

ADLF, 9 décembre 2016

A Sauret, Rennes

Impact de la pasteurisation et de l'homogénéisation
du lait maternel sur les cinétiques de digestion gastrique
chez le nouveau-né prématuré

Samira De Oliveira¹, Olivia Ménard¹, Amandine Bellanger², Patrick Pladys²,
Yann Le Gouar¹, Gwénaële Henry¹, Emelyne Dirson², Florence Rousseau¹,
Frédéric Carrière³, Didier Dupont¹, Claire Bourlieu¹, Amélie Deglaire¹



¹ Agrocampus Ouest, INRA, UMR STLO, Rennes, France

² CHU Rennes, Pôle Mère-Enfant

³ CNRS-UMR 7282 EIPL, Marseille, France

Introduction

- **Prématurés (< 37 SA)** : 7 % des naissances en France (Blondel et al., 2011)

- **Lait maternel** : aliment idéal pour les nouveaux-nés (Victora et al., 2016)

→ prévention des Entérocolites Ulcéronécrosantes chez les prématurés

→ Grands prématurés (< 32 SA, < 1,5 kg) : lait exprimé par la mère ou de donneuse anonyme

- **Lait de donneuse : pasteurisation de Holder** (62,5 °C; 30 min)

- Destruction de pathogènes (CMV, HIV) et stabilisation microbienne (Andersson et al., 2007)

- Dénaturation de vitamines et de protéines bioactives

- Cholesterol Ester Hydrolase (CEH ou BSSL), Lipoprotéine lipase

Absorption lipidique et croissance réduites

(Andersson et al., 2007; Montjoux-Regis et al., 2011; Williamson et al., 1978)

- **Pasteurisation** : réduction du degré de lipolyse ?

- **Homogénéisation du lait maternel** (Thomaz et al., 1999; Rayol et al., 1993; Martinez et al., 1987)

- Globules gras fragmentés en petites gouttelettes lipidiques → augmentation de la surface spécifique →

Augmentation du degré de lipolyse du lait pasteurisé ?



Impact de ces traitements sur les cinétiques d'hydrolyse et de déstructuration lors de la digestion gastrique chez le nouveau-né prématuré?



❑ DIGESTION DU LAIT MATERNEL *IN VIVO* CHEZ LE NOUVEAU-NÉ

[NCT02112331 \(ClinicalTrials.gov\)](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02112331)

Avril 2014- Avril 2016

- Enfants prématurés hospitalisés (GA < 32 semaines)
- Nutrition entérale (tube nasogastrique)
- Alimentation ≥ 120 mL/kg/jour ttes les 3 h

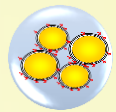
GROUPE A

Lait de la propre mère



Lait Cru

→ collecté < 24h
avant admin

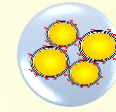


Lait Pasto

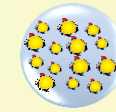
→ 1 pool aliquoté en 6
biberons

GROUPE B

Lait de **donneuse anonyme**



Lait Pasto

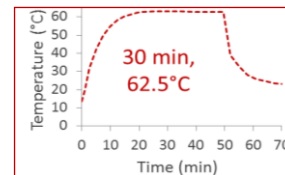


Lait Homogénéisé

→ Même pool de lait

Lactarium

Pasteurisation de
Holder



Homogenisation indirecte
par ultrasons



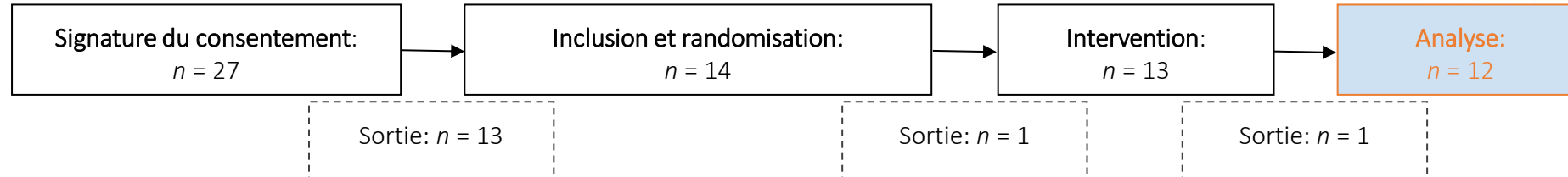
→ 595 W, 3 periods of 5
min interrupted by 30s
of pause



GROUPE A : PROTOCOLE

ClinicalTrials.gov

NCT02112331 (ClinicalTrials.gov)



- Malformation ou maladie digestive
- Gonflement abdominal
- Traitement avec catecholamine or morphine

- Echec de prélèvement (volume < 4 mL)



	Moyenne $\pm$ SD	Min-Max
Age gestationnel à la naissance (SA)	30.0 $\pm$ 1.1	28.1 – 31.7
Poids à la naissance(kg)	1.4 $\pm$ 0.3	0.9 – 1.9
Sexe, n F/M (%)	-	6/6 (50.0)
Age au 1° jour (j)	27 $\pm$ 12	14 – 53
Poids au 1° jour (kg)	1.8 $\pm$ 0.4	1.2 – 2.4

GROUPE A : PROTOCOLE

ClinicalTrials.gov

NCT02112331 (ClinicalTrials.gov)

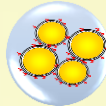


Lait de leur propre mère



Cru

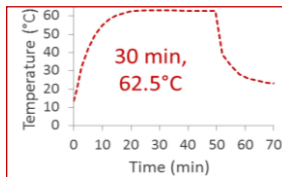
→ collecté < 24h
avant admin



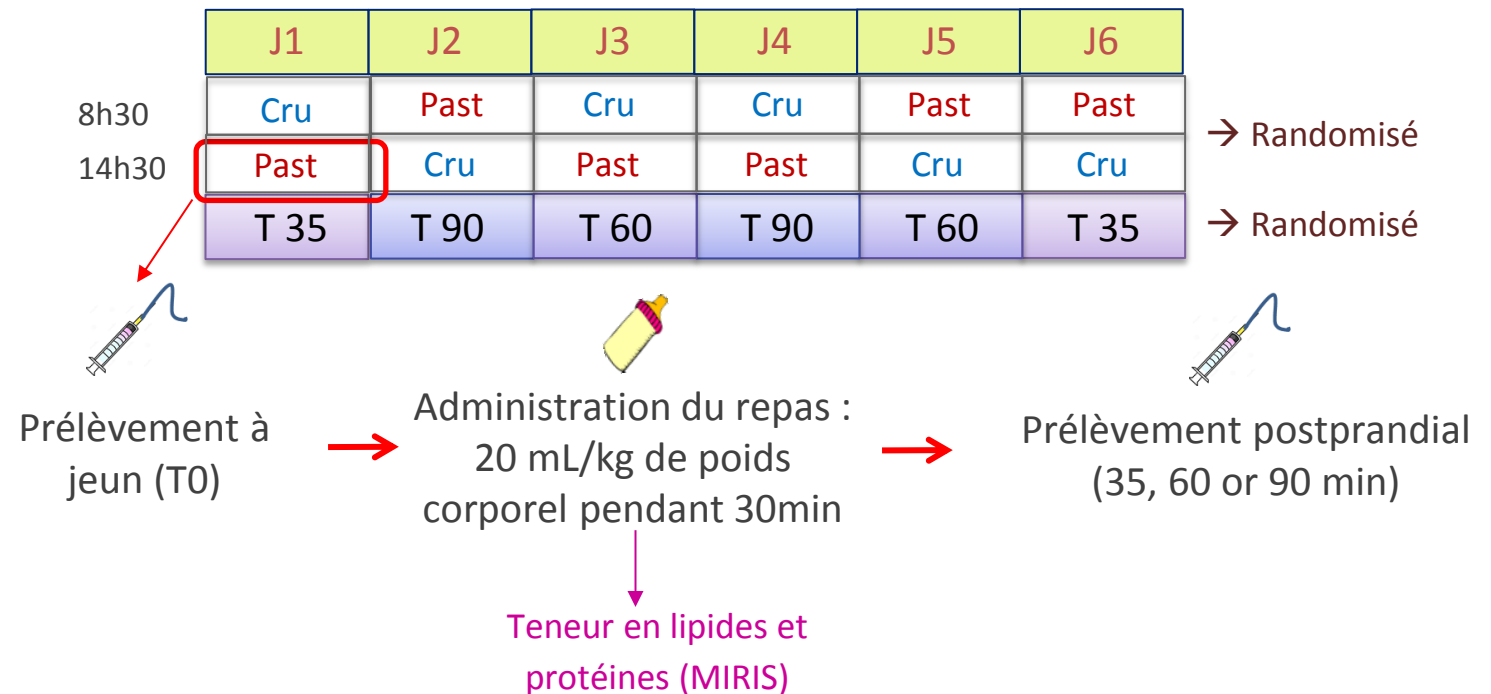
Pasteurisé

→ 1 pool aliquoté en 6
biberons

Pasteurisation de Holder
62,5 °C, 30 min



Essai croisé



→ Nombre d'échantillons : 120 digesta + 70 laits à analyser

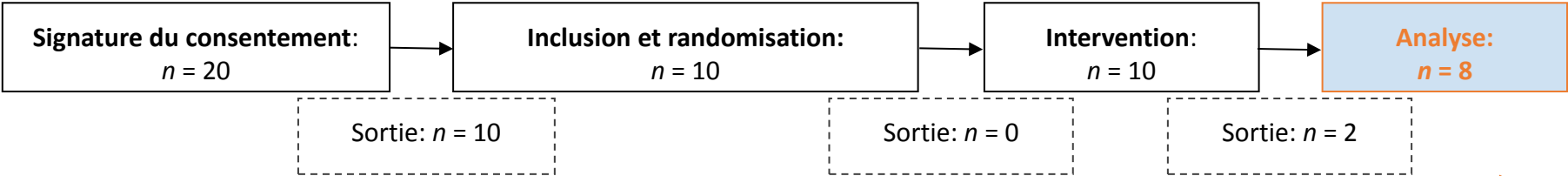


CHU
Rennes

GROUPE B : PROTOCOLE

[NCT02112331 \(ClinicalTrials.gov\)](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02112331)

- Enfants prématurés hospitalisés (GA < 32 semaines)
- Nutrition entérale (tube nasogastrique)
- Alimentation ≥ 120 mL/kg/jour ttes les 3 h
- Non “allaité” par leur mère



- Digestive disease or malformation
- Abdominal bloating with abdominal tension
- Treatment with catecholamine or morphine
- Sampling failure (volume < 4 mL) on two samples taken at the same postprandial time point (except 90 min) and for the same type of milk.



