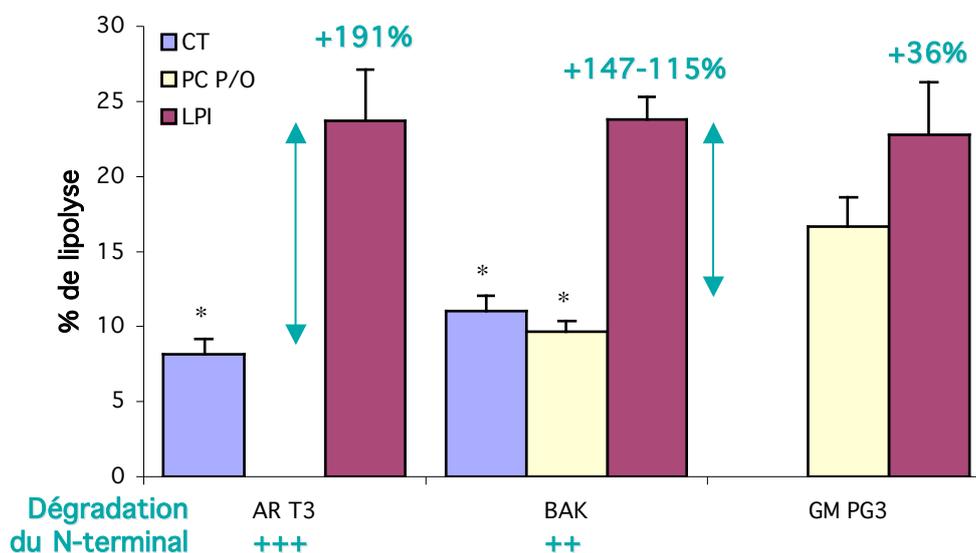
**Figure 46:** Analyses des sucs gastriques BAK T3 (A) et GM PG3 (B) par spectrométrie de masse (ionisation positive et mode linéaire) après digestion chimique au bromure de cyanogène.



La flèche rouge désigne le peptide N-terminal entier. La flèche bleue désigne la forme dégradée du peptide N-terminal. Les flèches vertes désignent l'absence des autres formes dégradées du peptide N-terminal.

Regardons maintenant l'amélioration du rendement de lipolyse gastrique des émulsions CT et PC P/O grâce à la présence de LPI en fonction de l'état de dégradation de l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique des sucs AR T3, BAK et GM PG3 (Figure 47).

**Figure 47:** Relation entre l'amélioration du rendement de lipolyse gastrique par LPI (moyenne  $\pm$  SEM) et l'état de dégradation de l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique de certains sucs.



CT: n=4 avec AR T3, n=8 avec BAK; PC P/O: n=18 avec BAK, n=12 avec GM PG3; LPI: n=4 avec AR T3, n=28 avec BAK, n=8 avec GM PG3). \* Valeur significativement différente de celle de l'émulsion LPI

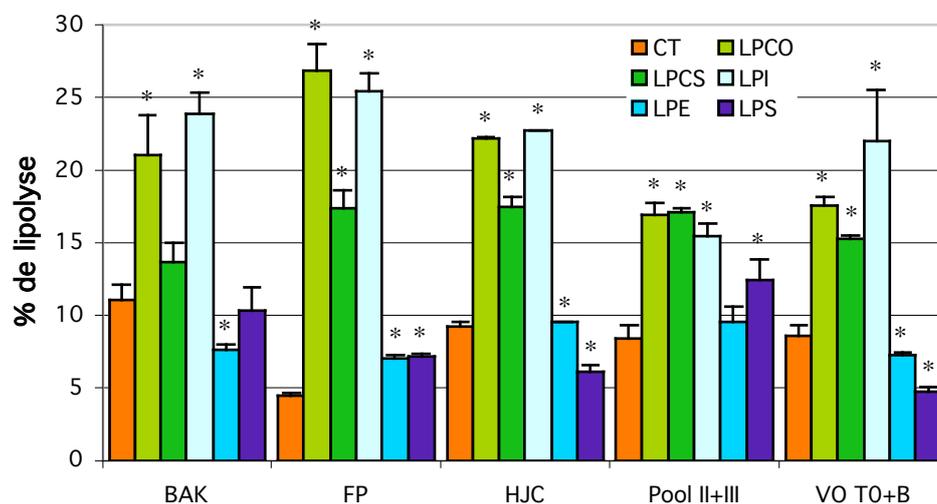
On obtient une amélioration d'autant plus importante que l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique est dégradée, ce qui confirme le mécanisme décrit en présence des lipases purifiées. La mise en évidence de ce mécanisme souligne à nouveau, que le mode d'action du LPI ne se limite pas à des mécanismes indirects, mettant en jeu des modifications de la qualité de l'interface lipidique (superficie, charge, compressibilité). Ce phospholipide semblerait bien pouvoir agir directement, notamment par le biais d'interactions directes avec la lipase gastrique, au niveau d'un site de fixation qui n'est pas son térapeptide N-terminal et qui reste à définir. Cela pourrait être lié à des caractéristiques propres de cette molécule, que nous avons essayé d'identifier.

### 2.2.6. La forme lysophospholipide

Lorsque nous avons hydrolysé nos différentes émulsions lipidiques avec le suc gastrique BAK, il est ressorti, que seuls trois phospholipides étaient capables d'améliorer le rendement de la lipolyse: LPI et LPCO (de façon très importante) et LPCS (de façon très modérée). Nous avons donc envisagé la possibilité, que l'effet activateur de ces phospholipides, et du LPI en particulier, soit lié à leur particularité d'être des

lysophospholipides. Afin de vérifier cela, nous avons hydrolysé avec plusieurs sucs gastriques (FP, HJC, Pool II+III et VO T0+B) les émulsions stabilisées par 5 lysophospholipides différents (LPCO, LPCS, LPI, LPE et LPS) par comparaison avec l'émulsion CT (Figure 48).

**Figure 48:** Rendements de lipolyse gastrique d'émulsions de trioléine stabilisées par différents types de lysophospholipides (moyenne  $\pm$  SEM).

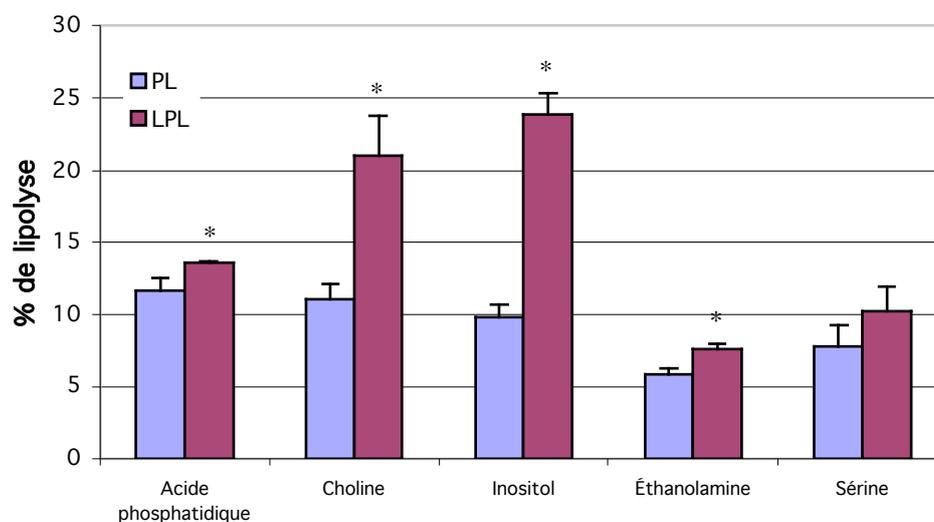


CT: n=8 avec BAK, n=4 avec FP, HJC et Pool II+III, n=10 avec VO T0+B; LPCO: n=12 avec BAK, n=6 avec FP, n=4 avec HJC, Pool II+III et VO T0+B; LPCS: n=12 avec BAK, n=4 avec FP, HJC, Pool II+III et VO T0+B; LPI: n=28 avec BAK, n=10 avec FP, n=4 avec HJC, n=6 avec Pool II+III, n=8 avec VO T0+B; LPE: n=14 avec BAK, n=6 avec FP, n=4 avec HJC, Pool II+III et VO T0+B; LPS: n=6 avec BAK, n=4 avec FP, HJC, Pool II+III et VO T0+B). \* Valeur significativement différente de celle de l'émulsion CT.

Nos résultats indiquent, que, tous sucs gastriques confondus, le rendement de lipolyse moyen est de  $8,35 \pm 1,08$  % pour l'émulsion CT,  $20,89 \pm 1,79$  % pour l'émulsion LPCO,  $16,15 \pm 0,74$  % pour l'émulsion LPCS,  $21,86 \pm 1,72$  % pour l'émulsion LPI,  $8,19 \pm 0,56$  % pour l'émulsion LPE et  $8,16 \pm 1,41$  % pour l'émulsion LPS, ce qui permet de dire, que globalement aucun lysophospholipide n'inhibe la lipolyse gastrique. Cette affirmation est strictement vraie pour les sucs gastriques FP et Pool II+III, mais on peut quand même indiquer une diminution notable pour le suc BAK avec LPE (-31 %) et pour les sucs HJC et VO T0+B avec LPS (respectivement -33 et -45 %). Lorsqu'ils sont activateurs, LPE et LPS augmentent tout de même le rendement de la lipolyse gastrique de 4 à 55 % et de 47 à 61 %, respectivement. Les trois autres lysophospholipides permettent une amélioration d'au moins 23 % ( $p < 0,05$ ): 23 à 286 % pour LPCS (93 % en moyenne), 90 à 498 % pour LPCO (150 % en moyenne) et 83 à 466 % pour LPI (159 % en moyenne), qui est responsable de l'effet le plus marqué sur l'activité de la lipase gastrique.

La forme lysophospholipide paraît donc jouer un rôle non négligeable dans l'amélioration du rendement de la lipolyse gastrique. Cependant, son impact semble étroitement lié à la nature du groupement porté par l'acide phosphorique. En effet, si on regarde le rendement de la lipolyse gastrique induit par chacun des cinq types de dérivé (l'acide phosphatidique, la choline, l'inositol, l'éthanolamine et la sérine) en fonction de son vecteur (phospholipide ou lysophospholipide), on constate que la forme lysophospholipide n'apporte d'amélioration significative que si elle est associée aux groupements choline et inositol (Figure 49).

**Figure 49:** Effet des formes phospholipides ou lysophospholipides des différentes espèces.



Les tests de digestion ont été réalisés avec le suc gastrique BAK (moyenne  $\pm$  SEM; acide phosphatidique: n=4; choline: n=8 pour le PL et 12 pour le LPL; inositol: n=10 pour le PL et 28 pour le LPL; éthanolamine: n=4 pour le PL et 14 pour le LPL; sérine: n=4 pour le PL et 6 pour le LPL). \* Valeur significativement différente de celle de la forme phospholipide.

### 2.2.7. L'inositol

L'effet activateur du LPI ne pouvant pas être totalement imputable à sa nature de lysophospholipide, nous avons également étudié le rôle de l'inositol dans la modulation de la lipolyse gastrique. Dans un premier temps, le milieu réactionnel a été enrichi avec de l'inositol libre. Celui-ci a tout d'abord été ajouté dans le tampon de lipolyse gastrique, à raison de 2 et 8 % (Tableau 9). Quelle que soit l'émulsion testée (PC P/O ou LPI), on constate que la présence d'inositol libre n'a pas d'effet. Nous avons ensuite ajouté l'inositol libre dans le tampon d'émulsification du mélange lipidique PC P/O à raison de 0,8 % (c'est-à-dire la même quantité d'inositol que celle apportée par le mélange lipidique LPI). On n'observe pas non plus d'amélioration du rendement de la lipolyse :  $17,77 \pm 0,60$  % sans inositol,  $19,18 \pm$

1,08 % en présence d'inositol ajouté avant l'émulsification et  $18,47 \pm 0,11$  % en présence d'inositol ajouté après l'émulsification.

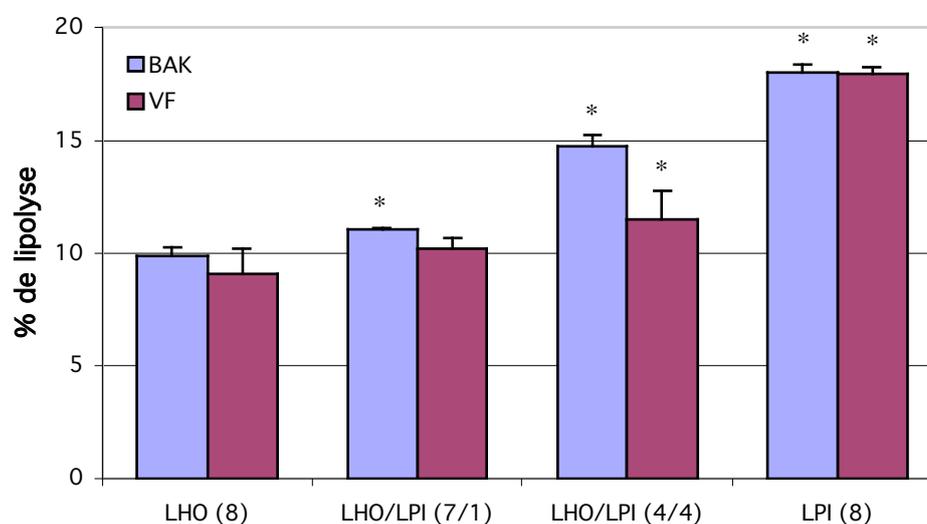
**Tableau 9:** Effet de la présence d'inositol libre, ajouté dans le tampon de lipolyse, sur le rendement de lipolyse gastrique (%) des émulsions PC P/O et LPI.

<i>Conditions expérimentales</i>	<i>Émulsion PC P/O</i>	<i>Émulsion LPI</i>
Sans inositol	$17,77 \pm 0,60$	$19,81 \pm 0,76$
Avec 2 % d'inositol	$19,28 \pm 0,27$	$18,56 \pm 0,38$
Avec 8 % d'inositol	$18,25 \pm 0,22$	$18,13 \pm 0,27$ *

Les tests de digestion ont été réalisés avec le suc gastrique GM PG1 (moyenne  $\pm$  SEM; n=4). \* Valeur significativement différente de celle obtenue sans inositol.

Dans un second temps, l'inositol a été apporté sous forme de lysophosphatidylinositol. Pour cela, nous avons ajouté une quantité croissante de mélange lipidique LPI dans le mélange lipidique LHO avant de procéder à l'émulsification et les différentes émulsions ont été hydrolysées par deux sucs gastriques différents (BAK et VF) (Figure 50).

**Figure 50:** Effet de la présence d'inositol, apporté sous forme de LPI, sur le rendement de lipolyse gastrique de l'émulsion LHO (moyenne  $\pm$  SEM; n=4).



\* Valeur significativement différente de celle de l'émulsion LHO.

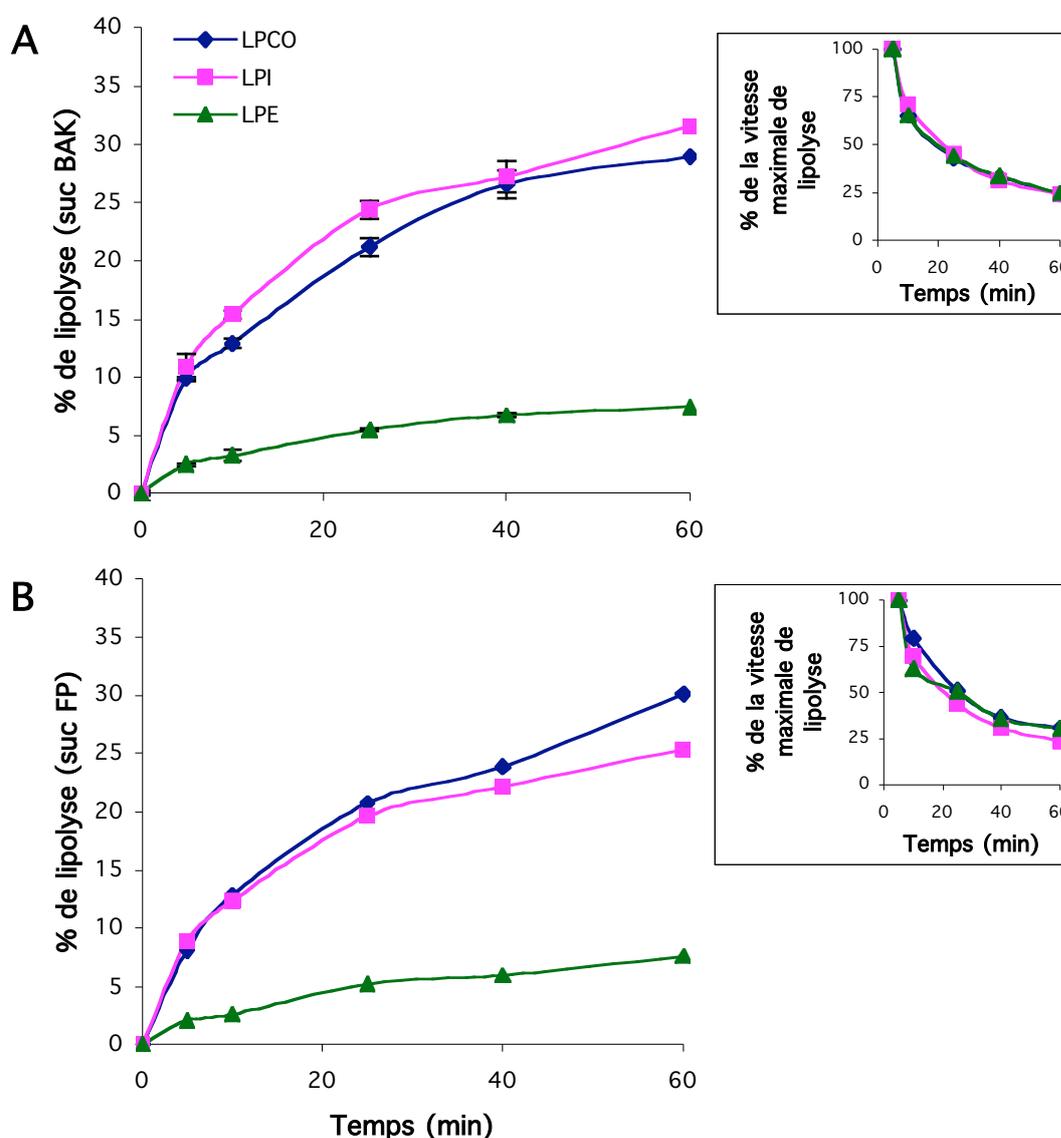
On observe alors, que la présence d'inositol sous forme de LPI dans le mélange lipidique LHO améliore nettement le rendement de la lipolyse, quelle que soit la source de lipase utilisée. Le rendement de lipolyse gastrique est amélioré significativement dès le rapport LHO/LPI de 7 pour 1 avec le suc gastrique BAK et dès le rapport LHO/LPI de 4 pour 4 avec

le suc gastrique VF. L'amélioration obtenue est proportionnelle à la quantité de LPI ajoutée, ce qui laisse supposer un effet dose de ce phospholipide. L'effet activateur du LPI est donc dû à l'association de la forme lysophospholipide et du groupement inositol. C'est d'ailleurs l'association de ces deux éléments structurels qui se traduit par une aire moléculaire atypique.

### 2.2.8. Le phénomène « d'inhibition » de la lipase gastrique

Afin de vérifier si le LPI pouvait améliorer le rendement de lipolyse gastrique en retardant le phénomène « d'inhibition » de la lipase par les acides gras qu'elle libère, nous avons étudié la cinétique d'hydrolyse des émulsions LPCO, LPI et LPE à l'aide des deux sucs gastriques BAK et FP (Figure 51).

**Figure 51:** Cinétique d'hydrolyse des émulsions LPCO, LPI et LPE par les sucs gastriques BAK (A) et FP (B) (moyenne  $\pm$  SEM; n=4).



On observe, que les deux sources de lipase donnent des résultats comparables. Le tiers du rendement total est obtenu pour les trois émulsions dès les 5 premières minutes de lipolyse. Les émulsions LPI et LPCO sont alors 4 fois mieux hydrolysées que l'émulsion LPE (avec des rendements de lipolyse respectifs de 10,85, 9,89 et 2,50 % avec le suc BAK et 8,89, 8,10 et 2,07 % avec le suc gastrique FP), et cet écart d'un facteur 4 est maintenu après 10, 25, 40 et 60 minutes d'incubation. On obtient donc trois cinétiques d'allures comparables : la vitesse d'hydrolyse diminue de façon similaire pour les trois émulsions (courbes dans les encarts de la figure 51). Le moins bon rendement de lipolyse obtenu avec l'émulsion LPE n'est donc pas dû à un arrêt plus précoce ou à un ralentissement plus marqué de la réaction, mais à l'hydrolyse d'une quantité moins importante de molécules de triglycérides tout le long de l'incubation. Cette expérience permet donc de conclure, que le mécanisme d'action du LPI sur l'activation de la lipolyse gastrique n'est pas lié à un empêchement du phénomène « d'inhibition » de la lipase par les acides gras qu'elle libère.

### 2.2.9. Conclusion

Les mécanismes impliqués dans l'amélioration du rendement de la lipolyse gastrique par le lysophosphatidylinositol sont complexes. Ils mettent en jeu plusieurs modifications de la qualité de l'interface lipidique. En effet, le LPI 1) permet d'obtenir des globules lipidiques de petit diamètre, 2) apporte des charges négatives à leur surface par son groupement inositol, ce qui améliore la lipolyse gastrique en soi et peut-être aussi par le biais d'interactions avec des protéines alimentaires lorsqu'elles sont également présentes, et 3) améliore la compressibilité de l'interface lipidique. Ces mécanismes indirects ne permettent pourtant pas d'expliquer complètement le mode d'action du LPI. Des mécanismes directs, mettant en jeu des interactions avec certains domaines spécialisés de la lipase gastrique, autres que le tétrapeptide N-terminal, interviennent également. En effet, le LPI permet de restaurer la perte d'activité liée à l'altération de l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique (supposée impliquée dans la fixation de l'enzyme à son substrat) ; le(s) site(s) impliqué(s) pourrai(en)t peut-être se fixer plus efficacement sur une interface LPI du fait de l'aire moléculaire très étendue de ce phospholipide. L'amélioration du rendement de la lipolyse gastrique par le LPI est donc un phénomène multifactoriel, et il semble que l'action de ce lipide particulier résulte de l'association spécifique de la forme lysophospholipide et du groupement inositol, et n'intervienne pas en empêchant le phénomène « d'inhibition » de la lipase par les acides gras qu'elle libère.

### 3. Étude de l'effet du type de phospholipide et de la présence de protéines sur la phase intestinale de la lipolyse

Les résultats précédents montrent, que le type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion lipidique et la présence de protéines dans le milieu réactionnel influencent fortement le rendement de la lipolyse gastrique de la trioléine. Nous avons donc étudié dans un second temps l'effet de ces molécules sur la phase intestinale de la lipolyse, qui met en jeu le système lipase-colipase pancréatique et, dans le cas particulier des nouveau-nés allaités, la lipase stimulée par les sels biliaires.

#### 3.1. La lipase pancréatique

##### 3.1.1. Mise au point des conditions expérimentales

La lipolyse intestinale se déroule en présence de sels biliaires, à la concentration d'environ 8 mM dans les conditions physiologiques normales (N) et 2 mM dans les conditions d'insuffisance pancréatique (IP). Nous avons regardé dans un premier temps l'effet de la nature et de la concentration de deux sources naturelles de sels biliaires à notre disposition au laboratoire, la bile vésiculaire de porc (BVP) et la bile hépatique humaine (BHH), sur l'hydrolyse de l'émulsion PC P/O par de la lipase pancréatique de porc purifiée (Tableau 10).

**Tableau 10:** Effet de la nature et de la concentration en sels biliaires sur le rendement de lipolyse intestinale (%) de l'émulsion PC P/O par de la lipase pancréatique de porc purifiée (moyenne  $\pm$  SEM).

<i>Conditions expérimentales</i>	<i>Bile Vésiculaire de porc (BVP)</i>	<i>Bile hépatique humaine (BHH)</i>
Sujet insuffisant pancréatique (IP)	51,65 $\pm$ 1,86 (n=12)	43,54 $\pm$ 1,04 * (n=4)
Sujet normal (N)	49,91 $\pm$ 1,19 (n=22)	60,82 $\pm$ 1,04 * (n=4)

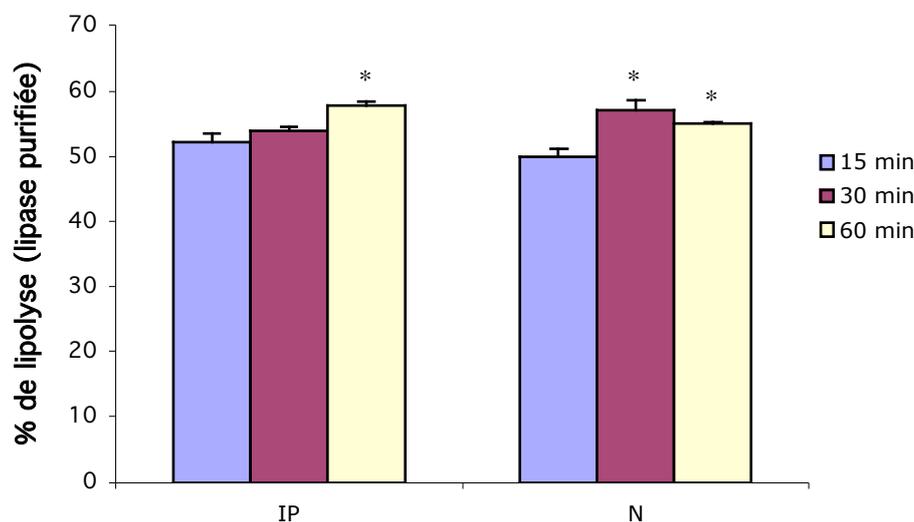
\* Valeur significativement différente de celle obtenue avec BVP.

Le rendement de lipolyse varie entre 50 et 52 % avec BVP et entre 44 et 61 % avec BHH. Le choix de la source de sels biliaires ne semble donc pas fondamental dans le cas de la lipase pancréatique utilisée. Étant donné que les expérimentations sont réalisées avec de la lipase pancréatique de porc, nous avons décidé de choisir des sels biliaires originaires de la même espèce. La source utilisée dans toutes les expérimentations suivantes sera donc BVP.

Nous avons ensuite regardé l'effet du temps d'incubation sur la détermination du rendement de lipolyse intestinale de l'émulsion PC P/O par la lipase pancréatique purifiée (Figure 52). Lorsque le temps d'incubation augmente de 15 à 60 minutes, le rendement de lipolyse varie de 52 à 58 % dans les conditions d'insuffisance pancréatique et de 50 à 55 %

dans les conditions normales. Dans les deux cas, plus de 90 % du rendement de lipolyse total est obtenu dès 15 minutes d'incubation. Nous avons donc décidé de réaliser les expérimentations suivantes sur cette durée.

**Figure 52:** Effet du temps d'incubation sur le rendement de lipolyse intestinale de l'émulsion PC P/O (moyenne  $\pm$  SEM).

