



Université Mohamed Khider de Biskra

Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie

Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :

Lamia ZIRE

Rokaya DADI

Le :

Thème

**Composition des phospholipides du lait : étude de la membrane des
globules gras**

Jury :

Mme. Fatima NEFOUCI

MAA Université de Biskra

Président

Mme. Asma BOUCIF

MCB Université de Biskra

Examineur

M. Ahmad ATHAMENA

MCB Université de Biskra

Rapporteur

Année universitaire : 2019 - 2020

REMERCIEMENTS

A Mr ATHAMENA Ahmed pour nous avoir guidé tout au long de la réalisation de ce travail

Nos remerciements s'adressent également à tous ceux qui nous ont aidés :

Nos parents qui nous ont soutenus, un gros merci à vous.

Sincère remerciement à Mme SAKRI Wissem, qui n'a pas hésité de nous transmettre un peu de leur savoir.

Aux personnels de laboratoire de notre département.

DEDICACE

Pour clôturer et finir des années de travail et d'effort, il faut avoir beaucoup de volonté et de courage ... ce jour si souhaité pour moi est déjà à la portée de la main.

Je dédie cette modeste étude scientifique :

Mon père qui m'a encouragé

Ma mère qui a veillé sur ma quiétude et m'a donné tant d'affection, de bonheur et de courage.

Mon oncle Azzedine qui est toujours là pour m'aider à tout moment

Mon mari qui m'encouragé

Ma vie et ma fille Miral

Mes sœurs bien aimées, Souad, Saliha et Abir

Mes frères

Mon amie qui est toujours à mes coté Nadjah Daci

Tous mes professeurs,

Tous mes collègues de la promo biochimie appliqué 2020, surtout Meriem, Radhia, Souad, Ikram, Ahlam.

Tous ceux et celles qui ont partagé avec moi les moments difficiles et les jours meilleurs

LAMIA

DEDICACE

Après des efforts à partir du primaire jusqu'à une faculté si désirée, j'espère avoir fait tout mon possible et que mes parents sont fiers de moi.

A mes parents

Pour leur présence, leur soutien, leur patience et écoute durant toutes ces années, le courage de persévérer dans mes études.

A mes chers frères et sœurs.

A mes nièces et neveux

A tous mes amis

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

ROKAYA

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abreviations

Introduction 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : La membrane des globules gras du lait (composition et structure)

1. Origine de la membrane des globules gras du lait : 3
2. Structure de la membrane des globules gras : 4
3. La composition de la membrane des globules gras du lait : 6
 - 3.1. Les lipides de la membrane des globules gras du lait : 7
 - 3.2. Phospholipides : 7
4. Les protéines de la membrane des globules gras 9

CHAPITRE 2 : Rôle bénéfique de la membrane des globules gras du lait sur la santé

1. Effets de la MFGM sur la santé : 11
2. Effets anti-cancéreux de la membrane des globules gras du lait 12
3. Effet des phospholipides sur les inflammations intestinales 13
4. Effets anti-cholestérol de la membrane des globules gras du lait : 15
5. Utilisation de PL de la MFGM pour encapsuler des composés bioactifs 16

CHAPITRE 3 : Les techniques d'analyses des lipides de la membrane de globules gras du lait.

1. Séparation des phospholipides de la membrane des globules gras du lait bovin par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)..... 18
 - 1.1. Appareillage : 18
 - 1.1.1. Phase mobile et réservoir : 18

1.1.1.1. Les Pompes :	18
1.1.1.2. Injecteurs :	18
1.1.1.3. Détecteurs :	19
1.1.2. Systèmes d'acquisition et d'affichage des données :	19
1.2. Techniques de séparation :	19

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES

1. Réactifs chimique et matériel instrumental :	20
2. Analyse des lipides polaires de la MFGM :	20
2.1. L'isolement de la MFGM.....	20
2.2. Extraction des lipides :	23
2.3. Dosage du phosphore lipidique total :	24
2.4. Analyse quantitative des phospholipides individuels par HPLC :	25

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. Quantification des lipides polaires de la membrane des globules gras :	28
2. Profil de répartition des principales classes de phospholipides de la membrane des globules gras du lait :	30
3. Teneur en glycérophospholipides et sphingolipides:	31
3.1. Glycérophospholipides :	31
3.2. Sphingolipides.....	33
CONCLUSION	35

Références bibliographiques

ANNEXE

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Principales voies de sécrétion des lipides et des protéines synthétisées par la cellule épithéliale mammaire.	4
Figure 2: Structure des globules gras avec la disposition détaillée des principales protéines ..	5
Figure 3: Structures des principaux glycérophospholipides de la graisse du lait	8
Figure 4: Structures de la sphingomyéline et de ses dérivés.....	8
Figure 5: Effets de la sphingomyéline sur la diminution de l'absorption intestinale du cholestérol C14 (C14- CH) pendant 8h chez le rat	15
Figure 6: Différentes étapes d'isolement de la MFGM	21
Figure 7: Isolement de la MFGM à partir de lait cru	22
Figure 8: Schéma générale de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	25
Figure 9: Chromatogramme du détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (ELSD) par chromatographie liquide en phase normale de la fraction lipidique totale de la crème obtenue à partir de vaches nourries avec les deux régimes différents	30

LISE DES TABLEAUX

Tableau 1: Caractéristiques des protéines de la Milk Fat Globule Membrane	10
Tableau 2: Composition estimée de la membrane des globules gras du lait.....	28
Tableau 3: Composition des lipides neutres exprimée en pourcentage des lipides totaux	29
Tableau 4: Aspects nutritionnels des lipides polaires du MFGM	32

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- MFG:** The milk fat globule (Le globule gras du lait)
- MFGM :** Membrane des globules gras du lait «Milk Fat Globule Membrane»
- PL :** phospholipides
- PE :** Phosphatidyléthanolamines
- PC :** Phosphatidylcholines
- SM :** Sphingomyélines
- PI :** Phosphatidylinositols
- PS :** Phosphatidylsérines
- SMUF:** Simulatedmilk ultra filtrate (Ultra filtrat de lait simulé)
- SSA:** Surface spécifique de la membrane des globules gras du lait
- LC :** Lactosyl Céramides
- GC :** Glucosyl Céramides
- CLDs :** cytoplasmic lipid droplets (gouttelettes lipidiques cytoplasmiques)
- ADPH :** L'adipophiline
- BTN :** Butyrophiline
- XDH :** Xanthine Déshydrogénase.
- XO:** Xanthine Oxydase
- MUC1 :** Mucine 1
- CD36 :** le cluster de différenciation
- PAS 6/7 :** Lactadhérine
- PP3 :** Peptone protéase 3
- FA:** Fattyacids (acides gras)
- SDS-PAGE :** Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
(Electrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécylsulfate de sodium)
- PASIII :** l'acide périodique Shift III

INTRODUCTION

Introduction

Le lait de vache contient de 3 à 5 % de matière grasse dispersée sous forme de globules sphériques dont le diamètre varie de 0,1 à 20 μm , avec une valeur moyenne de 3 à 5 μm . Ces globules gras sont hétérogènes ; ils sont essentiellement constitués d'une microgoutte de triglycérides, partiellement cristallisés à température ambiante, entourée d'une fine membrane communément appelée « la membrane du globule gras du lait » ou « milk fat globule membrane » MFGM. Cette enveloppe protectrice est un assemblage complexe de protéines, de phospholipides, de glycoprotéines, de lipides neutres, d'enzymes et autres composés mineurs. Elle agit comme un émulsifiant naturel permettant à la matière grasse, hydrophobe, de demeurer dispersée dans le plasma du lait, hydrophile et contribue de ce fait au maintien de l'émulsion (Vallée, 2015). Grâce à leurs propriétés émulsifiantes, la membrane du globule gras du lait est un excellent ingrédient pour le développement de nouvelles applications nécessitant des émulsifiants, des stabilisants ou des ingrédients fonctionnels dans les domaines alimentaires et non alimentaires (Singh, 2006) (Dewettinck et *al.*, 2008)

En raison de sa composition spécifique en protéines et en lipides polaires, mais aussi des lipides apolaires (tels que le cholestérol et les cérébrosides). L'intérêt croissant pour enrichir les préparations pour nourrissons est basé sur les propriétés bioactives des composants individuels des MFGM dont les effets bénéfiques ont été avérés sur le développement du cerveau, les fonctions cognitives, l'immunité et la physiologie intestinale. Cet intérêt est renforcé par les avantages apportés par la combinaison de ces composants. En effet, la persistance des globules de matière grasse dans l'intestin proximal permet la libération de molécules bioactives dans l'intestin distal, contribuant ainsi à leurs effets physiologiques (Bourlieu et *al.*, 2018)

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

Depuis quelques années, une attention considérable est portée à la MFGM par la communauté scientifique mais aussi par les industriels en raison des bénéfices santé que peut apporter la MFGM. De nombreuses études mettent en évidence le rôle important de certains

Introduction

composés de la MFGM tels que les phospholipides. D'autres études présentent l'effet de la supplémentation en MFGM dans les produits laitiers sur les avantages nutritionnels et le bien-être. Compte tenu de ses effets positifs sur la santé, il nous est apparu donc intéressant d'étudier la membrane des globules gras et de mettre l'accent sur sa composition en phospholipides

Conformément à l'objectif énoncé, le travail est organisé dans ce manuscrit de la manière suivante :

- La première partie est une synthèse bibliographique porte sur les connaissances actuellement de la membrane du globule gras du lait, son origine, sa composition générale, ainsi que son rôle bénéfique sur la santé.
- La deuxième partie renferme l'ensemble des méthodes et des protocoles expérimentaux utilisés et qui sera détaillé dans le chapitre Matériel et méthodes. Le dernier chapitre est consacré aux résultats collectés de différents articles scientifiques, associés à une discussion.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

La membrane des globules gras du lait (composition et structure)

Les globules gras du lait sont essentiellement des gouttelettes lipidiques enrobées d'une enveloppe protectrice. Cette dernière est partiellement dérivée de la membrane plasmique de la cellule sécrétrice ; de par sa nature, elle assure la dispersion de la matière grasse laitière, hydrophobe, dans le plasma du lait, hydrophile. (Danthine et *al.*, 2000). Cette enveloppe protectrice est généralement appelée la « membrane du globule gras du lait » ou « Milk fat globule membrane » (MFGM) (Vallée, 2015)

1. Origine de la membrane des globules gras du lait :

Les globules gras du lait se développent dans les cellules de l'épithélium sécrétoire mammaire. En effet, le réticulum endoplasmique est l'endroit où sont synthétisés à la fois les protéines et les triglycérides ; ces triglycérides sont ensuite accumulés sous forme de petites gouttes dans le cytoplasme. Ces gouttes lipidiques de 1 à 5 µm de diamètre, abondantes dans les cellules sécrétrices, sont appelées CLDs (« Cytoplasmic Lipid Droplets » – gouttelettes lipidiques cytoplasmiques) ; ce sont les précurseurs des globules gras du lait.

(Danthine et *al.*, 2000)

Dès 1959, Bargmann et Knoop ont observé que lorsque les globules bourgeonnent hors des cellules sécrétrices, ils sont enveloppés d'une membrane. Le mécanisme de sécrétion des globules gras le plus largement accepté actuellement est la migration des gouttelettes lipidiques (CLDs) à travers le cytoplasme de la cellule sécrétrice vers le pôle apical de cette cellule. Lorsque les CLDs atteignent cette surface apicale, elles sont graduellement recouvertes par la membrane plasmique de la cellule, jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un fin col non refermé. La sécrétion proprement dite a lieu quand les membranes du col fusionnent entre elles ; la goutte lipidique est alors expulsée dans le lumen alvéolaire. (Danthine et *al.*, 2000)

La sécrétion des CLD au niveau de la membrane apicale ne peut se faire sans la présence de trois protéines qui sont la butyrophiline, la xanthine oxydase et l'adipophiline

(Heid et Keenan, 2005; Mather ,2000; Ollivier-Bousquet, 2002). Ces trois molécules sont capables de s'associer pour former un complexe à l'origine de la fixation du CLD à la membrane apicale et donc de l'initiation du mécanisme de sécrétion. Les mécanismes d'enveloppement du CLD par la membrane, même s'ils font certainement intervenir les microfilaments d'actine, restent assez mal compris. La rupture finale de la membrane apicale et la sécrétion des globules gras sont également assez mal connues.

