

Résumé

Le calcium est un nutriment essentiel à la croissance et au maintien des fonctions métaboliques chez l'homme. D'ailleurs, plusieurs problèmes de santé dont l'ostéoporose, le diabète, l'hypertension et le cancer du colon ont été mis en relation avec une consommation insuffisante de calcium. Bien que le lait présente plusieurs avantages à cet égard, l'évolution des marchés à l'échelle mondiale montre, par ailleurs, une croissance importante de la consommation d'aliments enrichis et de suppléments nutritionnels, notamment de suppléments minéraux et surtout calciques qui représentent à eux seuls un marché de plus de 700 millions de dollars en Amérique. Des travaux de recherche réalisés à l'Université Laval ont déjà mis en évidence que l' α -lactalbumine (α -la), une des principales protéines du lactosérum (whey), favorise une absorption plus rapide et efficace du calcium. Par conséquent, tout en essayant d'établir ce que cette protéine devient au cours de la digestion dans l'estomac et dans l'intestin ainsi que la façon dont elle agit sur l'absorption du calcium et sous quelle forme (peptides), ce projet vise à exploiter ces connaissances dans la mise au point d'un supplément calcique pouvant servir à des fins nutraceutiques. Les résultats obtenus montrent que la digestion chez le rat de l' α -la est plus rapide que celle de l'ensemble des protéines du lactosérum et que les produits (peptides) libérés au cours de cette digestion diffèrent rapidement, particulièrement deux à trois heures après l'ingestion lorsque l'absorption du calcium est à son maximum. L'étude de ces peptides a permis de reproduire les hydrolysats d' α -la par la digestion enzymatique limitée, en laboratoire et à l'échelle pilote, afin d'en évaluer l'efficacité sur l'absorption calcique. Comparativement aux protéines du lactosérum et de l' α -la, les hydrolysats reproduits ont montré une plus grande efficacité à solubiliser le calcium dans l'estomac et, dans une moindre mesure, dans l'intestin où, dans des conditions défavorables du pH (6.8), le calcium a souvent tendance à précipiter avec le phosphore et le magnésium. Un supplément protéino-calcique développé à partir de ces hydrolysats pourrait donc présenter un net avantage sur les sels de suppléments calciques tels que les carbonates qui ont souvent tendance à précipiter dans l'intestin. Ce type de supplément serait surtout bénéfique pour les personnes âgées achlorhydriques ainsi que pour tous les patients opérés du tube digestif et les ulcéreux qui présentent des problèmes de sécrétions d'acides gastriques. Les résultats obtenus *in vivo* ont aussi permis d'observer une meilleure minéralisation, mais la trop courte période de l'expérimentation *in vivo* (2 semaines) n'a pas permis d'obtenir des résultats significativement différents sur le plan statistique.

Objectifs et méthodologie

Ces travaux visaient à aider l'industrie laitière à diversifier les utilisations du lactosérum et de ses protéines en exploitant leur potentiel nutraceutique pour produire des suppléments calciques destinés à l'industrie alimentaire ainsi qu'à des fins pharmaceutiques et médicales. Compte tenu de l'observation déjà faite que l'absorption du calcium au niveau intestinal est très efficace et plus rapide, deux à trois heures après l'ingestion des protéines du lactosérum, et notamment d'une de ses composantes, l' α -la, les objectifs spécifiques de ce projet étaient d'abord d'établir le plus précisément possible par chromatographie HPLC la nature des produits (peptides) retrouvés dans le système digestif du

rat, suite à l'ingestion de protéines du lactosérum et d' α -la et au moment où l'absorption du calcium était la plus élevée. Ces informations ont permis ensuite de réaliser en laboratoire et à l'échelle pilote la production de ces hydrolysats par digestion enzymatique contrôlée et leur séparation par ultrafiltration. Finalement, l'effet bénéfique de ces hydrolysats a été évalué chez le rat afin d'étudier leur efficacité dans des suppléments calciques et d'en établir les conditions d'utilisation éventuelles chez l'homme.

Résultats et perspectives

Les résultats obtenus au cours de la première phase du projet ont permis de démontrer pour la première fois que, comparativement au lactosérum, la digestion de l' α -la se déroulait de façon distincte et plus rapide au niveau de l'estomac et de l'intestin, notamment entre une et trois heures après le repas. L'absorption de l' α -la apparaissait également être plus rapide au cours de cette période. De même, les produits retrouvés dans le système digestif étaient distincts entre les deux régimes alimentaires, notamment une quantité plus élevée de peptides de petite taille moléculaire, d'équivalents en acides α -aminés et d'acides aminés libres après deux heures dans la partie supérieure de l'intestin des rats nourris avec l' α -la. La nature même de ces produits (profils peptidiques) était nettement différente. En général, le retard observé dans l'évacuation gastrique et l'absorption chez des rats alimentés avec le régime lactosérum s'est traduit par des teneurs en protéines solubles plus élevées dans l'estomac et dans les portions proximale et distale de l'intestin. Globalement, la digestion et l'absorption des rats du groupe α -la était si rapide

que les seuls produits protéiques résiduels retrouvés dans l'intestin étaient ceux issus de l'autolyse des enzymes gastriques et intestinales. De même, la solubilisation et l'absorption du calcium et du phosphore étaient également différentes entre les deux régimes. Ainsi, comparativement au groupe lactosérum, les rats alimentés avec le régime contenant de l' α -la ont présenté, dans les trois heures suivant la prise alimentaire, des concentrations globales en calcium soluble plus élevées dans l'estomac ainsi que dans les portions proximale et distale de l'intestin. Les teneurs en calcium insoluble ont été, à la même période, plus faibles dans le tube digestif des rats nourris avec l' α -la que dans celui des rats alimentés avec du lactosérum.

De même, les niveaux de phosphore soluble dans l'estomac et dans la portion proximale du petit intestin des rats alimentés avec le régime lactosérum étaient en général supérieurs à ceux observés dans le groupe de l' α -la. Parallèlement, et malgré une régulation homéostatique très rigoureuse du calcium sérique dans l'organisme, l'effet bénéfique d' α -la sur la solubilisation

du calcium a entraîné, dans les deux premières heures précédant l'ingestion alimentaire, une augmentation supérieure des concentrations sériques du calcium au niveau de la veine porte. Enfin, l'adaptation des rats à ces deux régimes alimentaires a été aussi très différente. Dans le but de maximiser l'efficacité d'absorption, les rats alimentés avec le régime lactosérum ont développé des villosités très importantes au niveau de la muqueuse intestinale. Une adaptation n'a pas été nécessaire dans le groupe α -la qui a démontré ainsi une certaine supériorité en ce qui concerne son efficacité d'absorption. Ces résultats ont été mis en relation avec l'observation déjà faite que, comparativement aux protéines de soja ou aux autres protéines du lait (caséines), les protéines du lactosérum, et plus particulièrement celles de l' α -la, favorisaient davantage une absorption efficace et rapide du calcium entre zéro et trois heures après leur ingestion. Les résultats de ces travaux obtenus à l'échelle du laboratoire nous ont permis, au cours de la deuxième phase des travaux, de reproduire, grâce à une hydrolyse peptique limitée, des hydrolysats d' α -la de composition comparable à celle retrouvée dans les contenus stomacaux des rats une heure après le repas. Les différentes hydrolyses ont ainsi permis de confirmer la résistance de la β -lactoglobuline (β -la) à la pepsine dans l'estomac des rats alimentés avec un régime alimentaire composé de protéines du lactosérum. En outre, ces résultats nous ont permis d'expliquer pourquoi la vidange gastrique dans le groupe lactosérum était plus lente que celle observée dans le groupe de rats nourris à base d' α -la. Les résultats obtenus au niveau de la phase II ont aussi été en accord avec ceux obtenus au niveau de la phase I et même les expliquaient encore mieux. À partir des résultats de la phase II, il est apparu que la digestion et l'absorption moins efficace observée chez des rats alimentés avec un régime composé de lactosérum étaient principalement attribuables à la présence de β -la dans cette diète. Ces résultats ont également permis, notamment en comparant les profils peptidiques de l' α -la et de β -la obtenus par l'électrophorèse capillaire, de démontrer la très grande susceptibilité d' α -la aux enzymes digestives (pepsine) et, de là, sa supériorité dans le métabolisme phosphocalcique.

Ces résultats ont donc montré clairement la qualité biologique de cette protéine par rapport aux protéines du lactosérum entier et aux caséines dont la digestion et l'absorption étaient retardées par la coagulation au niveau de l'estomac. Nous avons également mis à profit la résistance de la β -la résiduelle dans la source protéique enrichie en α -la pour déterminer le temps d'hydrolyse et le rapport enzyme substrat nécessaire pour reproduire les profils peptidiques présumés. Comme cette protéine (β -la) était résistante à la pepsine, sa proportion tendrait à augmenter au cours de la digestion. Il

nous suffisait alors de calculer la proportion en β -la résiduelle qui correspondait la mieux à celle obtenue *in vivo* chez des rats alimentés avec une diète composée de la source protéique enrichie en α -la. Il faut souligner cependant que la résistance de la β -la à la pepsine dans l'estomac était en accord avec sa fonction biologique comme transporteur d'acides gras et de vitamine A. Pour assurer cette fonction au niveau de l'intestin, il fallait qu'elle soit intacte. Cette résistance pourrait d'ailleurs être mise à profit pour concevoir un nutraceutique qui aurait un rôle majeur dans le métabolisme des acides gras et de la vitamine A. Pour compléter la phase II, les technologies d'hydrolyse enzymatique *in vitro* et d'ultrafiltration ont permis de reproduire les hydrolysats à l'échelle pilote.

Dans la troisième phase des travaux, les hydrolysats ainsi obtenus par une hydrolyse peptique très limitée dans un bioréacteur enzymatique et par ultrafiltration avec des membranes (Romicon PM30) de seuil de coupure de 30 000 daltons ont été utilisés dans la formulation de diètes dont l'efficacité sur la formation osseuse a été évaluée chez des rats. Comparativement au groupe lactosérum, les rats alimentés avec le régime contenant de l' α -la et ses hydrolysats rétentats ont présenté, dans les trois heures suivant la prise alimentaire, des concentrations globales en calcium insolubles plus faibles dans l'estomac et dans l'intestin. Les hydrolysats rétentats se sont particulièrement distingués par rapport aux deux sources protéiques en présentant des concentrations en Ca insoluble inférieures dans l'estomac et dans l'intestin où la neutralité du pH tend souvent à insolubiliser le Ca et à le rendre moins biodisponible pour l'absorption intestinale. Les teneurs en calcium dans le tibia droit des rats nourris de régimes composés de l' α -la et de ses hydrolysats étaient équivalentes, mais plus élevées que celles du groupe lactosérum. L'évaluation de l'ostéocalcine comme indicateur de la formation osseuse n'a pas été concluante dans le cadre de cette étude, à cause de l'utilisation du protocole de restriction alimentaire. Cette étude confirme donc l'effet bénéfique de l' α -la et de ses hydrolysats sur l'efficacité d'absorption du calcium dans le tube digestif et sa rétention dans le tibia, comparativement aux protéines du lactosérum dont elles ont été extraites. La supériorité des hydrolysats issus d'une hydrolyse limitée à la pepsine par rapport à l' α -la intacte, réside surtout dans leur plus grande capacité à contrecarrer l'insolubilisation du Ca dans l'estomac, et dans une moindre mesure, dans l'intestin. Il y aurait avantage, compte tenu de son action et de son efficacité à contrecarrer l'insolubilisation du Ca, de prendre en considération la conception d'un supplément calcique à partir des hydrolysats d' α -la plutôt qu'à partir de sa forme intacte.

Transfert des résultats

Dans un premier temps, les résultats de cette recherche pourraient être exploités par les industries de productions animales, notamment l'industrie aviaire. En effet, la croissance phénoménale maintenant obtenue pour les jeunes poulets s'accompagne, par ailleurs, de problèmes de développement osseux adéquat causant des pertes économiques importantes. Les fabricants d'alimentation destinée aux poulets sont donc à la recherche de suppléments

calciques efficaces et un transfert, vers cette industrie, pourrait se faire de 1 à 3 ans suivant la fin du projet. À long terme (3 à 5 ans) ce sont évidemment les industries alimentaires intéressées par l'enrichissement nutritionnel de leurs produits qui sont ciblées. Dans le cas des industries pharmaceutiques et des suppléments nutritionnels, des essais cliniques devraient cependant être réalisés.

Partenaires financiers

Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) : année 1

Novalait inc. : années 1, 2 et 3

Budget total : 196 000 \$



2750, rue Einstein, bureau 220-A
Sainte-Foy (Québec) G1P 4R1
Téléphone : (418) 527-7947
Télécopieur : (418) 527-5957
Courriel : novalait@novalait.ca

Point de contact

Responsable du projet :

Jean Amiot, Ph. D.

Centre de recherche en sciences et technologie du lait (STELA)

Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation

Université Laval

Québec(Québec) G1K 7P4

Téléphone : (418) 656-2482

Télécopieur : (418) 656-3353

Courriel : Jean.Amiot@al.n.ulaval.ca

Collaboratrice :

Odile Pantako, Ph. D.,

Centre STELA, Université Laval