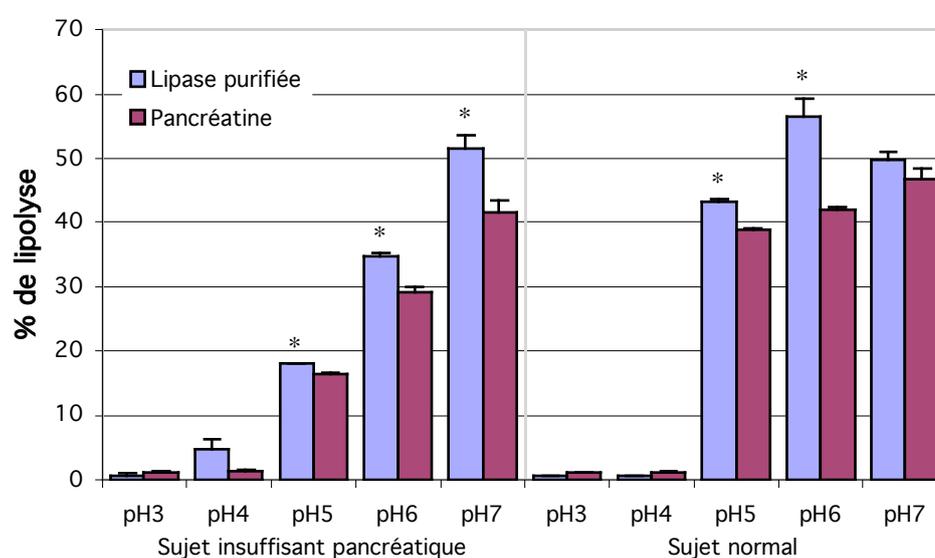


À 15 minutes n=16 dans les conditions d'insuffisance pancréatique (IP) et 22 dans les conditions normales (N), à 30 minutes n=8 et à 60 minutes n=4. \* Valeur significativement différente de celle obtenue à 15 min d'incubation.

Pour finir, nous nous sommes intéressés au pH de la réaction. Chez le sujet sain, le pH intraduodéal est d'environ 6,5 (Armand *et al.*, 1999), mais il peut varier beaucoup plus largement de 3,0 à 6,5 chez le sujet insuffisant pancréatique (Abrams *et al.*, 1984), suivant le pH du chyme gastrique et la sécrétion des ions bicarbonates par les cellules pancréatiques et duodénales. Ceci nous a donc conduits à tester l'activité de la lipase pancréatique à différents pH allant de 3 à 7. Nous avons regardé le rendement de lipolyse intestinale de l'émulsion PC P/O, en utilisant cette fois deux sources de lipase pancréatique : de la lipase pancréatique de porc purifiée et de la pancréatine (poudre de pancréas de porc) (Figure 53). Aux pH les plus bas (pH 3 et pH 4), le rendement de lipolyse intestinale est très faible (inférieur à 5 %). À partir de pH 5, toutes conditions confondues, on obtient un rendement supérieur à 16 %. Le rendement de lipolyse obtenu avec la lipase purifiée est systématiquement meilleur, que celui obtenu avec la pancréatine (d'environ 17 %). Il se peut, en effet, que la lipase pancréatique soit dégradée par les protéases également présentes dans la pancréatine. Le rendement de lipolyse maximal pour la lipase purifiée est d'environ 52 % à pH 7 dans les conditions

d'insuffisance pancréatique et 57 % à pH 6 dans les conditions normales. Pour la pancréatine, il est d'environ 42 à pH 7 dans les conditions d'insuffisance pancréatique et 47 % à pH 7 dans les conditions normales. Si on compare, enfin, les rendements de lipolyse obtenus avec les deux concentrations de sels biliaires, on constate qu'à pH 7 ils sont soit différents d'environ 20 % soit comparables (52 et 42 % pour IP et 50 et 47 % pour N), mais qu'ils sont bien plus bas à pH 6 et pH 5 dans les conditions d'insuffisance pancréatique (-35 et -59 % respectivement).

**Figure 53:** Effet du pH sur le rendement de lipolyse intestinale de l'émulsion PC P/O (moyenne  $\pm$  SEM).



Sujet insuffisant pancréatique: n=4 sauf n=8 avec la lipase purifiée à pH 4, n=12 avec la lipase purifiée à pH 7 et n=6 avec la pancréatine à pH 7; sujet normal: n=4 sauf n=6 avec la lipase purifiée à pH 4, n=22 avec la lipase purifiée à pH 7 et n=8 avec la pancréatine à pH 7. \* Valeur significativement différente de celle obtenue avec la pancréatine.

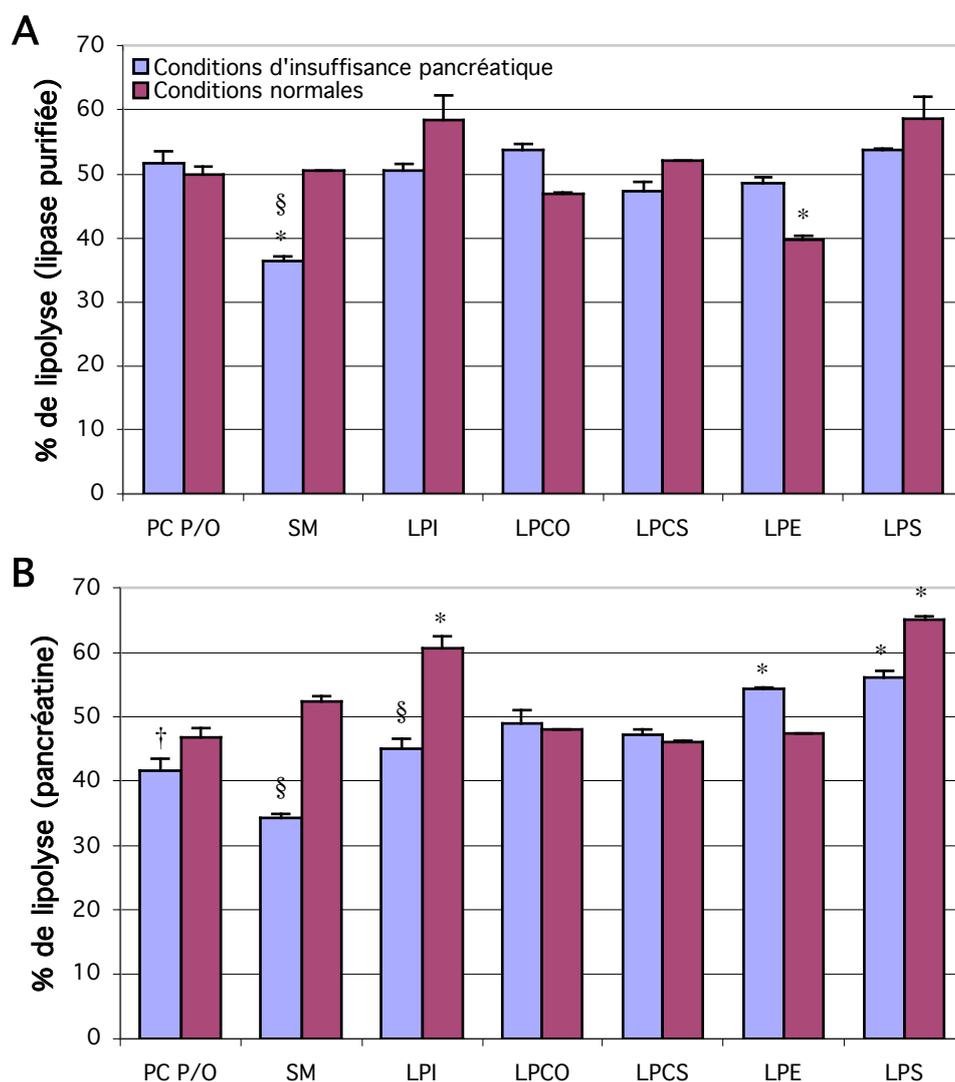
Les lipolyses intestinales présentées ci-après ont été menées à pH 7 pendant 15 minutes, sauf indication contraire.

### 3.1.2. Étude de l'effet du type de phospholipide sur l'activité de la lipase pancréatique

Dans les conditions d'incubation définies ci-dessus (avec de la bile vésiculaire de porc, pendant 15 minutes et à pH 7), nous avons déterminé le rendement de la lipolyse intestinale de sept émulsions choisies par rapport à leur rendement de lipolyse gastrique : PC P/O, SM, LPI, LPCO, LPCS, LPE et LPS. Nous avons utilisé de la lipase pancréatique purifiée et de la pancréatine et nous sommes placés à des concentrations en sels biliaires

proches des conditions physiologiques normales (8 mM) ou d'insuffisance pancréatique (2 mM) (Figure 54). Les rendements de lipolyse obtenus (34 % minimum) sont plus élevés que les rendements de lipolyse gastrique. Les rendements de lipolyse intestinale avec la lipase pancréatique purifiée varient de 36 à 54 % dans les conditions d'insuffisance pancréatique et de 40 à 59 % dans les conditions normales.

**Figure 54:** Rendement de lipolyse intestinale d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides (moyenne  $\pm$  SEM). Les tests de digestion ont été réalisés avec de la lipase pancréatique purifiée (A) et avec de la pancréatine (B).



n=4 sauf PC P/O: n=12 avec la lipase purifiée dans les conditions d'insuffisance pancréatique, n=22 avec la lipase purifiée dans les conditions normales, n=6 avec la pancréatine dans les conditions d'insuffisance pancréatique, n=8 avec la pancréatine dans les conditions normales, et LPI: n=6 avec la lipase purifiée, n=10 avec la pancréatine. Valeur significativement différente de celle obtenue avec l'émulsion PC P/O (\*), de celle obtenue dans les conditions normales (§), et de celle obtenue avec la lipase purifiée (†).

Avec la pancréatine, ils varient de 34 à 56 % dans les conditions d'insuffisance pancréatique et de 46 à 65 % dans les conditions normales. On a donc globalement un rendement d'environ 50 %, que la lipase pancréatique soit purifiée ou apportée par de la pancréatine, et que la concentration en sels biliaires soit de 2 ou de 8 mM.

De façon plus précise, l'utilisation de pancréatine par rapport à de la lipase pancréatique purifiée n'entraîne une diminution significative du rendement de la lipolyse que pour l'émulsion PC P/O et seulement dans les conditions d'insuffisance pancréatique (-19 %,  $p < 0,05$ ). La diminution de la concentration en sels biliaires, d'autre part, ne réduit significativement ( $p < 0,05$ ) que le rendement de la lipolyse intestinale des émulsions SM (-34 % avec la pancréatine et -28 % avec la lipase purifiée) et LPI (-26 % avec la pancréatine). Le type de phospholipide n'a pas non plus un effet très marqué sur l'activité de la lipase pancréatique purifiée. En effet, dans les conditions normales, les différents phospholipides testés permettent d'obtenir des rendements de lipolyse très proches. Seul LPE donne une émulsion moins bien hydrolysée, avec un rendement de lipolyse intestinale significativement diminué de 32 % par rapport à LPI et LPS ( $p < 0,005$ ) et de 21 % par rapport à PC P/O ( $p < 0,05$ ). Toujours avec la lipase purifiée, mais dans les conditions d'insuffisance pancréatique, c'est l'émulsion SM qui se comporte différemment. Son rendement de lipolyse est le plus faible et se traduit par une diminution significative ( $p < 0,005$ ) de 32 % par rapport à LPCO et LPCS, 30 % par rapport à PC P/O et 28 % par rapport à LPI.

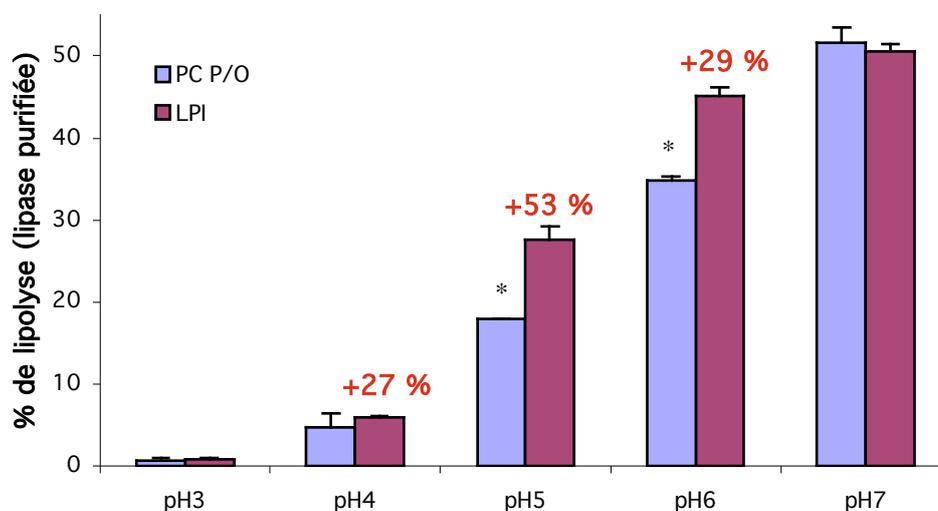
Avec la pancréatine et dans les conditions normales, on constate que deux phospholipides se détachent des autres en permettant d'améliorer significativement le rendement de lipolyse intestinale ( $p < 0,005$ ) : LPS et LPI, avec des rendements augmentés respectivement de 36 à 41 % et de 27 à 32 % par rapport aux autres émulsions sauf SM (dont le rendement est de plus de 50 % dans ces conditions). Avec la pancréatine et dans les conditions d'insuffisance pancréatique, les meilleurs rendements de lipolyse sont obtenus pour les émulsions LPS et LPE, avec une amélioration significative ( $p < 0,05$ ) ou non de 13 à 26 % par rapport à PC P/O, LPI, LPCO et LPCS. L'émulsion SM est la moins bien hydrolysée, avec une diminution significative de son rendement de lipolyse de 39 % par rapport à LPS, 37 % par rapport à LPE et 30 % par rapport à LPCO ( $p < 0,05$ ).

Toutes conditions confondues, l'effet du type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion lipidique est donc moins marqué avec la lipase pancréatique qu'avec la lipase gastrique. Néanmoins, LPS et LPI sont les phospholipides qui permettent d'obtenir les meilleurs rendements de lipolyse intestinale. L'émulsion SM est responsable des moins bons rendements, mais seulement dans les conditions d'insuffisance pancréatique.

L'émulsion LPE a un comportement ambivalent, en donnant le plus mauvais rendement de lipolyse avec la lipase purifiée dans les conditions normales (40 %) et le meilleur après LPS avec la pancréatine dans les conditions d'insuffisance pancréatique (54 %).

Étant donné que l'insuffisance pancréatique s'accompagne d'un abaissement du pH intraduodéal, nous avons également comparé l'effet des émulsions PC P/O et LPI sur l'activité de la lipase pancréatique purifiée à différents pH avec 2 mM de sels biliaires (Figure 55). À pH 7, les rendements de lipolyse obtenus sont équivalents (environ 51 %). À pH 3, l'activité de la lipase pancréatique est pratiquement nulle pour les deux phospholipides (moins de 1 %). Aux pH compris entre ces deux valeurs extrêmes, l'émulsion LPI permet d'obtenir une amélioration non négligeable du rendement de lipolyse intestinale. À pH 4 et pH 6, le rendement est augmenté respectivement de 27 et 29 % (significatif à pH 6 avec  $p < 0,05$ ). L'effet le plus marquant est obtenu à pH 5, avec une augmentation significative du rendement de lipolyse de 53 % grâce à la présence du LPI ( $p < 0,05$ ).

**Figure 55:** Comparaison des rendements de lipolyse intestinale des émulsions PC P/O et LPI dans les conditions d'insuffisance pancréatique (moyenne  $\pm$  SEM).

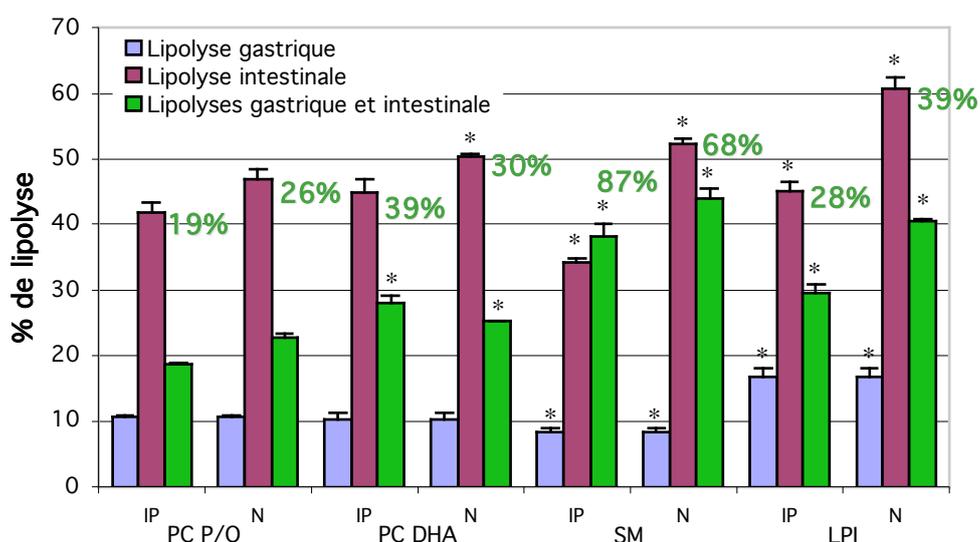


$n=4$  sauf  $n=8$  pour PC P/O à pH 4,  $n=12$  pour PC P/O à pH 7 et  $n=6$  pour LPI à pH 7. \* Valeur significativement différente de celle obtenue avec l'émulsion LPI.

Pour avoir des données plus proches de la réalité, nous avons aussi réalisé des tests de digestibilité en débutant la lipolyse intestinale (pancréatine) immédiatement après 60 minutes de lipolyse gastrique (suc gastrique GM PG3) (Figure 56). Les rendements de lipolyse gastrique obtenus avec le suc gastrique GM PG3 varient de  $8,31 \pm 0,54$  % (émulsion SM) à  $16,81 \pm 1,30$  % (émulsion LPI), les émulsions PC P/O et PC DHA permettant d'obtenir des

rendements de lipolyse intermédiaires (respectivement  $10,69 \pm 0,22$  et  $10,33 \pm 0,92$  %). Si on prend l'émulsion PC P/O comme référence, l'émulsion PC DHA ne modifie donc pas le rendement de lipolyse gastrique, tandis que l'émulsion LPI l'augmente de façon importante (+57 %) et que l'émulsion SM la diminue de façon modérée (-22 %) (variations significatives,  $p < 0,05$ ). En phase intestinale, les rendements de lipolyse, plus élevés, varient de 34 à 61 % et sont systématiquement plus faibles dans les conditions d'insuffisance pancréatique (de -11 à -34 % par rapport aux conditions normales). Si on classe les émulsions testées par ordre de rendement de lipolyse décroissant, on trouve d'abord LPI, puis PC DHA, PC P/O et SM dans les conditions d'insuffisance pancréatique, et LPI, SM, PC DHA et PC P/O dans les conditions normales.

**Figure 56:** Rendement de lipolyse intestinale d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, après 60 minutes de lipolyse gastrique (moyenne  $\pm$  SEM).



Les tests de digestion ont été réalisés avec le suc gastrique GM PG3 et de la pancréatine.  $n=4$  sauf pour les lipolyses intestinales seules de PC P/O (IP:  $n=6$ , N:  $n=8$ ) et de LPI ( $n=10$ ). Les pourcentages en vert correspondent aux rendements de lipolyse intestinale maintenus en présence du milieu réactionnel de lipolyse gastrique; ils ont été calculés avec la formule:  $[I-(GI-G)] \times 100/I$ . Abréviations: IP, conditions d'insuffisance pancréatique (2 mM de sels biliaires); N, conditions normales (8 mM de sels biliaires); G, rendement de lipolyse gastrique; I, rendement de lipolyse intestinale; GI, rendement de lipolyse gastrique et intestinale. \* Valeur significativement différente de celle obtenue avec l'émulsion PC P/O.

L'enchaînement immédiat des deux phases de digestion donne des résultats surprenants. Tout d'abord, c'est l'émulsion SM qui permet d'obtenir le meilleur rendement de lipolyse (environ 38 % à 2 mM de sels biliaires et 44 % à 8 mM). L'émulsion LPI arrive en deuxième position

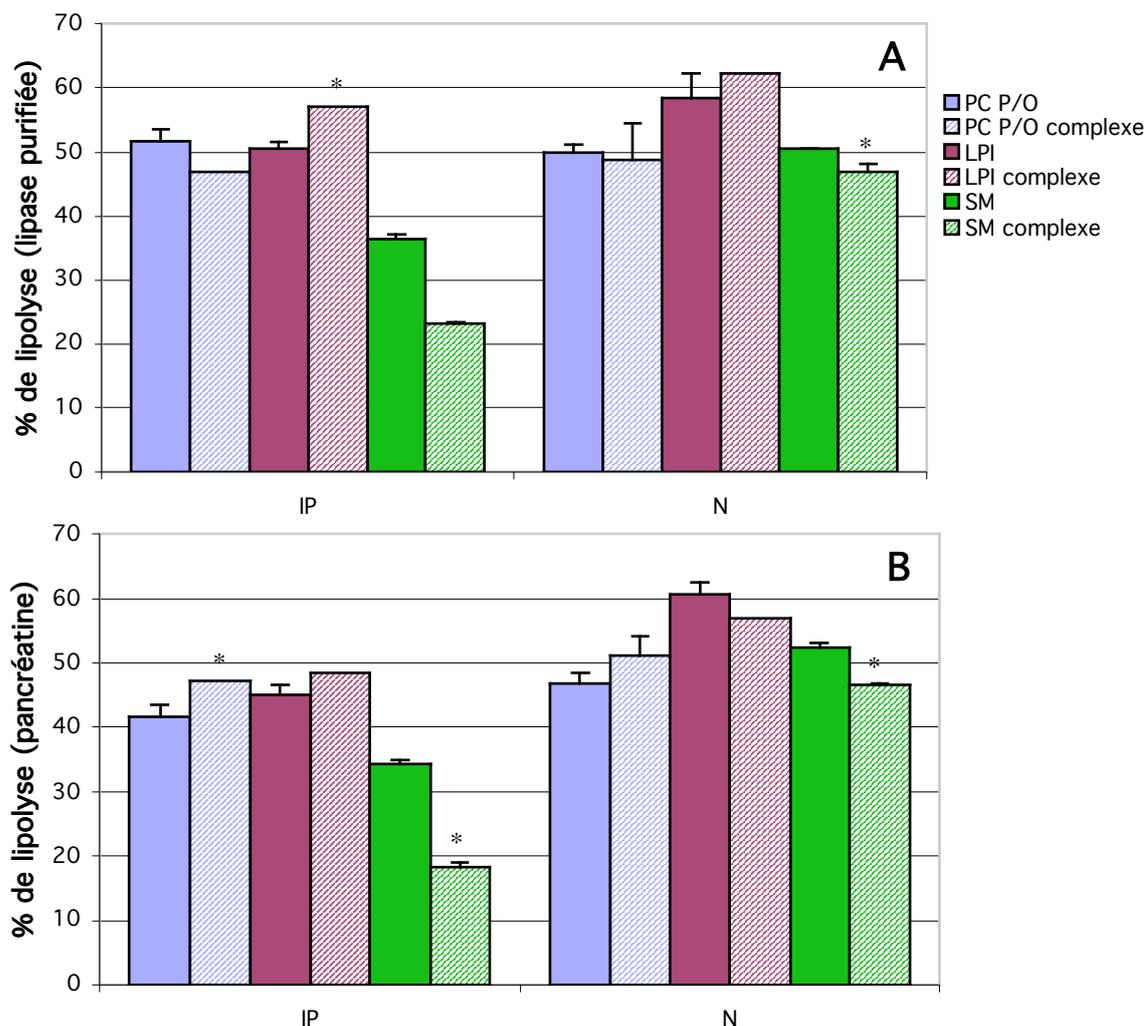
(environ 30 et 41 % à 2 et 8 mM de sels biliaires, respectivement), suivie de PC DHA (environ 28 et 25 %) et PC P/O (19 et 23 %). De plus, le rendement de lipolyse gastrique et intestinale n'est pas la somme du rendement de lipolyse gastrique et du rendement de lipolyse intestinale pris séparément. Le rendement de lipolyse obtenu avec les deux lipases est même inférieur au rendement de lipolyse obtenu avec la lipase pancréatique seule, sauf pour l'émulsion SM. Sachant que dans le cas des lipolyses gastriques et intestinales successives, les lipolyses gastriques sont menées exactement comme dans le cas des lipolyses gastriques seules, on en déduit que c'est le rendement de lipolyse intestinale qui est diminué, et on peut émettre l'hypothèse que cette diminution serait due à une dégradation de la lipase pancréatique par les protéases du suc gastrique, en particulier par la pepsine (Meyer *et al.*, 1994). Cette dégradation serait relativement limitée en présence de l'émulsion SM : 68 à 87 % du rendement de lipolyse intestinale est en effet maintenu en présence du milieu réactionnel de lipolyse gastrique. En revanche, elle serait importante à très importante en présence des autres émulsions avec des rendements de lipolyse intestinale maintenus de 28 et 39 % pour LPI, 30 et 39 % pour PC DHA et seulement 19 et 26 % pour PC P/O. Par ailleurs, il ne semble pas que la concentration en sels biliaires atténue ou renforce ces phénomènes.

### **3.1.3. Étude de l'effet du type de phospholipide sur l'activité de la lipase pancréatique en présence de protéines**

Comme pour la lipase gastrique, nous avons ensuite étudié l'effet du type de phospholipide sur l'activité de la lipase pancréatique en présence de lactose et de protéines de lait (mélange équimassique de protéines du lactosérum et de caséines). Nous avons à nouveau réalisé les tests de digestion avec de la lipase pancréatique purifiée et de la pancréatine, et dans les conditions normales (N) et d'insuffisance pancréatique (IP) (Figure 57).

Dans les conditions normales et quelle que soit la source de lipase pancréatique utilisée, l'ajout de lactose et de protéines de lait ne modifie pas notablement le rendement de lipolyse intestinale des trois émulsions testées : -2,4 % pour PC P/O, +6,4 % pour LPI et -6,8 % pour SM avec la lipase pancréatique purifiée, et +9,4 % pour PC P/O, -7,4 % pour LPI et -11,1 % pour SM avec la pancréatine. Dans les conditions d'insuffisance pancréatique, l'ajout de lactose et de protéines de lait n'entraîne pas non plus de modification notable du rendement de lipolyse intestinale des émulsions PC P/O et LPI. Par contre, cet ajout entraîne une diminution importante du rendement de lipolyse de l'émulsion SM de -36,3 % avec la lipase pancréatique purifiée et de -46,8 % avec la pancréatine. L'obtention d'un moins bon rendement de lipolyse intestinale en présence de sphingomyéline dans les conditions d'insuffisance pancréatique est donc accentuée en présence de lactose et de protéines de lait.

**Figure 57:** Rendement de lipolyse intestinale d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, en présence de lactose et de protéines de lait.



Les tests de digestion ont été réalisés à pH 7,00 avec de la lipase pancréatique purifiée (A) et avec de la pancréatine (B) (moyenne  $\pm$  SEM); PC P/O: n=12 dans les conditions d'insuffisance pancréatique (IP) avec la lipase purifiée, n=6 dans les conditions d'insuffisance pancréatique avec la pancréatine, n=22 dans les conditions normales (N) avec la lipase purifiée et n=8 dans les conditions normales avec la pancréatine; PC P/O complexe: n=2 dans les conditions d'insuffisance pancréatique, n=6 dans les conditions normales avec la lipase purifiée et n=4 dans les conditions normales avec la pancréatine; LPI: n=6 avec la lipase purifiée et n=10 avec la pancréatine; LPI complexe, SM et SM complexe: n=4. \* Valeur significativement différente de celle obtenue sans lactose et protéines.