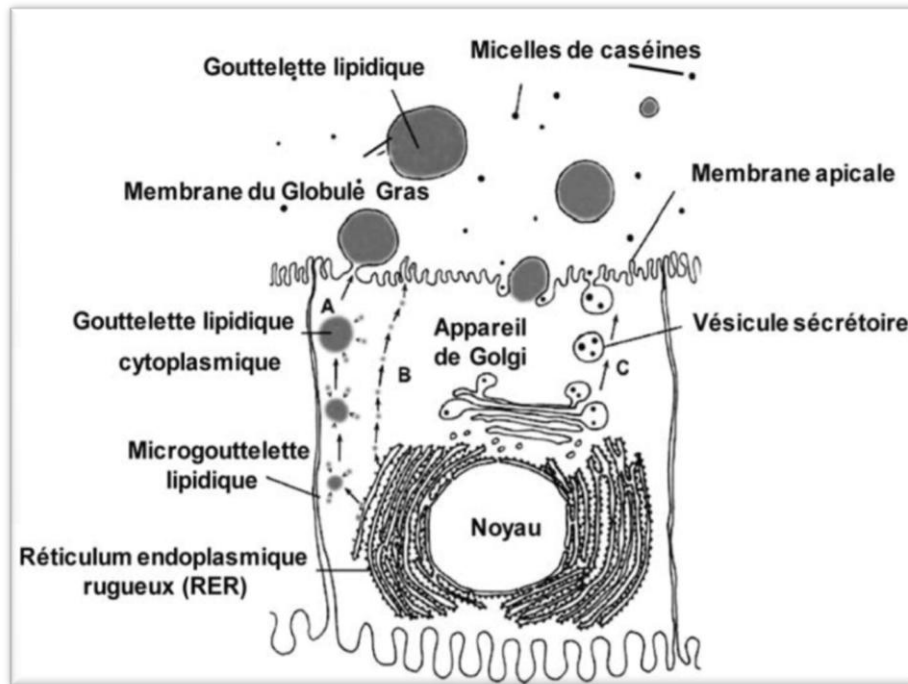


Figure 1: Principales voies de sécrétion des lipides et des protéines synthétisées par la cellule épithéliale mammaire. (Mather et Keenan, 1998)

Les voies C et A correspondent respectivement aux sécrétions des protéines par formation de vésicules sécrétoires puis exocytose (voie C) et des lipides par bourgeonnement ou formation de microgouttelettes lipidiques ou « Micro Lipid Droplet », qui sont sécrétées directement (voie B), ou fusionnent entre elles pour donner des gouttelettes lipidiques cytoplasmiques sécrétées par enveloppement dans la membrane plasmique apicale de la cellule (voie A).

2. Structure de la membrane des globules gras:

L'organisation de la membrane du globule gras est hétérogène. Cela s'explique par les différentes étapes que subit la MG au cours de son transit cellulaire et de sa sécrétion dans la lumière alvéolaire. Son épaisseur est assez variable, mais elle est en moyenne de 10 nm (Mulder et Walstra, 1974).

Elle est constituée de trois parties distinctes (Evers, 2004). La première partie, plus externe, correspond à une bicouche lipidique qui dérive directement de la membrane apicale. Cette bicouche, au même titre que les autres membranes biologiques, possède une structure phospholipidique asymétrique, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline se trouvant principalement sur la face externe de la bicouche et la phosphatidyléthanolamine et le phosphatidylinositol sur la face interne (Danthine et *al.*, 2000). La deuxième partie, plus interne, dériverait de la fraction cytosolique emprisonnée entre le CLD et la membrane apicale au moment de la sécrétion. Cette partie de la membrane du globule gras contient la

xanthine oxydase et la butyrophiline (Danthine et al., 2000). La troisième partie quant à elle correspond à une monocouche de protéines et de lipides polaires provenant du réticulum endoplasmique et déjà présente à la surface des CLD au sein de la cellule (Keenan et Dylewski, 1995).

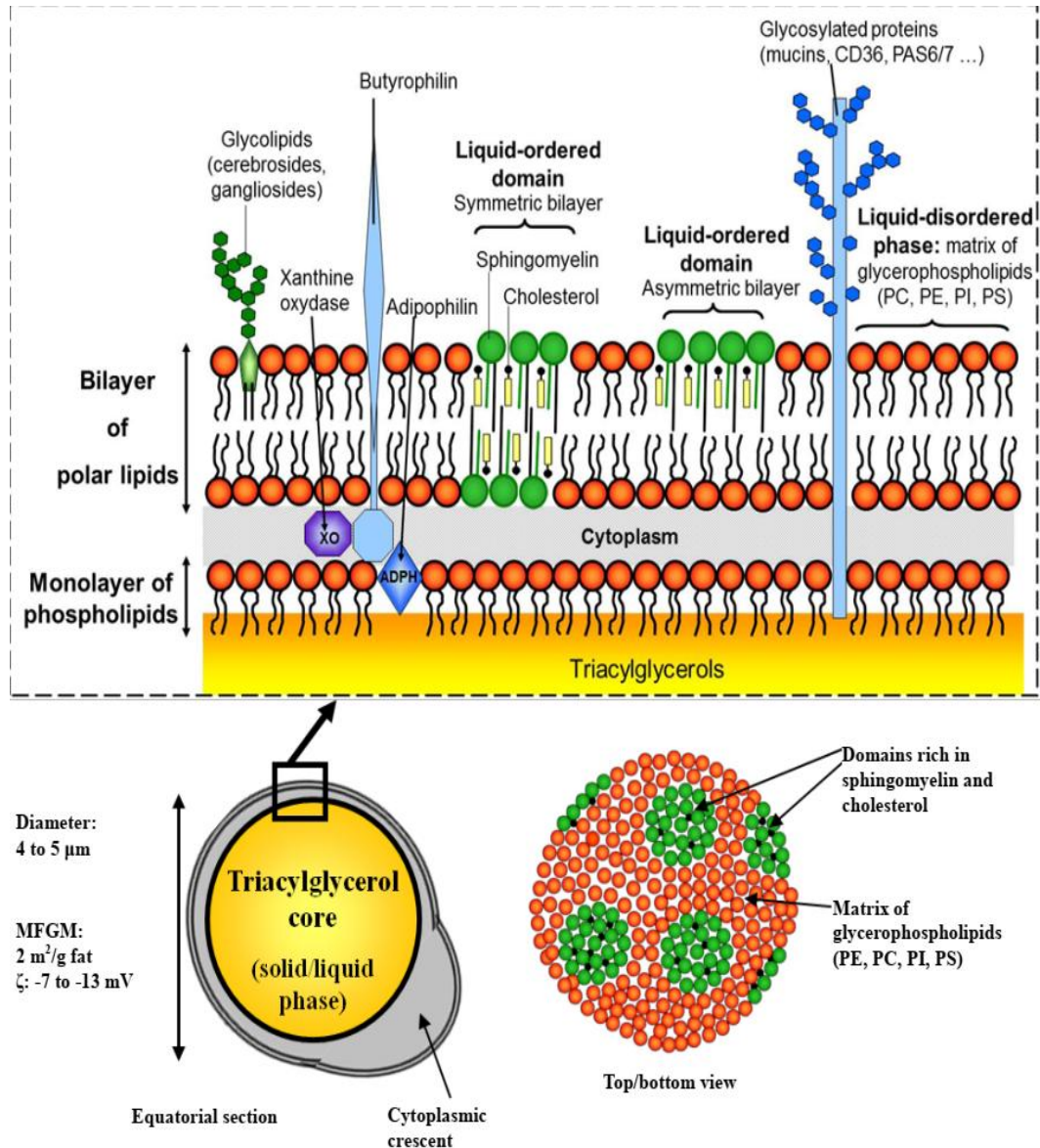


Figure 2: Structure des globules gras avec la disposition détaillée des principales protéines (Vallée, 2015)

Cette partie la plus interne, en contact direct avec le centre de triglycéride, contient entre autres l'adipophiline. La structure de la MFGM est représentée dans la figure 2.

Les protéines présentes dans les MFGM sont disposées aussi de façon asymétrique. L'adipophiline (**ADPH**) possède une grande affinité pour les triglycérides et se retrouve dans la monocouche interne. La protéine xanthine oxydase (**XDH/XO**) présente à la surface de la

monocouche, est liée à la Butyrophiline (**BTN**), une protéine transmembranaire présente sur la bicouche, qui est elle-même liée à ADPH. La liaison de ces trois protéines crée un complexe permettant de connecter et stabiliser la membrane interne avec la membrane externe des globules de gras (Figure 2). La mucine 1 (**MUC1**), le cluster de différenciation (**CD36**) et l'acide périodique Shift III (**PASIII**) sont liés à la bicouche membranaire, tandis que la lactadhérine (**PAS 6/7**) et la peptone protéase 3 (**PP3**) sont seulement attachées à la membrane externe de la bicouche lipidique (Dewettinck et *al.*, 2008)

Lopez et *al.*, (2010) ont également utilisé des sondes spécifiques pour les triacylglycérols, les glycolipides et les glycoprotéines afin d'identifier certaines caractéristiques structurelles de la MFGM telles que la présence d'un domaine rigide composé de sphingomyéline et de cholestérol et l'existence d'une zone hétérogène constituée de glycolipides et de glycoprotéines.

Au moment de la sécrétion et de la traite de la vache, la composition et la structure des MFGM sont sujettes à des modifications selon l'âge de la vache, la qualité bactériologique du lait, le stade de lactation et la saison. Ces effets sont minimes en comparaison avec les effets du traitement du lait sur la composition des MFGM (Dewettinck et *al.*, 2008), tels que le chauffage, le refroidissement, l'homogénéisation ou encore l'évaporation qui sont connus pour dénaturer les protéines du lait ou modifier les équilibres minéraux

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

3. La composition de la membrane des globules gras du lait :

Dans la plupart des analyses de composition des isolats de membrane obtenus à l'aide des techniques d'isolements, la somme des lipides et des protéines dépasse 90 % du poids sec. Cependant, les proportions relatives de ces 2 composants varient fortement selon les auteurs. Ces variations ont des origines multiples. Elles peuvent notamment provenir du mode de déstabilisation des globules gras, du mode de récupération des fragments membranaires, ainsi que d'autres facteurs non maîtrisables liés à la matière première qu'est le lait. Parmi ces derniers, nous pouvons citer la race et l'âge de l'animal, son régime, son stade de lactation, le

facteur saisonnier. Les plus grandes variations de composition sont observées au sein des lipides neutres et plus particulièrement des triglycérides (Danthine et *al.*, 2000)

Chaque globule gras du lait est entouré d'une couche superficielle ou membrane. Cette couche a pour fonction d'empêcher la coalescence des globules gras. Sa composition est complètement différente de celle de la matière grasse du lait ou du plasma du lait et ressemble à celle d'une membrane cellulaire, dont dérive en grande partie la membrane des globules gras.

Les phospholipides et les cérébrosides, ils comportent de nombreux résidus d'acides gras insaturés. La composition des protéines de la membrane est complexe ; il existe au moins 10 espèces principales et plusieurs composés mineurs. Il s'agit principalement de glycoprotéines spécifiques des membranes, dont la butyrophiline, qui semble être spécifique des globules gras du lait, un autre le composant le plus important est la peptone protéique 3, qui est également présente dans le sérum du lait. Plusieurs des protéines membranaires sont des enzymes : la phosphatase alcaline et la xanthine oxydase sont, pour la plupart, dans la membrane et constituent une partie considérable de ses protéines.