	Moyenne $\pm$ SD	Min-Max
Age gestationnel à la naissance (sem)	29.5 $\pm$ 1.5	27.3 – 31.3
Poids à la naissance(kg)	1.2 $\pm$ 0.3	0.8 – 1.9
Sexe, n F/M (%)	-	5/3 (62.5)
Age au 1° jour (j)	32.1 $\pm$ 21.3	11 – 73
Poids au 1° jour (kg)	1.7 $\pm$ 0.5	1.3 – 2.6

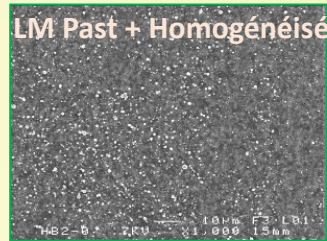
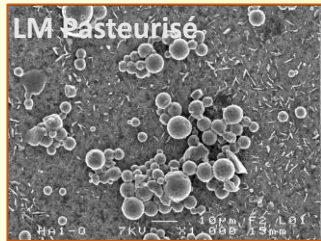
GROUPE B : PROTOCOLE

ClinicalTrials.gov

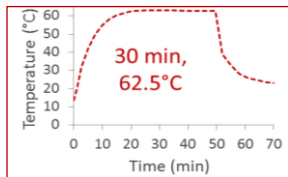
NCT02112331 (ClinicalTrials.gov)