### 3.1.4. Conclusion

Le type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion a peu d'effet sur l'activité de la lipase pancréatique contrairement au cas de la lipase gastrique. Pour une concentration en sels biliaires proche des conditions physiologiques normales (8 mM), les rendements de lipolyse intestinale obtenus avec les différents phospholipides testés sont très

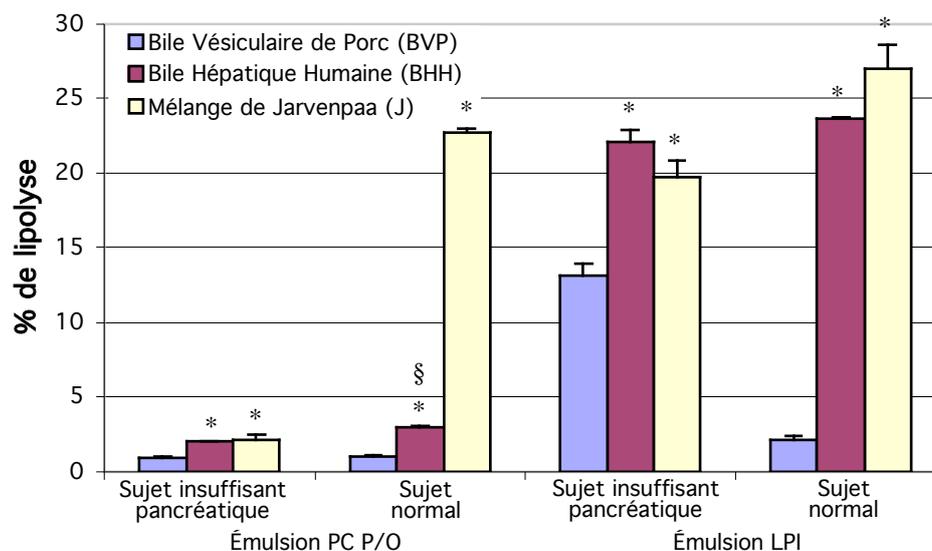
proches, y compris avec la sphingomyéline, pourtant responsable d'une diminution très importante du rendement de lipolyse gastrique. Ce faible impact du type de phospholipide en phase intestinale, également vrai en présence de lactose et de protéines de lait, pourrait être dû à une sorte "d'effet atténuateur" des lipides biliaries, qui apportent environ 7 fois plus de phospholipides que les émulsions. En effet, pour une concentration en sels biliaries plus faible, proche de celle trouvée dans l'insuffisance pancréatique (2 mM), la présence de sphingomyéline redevient un facteur d'inhibition de la lipolyse intestinale, encore plus puissant en présence de lactose et de protéines de lait. À cette concentration en sels biliaries et pour un pH également proche des conditions d'insuffisance pancréatique (compris entre 4 et 6), l'émulsion LPI permet d'obtenir un meilleur rendement de lipolyse que l'émulsion PC P/O, avec une augmentation importante de 27 à 53 % du rendement.

## **3.2. La lipase stimulée par les sels biliaries**

### **3.2.1. Mise au point des conditions expérimentales**

S'agissant d'une lipase dont l'activité dépend par nature des sels biliaries, nous avons tout d'abord testé trois sources de sels biliaries : de la bile vésiculaire de porc (BVP), de la bile hépatique humaine (BHH) et un mélange de sels biliaries purs, dont la composition se rapproche de celle trouvée chez le nouveau-né prématuré (Mélange de Jarvenpaa). Les rendements de lipolyse ont été déterminés pour deux émulsions représentatives (PC P/O et LPI) et à deux concentrations physiologiques de sels biliaries (2 mM pour l'insuffisance pancréatique et 8 mM pour les conditions normales) (Figure 58). Les plus faibles rendements de lipolyse sont obtenus avec BVP : 0,95 et 1,00 % pour PC P/O et 13,12 et 2,15 % pour LPI, respectivement à 2 et 8 mM de sels biliaries. On constate donc immédiatement, que l'émulsion LPI semble favoriser l'action de la lipase stimulée par les sels biliaries (BSSL) dans les conditions d'insuffisance pancréatique avec BVP. On retrouve cet effet avec BHH, puisque les rendements de lipolyse de l'émulsion PC P/O sont très faibles (2,07 et 2,99 % à 2 et 8 mM de sels biliaries respectivement) tandis que ceux de l'émulsion LPI sont supérieurs à 20 % (22,08 et 23,65 % à 2 et 8 mM de sels biliaries respectivement). Dans le cas de BHH, l'activation par LPI se produit indifféremment dans les conditions d'insuffisance pancréatique et normales. Le mélange de Jarvenpaa donne les meilleurs rendements de lipolyse, sauf pour LPI dans les conditions d'insuffisance pancréatique. L'émulsion PC P/O, toujours mal hydrolysée à 2 mM de sels biliaries, atteint pratiquement 23 % de rendement de lipolyse à 8 mM de mélange de Jarvenpaa, ce qui est très proche des rendements obtenus avec l'émulsion LPI (19,70 et 26,96 % à 2 et 8 mM de sels biliaries respectivement).

**Figure 58:** Effet de la nature et de la concentration en sels biliaires sur le rendement de lipolyse intestinale des émulsions PC P/O et LPI par la lipase stimulée par les sels biliaires (moyenne  $\pm$  SEM).



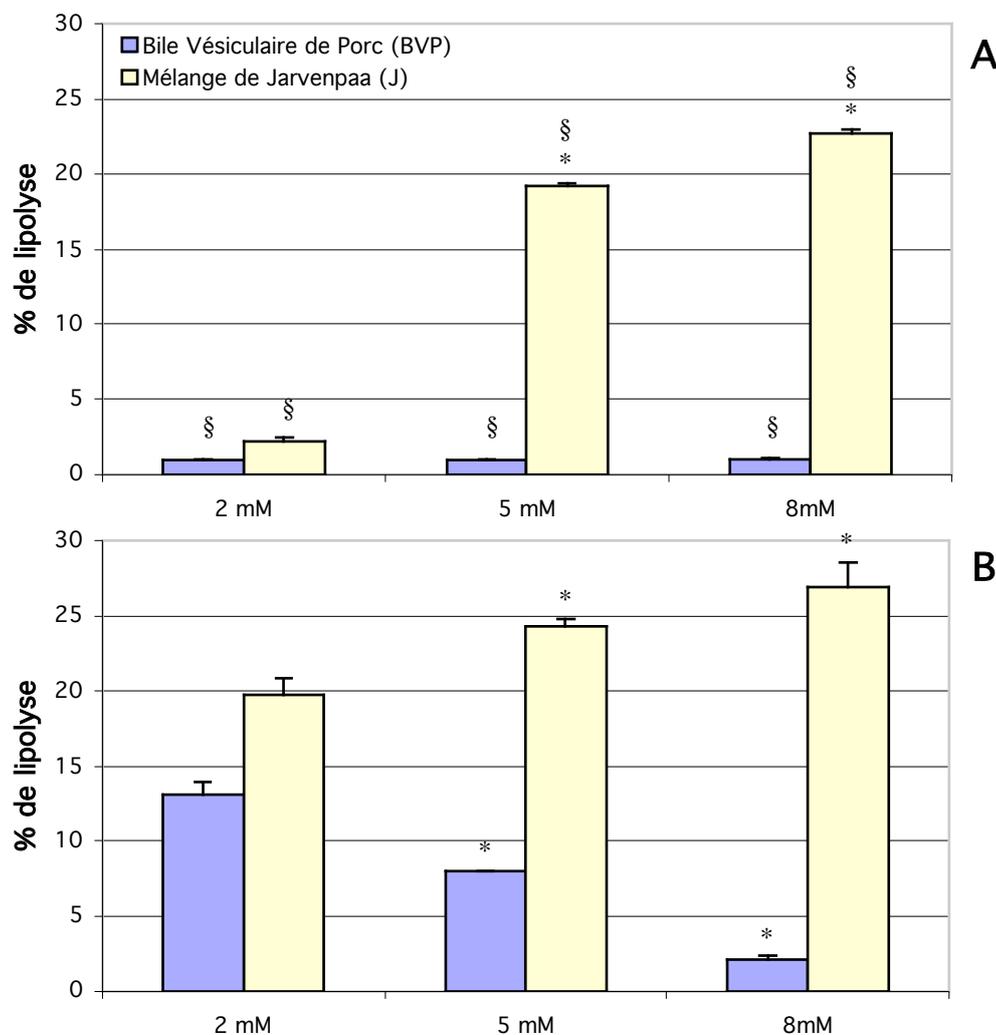
BVP: n=8 pour PC P/O et n=18 pour LPI; BHH: n=4; J: n=10 pour PC P/O-IP, n=8 pour PC P/O-N, n=14 pour LPI-IP et n=16 pour LPI-N. Valeur significativement différente de celle obtenue avec BVP (\*) et de celle obtenue avec BHH (§).

Si on teste également une concentration intermédiaire en sels biliaires (5 mM) pour BVP et le mélange de Jarvenpaa (Figure 59), on voit clairement, que la composition de la bile vésiculaire de porc ne convient pas à l'activation de la BSSL en présence de l'émulsion PC P/O et freine progressivement l'activation de l'enzyme en présence de l'émulsion LPI, tandis qu'inversement le mélange de Jarvenpaa favorise l'action de la BSSL de façon dose-dépendante pour les deux émulsions. Ces deux dernières sources de sels biliaires présentent des intérêts différents. Le mélange de Jarvenpaa présente l'avantage d'une composition en sels biliaires proche de celle du nouveau-né prématuré (rapport acides choliques/acides chénodésoxycholiques proche de 2 et rapport sels biliaires tauroconjugués/sels biliaires glycoconjugués supérieur à 2). La bile vésiculaire de porc présente l'avantage d'apporter tous les lipides biliaires (c'est-à-dire aussi les phospholipides et les protéines, absents du mélange de Jarvenpaa) et d'être composée de sels biliaires majoritairement glycoconjugués (rapport sels biliaires tauroconjugués/sels biliaires glycoconjugués d'environ 1 pour 9) comme dans la bile du nouveau-né âgé de plus d'un mois et de l'adulte.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du temps d'incubation sur la détermination du rendement de lipolyse intestinale par la BSSL (Figure 60). Qu'il s'agisse de l'émulsion PC P/O ou de l'émulsion LPI, et que la source de sels biliaires utilisée soit BVP ou le mélange de Jarvenpaa, on obtient au bout de 15 minutes environ 76 % du rendement obtenu

après 30 minutes d'incubation. Il nous a donc semblé, que cette durée serait suffisante pour pouvoir comparer différentes conditions expérimentales.

**Figure 59:** Effet de la nature et de la concentration en sels biliaires sur le rendement de lipolyse intestinale des émulsions PC P/O (A) et LPI (B) par la lipase stimulée par les sels biliaires (moyenne  $\pm$  SEM).



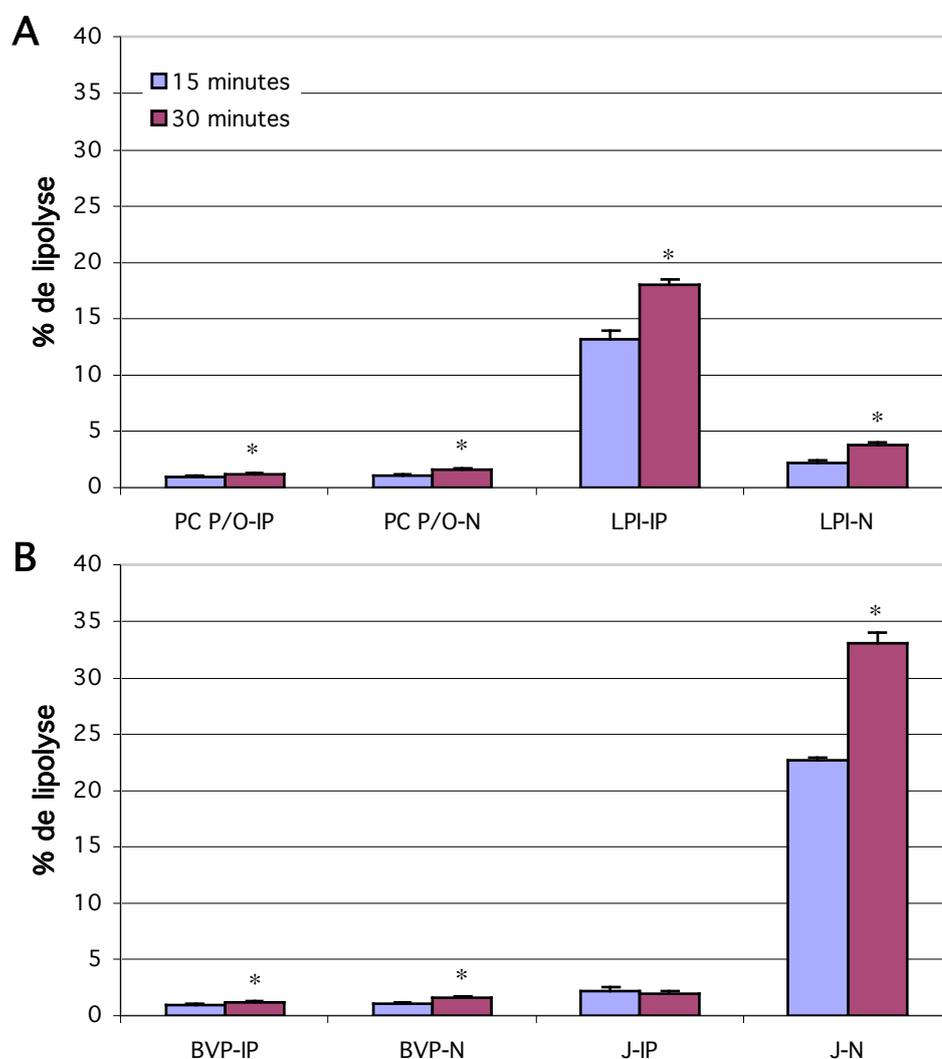
BVP: n=4 pour 5 mM, n=8 pour PC P/O-2 mM et PC P/O-8 mM, n=18 pour LPI-2 mM et LPI-8 mM; J: n=4 pour 5 mM, n=10 pour PC P/O-2 mM, n= 8 pour PC P/O-8 mM, n=14 pour LPI-2 mM, n=16 pour LPI-8 mM. Valeur significativement différente de celle obtenue à 2mM de sels biliaires (\*) et de celle obtenue avec l'émulsion LPI (§).

Enfin, l'effet du pH de la réaction sur le rendement de lipolyse de l'émulsion LPI en présence de BVP a été testé (Figure 61). Dans les conditions normales, les rendements de lipolyse obtenus sont très faibles et varient de 1,7 à 2,8 %. Le pH de la réaction n'influence pas réellement l'activité de la BSSL. Dans les conditions d'insuffisance pancréatique, les

rendements de lipolyse sont plus élevés et varient plus largement : 13,1 % à pH 7, 8,9 % à pH 6 et 4,5 % à pH 5. L'abaissement du pH entraîne donc une diminution du rendement de la lipolyse par la BSSL d'environ 30 % à chaque unité de pH perdue. Il est vrai, que le pH optimum d'action de la BSSL est compris entre 7,5 et 9 même si elle est stable plus d'une heure à pH 3,5.

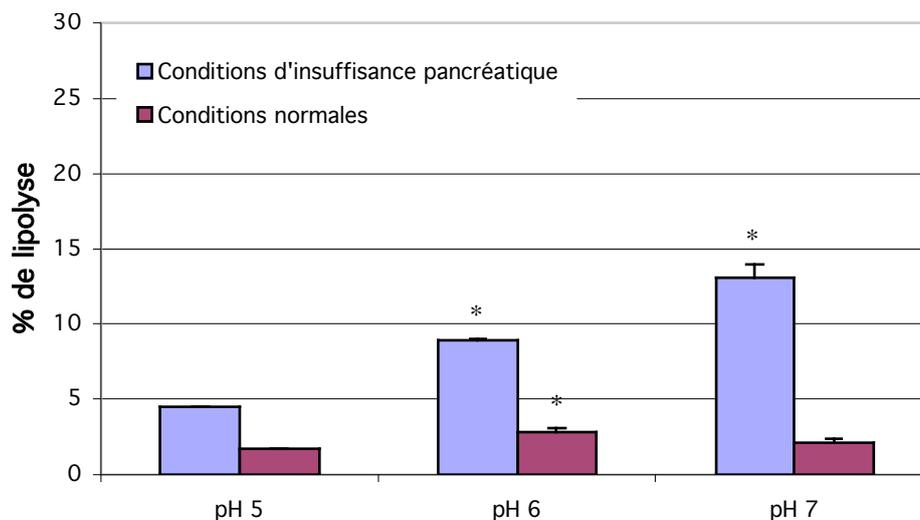
Les tests de digestion qui suivent ont donc été menés en présence de BVP ou de mélange de Jarvenpaa, pendant 15 minutes et à pH 7.

**Figure 60:** Effet du temps d'incubation sur le rendement de lipolyse intestinale par la lipase stimulée par les sels biliaires (moyenne  $\pm$  SEM). A: émulsions PC P/O et LPI en présence de bile vésiculaire de porc; B: émulsion PC P/O en présence de bile vésiculaire de porc (BVP) ou de mélange de Jarvenpaa (J). IP: conditions d'insuffisance pancréatique, N: conditions normales.



À 15 minutes: n=8 pour PC P/O-IP, PC P/O-N, BVP-IP, BVP-N et J-N, n=18 pour LPI-IP et LPI-N, n=10 pour J-IP; à 30 minutes: n=4. \* Valeur significativement différente de celle obtenue à 15 minutes.

**Figure 61:** Effet du pH sur le rendement de lipolyse intestinale de l'émulsion LPI par la lipase stimulée par les sels biliaires en présence de bile vésiculaire de porc (moyenne  $\pm$  SEM).



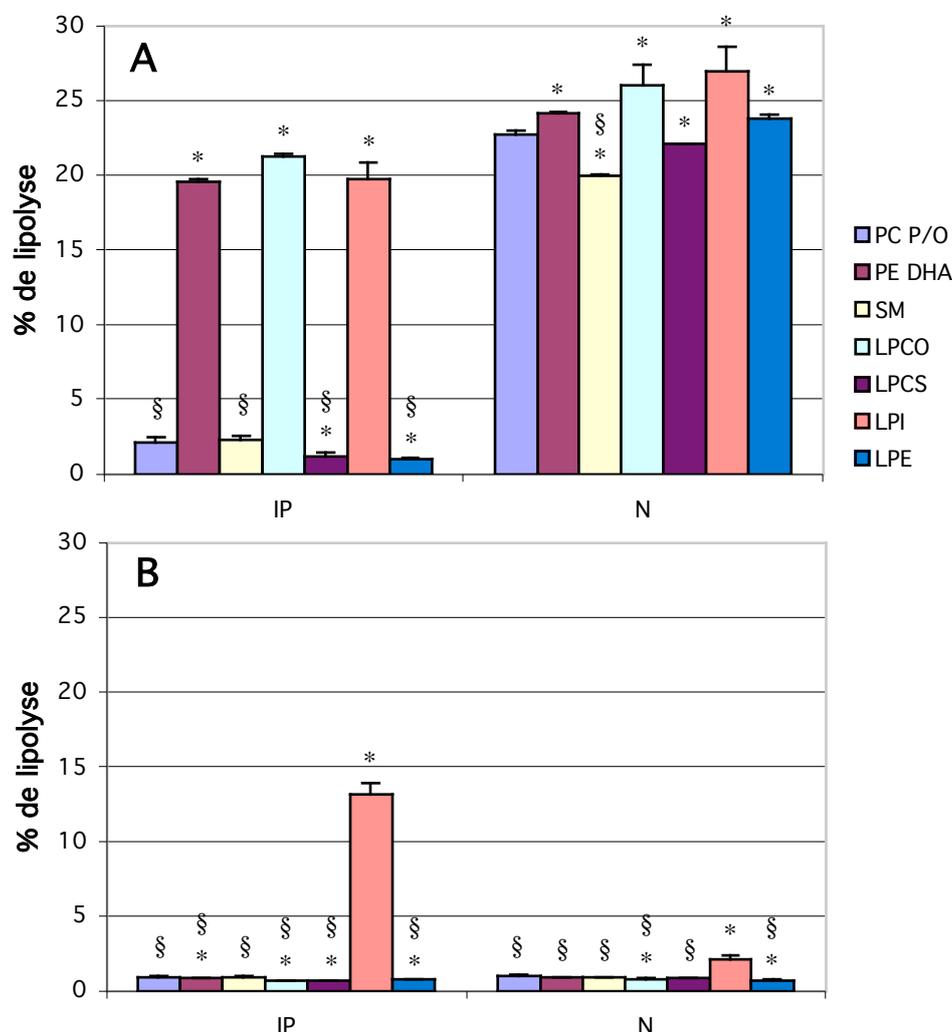
n=4 à pH 5 et pH 6, n=18 à pH 7. \* Valeur significativement différente de celle obtenue à pH 5.

### 3.2.2. Étude de l'effet du type de phospholipide sur l'activité de la lipase stimulée par les sels biliaires

L'effet du type de phospholipide sur l'activité de la BSSL a été étudié à l'aide de sept émulsions représentatives : PC P/O, PE DHA, SM, LPCO, LPCS, LPI et LPE (Figure 62). Avec le mélange de Jarvenpaa et dans les conditions normales, les rendements de lipolyse obtenus varient de 19,98 % (émulsion SM) à 26,96 % (émulsion LPI). Il n'y a pas de différence significative entre les rendements de lipolyse des différentes émulsions, sauf entre les deux valeurs extrêmes (SM et LPI) ( $p < 0,05$ ). Lorsqu'on se place dans les conditions d'insuffisance pancréatique, on observe une diminution du rendement de lipolyse pour toutes les émulsions. Cette diminution significative ( $p < 0,05$ ) est drastique pour les émulsions PC P/O (-90 %), SM (-88 %), LPCS (-95 %) et LPE (-96 %), mais plus modérée pour les émulsions PE DHA (-19 %), LPCO (-18 %) et LPI (-27 %). Ces trois émulsions permettent donc à la BSSL de conserver dans un environnement déficitaire en sels biliaires une activité satisfaisante, plus de 8 fois supérieure à celle obtenue avec une émulsion de référence comme PC P/O ( $p < 0,0001$ ). Avec BVP et dans les conditions normales, les rendements de lipolyse obtenus avec la BSSL sont relativement négligeables quel que soit le phospholipide utilisé. Dans les conditions d'insuffisance pancréatique, le rendement de lipolyse des émulsions PC P/O, PE DHA, SM, LPCO, LPCS et LPE est toujours aussi faible, voire encore plus bas. L'émulsion LPI, en revanche, permet d'obtenir un rendement de lipolyse non négligeable

(environ 13 %), avec une amélioration significative ( $p < 0,05$ ) d'un facteur 6 par rapport aux conditions normales, et d'un facteur 17 en moyenne par rapport aux autres émulsions.

**Figure 62:** Rendement de lipolyse intestinale d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, par la lipase stimulée par les sels biliaries (moyenne  $\pm$  SEM).



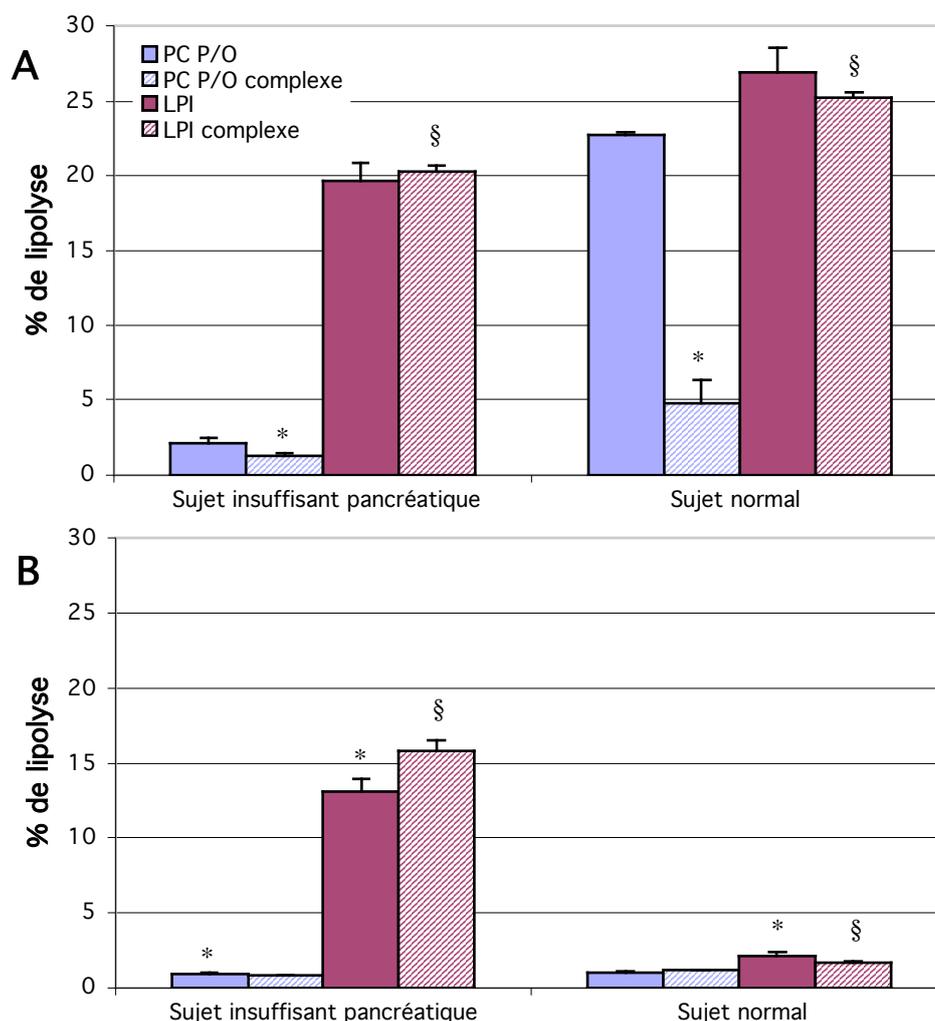
Les tests de digestion ont été réalisés en présence du mélange de Jarvenpaa (A) ou en présence de bile vésiculaire de porc (B) dans les conditions d'insuffisance pancréatique (IP) et dans les conditions normales (N).  $n=4$  pour PE DHA, SM, LPCS et LPE; avec le mélange de Jarvenpaa:  $n=10$  pour PC P/O-IP,  $n=4$  pour LPCO-IP,  $n=14$  pour LPI-IP,  $n=8$  pour PC P/O-N et LPCO-N,  $n=16$  pour LPI-N; avec la bile vésiculaire de porc:  $n=8$  pour PC P/O et LPCO,  $n=18$  pour LPI. Valeur significativement différente de celle obtenue avec l'émulsion PC P/O (\*) et de celle obtenue avec l'émulsion LPI (§).

L'ensemble de ces résultats souligne donc l'impact particulièrement intéressant du LPI sur l'activité de la lipase stimulée par les sels biliaries, aussi bien chez le nouveau-né (conditions d'insuffisance pancréatique avec le mélange de Jarvenpaa) que chez le sujet mucoviscidosique (conditions d'insuffisance pancréatique avec BVP).