Presque tous les lipides de la membrane sont des lipides polaires, en particulier les phospholipides. On a souvent dit que la membrane contenait une quantité importante de triglycérides à haut point de fusion, mais cela est très peu probable. (Les préparations obtenues à partir du lait et supposées représenter la matière de la membrane peuvent facilement être contaminées par des cristaux de triglycérides)

3-1 Les lipides de la membrane des globules gras du lait :

Les lipides polaires de la MFGM sont constitués de phospholipides et de sphingolipides. Il s'agit de molécules amphiphiles comportant une queue hydrophobe et un groupe de tête hydrophile.

3-2 Phospholipides :

Les phospholipides sont des lipides polaires très présents dans les cellules membranaires. Dans le lait classé comme lipides complexes, se distinguent par la présence de phosphore dans leur structure. Ils contiennent du glycérol ou de la sphingosine relié à un ou deux acides gras et à un groupement phosphate auquel est attaché un groupement azoté qui peut être la choline, l'éthanol amine ou la sérine (Vingnola, 2010)

Glycérophospholipides sont constitués d'un squelette de glycérol sur le quel deux acides gras (AG) sont estérifiés, un résidu phosphate avec différents groupes organiques (choline, sérine, éthanol amine, etc.) peut être lié au troisième groupe hydroxyle (Dewettinck et *al.*,

2008), la figure 1 montre la structure des PL les plus importants de la matière grasse du lait : phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI) et phosphatidylsérine (PS), les deux acides gras, représentés principalement par des AG non saturés, sont estérifiés au niveau de les positions sn-1 et sn-2 du squelette du glycérol (Contarini et Povo, 2013)

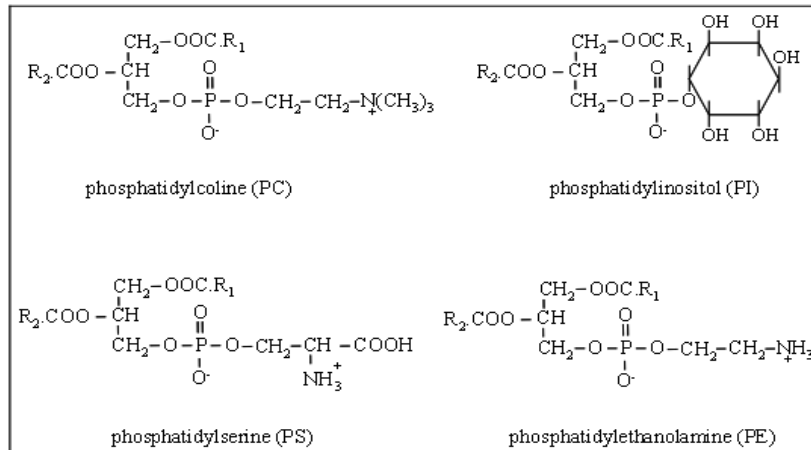


Figure 3: Structures des principaux glycérophospholipides de la graisse du lait (Contarini et Povo, 2013)

Les sphingolipides sont constitués de la base sphingoïde, une amine aliphatique à longue chaîne, contenant deux ou trois groupes hydroxyle, un céramide est formé lorsque le groupe amine de cette base sphingoïde est lié à un FA, sur cette unité céramide, un groupe organophosphate peut être lié pour former un sphingophospholipide (par exemple, la phosphocholine dans le cas de la sphingomyéline, SM) ou un saccharide pour former les sphingoglycolipides (glycosylcéramides) (Dewettinck et al., 2008)

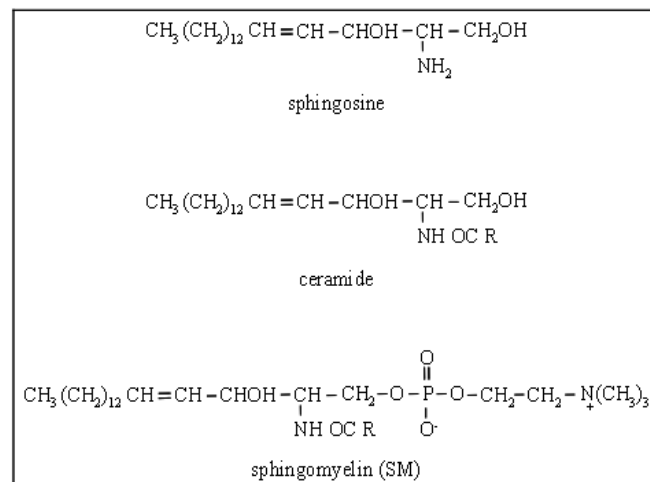


Figure 4: Structures de la sphingomyéline et de ses dérivés (Contarini et Povo, 2013)

Les lipides polaires ou complexes comprennent les glycolipides et les phospholipides. Ces derniers ont à la fois des propriétés hydrophiles et hydrophobes, et de ce fait contribuent largement au rôle émulsifiant de la membrane.

3-2- Les protéines de la membrane des globules gras :

Les MFGM sont composées de 1 à 4 % des protéines totales présentes dans le lait. Malgré leur contenu faible en protéines, elles jouent un rôle important dans plusieurs processus cellulaires et dans les mécanismes de défense des nouveau-nés. Dépendamment des études et de la source, les membranes des globules gras sont composées entre 25 et 60% de protéines (Vanderghem *et al.*, 2010). Environ 28 enzymes ou activités enzymatiques ont été détectées dans les préparations de MFGM. Les 8 protéines majoritaires de la MFGM sont la mucine 1, la xanthine oxydase, la butyrophiline, l'acide périodique de Schiff 6/7 (PAS 6), l'acide périodique de Schiff III (PAS 3), Cluster de différenciation 36 (CD36), l'adipophiline (ADPH) et la protéine de liaison des globules gras (FABP) (Struijs *et al.* 2013)

Cette composition est variable en fonction des techniques mises en œuvre pour extraire ces protéines. Cependant, certaines protéines de la membrane des globules gras n'ont pas encore été identifiées, leur structure et séquence en acides aminés est encore floue et des recherches sont en cours à ce propos. Le tableau n°04 ci-après résume les caractéristiques de chacune de ces protéines. (Lee *et al.*, 2018).

Tableau 1: Caractéristiques des protéines de la Milk Fat Globule Membrane (Lee et al., 2018)

	Mucine 1	Xanthine oxydase	Butyrophiline	Adipophiline	PAS 6/7	PAS 3
Masse moléculaire par SDS - PAGE Da	160-200 Da	146-155 Da	66-67 Da	52 Da	43-59 Da	95-100Da
Degré de glycosylation	50%	-	+	-	+	++
Présence d'acide sialique	Oui	Non applicable	non	Non applicable	oui	Non déterminé
Rôles	Protection des muqueuses contre les dommages physiques et les microorganismes	Antimicrobien	Sécrétion de la membrane des globules gras	Sécrétion des globules gras et transport des acides gras à longue chaîne et des triglycérides	Liaison au rotavirus et protection contre les gastroentérites	/
Dénaturation Thermique	Un court chauffage à 80°C peut la déplacer de son point d'attache avec la membrane	80°C/10s	58°C	/	/	/

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

CHAPITRE 2

Rôle bénéfique de la membrane des globules gras du lait sur la santé

1. Effets de la MFGM sur la santé :

Les progrès réalisés dans la connaissance de la composition et du rôle des composants de la membrane des globules gras du lait ont permis de constater que certains d'entre eux possèdent des propriétés biologiques qui vont au-delà de leur importance nutritionnelle. Spitsberg (2005), dans son article, fait référence à la membrane des globules gras du lait (MFGM) comme un nutraceutique ayant un potentiel nutritionnel et pharmaceutique. En fait, la MFGM contient des protéines antimicrobiennes, des suppresseurs de maladies et des micronutriments - des protéines de liaison qui fixent des composés comme le fer, le zinc, le cuivre, le folate et la vitamine B1, ainsi que d'autres composants, ayant des propriétés anti-cancérigènes. En effet, Lonnerdal et al. (2006) ont complété les aliments pour nourrissons avec des MFGM bovins et des micronutriments pour évaluer leur effet sur la croissance, la nutrition et la morbidité des enfants. Dans une étude en double aveugle portant sur des nourrissons âgés de 6 à 11 mois (n = 550), la supplémentation des aliments a permis d'améliorer le taux de cuivre et de la vitamine B12 chez les sujets, ce qui améliore la croissance et le fonctionnement normal du cerveau et du système nerveux, respectivement. Wat et al. (2009) ont ajouté du PL bovin à des souris nourries avec un régime riche en graisses, ce qui a entraîné une réduction du poids du foie, des lipides totaux hépatiques et des taux de lipides sériques, ce qui pourrait être bénéfique pour les humains souffrant de stéatose hépatique non alcooliques, en particulier les patients obèses et diabétiques.

2. Effets anticancéreux de la membrane des globules gras du lait :

Les acides gras libres non estérifiés à longue chaîne sont les éléments de base de la synthèse des triglycérides. Ils sont de plus en plus reconnus comme des médiateurs intracellulaires de l'expression des gènes. Les gènes BRCA1 et BRCA2 sont associés au cancer du sein et de l'ovaire, car ils participent à la réparation des lésions que l'ADN subit régulièrement et contrôlent la division des cellules. La présence de mutations dans l'un de ces deux gènes perturbe cette fonction et fait augmenter fortement le risque de cancer du sein et de l'ovaire. Les gènes BRCA1 et BRCA2 codent pour les protéines qui ont des rôles majeurs dans des processus de réparation de l'ADN et agissent en tant que suppresseurs de tumeur (par inhibition de croissance de cellules cancéreuses). Ces protéines ont été identifiées dans la membrane des globules gras du lait humain et bovin par la méthode Western blot et immunoprécipitation (Vissac et al., 2002). Il a été constaté que les protéines de liaison aux acides gras isolées à partir de MFGM inhibent la croissance de certaines lignées cellulaires de cancer du sein in vitro à de très faibles concentrations.

De plus, plusieurs lipides de la MFGM peuvent agir comme molécules de signalisation intracellulaire, comme la sphingomyéline qui possède des propriétés anticancéreuses (notamment dans le cancer du côlon). Surtout grâce à deux de ses métabolites, la sphingosine et la céramide, ils interviennent dans les mécanismes de signalisation transmembranaires qui contrôlent la croissance, le développement et la différenciation des cellules. SNOW et al. (2010) ont démontré qu'un aliment riche en phospholipides bovin issu du MFGM prévenait le cancer intestinal chez les rats.

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

3. Effet des phospholipides sur les inflammations intestinales :

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

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

Toutes ces données ont été soumises à des tests statistiques tels que le t test lorsqu'une distribution normale de la population a été démontrée et par des tests non-paramétriques pour

les autres (Mann-Whitney). Les réponses aux questions spécifiques ont été analysées par un test du chi 2

Le changement de nutrition a eu un effet sur les épisodes fiévreux des enfants qui ont diminué, de même pour les épisodes fébriles de courte durée. L'effet protecteur dû à la consommation régulière de cette boisson a pu être constaté après 6 semaines. Il existe tout de même certains biais dans cette étude. Environ $\frac{1}{4}$ des enfants ont abandonné l'étude dès le début à cause du goût chocolaté de la boisson et 13 ont été exclus car ils n'avaient pas suivi l'étude jusqu'au bout (moins de 80% des jours). De plus, l'origine des épisodes fébriles apparus chez certains enfants n'a pas été démontrée. Il peut en effet, juste s'agir d'infections virales bénignes.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence les effets protecteurs de la barrière gastro-intestinale par la MFGM ainsi que ses effets sur les troubles intestinaux et les infections comme la fièvre, la diarrhée, la toux. La formule enrichie en composants de la MFGM a été considérée comme sûre pour la santé et bien tolérée par les enfants. Il a aussi été constaté dans cette étude que l'administration de la formule enrichie en MFGM permettait de mieux réguler les comportements comme l'humeur et le stress chez les enfants.