Pool de Lait
de donneuse anonyme



Pasteurisation de Holder
62,5 °C, 30 min

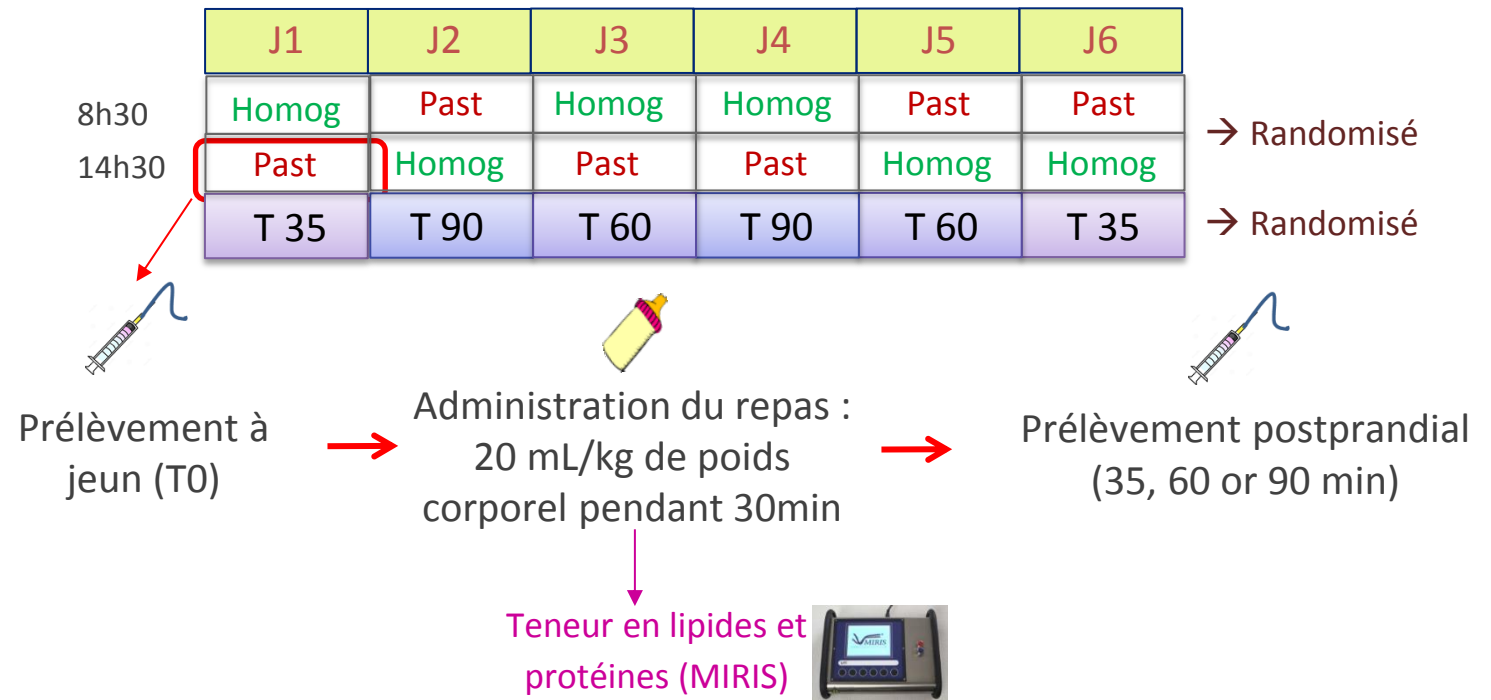


Homogénéisation indirecte
par ultrasonication



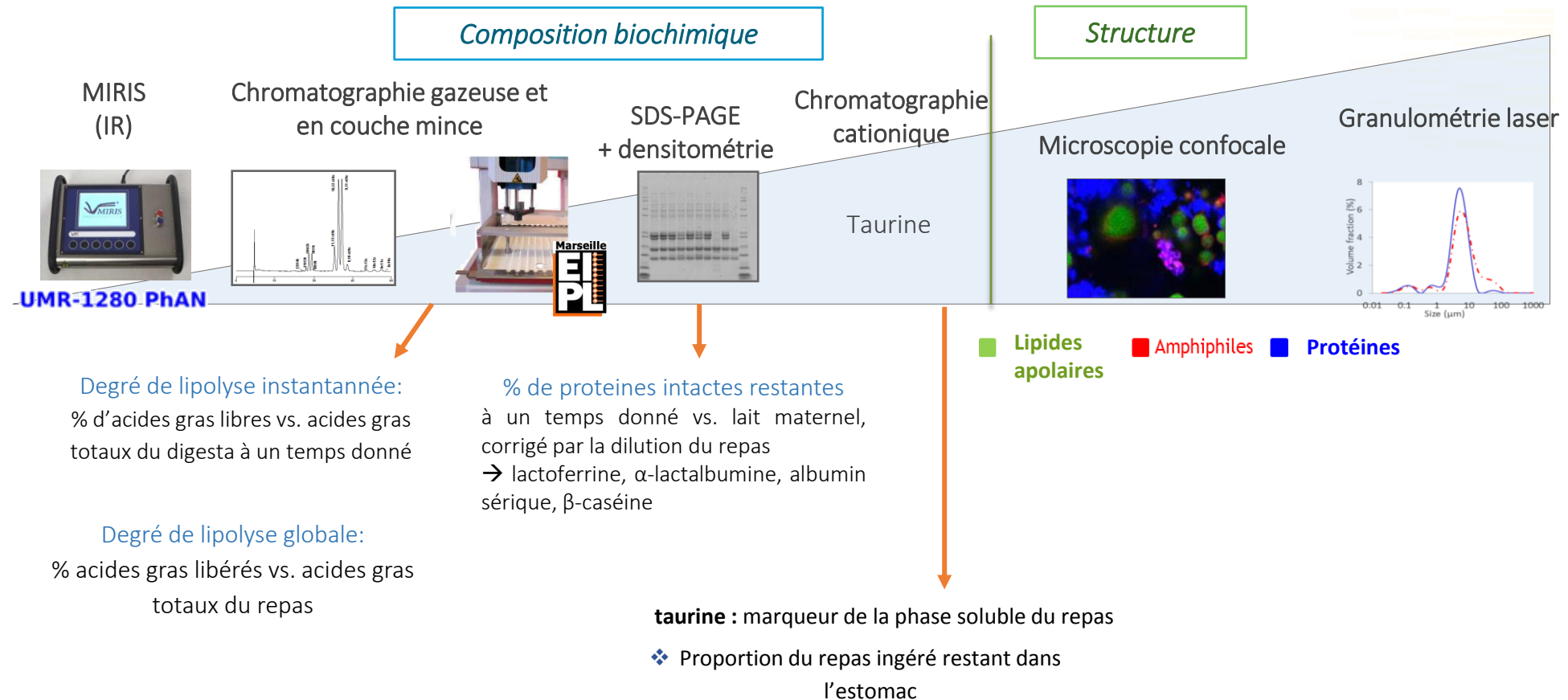
→ 595 W
→ 3 périodes de 5 min

Essai croisé



→ Nombre d'échantillons : 80 digestas + 8 laits à analyser

GROUPES A ET B : CARACTÉRISATION MULTI-ÉCHELLE DES DIGESTAS ET DU LAIT MATERNEL



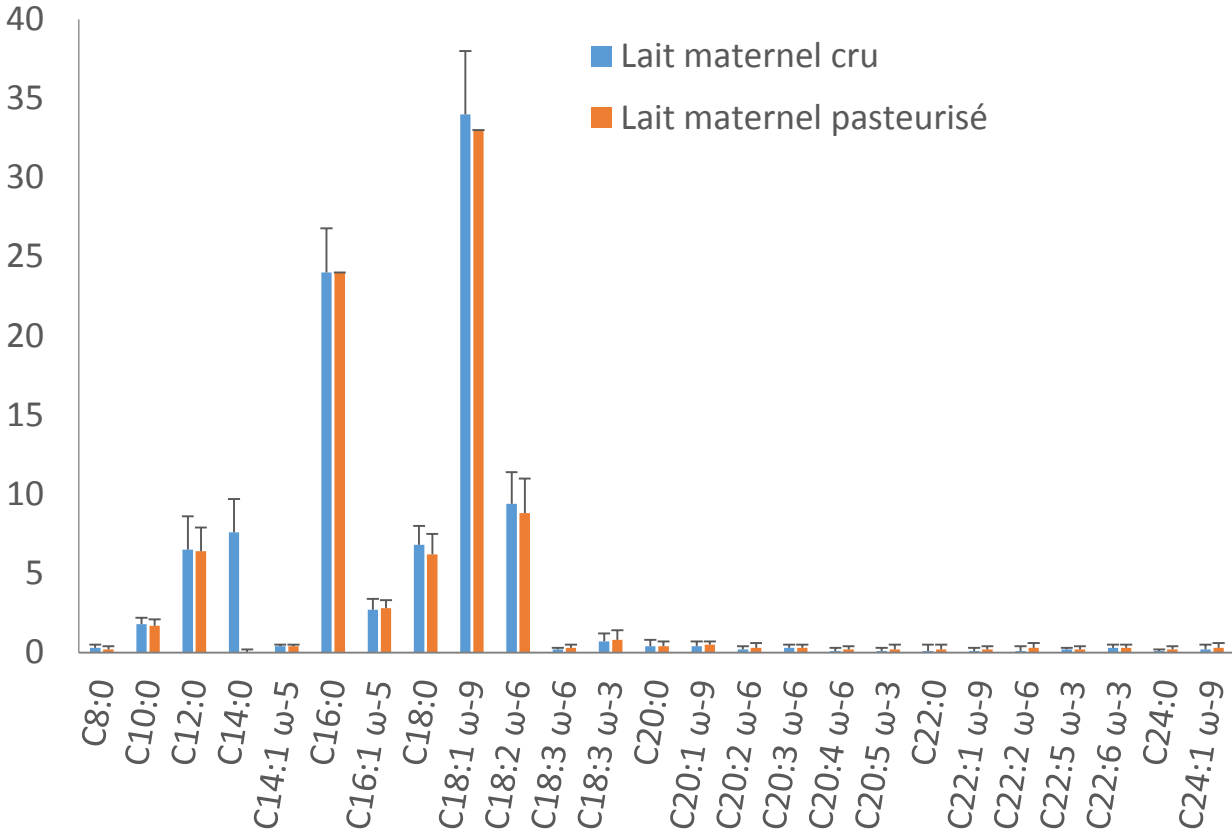
Statistiques : modèle linéaire mixte

Variable = **Temps + Repas + Repas x Temps** + Jour ou Poids corporel + Teneur en Protéines ou lipides du Lait + Sujet (aléatoire) + Erreur





COMPOSITION DES LAITS

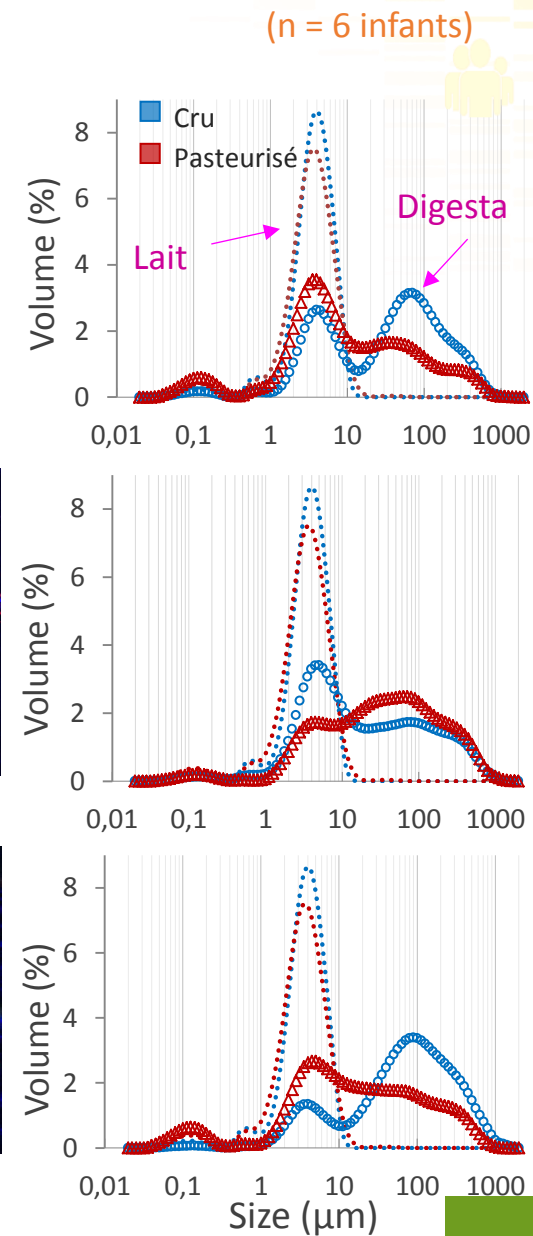
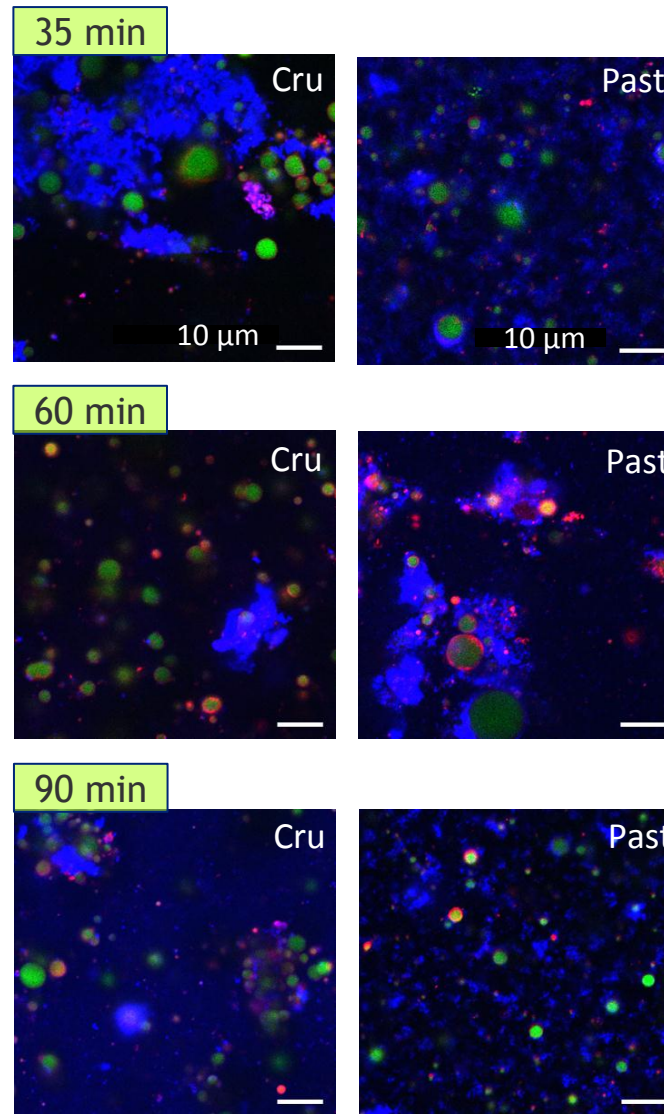
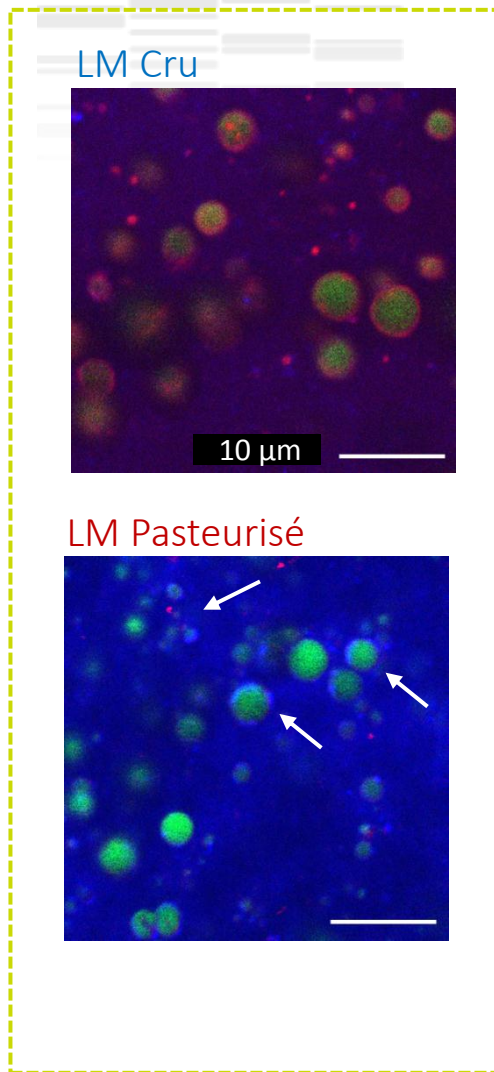


Groupe A

Groupe B

	Cru	Pasto	Pasto	Homog
Macronutriments (g/L)				
Lipides	40 ± 13	39 ± 5	33 ± 5	31 ± 4
Protéines	16 ± 4	21 ± 5	11 ± 1	11 ± 1
Glucides	78 ± 6	68 ± 6	78 ± 1	78 ± 1
Acides Gras (% w/w)				
AG saturés	49 ± 5	49 ± 5	51 ± 5	48 ± 4
AG insaturés	51 ± 5	51 ± 5	49 ± 5	52 ± 4
AG chaines courtes (C8)	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2
AG chaines moyennes (C10-C14)	16 ± 4	16 ± 4	16 ± 3	15 ± 3
AG chaines longues (C16-C20)	82 ± 5	82 ± 4	82 ± 4	83 ± 4
AG chaines très longues (C22-C24)	1.4 ± 1.2	2.1 ± 1.3	2.9 ± 2.3	2.6 ± 2.3
ω-6 / ω-3	8 ± 4	6 ± 3	7 ± 5	7 ± 5