### 3.2.3. Étude de l'effet du type de phospholipide sur l'activité de la lipase stimulée par les sels biliaires en présence de protéines

Des tests de digestion en présence de lactose et de protéines de lait (mélange équimassique de protéines du lactosérum et de caséines) ont également été réalisés avec la BSSL (Figure 63).

**Figure 63:** Rendement de lipolyse intestinale d'émulsions de trioléine, stabilisées par différents types de phospholipides, par la lipase stimulée par les sels biliaires en présence de lactose et de protéines de lait (moyenne  $\pm$  SEM).



Les tests de digestion ont été réalisés en présence du mélange de Jarvenpaa (A) ou en présence de bile vésiculaire de porc (B). Avec le mélange de Jarvenpaa: n=10 pour PC P/O dans les conditions d'insuffisance pancréatique et pour LPI complexe, n=8 pour PC P/O dans les conditions normales et pour PC P/O complexe, n=14 pour LPI dans les conditions d'insuffisance pancréatique, n=16 pour LPI dans les conditions normales; avec la bile vésiculaire de porc: n=8 pour PC P/O et PC P/O complexe, n=18 pour LPI, n=12 pour LPI complexe. Valeur significativement différente de celle obtenue avec du lactose et des protéines (\*) et de celle obtenue avec l'émulsion PC P/O complexe (§).

L'ajout de lactose et de protéines de lait dans le tampon d'hydrolyse de l'émulsion LPI ne modifie pratiquement pas son rendement de lipolyse par la BSSL : 25,25 % versus 26,96 % à 8 mM de mélange de Jarvenpaa, 20,24 % versus 19,70 % à 2 mM de mélange de Jarvenpaa, 1,68 % versus 2,15 % à 8 mM de sels biliaires, et 15,8 % versus 13,12 % à 2 mM de sels biliaires. L'ajout de lactose et de protéines de lait dans le tampon d'hydrolyse de l'émulsion PC P/O ne modifie pas non plus son rendement de lipolyse à 2 mM de mélange de Jarvenpaa (1,27 versus 2,16 %), 8 mM de sels biliaires (1,16 versus 1,00 %) et 2 mM de sels biliaires (0,84 versus 0,95 %). En revanche, à 8 mM de mélange de Jarvenpaa, on observe une diminution très importante du rendement de lipolyse de l'émulsion PC P/O d'environ 80 % (4,75 % versus 22,73 %). L'émulsion LPI permet dans toutes les conditions testées d'obtenir un rendement de lipolyse supérieur à celui de l'émulsion PC P/O. De plus, l'ajout de lactose et de protéines de lait annule l'effet de PC P/O dans la seule condition expérimentale où cette émulsion permettait d'obtenir un rendement de lipolyse proche de celui de l'émulsion LPI.

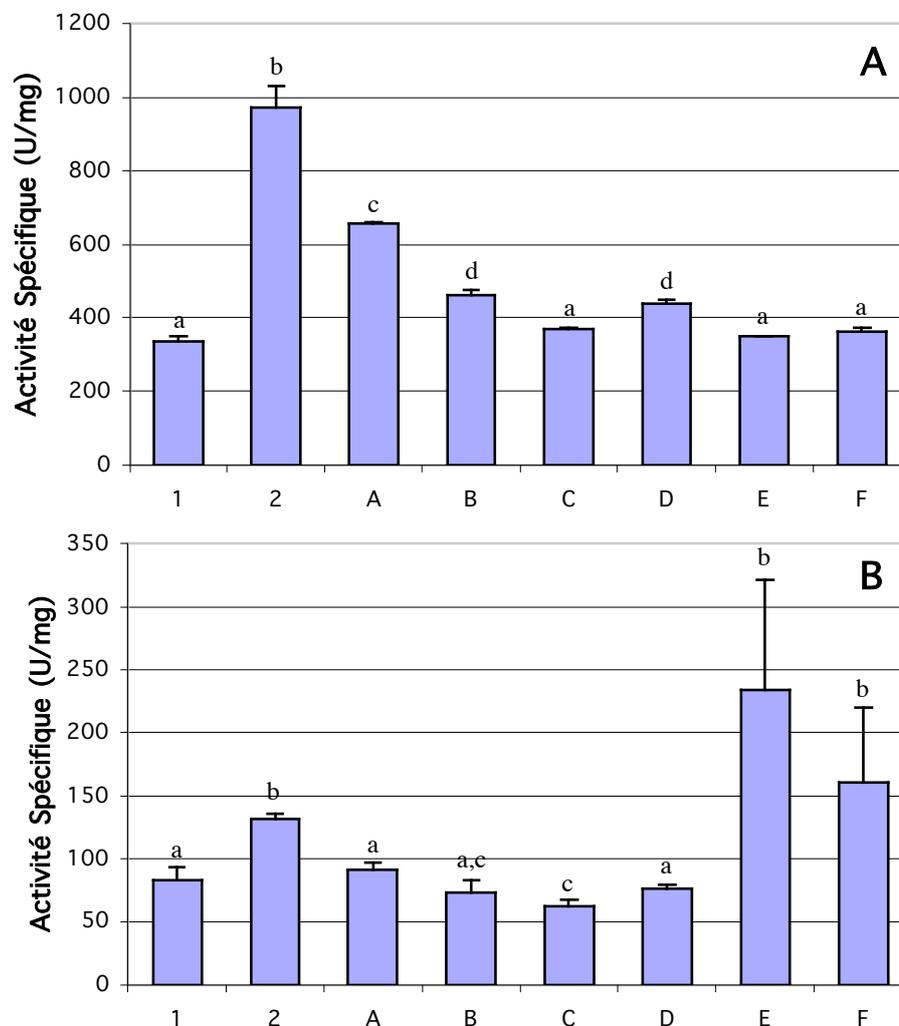
### **3.2.4. Étude de différents variants de la lipase stimulée par les sels biliaires**

Nous avons comparé l'activité enzymatique de différents variants de la BSSL fournis par l'équipe du Professeur Hernell: de la BSSL purifiée à partir de lait humain (BSSL 1, 2, C, D, E et F) et de la BSSL recombinante (BSSL A et B). Nous avons tout d'abord mesuré l'activité spécifique des différents échantillons de BSSL dans des conditions biochimiques, sur tributyrine et sur trioléine (Figure 64). Sur substrat à chaîne courte (tributyrine) (Figure 64A), les activités spécifiques (AS) obtenues varient très largement de 335 à 972 unités par milligramme de lipase. On peut classer les différents échantillons de BSSL en quatre groupes : une AS inférieure à 400 U/mg pour les BSSL 1, E, F et C, une AS comprise entre 400 et 600 U/mg pour les BSSL D et B, une AS comprise entre 600 et 800 U/mg pour la BSSL A, et une AS supérieure à 800 U/mg pour la BSSL 2. Sur substrat à chaîne longue (trioléine) (Figure 64B), on obtient des activités spécifiques plus faibles, variant de 63 à 235 U/mg. Les meilleures AS correspondent aux BSSL E, F et 2 (respectivement 235, 160 et 132 U/mg), tandis que les cinq autres lipases présentent des AS inférieures à 100 U/mg (comprises entre 63 et 91 U/mg). Si on exclut les BSSL E et F, dont le comportement par rapport aux autres lipases est très différent sur tributyrine et sur trioléine, on peut dire que le comportement relatif des différentes BSSL testées n'est pas modifié par la nature du substrat utilisé : on a un profil de variation des AS relativement conservé.

Afin de déterminer, ensuite, l'activité des différents échantillons de BSSL dans des conditions physiologiques, nous avons réalisé des tests de digestion avec deux émulsions de trioléine représentatives (PC P/O et LPI), en utilisant, comme d'habitude, deux concentrations

en sels biliaires (mélange de Jarvenpaa) permettant de reproduire les concentrations physiologiques d'insuffisance pancréatique ou normales (Figure 65).

**Figure 64:** Activité spécifique de différents échantillons de lipase stimulée par les sels biliaires dans des conditions biochimiques, sur substrat à chaîne courte (A) et longue (B) (moyenne  $\pm$  SEM; n=4).

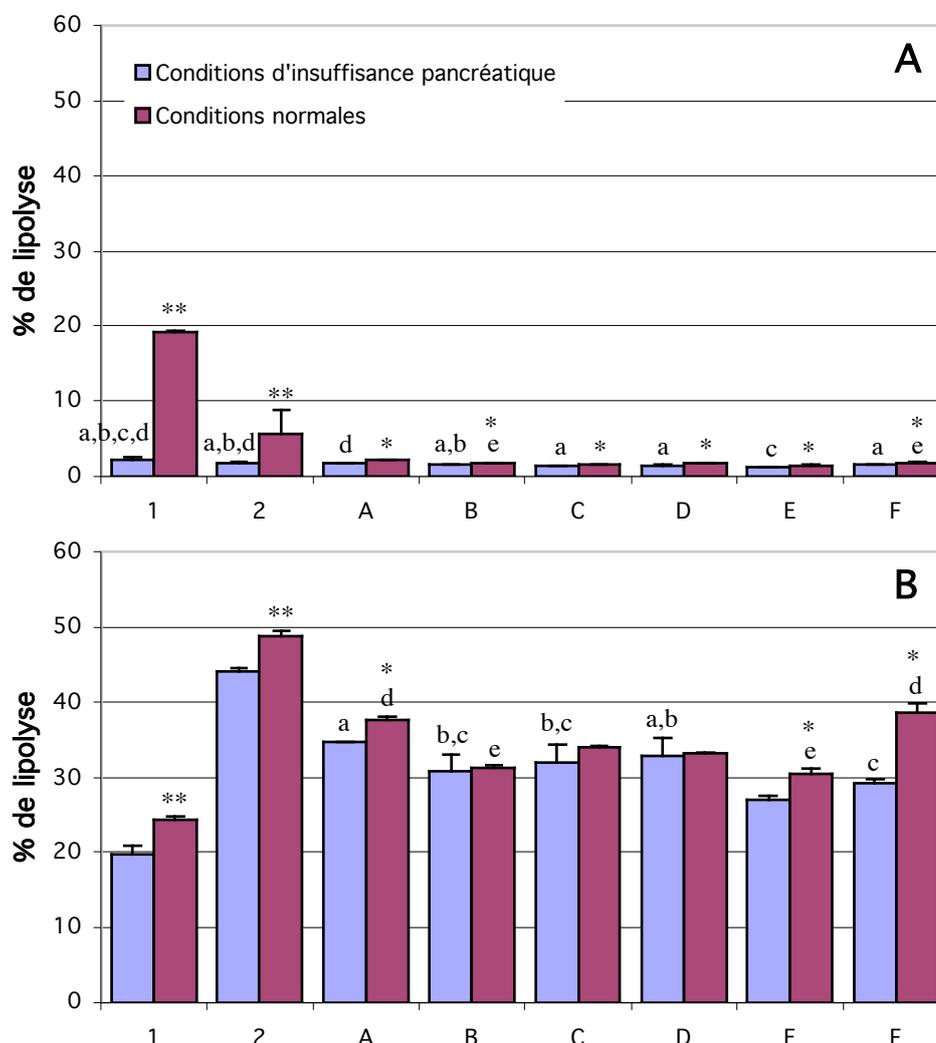


a, b, c, d: les valeurs indiquées par la même lettre ne sont pas significativement différentes.

Avec l'émulsion PC P/O (Figure 65A) et dans les conditions d'insuffisance pancréatique, on obtient de très faibles rendements de lipolyse quel que soit l'échantillon de BSSL utilisé (rendements de 1 à 2 %). Dans les conditions normales, on obtient des réponses variables selon l'échantillon de BSSL considéré, puisque seules les BSSL 1 et 2 permettent d'obtenir un rendement de lipolyse moins bas (de 19 et 6 % respectivement). Avec l'émulsion LPI (Figure 65B), les rendements de lipolyse obtenus sont plus élevés pour tous les échantillons de BSSL (rendements de 20 à 44 % dans les conditions d'insuffisance pancréatique et de 24 à 49 % dans les conditions normales). Les BSSL 1 et 2 se distinguent à nouveau des autres

échantillons. Cette fois, la BSSL 1 est la moins active (avec une diminution du rendement de lipolyse d'environ 37 % par rapport aux autres) et la BSSL 2 la plus active (avec une amélioration du rendement de lipolyse d'environ 49 % par rapport aux autres). L'augmentation de la concentration en sels biliaires entraîne une amélioration significative ( $p < 0,05$ ) du rendement de lipolyse pour les BSSL 1, 2, A, E et F (de 23, 10, 8, 13 et 32 % respectivement). Il apparaît enfin, que le profil de variation des rendements de lipolyse est assez proche du profil de variation des AS mesurées dans les conditions biochimiques.

**Figure 65:** Rendement de lipolyse intestinale des émulsions PC P/O (A) et LPI (B) par différents échantillons de lipase stimulée par les sels biliaires (moyenne  $\pm$  SEM);  $n=4$  sauf pour la BSSL 1 dans les conditions d'insuffisance pancréatique ( $n=10$  pour PC P/O et  $n=14$  pour LPI) et pour la BSSL 2 ( $n=6$ ).

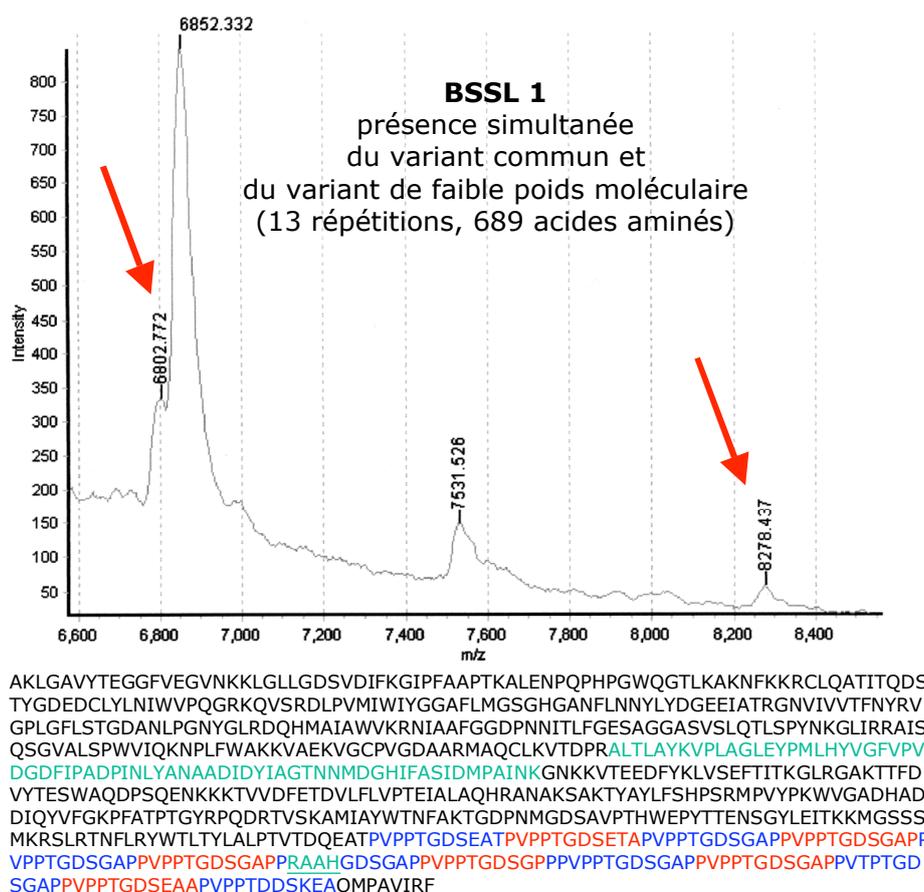


Les tests de digestion ont été réalisés avec le mélange de Jarvenpaa. a, b, c, d, e: les valeurs indiquées par la même lettre ne sont pas significativement différentes. Rendement de lipolyse significativement (\*) et très significativement (\*\*) différent de celui obtenu dans les conditions d'insuffisance pancréatique.



environ 6850 et 7550 Da, qui correspondent respectivement aux peptides 272-334 et 265-334 (en vert dans la séquence en acides aminés de la lipase). La partie C-terminale de l'enzyme (contenant les répétitions figurées en bleu et rouge dans la séquence) ne possède pas de site de clivage trypsique (ni lys, ni Arg). Elle est donc libérée après l'arginine 520 sous la forme d'un seul peptide d'environ 18600 Da, trop gros pour être repéré au spectromètre de masse.

**Figure 67:** Analyse des échantillons de BSSL 1 par spectrométrie de masse (ionisation positive et mode réflectron) après digestion enzymatique à la trypsine.



Les flèches rouges désignent les deux peptides issus de l'hydrolyse trypsique du domaine C-terminal du variant de faible masse moléculaire.

La digestion puis l'analyse de l'échantillon de BSSL 1 (Figure 67) permet également de voir les deux pics à 6850 et 7550 Da, mais elle fait apparaître deux pics supplémentaires (désignés par une flèche rouge) à 6800 et 8300 Da. Or, si on additionne ces deux masses, on retrouve la masse de la partie C-terminale du variant de faible masse moléculaire :

$$18600 \text{ (masse du C-ter du variant commun)} - 3 \times 1170 \text{ (masse moyenne d'une répétition)} = 15100.$$

L'existence des deux peptides supplémentaires est donc due à l'apparition d'un nouveau site de clivage trypsique au sein des répétitions C-terminales (en vert dans la séquence) du fait de

la mutation de la forme commune à la forme de faible masse moléculaire de la lipase (Lindquist *et al.*, 2002). L'échantillon de BSSL 1 contient ainsi à la fois le variant commun et le variant de faible masse, ce qui peut expliquer que son activité spécifique soit moins élevée que celle de l'échantillon de BSSL 2, qui ne contient que le variant commun. Les autres échantillons de BSSL contiennent peut-être aussi une proportion variable de la forme de faible masse moléculaire, avec pour conséquence une diminution plus ou moins importante de leur activité par rapport à l'échantillon 2.

### 3.2.5. Conclusion

Dans les conditions physiologiques normales (8 mM de sels biliaries), le type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion lipidique a peu d'impact sur l'activité de la lipase stimulée par les sels biliaries (comme pour la lipase pancréatique). Les rendements de lipolyse obtenus sont très faibles lorsque la source de sels biliaries utilisée est BVP (environ 1 %), mais ils sont beaucoup plus intéressants avec le mélange de Jarvenpaa (24 % en moyenne). La composition en sels biliaries de ce mélange correspond à celle trouvée chez le nouveau-né, et il est probablement logique qu'elle favorise l'action d'une lipase spécifiquement présente chez le nouveau-né (lorsqu'il est allaité). Par contre, dans les conditions physiologiques d'insuffisance pancréatique (2 mM de sels biliaries), l'action de la lipase stimulée par les sels biliaries est modulée par le type de phospholipide utilisé (toujours comme pour la lipase pancréatique). Avec la source de sels biliaries se rapprochant de la physiologie du nouveau-né (mélange de Jarvenpaa), les émulsions LPCO, LPI et PE DHA sont hydrolysées avec un rendement intéressant (variant de 19,6 à 21,3 %), tandis que les émulsions PC P/O, SM, LPCS et LPE ne sont pratiquement pas hydrolysées. Avec la source de sels biliaries se rapprochant de la physiologie de l'enfant et de l'adulte mucoviscidose (BVP), seule l'émulsion LPI est capable de stimuler l'activité de la lipase du lait (environ 13 % de rendement de lipolyse). L'effet du LPI est conservé en présence de lactose et de protéines de lait, par contre l'ajout de ces composés réduit de façon très marquée l'activité de la BSSL sur l'émulsion PC P/O dans les conditions où cette émulsion permettait pourtant d'obtenir un rendement optimal (conditions normales avec le mélange de Jarvenpaa). Le rendement de lipolyse intestinale par la lipase stimulée par les sels biliaries est également sous la dépendance d'un polymorphisme génétique. En effet, nous avons pu mettre en évidence, que l'activité de la BSSL, dans des conditions proches de la physiologie, dépendait du variant utilisé, la forme de faible masse moléculaire (13 répétitions C-terminales au lieu de 16) étant moins active que la forme commune de masse normale.

## 4. Étude de l'effet du type de phospholipide sur l'absorption intestinale des produits de lipolyse (Étude sur modèle cellulaire)

L'étude des phases gastrique et intestinale de la digestion d'émulsions de trioléine a permis de montrer, que le type de phospholipide utilisé pour stabiliser l'émulsion lipidique influence très fortement l'activité de la lipase gastrique, et notamment, dans les conditions d'insuffisance pancréatique, l'activité de la lipase pancréatique et de la lipase stimulée par les sels biliaires. Il était donc particulièrement intéressant de regarder ensuite, si le type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion lipidique influence également l'absorption intestinale des acides gras libérés au cours de la lipolyse. Nous avons utilisé pour cela des clones TC7 de cellules Caco-2 cultivées sur filtre et des particules contenant du PC P/O, du LPCO ou du LPI.

### 4.1. Caractérisation des particules utilisées

Les particules, de composition proche de celle des structures générées au cours de la lipolyse gastrique (73,7 % d'AG, 15,6 % de PL, 5 % de MG, 3,5 % de DG, 1,2 % de CL et 0,8 % de TG), ont été caractérisées par mesure de la granulométrie et du potentiel zêta (Tableau 10).

**Tableau 11:** Caractérisation des particules utilisées pour l'étude d'absorption intestinale des produits de lipolyse sur modèle cellulaire Caco-2 (moyenne  $\pm$  SEM; n=4).

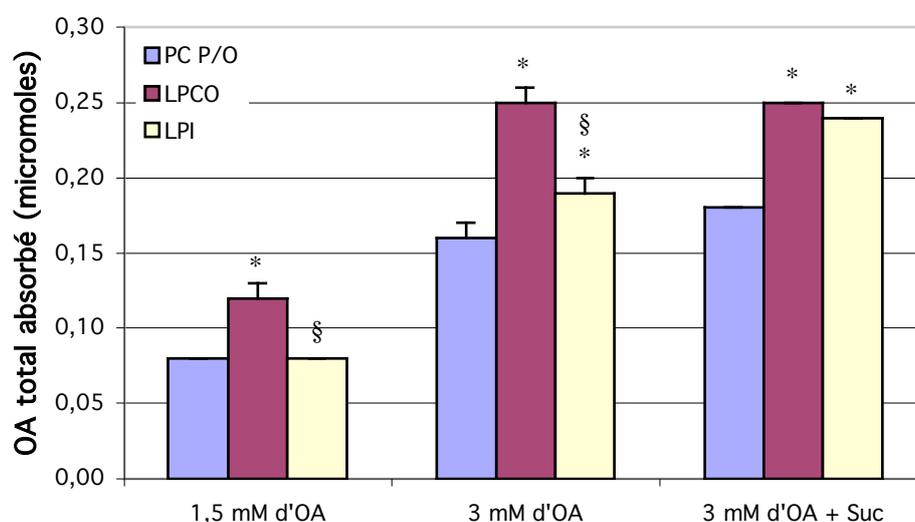
Type de particule	Granulométrie (nm)	Potentiel zêta (mV)
PC P/O	169 $\pm$ 17,56	- 82,7 $\pm$ 1,50
LPCO	200 $\pm$ 8,93	- 79,5 $\pm$ 1,65
LPI	198 $\pm$ 0,26	- 85,5 $\pm$ 1,70

Le diamètre des particules obtenues est d'environ 200 nm pour celles préparées avec les lysophospholipides (LPCO et LPI) et légèrement inférieur pour celles préparées avec PC P/O (169 nm). On peut noter en particulier que les particules LPI sont les plus homogènes, avec un écart standard à la moyenne inférieur à 0,15 % de la granulométrie mesurée. Concernant le potentiel électrocinétique, on obtient des structures chargées très négativement, de - 79,5 (LPCO) à - 85,5 (LPI) mV, les particules préparées avec LPI étant légèrement plus négatives que celles préparées avec de la phosphatidylcholine et la lysophosphatidylcholine.

## 4.2. Mesure de l'absorption intestinale des produits de lipolyse

Afin d'être proche des conditions physiologiques, nous avons utilisé une quantité de particules permettant d'apporter une concentration en acides gras proche de celle récupérée dans le milieu réactionnel après un test de digestion par la lipase gastrique dans le cas d'un rendement de lipolyse moyen (1,5 mM) ou élevé (3 mM). Du suc gastrique BAK en quantité physiologique, mais aucun sel biliaire, a aussi été ajouté dans une partie des puits (Figure 68).

**Figure 68:** Absorption cellulaire d'acide oléique (OA) apporté sous forme de particules par des cellules Caco-2 (moyenne  $\pm$  SEM; n=4).



Valeur significativement différente de celle obtenue avec l'émulsion PC P/O (\*) et de celle obtenue avec l'émulsion LPCO (§).

La quantité totale d'acide oléique absorbée par les cellules après une heure d'incubation varie très largement de 0,08 à 0,25  $\mu$ mol. À 1,5 mM d'acide oléique, les particules PC P/O et LPI permettent l'absorption de quantités équivalentes d'acides gras (0,08  $\mu$ mol), tandis que les particules LPCO permettent une amélioration significative de l'absorption de 50 % (0,12  $\mu$ mol). À 3 mM d'acide oléique, les quantités d'acides gras absorbées sont doublées pour les particules PC P/O et LPCO (0,16 et 0,25  $\mu$ mol respectivement). L'absorption de l'acide oléique apporté par les particules LPI est augmentée d'un facteur 2,4 lorsqu'on double la concentration initiale d'acide gras, ce qui se traduit par une absorption intermédiaire entre celles de PC P/O et LPCO. La présence supplémentaire de suc gastrique au niveau du milieu apical des cellules ne modifie pas la quantité d'acide oléique absorbée avec les particules LPCO (on reste à 0,25  $\mu$ mol). Par contre, elle permet d'augmenter l'absorption des acides

gras, légèrement avec les particules PC P/O (à 0,18  $\mu\text{mol}$ ), et de façon plus importante avec les particules LPI (on atteint 0,24  $\mu\text{mol}$ , soit autant qu'avec les particules LPCO). À 3 mM d'acide oléique et en présence de suc gastrique, LPCO et LPI permettent donc une amélioration significative (d'environ 36 %) de l'absorption obtenue avec les particules PC P/O. Cette étude préliminaire permet ainsi de constater, que le type de phospholipide influence également l'absorption des nutriments lipidiques. Celle-ci est maximale dans les conditions les plus proches de la physiologie et en présence de LPCO et LPI.

## DISCUSSION

La biodisponibilité des nutriments lipidiques, et des acides gras en particulier, dépend d'un processus physico-chimique et enzymatique complexe, comprenant l'émulsification des lipides dans l'estomac, l'hydrolyse enzymatique par les lipases gastrique et pancréatique, la solubilisation des produits d'hydrolyse pour permettre leur absorption par les entérocytes, et enfin, après resynthèse entérocytaire, le transport des nutriments lipidiques vers les différentes cellules utilisatrices de l'organisme. L'objectif de nombreux travaux de recherche a été de réduire ce processus. En effet, sa grande efficacité entraîne, en cas de pléthore lipidique, des désordres métaboliques graves (hyperlipidémies, obésité), pouvant déboucher sur des maladies cardiovasculaires, comme l'athérosclérose. La principale stratégie développée pour diminuer la biodisponibilité des nutriments lipidiques a été l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de l'activité catalytique des lipases gastrique et pancréatique (Weibel *et al.*, 1987, Hadvary *et al.*, 1988, Drent et Van der Veen, 1993). Par contre, peu d'études ont été consacrées à l'amélioration de ce processus, souvent altéré dans certains états physiologiques particuliers (nouveau-né, personne âgée) et dans diverses pathologies affectant le tractus digestif (mucoviscidose, pancréatite chronique, cholestase, maladie de Crohn). En effet, dans ces situations, les chercheurs se sont employés à corriger la malabsorption lipidique et la déficience en acides gras essentiels, soit en mettant au point des suppléments enzymatiques exogènes à base de lipase pancréatique associés ou non à des anti-acides (Keller et Layer, 2003) ou à base de lipase gastrique (Crabbe *et al.*, 1996, Gruber *et al.*, 2001), soit en augmentant l'apport alimentaire en triglycérides et/ou en acides gras essentiels (Minich *et al.*, 1997), soit en administrant des suppléments à base de sels biliaires pour favoriser l'absorption entérocytaire des acides gras (Minich *et al.*, 1997).