Selon Dewettinck et *al.*, (2008), les sphingolipides auraient un effet antibactérien. En effet, ils auraient la capacité de jouer un rôle protecteur contre les toxines bactériennes et contre les infections virales et bactériennes, en compétitionnant pour les sites de liaison et en devenant un site de liaison pour les bactéries. Cette compétition nuit aux pathogènes intestinaux, car la première étape d'une infection est l'adhésion aux muqueuses intestinales (Dewettinck et *al.*, 2008). De plus, les protéines oxydases xanthines (XDH/XO) auraient aussi un impact antibactérien à l'intérieur du tractus gastro-intestinal. Ce système catalyse la réduction du nitrite inorganique en oxyde nitrique et en présence d'oxygène, il convertirait en oxyde nitrique et en peroxy-nitrite. Ces deux substances ont des propriétés antibactériennes. Les MFGM créent des sites de liaison en compétitionnant avec les sites présents sur la membrane épithéliale, ce qui rend en même temps les bactéries plus disponibles à l'action du XDH/XO

Il a également été rapporté que chez le rat soumis à des stress infectieux induits par des bactéries pathogènes telles que *Clostridium difficile* ou *Listeria monocytogenes*, l'effet protecteur des MFGM a été associé à la stimulation de la sécrétion de mucines et à la prévention de l'adhérence des pathogènes à la muqueuse intestinale (Bhinder et *al.*, 2017; Sprong et *al.*, 2012). L'incorporation de matière grasse laitière enrichie en MFGM dans l'alimentation de souris soumises à un challenge inflammatoire (par injection intra-péritonéale

de LPS) a diminué l'inflammation et la perméabilité intestinales (Snow *et al.*, 2011). Ces effets pourraient être en partie liés à la présence de gangliosides qui inhiberaient la dégradation des protéines des jonctions serrées (occludine) induite par une inflammation aiguë en réponse à un challenge LPS (Park, Thomson, et Clandinin, 2010). Ainsi, l'implication des MFGM et de ses composants dans la protection de l'intégrité de la barrière intestinale est démontrée dans des conditions de challenge inflammatoire ou infectieux, suggérant un effet protecteur de la barrière intestinale principalement dans des conditions inflammatoires aiguës.

4. Effets anti-cholestérol de la membrane des globules gras du lait :

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

Concernant, l'assimilation du cholestérol, une étude sur les rats (Noh et Koo, 2004) a démontré que la sphingomyéline pouvait diminuer, selon la dose, l'absorption intestinale du cholestérol et des graisses (Figure 5).

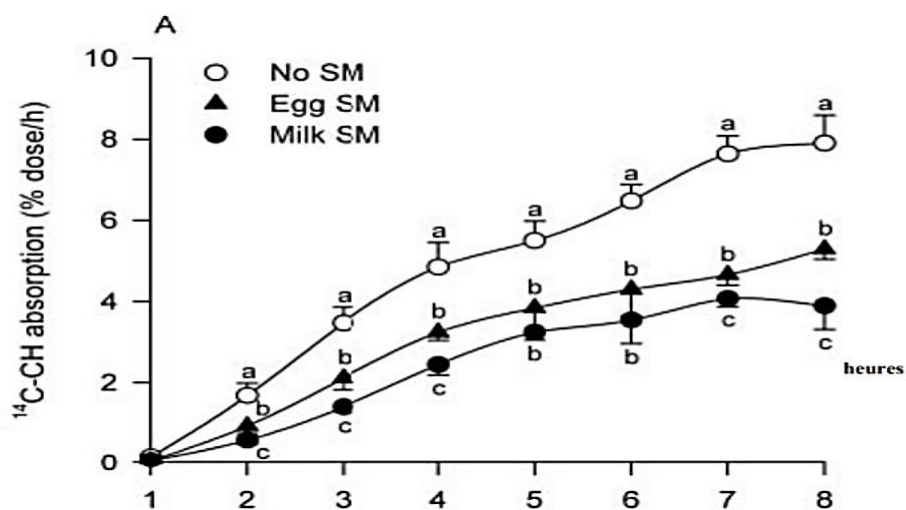


Figure 5: Effets de la sphingomyéline sur la diminution de l'absorption intestinale du cholestérol C14 (C14-CH) pendant 8h chez le rat (Noh et Koo, 2004)

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

Ce serait en effet les groupes acyle gras des longues chaînes saturées de la sphingomyéline du lait qui seraient responsables de l'inhibition directe de la lipolyse lumenale, de la solubilisation des micelles et qui auraient une action sur le transfert des lipides micellaires vers les anthérocytes. Ce serait aussi la saturation importante des groupes acyle de la sphingomyéline de la MFGM qui favoriserait son effet inhibiteur par rapport à la sphingomyéline issue d'autres sources que le lait (Noh et Koo, 2004) .

5. Utilisation de PL de la MFGM pour encapsuler des composés bioactifs

Un liposome est une vésicule sphérique formée par l'auto-assemblage de molécules amphiphiles comme les phospholipides avec un diamètre allant de 20 nm à plusieurs microns. Les liposomes sont constitués d'une bicouche de phospholipides, d'un noyau aqueux et d'une couche périphérique hydrophobe en surface. Les liposomes sont fréquemment utilisés en industries cosmétiques et pharmaceutiques pour la protection et la libération de nutraceutiques et de molécules actives (Maherani et *al.*, 2011) (Singh 2006). Dans l'industrie alimentaire, les liposomes peuvent être utilisés pour encapsuler des composés bioactifs. La lécithine de soja ou de jaune d'œuf, qui est généralement utilisée pour former les liposomes, est très coûteuse (Mozafari et *al.*, 2008; Thompson et *al.*, 2006). La MFGM a récemment été proposée comme alternative aux lécithines traditionnellement.

CHAPITRE 3

Les techniques d'analyses des lipides de la membrane de globules gras du lait.

1. Séparation des phospholipides de la membrane des globules gras du lait bovin par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC)

La chromatographie est une technique analytique basée sur la séparation des molécules différencées dans leur structure et/ou la composition. En général, la chromatographie implique le déplacement d'un échantillon dans le système au cours d'une phase stationnaire. Les molécules de l'échantillon auront des affinités différentes et les interactions avec le support fixe, conduisant à la séparation des molécules. Les composants de l'échantillon qui présentent des interactions avec la phase stationnaire se déroulent plus lentement à travers la colonne que les composants à faible interactions. (Kupiec, 2004)

1.1 Appareillage :

1.1.1 Phase mobile et réservoir :

Le type et la composition de la phase mobile affectent la séparation des composants. Différents solvants sont utilisés pour différents types de HPLC. Pour la CLHP en phase normale, le solvant généralement non polaire et dans la HPLC en phase inverse, le solvant est normalement un mélange d'eau et d'un solvant organique polaire. La pureté des solvants et des sels inorganiques utilisés pour fabriquer la phase mobile est primordiale. (Kupiec, 2004)

1.1.1.1 Les Pompes :

Des pompes à haute pression sont nécessaires pour pousser la phase mobile à travers la phase stationnaire et bondée. Une pression de pompe constante (généralement environ 1000-2000 psi) est nécessaire pour assurer la reproductibilité et la précision. L'incapacité à créer une pression, ou les fuites peuvent indiquer que la pompe n'est pas fonctionnelle correct. (Kupiec, 2004)

1.1.1.2 Injecteurs :

Un injecteur pour un système HPLC doit fournir injection de l'échantillon liquide dans la plage de 0,1 à 100 ml de volume avec une grande reproductibilité et sous haute pression (jusqu'à 4000 psi). Pour la chromatographie liquide, les échantillons liquides peuvent être directement injectés et les échantillons solides n'ont qu'à être diluer dans le solvant approprié. (Kupiec, 2004)

1.1.1.3 Détecteurs :

Il existe de nombreux types de détecteurs qui peuvent être utilisés pour la HPLC. Le détecteur est utilisé pour détecter la présence d'un composé passant à travers et pour fournir un signal électronique à un dispositif d'acquisition de données. Les principaux types de détecteurs utilisés dans la CLHP sont l'indice de réfraction (IR), l'ultraviolet (UV-Vis) et fluorescence, mais il existe aussi des réseaux de diodes, et des détecteurs de conductivité. (Kupiec, 2004)

1.1.2 Systèmes d'acquisition et d'affichage des données :

Les techniques d'acquisition peuvent aider à l'analyse du signal. Les données le système d'acquisition de la plupart des systèmes HPLC est un ordinateur. Le site de L'ordinateur intègre la réponse du détecteur à chaque component et le place dans un chromatographe facile à lire et d'interpréter. Ces caractéristiques sont les suivantes. (Kupiec, 2004)

1.2 Techniques de séparation :

L'analyse des PL implique généralement différentes étapes, consistant en l'extraction de la matière grasse du lait, l'isolation de la fraction de PL des autres classes de lipides, la séparation et la détection des différentes classes et/ou espèces de phospholipides ,en ce qui concerne l'isolement de la fraction PL des autres classes de lipides concernés, la chromatographie sur couche mince , la chromatographie sur colonne et l'extraction en phase solide (SPE) ont été appliquées. Chromatographie liquide à haute performance avec UV ou Le détecteur à diffusion de lumière par évaporation (ELSD) a été utilisé pour le analyse des différents PL plus récemment (Donato et *al.*, 2011)

Un HPLC-ELSD méthode d'analyse des classes de lipides du beurre et du lait de différentes espèces, axée sur la fraction des phospholipides avec- d'une étape de fractionnement préalable et un seul passage. La séparation des classes de lipides a été réalisée sur un 5 micro mitre d.p. colonne Rx-Sil. (Donato et *al.*, 2011)

PARTIE
EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1

MATERIEL ET

METHODES

1. Réactifs chimiques et matériel instrumental :

Tous les solvants utilisés pour cette étude sont de qualité analytique et proviennent de Merck (Darmstadt, Allemagne). La triéthylamine (pureté>99%) et l'acide formique (pureté>98%) ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les standards de phospholipides ont été fournis par Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), PE (L- α -Dipalmitoylphosphatidyléthanolamine; pureté 99%), PI (L- α -phosphatidylinositol, de soja, pureté 98%), PS (1,2-diacyl-sn-glycéro-3-phosphosérine; pureté 98), PC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ; pureté 99%), et SM (sphingomyéline du cerveau bovin ; pureté 99%). Parmi l'appareillage utilisé : Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) doté d'un système de marque Agilent série 1100 avec une pompe quaternaire et un injecteur automatique. Centrifugeuse réfrigérée 3K30 (Sigma), Évaporateur rotatif (BUCHI), spectrophotomètre UV-VIS.

2. Analyse des lipides polaires de la MFGM :

Au cours de cette étude, quatre méthodes majeures de l'analyse des phospholipides de la MFGM ont été étudiées : L'isolement de la MFGM, l'extraction des lipides, dosage des phospholipides totaux et l'analyse quantitative des phospholipides individuels par HPLC.

2. 1. L'isolement de la MFGM :

- Principe :

Selon la technique décrite par (Dewettinck et *al.*, 2008); l'obtention de la MFGM en laboratoire comprend différentes étapes : la séparation des globules gras, le lavage de la crème, la libération de la MFGM à partir des globules gras et enfin la récupération de la MFGM.