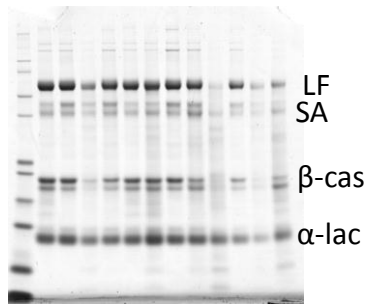
AGREGATION GASTRIQUE DU LAIT MATERNEL



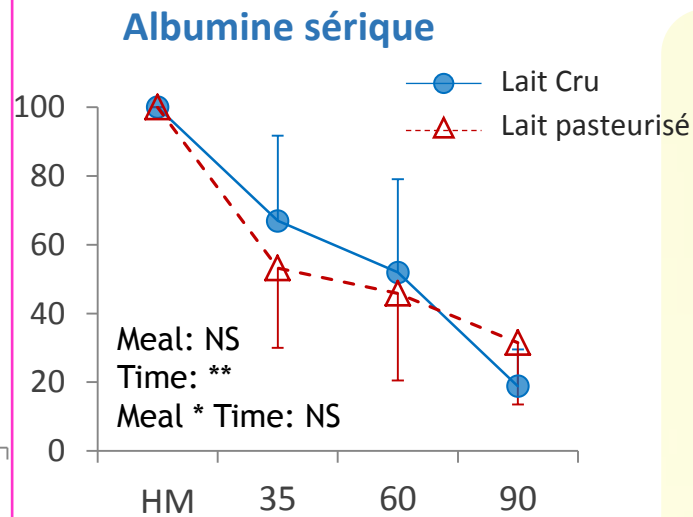
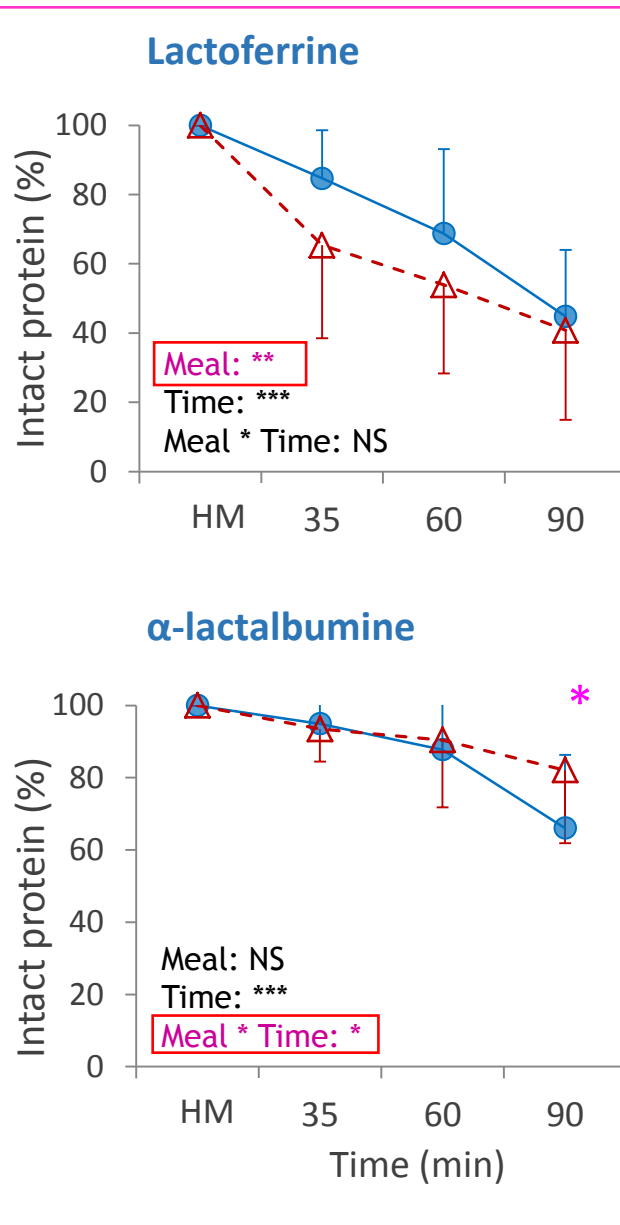
■ Apolar lipids ■ Amphiphiles ■ Proteins

Protéolyse gastrique : impact sélectif de la pasteurisation sur la protéolyse gastrique

SDS-PAGE



+ densitométrie



→ Protéolyse plus rapide pour la lactoferrine du lait pasteurisé

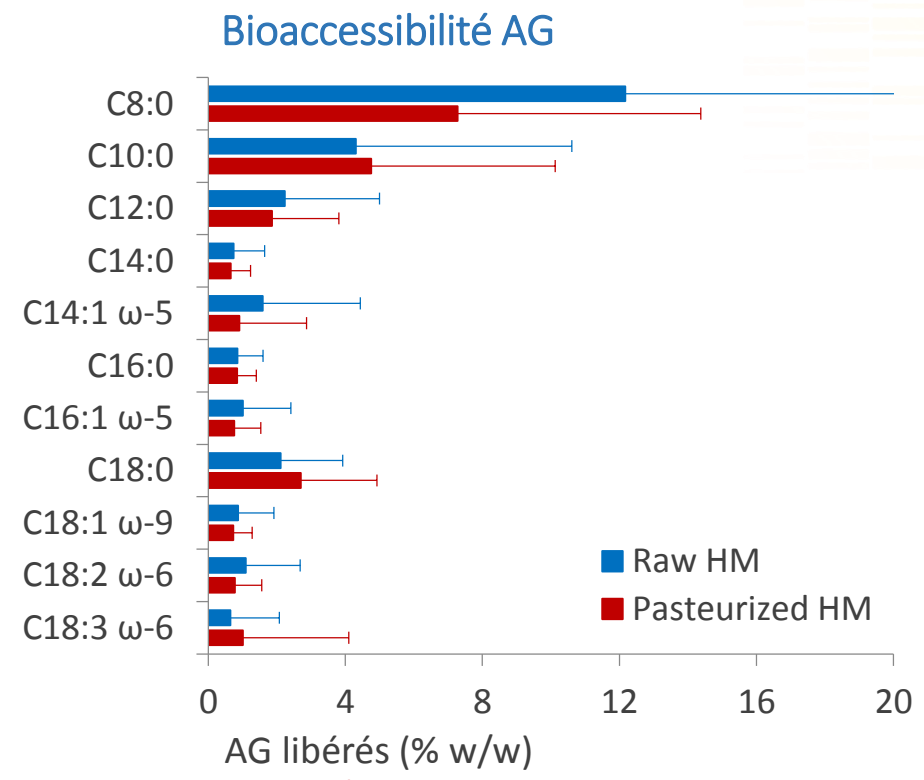
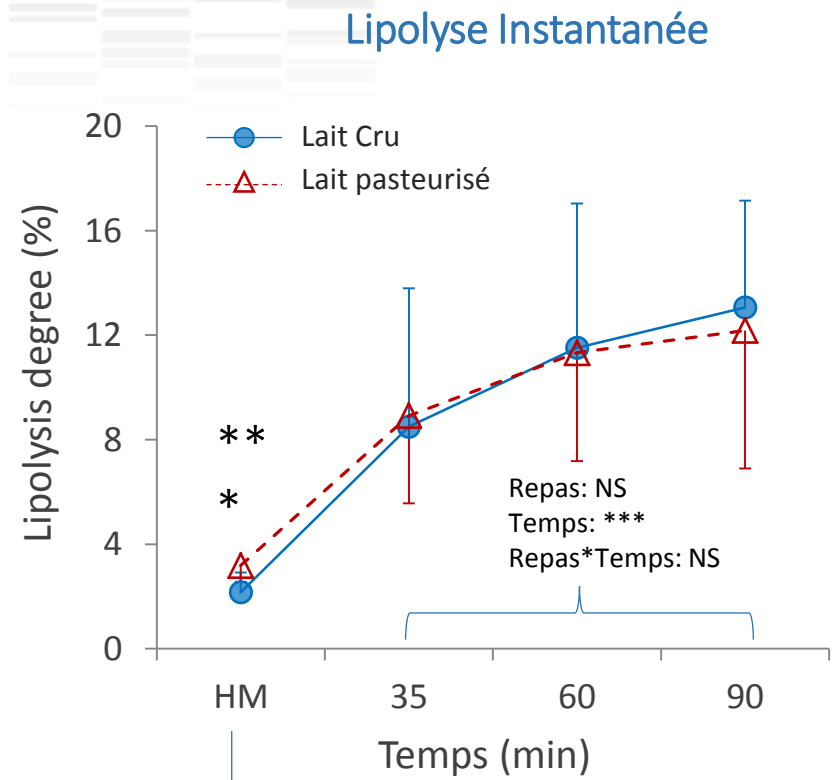
- Réduction de sa capacité à se lier au fer?
- Réduction de sa capacité bactericide?
- Réduction de sa capacité à stimuler la prolifération des cellules épithéliales?

→ A 90 min de digestion, protéolyse plus lente pour l'α-lactalbumine

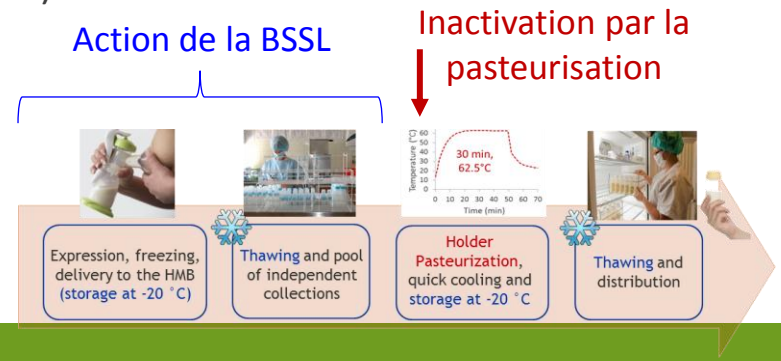
→ l'α-lactalbumine est la plus résistante à la protéolyse

Et au niveau des peptides :
Cinétique de libération différente
(32% : Pasteurisé > Cru)
Rôle de la plasmine ?

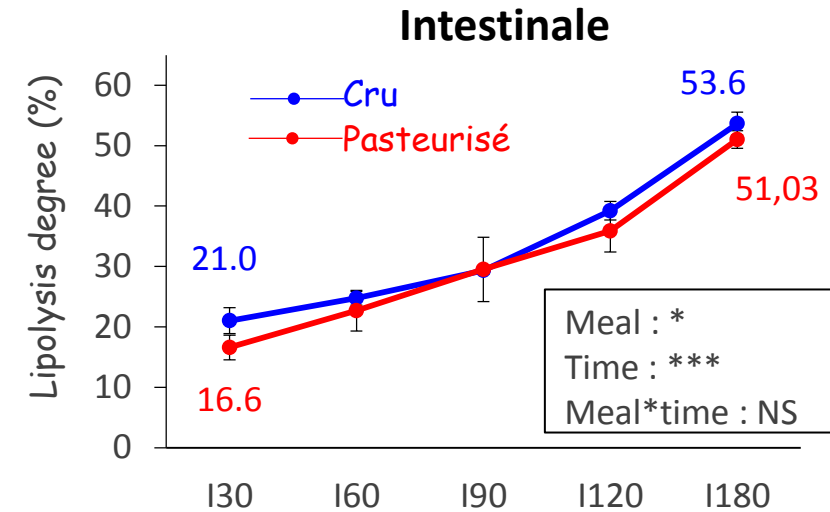
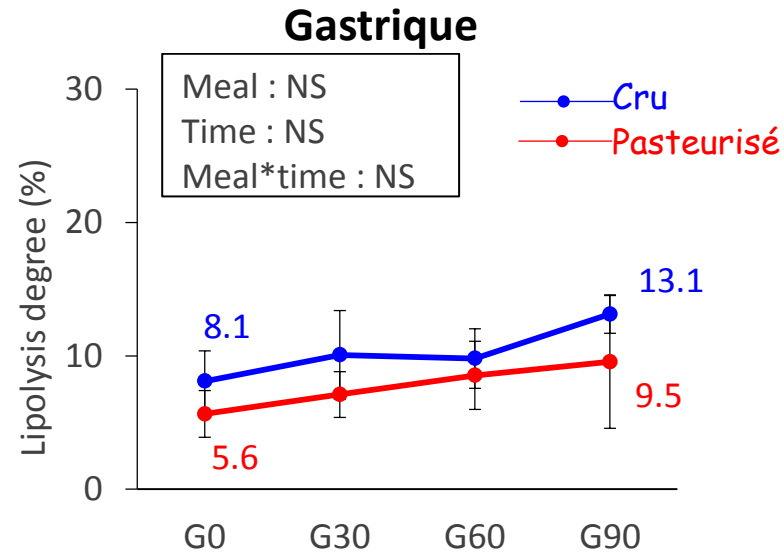
LA PASTEURISATION N'IMPACTE PAS LA LIPOLYSE GASTRIQUE DU LAIT MATERNEL



Pre-lipolyse: n = 4 enfants
Cru = 2.2 ± 0.8%
Past = 3.2 ± 0.6%



Etude in vitro au stade prématuré



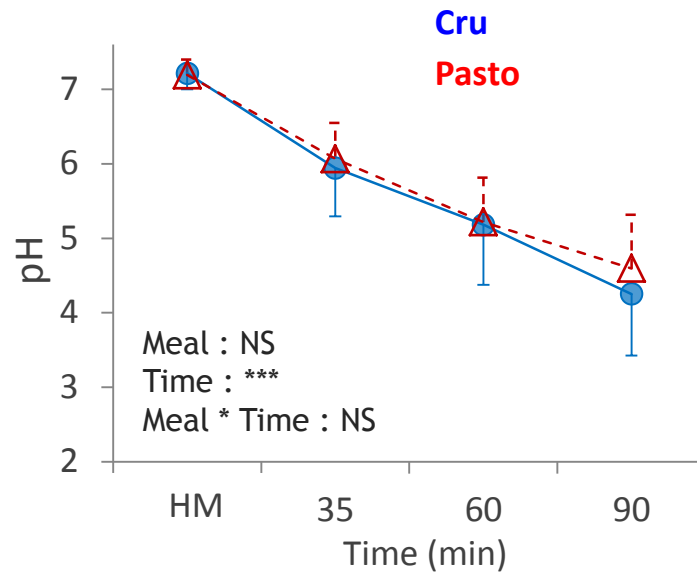
Fatty acid	B. FA released during intestinal digestion (% w/w of each FA initially esterified)						Effect of ^a		
	I60		I120		I180		Meal	Time	Meal * Time
	RHM	PHM	RHM	PHM	RHM	PHM			
C8:0	79.5 ± 11.5	47.9 ± 7.0	92.5 ± 9.6	63.9 ± 12.3	105.3 ± 14.1	83.3 ± 5.1	*	***	NS
C10:0	43.7 ± 3.4 ^b	28.0 ± 5.0 ^a	60.2 ± 3.0 ^b	46.5 ± 5.8 ^a	87.5 ± 8.2 ^b	65.7 ± 7.1 ^a	*	***	*
C12:0	26.6 ± 2.5 ^b	15.9 ± 3.5 ^a	42.3 ± 3.2 ^b	30.7 ± 3.8 ^a	67.4 ± 6.7 ^b	45.8 ± 6.9 ^a	*	***	*
C14:0	14.8 ± 1.5 ^b	9.5 ± 2.7 ^a	27.1 ± 2.4 ^b	21.1 ± 3.5 ^a	47.8 ± 4.2 ^b	33.6 ± 6.4 ^a	*	***	*
C14:1 c9	25.2 ± 2.5 ^b	15.4 ± 4.0 ^a	39.3 ± 3.3	33.1 ± 3.6	62.2 ± 4.5	47.9 ± 10.1	0.06	***	*
C16:0	10.1 ± 1.4	7.6 ± 0.5	17.6 ± 2.0	14.2 ± 1.2	32.9 ± 5.4	23.0 ± 1.7	*	***	NS
C16:1 c9	19.7 ± 4.2	13.1 ± 1.0	31.3 ± 4.6	24.4 ± 1.2	50.9 ± 8.8	37.5 ± 3.1	0.06	***	NS
C18:0	23.1 ± 4.0	21.8 ± 1.2	39.4 ± 3.5	39.2 ± 0.9	68.7 ± 8.3	63.0 ± 3.2	NS	***	NS
C18:1 c9	16.1 ± 1.3	11.0 ± 0.8	28.0 ± 1.2	22.9 ± 1.9	46.2 ± 4.8	38.0 ± 1.8	*	***	NS
C18:2 c9,c12	17.2 ± 1.2	11.0 ± 0.5	29.3 ± 1.2	22.7 ± 2.3	48.4 ± 3.9	37.4 ± 2.9	**	***	NS
C18:3 c9,c12,c15	22.4 ± 0.8	8.6 ± 7.5	38.1 ± 2.0	25.9 ± 3.4	60.6 ± 2.4	43.6 ± 4.7	**	***	NS

G, gastric phase followed by time in min; I, intestinal phase followed by time in min; ND, not determined.

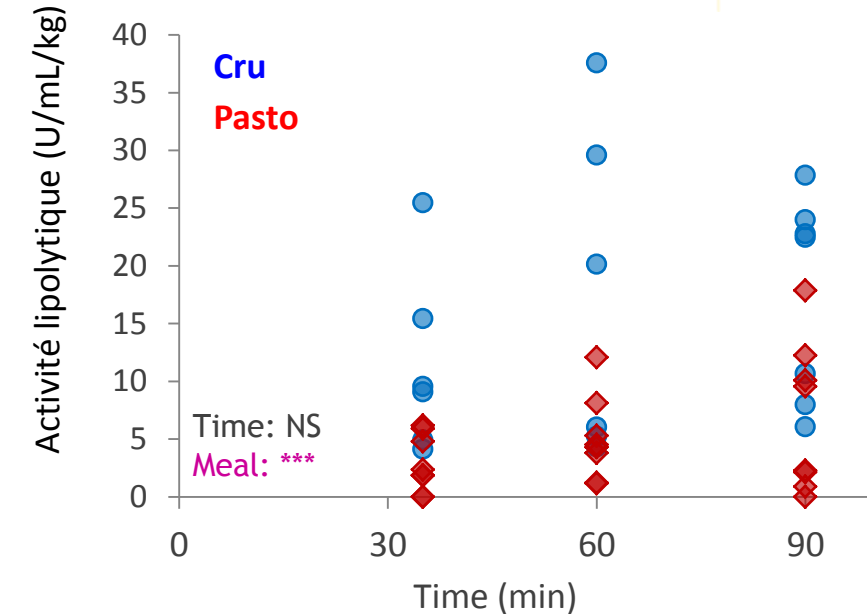
^a Statistics were conducted on data from human milk to G90 and from I60 to I180. Statistical significance: $p < 0.001$ (***); $p < 0.01$ (**); $p < 0.05$ (*); $p > 0.1$ (NS). When there was a significant interaction, multiple comparisons of means were conducted. Data having a different letter within the same row and at the same time point significantly differed.

La pasteurisation ne modifie pas le pH postprandial mais modifie l'activité lipolytique...

pH gastrique postprandiale



Activité lipolytique postprandiale

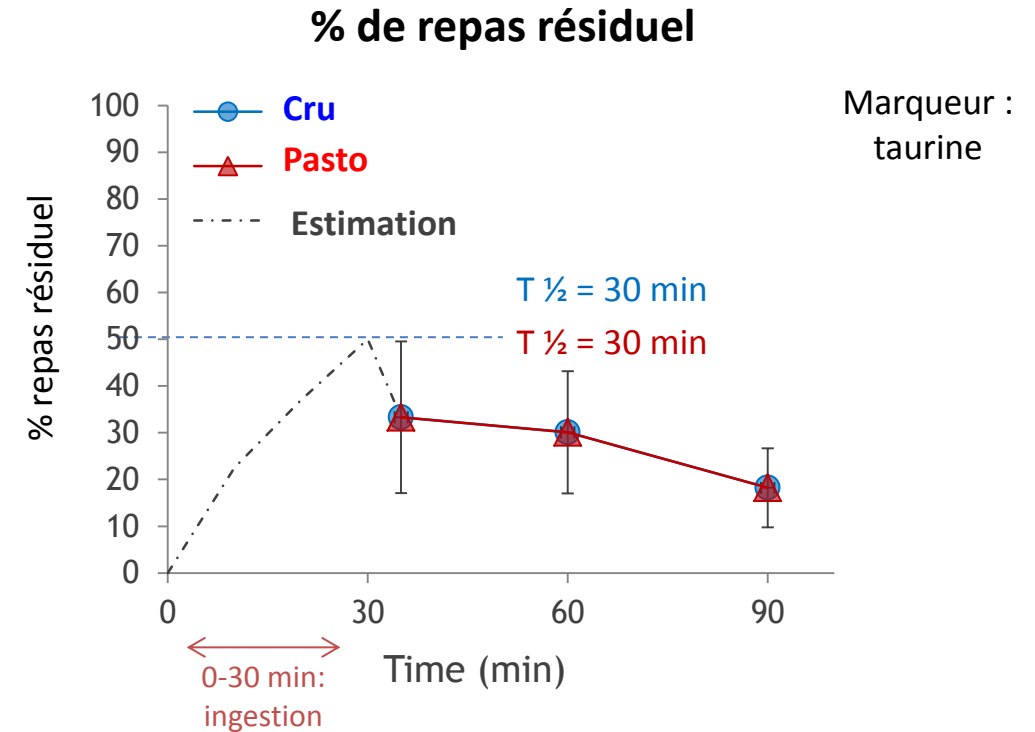
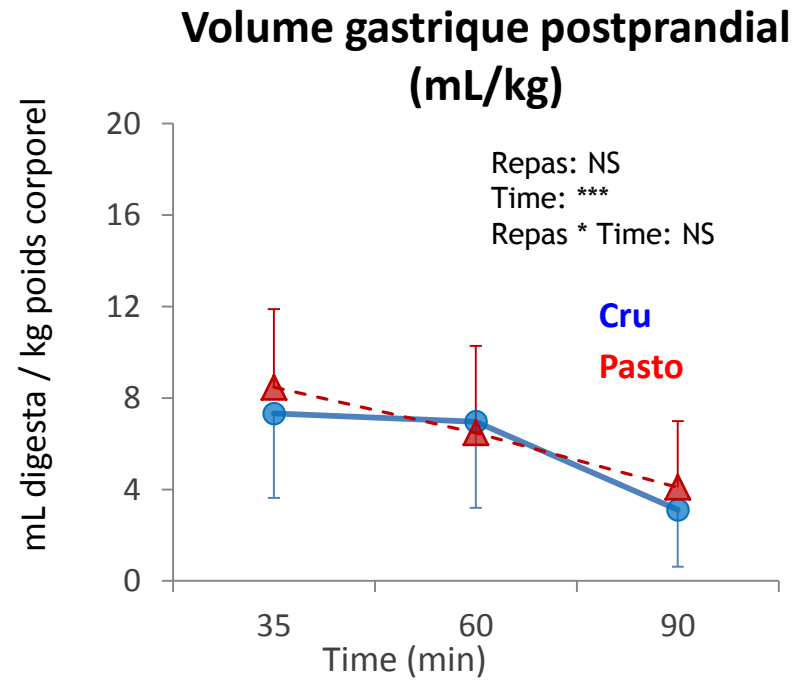


* Déterminé par titration des acides gras libres libérés de la tributyrine (pH-stat, pH 4.5, 37°C). n = 4 for each group

- ❖ Capacité d'acidification limitante des nouveaux-nés
- ❖ Fort pouvoir tampon du lait

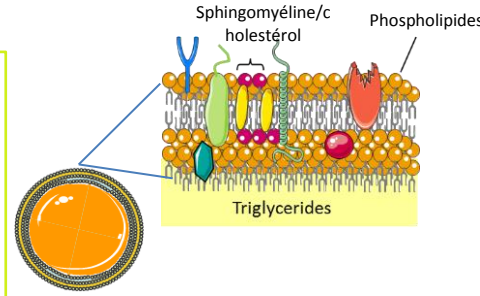
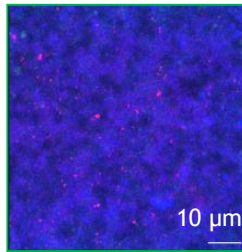
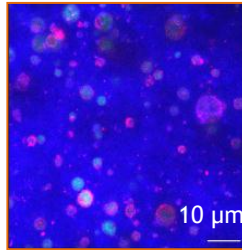
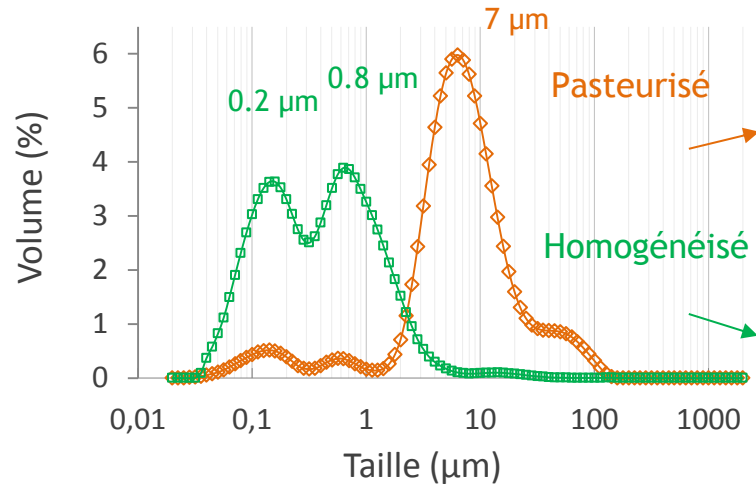
(Bourlieu et al., 2014; Salaun, Mietton, & Gaucheron, 2005)

- ❖ Activité lipolytique plus élevée avec le lait cru qu'avec la lait pasto : 9 U/mL pour le lait cru vs. 28 U/mL pour le lait pasto
- ❖ Plutôt dû à une activité plus élevée de la lipase gastrique que de la BSSL

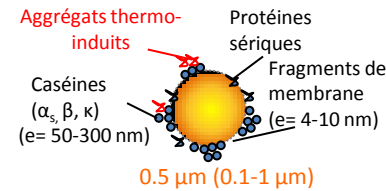


❖ Pas d'impact de la pasteurisation sur la vidange gastrique

Lait maternel



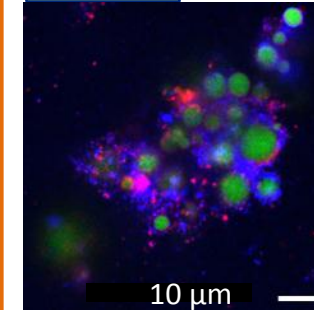
Gouttelettes submicroniques avec membrane néoformée



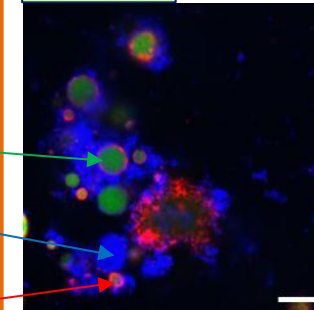
(n = 5)

Pasteurisé

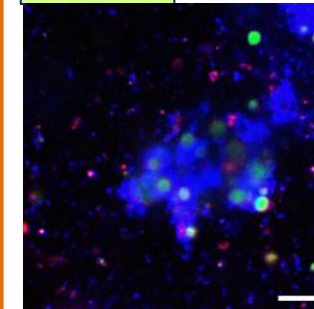
35 min



60 min

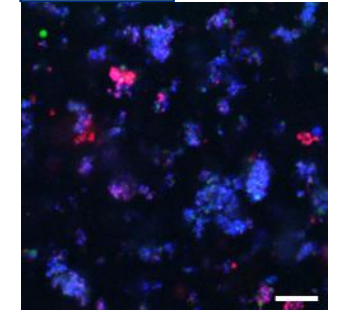


90 min

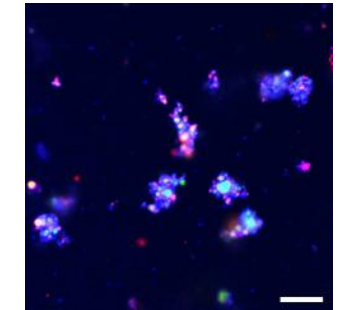


Homogénéisé

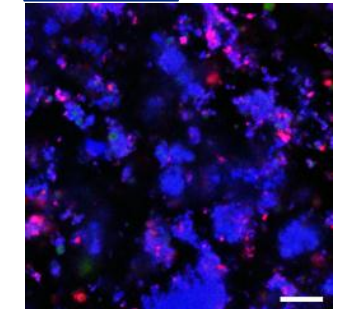
35 min



60 min



90 min



Surface spécifique :

Lait pasteurisé : $4,1 \pm 1,2 \text{ m}^2/\text{g}$

Lait homogénéisé : $25,5 \pm 3,8 \text{ m}^2/\text{g}$

- Forte déstabilisation de l'émulsion dès 35 min
- Persistance des caractéristiques structurales de la matrice sur toute la digestion gastrique
- Différence de type d'agrégats

Lipides apolaires

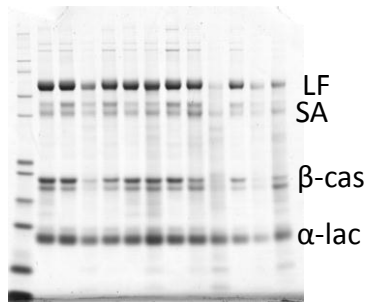
Protéines

Amphiphiles

Groupe B L'HOMOGÉNÉISATION IMPACTE SÉLECTIVEMENT LA PROTÉOLYSE GASTRIQUE

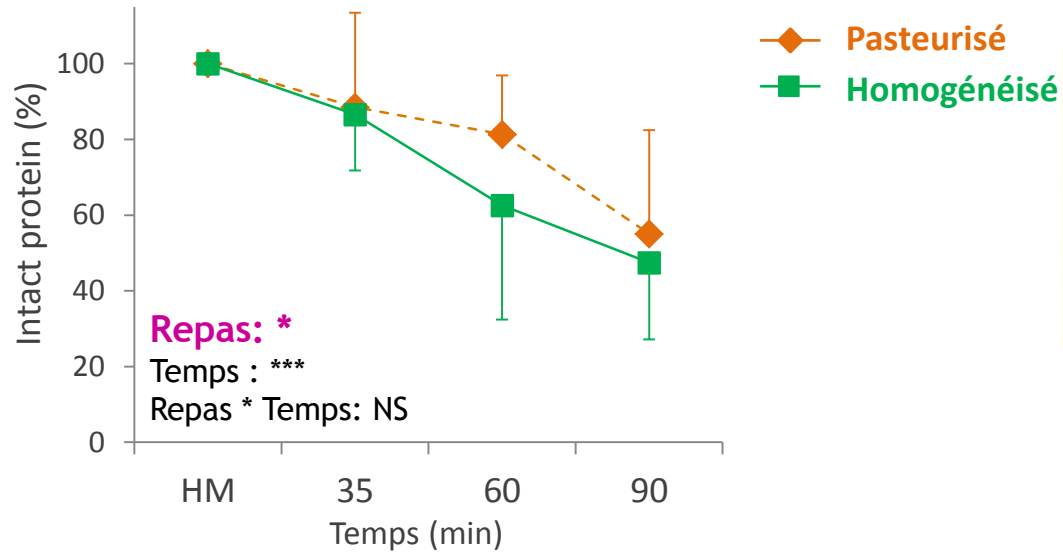


SDS-PAGE



+ densitométrie

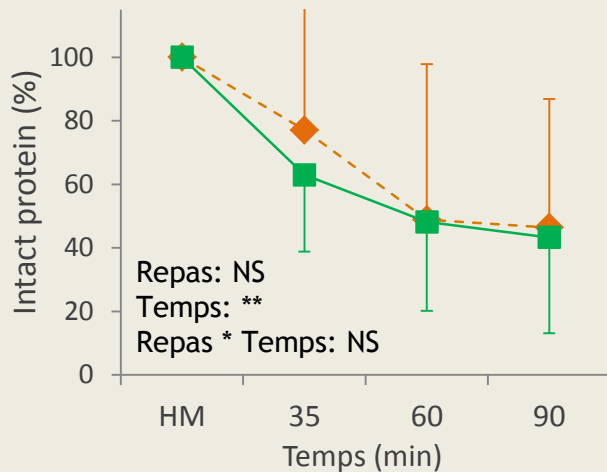
Albumine sérique



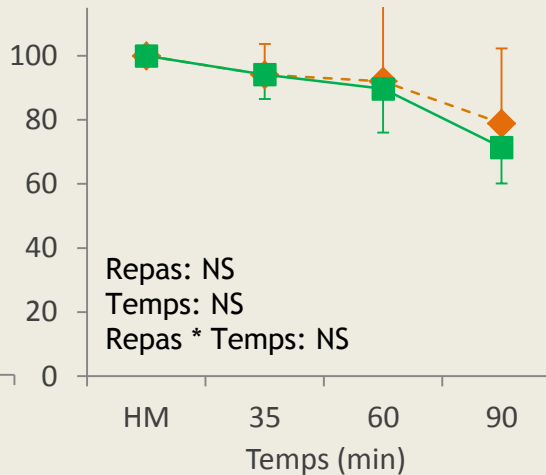
→ Protéolyse de l'albumine sérique plus rapide après homogénéisation (Macierzenka et al., 2009)

→ Pas d'impact significatif sur les autres protéines majeures

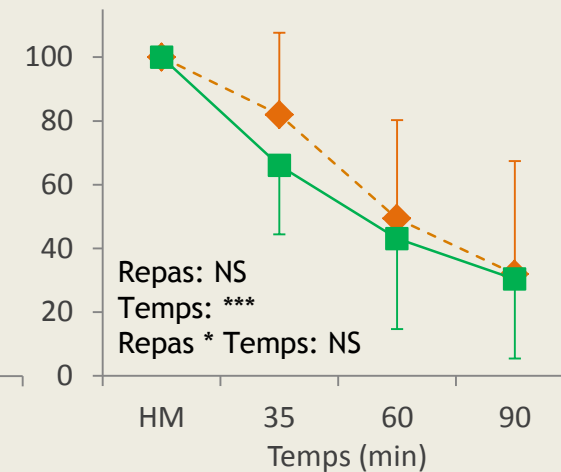
Lactoferrine



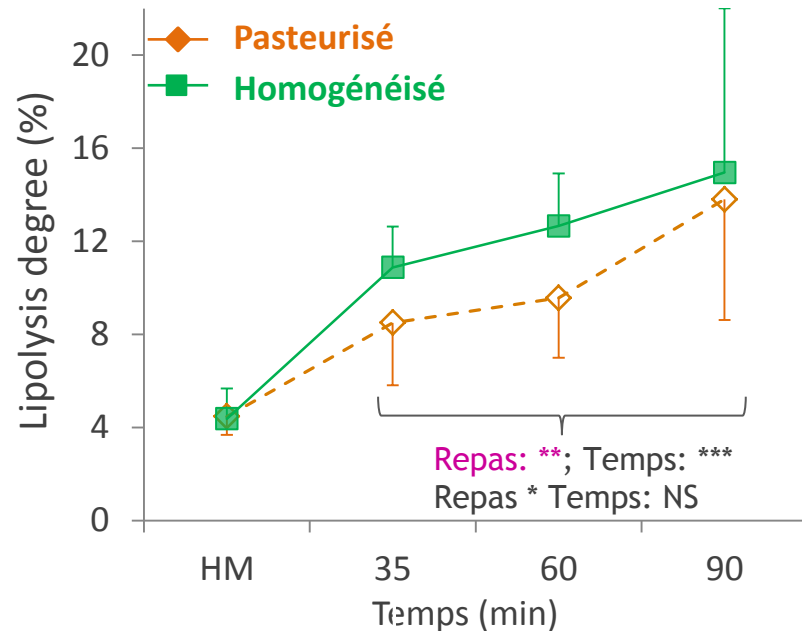
α-lactalbumine



β-caséine

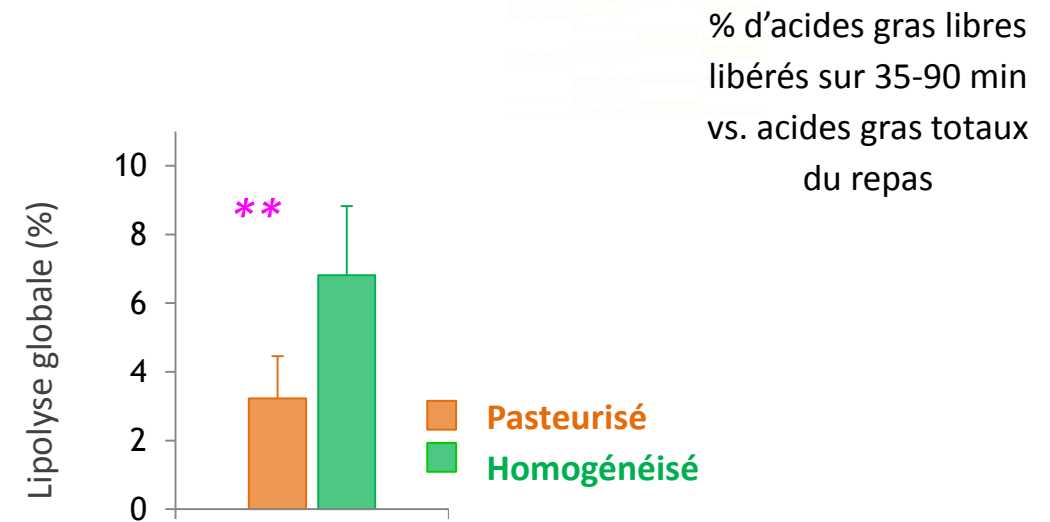


Lipolyse instantannée



% d'acides gras libres
vs. acides gras totaux
du digesta à un temps
donné

Lipolyse globale entre 35 et 90 min

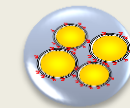
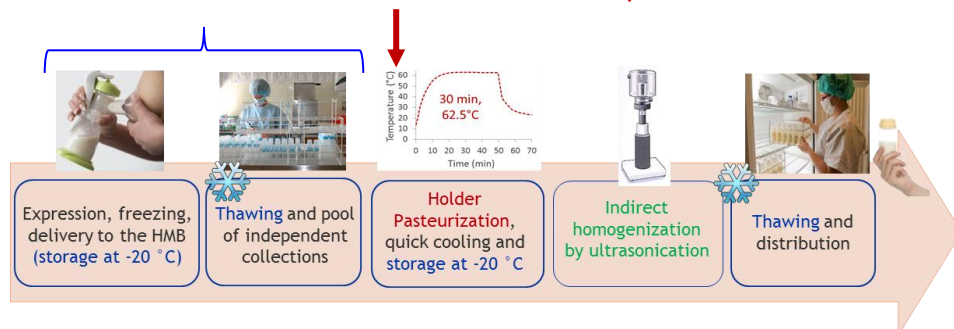


% d'acides gras libres
libérés sur 35-90 min
vs. acides gras totaux
du repas

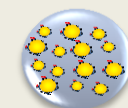
Prélipolyse: $4.4 \pm 1.0\%$ (n = 4 pools)

Action de la lipase endogène
(BSSL)

Inactivation thermique



Pasteurisé



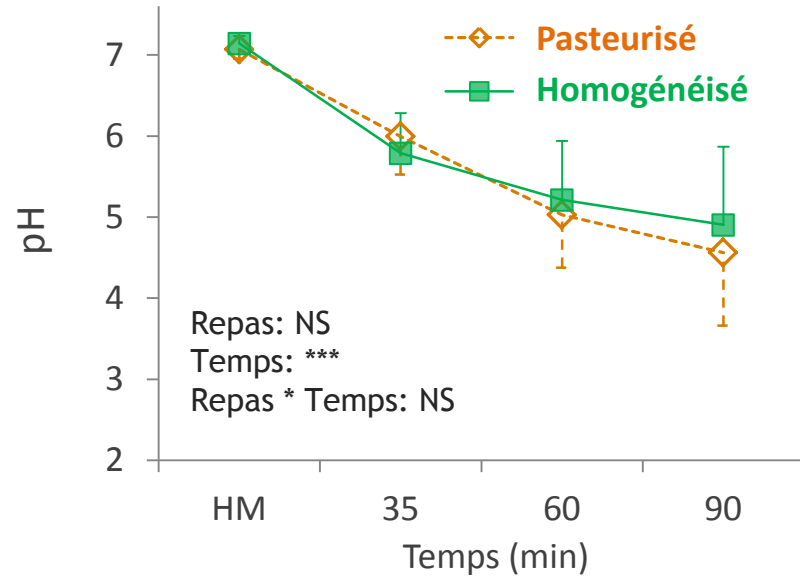
Homogénéisé

❖ Même composition, même niveau de pré-lipolyse, Lipase endogène inactivée

❖ Différente structure

➔ Surface spécifique des gouttelettes lipidiques
➔ facilite l'adsorption de la lipase gastrique
(Bourlieu et al., Food Chem, 2015)

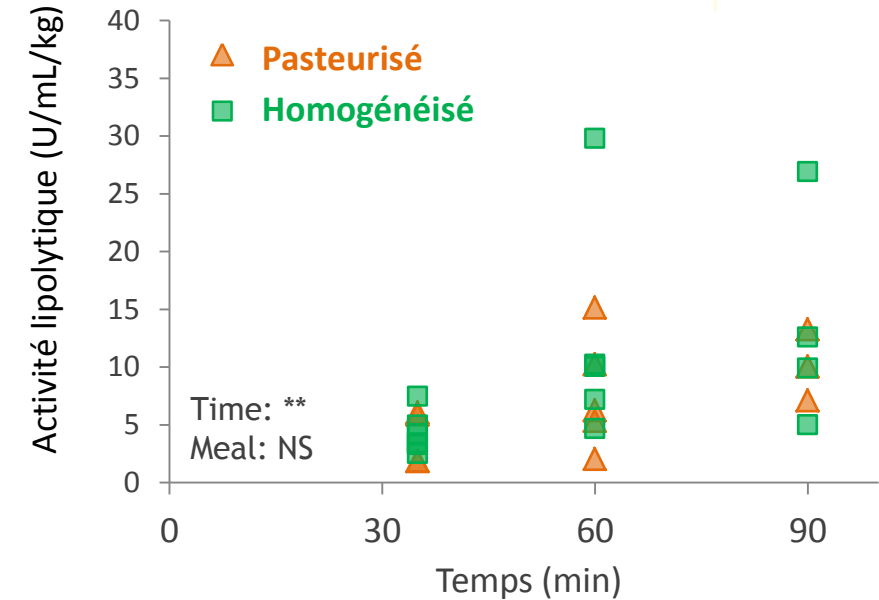
pH gastrique postprandiale



- ❖ Capacité d'acidification limitante des nouveaux-nés
- ❖ Fort pouvoir tampon du lait

(Bourlieu et al., 2014; Salaun, Mietton, & Gaucheron, 2005)

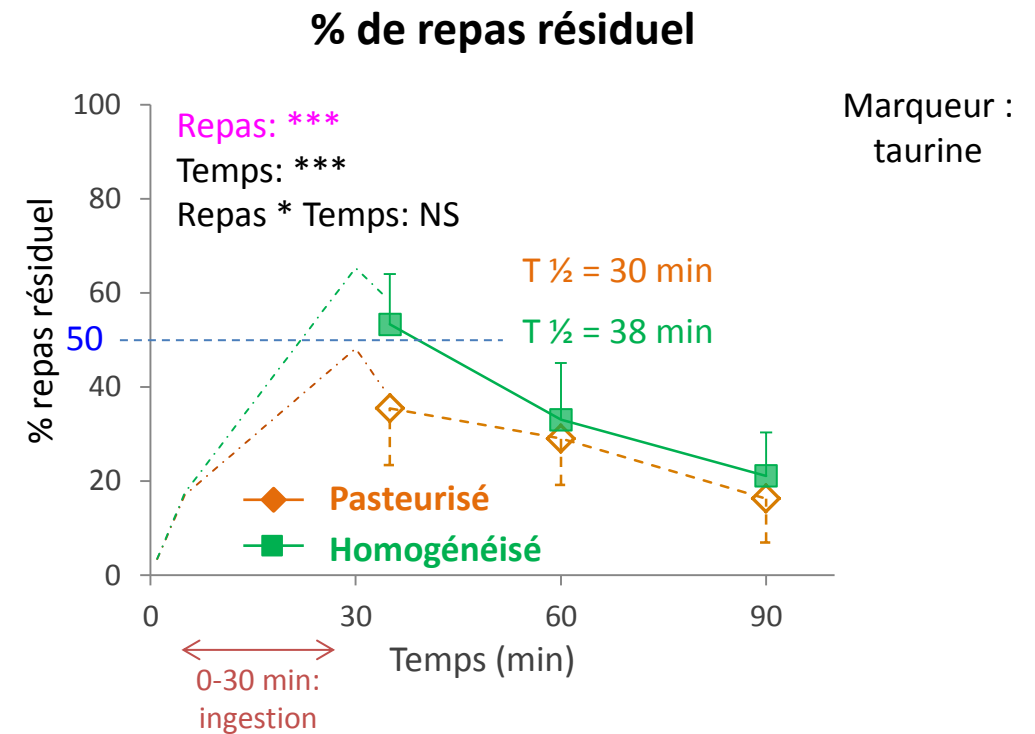
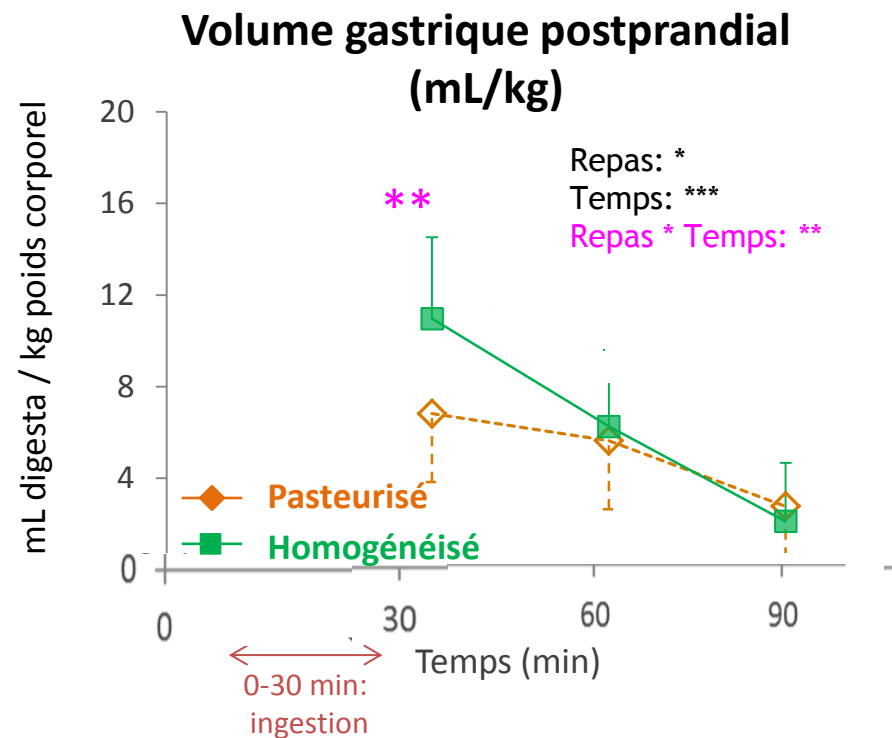
Activité lipolytique postprandiale



* Déterminé par titration des acides gras libres libérés de la tributyrine (pH-stat, pH 4.5, 37°C). n = 4 for each group

- ❖ Activité lipolytique : 7 – 21 U/mL

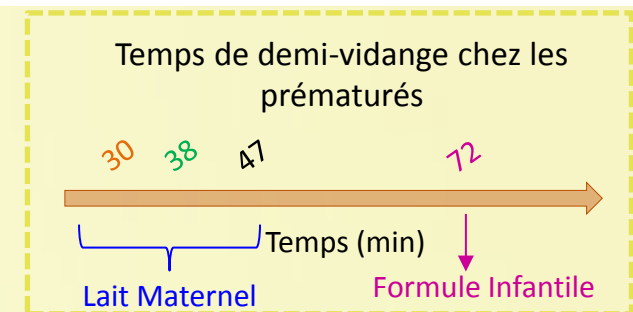
→ en accord avec la littérature (Friedrikson & Hernell, 1977; Roman et al., 2007)



❖ **Rétrocontrôle hormonal**

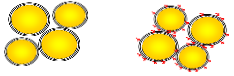
- ↗ Acides gras libres dans le duodénum → ↗ CCK
- ↘ contraction pylore et vidange gastrique

(Grider, 1994; Yamagishi & Debas, 1978)



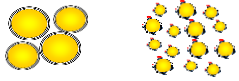
(Bourlieu et al., 2014)

CONCLUSION



Pasteurisation de Holder :

- Pas d'impact sur la lipolyse gastrique mais réduction de la bioaccessibilité intestinale des acides gras observée in vitro
- Augmentation de la protéolyse gastrique de la lactoferrine → impact sur ses fonctions bioactives ?



Homogénéisation :

- Pas d'impact majeur sur la protéolyse sauf pour l'albumine sérique
 - Augmentation et accélération de la lipolyse gastrique
 - Ralentissement de la vidange gastrique
- } → bénéfique pour la croissance de l'enfant prématuré?

La lipase endogène du lait (BSSL) est active pendant le stockage du lait (congélation/décongélation)

Apports en connaissances sur la physiologie digestive du nouveau-né → amélioration de notre modèle in vitro





EMELYNE
DIRSON

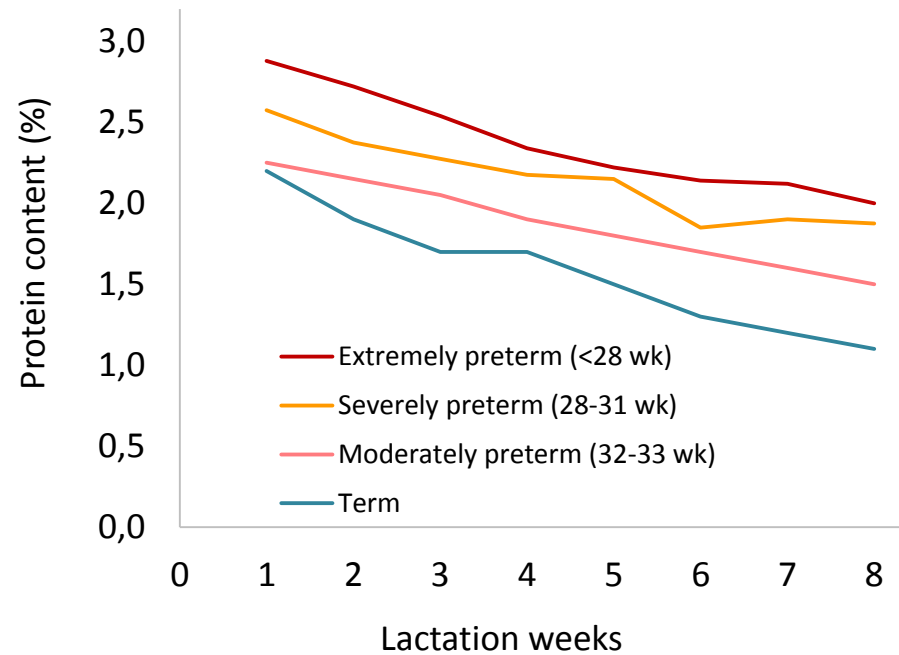


Merci aux techniciennes,
au personnel de l'hôpital,
aux volontaires et à leurs parents





Une structure complexe et en évolution



(Gidrewicz & Fenton, 2014; Malacarne et al., 2002)

More than a source of nutrition!

Bioactive components:

- Immunoglobulins, lactoferrin, growth factors, endogenous enzymes, oligosaccharides, cytokines...

(Donovan, 2016; Andreas et al., 2015;
Labbok et al., 2004)