L'originalité de nos travaux a ainsi été de chercher à améliorer la biodisponibilité des acides gras en développant des stratégies pouvant permettre d'accroître l'activité des lipases. Étant donné, que l'hydrolyse enzymatique des lipides alimentaires se déroule au niveau d'une interface lipidique, il nous a paru judicieux de nous focaliser sur les caractéristiques physico-chimiques de cette interface. Deux propriétés de l'interface ont constitué en particulier des pistes à explorer et ont fondé notre hypothèse de départ. La première propriété était la taille des globules lipidiques ; en effet, de nombreux travaux menés au laboratoire ont montré que

la taille des globules lipidiques des émulsions avait un impact fort sur l'activité des lipases gastrique et pancréatique (Armand *et al.*, 1992b, Borel *et al.*, 1994a, Borel *et al.*, 1994b, Armand *et al.*, 1994, Armand *et al.*, 1996a, Armand *et al.*, 1999, Pafumi *et al.*, 2002). La seconde propriété était la structure des globules lipidiques (notamment l'organisation de la monocouche de surface) ; cette seconde propriété a été beaucoup moins étudiée, et repose en particulier sur l'observation que les triglycérides du lait maternel sont mieux hydrolysés que ceux d'un substitut de lait de composition lipidique comparable, du fait de l'ultrastructure particulière de ses globules lipidiques (Armand *et al.*, 1996b). Nous avons alors essayé de modifier la taille et la structure des globules lipidiques en utilisant différents types de phospholipides et acides gras libres.

Les résultats les plus originaux obtenus au cours de cette thèse mettent en évidence l'importance d'un phospholipide en particulier : le lysophosphatidylinositol. En effet, parmi tous les phospholipides testés, le lysophosphatidylinositol est le seul à augmenter de façon très importante le rendement de la lipolyse gastrique, et le seul à favoriser l'action de la lipase pancréatique et de la lipase stimulée par les sels biliaires dans les conditions d'insuffisance pancréatique. Ces résultats extrêmement intéressants nous ont conduit à rechercher les mécanismes pouvant expliquer un tel impact de ce phospholipide. En nous basant sur les données de la littérature, nous avons envisagé les quatre hypothèses suivantes :

- 1) L'effet du LPI pourrait être lié à son impact sur la granulométrie des émulsions lipidiques ;
- 2) L'effet du LPI pourrait être lié à son apport de charges électriques négatives à l'interface lipidique ;
- 3) L'effet du LPI pourrait être lié à son influence sur la compressibilité de l'interface lipidique ;
- 4) L'effet du LPI pourrait impliquer des interactions directes avec les différentes lipases digestives.

#### *Effet du lysophosphatidylinositol et granulométrie des émulsions lipidiques*

Nous avons tout d'abord considéré la taille des globules lipidiques de l'émulsion LPI. Leur diamètre médian est petit ( $0,60 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ) et le reste au cours du temps, même après 5 mois de conservation à  $+4^\circ\text{C}$ . La faible granulométrie obtenue avec le LPI peut être expliquée par la classification de Carey et Small (1970) : les phospholipides anioniques favorisent la formation de globules lipidiques de petite taille simplement parce qu'ils sont plus polaires que

les phospholipides zwitterioniques. D'autres auteurs rapportent d'ailleurs, que la phosphatidyléthanolamine (phospholipide neutre) ne serait pas un bon émulsifiant de la trioléine (Saito *et al.*, 1999). Or, la granulométrie d'une émulsion lipidique est un paramètre favorisant particulièrement l'activité des lipases gastrique et pancréatique, dans la mesure où il a été établi que l'activité lipolytique de ces enzymes était d'autant plus importante que la taille des globules lipidiques était petite (Armand *et al.*, 1999, Pafumi *et al.*, 2002). En effet, des globules lipidiques de petit diamètre offrent une surface d'interface lipidique plus grande, ce qui permet d'une part à davantage de molécules de lipase de s'y fixer, et d'autre part de retarder « l'inhibition » de l'activité de la lipase gastrique par les acides gras qu'elle libère. On pourrait donc penser que le LPI favorise l'activité des lipases digestives parce qu'il permet d'obtenir des globules lipidiques très stables et de petit diamètre.

Toutefois, l'étude de la granulométrie des différentes émulsions lipidiques testées, a montré que d'autres phospholipides, également anioniques, permettaient d'obtenir des globules de petit diamètre (l'acide phosphatidique, l'acide lysophosphatidique, le phosphatidylinositol, la phosphatidylsérine et la lysophosphatidylsérine) mais ne permettaient pas pour autant de stimuler l'activité des lipases digestives.

L'impact du LPI sur la granulométrie des émulsions lipidiques n'est donc pas un argument suffisant pour expliquer l'effet de ce phospholipide.

#### *Effet du lysophosphatidylinositol et charges électriques à la surface des globules lipidiques*

Nous avons ensuite considéré la nature des charges électriques à la surface des globules lipidiques. Nous avons observé, quel que soit le dispersant utilisé, que le LPI permettait d'obtenir une émulsion de potentiel zêta fortement négatif (-28 à -42 mV). Les autres émulsions présentant un potentiel zêta très négatif étaient celles contenant aussi un phospholipide anionique (émulsions LPS, PI et PS), et les moins négatives étaient celles contenant un groupement choline zwitterionique (émulsions CT, seule ou avec acide gras libre, PC et LPC). Cette observation s'explique tout naturellement par la localisation à l'interface lipidique des phospholipides, qui constituent de fait les principales charges électriques mesurables à la surface des globules. Il est à noter, que les émulsions LHO et LHS font partie des émulsions moyennement négatives, avec un potentiel zêta proche de celui du lait humain (-14 à -19 mV), probablement du fait d'une composition en phospholipides représentative de celle du lait humain. Nous avons donc émis l'hypothèse, que le LPI pouvait favoriser l'activité des lipases digestives en apportant des charges très négatives à l'interface lipidique.

Cependant, nous n'avons pas pu établir de corrélation entre le potentiel zêta des différentes émulsions testées et leur rendement de lipolyse gastrique. En revanche, en excluant les émulsions, dont les globules lipidiques sont très peu chargés, on observe quand même que l'activité de la lipase gastrique a tendance à être d'autant plus importante que le potentiel zêta est négatif. Une observation comparable a été mise en évidence précédemment pour la cholestérol estérase neutre des macrophages alvéolaires, dont l'activité est 1,5 à 3,8 fois plus élevée sur des liposomes émulsifiés par des phospholipides chargés négativement (phosphatidylsérine, acide phosphatidique, phosphatidylinositol) que par des phospholipides moins négatifs (phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et sphingomyéline) (Ishii *et al.*, 1995). Les auteurs de cette étude avancent, que la charge négative des phospholipides ayant un effet activateur favoriserait l'affinité de la lipase pour les liposomes, et donc les interactions entre l'enzyme et son substrat (Ishii *et al.*, 1995).

Si on peut envisager un tel mécanisme entre la lipase gastrique et l'émulsion LPI seule, il est difficile de s'en satisfaire en présence de lactose et de protéines de lait. En effet, dans ces conditions complexes, on obtient un rendement de lipolyse maximal de l'émulsion LPI (environ 35 %) mais un abaissement du potentiel zêta à des valeurs comprises entre -14 et -18 mV seulement. Il semble donc, que le potentiel électrocinétique, à l'instar de la granulométrie, ne puisse expliquer que partiellement l'effet activateur du LPI. On notera d'ailleurs, que ces deux paramètres semblent liés : les globules lipidiques ont tendance à être d'autant plus petits que leur potentiel zêta est négatif. Nous avons pu établir une corrélation entre la charge des globules lipidiques et leur diamètre moyen, avec un  $R^2$  de 0,387 ( $p < 0,0001$ ), qui augmente à 0,565 ( $p < 0,0001$ ) si on exclut les deux émulsions « grossières » LPE et SM. La présence de charges négatives à la surface des globules lipidiques semble jouer un rôle essentiel dans la prévention des phénomènes de fusion responsables d'une augmentation de la granulométrie. En effet, il a été montré que, la coalescence des globules lipidiques, liée à un traitement thermique de l'émulsion (stérilisation en autoclave à 121°C) ou à sa longue conservation (1 mois à 4°C, à température ambiante ou à 40°C), était inhibée par un potentiel électrocinétique fortement négatif (-39 mV en moyenne) obtenu en ajoutant de faibles quantités d'acide phosphatidique, de phosphatidylglycérol ou de phosphatidylinositol (Chansiri *et al.*, 1999). La taille et la charge électrique à la surface des globules lipidiques semblent intervenir aussi de façon complémentaire : la lipase fongique de *Thermomyces lanuginosa*, à titre d'exemple, n'est active que sur des liposomes de petit diamètre (40 nm) et anioniques (Cajal *et al.*, 2000).

*Effet du lysophosphatidylinositol et compressibilité de l'interface lipidique*

La technique des films monomoléculaires nous a permis d'établir que le LPI était un lipide particulièrement compressible (le plus compressible des différents phospholipides testés). Cette propriété pourrait permettre à la lipase gastrique de pénétrer facilement dans la monocouche phospholipidique de surface des globules lipidiques pour atteindre et hydrolyser les triglycérides localisés dans le cœur, selon un mécanisme proposé pour la lipase linguale (Hamosh, 1990). En effet, un lien a déjà été établi dans la littérature entre la compressibilité de l'interface lipidique et l'activité des lipases. Saito et collaborateurs ont montré que l'activité de la lipoprotéine lipase était inhibée par la présence de sphingomyéline, un phospholipide particulièrement « rigide » à cause des chaînes acyles saturées de sa base céramide (Saito *et al.*, 2000). L'organisation très condensée des chaînes acyles de la SM induit en effet la condensation de la tête polaire de la molécule et une réduction de son hydratation, qui seraient responsables d'une inhibition de la liaison de cette lipase à l'interface lipidique (Saito *et al.*, 2000). Selon un mécanisme dans lequel la lipoprotéine lipase s'adsorberait à l'interface sans pénétrer à l'intérieur de la monocouche, les interactions hydrophobes très fortes entre les chaînes acyles de la SM et celles des triglycérides seraient aussi responsables d'un ralentissement du transfert du substrat depuis la surface du globule vers la poche catalytique de l'enzyme (Saito *et al.*, 2000). Nous avons observé un résultat similaire avec la lipase gastrique. On peut supposer que des processus comparables interviennent dans l'inhibition de la lipolyse gastrique par la sphingomyéline, et de façon inverse dans l'activation de la lipolyse gastrique par le LPI.

La grande compressibilité du LPI pourrait s'expliquer par la forme moléculaire particulière des lysophospholipides. En effet, dans les membranes biologiques, les phospholipides ont approximativement une forme moléculaire cylindrique (l'aire de la section de la tête polaire est équivalente à celle du corps apolaire constitué par les chaînes acyles), tandis que les lysophospholipides ont une forme moléculaire conique, puisque l'aire de la section de leur tête polaire est plus importante que celle de leur unique chaîne acyle (Lundbaek et Andersen, 1994). Cette forme conique modifierait la courbure spontanée de la monocouche des globules lipidiques et abaisserait le coût énergétique de sa déformation (Lundbaek et Andersen, 1994).

Cependant, nos résultats ont démontré, que cette particularité de forme ne permettait pas à tous les lysophospholipides d'être plus compressibles et plus activateurs de la lipolyse gastrique que les phospholipides. En effet, d'une part, la réalisation de films monomoléculaires nous a permis d'observer que certains lysophospholipides étaient très

compressibles (LPCO et LPI) et d'autres pas (LPAo et LPAp). D'autre part, nos tests de digestion, nous ont permis de conclure que certains lysophospholipides amélioreraient le rendement de lipolyse gastrique par rapport à l'émulsion de référence CT (LPCO, LPCS et LPI) et d'autres pas (LPE et LPS). En outre, le rendement de lipolyse gastrique d'un lysophospholipide par rapport à son équivalent de forme phospholipide n'a été amélioré que pour deux groupements polaires : la choline et l'inositol. Il faut donc tenir compte du groupement spécifique porté par l'atome de phosphore, en particulier de son volume : 0,063 nm<sup>3</sup> pour l'éthanolamine, 0,087 nm<sup>3</sup> pour la sérine, 0,101 nm<sup>3</sup> pour la choline et 0,187 nm<sup>3</sup> pour l'inositol (Lundbaek et Andersen, 1994). On constate alors qu'une meilleure compressibilité et qu'un meilleur rendement de lipolyse sont associés aux deux lysophospholipides portant les groupements les plus volumineux : LPI et LPCO.

Nos résultats montrent également, qu'en plus d'être très compressible, le LPI présente une aire moléculaire incroyablement étendue : environ 180 Å<sup>2</sup>/molécule à 2 mN/m de pression. Ce lysophospholipide occupe ainsi avec son unique chaîne acyle une superficie aussi importante que le cardiolipide avec ses quatre chaînes (deux acides phosphatidiques estérifiés sur les deux fonctions alcool primaires de la même molécule de glycérol) (Nichols-Smith *et al.*, 2004). Le cardiolipide est une molécule fortement impliquée dans le maintien de la fluidité des membranes mitochondriales (Nichols-Smith *et al.*, 2004) ; on peut alors émettre l'hypothèse, d'après cette propriété du cardiolipide, que l'aire moléculaire importante du LPI lui permette d'augmenter la fluidité de l'interface lipidique des globules et de favoriser par ce mécanisme l'action des lipases digestives. Dans le cas particulier de la lipase gastrique, la forte compressibilité du LPI et son aire moléculaire particulièrement étendue nous ont aussi conduits à envisager que ces propriétés physico-chimiques pouvaient permettre de limiter le phénomène « d'inhibition » de la lipase gastrique par les acides gras qu'elle libère. En effet, ces deux propriétés pourraient permettre l'incorporation de davantage de molécules d'acides gras dans l'interface lipidique avant que l'augmentation de la pression de surface n'entraîne sa réorganisation par la formation de particules sphériques riches en acides gras entrainant la lipase gastrique (Pafumi *et al.*, 2002). Une étude cinétique des lipolyses obtenues en présence de LPI et de LPE (phospholipide non activateur) a été réalisée afin de tester cette hypothèse. Elle a montré que le tiers du rendement total était obtenu dès les 5 premières minutes de lipolyse avec les deux molécules lipidiques, et que le rendement de lipolyse de l'émulsion LPI était quatre fois plus important que celui de l'émulsion LPE à chaque temps mesuré. Les cinétiques d'hydrolyse étaient donc comparables. Le mécanisme d'action du LPI ne met donc

pas en jeu une limitation du phénomène « d'inhibition » par les acides gras générés au cours de la lipolyse.

#### *Interactions directes entre le lysophosphatidylinositol et les lipases gastrique et pancréatique*

Des travaux de Bernbäck et Bläckberg ont montré que le térapeptide N-terminal Leu-Phe-Gly-Lys de la lipase gastrique serait essentiel pour l'activité de l'enzyme sur son substrat émulsifié (Bernbäck et Bläckberg, 1989). Les auteurs suggèrent que le groupement  $\alpha\text{-NH}_3^+$  de la lysine 4 pourrait jouer un rôle similaire à celui présent dans le domaine N-terminal de la phospholipase A2 sécrétée. En effet, des études portant sur cette phospholipase indiquent que son groupement  $\alpha\text{-NH}_3^+$  N-terminal lui permet soit d'être maintenue dans une conformation optimale en établissant des liaisons hydrogènes avec des atomes internes, soit de se fixer à son substrat en interagissant directement avec les charges négatives à l'interface lipidique (Bernbäck et Bläckberg, 1989). L'implication d'une extrémité N-terminale hydrophobe dans la liaison d'une enzyme à son substrat a également été illustrée par une étude portant sur la lipase bactérienne de *Rhizopus oryzae* (Sayari *et al.*, 2005). Les auteurs ont comparé cette lipase (ROL32) avec sa forme tronquée au niveau N-terminal (ROL29), et ont montré, que la capacité de ROL29 à pénétrer dans un film monomoléculaire de lécithines d'œuf était diminuée du fait de la perte de son extrémité N-terminale hydrophobe (Sayari *et al.*, 2005).

Le térapeptide N-terminal de la lipase gastrique est très sensible à l'action de la trypsine du fait de la présence du site de clivage Lys4-Leu5. Nous avons pu le constater en donnant certains de nos échantillons de lipase gastrique purifiée à séquencer. Nous avons supposé que la dégradation du térapeptide N-terminal de la lipase gastrique s'était produite au cours des étapes successives de purification de l'enzyme. Cependant, l'analyse en spectrométrie de masse de la lipase de certains sucs gastriques immédiatement après électrophorèse a mis en évidence que l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique pouvait soit subir une dégradation dans le suc gastrique soit être sécrétée sous forme dégradée. La dégradation du térapeptide N-terminal de la lipase gastrique est donc une réalité physiologique, et les résultats que nous avons obtenus sur les sucs gastriques de trois patients différents laisse supposer une grande variabilité inter-individuelle dans le niveau de cette dégradation.

Concernant l'activité de la lipase gastrique, nos données confirment les observations de Bernbäck et Bläckberg. En effet, nous avons constaté que plusieurs de nos émulsions (notamment les émulsions CT et PC P/O) étaient moins bien hydrolysées par les lipases

gastriques dégradées (purifiées ou sous forme de sucs gastriques). En revanche, nos résultats montrent que l'état de dégradation de l'extrémité N-terminale de la lipase gastrique ne réduit pas l'hydrolyse des triglycérides de l'émulsion LPI. En présence d'une lipase intègre, le LPI permet d'obtenir le meilleur rendement de lipolyse gastrique. On peut alors supposer que le LPI active la lipolyse gastrique en interagissant fortement avec le N-terminal de la lipase. En effet, dans l'hypothèse où le groupement  $\alpha\text{-NH}_3^+$  du térapeptide N-terminal de la lipase gastrique interagirait directement avec les charges négatives de l'interface (Bernbäck et Bläckberg, 1989), le LPI offrirait davantage de charges négatives. En présence d'une lipase dégradée, le LPI permet une amélioration du rendement de lipolyse d'autant plus élevée que l'extrémité N-terminale est dégradée. On peut alors supposer que l'effet « restaurateur » du LPI mette en jeu au moins trois mécanismes possibles ; le LPI pourrait :

- interagir directement avec la lipase gastrique au niveau d'un site de fixation qui n'est pas son térapeptide N-terminal et qui reste à définir ;
- offrir une interface lipidique plus déformable ou plus amphipathique, mieux adaptée à une lipase dépourvue de son extrémité hydrophobe chargée positivement ;
- stabiliser la conformation active de la lipase gastrique, fragilisée par l'absence de son térapeptide N-terminal ; en effet, des travaux portant sur la citrate synthase ont montré que le LPI était capable de stimuler la renaturation de cette enzyme (après dénaturation à l'urée pendant 50 minutes) et de prévenir son agrégation à 42°C, jouant ainsi le rôle de molécule chaperonne (Kern *et al.*, 2001) ; on peut donc supposer que le LPI puisse aussi avoir cet effet vis-à-vis de la lipase gastrique.

Le rôle de molécule chaperonne du LPI pourrait également intervenir dans le cas de la lipase pancréatique. Nos résultats montrent que le type de phospholipide entrant dans la composition de nos émulsions de trioléine influence peu le rendement de lipolyse intestinale par la lipase pancréatique dans les conditions physiologiques normales (8 mM de sels biliaires, pH 7). En revanche, nous avons observé un meilleur rendement de lipolyse dans les conditions d'insuffisance pancréatique (2 mM de sels biliaires et pH 4 à 6) en présence de LPI. Sachant que l'abaissement de la concentration en sels biliaires dans le milieu se traduit par une augmentation de leur présence sous forme de monomères, qui gênent l'association entre la lipase et la colipase (le complexe ternaire lipase-colipase-sels biliaires se forme en effet en présence de micelles de sels biliaires) (Lykidis *et al.*, 1997), on peut penser que le LPI peut intervenir en stabilisant la conformation active de la lipase pancréatique à la place des micelles de sels biliaires.

Un second élément doit être pris en compte pour comprendre l'influence des conditions normales ou d'insuffisance pancréatique sur la manifestation de l'effet activateur du LPI. Nous avons apporté les sels biliaires sous forme de bile vésiculaire de porc. Cette source apportait donc également une quantité importante de phospholipides biliaires. En effet, leur concentration dans le milieu réactionnel était environ 7 fois plus importante que celle des phospholipides apportés par l'émulsion. Les phospholipides biliaires pourraient donc être responsables d'une « dilution » de l'effet du LPI en phase intestinale dans les conditions physiologiques normales. Dans les conditions reproduisant l'insuffisance pancréatique (2 mM de sels biliaires), le rapport entre les phospholipides biliaires et les phospholipides apportés par l'émulsion se trouve abaissé de 7/1 à presque 2/1, ce qui se traduit par l'apparition de l'effet activateur du LPI. Un effet dose du LPI est donc à rechercher pour améliorer davantage la lipolyse intestinale par la lipase pancréatique. Nous avons d'ailleurs mis en évidence un tel effet pour la lipase gastrique, la lipolyse gastrique se déroulant dans un milieu dépourvu d'autre phospholipides que ceux apportés par l'émulsion.

#### *Interactions directes entre le lysophosphatidylinositol et la lipase stimulée par les sels biliaires*

Nos travaux ont montré que le LPI permettait de stimuler l'activité de la lipase stimulée par les sels biliaires dans les conditions mimant l'insuffisance pancréatique, mais pas dans les conditions normales. Par analogie avec la lipase pancréatique, on peut envisager que l'effet du LPI soit aussi « dilué » par la présence des phospholipides biliaires. La comparaison des trois sources de sels biliaires utilisées pour nos tests de digestion par la BSSL apporte un élément de réponse. En présence de bile vésiculaire de porc (apport de phospholipides et de sels biliaires), l'effet activateur du LPI ne se manifeste qu'à 2 mM de sels biliaires. En présence du mélange de Jarvenpaa (apport de sels biliaires seulement) et de bile hépatique humaine (apport de phospholipides et des mêmes types de sels biliaires que ceux apportés par le mélange de Jarvenpaa), l'effet activateur du LPI se manifeste quelle que soit la concentration en sels biliaires, et l'on obtient des rendements de lipolyse proches. Il ne semble donc pas y avoir de « dilution » de l'effet du LPI par les phospholipides biliaires dans le cas de la BSSL. La manifestation de l'effet du LPI avec cette lipase semble plutôt conditionnée fortement par la nature des sels biliaires présents dans le milieu.

Lorsqu'il se manifeste, l'effet activateur du LPI pourrait mettre en jeu au moins deux domaines de la BSSL. Le premier domaine potentiellement impliqué pourrait être une région cationique localisée dans le domaine N-terminal de l'enzyme, incluant les lysines 56, 61 et 62

et surtout l'arginine 63 (région supposée remplir la fonction de site de liaison à l'héparine) (Aubert *et al.*, 2002). En effet, cette région semblerait capable, grâce à ses charges positives, d'interagir plus fortement avec des micelles de phospholipides anioniques (phosphatidylsérine, phosphatidylinositol et acide phosphatidique) que zwitterioniques (phosphatidylcholine), induisant une augmentation significative de l'activité de la lipase sur substrat soluble (4-nitrophényl hexanoate) (Aubert *et al.*, 2002). Il a également été montré, que le remplacement de l'arginine 63 par une alanine inhibait presque entièrement l'activité de l'enzyme sur des esters de cholestérol émulsifiés, mais ne diminuait en aucun cas son activité (indépendante des sels biliaires) sur des lysophosphatidylcholines en solution (Liang *et al.*, 2000). Les mesures d'adsorption de cette lipase mutée sur un film monomoléculaire de 1,2-dioléine ont montré de plus, que la pression de surface n'était pas modifiée, mais que la quantité de lipase adsorbée était diminuée de 5 à 8 fois par rapport à la lipase native, ce que les auteurs ont imputé à un relâchement de la conformation de la protéine par dénaturation (Liang *et al.*, 2000). La mutation de l'arginine 63 semble donc affecter la liaison de la lipase stimulée par les sels biliaires à son substrat lipidique émulsifié, soit en diminuant les charges positives nécessaires pour permettre l'interaction de l'enzyme avec les micelles chargées négativement, soit en créant une sensibilité accrue de la lipase à la dénaturation interfaciale (Liang *et al.*, 2000). Le LPI pourrait donc accroître l'adsorption de la BSSL à l'interface par le biais de cette région cationique, en augmentant les charges négatives à la surface des globules et/ou en prévenant sa dénaturation (rôle de protéine chaperonne, que nous avons évoqué précédemment pour les lipases gastrique et pancréatique).

Le second domaine de la BSSL potentiellement impliqué dans l'activation par le LPI pourrait être constitué par les acides aminés 361 à 393. En effet, cette région présente de grandes similitudes avec le domaine liant les sphingolipides (Sphingolipid Binding Domain) de la protéine gp120 du virus du sida (Aubert-Jousset *et al.*, 2004). La lipase utiliserait, grâce à ce domaine, les sphingolipides des rafts lipidiques membranaires lors de son processus de sécrétion (Aubert-Jousset *et al.*, 2004), et l'on peut envisager que ce domaine puisse aussi lui permettre de s'adsorber sélectivement sur la monocouche de surface des globules lipidiques. Il est à noter, que ce domaine liant les sphingolipides n'interagit pas avec la sphingomyéline (Aubert-Jousset *et al.*, 2004).

Les différents types d'expérimentations menés pour tenter d'élucider les mécanismes impliqués dans l'amélioration du rendement des lipolyses gastrique et intestinale par le

lysophosphatidylinositol montrent qu'il est le seul parmi les nombreux phospholipides testés à réunir simultanément cinq propriétés spécifiques. En effet, le LPI 1) permet d'obtenir une émulsion très fine (granulométrie inférieure à 1  $\mu\text{m}$ ), 2) est chargé très négativement du fait de son groupement inositol, 3) est un lyso-phospholipide, 4) est très compressible et 5) possède une aire moléculaire étonnamment étendue (en partie du fait de son groupement inositol en ce qui concerne ces deux dernières propriétés).