La séparation des globules gras à partir du lait peut être effectuée en utilisant une centrifugeuse ou une écrémeuse (Dewettinck et *al.*, 2008). Une fois isolée, la crème est lavée plusieurs fois avec du tampon: deux fois (Lee et *al.*, 2018), trois fois (Fong et *al.*, 2007) ou plus (Sánchez-Juanes et *al.*, 2009) selon les auteurs. Dewettinck et *al.* 2008 proposent une liste exhaustive de solutions de lavage utilisées pour laver la crème. L'eau distillée ou déionisée, une solution salée de saccharose avec ou sans tampon, une solution tampon de phosphate isotonique, un tampon phosphate salin ou un ultra filtrat de lait sont autant d'exemples de tampons disponibles pour laver la crème. La MFGM est ensuite libérée du cœur lipidique en utilisant divers procédés comme le barattage, l'agitation, différents cycles de congélation et de décongélation, un traitement avec des détergents, une mise en suspension dans des solvants

polaires et aprotiques ou encore avec des sels biliaires (Singh, 2006). L'étape finale consiste à isoler la MFGM. La membrane peut être isolée par ultracentrifugation, typiquement à une vitesse allant de 90 000 à 100 000 g pendant 60 min (Singh, 2006), par précipitation des protéines à faible pH, par induction de l'agrégation membranaire avec du sulfate d'ammonium suivie d'une ultracentrifugation ou par microfiltration (Dewettinck et *al.*, 2008 ;Elías et *al.*, 2013).

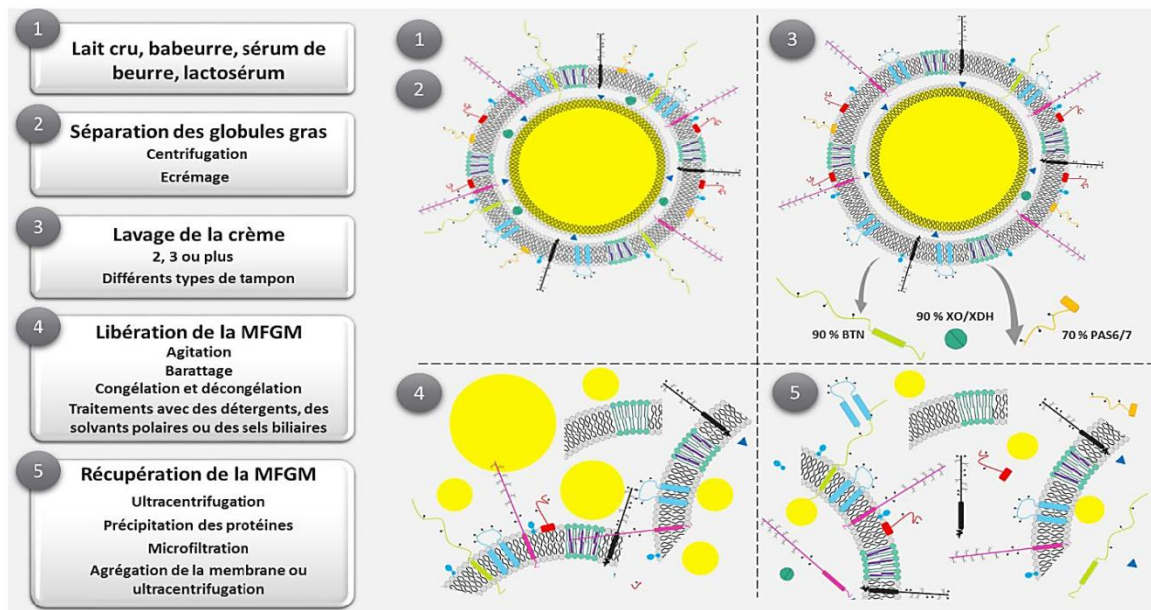


Figure 6: Différentes étapes d'isolement de la MFGM (Guerin et *al.*, 2019)

- Protocole expérimental :

La MFGM est isolée à partir de lait cru de vache en utilisant la technique illustrée à la figure 7. Pour chaque essai expérimental 5 L de lait sont collectés dans un tank réfrigéré d'une ferme locale après la traite du matin. Les globules gras sont d'abord séparés du lait à l'aide d'une écrémeuse de paille. La crème est ensuite mise en suspension dans une solution de lavage et laissée à la température ambiante pendant 15 min. Après le lavage de la crème est reséparée. Cette étape de lavage est répétée une ou deux fois selon l'expérience.

La crème lavée ainsi obtenue est stockée dans un réfrigérateur à 4 °C pendant une nuit puis transformée le lendemain en beurre par barattage à l'aide d'un mélangeur (KitchenAid, St. Joseph, MI). Le barattage permet la formation du beurre et d'un liquide appelé babeurre. Ce dernier est recueilli par filtration à travers 2 couches d'étamine, qui est utilisée pour retenir les minuscules granules de beurre.

Le beurre est, quant à lui, chauffé à 60 °C après addition de la même quantité d'eau distillée (1:1, m/m). Le mélange est centrifugé dans des tubes en verre avec une centrifugeuse de laboratoire à 1070 g pendant 5 min. Le surnageant, contenant l'huile de beurre est éliminé et le sérum de beurre, contenant la MFGM, est filtré à travers une double couche d'étamine. La suspension de sérum de beurre contenant la MFGM est finalement collectée, congelée et lyophilisée pour obtenir de la poudre de MFGM.

La poudre de MFGM et une quantité suffisante de la suspension MFGM sont conservés à -20°C avant toute analyse ultérieure.

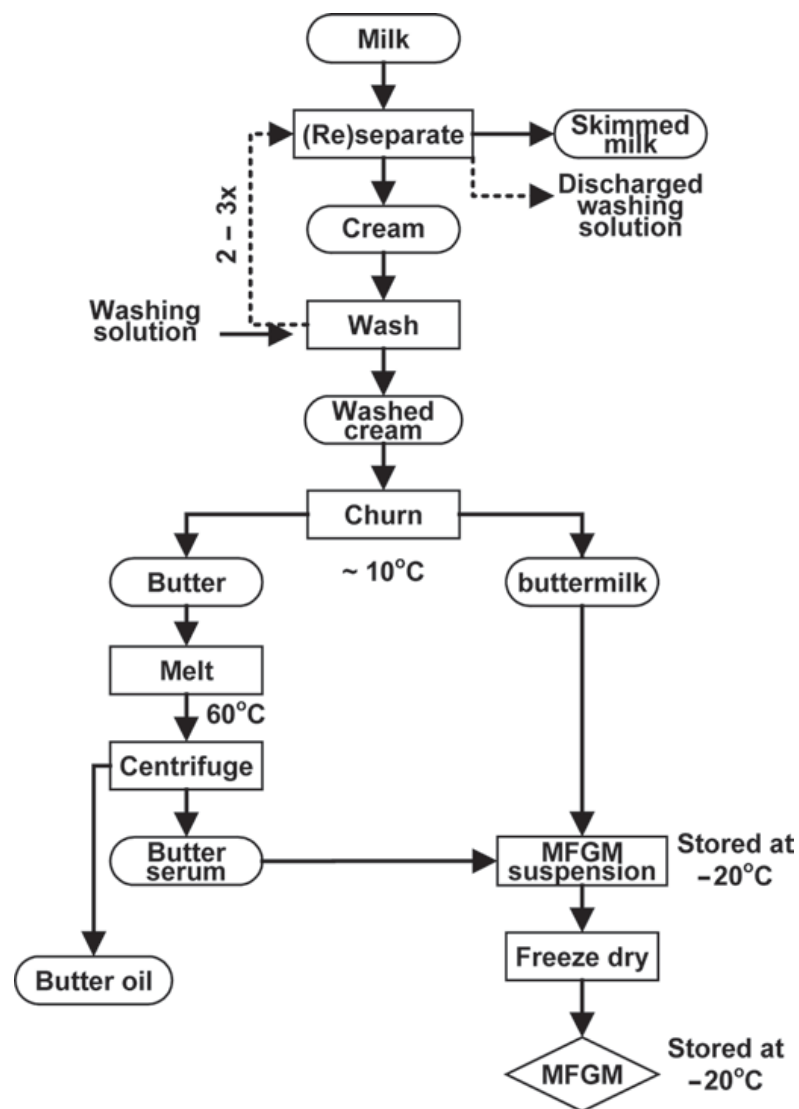


Figure 7: Isolement de la MFGM à partir de lait cru (Le et *al.*, 2009)

2- 2- Extraction des lipides :

- Principe de la technique :

La méthode de FOLCH et al. (1957) fait appel à un mélange binaire composé d'un bon solvant des lipides (chloroforme) et d'un solvant plus polaire qui permet de rompre les liaisons lipides-protéines (méthanol). L'extraction est réalisée à la température ambiante, de la plupart des composés lipidiques présents dans le lait. L'extrait lipidique est ensuite purifié par lavage de la phase organique avec une solution saline.

- Mode opératoire :

L'extraction des lipides totaux est réalisée selon la méthode décrite par Folchet al. (1957). Il s'agit d'une méthode d'extraction à froid standardisée, basée sur l'utilisation d'un mélange de solvants [chloroforme – méthanol 2 :1 (v/v)]. Expérimentalement, 50 g d'échantillon sont placés dans un flacon en verre. Le flacon contenant l'échantillon est additionné de 200 mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1) puis mis sous agitation pendant 1 heure. La solution ainsi obtenue est alors filtrée sous vide. Après lavage du filtre avec 200 mL du mélange chloroforme/méthanol. Les filtrats sont ainsi recueillis dans des flacons en verre.

La purification de l'extrait lipidique est réalisée par addition d'une solution aqueuse de KCl à 0,9% (m/v), elle est ajoutée au filtrat à raison de 1/4 du volume total de filtrat. Après agitation, on laisse décanter le mélange deux phases distinctes se forment.

- Une phase inférieure, chloroformique, contenant les lipides

- Une phase supérieure contenant l'eau, le méthanol et les contaminants hydrosolubles. Cette dernière est éliminée par aspiration à la trompe à eau. La phase lipidique lavée est transférée dans des ballons de 500 mL et les solvants sont évaporés à 50°C sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif.

L' extraction de Folch (Folch et *al.*, 1957). Ils ont été réalisés pour extraire les matières grasses totales du lait et des échantillons de MFG ainsi que pour l'extraction de PL et la détermination de la teneur totale en matières grasses, les échantillons ont été mélangés avec un solvant chloroforme : méthanol (2:1, v/v) dans un rapport de 1:8 (v/v) pour le lait ou de 1:20 (p/v) pour les échantillons MFG.

Successivement. Les mélanges ont été lavés avec 0,2 volume de solution de NaCl à 0,9 % (p/v) pour augmenter la récupération globale des lipides, la fraction de chloroforme enrichis

par les lipides ont été collectés et les solvants séchés par évaporation rotative (ou par un léger courant d'azote lorsque le volume de solvant n'était pas supérieur à 3 ml), toutes les extractions ont été réalisées en triple

1.3 Dosage du phosphore lipidique total :

- Principe :

Ce dosage est basé sur la quantification par méthode colorimétrique, du phosphore lipidique préalablement libéré par minéralisation acide dans un mélange acide perchlorique (1 vol.), acide sulfurique (2 vol.), tétraoxyde de vanadium (1 g/L de mélange acide)

- Mode opératoire

Ce liquide de minéralisation est ajouté à chaque échantillon, à raison de 0.25 mL par tube d'échantillon de lipides totaux. Une gamme étalon comportant 0, 3, 6, 9 et 12 µg de phosphore (solution standard de phosphate monopotassique à 6 µg de P/50 µl) qui servira à quantifier le phosphore lipidique. Elle sera traitée dans les mêmes conditions que les échantillons lipidiques : la minéralisation acide s'effectue par chauffage sur bec Bunsen sous hotte, jusqu'à obtention de fumées blanches.

Après minéralisation et refroidissement, on ajoute à chaque tube soit 5 mL de réactif donnant avec le phosphore en milieu sulfurique une coloration bleue spécifique (bleu de molybdène) après 8 minutes de chauffage à 100 °C, les tubes sont à nouveau vortexés et l'intensité de la couleur bleue mesurée au spectrophotomètre à 830 nm.

Les proportions pour 100 mL de réactif :

- Mélange ANSA (0,63 g).
- Heptamolybdate d'ammonium : (0,2 g).
- H₂O 100 mL.

Le mélange ANSA est obtenu en mélangeant au mortier (60 g de métabisulfite de sodium, 2 g de sulfite de sodium et 1 g d'acide amino naphthol sulfonique).

La teneur en phosphore lipidique des échantillons est alors calculée à partir de l'équation de la courbe d'étalon. Les résultats obtenus sont ramenés au volume total de l'échantillon (phosphore lipidique total) puis en µg/100 mg de MGF. Les teneurs en phospholipides totaux sont déduites du phosphore lipidique en utilisant la relation suivante :

$$\text{Phospholipides totaux} = \text{phosphore lipidique total} \times 27$$

N.B : ce coefficient a été obtenu par des mesures effectuées à l'aide d'étalons traités par chromatographie liquide sur colonne de silice (Brichon, 1984).

2.4. Analyse quantitative des phospholipides individuels par HPLC :

-Principe de la chromatographie :

La chromatographie est un procédé physico-chimique aboutit à la séparation des divers solutés d'un mélange homogène. La base de cette séparation est la distribution des solutés entre deux phases non miscibles, une phase stationnaire qui est fixe, l'autre mobile (phase mobile). Tous les solutés sont forcés au départ à parcourir un même chemin. La phase mobile est utilisée pour véhiculer les solutés, il peut être soit un liquide soit un gaz. La phase stationnaire est généralement immobilisée dans une colonne, peut être un solide ou un liquide fixé sur un solide, son rôle est d'immobiliser ces solutés. Ce système de deux phases est couplé à un système d'injection des échantillons à analyser et à un système de détection (Caude, 1996). L'état physique de la phase mobile est important pour distinguer le type de la chromatographie appliquée. Le terme CPL est employé quand la phase mobile est composée d'un solvant ou d'un mélange complexe des solvants nous parlons de la chromatographie en phase liquide (CPL).

La méthode globalement adaptée pour analyser les phospholipides est la chromatographie liquide haute performance. Le système HPLC (figure 8) est constitué d'une pompe quaternaire, d'un dégazeur à hélium et d'un injecteur automatique. Le système est couplé avec un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (ELSD)

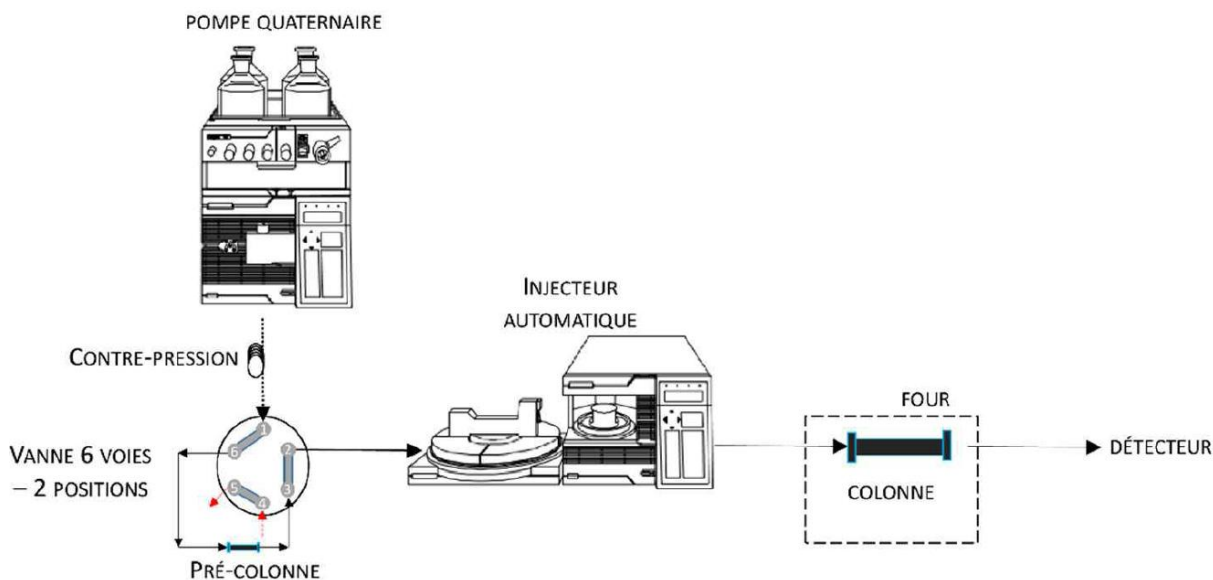


Figure 8: Schéma générale de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La caractérisation et quantification des phospholipides individuelles ont été réalisées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) selon la méthode adaptée (Rombaut et Dewettinck, 2006)

Les séparations des phospholipides et des sphingomyélines ont été réalisées sur une chaîne HPLC Agilent (HP 1100, Agilent, Massy, France) avec 4 lignes de solvant, un dégazeur et une pompe quaternaire, et le détecteur était Evaporative Light Scattering Detector (ELSD; PL-ELS1000, PolymerLaboratories, Marseille, France). Un logiciel HPChem (Agilent, Massy, France) a permis l'acquisition des données du détecteur ELSD. Une colonne de silice, 150 × 3 mm avec un diamètre de particule de 3 µm (AIT, Houilles, France) et une précolonne en silice avec le même garnissage et le même diamètre interne ont été utilisées. De l'air comprimé séché et filtré a été utilisé comme gaz de nébulisation à un débit de 1,7 L/min et à une température de 50 °C, la température d'évaporation était de 85 °C

Le programme d'élution était :

- t=0 min à t=7 min la composition du mélange des solvants constituant la phase éluante est gardée constante de chloroforme/méthanol/tampon 87,5:12:0,5 (vol/vol/vol), tampon (acide formique 1 M neutralisé à pH 3 avec la triéthylamine)
- t=7 min à t=27 min un linéaire gradient de chloroforme/méthanol/tampon 87,5:12:0,5 (vol/vol/vol) à 28:60:12 (vol/vol/vol) .
- t=27 min à t=29 min remettre la phase mobile aux conditions initiales constantes, c'est-à-dire 87,5:12:0,5 (vol/vol/vol),
- On a laissé la colonne s'équilibrer jusqu'à la prochaine injection à t=36 min

Le temps total d'exécution chromatographique était de 36 min par échantillon, qui comprenait:

1. Les 7 min en conditions isocratiques pour éluer les lipides non polaires,
2. Le linéaire gradient pour éluer les lipides polaires,
3. 2 min pour rétablir les conditions initiales,
4. Les 7 dernières min pour rééquilibrer la colonne

Le débit a été maintenu à 0,5 mL/min. et la colonne a été maintenue à 40°C, le volume d'injection était de 10µL par échantillon

Les lipides extraits sont pesés (100 mg) et dissous dans 500µL de chloroforme/méthanol (88:12, vol/vol) et transférés dans des tubes à essai bouchés pour l'analyse par HPLC. Chaque échantillon est injecté trois fois.

L'identification des phospholipides et de la sphingomyéline est réalisée par comparaison avec le temps de rétention des standards purs, pour obtenir une évaluation quantitative des phospholipides et de la sphingomyéline, cinq courbes d'étalonnage sont déterminées par injection de 10 μL de solutions diluées dans le chloroforme/méthanol (88:12,vol/vol) de PE (0.1-1.5 μg), PC (0.5-2.5 μg), PS (0.1-1.75 μg), PI (0.1-1.75 μg) et SM (0.5-3 μg), chaque solution est préparée et injectée en trois fois (Lopez et *al.*, 2008)

CHAPITRE 2
RESULTATS ET
DISCUSSIONS

1. Quantification des lipides polaires de la membrane des globules gras

Comme on peut le voir dans le Tableau 3, la fraction lipidique de la MFGM se compose d'environ 30% de lipides polaires comprennent les glycolipides et les phospholipides. Ces derniers ont à la fois des propriétés hydrophiles et hydrophobes, et de ce fait contribuent largement au rôle émulsifiant de la membrane. Les types majeurs de lipides polaires présents dans la membrane sont : la phosphatidylcholine(PC), la phosphatidyléthanolamine(PE), la sphingomyéline (SM), le phosphatidylinositol(PI), la phosphatidylsérine(PS). Le glucosylcéramide (GluCer), le lactosylcéramide (LacCer) et les gangliosides sont présents à l'état de traces (Deeth 1997) .

Tableau 2: Composition estimée de la membrane des globules gras du lait (Walstraet *al.*, 2006)

Composant	g/100 g globules gras	g pour 100g Matière sèche MFGM
Protéines	1800	70
Phospholipides	650	25
Cérébrosides	80	3
Cholestérol	40	2
Monoglycérides	+ ^a	?
Eau	+	–
Caroténoïdes+Vit. A	0,04	0,0
Fe	0 ,3	0,0
Cu	0, 01	0,0
Total	>2570	100

+ ^a; présent, mais la quantité est inconnue.

Les lipides du MFGM sont principalement des lipides polaires, bien que des lipides neutres puissent également être présents. Les lipides neutres comprennent les triglycérides, les di glycérides, les mono glycérides, les esters et le cholestérol (Tableau4). En fait, la membrane du globule gras, dans son état natif normal (c'est-à-dire dans du lait non réfrigéré) contient des triglycérides, mais probablement en faible quantité (Walstra, 1974). Les grandes quantités de triglycérides généralement retrouvées parmi les constituants membranaires proviennent en grande partie de cristaux de matière grasse du cœur du globule contaminant la

membrane durant le processus de barattage. Ces triglycérides ce entraînés avec le matériel membranaire se distinguent des triglycérides totaux du lait ,car ils contiennent une plus grande proportion d'acides gras à longue chaîne (Sharma et *al.*, 1987); ils sont d'ailleurs qualifiés de triglycérides à haut point de fusion (Kanno, 1989). La proportion de triglycérides associés à la membrane dépend fortement des conditions d'isolement ; c'est pourquoi de grandes variations existent quant à la composition lipidique de la membrane

Tableau 3: Composition des lipides neutres exprimée en pourcentage des lipides totaux

Classe lipidique	Pourcentage rapporté aux lipides totaux	Référence
Triglycérides	51–68	Anderson et Cawston [3]
	37,3 ± 9	Patton [41]
	48,4 ± 2,6	Chen et Nawar [9]
	45,8 ± 1	Danthine (résultat non publié, 1998)
Diglycérides	9	Keenan et Patton [28]
	8,5 ± 0,5	Danthine (résultat non publié, 1998)
Monoglycérides	traces	Keenan et Patton [28]
	0,7 ± 0,2	Danthine (résultat non publié, 1998)
Esters	0,1–0,8	Patton et Keenan [42], Keenan et al. [29]
Cholestérol	0,2–5,2	Patton et Keenan [42]
	6,1 ± 0,4	Patton [41]
	0,2–2,0	Keenan et Patton [28]
	1,7 ± 0,2	Danthine (résultat non publié, 1998)

la caractérisation des phospholipides dans le lait a commencé dans les années 1960 (Sprecher et *al.*, 1965 ; Webb et *al.*, 1974). Récemment, grâce à l'utilisation de nouvelles technologies, leurs propriétés physico-chimiques ont été exploitées, mettant en évidence les propriétés émulsifiantes et anti moussantes des MFGM. De plus, ces lipides ont des effets bénéfiques sur la santé, en particulier les phospholipides présents dans certains tissus animaux, tels que la sphingomyéline et la phosphatidylcholine, les cérébrosides et les gangliosides (considérés comme des glycolipides importants). En fait, les PL et leurs métabolites ont des rôles biologiques importants, comme la communication entre les cellules, la myélinisation dans le système nerveux central, et en tant que récepteurs membranaires. Les sources avec des concentrations élevées en PL, comme le MFGM, devraient être considérés comme de grande valeur par les technologues alimentaires, et des efforts doivent être faits

pour les inclure dans les produits alimentaires qui ne fournissent pas seulement des nutriments essentiels mais aussi des composés fonctionnels.