L'association de ces cinq caractéristiques, parfois inter-dépendantes et dont l'importance relative reste à établir, semble permettre au LPI d'offrir aux lipases digestives une interface lipidique optimale, permettant d'obtenir un rendement de lipolyse maximal. Notre étude préliminaire sur modèle cellulaire nous a de plus permis de nous assurer que le LPI, qui favorise la digestion des triglycérides d'un côté, n'était pas un élément limitant l'absorption des acides gras libérés de l'autre.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**

En conclusion, nos travaux apportent une meilleure compréhension des aspects physico-chimiques et enzymatiques de la digestion des lipides, et éclairent en particulier les rôles respectifs et les mécanismes d'action de la lipase gastrique, du système lipase/colipase pancréatique et de la lipase stimulée par les sels biliaires, dans un contexte se rapprochant davantage de la physiologie que des conditions biochimiques classiquement utilisées pour tester l'activité de ces enzymes. Nos travaux ont également et surtout permis de mettre en évidence une stratégie originale permettant d'améliorer la biodisponibilité des nutriments lipidiques chez l'insuffisant pancréatique, en utilisant les propriétés physico-chimiques des lipides. En effet, nous montrons pour la première fois, que le type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion de trioléine ou l'ajout d'un type donné d'acide gras libre dans le mélange lipidique avant l'émulsification modifie la taille et le potentiel électrocinétique des globules lipidiques, influence l'action des lipases gastrique, pancréatique et stimulée par les sels biliaires, et module l'absorption des acides gras par des cellules Caco2. Nos résultats démontrent en particulier, que le lysophosphatidylinositol permet d'obtenir une amélioration très importante des rendements de lipolyse gastriques et intestinaux. Les caractéristiques spécifiques de ce lipide (présence d'un groupement inositol anionique, forme lysophospholipide, aire moléculaire étonnamment étendue et forte compressibilité) lui permettent d'offrir aux lipases une interface lipidique probablement optimale en termes de surface, de charge et d'accessibilité et lui permettent aussi vraisemblablement d'interagir directement avec certains domaines spécialisés des enzymes lipolytiques.

Ces résultats présentent un fort potentiel de valorisation dans le domaine de la santé publique et ont fait l'objet d'un dépôt de brevet. En effet, à moyen terme, les données obtenues seront exploitables dans le cadre de la Nutrition Artificielle, avec la mise au point d'émulsions entérales de biodisponibilité maximale pour les sujets présentant une insuffisance pancréatique, et/ou dans le cadre de l'Agroalimentaire, avec l'élaboration de préparations destinées à l'alimentation particulière des nouveaux-nés et des personnes âgées. Nous devons pour cela assurer la fabrication d'émulsions prototypes contenant une quantité à déterminer de lysophosphatidylinositol et mettre en place des études cliniques de supplémentation nutritionnelle chez les sujets nécessitant une amélioration de la biodisponibilité des acides gras ingérés.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abia R**, Pacheco YM, Montero E, Ruiz-Gutierrez V and Muriana FJ. Distribution of fatty acids from dietary oils into phospholipid classes of triacylglycerol-rich lipoproteins in healthy subjects, *Life Sci*, 2003, 72, 1643-1654.
- Abouakil N**, Mas E, Bruneau N, Benajiba A and Lombardo D. Bile salt-dependent lipase biosynthesis in rat pancreatic AR 4-2 J cells. Essential requirement of N-linked oligosaccharide for secretion and expression of a fully active enzyme, *J Biol Chem*, 1993, 268, 25755-25763.
- Abrams CK**, Hamosh M, Van Hubbard S, Dutta SK and Hamosh P. Lingual lipase in cystic fibrosis. Quantification of enzyme activity in the upper small intestine of patients with exocrine pancreatic insufficiency, *J Clin Invest*, 1984, 73, 374-382.
- Abrams CK**, Hamosh M, Lee TC, Ansher AF, Collen MJ, Lewis JH, Benjamin SB and Hamosh P. Gastric lipase: localization in the human stomach, *Gastroenterology*, 1988, 95, 1460-1464.
- Anderson RA and Sando GN**. Cloning and expression of cDNA encoding human lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase. Similarities to gastric and lingual lipases, *J Biol Chem*, 1991, 266, 22479-22484.
- Aoubala M**, Bonicel J, Benicourt C, Verger R and De Caro A. Tryptic cleavage of gastric lipases: location of the single disulfide bridge, *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1213, 319-324.
- Armand M**, Borel P, Rolland PH, Senft M, Andre M, Lafont H and Lairon D. Adaptation of gastric lipase in mini-pigs fed a high fat diet, *Nutr Res*, 1992a, 12, 489-499.
- Armand M**, Borel P, Ythier P, Dutot G, Melin C, Senft M, Lafont H and Lairon D. Effects of droplet size, triacylglycerol composition, and calcium on the hydrolysis of complex emulsions by pancreatic lipase: an in vitro study, *J Nutr Biochem*, 1992b, 3, 333-341.
- Armand M**, Borel P, Dubois C, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Lafont H and Lairon D. Characterization of emulsions and lipolysis of dietary lipids in the human stomach, *Am J Physiol*, 1994, 266, G372-381.
- Armand M**, Hamosh M, DiPalma JS, Gallagher J, Benjamin SB, Philpott JR, Lairon D and Hamosh P. Dietary fat modulates gastric lipase activity in healthy humans, *Am J Clin Nutr*, 1995, 62, 74-80.

- Armand M**, Borel P, Pasquier B, Dubois C, Senft M, Andre M, Peyrot J, Salducci J and Lairon D. Physicochemical characteristics of emulsions during fat digestion in human stomach and duodenum, *Am J Physiol*, 1996a, 271, G172-183.
- Armand M**, Hamosh M, Mehta NR, Angelus PA, Philpott JR, Henderson TR, Dwyer NK, Lairon D and Hamosh P. Effect of human milk or formula on gastric function and fat digestion in the premature infant, *Pediatr Res*, 1996b, 40, 429-437.
- Armand M**. Propriétés physicochimiques des émulsions lipidiques : effets sur la digestion et l'assimilation des lipides, *Cah Nutr Diét*, 1998, 33, 305-311.
- Armand M**, Pasquier B, André M, Borel P, Senft M, Peyrot J, Salducci J, Portugal H, Jaussan V and Lairon D. Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract, *Am J Clin Nutr*, 1999, 70(6), 1096-1106.
- Armand M**, Giardi C, Arimondo A, Gaget JY and Coste TC. Caractéristiques physicochimiques du lait de jument et intérêt en nutrition infantile, *Nutr Clin Métabol*, 2002, 16, P50, 41S, JFN.
- Armand M**, Hamosh M, Philpott JR, Resnik KA, Rosenstein BJ, Hamosh A, Perman JA and Hamosh P. Gastric function in children with cystic fibrosis: effect of diet on gastric lipase levels and fat digestion, *Pediatr Res*, 2004, 55, 457-465.
- Aubert E**, Sbarra V, Le Petit-Thevenin J, Valette A and Lombardo D. Site-directed mutagenesis of the basic N-terminal cluster of pancreatic bile salt-dependent lipase. Functional significance, *J Biol Chem*, 2002, 277, 34987-34996.
- Aubert-Jousset E**, Garmy N, Sbarra V, Fantini J, Sadoulet MO and Lombardo D. The combinatorial extension method reveals a sphingolipid binding domain on pancreatic bile salt-dependent lipase: role in secretion, *Structure*, 2004, 12, 1437-1447.
- Baba T**, Downs D, Jackson KW, Tang J and Wang CS. Structure of human milk bile salt activated lipase, *Biochemistry*, 1991, 30, 500-510.
- Barnes LA**, Morrow G 3rd, Silverio J, Finnegan LP and Heitman SE. Calcium and fat absorption from infant formulas with different fat blends, *Pediatrics*, 1974, 54, 217-221.
- Belfrage P and Vaughan M**. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides, *J Lipid Res*, 1969, 10, 341-344.
- Bell SJ**, Bradley D, Forse RA and Bistrrian BR. The new dietary fats in health and disease, *J Am Diet Assoc*, 1997, 97, 280-286.
- Benzonana G and Desnuelle P**. Étude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène, *Biochim Biophys Acta*, 1965, 105, 121-136.

- Bernbäck S and Bläckberg L.** Human gastric lipase. The N-terminal tetrapeptide is essential for lipid binding and lipase activity, *Eur J Biochem*, 1989, 182, 495-499.
- Bernbäck S, Bläckberg L and Hernell O.** The complete digestion of human milk triacylglycerol in vitro requires gastric lipase, pancreatic colipase-dependent lipase, and bile salt-stimulated lipase, *J Clin Invest*, 1990, 85, 1221-1226.
- Bernoud N, Fenart L, Moliere P, Dehouck MP, Lagarde M, Cecchelli R and Lecerf J.** Preferential transfer of 2-docosahexaenoyl-1-lysophosphatidylcholine through an in vitro blood-brain barrier over unesterified docosahexaenoic acid, *J Neurochem*, 1999, 72, 338-345.
- Birch EE, Birch DG, Hoffman DR and Uauy R.** Dietary essential fatty acid supply and visual acuity development, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992, 33, 3242-3253.
- Bitman J and Wood DL.** Quantitative densitometry in situ of lipids separated by thin layer chromatography, *J Liq Chromatogr*, 1981, 4, 1023-1034.
- Bläckberg L and Hernell O.** The bile-salt-stimulated lipase in human milk. Purification and characterization, *Eur J Biochem*, 1981, 116, 221-225.
- Bläckberg L, Angquist KA and Hernell O.** Bile-salt-stimulated lipase in human milk. Evidence for its synthesis in the lactating mammary gland, *FEBS Lett*, 1987, 217, 37-41.
- Bläckberg L and Hernell O.** Bile salt-stimulated lipase in human milk. Evidence that bile salt induces lipid binding and activation via binding to different sites, *FEBS Lett*, 1993, 323, 207-210.
- Bodmer MW, Angal S, Yarranton GT, Harris TJ, Lyons A, King DJ, Pieroni G, Riviere C, Verger R and Lowe PA.** Molecular cloning of a human gastric lipase and expression of the enzyme in yeast, *Biochim Biophys Acta*, 1987, 909, 237-244.
- Borel P, Lairon D, Senft M, Chautan M and Lafont H.** Wheat bran and wheat germ: effect on digestion and intestinal absorption of dietary lipids in the rat, *Am J Clin Nutr*, 1989, 49, 1192-1202.
- Borel P, Armand M, Senft M, André M, Lafont H and Lairon D.** Gastric lipase: evidence of an adaptative response to dietary fat in the rabbit, *Gastroenterology*, 1991, 100, 1582-1589.
- Borel P, Armand M, Ythier P, Dutot G, Melin C, Senft M, Lafont H and Lairon D.** Hydrolysis of emulsions with different triglycerides and droplet sizes by gastric lipase in vitro. Effect on pancreatic lipase activity, *J Nutr Biochem*, 1994a, 5, 124-133.
- Borel P, Armand M, Pasquier B, Senft M, Dutot G, Melin C, Lafont H and Lairon D.** Digestion and absorption of tube feeding emulsions with different droplet sizes and compositions in the rat, *J Parent Ent Nutr*, 1994b, 18, 534-543.

- Borel P**, Grolier P, Armand M, Partier A, Lafont H, Lairon D and Azais-Braesco V. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets, *J Lipid Res*, 1996, 37, 250-261.
- Borgström B and Erlanson C**. Pancreatic juice co-lipase: physiological importance, *Biochim Biophys Acta*, 1971, 242, 509-513.
- Borgström B and Erlanson C**. Pancreatic lipase and co-lipase. Interactions and effects of bile salts and other detergents, *Eur J Biochem*, 1973, 37, 60-68.
- Borgström B**. Importance of phospholipids, pancreatic phospholipase A2, and fatty acid for the digestion of dietary fat: in vitro experiments with the porcine enzymes, *Gastroenterology*, 1980, 78, 954-962.
- Borovicka J**, Schwizer W, Mettraux C, Kreiss C, Remy B, Asal K, Jansen JB, Douchet I, Verger R and Fried M. Regulation of gastric and pancreatic lipase secretion by CCK and cholinergic mechanisms in humans, *Am J Physiol*, 1997, 273, G374-380.
- Borowitz D**, Goss CH, Stevens C, Hayes D, Newman L, O'Rourke A, Konstan MW, Wagener J, Moss R, Hendeles L, Orenstein D, Ahrens R, Oermann CM, Aitken ML, Mahl TC, Young KR Jr, Dunitz J and Murray FT. Safety and preliminary clinical activity of a novel pancreatic enzyme preparation in pancreatic insufficient cystic fibrosis patients, *Pancreas*, 2006, 32, 258-263.
- Bourre JM**, Francois M, Youyou A, Dumont O, Piciotti M, Pascal G and Durand G. The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats, *J Nutr*, 1989, 119, 880-892.
- Bottino NR**, Vanderburg G and Reiser R. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis, *Lipids*, 1967, 2, 489-493.
- Bracco U**. Effect of triglyceride structure on fat absorption, *Am J Clin Nutr*, 1994, 60, 1002S-1009S.
- Brockerhoff H**. Substrate specificity of pancreatic lipase. Influence of the structure of fatty acids on the reactivity of esters, *Biochim Biophys Acta*, 1970, 212, 92-101.
- Brockerhoff H and Jensen RG**. In : *Lipolytic enzymes*, Academic Press Inc., New York, 1974.
- Brockman HL**. General features of lipolysis : reaction scheme, interfacial structure and experimental approaches. In : *Lipases*, Borgstrom B and Brockman HL (eds.), Elsevier, 1984, pp 3-46.

- Brossard N**, Croset M, Lecerf J, Pachiaudi C, Normand S, Chirouze V, Macovschi O, Riou JP, Tayot JL and Lagarde M. Metabolic fate of an oral tracer dose of [<sup>13</sup>C]docosahexaenoic acid triglycerides in the rat, *Am J Physiol*, 1996, 270, R846-R854.
- Bruneau N**, Nganga A, Fisher EA and Lombardo D. O-Glycosylation of C-terminal tandem-repeated sequences regulates the secretion of rat pancreatic bile salt-dependent lipase, *J Biol Chem*, 1997, 272, 27353-27361.
- Burnette WN**. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal Biochem*, 1981, 112, 195-203.
- Cajal Y**, Svendsen A, Girona V, Patkar SA and Alsina MA. Interfacial control of lid opening in *Thermomyces lanuginosa* lipase. *Biochemistry*, 2000, 39, 413-423.
- Cansell M**, Nacka F and Combe N. Marine lipid-based liposomes increase in vivo FA bioavailability, *Lipids*, 2003, 38, 551-559.
- Carey MC and Small DC**. The characteristics of mixed micellar solutions with particular reference to bile, *Am J Med*, 1970, 49, 590-608.
- Carey MC**, Small DM and Bliss CM. Lipid digestion and absorption, *Ann Rev Physiol*, 1983, 45, 651-677.
- Carlson SE**. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid in infant development, *Semin Neonatol*, 2001, 6, 437-449.
- Carnielli VP**, Verlato G, Pederzini F, Luijendijk I, Boerlage A, Pedrotti D and Sauer PJ. Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula, *Am J Clin Nutr*, 1998, 67, 97-103.
- Carrere J**, Figarella-Branger D, Senegas-Balas F, Figarella C and Guy-Crotte O. Immunohistochemical study of secretory proteins in the developing human exocrine pancreas, *Differentiation*, 1992, 51, 55-60.
- Carrie I**, Clement M, de Javel D, Frances H and Bourre JM. Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation, *J Lipid Res*, 2000, 41, 465-472.
- Carriere F**, Raphel V, Moreau H, Bernadac A, Devaux MA, Grimaud R, Barrowman JA, Bénicourt C, Junien J-L, Laugier R and Verger R. Dog gastric lipase: stimulation of its secretion in vivo and cytolocalization in mucous pit cells, *Gastroenterology*, 1992, 102, 1535-1545.

- Carriere F**, Barrowman JA, Verger R and Laugier R. Secretion and contribution to lipolysis of gastric and pancreatic lipases during a test meal in humans, *Gastroenterology*, 1993, 105, 876-888.
- Carriere F**, Renou C, Lopez V, De Caro J, Ferrato F, Lengsfeld H, De Caro A, Laugier R and Verger R. The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals, *Gastroenterology*, 2000, 119, 949-960.
- Carriere F**, Grandval P, Gregory PC, Renou C, Henniges F, Sander-Struckmeier S and Laugier R. Does the pancreas really produce much more lipase than required for fat digestion? *JOP*, 2005, 6, 206-215.
- Cash T**. Uber den anteil des magens und pankreas an der verdauung des fettes, *Arch Anat Physiol Phys Abt*, 1880, 323.
- Cavalier JF**, Buono G and Verger R. Covalent inhibition of digestive lipases by chiral phosphonates, *Acc Chem Res*, 2000, 33, 579-589.
- Cawood AL**, Carroll MP, Wootton SA and Calder PC. Is there a case for n-3 fatty acid supplementation in cystic fibrosis? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2005, 8, 153-159.
- Chahinian H**, Bezzine S, Ferrato F, Ivanova MG, Perez B, Lowe ME and Carriere F. The beta 5' loop of the pancreatic lipase C2-like domain plays a critical role in the lipase-lipid interactions, *Biochemistry*, 2002, 41, 13725-13735.
- Chansiri G**, Lyons RT, Patel MV and Hem SL. Effect of surface charge on the stability of oil/water emulsions during steam sterilization, *J Pharm Sci*, 1999, 88, 454-458.
- Chappell JE**, Clandinin MT, Kearney-Volpe C, Reichman B and Swyer PW. Fatty acid balance studies in premature infants fed human milk or formula: effect of calcium supplementation, *J Pediatr*, 1986, 108, 439-447.
- Chapus C**, Sari H, Semeriva M and Desnuelle P. Role of colipase in the interfacial adsorption of pancreatic lipase at hydrophilic interfaces, *FEBS Lett*, 1975, 58, 155-158.
- Christensen MS**, Hoy CE and Redgrave TG. Lymphatic absorption of n-3 polyunsaturated fatty acids from marine oils with different intramolecular fatty acid distributions, *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1215, 198-204.
- Christensen MS**, Hoy CE, Becker CC and Redgrave TG. Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure, *Am J Clin Nutr*, 1995a, 61, 56-61.
- Christensen MS**, Mullertz A and Hoy CE. Absorption of triglycerides with defined or random structure by rats with biliary and pancreatic diversion, *Lipids*, 1995b, 30, 521-526.

- Cohen M**, Morgan RG and Hofmann AF. Lipolytic activity of human gastric and duodenal juice against medium and long chain triglycerides, *Gastroenterology*, 1971, 60, 1-15.
- Corsico B**, Liou HL and Storch J. The alpha-helical domain of liver fatty acid binding protein is responsible for the diffusion-mediated transfer of fatty acids to phospholipid membranes, *Biochemistry*, 2004, 43, 3600-3607.
- Crabbe T**, Weir AN, Walton EF, Brown ME, Sutton CW, Tretout N, Bonnerjea J, Lowe PA and Yarranton GT. The secretion of active recombinant human gastric lipase by *Saccharomyces cerevisiae*, *Protein Expr Purif*, 1996, 7, 229-236.
- Crandall WV and Lowe ME**. Colipase residues Glu64 and Arg65 are essential for normal lipase-mediated fat digestion in the presence of bile salt micelles, *J Biol Chem*, 2001, 276, 12505-12512.
- Cynober L**, Alix E, Arnaud-Battandier F, Bonnefoy M, Brocker P, Cals MJ, Coplo C, Ferry M, Ghisolfi-Marque A, Lesourd B, Mignot C et Patureau-Mirand P. Personnes âgées, Dans : *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*, Martin A (coord.), Éditions Tec & Doc, Paris, 2001, pp 307-335.
- De Caro A**, Figarella C, Amic J, Michel R et Guy O. Human pancreatic lipase : a glycoprotein, *Biochim Biophys Acta*, 1977, 490, 411-419.
- Delchier JC**, Vidon N, Saint-Marc Girardin MF, Soule JC, Moulin C, Huchet B and Zylberberg P. Fate of orally ingested enzymes in pancreatic insufficiency: comparison of two pancreatic enzyme preparations, *Aliment Pharmacol Ther*, 1991, 5, 365-378.
- DeNigris SJ**, Hamosh M, Kasbekar DK, Fink CS, Lee TC and Hamosh P. Secretion of human gastric lipase from dispersed gastric glands, *Biochim Biophys Acta*, 1985, 836, 67-72.
- DeNigris SJ**, Hamosh M, Kasbekar DK, Lee T and Hamosh P. Lingual and gastric lipases: species differences in the origin of prepancreatic digestive lipases and in the localization of gastric lipase, *Biochim Biophys Acta*, 1988, 959, 38-45.
- Descroix-Vagne M**, Perret JP, Daoud-el Baba M, Bosshard A, Dechelette MA, Gros I, Desvigne A and Rakotomalala H. Variation of gastric lipase secretion in the Heidenhain pouch of the cat, *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 1993, 101, 79-85.
- DiPalma J**, Kirk CL, Hamosh M, Colon AR, Benjamin SB and Hamosh P. Lipase and pepsin activity in the gastric mucosa of infants, children, and adults, *Gastroenterology*, 1991, 101, 116-121.
- Docherty AJ**, Bodmer MW, Angal S, Verger R, Riviere C, Lowe PA, Lyons A, Emtage JS and Harris TJ. Molecular cloning and nucleotide sequence of rat lingual lipase cDNA, *Nucleic Acids Res*, 1985, 13, 1891-1903.

- Dockray GJ and Gregory RA.** Gastrin. In: *Handbook of Physiology, Section 6, The gastrointestinal system, Vol 2*, Makhlof GM (Ed.), American Physiological Society, 1989, pp 311–336.
- Drent ML and Van der Veen EA.** Lipase inhibition: a novel concept in the treatment of obesity, *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1993, 17, 241-244.
- Duong M,** Psaltis M, Rader DJ, Marchadier D, Barter PJ And Rye KA. Evidence that hepatic lipase and endothelial lipase have different substrate specificities for high-density lipoprotein phospholipids, *Biochemistry*, 2003, 42, 13778-13785.
- Egloff MP,** Sarda L, Verger R, Cambillau C and van Tilbeurgh H. Crystallographic study of the structure of colipase and of the interaction with pancreatic lipase, *Protein Sci*, 1995, 4, 44-57.
- Faber J,** Goldstein R, Blondheim O, Stankiewicz H, Darwashi A, Bar-Maor JA, Gorenstein A, Eidelman AI and Freier S. Absorption of medium chain triglycerides in the stomach of the human infant, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1988, 7, 189-195.
- Fave G,** Coste TC and Armand M. Physicochemical properties of lipids : new strategies to manage fatty acid bioavailability, *Cell Mol Biol*, 2004, 50, 815-831.
- Fidler N,** Sauerwald T, Pohl A, Demmelmair H and Koletzko B. Docosahexaenoic acid transfer into human milk after dietary supplementation: a randomized clinical trial, *J Lipid Res*, 2000, 41, 1376-1383.
- Filer LJ Jr,** Mattson FH and Fomon SJ. Triglyceride configuration and fat absorption by the human infant, *J Nutr*, 1969, 99, 293-298.
- Fillery-Travis AJ,** Foster LH and Robins MM. Stability of emulsions stabilised by two physiological surfactants: L- $\alpha$ -phosphatidylcholine and sodium taurocholate, *Biophys Chem*, 1995, 54, 253-260.
- Fillery-Travis AJ,** Gee JM, Waldron KW, Robins MM and Johnson IT. Soluble non-starch polysaccharides derived from complex food matrices do not increase average lipid droplet size during gastric lipid emulsification in rats, *J Nutr*, 1997, 127, 2246-2252.
- Fink CS,** Hamosh P and Hamosh M. Fat digestion in the stomach: stability of lingual lipase in the gastric environment, *Pediatr Res*, 1984, 18, 248-254.
- Fink CS,** Hamosh M, Hamosh P, DeNigris SJ and Kasbekar DK. Lipase secretion from dispersed rabbit gastric glands, *Am J Physiol*, 1985, 248, G68-72.
- Folch J,** Lees M and Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J Biol Chem*, 1957, 226, 497-509.

- Fredrikzon B and Hernell O.** Role of feeding on lipase activity in gastric contents, *Acta Paediatr Scand*, 1977, 66, 479-484.
- Fredrikzon B and Olivecrona T.** Decrease of lipase and esterase activities in intestinal contents of newborn infants during test meals, *Pediatr Res*, 1978, 12, 631-634.
- Freed BA, Hsia B, Smith JP and Kaminski MV Jr.** Enteral nutrition: frequency of formula modification, *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1981, 5, 40-45.
- Freed LM, York CM, Hamosh M, Sturman JA and Hamosh P.** Bile salt-stimulated lipase in non-primate milk: longitudinal variation and lipase characteristics in cat and dog milk, *Biochim Biophys Acta*, 1986a, 878, 209-215.
- Freed LM, Neville MC, Hamosh P and Hamosh M.** Diurnal and within-feed variations in lipase activity and triglyceride content of human milk, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1986b, 5, 938-942.
- Freed LM, Berkow SE, Hamosh P, York CM, Mehta NR and Hamosh M.** Lipases in human milk: effect of gestational age and length of lactation on enzyme activity, *J Am Coll Nutr*, 1989, 8, 143-150.
- Fried M, Erlacher U, Schwizer W, Lochner C, Koerfer J, Beglinger C, Jansen JB, Lamers CB, Harder F, Bischof-Delaloye A, et al.** Role of cholecystokinin in the regulation of gastric emptying and pancreatic enzyme secretion in humans. Studies with the cholecystokinin-receptor antagonist loxiglumide, *Gastroenterology*, 1991, 101, 503-511.
- Gargouri Y, Pieroni G, Riviere C, Saunier JF, Lowe PA, Sarda L and Verger R.** Kinetic assay of human gastric lipase on short- and long-chain triacylglycerol emulsions, *Gastroenterology*, 1986a, 91, 919-925.
- Gargouri Y, Pieroni G, Lowe PA, Sarda L and Verger R.** Human gastric lipase. The effect of amphiphiles, *Eur J Biochem*, 1986b, 156, 305-310.
- Gargouri Y, Pieroni G, Riviere C, Lowe PA, Saunier JF, Sarda L and Verger R.** Importance of human gastric lipase for intestinal lipolysis : an *in vitro* study, *Biochim Biophys Acta*, 1986c, 879, 419-423.
- Gargouri Y, Pieroni G, Ferrato F and Verger R.** Human gastric lipase A kinetic study with dicaprin monolayers, *Eur J Biochem*, 1987, 169, 125-129.
- Granger DN, Barrowman MD and Kvietys PR.** In: *Clinical gastrointestinal physiology*, Saunders WB (ed.), Philadelphia, 1985, pp 67-116.
- Gruber V, Berna PP, Arnaud T, Bournat P, Clement C, Mison D, Olganier B, Philippe L, Theisen M, Baudino S, Benicourt C, Cudrey C, Bloes C, Duchateau N, Dufour S, Gueguen C, Jacquet S, Ollivo C, Poncetta C, Zorn N, Ludevid D, Van Dorsselaer A, Verger R, Doherty A,**

- Mérot B and Danzin C. Large-scale production of a therapeutic protein in transgenic tobacco plants: effect of subcellular targeting on quality of a recombinant dog gastric lipase, *Mol Breed*, 2001, 7, 329–340.
- Hadvary P**, Lengsfeld H and Wolfer H. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin, *Biochem J*, 1988, 256, 357-361.
- Hamazaki T**, Urakaze M, Makuta M, Ozawa A, Soda Y, Tatsumi H, Yano S and Kumagai A. Intake of different eicosapentaenoic acid-containing lipids and fatty acid pattern of plasma lipids in the rats, *Lipids*, 1987, 22, 994-998.
- Hamilton JA**. Interactions of triglycerides with phospholipids: incorporation into the bilayer structure and formation of emulsions, *Biochemistry*, 1989, 28, 2514-2520.
- Hamilton JA**, Vural JM, Carpentier YA and Deckelbaum RJ. Incorporation of medium chain triacylglycerols into phospholipid bilayers: effect of long chain triacylglycerols, cholesterol, and cholesteryl esters, *J Lipid Res*, 1996, 37, 773-782.
- Hamilton JA**. Fast flip-flop of cholesterol and fatty acids in membranes : implications for membrane transport proteins, *Curr Opin Lipidol*, 2003, 14, 263-271.
- Hamosh M and Scow RO**. Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid, *J Clin Invest*, 1973, 52, 88-95.
- Hamosh M**, Sivasubramanian KN, Salzman-Mann C and Hamosh P. Fat digestion in the stomach of premature infants. I. Characteristics of lipase activity, *J Pediatr*, 1978, 93, 674-679.
- Hamosh M**, Scanlon JW, Ganot D, Likel M, Scanlon KB and Hamosh P. Fat digestion in the newborn. Characterization of lipase in gastric aspirates of premature and term infants, *J Clin Invest*, 1981, 67, 838-846.
- Hamosh M**, Bitman J, Liao TH, Mehta NR, Buczek RJ, Wood DL, Grylack LJ and Hamosh P. Gastric lipolysis and fat absorption in preterm infants: effect of medium-chain triglyceride or long-chain triglyceride-containing formulas, *Pediatrics*, 1989, 83, 86-92.
- Hamosh M**. In : *Lingual and gastric lipases : their role in fat digestion*, CRC Press Inc., 1990.
- Hamosh M**. Enzymes in human milk, In: *Handbook of milk composition*, Jensen RG (Ed.), Academic Press Inc., 1995, pp 407-411.
- Haruma K**, Kamada T, Kawaguchi H, Okamoto S, Yoshihara M, Sumii K, Inoue M, Kishimoto S, Kajiyama G, Miyoshi A. Effect of age and Helicobacter pylori infection on gastric acid secretion, *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15, 277-283.

- Hayes JR**, Pence DH, Scheinbach S, D'Amelia RP, Klemann LP, Wilson NH and Finley JW. Review of triacylglycerol digestion, absorption, and metabolism with respect to Salatrim triacylglycerols, 1994, *J Agr Food Chem*, 1994, 42, 474-483.
- Hegele RA**, Ramdath DD, Ban MR, Carruthers MN, Carrington CV and Cao H. Polymorphisms in PNLIP, encoding pancreatic lipase, and associations with metabolic traits, *J Hum Genet*, 2001, 46, 320-324.
- Heid HW and Keenan TW**. Intracellular origin and secretion of milk fat globules, *Eur J Cell Biol*, 2005, 84, 245-258.
- Henry DC**. The cataphoresis of suspended particles. I. The equation of cataphoresis, *Proc Roy Soc*, 1931, 106-129.
- Hermoso J**, Pignol D, Penel S, Roth M, Chapus C and Fontecilla-Camps JC. Neutron crystallographic evidence of lipase-colipase complex activation by a micelle, *EMBO J*, 1997, 16, 5531-5536.
- Hernell O and Olivecrona T**. Human milk lipases. II. Bile salt-stimulated lipase, *Biochem Biophys Acta*, 1974, 369, 234-244.
- Hernell O and Bläckberg L**. Digestion of human milk lipids: physiologic significance of sn-2 monoacylglycerol hydrolysis by bile salt-stimulated lipase, *Pediatr Res*, 1982, 16, 882-885.
- Hernell O**, Staggers JE and Carey MC. Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption. 2. Phase analysis and aggregation states of luminal lipids during duodenal fat digestion in healthy adult human beings, *Biochemistry*, 1990, 29, 2041-2056.
- Hernell O**, Bläckberg L, Chen Q, Sternby B and Nilsson A. Does the bile salt-stimulated lipase of human milk have a role in the use of the milk long-chain polyunsaturated fatty acids?, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1993, 16, 426-431.
- Hernell O and Bläckberg L**. Human milk bile salt-stimulated lipase: functional and molecular aspects, *J Pediatr*, 1994, 125, S56-61.
- Hide WA**, Chan L and Li WH. Structure and evolution of the lipase superfamily, *J Lipid Res*, 1992, 33, 167-178.
- Homan R and Jain MK**. Biology, pathology and interfacial enzymology of pancreatic phospholipase A2, In : *Intestinal lipid metabolism*, Mansbach CM 2nd, Tso P and Kuksis A (Eds.), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2001, pp. 81-104.
- Howe PR**, Downing JA, Grenyer BF, Grigonis-Deane EM and Bryden WL. Tuna fishmeal as a source of DHA for n-3 PUFA enrichment of pork, chicken, and eggs, *Lipids*, 2002, 37, 1067-1076.

- Hull M and Keeton RW.** The existence of a gastric lipase, *J Biol Chem*, 1917, 32, 127-140.
- Hunt JN and Knox MT.** A relation between the chain length of fatty acids and the slowing of gastric emptying, *J Physiol*, 1968, 194, 327-336.
- Ikeda I, Sasaki E, Yasunami H, Nomiyama S, Nakayama M, Sugano M, Imaizumi K and Yazawa K.** Digestion and lymphatic transport of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids given in the form of triacylglycerol, free acid and ethyl ester in rats, *Biochim Biophys Acta*, 1995, 1259(3), 297-304.
- Innis SM.** Plasma and red blood cell fatty acid values as indexes of essential fatty acids in the developing organs of infants fed with milk or formulas, *J Pediatr*, 1992, 120, S78-S86.
- Innis SM, Dyer R and Nelson CM.** Evidence that palmitic acid is absorbed as sn-2 monoacylglycerol from human milk by breast-fed infants, *Lipids*, 1994, 29, 541-545.
- Innis SM and Dyer R.** Dietary triacylglycerols with palmitic acid (16:0) in the 2-position increase 16:0 in the 2-position of plasma and chylomicron triacylglycerols, but reduce phospholipid arachidonic and docosahexaenoic acids, and alter cholesteryl ester metabolism in formula-fed piglets, *J Nutr*, 1997, 127, 1311-1319.
- Innis SM.** Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development, *Adv Exp Med Biol*, 2004, 554, 27-43.
- Ishibashi T, Matsumoto S, Harada H, Ochi K, Tanaka J, Seno T, Oka H, Miyake H and Kimura I.** Aging and exocrine pancreatic function evaluated by the recently standardized secretin test, *Nippon Ronen Igakkai Zasshi*, 1991, 28, 599-605.
- Ishii I, Onozaki R, Takahashi E, Takahashi S, Fujio N, Harada T, Morisaki N, Shirai K, Saito Y and Hirose S.** Regulation of neutral cholesterol esterase activity by phospholipids containing negative charges in substrate liposome, *J Lipid Res*, 1995, 36, 2303-2310.
- James AH.** In: *The physiology of gastric digestion*, Arnold E (Ed.), London, 1960, pp 25.
- Jandacek RJ, Whiteside JA, Holcombe BN, Volpenhein RA and Taulbee JD.** The rapid hydrolysis and efficient absorption of triglycerides with octanoic acid in the 1 and 3 positions and long-chain fatty acid in the 2 position, *Am J Clin Nutr*, 1987, 45, 940-945.
- Jarvenpaa AL, Rassin DK, Kuitunen P, Gaull GE and Raiha NC.** Feeding the low-birth-weight infant. III. Diet influences bile acid metabolism, *Pediatrics*, 1983, 72, 677-683.
- Jensen MM, Christensen MS and Hoy CE.** Intestinal absorption of octanoic, decanoic, and linoleic acids: effect of triglyceride structure, *Ann Nutr Metab*, 1994, 38, 104-116.
- Jensen RG, Dejong FA, Clark RM, Palmgren LG, Liao TH and Hamosh M.** Stereospecificity of premature infant lingual lipase, *Lipids*, 1982, 17, 570-572.
- Jensen RG.** In: *Handbook of milk composition*, Academic Press Inc., 1995.

- Jeppesen PB**, Hoy CE and Mortensen PB. Essential fatty acid deficiency in patients receiving home parenteral nutrition, *Am J Clin Nutr*, 1998, 68, 126-133.
- Kaminsky S**, Smith LJ and D'Souza SW. Human gastric lipase. Effects of fatty acid and bovine serum albumin on in vitro activity, *Scand J Clin Lab Invest*, 1988, 48, 583-587.
- Keenan TW and Patton T**. The structure of milk: implications for sampling and storage. A. The milk lipid globule membrane, In : *Handbook of milk composition*, Jensen RG (ed.), Academic press Inc., 1995, pp 5-50.
- Keller J and Layer P**. Pancreatic Enzyme Supplementation Therapy, *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2003, 6, 369-374.
- Kern R**, Joseleau-Petit D, Chattopadhyay MK and Richarme G. Chaperone-like properties of lysophospholipids, *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289, 1268-1274.
- Kimura M**, Shizuki M, Miyoshi K, Sakai T, Hidaka H, Takamura H and Matoba T, Relationship between the molecular structures and emulsification properties of edible oils, *Biosci Biotech Biochem*, 1994, 58, 1258-1261.
- Kirk CL**, Iverson SJ and Hamosh M. Lipase and pepsin activities in the stomach mucosa of the suckling dog, *Biol Neonate*, 1991, 59, 78-85.
- Knospe C and Plendl J**. Histochemical demonstration of lipase activity in the gastric mucosa of the cat, *Anat Histol Embryol*, 1997, 26, 303-304.
- Kolliker A**. Von einige bemerkungen uber die resorption des fettes im darme, uber das vorkommen einer physiologisches fettleber bei jungen saugetieren und uber die funktion der milz, *Verhandlungen der Physikalisch-Medizinischen Gesellsch*, 1857, 7, 174.
- Kritchevsky D**, Davidson LM, Weight M, Kriek NP and du Plessis JP. Influence of native and randomized peanut oil on lipid metabolism and aortic sudanophilia in the vervet monkey, *Atherosclerosis*, 1982, 42, 53-58.
- Kritchevsky D**. Fatty acids, triglyceride structure, and lipid metabolism, *J Nutr Biochem*, 1995, 6, 172-178.
- Krokan HE**, Bjerve KS and Mork E. The enteral bioavailability of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is as good from ethyl esters as from glyceryl esters in spite of lower hydrolytic rates by pancreatic lipase in vitro, *Biochim Biophys Acta*, 1993, 1168, 59-67.
- Laemmli UK**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 1970, 227, 680-685.
- Lagarde M**, Bernoud N, Brossard N, Lemaitre-Delaunay D, Thies F, Croset M and Lecerf J. Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain, *J Mol Neurosci*, 2001, 16, 201-204, discussion 215-221.

- Lagarde M**, Calzada C, Vericel E. Pathophysiologic role of redox status in blood platelet activation. Influence of docosahexaenoic acid, *Lipids*, 2003, 38, 465-468.
- Lairon D**, Nalbone G, Lafont H, Leonardi J, Domingo N, Hauton JC and Verger R. Inhibition of lipase adsorption at interfaces. Role of bile salt micelles and colipase, *Biochemistry*, 1978, 17, 205-208.
- Lapillonne A**, Clarke SD and Heird WC. Polyunsaturated fatty acids and gene expression, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004, 7, 151-156.
- Larque E**, Demmelmair H and Koletzko B. Perinatal supply and metabolism of long-chain polyunsaturated fatty acids: importance for the early development of the nervous system, *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 967, 299-310.
- Larsson A and Erlanson-Albertsson C**. Effect of phosphatidylcholine and free fatty acids on the activity of pancreatic lipase-colipase, *Biochim Biophys Acta*, 1986, 876, 543-550.
- Laugier R**, Bernard JP, Berthezene P and Dupuy P. Changes in pancreatic exocrine secretion with age: pancreatic exocrine secretion does decrease in the elderly, *Digestion*, 1991, 50, 202-211.
- Lebenthal E and Lee PC**. Development of functional responses in human exocrine pancreas, *Pediatrics*, 1980, 66, 556-560.
- Legrand P**, Bourre JM, Descomps B, Durand G et Renaud S. Lipides, Dans : *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*, Martin A (coord.), Éditions Tec & Doc, Paris, 2001, pp 63-82.
- Lemaitre-Delaunay D**, Pachiaudi C, Laville M, Pousin J, Armstrong M and Lagarde M. Blood compartmental metabolism of docosahexaenoic acid (DHA) in humans after ingestion of a single dose of [(13)C]DHA in phosphatidylcholine, *J Lipid Res*, 1999, 40, 1867-1874.
- Leskanich CO**, Matthews KR, Warkup CC, Noble RC and Hazzledine M. The effect of dietary oil containing (n-3) fatty acids on the fatty acid, physicochemical, and organoleptic characteristics of pig meat and fat, *J Anim Sci*, 1997, 75, 673-683.
- Liang Y**, Medhekar R, Brockman HL, Quinn DM and Hui DY. Importance of arginines 63 and 423 in modulating the bile salt-dependent and bile salt-independent hydrolytic activities of rat carboxyl ester lipase, *J Biol Chem*, 2000, 275, 24040-24046.
- Lindner I**, Helwig U, Rubin D, Li Y, Fisher E, Boeing H, Mohlig M, Spranger J, Pfeiffer A, Hampe J, Schreiber S, Doring F and Schrezenmeir J. Putative association between a new polymorphism in exon 3 (Arg109Cys) of the pancreatic colipase gene and type 2 diabetes mellitus in two independent Caucasian study populations, *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49, 972-976.

- Lindquist S**, Bläckberg L and Hernell O. Human bile salt-stimulated lipase has a high frequency of size variation due to a hypervariable region in exon 11, *Eur J Biochem*, 2002, 269, 759-767.
- Lohse P**, Lohse P, Chahrokh-Zadeh S and Seidel D. The acid lipase gene family: three enzymes, one highly conserved gene structure, *J Lipid Res*, 1997a, 38, 880-891.
- Lohse P**, Lohse P, Chahrokh-Zadeh S and Seidel D. Human lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase and human gastric lipase: site-directed mutagenesis of Cys227 and Cys236 results in substrate-dependent reduction of enzymatic activity, *J Lipid Res*, 1997b, 38, 1896-1905.
- Lowe ME**. The triglyceride lipases of the pancreas, *J Lipid Res*, 2002, 43, 2007-2016.
- Lowry OH**, Rosebrough MJ, Farr AL and Randal RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 1951, 193, 265-275.
- Lucas A**, Quinlan P, Abrams S, Ryan S, Meah S and Lucas PJ. Randomised controlled trial of a synthetic triglyceride milk formula for preterm infants, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 1997, 77, F178-184.
- Lundbaek JA and Andersen OS**. Lysophospholipids modulate channel function by altering the mechanical properties of lipid bilayers, *J Gen Physiol*, 1994, 104, 645-673.
- Lykidis A**, Avranas A and Arzoglou P. Combined effect of a lecithin and a bile salt on pancreatic lipase activity, *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1997, 116, 51-55.
- Malagelada JR and Azpiroz F**. In : *Determinants of gastric emptying and transit in the small intestine*, Oxford Univ Press, New York, 1989, pp 909-937.
- Mandell IB**, Buchanan-Smith JG, Holub BJ and Campbell CP. Effects of fish meal in beef cattle diets on growth performance, carcass characteristics, and fatty acid composition of longissimus muscle, *J Anim Sci*, 1997, 75, 910-919.
- Mansbach CM 2nd**, Cohen RS and Leff PB. Isolation and properties of the mixed lipid micelles present in intestinal content during fat digestion in man, *J Clin Invest*, 1975, 56, 781-791.
- Marcet**. A course of lectures on the chemistry, physiology and pathology of human excrements. Lecture V, *Med Times Gazette*, 1858, 17, 209.
- Mattson FH and Volpenhein RA**. The digestion and absorption of triglycerides, *J Biol Chem*, 1964, 239, 2772-2777.
- Mattson FH**, Nolen GA and Webb MR. The absorbability by rats of various triglycerides of stearic and oleic acid and the effect of dietary calcium and magnesium, *J Nutr*, 1979, 109, 1682-1687.

- Mathews SA**, Oliver WT, Phillips OT, Odle J, Diersen-Schade DA and Harrell RJ. Comparison of triglycerides and phospholipids as supplemental sources of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids in piglets. *J Nutr*, 2002, 132, 3081-3089.
- McKenna MC**, Hubbard VS and Bieri JG. Linoleic acid absorption from lipid supplements in patients with cystic fibrosis with pancreatic insufficiency and in control subjects, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1985, 4, 45-51.
- Meier RF and Beglinger C**. Nutrition in pancreatic diseases, *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2006, 20, 507-529.
- Meyer JH**, Gu YG, Jehn D and Doty JE. Factors that affect the performance of lipase on fat digestion and absorption in a canine model of pancreatic insufficiency, *Pancreas*, 1994, 9, 613-623.
- Michalski MC**, Michel F, Sainmont D and Briard V. Apparent  $\zeta$ -potential as a tool to assess mechanical damages to the milk fat globule membrane, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, 23, 23-30.
- Miled N**, Canaan S, Dupuis L, Roussel A, Riviere M, Carriere F, de Caro A, Cambillau C and Verger R. Digestive lipases: from three-dimensional structure to physiology, *Biochimie*, 2000, 82, 973-986.
- Miled N**, Roussel A, Bussetta C, Berti-Dupuis L, Rivière M, Buono G, Verger R, Cambillau C and Canaan S. Inhibition of dog and human gastric lipases by enantiomeric phosphonate inhibitors: a structure-activity study, *Biochemistry*, 2003, 42, 11587-11593.
- Miller KW and Small DM**. Surface-to-core and interparticle equilibrium distributions of triglyceride-rich lipoprotein lipids, *J Biol Chem*, 1983, 258, 13772-13784.
- Minich DM**, Vonk RJ and Verkade HJ. Intestinal absorption of essential fatty acids under physiological and essential fatty acid-deficient conditions, *J Lipid Res*, 1997, 38, 1709-1721.
- Mishra A**, Greaves R and Massie J. The Relevance of Sweat Testing for the Diagnosis of Cystic Fibrosis in the Genomic Era, *Clin Biochem Rev*, 2005, 26, 135-153.
- Mokrzycki-Issartel N**, Bouchon B, Farrer S, Berland P, Laparra H, Madelmont JC and Theisen M. A transient tobacco expression system coupled to MALDI-TOF-MS allows validation of the impact of differential targeting on structure and activity of a recombinant therapeutic glycoprotein produced in plants, *FEBS Lett*, 2003, 552, 170-176.
- Moore SA**, Kingston RL, Loomes KM, Hernell O, Bläckberg L, Baker HM and Baker EN. The structure of truncated recombinant human bile salt-stimulated lipase reveals bile salt-

independent conformational flexibility at the active-site loop and provides insights into heparin binding, *J Mol Biol*, 2001, 312, 511-523.

**Moreau H**, Gargouri Y, Lecat D, Junien J-L and Verger R. Screening of preduodenal lipases in several mammals, *Biochim Biophys Acta*, 1988a, 959, 247-252.

**Moreau H**, Laugier R, Gargouri Y, Ferrato F and Verger R. Human preduodenal lipase is entirely of gastric fundic origin, *Gastroenterology*, 1988b, 95, 1221-1226.

**Moreau H**, Saunier JF, Gargouri Y, Pieroni G, Verger R and Sarles H. Human gastric lipase: variations induced by gastrointestinal hormones and by pathology, *Scand J Gastroenterol*, 1988c, 23, 1044-1048.

**Moreau H**, Bernadac A, Gargouri Y, Benkouka F, Laugier R and Verger R. Immunocytolocalization of human gastric lipase in chief cells of the fundic mucosa, *Histochemistry*, 1989, 91, 419-423.

**Moreau H**, Bernadac A, Tretout N, Gargouri Y, Ferrato F and Verger R. Immunocytochemical localization of rabbit gastric lipase and pepsinogen, *Eur J Cell Biol*, 1990, 51, 165-172.

**Moreau H**, Abergel C, Carrière F, Ferrato F, Fontecilla-Camps JC, Cambillau C and Verger R. Isoform purification of gastric lipases. Towards crystallization, *J Mol Biol*, 1992, 225, 147-153.

**Moreau J**, Bouisson M, Balas D, Ravaud A, Stupnik S, Buscail L, Vaysse N and Ribet A. Gastric lipase in alcoholic pancreatitis. Comparison of secretive profiles following pentagastrin stimulation in normal adults and patients with pancreatic insufficiency, *Gastroenterology*, 1990, 99, 175-180.

**Mu H and Hoy CE**. Effects of different medium-chain fatty acids on intestinal absorption of structured triacylglycerols, *Lipids*, 2000, 35, 83-89.

**Nara E**, Miyashita K, Ota T and Nadachi Y. The oxidative stability of polyunsaturated fatty acids in salmon egg phosphatidylcholine liposomes, *Fish Sci*, 1998, 64, 282-286.

**Nelson GJ**, Schmidt PC, Bartolini GL, Kelley DS and Kyle D. The effect of dietary docosahexaenoic acid on plasma lipoproteins and tissue fatty acid composition in humans, *Lipids*, 1997, 32, 1137-1146.

**Nelson JH**, Jensen RG and Pitas RE. Pregastric esterase and other oral lipases. A review, *J Dairy Sci*, 1977, 60, 327-362.

**Nichols-Smith S**, Teh SY and Kuhl TL. Thermodynamic and mechanical properties of model mitochondrial membranes, *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1663, 82-88.

- Nilsson J**, Bläckberg L, Carlsson P, Enerback S, Hernell O and Bjursell G. cDNA cloning of human-milk bile-salt-stimulated lipase and evidence for its identity to pancreatic carboxylic ester hydrolase, *Eur J Biochem*, 1990, 192, 543-550.
- Nishimukai M**, Hara H and Aoyama Y. Enteral administration of soybean lecithin enhanced lymphatic absorption of triacylglycerol in rats, *Br J Nutr*, 2003, 90, 565-571.
- Nishioka T**, Having R, Tazuma S, Stellaard F, Kuipers F and Verkade HJ. Administration of phosphatidylcholine-cholesterol liposomes partially reconstitutes fat absorption in chronically bile-diverted rats, *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1636, 90-98.
- Nutting DF**, Kumar NS, Siddiqi SA and Mansbach CM 2nd. Nutrient absorption, *Curr Opin Gastroenterol*, 2002, 18, 168-175.
- Ohta A**, Mayo MC, Kramer N and Lands WEM. Rapid analysis of fatty acids in plasma lipids, *Lipids*, 1990, 25, 742-747.
- Ollis DL**, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I, Schrag J, et al. The alpha/beta hydrolase fold, *Protein Eng*, 1992, 5, 197-211.
- Olsen O**, Wojdemann M, Berner B, Christiansen G and Sternby B. Secretin and gastric lipase secretion, *Digestion*, 1998, 59, 655-659.
- Pafumi Y**, Lairon D, de la Porte PL, Juhel C, Storch J, Hamosh M and Armand M. Mechanisms of inhibition of triacylglycerol hydrolysis by human gastric lipase, *J Biol Chem*, 2002, 277, 28070-28079.
- Pasquier B**, Armand M, Castelain C, Guillon F, Borel P, Lafont H and Lairon D. Emulsification and lipolysis of triacylglycerols are altered by viscous soluble dietary fibres in acidic gastric medium in vitro, *Biochem J*, 1996a, 314, 269-275.
- Pasquier B**, Armand M, Guillon F, Castelain C, Borel P, Barry JL, Pieroni G and Lairon D. Viscous soluble dietary fibers alter emulsification and lipolysis of triacylglycerols in duodenal medium in vitro, *J Nutr Biochem*, 1996b, 7, 293-302.
- Payet M**, Esmail MH, Polichetti E, Le Brun G, Adjemout L, Donnarel G, Portugal H and Pieroni G. Docosahexaenoic acid-enriched egg consumption induces accretion of arachidonic acid in erythrocytes of elderly patients, *Br J Nutr*, 2004, 91, 789-796.
- Perret JP**, Daoud-Elbaba M, Rakotomalala H, Gros I and Descroix-Vagne M. Cholinergic and pentagastrin stimulation of the gastric secretions of acid, pepsin and lipase in the awake rabbit, *Arch Int Physiol Biochim Biophys*, 1993a, 101, 87-91.
- Perret JP**, Daoud-el Baba M, Gros I and Descroix-Vagne M. Post-prandial lipase, pepsin and acid secretion of a Heidenhain pouch in the rabbit, *Reprod Nutr Dev*, 1993b, 33, 199-207.

- Raybould HE**, Meyer JH, Tabrizi Y, Liddle RA and Tso P. Inhibition of gastric emptying in response to intestinal lipid is dependent on chylomicron formation, *Am J Physiol*, 1998, 274, R1834-1838.
- Redgrave TG**, Kodali DR and Small DM. The effect of triacyl-sn-glycerol structure on the metabolism of chylomicrons and triacylglycerol-rich emulsions in the rat, *J Biol Chem*, 1988, 263, 5118-5123.
- Renou C**, Carriere F, Ville E, Grandval P, Joubert-Collin M and Laugier R. Effects of lansoprazole on human gastric lipase secretion and intragastric lipolysis in healthy human volunteers, *Digestion*, 2001, 63, 207-213.
- Rodriguez-Palmero M**, Lopez-Sabater MC, Castellote-Bargallo AI, de la Torre-Boronat MC and Rivero-Urgell M. Administration of low doses of fish oil derived N-3 fatty acids to elderly subjects, *Eur J Clin Nutr*, 1997, 51, 554-560.
- Rogalska E**, Ransac S and Verger R. Stereospecificity of lipases. II. Stereoselective hydrolysis of triglyceride by gastric and pancreatic lipases, *J Biol Chem*, 1990, 265, 20271-20276.
- Roulet M**, Weber AM, Paradis Y, Roy CC, Chartrand L, Lasalle R and Morin CL. Gastric emptying and lingual lipase activity in cystic fibrosis, *Pediatr Res*, 1980, 14, 1360-1362.
- Roussel A**, Canaan S, Egloff MP, Riviere M, Dupuis L, Verger R and Cambillau C. Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest, *J Biol Chem*, 1999, 274, 16995-7002.
- Rovery M**, Boudouard M and Bianchiotta J. An improved large scale procedure for the purification of porcine pancreatic lipase, *Biochim Biophys Acta*, 1978, 525, 373-379.
- Saito H and Ishihara K**. Antioxydant activity and active sites of phospholipids as antioxydants, *J Am Oil Chem Soc*, 1997, 74, 1531-1536.
- Saito H**, Kawagishi A, Tanaka M, Tanimoto T, Okada S, Komatsu H and Handa T. Coalescence of Lipid Emulsions in Floating and Freeze-Thawing Processes: examination of the Coalescence Transition State Theory, *J Colloid Interface Sci*, 1999, 219, 129-134.
- Saito H**, Arimoto I, Tanaka M, Sasaki T, Tanimoto T, Okada S and Handa T. Inhibition of lipoprotein lipase activity by sphingomyelin: role of membrane surface structure, *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1486, 312-320.
- Salzman-Mann C**, Hamosh M, Sivasubramanian KN, Bar-Maor A, Zinder O, Avery GB, Watkins JB and Hamosh P. Congenital esophageal atresia: lipase activity is present in the esophageal pouch and stomach, *Dig Dis Sci*, 1982, 27, 124-128.

- Sarda L and Desnuelle P.** Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion, *Biochim Biophys Acta*, 1958, 30, 513-521.
- Sayari A, Frikha F, Miled N, Mtibaa H, Ben Ali Y, Verger R and Gargouri Y.** N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties, *FEBS Lett*, 2005, 579, 976-982.
- Schechter E.** Dans: *Biochimie et biophysique des membranes*, 2<sup>nd</sup> édition, Masson, 1997.
- Schneeman BO.** Building scientific consensus: the importance of dietary fiber, *Am J Clin Nutr*, 1999, 69, 1.
- Schonheyder F and Volqvartz K.** The gastric lipase in man, *Acta Physiol Scand*, 1946, 11, 349.
- Shiratori K, Watanabe S and Takeuchi T.** Intestinal fat digestion plays a significant role in fat-induced suppression of gastric acid secretion and gastrin release in the rat, *Dig Dis Sci*, 1993, 38, 2267-2272.
- Sims HF, Jennens ML and Lowe ME.** The human pancreatic lipase-encoding gene: structure and conservation of an Alu sequence in the lipase gene family, *Gene*, 1993, 131, 281-285.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC.** Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal Biochem*, 1985, 150, 76-85.
- Song JH, Inoue Y and Miyazawa T.** Oxidative stability of docosahexaenoic acid-containing oils in the form of phospholipids, triacylglycerols, and ethyl esters, *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61, 2085-2088.
- Spilburg CA, Cox DG, Wang X, Bernat BA, Bosner MS and Lange LG.** Identification of a species specific regulatory site in human pancreatic cholesterol esterase, *Biochemistry*, 1995, 34, 15532-15538.
- Spooner PJ, Gantz DL, Hamilton JA and Small DM.** The distribution of oleic acid between chylomicron-like emulsions, phospholipid bilayers and serum albumin. A model for fatty acid distribution between lipoproteins, membranes and albumin, *J Biol Chem*, 1990, 265, 12650-12655.
- Staggers JE, Fernando-Warnakulasuriya GJ and Wells MA.** Studies on fat digestion, absorption, and transport in the suckling rat. II. Triacylglycerols: molecular species, stereospecific analysis, and specificity of hydrolysis by lingual lipase, *J Lipid Res*, 1981, 22, 675-679.

- Storch J.** The role of fatty acid binding proteins in enterocyte fatty acid transport, In : *Intestinal lipid metabolism*, Mansbach CM 2nd, Tso P and Kuksis A (Eds.), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 2001, pp. 153-170.
- Strömqvist M,** Hernell O, Hansson L, Lindgren K, Skytt A, Lundberg L, Lidmer AS and Bläckberg L. Naturally occurring variants of human milk bile salt-stimulated lipase, *Arch Biochem Biophys*, 1997, 347, 30-36.
- Swan JS,** Hoffman MM, Lord MK and Poechmann JL. Two forms of human milk bile-salt-stimulated lipase, *Biochem J*, 1992, 283, 119-122.
- Szafran Z,** Szafran H, Popiela T and Trompeter G. Coupled secretion of gastric lipase and pepsin in man following pentagastrin stimulation, *Digestion*, 1978, 18, 310-318.
- Taylor IL,** Byrne WJ, Christie DL, Ament ME and Walsh JH. Effect of individual l-amino acids on gastric acid secretion and serum gastrin and pancreatic polypeptide release in humans, *Gastroenterology*, 1982, 83, 273-278.
- Thies F,** Delachambre MC, Bentejac M, Lagarde M and Lecerf J. Unsaturated fatty acids esterified in 2-acyl-1-lysophosphatidylcholine bound to albumin are more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form, *J Neurochem*, 1992, 59, 1110-1116.
- Thies F,** Pillon C, Moliere P, Lagarde M and Lecerf J. Preferential incorporation of sn-2 lysoPC DHA over unesterified DHA in the young rat brain, *Am J Physiol*, 1994, 267, R1273-1279.
- Thomas A,** Allouche M, Basyn F, Brasseur R, Kerfelec B. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity, *J Biol Chem*, 2005, 280, 40074-40083.
- Tiruppathi C and Balasubramanian KA.** Purification and properties of an acid lipase from human gastric juice, *Biochim Biophys Acta*, 1982, 712, 692-697.
- Tiruppathi C and Balasubramanian KA.** Single step purification and amino acid composition of purified acid lipase from human gastric juice, *Indian J Biochem Biophys*, 1985, 22, 111-114.
- Tomarelli RM,** Meyer BJ, Weaber JR and Bernhart FW. Effect of positional distribution on the absorption of the fatty acids of human milk and infant formulas, *J Nutr*, 1968, 95, 583-590.
- Toothill J,** Thompson SY and Edwards-Webb JD. Studies on lipid digestion in the preruminant calf. The source of the lipolytic activity in the abomasum, *Br J Nutr*, 1976, 36, 439-447.

- Tremblay E**, Basque JR, Rivard N and Menard D. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha down regulate human gastric lipase gene expression, *Gastroenterology*, 1999, 116, 831-841.
- Tso P**. Intestinal lipid absorption In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, Johnson LR (ed.), Raven Press, New York, 1994, pp 1867-1908.
- Tso P**, Lee T and Demichele SJ. Lymphatic absorption of structured triglycerides vs physical mix in a rat model of fat malabsorption, *Am J Physiol*, 1999, 277, G333-340.
- Uauy RD**, Birch DG, Birch EE, Tyson JE and Hoffman DR. Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinal function of very-low-birth-weight neonates, *Pediatr Res*, 1990, 28, 485-492.
- Van Elswyk ME**. Comparison of n-3 fatty acid sources in laying hen rations for improvement of whole egg nutritional quality: a review, *Br J Nutr*, 1997, 78, S61-69.
- Van Kuiken BA and Behnke WD**. The activation of porcine pancreatic lipase by cis-unsaturated fatty acids, *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1214, 148-160.
- Verger R**, Rietsch J and Desnuelle P. Effects of colipase on hydrolysis of monomolecular films by lipase, *J Biol Chem*, 1977, 252, 4319-4325.
- Verger R**. Pancreatic lipase, In: *Lipases*, Borgstrom B and Brockman HL (eds.), Elsevier, Amsterdam, 1984, pp 84-150.
- Vidgren HM**, Agren JJ, Schwab U, Rissanen T, Hanninen O and Uusitupa MI. Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men, *Lipids*, 1997, 32, 697-705.
- Ville E**, Carriere F, Renou C and Laugier R. Physiological study of pH stability and sensitivity to pepsin of human gastric lipase, *Digestion*, 2002, 65, 73-81.
- Volhard F**. Uber resorption und felltsplaltung im magen, *Munch Med Wschr*, 1900, 47, 141.
- Volhard F**. Uber das fettspaltende ferment des magens, *Z Klin Med*, 1901, 43, 397.
- Wang CS**, Dashti A, Jackson KW, Yeh JC, Cummings RD and Tang J. Isolation and characterization of human milk bile salt-activated lipase C-tail fragment, *Biochemistry*, 1995, 34, 10639-10644.
- Ward AT**, Wittenberg KM and Przybylski R. Bovine milk fatty acid profiles produced by feeding diets containing solin, flax and canola, *J Dairy Sci*, 2002, 85, 1191-1196.
- Weibel EK**, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E and Lengsfeld H. Lipstatin : an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity, *J Antibiot (Tokyo)*, 1987, 40, 1081-1085.

- Wensing AG**, Mensink RP and Hornstra G. Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin on platelet aggregation in healthy elderly subjects, *Br J Nutr*, 1999, 82, 183-191.
- Werner A**, Havinga R, Kuipers F and Verkade HJ. Treatment of EFA deficiency with dietary triglycerides or phospholipids in a murine model of extrahepatic cholestasis, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286, G822-832.
- Wicker-Planquart C**, Canaan S, Riviere M and Dupuis L. Site-directed removal of N-glycosylation sites in human gastric lipase, *Eur J Biochem*, 1999, 262, 644-651.
- Wickham M**, Garrod M, Leney J, Wilson PD and Fillery-Travis A. Modification of a phospholipid stabilized emulsion interface by bile salt: effect on pancreatic lipase activity, *J Lipid Res*, 1998, 39, 623-632.
- Wickham M**, Wilde P and Fillery-Travis A. A physicochemical investigation of two phosphatidylcholine/bile salt interfaces: implications for lipase activation, *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1580, 110-122.
- Wijendran V**, Huang MC, Diau GY, Boehm G, Nathanielsz PW and Brenna JT. Efficacy of dietary arachidonic acid provided as triglyceride or phospholipid as substrates for brain arachidonic acid accretion in baboon neonates, *Pediatr Res*, 2002, 51, 265-272.
- Wilson FA**, Sallee VL and Dietschy JM. Unstirred water layers in intestine: rate determinant of fatty acid absorption from micellar solutions, *Science*, 1971, 174, 1031-1033.
- Winkler FK**, D'Arcy A and Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase, *Nature*, 1990, 343, 771-774.
- Wojdemann M**, Norregaard P, Sternby B, Worning H and Olsen O. Low doses of pentagastrin stimulate gastric lipase secretion in man, *Scand J Gastroenterol*, 1995, 30, 631-634.
- Wojdemann M**, Traberg P, Stadil F, Sternby B, Larsen S, Hilsted L and Olsen O. Effect of sham feeding and acute suppression of acid secretion on human gastric lipase secretion, *Am J Gastroenterol*, 1998a, 93, 244-248.
- Wojdemann M**, Wettergren A, Sternby B, Holst JJ, Larsen S, Rehfeld JF and Olsen O. Inhibition of human gastric lipase secretion by glucagon-like peptid-1, *Dig Dis Sci*, 1998b, 43, 799-805.
- Wojdemann M**, Riber C, Bisgaard T, Sternby B, Larsen S, Rehfeld JF, Holst JJ and Olsen O. Inhibition of human gastric lipase by intraduodenal fat involves glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin, *Regul Pept*, 1999, 80, 101-106.
- Wong H and Schotz M**. The lipase gene family, *J Lipid Res*, 2002, 43, 993-999.

**Yang LY**, Kuksis A and Myher JJ. Lipolysis of menhaden oil triacylglycerols and the corresponding fatty acid alkyl esters by pancreatic lipase in vitro: a reexamination, *J Lipid Res*, 1990, 31, 137-147.

**Yehuda S**, Rabinovitz S and Mostofsky DI. Essential fatty acids and the brain: from infancy to aging, *Neurobiol Aging*, 2005, 26, 98-102.

**York CM**, Yao J, Hamosh M, Oftedal OT, Freed LM and Hamosh P. Gastric lipase in the dog and the seal Implication for neonatal fat digestion, *Fed Proc*, 1987, 46, 1084 (A4477).

**Young SG**, Cham CM, Pitas RE, Burri BJ, Connolly A, Flynn L, Pappu AS, Wong JS, Hamilton RL and Farese RV Jr. A genetic model for absent chylomicron formation: mice producing apolipoprotein B in the liver, but not in the intestine, *J Clin Invest*, 1995, 96, 2932-2946.

**Zentler-Munro PL**, Assoufi BA, Balasubramanian K, Cornell S, Benoliel D, Northfield TC and Hodson ME. Therapeutic potential and clinical efficacy of acid-resistant fungal lipase in the treatment of pancreatic steatorrhoea due to cystic fibrosis, *Pancreas*, 1992, 7, 311-319.

**Tableau 1bis:** Activité de la lipase gastrique humaine, mesurée à partir de différentes sources et dans différentes conditions de dosage.

Source de lipase gastrique	Sujet	Activité	Substrat (pH)	Commentaires	Référence
Glandes gastriques		12,17 ± 0,88 U/mg 4,48 ± 0,64 U/mg 1,18 ± 0,12 U/mg	Tributyryne Tricapryline Trioléine		DeNigris et al., 1985
Muqueuse gastrique	22 patients (23 à 86 ans)	4800 U/g de tissu frais (sujets de moins de 50 ans) 700 U/g de tissu frais (sujets de plus de 60 ans)	Tributyryne	Patients ne présentant pas de pathologie gastrique	Moreau et al., 1988b
Muqueuse gastrique		118 ± 8,80 U/g de tissu séché	Trioléine		DeNigris et al., 1988
Muqueuse gastrique (fundus)	22 sujets	1,60 ± 0,14 U/mg (0,59-3,35 U/mg)	Trioléine		Abrams et al., 1988
Muqueuse gastrique (corps de l'estomac)	29 sujets sains (3 mois à 26 ans)	1,80-5,30 U/mg (pas de corrélation avec l'âge)	Trioléine (4,2)	Trioléine émulsionnée avec 4 % de lécithines, 1,3 % de monooléine, 1,3 % d'oléate, et 0,65 % de cholestérol	DiPalma et al., 1991
Contenu gastrique pendant un repas standardisé liquide	15 adultes sains (22 à 42 ans)	120 U/mL 1200 U/mg	Tributyryne (6,0)	<b>Repas standardisé liquide:</b> Shak Iso (Sopharga, France) à 12,5 g de lipides, dont 11,2 g de TG (13,6 mmol/375 mL)	Carrière et al., 1993
Contenu gastrique avant et pendant un repas standardisé liquide	5 hommes sains (21 à 22 ans)	58,11 ± 6,00 U/mL à jeun 24,40 ± 3,57 U/mL à 1h 46,66 ± 10,07 U/mL à 2h 40,00 ± 3,53 U/mL à 3h 57,94 ± 7,03 U/mL à 4h	Tributyryne (5,4)	<b>Repas standardisé liquide:</b> Solution de NaCl avec 70 g d'huile d'olive, 1 œuf entier, 1 blanc d'œuf, et 70 g de sucrose, soit 65,5 % de lipides, dont une majorité de TG (86 mmol/400mL)	Armand et al., 1994
Contenu gastrique avant et pendant un repas standardisé liquide	7 hommes sains (19 à 24 ans)	41,11 ± 8,13 U/mL à jeun 11,41 ± 1,76 U/mL à 1h 17,40 ± 3,25 U/mL à 2h 24,70 ± 4,21 U/mL à 3h 43,91 ± 6,09 U/mL à 4h	Tributyryne (5,4)	<b>Repas standardisé liquide:</b> Solution de NaCl avec 70 g d'huile d'olive, 1 œuf entier, 1 blanc d'œuf, et 70 g de sucrose, soit 65,5 % de lipides, dont une majorité de TG (86 mmol/400mL)	Armand et al., 1996a
Contenu gastrique après ingestion d'un substitut de lait	13 nouveau-nés prématurés	0,0556 ± 0,0117 U/mL (0,0042-0,1400 U/mL)	Tripalmitine (5,4)	Poids de naissance: 1050 à 1786 g	Hamosh et al., 1978
Contenu gastrique prélevé juste après la naissance, dans le cadre des soins habituels	142 nouveau-nés (26 à 41 semaines)	0,333 ± 0,066 U/mL (poids de naissance < à 2Kg) 0,558 ± 0,045 U/mL (poids de naissance > à 2Kg)	Trioléine (4,2)	Trioléine émulsionnée avec 4 % de lécithines, 1,3 % de monooléine, 1,3 % d'oléate, et 0,65 % de cholestérol Poids de naissance: 700 g à 4 Kg	Hamosh et al., 1981
Contenu gastrique avant et pendant l'ingestion de lait humain	28 nouveau-nés prématurés (24 à 34 semaines)	8,65 ± 0,88 U/mL à jeun 2,11 ± 0,54 U/mL à 10 min 2,72 ± 0,47 U/mL à 30 min 4,15 ± 0,85 U/mL à 50 min 5,38 ± 1,54 U/mL à 70 min	Trioléine (5,4)	Trioléine émulsionnée avec 4 % de lécithines, 1,3 % de monooléine, 1,3 % d'oléate, et 0,65 % de cholestérol Poids de naissance: 500 g à 1,7 Kg	Armand et al., 1996b
Contenu gastrique avant et pendant l'ingestion du substitut de lait SMA Super Preemie		10,25 ± 1,37 U/mL à jeun 2,83 ± 0,41 U/mL à 10 min 3,16 ± 0,47 U/mL à 30 min 4,74 ± 0,61 U/mL à 50 min			
Contenu gastrique avant et pendant l'ingestion du substitut de lait Similac Special Care		8,28 ± 1,24 U/mL à jeun 2,05 ± 0,31 U/mL à 10 min 2,71 ± 0,31 U/mL à 30 min 4,43 ± 0,90 U/mL à 50 min 4,93 ± 1,23 U/mL à 70 min			
Contenu gastrique avant et pendant l'ingestion d'un repas test riche en lipides, après 2 semaines d'alimentation spontanée (5,6 ± 0,9 g de lipides/kg PC/j)	6 enfants atteints de mucoviscidose (2 à 14 ans)	19,47 ± 4,54 U/mL à jeun 5,20 ± 1,06 U/mL à 20 min 11,74 ± 1,45 U/mL à 40 min 13,91 ± 1,91 U/mL à 60 min 13,72 ± 2,25 U/mL à 80 min 17,19 ± 2,21 U/mL à 100 min 13,05 ± 4,00 U/mL à 120 min	Trioléine (5,4)	Trioléine émulsionnée avec 4 % de lécithines, 1,3 % de monooléine, 1,3 % d'oléate, et 0,65 % de cholestérol Régimes modéré et riche en lipides apportant respectivement 30 et 50 % de l'énergie sous forme de lipides <b>Repas test modéré en lipides:</b> 240 mL de substitut de lait Ensure (Mead Johnson, USA), apportant 31,4 % de lipides <b>Repas test riche en lipides:</b> 138 mL de substitut de lait Ensure (Mead Johnson, USA), 4 c. à café de protéines en poudre, 11 mL d'huile de maïs et de l'eau qsp 240 mL, apportant 54 % de lipides	Armand et al., 2004
Contenu gastrique avant et pendant l'ingestion d'un repas test riche en lipides, après 2 semaines d'un régime riche en lipides (6,1 ± 1,1 g de lipides/kg PC/j)		16,05 ± 2,17 U/mL à jeun 5,99 ± 1,72 U/mL à 20 min 11,02 ± 2,24 U/mL à 40 min 10,23 ± 3,07 U/mL à 60 min 14,66 ± 1,46 U/mL à 80 min 18,68 ± 0,00 U/mL à 100 min			
Contenu gastrique avant et pendant l'ingestion d'un repas test modéré en lipides, après 2 semaines d'un régime modéré en lipides (2,9 ± 0,4 g de lipides/kg PC/j)		17,01 ± 4,39 U/mL à jeun 3,88 ± 0,64 U/mL à 20 min 8,05 ± 1,39 U/mL à 40 min 11,63 ± 2,01 U/mL à 60 min 14,56 ± 2,20 U/mL à 80 min 21,45 ± 5,48 U/mL à 100 min			

Source de lipase gastrique	Sujet	Activité	Substrat (pH)	Commentaires	Référence
Contenu gastrique avant et pendant l'ingestion d'une émulsion artificielle fine	8 hommes sains (24 ans en moyenne)	64,40 ± 18,85 U/mL à jeun 10,39 ± 1,95 U/mL à 30 min 18,16 ± 4,83 U/mL à 1 h 25,08 ± 6,33 U/mL à 2 h 39,80 ± 5,04 U/mL à 3 h 33,44 ± 8,53 U/mL à 4 h 41,20 ± 9,97 U/mL à 5 h	Tributyryne (5,4)	Emulsions apportant 57 % de l'énergie sous forme de lipides Granulométries de 0,7 ± 0,2 µm pour l'émulsion fine et 10,1 ± 0,9 µm pour l'émulsion grossière	Armand et al., 1999
Contenu gastrique avant et pendant l'ingestion d'une émulsion artificielle grossière		36,30 ± 6,14 U/mL à jeun 9,98 ± 3,62 U/mL à 30 min 11,97 ± 3,37 U/mL à 1 h 41,76 ± 10,72 U/mL à 2 h 40,55 ± 6,52 U/mL à 3 h 43,48 ± 3,92 U/mL à 4 h 32,29 ± 4,18 U/mL à 5 h			
Suc gastrique	21 adultes sains (51 ans en moyenne) 34 adultes sains (25-71 ans) 5 adultes sains (25-71 ans) 7 enfants sains (10-144 mois) 17 adultes souffrant d'UD (26-76 ans) 13 patients souffrant de PCC (16-72 ans) 6 enfants atteints de mucoviscidose (1-30 mois)	64 ± 9 U/mL (B) 63 ± 8 (B), 80 ± 8 (PG) U/mL 75 ± 17 (B), 112 ± 23 (PG) U/mL 68 ± 12 U/mL (B) 60 ± 7 (B), 79 ± 12 (PG) U/mL 52 ± 13 (B), 76 ± 9 (PG) U/mL 30 ± 6 U/mL (B)	Tributyryne		Moreau et al., 1988c
Suc gastrique	8 adultes sains (20 à 25 ans)	28,4 ± 4,5 - 25,9 ± 5,7 U/mL	Tributyryne (5,5)		Wojdemann et al., 1998a
Suc gastrique	7 adultes sains (22 à 28 ans)	12,4 ± 4,9 U/mL	Tributyryne (5,5)		Wojdemann et al., 1999
Suc gastrique	26 (B) et 29 (PG) patients	130 ± 62 (50-239) U/mL (B) 79 ± 49 (17-240) U/mL (PG)	Tributyryne (6,0)	Patients venus pour une exploration fonctionnelle	Ville et al., 2002
Suc gastrique (à jeun), après deux semaines de régime pauvre ou riche en lipides	9 adultes sains (21 à 41 ans)	5,67 ± 0,46 U/mL (B) 5,16 ± 1,27 U/mL (PG) (0,65 g de lipides/Kg de PC/j) 9,89 ± 1,47 U/mL (B) 7,51 ± 1,54 U/mL (PG) (1,89 g de lipides/Kg de PC/j)	Trioléine (5,4)	Trioléine émulsifiée avec 4 % de lécithines, 1,3 % de monooléine, 1,3 % d'oléate, et 0,65 % de cholestérol	Armand et al., 1995
Suc gastrique Lipase gastrique purifiée Lipase gastrique purifiée Lipase gastrique purifiée Lipase gastrique purifiée Lipase gastrique purifiée	13 adultes souffrant d'ulcère ou d'atrophie gastrique	50-70 U/mL 540 U/mg (10 µM BSA) 700 U/mg (6 mM SB) 1160 U/mg 50-70 U/mL 570 U/mg (20-50 µM BSA) 300 U/mg (sans SB) 600 U/mg	Tributyryne (5,4)  Tributyryne (6,0) Intralipide (5,4)  Intralipide (4,5-5,5)		Gargouri et al., 1986a
Suc gastrique Lipase gastrique purifiée Suc gastrique Lipase gastrique purifiée Lipase gastrique purifiée		32 U/mg 34 U/mg 33 U/mg 32 U/mg 1300 U/mg	Mélange de TG (repas standardisé liquide)  Mélange de TG (repas standardisé solide) Tributyryne (4,5)	Repas standardisé liquide: Shak Iso (Sopharga, France) à 12,5 g de lipides, dont 11,2 g de TG (13,6 mmol/375 mL) Repas standardisé solide: repas mixé (bœuf, frites, haricots verts, marmelade de pommes, beurre et eau) à 27,4 g de lipides, dont 25 g de TG (30 mmol/700 mL)	Carrière et al., 2000
Lipase gastrique purifiée		400 U/mg 45 U/mg	Tributyryne (5,3) Trioléine (5,3)	A partir du suc gastrique prélevé chez 15 individus en sécrétion basale et sous stimulation à l'histamine	Tiruppathi et Balasubramanian, 1982
Lipase gastrique purifiée		1200 U/mg	Tributyryne		Moreau et al., 1992
Lipase gastrique purifiée Lipase gastrique purifiée Lipase gastrique recombinante Lipase gastrique recombinante		1080 U/mg 365 U/mg 745 U/mg 684 U/mg	Tributyryne (6,0) Intralipide (5,0) Tributyryne (5,6) Intralipide (4,0)	Lipase gastrique recombinante exprimée dans le système Baculovirus/cellules d'insecte	Wicker-Planquart et al., 1999
Lipase gastrique purifiée	Adultes sains	910 U/mg	Tributyryne (5,4)	A partir du suc gastrique prélevé sous stimulation à la pentagastrine	Pafumi et al., 2002
Lipase gastrique recombinante		580 U/mg	Tributyryne (5,7)	Expression dans le système Baculovirus/cellules d'insecte	Roussel et al., 1999

Abréviations: TG, triglycérides; Kg PC, kilogramme de poids corporel; (B), suc gastrique collecté dans les conditions basales; (PG), suc gastrique collecté sous stimulation à la pentagastrine; UD, ulcères duodénaux; PCC, pancréatite chronique alcoolique.

Stratégies d'amélioration de la biodisponibilité des acides gras :  
Approches physico-chimiques et enzymatiques.

La biodisponibilité des nutriments lipidiques dépend d'un processus physico-chimique et enzymatique complexe : digestion par les lipases dans l'estomac puis l'intestin, absorption par les entérocytes et transport vers les cellules utilisatrices. L'altération physiologique (nouveau-né, personne âgée) ou pathologique (mucoviscidose, pancréatite) de ce processus réduit la biodisponibilité des acides gras essentiels, indispensables au développement et au fonctionnement des cellules de l'organisme.

Ce mémoire présente des stratégies permettant d'améliorer la biodisponibilité des nutriments lipidiques chez l'insuffisant pancréatique, en utilisant les propriétés physico-chimiques des lipides. En effet, elles déterminent des caractéristiques primordiales de l'interface lipidique (surface, composition), au niveau de laquelle se déroule l'hydrolyse enzymatique.

Nos travaux montrent, *in vitro* dans des conditions proche de la physiologie, que le type de phospholipide entrant dans la composition d'une émulsion de trioléine, ou l'ajout d'un type donné d'acide gras libre dans le mélange lipidique avant l'émulsification, modifie la taille et le potentiel zêta des globules lipidiques, influence l'action des lipases gastrique, pancréatique et stimulée par les sels biliaires, et module l'absorption des acides gras par des cellules Caco-2. Un effet majeur est obtenu avec le lysophosphatidylinositol, rendant ce lipide potentiellement utilisable en nutrition clinique. Il présente un comportement interfacial étonnant (aire moléculaire, compressibilité) et son mécanisme d'action associe des effets indirects (modifications de l'interface lipidique) et directs (interactions avec les lipases).

**Mots clés:** Biodisponibilité des acides gras, Propriétés physico-chimiques des lipides, Insuffisance pancréatique, Phospholipides, Globules lipidiques, Lipases gastrique et pancréatique, Lipase stimulée par les sels biliaires, Nutrition clinique.

Strategies for improving fatty acid bioavailability :  
Physicochemical and enzymatic approaches.

Bioavailability of lipid nutrients depends on a complex physicochemical and enzymatic process: digestion by lipases in the stomach then the intestine, uptake by the enterocytes and transport towards the user cells. Physiological (newborn infants, aged people) or pathological (cystic fibrosis, pancreatitis) impairment of this process reduces the bioavailability of the essential fatty acids, which are required for development and functioning of body cells.

This manuscript presents strategies for improving lipid nutrients bioavailability in subjects suffering from pancreatic insufficiency, by using the physicochemical properties of lipids. Indeed, they determine major characteristics of the lipid interface (area, compounding), where enzymatic hydrolysis occurs.

Our work shows, *in vitro* under conditions close to physiology, that the type of phospholipid entering the composition of a triolein emulsion, or the addition of a certain type of free fatty acid in the lipid mixture before emulsification, modifies the size and zeta potential of the lipid droplets, influences the action of gastric, pancreatic and bile salt-stimulated lipases, and modulates fatty acid absorption by Caco-2 cells. A large effect is obtained with the lysophosphatidylinositol, making this lipid molecule potentially usable in clinical nutrition. It presents an amazing interfacial behavior (molecular area, compressibility) and its mechanism of action associates indirect effects (modifications of the lipid interface) and direct ones (interactions with lipases).

**Key words:** Fatty acid bioavailability, Physicochemical properties of lipids, Pancreatic insufficiency, Phospholipids, Lipid droplets, Gastric and pancreatic lipases, Bile salt- stimulated lipase, Clinical nutrition.