2. Profil de répartition des principales classes de phospholipides de la membrane des globules gras du lait :

Les chromatogrammes présentés dans la figure 1 montrent que les lipides neutres (principalement les triacylglycérols) ont été élués en premier et n'ont pas interféré avec la séparation des lipides polaires de la membrane des globules gras du lait, c'est-à-dire la phosphatidyléthanolamine (PE), le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylcholine (PC) et la sphingomyéline (SM)

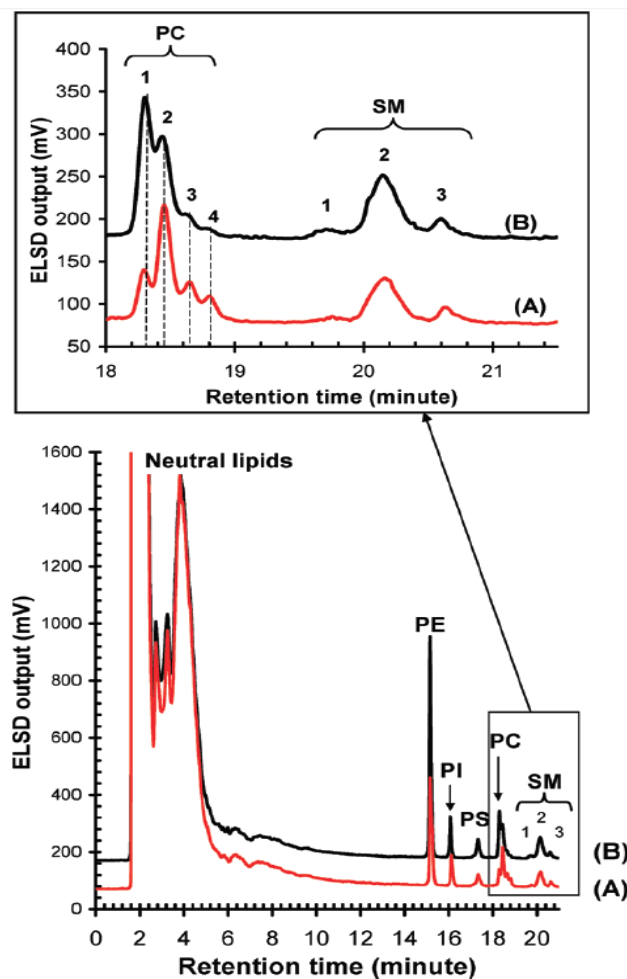


Figure 9: Chromatogramme du détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (ELSD) par chromatographie liquide en phase normale de la fraction lipidique totale de la crème obtenue à partir de vaches nourries avec les deux régimes différents

(A) ensilage de maïs et (B) ensilage de maïs complété par des graines de lin extrudées. Ces 2 chromatogrammes sont représentatifs des chromatogrammes obtenus pour l'ensemble du lait (n=18 pour chaque régime).

Ces 2 chromatogrammes sont représentatifs des chromatogrammes obtenus pour l'ensemble du lait (n=18 pour chaque régime).

La phosphatidylcholine (PC) est éluée sous forme de 4 pics et la sphingomyéline (SM) est éluée sous forme de 3 pics en raison de la séparation partielle des espèces moléculaires (figure 1).

L'analyse des chromatogrammes enregistrés montrent que les intensités relatives des 4 pics enregistrés pour PC étaient différentes dans le lait des vaches nourries avec le régime ensilage de maïs par rapport au régime enrichi en graines de lin. Ces différentes intensités relatives signifient que les espèces PC dans le lait ont été affectées par le régime alimentaire des vaches.

3. Teneur en glycérophospholipides et sphingolipides.

Les teneurs en phospholipides de la MFGM varient beaucoup dans la littérature notamment dû aux différentes techniques d'isolation, de purification et d'analyses mais également à la variabilité naturelle de la composition lipidique du lait.

3.1. Glycérophospholipides

Les glycérophospholipides sont constitués d'un glycérol estérifié par deux acides gras en position sn-1 et sn-2, et par un acide phosphorique en position sn-3 lui-même estérifié par un groupement polaire qui donnera l'identité du phospholipide (Rombaut et *al.*, 2006).

- **La phosphatidylcholine (PC)**, représente jusqu'à 37 % des phospholipides totaux, et est un constituant majeur des membranes cellulaires qui assure la structure et maintient la barrière de perméabilité (Dewettinck et *al.*, 2008 ; Jiménez - Flores et Higuera - Cipara, 2009). La phosphatidylcholine qui était avant appelée « lécithine ». Elle aide le foie à se régénérer après des attaques de substances chimiques toxiques comme c'est le cas de certains médicaments (Anand et *al.*, 1999) , de l'alcool ... mais aussi à répondre à des dommages liés à des virus comme dans le cas des hépatites. Des essais cliniques ont été effectués pour les hépatites B et C (Niederau et *al.*, 1998). La phosphatidylcholine protège aussi la muqueuse gastro-intestinale contre les attaques de toxiques et dans une étude menée sur les enfants prématurés, elle réduirait les entérocolites nécrosantes (Carlson et *al.*, 1998)
- **La phosphatidyléthanolamine (PE)** est hautement insaturée et représente jusqu'à 30 % des phospholipides totaux de la MFGM. On la trouve principalement dans le tissu nerveux et le cerveau, où elle représente environ la moitié de la teneur en phospholipides. Sa

composition en acides gras diffère de la PE présente dans le lait entier, présentant plus de C18 :1 et C18 :2 et moins de C14 :0 et C16 :0 (Sánchez-Juanes *et al.*, 2009)

Un autre phospholipide, le phosphatidylinositol (PI) qui représente de 5 à 11%, il sert de substrat à plusieurs enzymes impliquées dans la signalisation cellulaire et peut être phosphorylé pour former du phosphatidylinositolphosphate (PIP).

- **La phosphatidylsérine (PS)** est un phospholipide chargé négativement des cellules et des plaquettes sanguines qui contribuent à la coagulation du sang. En outre, la PS peut réduire le risque de dysfonctionnement cognitif chez les personnes âgées, comme présenté dans le tableau 5 (Dewettinck *et al.*, 2008)

La distribution de ces phospholipides n'est pas homogène dans tout la MFGM. Les PE, PS et PI sont localisés principalement dans la monocouche interne, tandis que PC, sphingomyéline (SM) et glycosphingolipides, tels que les cérébrosides et les gangliosides se trouvent dans la bicouche externe (Lopez *et al.*, 2008)

Tableau 4: Aspects nutritionnels des lipides polaires du MFGM

Composant	PL % ^a	Aspects nutritionnels
Sphingolipides et métabolites	18,0-34,1 ^b	- Réduction du nombre de foyers de cryptes aberrants et d'adénocarcinomes - Modification du type de tumeur (maligne ⇒ bénigne) Anti cholestérolémique - Protection du foie contre la stéatose induite par les graisses et le cholestérol - Suppression des pathogènes gastro-intestinaux Maturation intestinale néonatale - Myélinisation du système nerveux central en développement Modulateurs endogènes de la fonction vasculaire associée aux maladies liées à l'âge et au développement de la maladie d'Alzheimer
Sphingosine 1-phosphate		Mitogenic
Phosphatidylcholine (PC)	19,2-37,3	- Soutenir la récupération du foie après une attaque chimique toxique ou des dommages viraux

		- Protège la muqueuse gastro-intestinale humaine contre les attaques toxiques Réduction de l'entérocolite nécrosante Atténue la stéatose hépatique induite par l'acide orotique
Lysophosphatidylcholine (lysoPC)	2	Pouvoir bactériostatique et bactéricide Fort rôle gastro protecteur de la muqueuse duodénale
Phosphatidyléthanolamine (PE)	19,8-40,0	Maintient l'hémostase
Phosphatidylinositol (PI)	5-11%	-Substrat dans la signalisation cellulaire -Favorise le transport et le métabolisme du cholestérol plasmatique
Phosphatidylsérine (PS)	1,9-10,5	-Restaurer la mémoire normale sur une variété de tâches -Effets positifs sur les patients Alzheimer -Améliorer la capacité d'exercice des humains qui font de l'exercice

^a Teneur relative en phospholipides (g pour 100 g de lipides polaires, y compris la sphingomyéline). ^bTeneur en sphingomyéline.

La MFGM présente des propriétés fonctionnelles voire nutritionnelles très importantes. Outre son rôle de barrière physique protégeant les triglycérides du lait contre la lipolyse enzymatique (Danthine et *al.*, 2000), la MFGM offre des propriétés tensioactives essentielles à la stabilisation des émulsions. Elle peut ainsi être utilisée dans la formulation de crèmes reconstituées ou de liposomes délivrant progressivement un agent bioactif. Ces dernières années, différentes études ont mis en évidence de probables propriétés métaboliques bénéfiques sur la santé apportée par certaines classes de lipides polaires comme les SM, PE et PC et certaines protéines membranaires (Singh, 2006). Un intérêt croissant s'est donc développé pour l'étude et la valorisation de la MFGM.

3-2 Sphingolipides

Les sphingolipides dérivent eux de la sphingosine, une amine constituée d'une chaîne aliphatique mono-insaturée (12–22 atomes de carbone) et deux fonctions alcool : l'une

primaire et l'autre secondaire. La fixation sur la fonction amine d'un AG donne un céramide. La fonction alcool primaire peut-elle réagir avec différents composés :

- ✓ l'acide phosphorique qui lui-même estérifie la choline pour donner un phosphosphingolipide plus couramment appelé la sphingomyéline ; la sphingomyéline fait donc également partie des phospholipides
- ✓ un glucide pour former alors ce que l'on appelle un glycosphingolipide. S'il s'agit d'un glucide (D-glucose ou D-galactose), le composé formé est un cérébroside. S'il s'agit d'une structure osidique complexe avec au moins trois résidus osidiques dont l'un est estérifié à l'acide sialique, c'est une ganglioside. Les sphingolipides sont présents dans les membranes des cellules des mammifères, notamment dans la gaine de myéline du tissu nerveux et dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique. La sphingomyéline est également présente dans la membrane des globules gras du lait

Comme c'est indiqué dans le Tableau 4, les sphingolipides représentent 18 à 34,1% des lipides polaires de la membrane des globules gras. La MFGM aurait un haut degré de saturation qui lui permettrait de s'associer avec le cholestérol afin de former des « radeaux lipidiques » impliqués dans des processus cellulaires. Des processus d'endocytose et d'échanges du cholestérol permettraient ainsi à la sphingomyéline d'avoir un impact dans l'absorption du cholestérol dans les intestins (Brown et London, 2000; Dewettinck et *al.*, 2008). Les métabolites de la sphingomyéline présentent également des avantages pour la santé, comme le montre le tableau 4.

Les sphingolipides sont abondants dans la membrane apicale de l'épithélium de l'intestin, et leurs produits de dégradation (céramides et sphingosine) sont considérés comme les composés les plus bioactifs, ayant des effets importants sur la régulation cellulaire. Ces composés sont essentiels au maintien de la structure membranaire et servant de sites de liaison pour certains micro-organismes, toxines microbiennes et virus. La céramide est un messager lipidique majeur qui inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose, tandis que la sphingosine-1-phosphate est un second messager à l'intérieur de la cellule et des preuves scientifiques indiquent le rôle important de cette dernière molécule dans la régulation de la croissance cellulaire, l'angiogenèse et la fonction immunitaire.

Conclusions

Conclusions

Ces dernières années, la communauté scientifique et les industriels ont accordé une attention considérable à la membrane du globule gras du lait en raison des bénéfices santé que la MFGM peut apporter. De nombreuses études mettent en évidence le rôle important de certains composés de la MFGM tels que les phospholipides. Dans ce contexte, cette étude a pour objectif d'étudier la membrane des globules gras et de mettre l'accent sur sa composition en phospholipides

Les résultats observés ont permis de montrer que les lipides du MFGM sont principalement des lipides polaires comprennent les glycolipides et les phospholipides, bien que des lipides neutres puissent également être présents. Les types majeurs de phospholipides présents dans la membrane et leurs pourcentages approximatifs sont : la phosphatidylcholine 19,2-37,3%, la phosphatidyléthanolamine 19,8-42%, la sphingolipides 18-34,1%, le phosphatidylinositol 5-11%, la phosphatidylsérine 1,9-10,5 %

Les proportions relatives en phospholipides de la MFGM varient fortement selon les auteurs notamment dû aux différentes techniques d'isolation, de purification des fragments membranaires et d'analyses mais également à la variabilité naturelle de la composition lipidique du lait (la race et l'âge de l'animal, son régime, son stade de lactation et le facteur saisonnier).

ملخص

كريات دهن الحليب هي في الأساس قطرات دهنية مغلفة بغلاف واقٍ يضمن تشتت دهون الحليب الكارهة للماء في بلازما الحليب المحبة للماء. يُطلق على هذا الغلاف الواقٍ عمومًا اسم "غشاء كريات دهن الحليب". تهدف دراستنا إلى دراسة غشاء الكريات الدهنية والتأكد على تكوينها في الدهون الفوسفورية. أظهرت النتائج أن الفسفوليبيدات الرئيسية الموجودة في الغشاء ونسبها التقريبية هي: فوسفاتيديل كولين 19.2-37.3%، فوسفاتيديلإيثانولامين 19.8-42%، سفينجوليبيدات 18-34.1%، فسفاتيديلاينوزيتول 5-11%، فوسفاتيديلسيرين 1.9-10.5%. تختلف محتويات الفسفوليبيد بشكل كبير وفقًا للمؤلفين، لا سيما بسبب اختلاف تقنيات العزل والتنقية والتحليل، ولكن أيضًا بسبب التباين الطبيعي لتكوين الدهون في الحليب.

الكلمات المفتاحية: غشاء الكريات الدهنية، التركيب، العزل، الدهون الفوسفورية، الخصائص الغذائية والوظيفية

RESUME

Les globules gras du lait sont essentiellement des gouttelettes lipidiques enrobées d'une enveloppe protectrice qui assure la dispersion de la matière grasse laitière, hydrophobe, dans le plasma du lait, hydrophile. Cette enveloppe protectrice est généralement appelée la « membrane du globule gras du lait ». Notre étude a pour objectif d'étudier la membrane des globules gras et de mettre l'accent sur sa composition en phospholipides. Les résultats observés montrent que les phospholipides majeurs présents dans la membrane et leurs pourcentages approximatifs sont : la phosphatidylcholine 19,2-37,3%, la phosphatidyléthanolamine 19,8-42%, la sphingolipides 18-34,1%, le phosphatidylinositol 5-11%, la phosphatidylsérine 1,9-10,5 %. Ces teneurs en phospholipides varient beaucoup selon les auteurs notamment dû aux différentes techniques d'isolation, de purification et d'analyses mais également à la variabilité naturelle de la composition lipidique du lait.

Mots clés : membrane des globules gras, composition, isolement, phospholipides, propriétés nutritionnelles et fonctionnelles

SUMMARY

Milk fat globules are essentially lipid droplets coated with a protective envelope that ensures the dispersion of the hydrophobic milk fat in the hydrophilic milk plasma. This protective envelope is generally called the "milk fat globule membrane". The objective of our study was to investigate the fat globule membrane and to focus on its phospholipid composition. The observed results show that the major phospholipids present in the membrane and their approximate percentages are: phosphatidylcholine 19.2-37.3%, phosphatidylethanolamine 19.8-42%, sphingolipids 18-34.1%, phosphatidylinositol 5-11%, phosphatidylserine 1.9-10.5%. These phospholipid contents vary greatly according to the authors, in particular due to the different techniques of isolation, purification and analysis, but also to the natural variability of the lipidic composition of milk

Key words: fat globule membrane, composition, isolation, phospholipids, nutritional and functional properties

Bibliographie

Bibliographie

- Bhinder, Ganive et al. 2017. « Milk Fat Globule Membrane Supplementation in Formula Modulates the Neonatal Gut Microbiome and Normalizes Intestinal Development ». *Scientific Reports* 7: 45274.
- Bourlieu, Claire et al. 2018. « Vers des formules infantiles biomimétiques de la structure du lait maternel et de son comportement digestif ? » *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 53(4): 218-31.
- Chloé Vallée. 2015. « La Membrane des globules gras du lait : Propriétés et applications en santé «Milk Fat Globule Membrane (MFGM): Properties and health applications» - Université de Lorraine ». <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733526> (23 mars 2021).
- Contarini, Giovanna, et Milena Povolo. 2013. « Phospholipids in Milk Fat: Composition, Biological and Technological Significance, and Analytical Strategies ». *International Journal of Molecular Sciences* 14(2): 2808-31.
- Danthine, Sabine et al. 2000. « Évolution Des Connaissances Sur La Membrane Du Globule Gras Du Lait : Synthèse Bibliographique ». *Le Lait* 80(2): 209-22.
- Deeth, H. C. 1997. « The role of phospholipids in the stability of milk fat globules ». *Australian Journal of Dairy Technology* 52: 44-46.
- Dewettinck, Koen et al. 2008. « Nutritional and Technological Aspects of Milk Fat Globule Membrane Material ». *International Dairy Journal* 18(5): 436-57.
- Donato, Paola et al. 2011. « Determination of Phospholipids in Milk Samples by Means of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Evaporative Light Scattering and Mass Spectrometry Detection ». *Journal of Chromatography A* 1218(37): 6476-82.
- Evers, J. M. 2004. « The milk fat globule membrane-compositional and structural changes post secretion by the mammary secretory cell ». *International Dairy Journal* 14: 661-74.
- Fong, Bertram Y., Carmen S. Norris, et Alastair K. H. MacGibbon. 2007. « Protein and Lipid Composition of Bovine Milk-Fat-Globule Membrane ». *International Dairy Journal* 17(4): 275-88.
- Elías, -Argote, Laubscher A, et Jiménez-Flores R. 2013. « Dairy Ingredients Containing Milk Fat Globule Membrane: Description, Composition, and Industrial Potential | Request PDF ». In *ResearchGate*, , 71-94.

Bibliographie

- Guerin, Justine et al. 2019. « Milk Fat Globule Membrane Glycoproteins: Valuable Ingredients for Lactic Acid Bacteria Encapsulation? » *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(4): 639-51
- Heid, Hans W., et Thomas W. Keenan. 2005. « Intracellular Origin and Secretion of Milk Fat Globules ». *European Journal of Cell Biology* 84(2): 245-58.
- Innocente, N. (Universitadegli studi di Udine, C. Blecker, C. Deroanne, et M. Paquot. 1997. « Langmuir Film Balance Study of the Surface Properties of a Soluble Fraction of Milk Fat-Globule Membrane ». *Journal of agricultural and food chemistry (USA)*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US1997076534> (23 mars 2021).
- Keenan T.W et Dylewski D.P.,. 1995. *Intracellular origin of milk lipid globules and the nature and structure of the milk lipid globule membrane*. second edition. Advanced dairy chemistry 2. Lipids.
- Kupiec, Tom. 2004. « Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography ». *International Journal of Pharmaceutical Compounding* 8(3): 223-27.
- Lee, Hanna et al. 2018. « Compositional Dynamics of the Milk Fat Globule and Its Role in Infant Development ». *Frontiers in Pediatrics* 6: 313.
- Maherani, B et al. 2011. « Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies ». *Current Nanoscience* · 7(3): 436-52.
- Mather, I. H., et T. W. Keenan. 1998. « Origin and Secretion of Milk Lipids ». *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 3(3): 259-73.
- Mather, Ian H. 2000. « A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane^{1,2} ». *Journal of Dairy Science* 83(2): 203-47.
- Mozafari, M. et al. 2008. « Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology ». *International Journal of Food Properties* 11: 833-44.
- Mulder, H, et P Walstra. 1974. *The Milk Fat Globule: Emulsion Science as Applied to Milk Products and Comparable Foods*. Wageningen: Pudoc.
- Noh, Sang K., et Sung I. Koo. 2004. « Milk Sphingomyelin Is More Effective than Egg Sphingomyelin in Inhibiting Intestinal Absorption of Cholesterol and Fat in Rats ». *The Journal of Nutrition* 134(10): 2611-16.
- Ollivier-Bousquet, Michèle. 2002. « Milk Lipid and Protein Traffic in Mammary Epithelial Cells: Joint and Independent Pathways ». *Reproduction Nutrition Development* 42(2): 149-62.

Bibliographie

- Park, Eek J., Alan B. R. Thomson, et Michael T. Clandinin. 2010. « Protection of Intestinal Occludin Tight Junction Protein by Dietary Gangliosides in Lipopolysaccharide-Induced Acute Inflammation ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 50(3): 321-28.
- Singh, Harjinder. 2006. « The Milk Fat Globule Membrane—A Biophysical System for Food Applications ». *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11(2): 154-63.
- Snow, D. R. et al. 2011. « Membrane-Rich Milk Fat Diet Provides Protection against Gastrointestinal Leakiness in Mice Treated with Lipopolysaccharide ». *Journal of Dairy Science* 94(5): 2201-12.
- Sánchez-Juanes, Fernando, Josefa M. Alonso, Lorena Zancada, et Pablo Hueso. 2009. « Glycosphingolipids from Bovine Milk and Milk Fat Globule Membranes: A Comparative Study. Adhesion to Enterotoxigenic Escherichia Coli Strains ». 390(1): 31-40.
- Sharma, K. C., A. Kumari, V. K. Sareen, et S. Singh. 1987. « Lipid Composition of Fat Globule Membranes from Butter Milk and Butter Serum of Buffalo and Cow Milk ». *Milchwissenschaft* 42(7): 439-42.
- Spitsberg, V. L. 2005. « Invited Review: Bovine Milk Fat Globule Membrane as a Potential Nutraceutical ». *Journal of Dairy Science* 88(7): 2289-94.
- Sprong, R. Corinne, Marco F. E. Hulstein, Tim T. Lambers, et Roelof van der Meer. 2012. « Sweet Buttermilk Intake Reduces Colonisation and Translocation of *Listeria Monocytogenes* in Rats by Inhibiting Mucosal Pathogen Adherence ». *The British Journal of Nutrition* 108(11): 2026-33.
- Struijs, K et al. 2013. « Milk fat globule membrane glycoproteins prevent adhesion of the colonic microbiota and result in increased bacterial butyrate production ». *International Dairy Journal* 32: 99-109 .
- Thompson, A. K. et al. 2006. « Comparison of the Structure and Properties of Liposomes Prepared from Milk Fat Globule Membrane and Soy Phospholipids ». *Journal of agricultural and food chemistry*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301077796> (24 mars 2021).
- Vanderghem, Caroline et al. 2010. « Milk fat globule Membrane and butter milks: from composition to valorization ». *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2 14(3): 485-500.
- Veereman-Wauters, Gigi et al. 2012. « Milk Fat Globule Membrane (INPULSE) Enriched Formula Milk Decreases Febrile Episodes and May Improve Behavioral Regulation in Young Children ». *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 28(7-8): 749-52.

Bibliographie

- Vingnola, C. 2010. *Science et technologie du lait : transformation du lait*. presse international polytechnique.
- Vissac, Cécile et al. 2002. « Presence of BRCA1 and BRCA2 Proteins in Human Milk Fat Globules after Delivery ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1586(1): 50-56.
- Walstra, Pieter. 1974. « High melting triglycerides in fat globule membrane- artifact ». *Netherlands Milk and Dairy Journal* 28: 3-9.
- Walstra, Pieter, Jan T. M. Wouters, et Tom J Geurts. 2006. *Dairy Science and Technology*. FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY.