

MÉMOIRE

présenté à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR-INGENIEUR EN BIOCHIMIE APPLIQUEE

par

Claudine ROSIERS



LE COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE DU RAT

1 - PURIFICATION ET PARAMÈTRES ENZYMATIQUES

2 - ACTION VIS-À-VIS DES DÉRIVÉS HYDROGÉNÉS OBTENUS À PARTIR D'HYDROLYSATS D'AMIDON

Présenté le 6 novembre 1984 à 16 h devant la Commission d'Examen

Président :	J.	MONTREUIL
Rapporteurs :	S.	BOUQUELET
	P.	WÜRSCH
Examineurs :	P.J.	SICARD
	J.P.	ROUSSEAU

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur S. BOUQUELET dans le laboratoire de Chimie Biologique de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE I, laboratoire associé au C.N.R.S. n° 217 : - Relations structure-fonction des constituants membranaires - (Directeur Professeur J. MONTREUIL).

L'étude a été conduite, sous contrat C.I.F.R.E et en relation avec les laboratoires de la société ROQUETTE Frères - Lestrem (62) - sous la direction de Monsieur P.J. SICARD, Directeur Recherche et Développement.

JE TIENS À ADRESSER MES REMERCIEMENTS LES PLUS SINCÈRES
À TOUS CEUX QUI, DE PRÈS OU DE LOIN, PAR LEURS CONSEILS,
LEUR EXPERIENCE, LEUR COLLABORATION, M'ONT AIDÉE À
RÉALISER CETTE ÉTUDE.

- P L A N -

PAGE

INTRODUCTION

GENERALITES

<u>A - LE MARCHE DES EDULCORANTS</u>	3
I) L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DE L'AMIDON	3
II) LES POLYALCOOLS	3
III) LES COMPOSES NON GLUCIDIQUES HYPOCALORIQUES	5
<u>B - LE LYCASIN[®] 80/55 ET LE MALTITOL</u>	8
I) PRESENTATION	8
II) METABOLISME	12
a) <i>METABOLISME DU GLUCOSE ET DU SORBITOL</i>	
b) <i>METABOLISME DU MALTITOL ET DES MALTOOLIGOSACCHARIDES HYDROGENES</i>	
<u>C) LES DISACCHARIDASES INTESTINALES</u>	17
I) LOCALISATION	17
a) <i>DANS LA MEMBRANE</i>	
b) <i>DANS LA VILLOSITE</i>	
c) <i>LE LONG DE L'INTESTIN</i>	

II) ISOLEMENT ET CARACTERISATION	19
III) ADAPTATION	22
<u>D) LA MICROFLORE INTESTINALE</u>	22
<u>MATERIEL ET METHODES</u>	
<hr/> <hr/>	
<u>A - LE COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE</u>	26
I) PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE	26
a) <i>PRELEVEMENT DE L'INTESTIN</i>	
b) <i>TRAITEMENT DE L'INTESTIN</i>	
II) FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE	28
a) <i>CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS</i>	
b) <i>CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION</i>	
III) DETERMINATION DES PARAMETRES ENZYMATIQUES	28
a) <i>ACTIVITES DISACCHARIDASIQVES</i>	
b) <i>ACTIVITES PROTEASIQUES</i>	
c) <i>ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE</i>	
IV) DOSAGE DU GLUCOSE	31
V) DOSAGE DU SORBITOL	32

VI) CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION	32
VII) CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	32
VIII) DOSAGE DES PROTEINES	34
IX) ELECTROPHORESE	34
X) METHODES IMMUNOLOGIQUES	34
a) <i>OBTENTION DES ANTISERUMS</i>	
b) <i>IMMUNODIFFUSION</i>	
c) <i>IMMUNOELECTROPHORESE UNIDIMENSIONNELLE</i>	
d) <i>IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE</i>	
XI) DETERMINATION DES PROPRIETES ENZYMATIQUES	35
a) <i>EFFET DU PH</i>	
b) <i>EFFET DE LA TEMPERATURE</i>	
c) <i>DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE</i>	
d) <i>DETERMINATION DU POINT ISOLECTRIQUE</i>	
e) <i>DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES</i>	
XII) LOCALISATION DE LA MALTASE/GLUCOAMYLASE	39
LE LONG DE L'INTESTIN GRELE	
a) <i>PAR METHODE ENZYMATIQUE</i>	
b) <i>PAR IMMUNOFLUORESCENCE</i>	
<u>B - ETUDE, <i>IN VITRO</i>, DE LA DEGRADATION DU LYCASIN®</u>	41
<u>80/55 ET DU MALTITOL</u>	
I) ETUDE DE L'ACTION DE LA MALTASE/GLUCOAMYLASE	41
a) <i>CINETIQUE D'HYDROLYSE</i>	
b) <i>CINETIQUE D'HYDROLYSE MALTOSE-MALTITOL EN MELANGE</i>	

II) ETUDE DE L'ACTION DE L' α -AMYLASE PANCREATIQUE	42
a) <i>HYDROLYSE COMPAREE LYCASIN[®] 80/55 ET SIROP DE GLUCOSE 545</i>	
b) <i>ACTION DU MALTITOL ET DU MALTOTRIITOL SUR L'HYDROLYSE DES MALTOOLIGOSACCHARIDES</i>	
III) ROLE DU CAECUM	43
<u>RESULTATS ET DISCUSSION</u>	
<u>A - LE COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE</u>	45
I) PURIFICATION DU SYSTEME ENZYMATIQUE	45
a) <i>DIGESTION A LA PAPAINE</i>	
b) <i>CHROMATOGRAPHIE SUR D.E.A.E TRISACRYL M</i>	
c) <i>CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHAROSE 6B</i>	
d) <i>CONTROLE DE PURETE</i>	
e) <i>EXTENSION DU PROCEDE DE PURIFICATION AU RAT AXENIQUE ET AU CHIEN</i>	
II) CARACTERISATION DU COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE	57
a) <i>POINT ISOELECTRIQUE</i>	
b) <i>MASSE MOLECULAIRE</i>	
c) <i>PROPRIETES ENZYMATIQUES</i>	
III) LOCALISATION DU COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE	69
a) <i>PAR DOSAGE ENZYMATIQUE</i>	
b) <i>PAR IMMUNOFLOURESCENCE</i>	

B - <u>ETUDE, IN VITRO, DE LA DEGRADATION DU LYCASIN* 80/55</u> <u>ET DU MALTITOL</u>	78
I) ACTION DU COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE SUR DIFFERENTS SUBSTRATS	78
a) <i>CINETIQUES DE TEMPS</i>	
b) <i>CINETIQUES EN PRESENCE DE MELANGE DE SUBSTRATS HYDROGENES</i> <i>ET NON HYDROGENES</i>	
II) ACTION DE L' α -AMYLASE PANCREATIQUE	81
III) ACTION DE LA MICROFLORE INTESTINALE	88
<u>CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS</u>	92
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	

GENERALITES

INTRODUCTION

Grâce à leurs propriétés physico-chimiques et leur saveur sucrée, "les sucres hydrogénés" (sorbitol, maltitol) sont étudiés en vue de la substitution du saccharose dans l'alimentation humaine. Le lycasin® 80/55, sirop de glucose hydrogéné, contenant 50 à 55 p.100 de maltitol, est fabriqué par la société ROQUETTE Frères.

Ce produit est utilisé dans les pays scandinaves pour ses propriétés acariogènes et au Japon pour ses propriétés acaloriques. D'autre part, en ce qui concerne le métabolisme de ce composé, on peut dégager deux grandes voies, passant, selon les auteurs :

- soit par la voie classique des glucides
- soit par la microflore intestinale.

Dans le cadre d'une extension de son autorisation, la société ROQUETTE Frères nous a demandé d'explicitier le processus de dégradation du Lycasin® 80/55 et du maltitol qu'il contient.

En utilisant la similitude de structure, existante entre le lycasin® 80/55 et les dérivés de l'amidon, nous avons choisi, comme hypothèse de travail, la dégradation de ce substrat par les enzymes de la muqueuse intestinale .

Le rôle fondamental des glucides en tant qu'aliment énergétique n'est plus à démontrer. Ils représentent 50 p.100 du total des calories ingérées chez l'homme. Ils confèrent en outre aux aliments certaines propriétés rhéologiques et organoleptiques et influent ainsi sur leur acceptabilité, l'exemple le plus représentatif étant celui de la saveur sucrée qui conditionne fortement notre alimentation. (100)

C'est depuis le début du siècle que l'on a vu la consommation de "sucre" (saccharose) augmenter dans les pays industrialisés. En réalité l'étude (151,167) de l'apport énergétique total fourni par le régime alimentaire moyen a montré que lorsque le revenu augmente, la part des calories apportées par les glucides diminue mais la consommation de saccharose augmente.

A titre d'exemple, cette dernière peut atteindre, en Allemagne, 100 g. par habitant et par jour (soit 16 p.100 des calories ingérées) et aux Etats Unis près du double.

Cette consommation importante vient du fait que les glucides, et notamment le saccharose, sont présents dans de nombreux aliments en tant que source naturelle (fruits, légumes, pain) mais aussi et surtout en tant qu'auxiliaire de fabrication et d'additif (sucre de table boissons, jus de fruits, conserves, confiseries...).

Depuis quelques années un certain nombre de maladies ont été associées à la consommation élevée de saccharose ; carie dentaire, obésité, maladies cardiovasculaires et diabète. Certes, le saccharose n'est pas l'unique responsable de ces maux, il faut y associer les autres glucides et surtout un déséquilibre alimentaire lié au sédentarisme

Cependant, on tend actuellement à remplacer le saccharose par d'autres produits à saveur sucrée, apparemment moins dangereux pour la santé de l'homme.

A) LE MARCHE DES EDULCORANTS

I) L'INDUSTRIE DE TRANSFORMATION DE L'AMIDON (77)

L'industrie de l'amidon est actuellement l'une des plus importantes activités agro-industrielles du monde avec un marché estimé à 5 milliards de dollars en 1980 (sans tenir compte des sous produits).

L'amidon est produit industriellement à partir d'un grand nombre de matières premières principalement de céréales et de racines. En 1980, la production annuelle a été estimée à 16 millions de tonnes, l'amidon de maïs représentant 77 p.100 de la production totale.

Toujours en 1980, les Etats-Unis produisaient 6,1 millions de tonnes d'amidon de maïs, soit 39 p.100 du marché mondial ; la C.E.E. avec 35 millions de tonnes représentait 22 p.100 du marché.

Mais en règle générale, les pays industrialisés s'orientent vers la commercialisation de produits transformés à plus grande valeur ajoutée, c'est le cas du glucose, des hydrolysats d'amidon à différents taux d'hydrolyse [5 à 95 équivalent Dextrose (D.E)], du fructose et des sirops à haute teneur en fructose (S.H.T.F.).

II) LES POLYALCOOLS (48,140,155)

La figure 1, page 4 . regroupe les différents polyalcools que l'on peut trouver sur le marché ainsi que leurs sources.

La plupart de ces dérivés sont obtenus par hydrogénation catalytique de mono- ou d'oligosaccharides.

Ils sont particulièrement intéressants du fait de :

- leur grande stabilité chimique*
- leurs propriétés physico-chimiques*
- leurs propriétés rhéologiques : . affinité pour l'eau accrue*
 - . diminution de la tendance à la cristallisation*

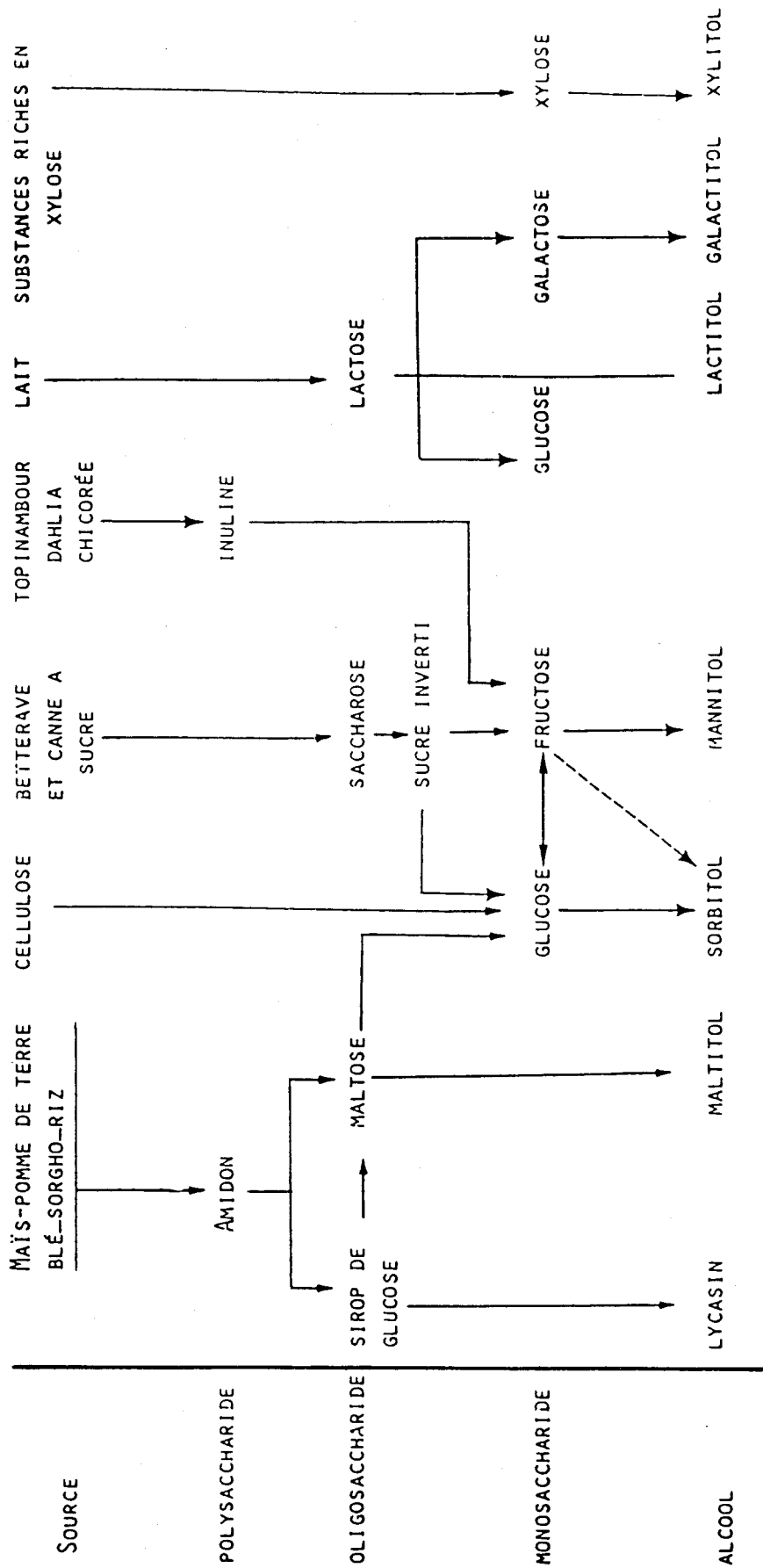


FIGURE 1
 =:~::~=:

LES POLYALCOOLS ET LEURS SOURCES
 =:~::~=:

- leurs activités pharmacodynamiques : le sorbitol, par exemple, est utilisé en thérapeutique comme accélérateur du transit intestinal.

C'est en 1872 qu'un chimiste français (BOUSSINGAULT) (23) met en évidence la présence de sorbitol dans des baies de Sorbier (*Sorbus Aucuparia*).

FISCHER en 1891 prépara du xylitol par réduction catalytique du xylose (51). Dès lors la découverte et la préparation de polyalcools n'a fait que s'intensifier. Il faut cependant noter qu'une période assez longue s'est écoulée entre la découverte de ces polyols et leur fabrication industrielle. Un aperçu de la production industrielle de ce type de produits est donné par le tableau I, page 6.

III) LES COMPOSÉS NON GLUCIDIQUES HYPOCALORIQUES (92,123)

Ces composés peuvent être classés en trois catégories :

- les composés naturels tels que le stéviolside, la thaumatine, la monelline.
- les édulcorants hémisynthétiques tels que l'aspartame.
- les édulcorants synthétiques tels que la saccharine et les cyclamates.

Leur pouvoir sucrant est en général très élevé par rapport au saccharose comme on peut le remarquer dans le tableau II, page 6.

A l'heure actuelle, la saccharine bénéficie pratiquement d'une situation de monopole avec un marché de 3 milliards de dollars en 1983, mais l'aspartame est en train de battre en brèche ce monopole.

Le problème de la plupart de ces édulcorants se situe au niveau de leur toxicité potentielle. Leur usage en alimentation est d'ailleurs strictement réglementé.

En France :

"... Il n'existe pas en pharmacie de liste positive des édulcorants. Leur utilisation, soit en tant que tels comme agents sucrants pour diabétiques, soit dans des formulations comme excipients utilisés à des fins

TABLEAU I

====

PRODUCTION MONDIALE DE CERTAINS POLYALCOOLS EN 1980

====

	PRODUCTION (tonnes)
<i>Sorbitol liquide (70 p.100 de M.S.)</i>	360 000
<i>Sorbitol cristallisé</i>	55 000
<i>Mannitol cristallisé</i>	10 000
<i>Xylitol</i>	2 000
<i>Lycasin® (75 p.100 de M.S.)</i>	3 000

TABLEAU II

====

POUVOIR SUCRANT DE CERTAINS EDULCORANTS HYPOCALORIQUES
EXPRIME PAR RAPPORT AU SACCHAROSE (P.S. = 1)

====

	POUVOIR SUCRANT (P.S.)
<i>Saccharine</i>	300
<i>Cyclamate</i>	50
<i>Acésulfame K</i>	150
<i>Aspartame</i>	200
<i>Stéviolside</i>	150
<i>Thaumatine</i>	≈ 3 000

diverses, doit faire l'objet d'AMM, pour chaque spécialité, après avis de la commission compétente du Ministère de la Santé sur examen des dossiers analytiques, toxicopharmacologiques et alimentaires. Toutefois, l'emploi comme adjuvant de fabrication est possible si la substance est déjà autorisée comme principe actif ou si elle est inscrite à la pharmacopée.

L'utilisation en alimentation a pour base deux lois :

Dans son article 49, la loi du 30 mars 1902 interdit, pour tout usage autre que la thérapeutique, la pharmacie et la préparation de produits non alimentaires, l'emploi de la saccharine ou tout autre substance édulcorante artificielle, possédant un pouvoir sucrant supérieur à celui du sucre de canne ou de betterave, sans en avoir les qualités nutritives.

Sont donc interdites en alimentation toutes substances présentant les trois caractéristiques d'être artificielles, de posséder un pouvoir sucrant supérieur à celui du sucre et de ne pas avoir ses propriétés nutritives.

La loi du 1er août 1905 et les règlements pris pour son application permettent l'utilisation en alimentation des sucres dits alimentaires. Les pentoses en sont exclus. Ces derniers, les polyalcools et les édulcorants d'origine végétale sont considérés comme des additifs. Pour être employés en alimentation et diététique, ils doivent donc être autorisés après avis de la section de l'hygiène alimentaire et de la nutrition du Conseil supérieur d'hygiène publique de France et de l'Académie nationale de médecine. Leur emploi en "alimentation particulière" (alimentation diététique) est astreint aux mêmes procédures d'autorisation..."

B) LE LYCASIN® 80/55 ET LE MALTITOL

I) PRÉSENTATION

Dans le cadre de la diversification des produits dérivés de l'amidon de maïs, la société Roquette Frères a choisi, entre autres voies, celle des produits hydrogénés comme le mannitol, le sorbitol et plus récemment le Lycasin® 80/55.

Le lycasin® 80/55 est un produit obtenu par hydrogénation d'un hydrolysate d'amidon de maïs. A l'origine, 80 représentait le pourcentage de matière sèche, et 55 le pourcentage de maltitol. Actuellement il est commercialisé sous la forme d'un liquide sirupeux, incolore et limpide à 75 p.100 de matière sèche. Sa composition moyenne est résumée dans le tableau III, page 9.

Actuellement, le lycasin® est utilisé en industrie alimentaire dans les pays scandinaves, en Suisse, en Grande Bretagne et aux Etats Unis.

Sa commercialisation est basée principalement sur

- son pouvoir sucrant : 0,55*
- sa non-cariogénicité*
- ses propriétés physico-chimiques*

En effet, les propriétés très intéressantes du Lycasin® 80/55 déterminent son utilisation dans de nombreuses préparations alimentaires et notamment en confiserie.

Sa viscosité qui est de 2000 centipoises à 20°C permet de le manipuler sans difficultés ; il se comporte en fait comme un sirop de glucose à D.E. élevé.

Son pouvoir anticristallisant explique ses nombreuses utilisations en confiserie notamment en présence d'autres produits sorbitol, xylitol, mannitol, qui ont une tendance à la cristallisation.

TABLEAU III

=====
 =====
 =====

COMPOSITION MOYENNE DU LYCASIN® 80/55

=====
 =====
 =====

COMPOSES	p. 100 de M.S.
GLUCITOL = SORBITOL	6
MALTITOL	52
MALTOTRIITOL	18
MALTOTETRAITOL	1,5
MALTOPENTAITOL	2
MALTOHEXAITOL	2,5
DP n = 6 - 10	7
DP n = 10 - 20	10
DP n > 20	< 1

Le lycasin® 80/55 est très hygroscopique, il en résulte donc une stabilité bactériologique accrue. En revanche, lorsqu'on l'utilise pour la confection d'articles de sucre cuit, il est nécessaire de prévoir un emballage hermétique.

Enfin, il est intéressant de noter que le lycasin®, ne contenant pas de sucres réducteurs libres, est peu sensible aux réactions de brunissement.

Les applications technologiques du lycasin® 80/55 sont nombreuses :

- en confiserie : bonbons, sucre-cuit, chewing-gum, pâtes à mâcher, confiseries gélifiées et bonbons dragéifiés.
- en alimentaire : boissons, crèmes glacées, confitures, biscuiteries...
- en pharmacie : sirops pharmaceutiques.

En ce qui concerne l'incidence du lycasin® 80/55 sur la carie dentaire, de nombreuses études ont été effectuées. Il serait long et fastidieux de les énumérer ici, nous nous contenterons donc de résumer les principaux travaux.

In vitro, le maltitol, le lycasin® 80/55 et surtout le sorbitol n'induisent qu'une très faible production d'acides organiques (14, 15, 16, 55, 62, 63, 73, 74, 109). La figure 2, page 11 permet de comparer le comportement du pH de la salive lors d'un test d'incubation avec différents substrats à 37°C. La mesure de l'acidification permet de déterminer si le produit est cariogène ou non, le pH seuil recommandé étant de pH 5,7. La non cariogénicité du lycasin® 80/55 serait due, en outre, à sa faible teneur en polymères supérieurs (157)

Par ailleurs, WURSCH et KOELLREUTER (163) ont constaté que le maltotriitol inhibe la fermentation des sucres cariogènes à faible concentration. Plusieurs explications restent possibles ; il peut s'agir soit d'un phénomène d'interférence dans le transport des sucres à travers la membrane des micro-organismes, soit d'une inhibition au niveau de la glycolyse ou d'autres voies métaboliques.

In vivo, BIRKED et al. (17) ont montré que chez l'animal et chez l'homme, le lycasin® 80/55 est nettement moins fermentescible que le glucose.

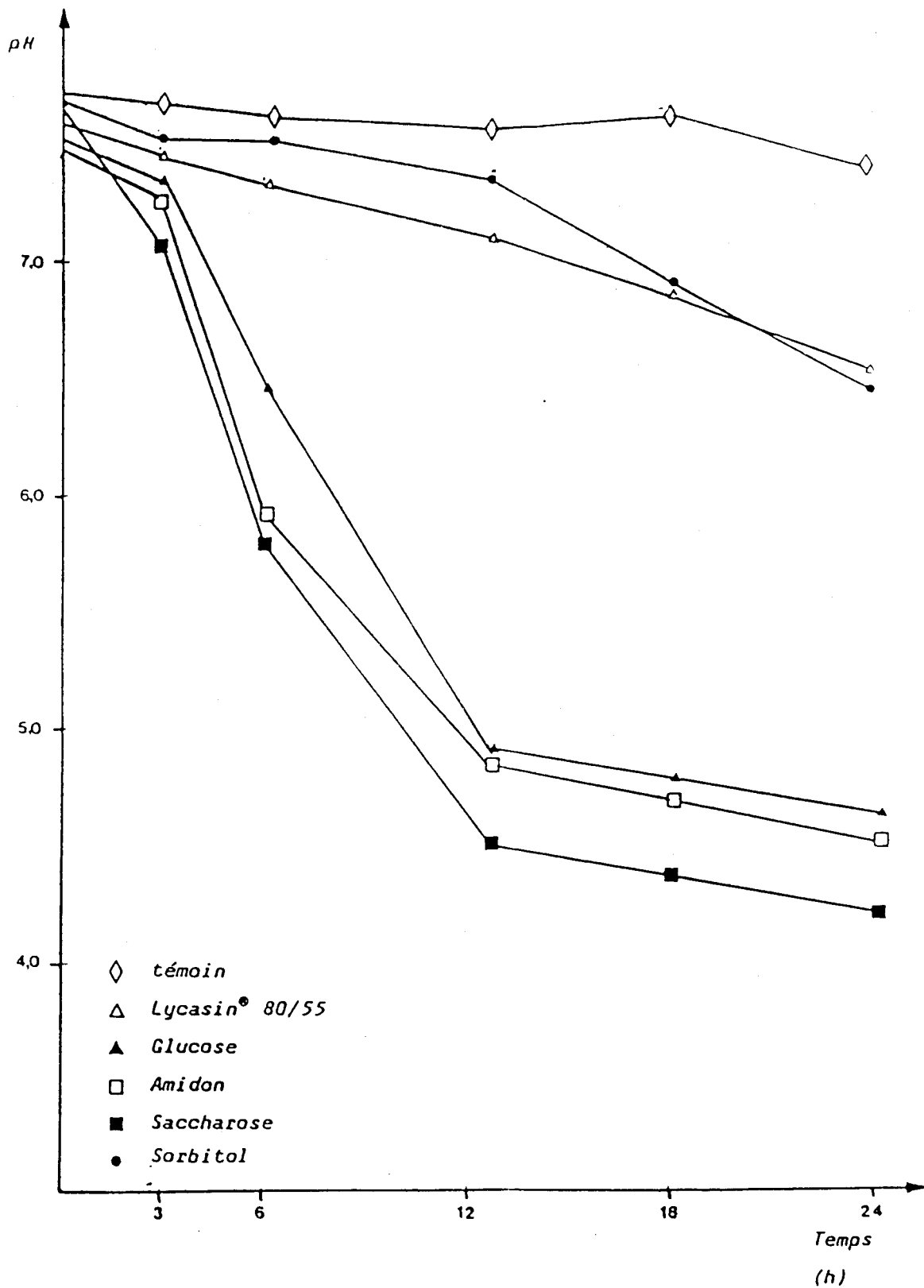


FIGURE 2
 =====

INCUBATION DE DIFFERENTS SUBSTRATS
 AVEC DE LA SALIVE A 37°C

=====

I) MÉTABOLISME

a) METABOLISME DU GLUCOSE ET DU SORBITOL

Le lycasin[®] 80/55 est composé d'enchainements plus ou moins longs de résidus glucose avec un résidu sorbitol en fin de chaîne. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de résumer le métabolisme de ces deux molécules.

1) Absorption intestinale (7,12, 32,161)

Le glucose est un sucre transporté principalement par voie active intestinale. Le sorbitol, lui, diffuse très lentement ; à raison de 10 à 20 g.h⁻¹, soit environ 25 à 35 p.100 de la diffusion passive du glucose (54,56).

2) les voies métaboliques

Le métabolisme du glucose est effectué par les voies classiques d'EMBDEN-MEYERHOFF, cycle des pentoses phosphates et cycle de KREBS.

Le sorbitol intègre les chaînes de dégradation chez les organismes supérieurs par la voie du fructose (figure 3, page 13) (13).

La sorbitol déshydrogénase catalyse la transformation du sorbitol en fructose. Elle est présente, principalement dans le foie, la prostate et le rein. (70)

On voit ainsi que la transformation en D-fructose permet au sorbitol de rejoindre les voies glycolytiques classiques par des mécanismes non insulino-dépendants.

Par ailleurs, il faut noter que certains tissus ont la possibilité de transformer le D-glucose en D-sorbitol grâce à l'aldose réductase. Cela explique la présence de sorbitol dans certains fluides et organes de mammifères.

b) METABOLISME DU MALTITOL ET DES MALTOOLIGOSACCHARIDES HYDROGENES

Les japonais ont été les premiers à étudier de près le métabolisme du maltitol. En 1972, ASADA et al. (3) affirment que le maltitol est

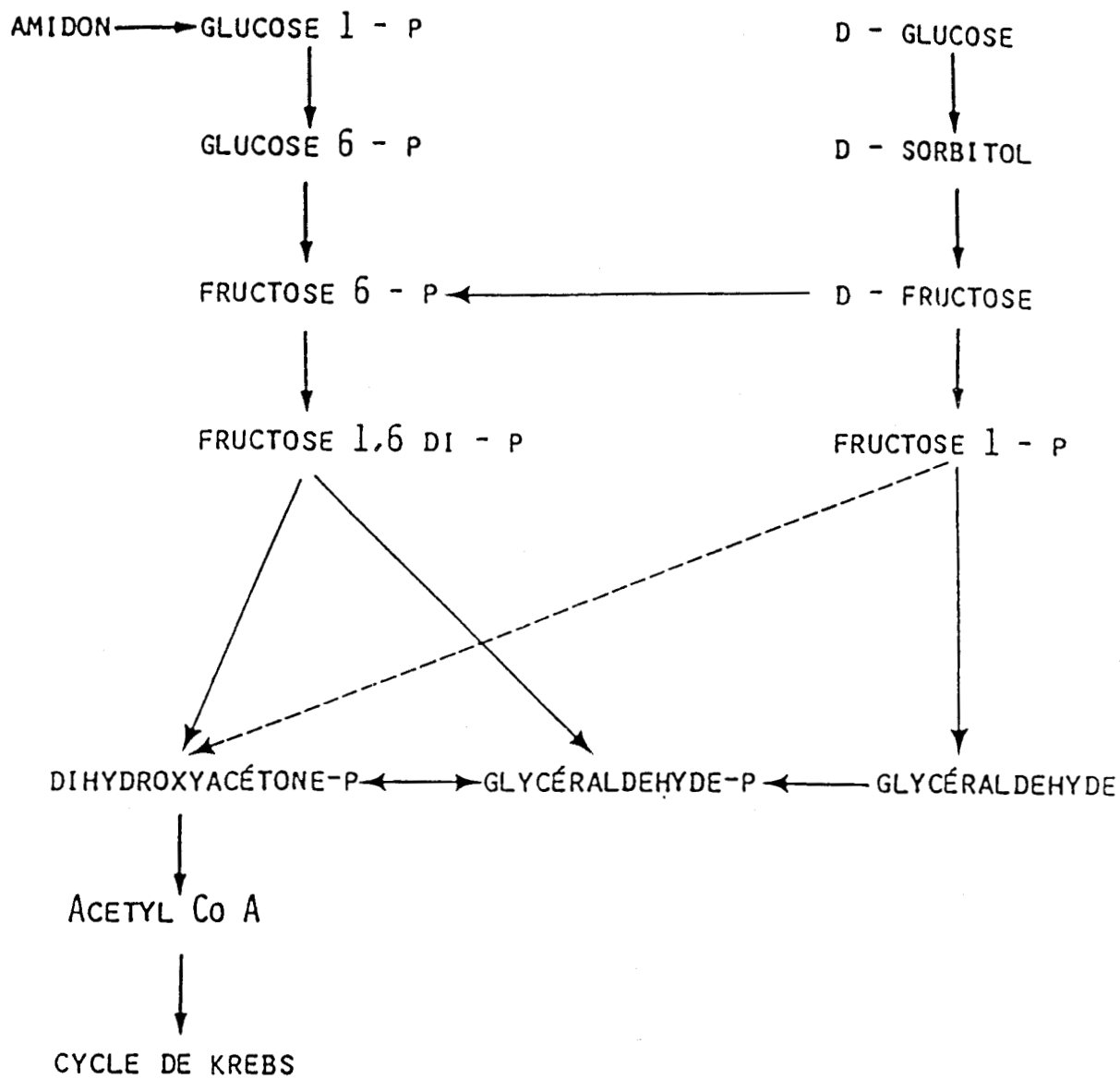


FIGURE 3
 ::=:==:::

METABOLISME DU GLUCOSE ET DU SORBITOL
 ::=:==:::

un produit acalorique intéressant. Contrairement à ces affirmations, AMINOFF (2) démontre que le lycasin® 80/55 contenant plus de 50 p.100 de maltitol est complètement métabolisé.

A la vue de ces premières données contradictoires, il est apparu intéressant d'étudier les travaux concernant le métabolisme du maltitol et des sirops de glucose hydrogénés.

1) Etudes in vivo

Nombreux sont les auteurs japonais (79,80,111,112) qui démontrent la non-utilisation du maltitol après administration orale (< 5p.100).

Par contre, en utilisant du maltitol radioactif, d'autres (95,121) affirment que ce dérivé est utilisé à 90 p.100 ; la voie principale de dégradation étant la microflore.

D'autre part, des études de la glycémie ont montré que l'administration orale de maltitol a le même effet que celle du glucose (59,60,90) et du saccharose (18).

Les essais comparatifs sur des rats nourris de façon conventionnelle ou avec du maltitol ont permis de démontrer la complète dégradation et l'absorption du dérivé hydrogéné (13,53,65,148,166).

LEROY (93), en suivant l'ingestion orale d'une solution de sirop de glucose hydrogéné à 10 et 20 p.100, a montré que dans le tractus digestif, il y a d'abord disparition des maltooligosaccharides puis du maltitol avec corrélativement l'apparition de glucose et de sorbitol. Ces résultats, ainsi que ceux obtenus à partir de nombreuses études effectuées par la société ROQUETTE FRERES, tendent à prouver que le maltitol est utilisé par l'organisme via l'hydrolyse enzymatique intestinale.

Des travaux ont aussi été réalisés sur l'homme (71,72). KAMOI (79,80) montre que le maltitol ne provoque qu'une faible augmentation de la glycémie et que de plus, il inhibe l'absorption du glucose.

Par contre RENNERT et BIANCHINI (121) retrouvent pratiquement les mêmes résultats que ceux obtenus chez le rat et, MIYAKAWA et KAWANURA (108) trouvent de nombreuses similitudes entre l'utilisation du maltitol et celle du glucose.

Enfin, KEARSLEY et al. (81) affirment que le lycasin® 80/55 est utilisé à environ 80 p.100, la dose journalière tolérée par l'homme étant de 100 g.jour.⁻¹

2) Etude in vitro

Deux principaux types d'hydrolyse enzymatique sont impliqués dans la dégradation des maltooligosaccharides hydrogénés ; les α -amylases d'une part, les disaccharidases intestinales d'autre part.

α) Les α -amylases

Tout d'abord, l' α -amylase salivaire a une action très faible vis-à-vis des dérivés hydrogénés comme le lycasin® 80/55 (5 p.100 d'hydrolyse par rapport à celle de l'amidon). Les produits libérés lors de l'hydrolyse de maltooligosaccharides ne renferment que peu de maltose et pratiquement pas de glucose (55). Cette enzyme agit de façon optimale sur les chainons à 6 résidus de glucose.

Des études effectuées par WURSCH et DEL VEDOVO (152) montrent que le maltitol et surtout le maltotriitol sont des inhibiteurs de l' α -amylase salivaire.

En ce qui concerne l' α -amylase pancréatique (10,11,78,125,126), elle hydrolyse facilement la liaison α - (1 \rightarrow 4)- glucosidique des maltooligosaccharides hydrogénés ; bien que la fonction alcool provoque quelques modifications par rapport aux homologues non réduits (115,122,127). La figure 4 P 16, donne en parallèle les modèles proposés par ROBYT et DEXTER (122) et par SAITO et al. (126).

La liaison la plus rapidement hydrolysée est la 3ème à partir d'une fonction alcool et la 2ème à partir d'une fonction réductrice. Le maltopentaitol et le maltopentaose sont les structures sur lesquelles on ne met en évidence qu'un seul point de coupure. Il est à noter que les dérivés maltotétraose et maltotriose peuvent être hydrolysés mais à des vitesses respectivement 10 et 100 fois moins grandes que les autres substrats.

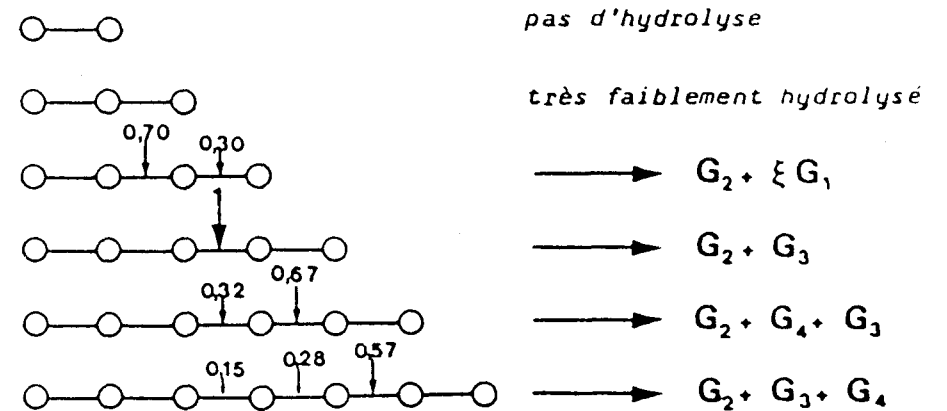
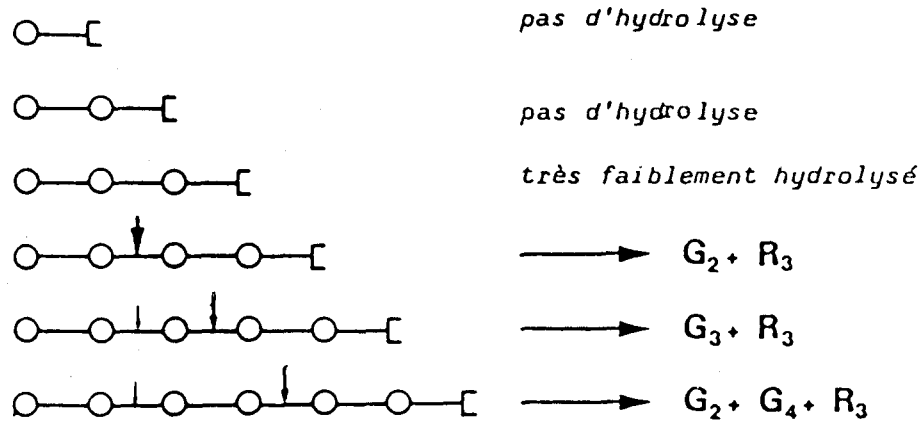


FIGURE 4
=:~::~:~::~:~::~:~::~:

ACTION DE L'α-AMYLASE PANCREATIQUE
=:~::~:~::~:~::~:~::~:

= maltooligosaccharide à n unités de D-glucose
= maltooligosaccharide réduit à (n-1) unités de D-glucose

A noter qu'il existe des phénomènes de condensation (transglycosylation) pouvant intervenir à forte concentration notamment sur le maltotriose (113).

B) les disaccharidases

DAHLQVIST et TELENIUS (40) ont remarqué que l'hydrolyse du maltitol est 30 fois plus faible que celle du maltose, en utilisant des homogénats d'intestin de rats. Mais, ils ajoutent que l'hydrolyse du maltitol peut être complète lors d'une incubation longue. D'autres auteurs (112,76) ont trouvé un rapport d'hydrolyse de 1/20. C'est pourquoi ils concluent qu'en diète mixte, le maltitol est très faiblement hydrolysé (3,112).

YOSCHIZAWA et al. (165), en étudiant les paramètres cinétiques, ont démontré qu'il existait une compétition entre le maltose et le maltitol. Ils proposent donc l'hypothèse d'un seul site de catalyse enzymatique et concluent à une très faible hydrolyse du maltitol (K_m élevé, V_{max} faible).

C) LES DISACCHARIDASES INTESTINALES

Si on retient l'hypothèse d'une hydrolyse du maltitol par des enzymes de la muqueuse intestinale, il est intéressant de faire le point sur ces enzymes appelées disaccharidases. Le tableau IV, page 18, rassemble les différentes enzymes et leurs principaux substrats. Nous nous sommes attachés plus particulièrement aux complexes maltase/glucoamylase et saccharase/isomaltase.

I) LOCALISATION

a) DANS LA MEMBRANE

Ces disaccharidases font partie intégrante de la membrane des microvillosités intestinales et ne sont pas secrétées dans la lumière intestinale (19,21,22,35,83,107,142,145,152,154). Les faibles activités enzymatiques qui y sont retrouvées résultent de la desquamation cellulaire.

Cette localisation a été démontrée par des techniques histochimiques (49,110,132). L'étude de ces enzymes en microscopie électronique (6,50), l'utilisation des protéases ou de détergents (57,91,97,98,99,104) ont permis de préciser

Bien que moins nombreuses, les études sur la maltase / glucoamylase (5,58,87,119,120,128,143) tendent à montrer qu'il s'agit d'un complexe enzymatique du même type que la saccharase/isomaltase (52,147,149). Mais la séparation des deux sites actifs, s'ils existent, n'a pas été jusqu'à présent réalisée (145).

animale.

d'une variation des activités disaccharidasiques en fonction de l'espèce. Au sujet de ce complexe, WACKERT et al. (159) ont montré que l'éléphant de case/isomaltase et de la pro-enzyme correspondante.

La figure 5, page 21, illustre les modèles structuraux de la saccha-

seulement un point d'ancrage dans la membrane villositaire (144,146,147) asymétrique ayant 2 types de sites actifs distincts (25,28,31,150) et En ce qui concerne la saccharase/isomaltase, il s'agit d'un dimère

équipes (4,36,42,64,66,86,87,130,133,141,153,160,164).

Ces deux disaccharidases ont été isolées et purifiées par de nombreuses

II) ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION

Le tableau V, page 20, résume les différents travaux effectués à ce sujet.

sées étant très différentes les unes des autres.

Les études sont difficiles à comparer et à exploiter, les méthodes utilisées différentes disaccharidases semble dépendre de l'espèce animale (34) plus proximale que la saccharase/isomaltase. Mais la distribution des A priori, le complexe maltase/glucoamylase semble avoir une position

c) LOCALISATION LE LONG DE L'INTESTIN

Les disaccharidases sont absentes au niveau des cryptes (41) et sont sensibles aux protéases pancréatiques et notamment l'élastase (1,27).

b) DANS LA VILLOSITÉ

leur mode d'ancrage. Elles sont ancrées par un petit segment peptidique terminal et ont la majeure partie de leur corps orientée du côté non cytoplasmique (lumière intestinale) (82,105,137).

TABLEAU V

==:==:==:==:==:==

LOCALISATION LE LONG DE L' INTESTIN

DES ACTIVITES MALTASE ET SACCHARASE

==:==:==:==:==:==

ANIMAL	ACTIVITE MALTASE	ACTIVITE SACCHARASE	AUTEURS
			KOLINSKA ET KRAML (87)
CHIEN	DUODENUM ET JEJUNUM		MALHOTRA ET GEORGE (102) WELSH et WALKER (160)
			LEVANTI et al. (94)
PORC	DUODENUM	ILEON PROXIMAL	MALHOTRA ET GEORGE (101)
	JEJUNO-ILEON	ILEON PROXIMAL	DAHLQVIST (37)
RAT	DUODENUM ET JEJUNO-ILEON	JEJUNO-ILEON	MALHOTRA et GEORGE (101)
	NO-ILEON		

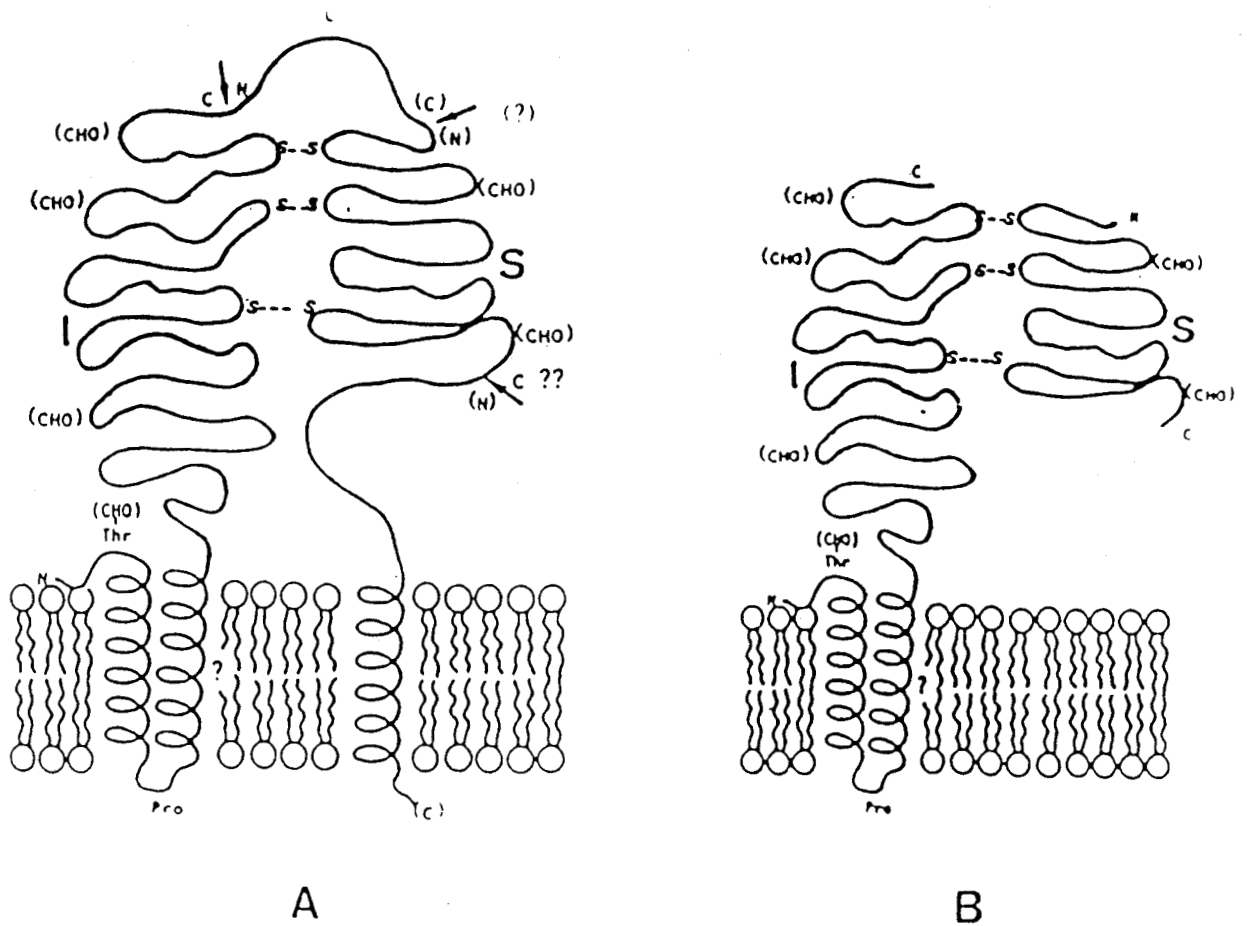


FIGURE 5
=:::==:::==

LE COMPLEXE SACCHARASE/ISOMALTASE

DE LA BORDURE EN BRÛSSE DE L'INTESTIN GRELE
=:::==:::==

A) La pro-saccharase/isomaltase selon SEMENZA et al. (134,135,136,138)

- avec I = portion isomaltase
- S = portion saccharase
- L = fragment sensible à l'attaque protéolytique
- CHO = chaines glycaniques
- N et C = fragments N et C - terminaux

B) La saccharase/isomaltase selon BRUNNER et al. (26)

Les valeurs des masses moléculaires de ces 2 complexes sont résumés dans le tableau, VI page 23.

III) ADAPTATION

Certains auteurs (19,43) ont montré que, chez le rat, une diète riche en glucide augmentait les activités maltase et saccharase par rapport à un régime sans glucide. Cette adaptation n'a pas été mise en évidence chez l'homme.

En fait, pour d'autres auteurs (85,124), c'est la concentration en saccharose qui provoquerait une augmentation de l'activité saccharase et ainsi l'augmentation de l'activité maltase qui lui est associée.

On peut noter aussi que les disaccharidases de rat sont sensibles au rythme circadien (67,75,118). Elles présentent, en effet, un maximum d'activité la nuit.

D) LA MICROFLORE INTESTINALE

La flore microbienne joue un rôle important dans la transformation du bol alimentaire. Chez les non-ruminants, les aliments passent dans l'estomac puis transitent rapidement dans l'intestin grêle. L'effet des bactéries à ce niveau est discret car la flore, même si elle est abondante, est peu active. C'est dans l'iléon et surtout dans le caecum, là où le séjour du bol alimentaire est le plus long, que la population bactérienne atteint son maximum (106,117).

Elle détruit certains déchets (ex : urée) et résidus de la digestion intestinale. Cette dégradation se traduit, entre autre, par la production de gaz, d'acides volatiles, d'acides aminés et produits aromatiques qui sont réabsorbés par la muqueuse intestinale.

On peut constater que la population bactérienne de chaque individu est très stable. En effet, la flore du tube digestif exerce un "effet de barrière" qui s'oppose à la colonisation par les bactéries exogènes quotidiennement ingérées (46)

TABLEAU VI

=====
 =====

MASSE MOLECULAIRE DES COMPLEXES

SACCHARASE/ISOMALTASE ET MALTASE/GLUCOAMYLASE

CHEZ LE PORC

=====
 =====

ENZYME	MASSE MOLECULAIRE PAR GEL FILTRATION	MASSE MOLECULAIRE PAR SDS-ELECTROPHORESE:	
		A*	B*
Saccharase/isomaltase	370 000	265 000 150 000 140 000	265 000
Maltase/glucoamylase	260 000	245 000 135 000 125 000	245 000

(*) A : porc normal

(*) B : porc présentant une ligature du canal pancréatique

D'un autre côté, certaines équipes ont observé l'établissement ou la disparition de certaine souche lors de la prise d'un aliment donné (33, 47, 103, 116).

D'autres ont mis en évidence, l'induction par la diète de certaines enzymes produite par la microflore du gros intestin (29 , 139). Il est intéressant de remarquer ici la possibilité d'une adaptation de la microflore à une diète particulière.

Enfin, FREND et al. (61) pensent, qu'en dehors des différences anatomiques entre le rat et l'homme, le caecum de rat peut être considéré comme un modèle expérimental satisfaisant pour le colon proximal humain. En effet, la population bactérienne de l'estomac et de l'intestin grêle est inférieure chez l'homme comme l'illustre le tableau VII, page 25 . Par contre dans le gros intestin, la population est comparable à celle présente dans le caecum (45,63)

En conclusion, le métabolisme des sirops de glucose hydrogénés et notamment du maltitol est sujet à bien des controverses. De nombreux points restent encore à éclaircir notamment en ce qui concerne les modes de dégradation du maltitol; par hydrolyse enzymatique dans l'intestin grêle ou par fermentation bactérienne dans le gros intestin.

A partir des résultats obtenus aux laboratoires de la société ROQUETTE FRERES, nous avons émis l'hypothèse que l'hydrolyse du maltitol était effectuée par un système enzymatique intestinal analogue au complexe maltase/glucoamylase.

C'est pourquoi, dans un premier temps, nous nous sommes attachés à isoler l'enzyme responsable de l'activité "maltitol hydrolase". Nous avons ensuite essayé de déterminer ses paramètres enzymatiques ainsi que sa localisation le long de l'intestin. Enfin, nous avons tenté de savoir si l' α .amylase pancréatique, d'une part, et la microflore, d'autre part, avaient un rôle éventuel dans l'utilisation des sirops de glucose hydrogénés.

TABLEAU VII

===

POPULATION BACTERIENNE LE LONG DU TUBE DIGESTIF

CHEZ L'HOMME ET LE RAT

(EN MICROORGANISMES PAR GRAMME DE POIDS HUMIDE)

===

	ESTOMAC	INTESTIN GRELE PROXIMAL	INTESTIN GRELE DISTAL	CAECUM OU GROS INTESTIN
HOMME	10^0	$10^{2,6}$	$10^{4,2}$	$10^{8,3}$
RAT	$10^{7,7}$	$10^{6,9}$	$10^{7,7}$	$10^{8,3}$

MATERIEL

ET

METHODES

A - LE COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE

I) PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

a) PRELEVEMENT DE L'INTESTIN

Les animaux, sans diète préalable, sont sacrifiés par inhalation massive de chloroforme.

L'intestin est prélevé du "pylore au caecum" puis lavé avec du sérum physiologique. On procède alors à un grattage de l'intestin, préalablement découpé longitudinalement ("scraping"). La bordure en brosse, ainsi obtenue, est congelée dans du sérum physiologique contenant de l'azide de sodium (2 p.10 000).

b) TRAITEMENT DE L'INTESTIN

Les différentes étapes du traitement sont résumées dans la figure 6 page 27.

1) homogénéisation

Le scraping est homogénéisé dans du sérum physiologique au Polytron pendant une minute, à 5 000 tours par minute, dans une enceinte réfrigérée à 4°C.

2) centrifugations

Elles sont effectuées dans une centrifugeuse BECKMAN J21 B (rotor JA 20) pendant 20 minutes, à 12 000 tours par minute, à 4 °C.

3) digestion à la papaïne

Le culot de centrifugation d'environ 3g de poids frais, est repris dans 20 ml de tampon phosphate 10 mM pH 6,0, 6,25 mg de papaïne sont alors ajoutés ainsi que 62 mg de chlorhydrate de cystéine. L'hydrolyse enzymatique est effectuée à 37°C, pendant 90 minutes. Les enzymes de la bordure en brosse, ainsi libérées, sont recueillies après centrifugation. Les activités sont stables à 37°C et la papaïne n'hydrolyse pas les enzymes solubilisées au moins chez le rat (97).

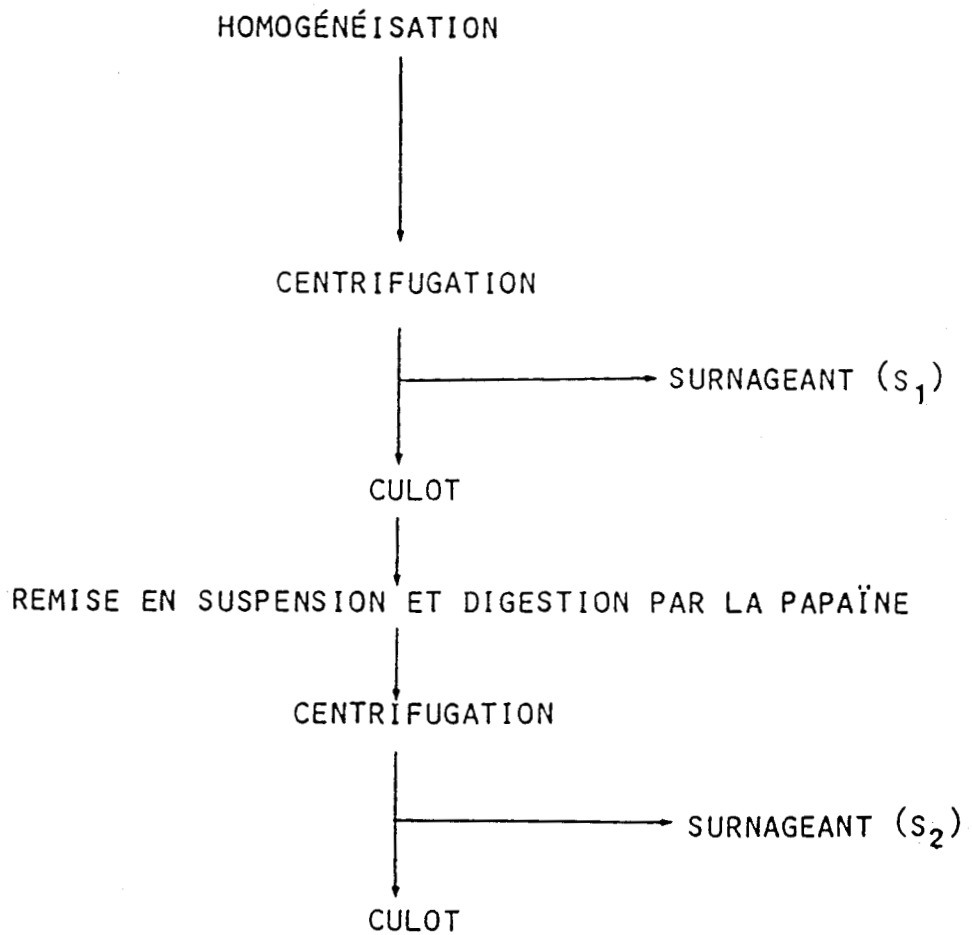


FIGURE 6 : TRAITEMENT DE LA MUQUEUSE INTESTINALE

=====
=====

II) FRACTIONNEMENT PAR CHROMATOGRAPHIE

a) CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS SUR D.E.A.E. TRISACRYL M.

(IBF FRANCE)

Le surnageant S_2 , correspondant à la digestion par la papaïne de 5 muqueuses intestinales, concentré sur cellule Amicon (membrane PM10), est chromatographié sur une colonne (3 X 40 cm) contenant le gel équilibré dans un tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,5.

Après un lavage avec 2 fois le volume de la colonne en tampon d'équilibrage, l'éluion est réalisée par un gradient discontinu en NaCl (0,025 ; 0,2 et 1 molaire). Le débit est de 24 ml.h⁻¹.

Des fractions de 6 ml sont recueillies. Après détection à 280 nm, les différents pics de protéines sont concentrés sur cellule Amicon, (membrane PM 10). Un dosage des activités maltase, 'maltitol-hydrolase' et saccharase est alors effectué.

b) CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION SUR SEPHAROSE 6B

(PHARMACIA FRANCE)

La fraction élue à 0,2 M en NaCl, renfermant 1,2 à 1,5 mg de protéine, est chromatographiée sur une colonne (1,6 x 74 cm) de Sépharose 6B, équilibré en tampon phosphate 100 mM pH 6,8. Le débit d'éluion est de 6 ml.h⁻¹. Des fractions de 1,5 ml sont recueillies.

La détection des protéines est effectuée à 280 nm.

III) DETERMINATION DES ACTIVITES ENZYMATIQUES

a) ACTIVITES DISACCHARIDASIQUES

1) réactifs

- tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,0.
- solutions à 60 mM de maltose (4-O- α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranose) (SIGMA) ; de maltitol (4-O- α -D-glucopyranosyl- α -D-glucitol) (BDH. Chem. Ltd); de saccharose (β -D)fructofuranosyl-

D-glucopyranoside (BDH. Chem. Ltd) dans le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,0.

2) mode opératoire

1 ml de substrat est mélangé à 250 µl de solution enzymatique (0 à 0,5 U.ml⁻¹). La solution est maintenue pendant 90 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par chauffage au bain marie bouillant pendant 3 minutes. Le dosage du glucose et/ou du sorbitol est effectué par méthode enzymatique.

Une unité enzymatique est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à l'hydrolyse d'une micromole de substrat par minute dans les conditions standard.

L'activité exprimée en unité par ml de solution enzymatique est donnée par la relation suivante :

$$\text{Activité (U.ml}^{-1}\text{)} = \frac{Q}{PM \times t \times n}$$

Q = Quantité de glucose libéré par 1 ml de solution enzymatique (exprimée en µg)

PM = Poids moléculaire du disaccharide

t = Temps d'hydrolyse

n = nombre de résidus glucose dans la molécule (maltose n = 2).
maltitol n = 1, saccharose n = 1).

b) ACTIVITES PROTEASIQUES

Ces méthodes ont été uniquement utilisées de façon qualitative afin de mettre en évidence la présence possible de protéase.

1) Méthode de CHIBA et al. (30)

- Réactifs

L'azocoll substrat à base de collagène (CALBIOCHEM)

- protocole

10 mg d'azocoll sont mis en présence d'1 ml de solution enzymatique à tester. L'incubation est effectuée, à 37°C, pendant une durée variable, allant de 1 heure à 24 heures selon la concentration en protéase du milieu. Une centrifugation élimine le substrat n'ayant pas été dégradé. La mesure de la densité optique à 520 nm du surnageant permet de quantifier les protéases présentes.

2) Méthode à la caséine jaune

- Réactifs

- . Solution à 5 mg/ml de caséine jaune (CALBIOCHEM) (protéine de lait) dans un tampon tris HCl, 0,1 M, pH 8,5, 10 mM en chlorure de calcium.
- . Soude normale
- . Solution d'acide trichloracétique à 10 p.100

- Protocole

. 400 µl de solution de caséine sont mélangés à 100 µl de solution enzymatique. Le mélange est maintenu 15 minutes à 37°C, le temps et la température pouvant varier selon la nature et la quantité des protéases présentes.

. On ajoute ensuite 500 µl d'acide trichloracétique de façon à précipiter les protéines non dégradées. Elles sont éliminées par centrifugation.

. 500 µl de soude sont alors ajoutés à 500 µl de surnageant de manière à révéler la coloration des molécules libérées lors de l'hydrolyse protéasique.

. On mesure ensuite l'absorbance à 423 nm du surnageant alcalinisé.

c) ACTIVITE RIBONUCLEASIQUE

L'activité ribonucléasique a été choisie comme traceur de contamination pancréatique :

- Réactifs

- . Solution d'A.R.N. de Torula à 1 p.100 dans un tampon acétate 0,1 M pH 5,0 (SIGMA).
- . Solution d'acide perchlorique à 7 p.100

- Protocole

. 400 μ l de solution d'A.R.N. sont mélangés à 100 μ l de solution enzymatique.

. Après une incubation de 10 minutes à 37°C, on ajoute 500 μ l d'acide perchlorique.

. Une centrifugation permet d'éliminer l'A.R.N. n'ayant pas été dégradé.

. 100 μ l du surnageant sont mélangés à 2,9 ml d'eau. On mesure alors l'absorbance à 260 nm contre de l'eau.

L'unité d'activité ribonucléasique, appelée le Kunitz, équivaut à la variation d'une unité de $A_{260 \text{ nm}}$ dans les conditions opératoires décrites ci-dessus.

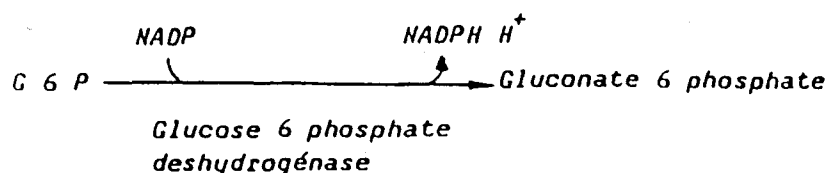
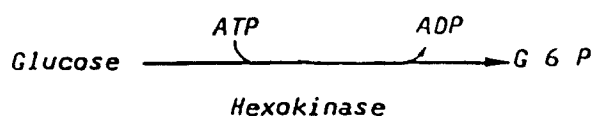
L'activité en $U.ml^{-1}$ est calculée à partir de la formule suivante :

$$\text{Activité} = \frac{\Delta A \times \text{facteur de dilution}}{\text{temps} \times \text{prise d'essai}} = \Delta A_{260 \text{ nm}} \times 30$$

IV) DOSAGE DU GLUCOSE (8)

La méthode utilisée est celle décrite par BOEHRINGER, son principe est le suivant :

Le glucose est phosphorylé en glucose 6P (G6P) par l'hexokinase en présence d'adénosine 5' triphosphate (A.T.P.). Le glucose 6 phosphate est alors oxydé en 6 phospho-gluconate.

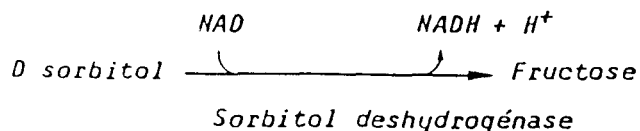


Le NADPH formé est mesuré à 340 nm.

V) DOSAGE DU SORBITOL (9)

La méthode décrite est celle préconisée par BOEHRINGER.

Le D-sorbitol est oxydé en fructose par la réaction enzymatique catalysée par la sorbitol deshydrogénase (SDH) en présence de nicotinamide (NAD).



Le NADH formé est mesuré à 340 nm.

VI) CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PRESSION

La répartition glucidique, après hydrolyse enzymatique, a été déterminée par chromatographie liquide haute pression, selon la méthode mise au point par les laboratoires de la société ROQUETTE FRERES. La séparation est effectuée au moyen de deux colonnes en série de 0,9 x 32 cm. La détection est réalisée par réfractométrie. Nous avons utilisé, entre autre, le support chromatographique Q15 S-Ca⁺⁺ qui permet de séparer les composés à bas poids moléculaire. La figure 7, page 33 illustre le chromatogramme du lycasin® 80/55 obtenu sur cette colonne.

VII) CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

1) Réactifs

- solution d'orcinol sulfurique : 200 mg d'orcinol (3,5-Dihydroxy-toluène) solubilisé dans 100 ml d'acide sulfurique à 20 p.100
- gel de silice 60 (MERCK)

2) Protocole

Les dépôts sont de 5 µl. La migration est effectuée dans une seule dimension en 2 développements successifs dans le système solvant nbutanol/ acide acétique/eau (2/1/1 V/V).

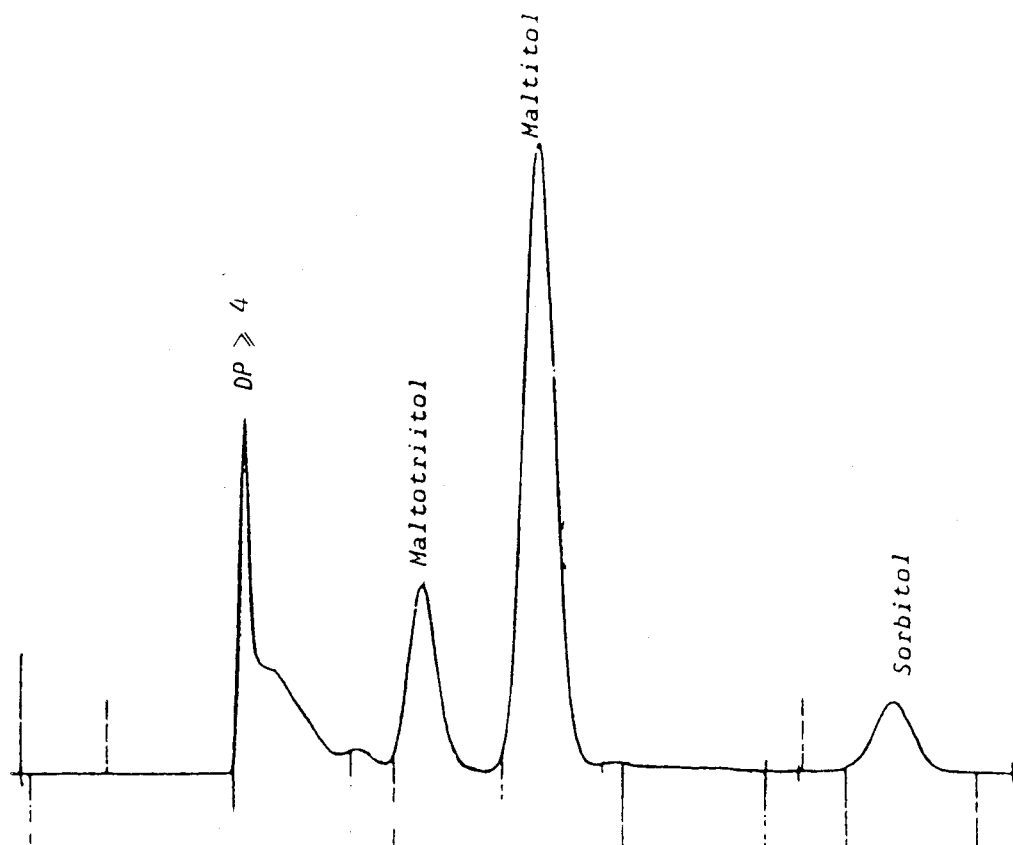


FIGURE 7

====

CHROMATOGRAMME DU LYCASIN® 80/55

====

<u>Conditions:</u> Colonne	: Q 15 S - Ca ⁺⁺ (BIO-RAD)
Température de la colonne	: 85°C
Eluant	: Eau distillée
Débit	: 1,5 ml. min ⁻¹

VIII) DOSAGE DES PROTEINES

Le taux de protéines est déterminé par la méthode au bleu de coomassie (BIO-RAD), la sérum-albumine étant utilisée comme standard interne (24).

IX) ELECTROPHORESE

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide-S.D.S ont été réalisées selon la méthode de KERCKAERT (84), avec un gradient de polyacrylamide de 5 - 15 p.100. La migration est effectuée à 40 mA (220V), le bleu de bromophénol servant de témoin interne de migration.

X) METHODES IMMUNOLOGIQUES

a) OBTENTION DES ANTISERUMS.

Les immunosérums ont été préparés selon la technique de multiponction intradermique sur lapin de VAITUKAITIS et al. (156). La solution injectée renferme 0,9 à 2,5 mg de protéines dans 1,5 ml de sérum physiologique et 3 ml d'adjuvant complet de Freud. Deux types d'antisérums ont été réalisés, "un anti-S₂" obtenu à partir d'un surnageant après traitement à la papaïne et un "anti-Sépharose" obtenu à partir d'une sortie de chromatographie sur Sépharose 6B. Dans le premier cas, il s'agit d'un antisérum total, dans l'autre d'un antisérum "spécifique".

Le premier prélèvement a lieu un mois après l'injection et un rappel par voie sous-scapulaire est effectué le lendemain. Par la suite, les prélèvements sont réalisés tous les 15 jours jusqu'à l'abattage de l'animal.

Le sang, après prélèvement, est laissé au repos une nuit à 4°C jusqu'à rétraction du caillot plasmatique. Il est alors centrifugé à 1500 g pendant 10 min., à 4°C. Les sérums, ainsi obtenus, sont rassemblés et les anticorps sont précipités au sulfate d'ammonium à 40 p.100 de saturation à pH 7,0: Le précipité est ensuite solubilisé dans du tampon phosphate de sodium 5 mM pH 7,4 renfermant 9 p.1000 de NaCl (P.B.S), puis dialysé 2 jours, à 4°C, contre ce même tampon.

b) IMMUNODIFFUSION

La méthode d'immunodiffusion double d'Ouchterlony (114) permet de déterminer les relations antigéniques pouvant exister entre différents constituants. La diffusion dure 48 heures en chambre humide.

c) IMMUNOELECTROPHORESE UNIDIMENSIONNELLE SUR GELOSE

Ces immunoélectrophorèses sont effectuées selon la méthode de GRABAR et WILLIAMS (68), modifiée par SCHEIDEGGER (129). L'électrophorèse sur gélose est réalisée dans un tampon véronal pH 8,6 sous une tension de 15 Volts.cm⁻¹ pendant 30 minutes. Elle est suivie d'une diffusion de 48 H. La révélation des protéines est réalisée par le réactif à l'amidoschwartz.

d) IMMUNOELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE

Elles sont effectuées selon la méthode de BØG-HANSEN et al. (20). Le gel d'agarose (SIGMA) est à 1 p.100 dans le tampon d'électrophorèse : Tris/HCl 72 mM, véronal sodé 24 mM, lactate de calcium 40 mM, pH 8,6.

La première électrophorèse s'effectue à 10 Volts. cm⁻¹ pendant 2 heures. L'agarose, utilisé pour la deuxième dimension, contient l'anti-sérum (soit 100 µl "d'anti S₂" soit 50 µl d'"anti-Sepharose" dans 15 ml d'agarose à 1 p.100). La deuxième migration est réalisée à 2 volts.cm⁻¹ pendant 18 heures.

XI) DETERMINATION DES PROPRIETES ENZYMATIQUES

a) EFFET DU pH

La variation de l'activité enzymatique en fonction du pH a été mesurée sur des solutions de maltose et de maltitol.

Les systèmes tampons utilisés sont les suivants :

- acide citrique/citrate trisodique 10 mM: pH 3 à 6,5
- Phosphate de sodium 10 mM: pH 6 à 8
- Veronal/soude 10 mM: pH 7 à 9
(diéthyl -malonylurée)

On mélange 750 µl de tampon à 250 µl de solution enzymatique

Après avoir déterminé le pH, on ajoute 250 µl de la solution aqueuse de substrat, de façon à obtenir une concentration finale de 48 mM. Le dosage de l'activité est réalisé selon le protocole décrit page 28.

Afin de détecter d'éventuelles variations de pH, on effectue une autre mesure après l'incubation.

b) EFFET DE LA TEMPERATURE

La température optimale n'a pas été déterminée, on se place à la température physiologique du rat. Par contre, on a procédé à une étude de la stabilité enzymatique à 55°C. La solution enzymatique à étudier est incubée dans un bain-marie à 55°C. Après différents temps, allant de 0 à 120 minutes, on stoppe l'effet de la température en plongeant les tubes dans un bain de glace pilée. L'activité résiduelle vis-à-vis du maltose, maltitol et saccharose est quantifiée selon le protocole décrit pages 28,29.

c) DETERMINATION DE LA MASSE MOLECULAIRE

La masse moléculaire a été estimée par chromatographie de tamisage moléculaire sur une colonne de Sepharose -6B (1,6 x 74 cm) équilibrée et éluée par du tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,8. La colonne a été préalablement équilibrée au moyen du kit de calibration PHARMACIA.

d) DETERMINATION DU POINT ISOELECTRIQUE

La détermination du point isoélectrique a été effectuée en veine liquide dans une colonne (LKB 8101-110ml) selon la méthode de VESTERGERG et SVENSSON (158).

Le gradient de glycerol est monté à la vitesse de $1,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. La zone de pH utilisée étant de pH 3,5 - 10.

La solution à étudier est soumise, à 4°C, à une puissance constante de 11 Watts pendant 24 heures.

L'éluotion de la colonne est effectuée à $85 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$

Sur chacune des fractions de 2ml, le pH, l'absorbance à 280 et 254 nm et l'activité enzymatique ont été déterminés.

e) DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES

Les conditions expérimentales sont résumées dans le tableau ci-après.

SUBSTRAT (1)	TEMPS D'INCUBATION (en minutes)	GAMME DE CONCENTRATION (mM)
<i>p</i> -N-nitrophényl- α -D-glucopyranoside	10 - 20	1 à 20
Maltose	2 - 4 - 6	5 à 100
Maltitol	15 - 30	0,10 à 15
Maltotriose	4 - 6	0,10 à 15
Maltotriitol	5 - 10 - 30	0,10 à 10
Maltopentaitol	4 - 6	0,10 à 15
Maltoheptaitol	4 - 6	0,10 à 15

(1) Les substrats sont mis en solution dans le tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,0.

Le volume réactionnel final est de 1,25 ml, la quantité d'enzyme introduite est toujours équivalente à 0,07 U de maltase.

La constante de MICHAELIS (K_m) et la vitesse maximale de réaction (V_{max}) sont déterminées selon la méthode de représentation graphique de LINEWEAVER et BURK (96).

L'action d'inhibiteurs

La constante d'inhibition (K_i) est déterminée selon la méthode de représentation graphique de DIXON (44)

Les inhibiteurs utilisés sont le maltose, le maltitol, l'isomaltitol (SERVA) et la δ -gluconolactone (KOCH LIGHT Laboratories Ltd). Ils sont préincubés 10 minutes avec l'enzyme avant d'effectuer l'hydrolyse enzymatique des substrats étudiés : maltose et maltitol.

Lorsqu'un même site d'une même enzyme est capable d'agir sur deux substrats différents, ces deux composés peuvent se comporter comme des inhibiteurs réciproques. A ce moment là, il est possible de savoir quelle sera la vitesse maximale de réaction en présence des deux substrats. Il suffit d'appliquer la formule suivante :

$$\frac{K_{mA}}{\alpha \cdot K_{mB}} = \frac{V_{\max A} - V_{\text{mix}}}{V_{\text{mix}} - V_{\max B}}$$

Dans notre cas particulier :

K_{mA} représente la constante de Michaelis vis-à-vis du maltose, K_{mB} celle vis-à-vis du maltitol, $V_{\max A}$ et $V_{\max B}$ représentent les vitesses maximales de réaction respectivement sur le maltose et sur le maltitol ; V_{mix} correspondant à la vitesse maximale en présence des deux substrats, et α au rapport des concentrations maltose sur maltitol. On l'a choisi égal à 1/10 et 1/30.

XII) LOCALISATION DE LA MALTASE/GLUCOAMYLASE LE LONG DE

L'INTESTIN GRELE

Les essais ont été réalisés à 4°C sur des rats normaux nourris ad libidum. Après décapitation, l'intestin est prélevé, puis lavé par du tampon phosphate de sodium 4 mM renfermant 9 p.1000 de NaCl à pH 7,4 (P.B.S.). Il est ensuite découpé en 24 morceaux de 2 à 3 cm de longueur.

a) PAR METHODE ENZYMATIQUE

Sur chaque segment, ouvert longitudinalement, la muqueuse intestinale est prélevée par "scraping". Afin de pouvoir étudier l'activité enzymatique, on traite trois rats parallèlement. Les "scraping" correspondants au même segment sont réunis et conservés à 4°C dans 3 ml de tampon P.B.S..

Chaque fraction est alors homogénéisée au Polytron (30 sec.). Le broyat, après détermination des activités disaccharidasiques, est traité selon le protocole décrit page 26 . On procède ensuite au dosage des protéines et de l'activité maltasique sur le S_1 et le S_2 de chacune des 24 fractions.

b) PAR IMMUNOFLUORESCENCE

Un segment de 1 cm environ est prélevé sur chaque morceau. Chaque fragment est traité par le P-formaldéhyde à 5 p.100. Des coupes de 7 μ m d'épaisseur sont obtenues par la technique de "coupe-congélation" au moyen d'un microtome CRYO-CUT.

Les coupes obtenues sont traitées, à température ambiante, de la façon suivante :

- 1 - incubation de 30 minutes avec 100 μ l d'une solution d'anticorps
 - . soit un "anti - S_2 " à 4 mg/ml de protéines, dilué au 200ème
 - . soit un "anti-Sépharose" à 2,85 mg/ml de protéines, dilué au 200-400 et 800 ième
 - . soit un sérum normal de lapin non immunisé à 1,45 mg/ml de protéines dilué au 200ème.

- 2 - 3 lavages successifs de 10 minutes en tampon P.H. Sphosphate de sodium 4 mM, NaCl à 9 p.1000, pH 7,4)
 - 3 - incubation de 30 minutes avec 25 µl d'une solution d'anti-anti-corps de lapin marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (F.I.T.C) Les anticorps sont dilués au 1/100 dans une solution de bleu de tripan au 1/50 000.
 - 4 - 3 lavages successifs de 10 minutes en tampon P.B.S.
- Les coupes sont lues au microscope Leitz Orthoplan.
Les photos sont effectuées sur film Kodak Tri-X pan.

B - ETUDE, IN VITRO, DE LA DEGRADATION
DU LYCASIN 80/55 ET DU MALTITOL

I) ETUDE DE L'ACTION DE LA MALTASE/GLUCOAMYLASE

a) CINETIQUE D'HYDROLYSE

1) Réactifs

- . tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,0
- . substrats à 2,1 p.100 P/V, équivalent à une concentration de 60 mM. [Maltose-Maltitol-Lycasin®80/55 - sirop de glucose 545 et mélange lycasin®80/55 (90 p.100) sirop de glucose 545 (10 p.100)]

2) mode opératoire

500 µl de solution de substrat à hydrolyser sont mélangés à 125 µl de solution enzymatique contenant 0,7 unité maltase. L'incubation est effectuée à 37°C pendant des temps variables (3H30, 8, 24 et 48 heures).

La réaction est stoppée par chauffage au bain marie bouillant pendant 3 minutes.

L'hydrolyse est suivie par H.P.L.C. Le glucose et le sorbitol sont dosés par méthode enzymatique.

b) CINETIQUE D'HYDROLYSE MALTOSE-MALTITOL EN MELANGE

1) Réactifs

- . substrats 60 mM final contenant du maltose et du maltitol en mélange dans des rapports molaires maltose/maltitol de 0,06 - 0,1 et 0,15.

2) Protocole

0,07 unité maltase est ajoutée à 500 µl de substrat. L'incubation, effectuée à 37°C, est stoppée par chauffage au bain marie bouillant pendant 3 minutes, après différents temps d'incubation. Le dosage du glucose et du sorbitol permet de déterminer les quantités de maltose et de maltitol hydrolysées.

II) ETUDE DE L'ACTION DE L' α -AMYLASE PANCRÉATIQUE

a) HYDROLYSE COMPAREE LYCASIN* 80/55 ET SIROP DE GLUCOSE 545

1) Réactifs

- α -amylase pancréatique de porc traitée au DIFP ou au PMSF (SIGMA) en solution dans du tampon phosphate de sodium pH 6,0 (4,5 unités .ml⁻¹)
- extrait pancréatique humain fourni aimablement par le service de gastroentérologie du C.H.U. de Lille
- substrats à 2,1 p.100 de matière sèche en solution dans un tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,0 renfermant 0,1 p.100 de NaCl.

2) Protocole

1 ml de substrat est mélangé à 125 μ l de solution enzymatique. L'incubation, effectuée à 37°C, est stoppée au bout de 24 ou 48 heures par chauffage au bain marie bouillant pendant 3 minutes. Après centrifugation à 3 500 tours . min⁻¹ pendant 30 minutes, la quantité de glucose et/ou de sorbitol est déterminée par méthode enzymatique. La répartition des oligosaccharides est suivie par chromatographie sur couche mince.

b) ACTION DU MALTITOL ET DU MALTOTRIITOL SUR L'HYDROLYSE DE MALTO-OLIGOSACCHARIDES

1) Réactifs

- tampon phosphate de sodium 10 mM pH 6,0 contenant 0,1 p.100 de NaCl.
- maltooligosaccharides (SIGMA) à 2 p.100 (P/V) dans le tampon phosphate de sodium
- maltotriitol (Serva) et maltitol (ALDRICH) à 1 p.100 (P/V)
- solution enzymatique
 - A - extrait pancréatique humain
 - B - α -amylase pancréatique de porc - DIFP (SIGMA) à 4,5 Unités .ml⁻¹ dans du tampon phosphate de sodium.

2) Protocole

500 µl de maltooligosaccharides sont mélangés à 150 µl de solution enzymatique (A ou B) en présence de 500, 250 ou 100 µl de maltotriitol soit de maltitol.

Un témoin (ou blanc) est réalisé en remplaçant le substrat hydrogéné par la solution tampon.

Les échantillons sont ensuite chromatographiés en H.P.L.C ou déposés sur couche mince. Le glucose est dosé par méthode enzymatique.

III) ROLE DU CAECUM

1) Réactifs

- Composition des milieux de culture utilisés

Extrait de viande	5	g
Extrait de levure	5	g
Cystéine	1	g
Acide thioglycolique	0,03	g
Source de carbone	10	g

Tampon phosphate de sodium 100 mM pH 7,4 qsp 1 litre

La source de carbone est :

- A - le glucose
- B - le maltose
- C - le maltitol
- D - le sorbitol

- suspension caecale : 4 caecums de rats nourris de façon normale sont mis en solution dans 150 ml de sérum physiologique cystéiné

2) Protocole

Les milieux de culture ont été ensemencés avec 4 ml de la suspension caecale. La fermentation s'est effectuée à 37°C en anaérobiose.

Les prélèvements de 2 ml ont été réalisés aux temps T0 avant ensemencement, T1 juste après et T2, T3, T4 respectivement après 3 jours, 1 et 2 semaines de culture.

3) Dosages

- Les sucres

Le glucose et le sorbitol libres ont été dosés par méthode enzymatique. La quantité de disaccharides non hydrolysés a été déterminée après hydrolyse acide par l'acide chlorhydrique 2N - 1 heure .

- L'A.T.P

Le dosage de l'A.T.P, par utilisation du système luciferine-luciférase, a été effectué selon le protocole mis au point au laboratoire de microbiologie de la société ROQUETTE FRERES. L'ATP est libéré grâce au DMSO (MERCK), l'échantillon est ensuite stabilisé dans du tampon MOPS 0,1 M. La quantité d'A.T.P est déterminée par fluorescence sur BIOCOUNTER - LUMAC M 2010 après ajout du réactif enzymatique lumit (LUMAC).

RESULTATS

ET

DISCUSSION

I) PURIFICATION DU SYSTEME ENZYMATIQUE

Nous avons utilisé l'activité saccharase du complexe saccharase/isomaltase comme témoin interne de purification. En effet ce système enzymatique possède à la fois une activité saccharase et une activité maltase.

Tout d'abord, le lavage interne de la muqueuse intestinale permet d'éliminer du tube digestif à la fois, les produits de dégradation des aliments et une grande partie de la microflore intestinale.

L'homogénéisation au Polytron a pour but de faciliter l'attaque enzymatique à la papaïne.

a) DIGESTION A LA PAPAINE

Les tableaux VIII et IX, respectivement pages 46 et 47 permettent de suivre les différentes étapes de purification.

Après attaque de la muqueuse intestinale par la papaïne, les disaccharidases solubilisées se retrouvent dans le surnageant S_2 (figure 6 page 27). 75 p.100 des activités présentes dans l'homogénat sont ainsi récupérés. On peut noter, dès à présent, que les facteurs de purification et les pourcentages de récupération des activités maltase et "maltitol-hydrolase" sont très voisins.

b) CHROMATOGRAPHIE SUR D.E.A.E Trisacryl M

Les profils d'éluion des protéines et des activités maltase et saccharase sont illustrés par la figure 8 page 48. Par ce procédé, on obtient différentes fractions enzymatiques et notamment les pic I et V.

Tout d'abord, le pic I renferme 10 à 15 p.100 de l'activité maltase initiale et 50 à 75 p.100 de l'activité saccharase ; il s'agit du complexe saccharase/isomaltase. On y retrouve aussi une activité protéasique due à la présence de papaïne.

TABLEAU VIII

PURIFICATION DU COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE

ETAPE DE PURIFICATION	ACTIVITE TOTALE (U)		PROTEINES TOTALES (mg)	ACTIVITE SPECIFIQUE (U.mg ⁻¹ · 10 ⁻³)		p. 100 de récupération		FACTEUR DE PURIFICATION		R ₁ (*)
	MALTASE	MALTITOL HYDROLASE		MALTASE	MALTITOL HYDROLASE	MALTASE	MALTITOL HYDROLASE	MALTASE	MALTITOL HYDROLASE	
HOMOGENAT	40	3,8	350	115	11	100	100	1	1	0,096
S ₁	8	0,7	100	80	7	20	18	/	/	0,085
S ₂	30	3,1	7	4200	450	75	80	36,5	41	0,107
D. E. A. E (pic V)	15	1,3	0,9	16 000	1450	38	35	139	132	0,090
SEPHAROSE 6B	12	1,1	0,7	16 800	1600	30,5	28	146	145,5	0,095

(*) R₁ = Activité spécifique "Maltitol-hydrolase"
Maltase

TABLEAUX IX

=====
 =====

LES ACTIVITÉS MALTASE ET SACCHARASE AU COURS DE LA PURIFICATION

=====
 =====

ETAPE DE PURIFICATION	ACTIVITE TOTALE (U)		ACTIVITE SPECIFIQUE (U.mg ⁻¹ × 10 ⁻³)		R ₂ (*)
	MALTASE	SACCHARASE	MALTASE	SACCHARASE	
HOMOGENAT	40	28	115	80	0,7
S ₁	8	6	180	60	0,71
S ₂	30	12	4200	1700	0,4
D.E.A.E.(pic V)	15	0,01	16000	2	0
SEPHAROSE 6B	12	0	16800	0	0

* R₂ = Activité spécifique $\frac{\text{Saccharase}}{\text{Maltase}}$

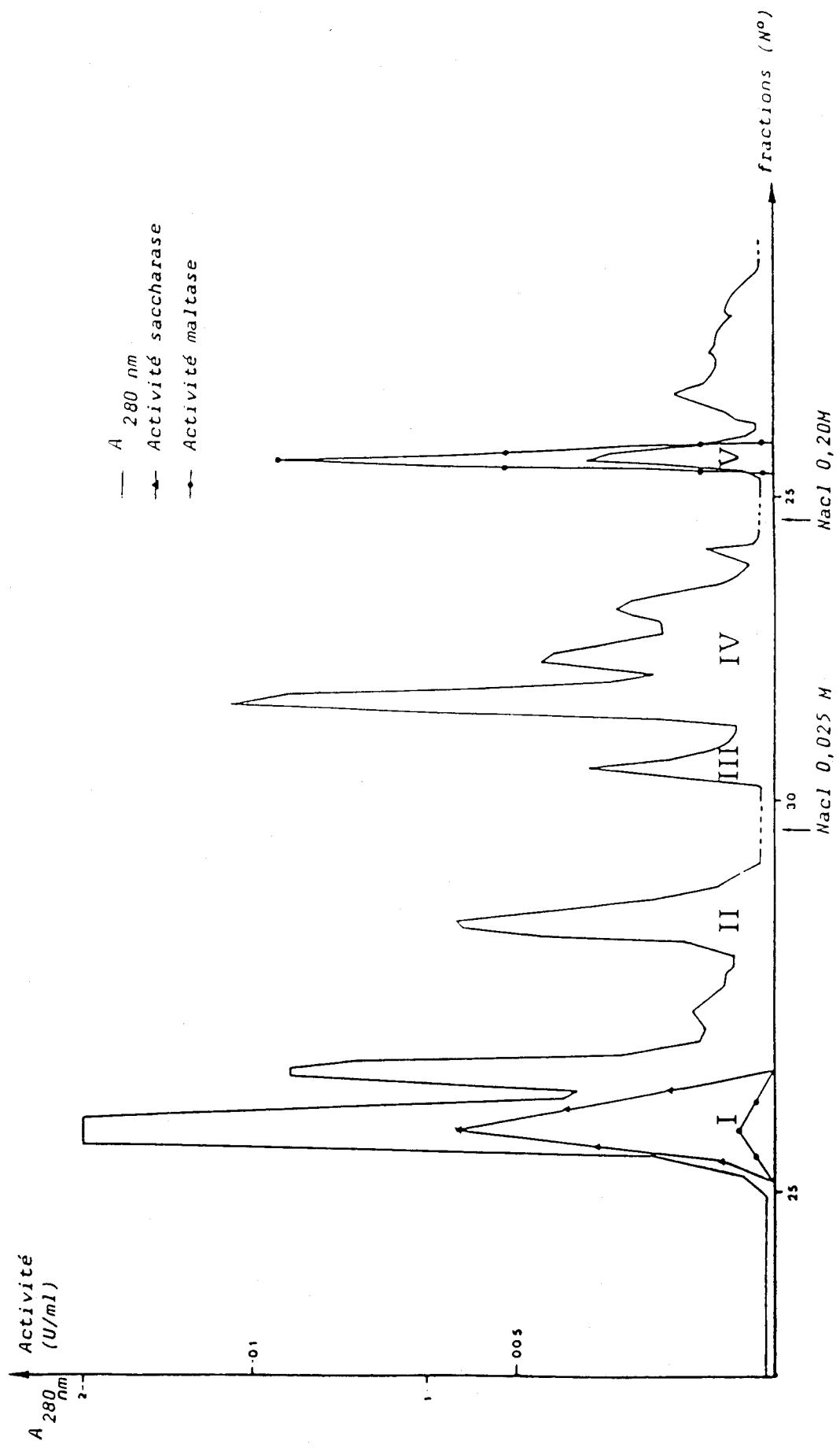


FIGURE 8 PROFIL DE CHROMATOGRAPHIE D'UN S₂ SUR D.E.A.E. TRISACRYL M

Ensuite, la fraction V renferme 50 à 55 p.100 de l'activité maltase initiale. La contamination par d'autres activités disaccharidasi-ques et en particulier celle due au complexe saccharase/isomaltase est négligeable. Nous sommes en présence du complexe maltase/glucoamylase.

On peut aussi remarquer (tableaux VIII et IX, page 46 et 47) que, d'une part le rapport R_1 (Activité "maltitol hydrolase") semble constant

$$\frac{\text{maltitol hydrolase}}{\text{maltase}}$$

et, d'autre part que le rapport R_2 (activité saccharase) tend vers zéro.

$$\frac{\text{saccharase}}{\text{maltase}}$$

Ce qui nous permet d'affirmer que les résultats que nous obtiendrons par la suite ne seront pas entachés d'une activité maltase secondaire due au complexe saccharase/isomaltase.

En résumé, par cette étape chromatographique, on obtient le complexe maltase/glucoamylase dont l'activité spécifique est de 16 U. mg^{-1} avec un facteur de purification de 140.

c) CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHAROSE 6B

Cette gel filtration permet d'éliminer les derniers contaminants restant après chromatographie sur D.E.A.E Trisacryl M. Le facteur de purification est de 145 pour une activité spécifique de 17 U. mg^{-1} .

Cette étape est nécessaire, même si le facteur de purification obtenu paraît faible, car elle permet de pallier les variations possibles pouvant intervenir lors de la chromatographie sur D.E.A.E Trisacryl M.

L'intérêt de ce procédé de purification réside surtout dans le fait que l'on obtient le complexe maltase/glucoamylase, libre de toute activité saccharase. Cette dernière est, en effet, éliminée ainsi que l'activité maltase qui lui est associée, au cours de l'étape de D.E.A.E Trisacryl M.

Au cours des différentes purifications réalisées, nous n'avons pas mis en évidence une séparation des activités maltase et "maltitol-hydrolase". Elles sont présentes, quelque soit le stade de purification, dans un rapport constant. Dès à présent, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une hydrolyse du maltitol par le complexe maltase/glucoamylase.

d) CONTROLE DE PURETE

1) électrophorèse

Après chromatographie sur Sépharose 6B, le complexe maltase/glucoamylase ayant une activité "maltitol-hydrolase" est homogène en électrophorèse sur gel de S.O.S - polyacrylamide.

La figure 9, page 51 illustre l'évolution de la purification depuis l'extrait brut S_1 jusqu'à l'étape ultime de gel filtration. On peut noter que les premières étapes de purification, centrifugations et digestion à la papaïne, permettent d'éliminer de nombreuses protéines contaminantes.

2) Immunoélectrophorèse

La présence d'un arc unique de précipitation en immunoélectrophorèse unidimensionnelle (figure 10 page 52) et d'un pic unique en bidimensionnelle (figure 11 page 53) démontre la pureté immunochimique du complexe enzymatique obtenu après gel filtration.

En immunoélectrophorèse bidimensionnelle (figure 11, page 53), on peut noter l'intérêt de l'étape de gel filtration qui permet bien d'éliminer quelques contaminants restant après l'étape de D.E.A.E. Trisacryl M.

e) EXTENSION DU PROCÉDE DE PURIFICATION AU RAT AXÉNIQUE ET AU CHIEN

1) Rat axénique

Le procédé de purification, mis au point sur le rat normal, a été appliqué au rat axénique de façon à voir si ce dernier possédait le même potentiel enzymatique et en particulier un complexe maltase/glucoamylase analogue à celui décrit chez le rat normal.

Avant de donner les résultats, il est nécessaire de noter que le traitement de l'intestin a été modifié en un point par rapport à la méthode décrite page 26. En effet, la muqueuse intestinale de rat axénique, nettement plus fragile, se desquame très facilement. C'est pourquoi, au lieu de découper et décaper l'intestin, nous avons préféré l'homogénéiser tel quel.

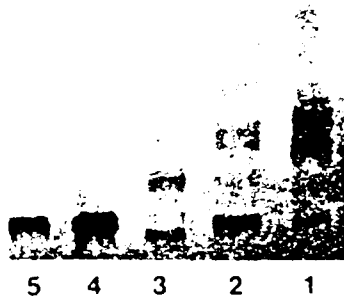


FIGURE 9 : ELECTROPHORÈSE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE
 EN PRÉSENCE DE S.D.S.

- 1 - Surnageant S_1
- 2 - Surnageant S_2
- 3 - Pic I en sortie de D.E.A.E Trisacryl M
- 4 - Pic V en sortie de D.E.A.E. Trisacryl M
- 5 - Sortie de Sépharose 6B

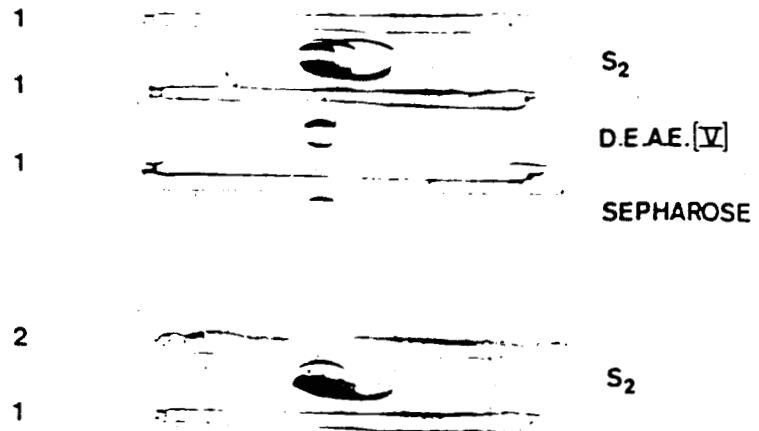


FIGURE 10 : IMMUNOÉLECTROPHORÈSE UNIDIMENSIONNELLE

- 1 - Antisérums total
- 2 - Antisérums "spécifique"

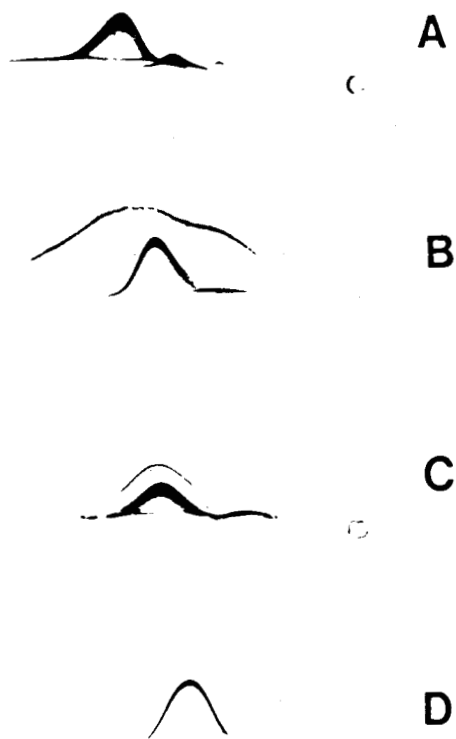


FIGURE 11 : IMMUNOÉLECTROPHORÈSE BIDIMENSIONNELLE CONTRE UN ANTISÉRUM TOTAL.

- A) Surnageant S_1
- B) Surnageant S_2
- C) Sortie de D.E.A.E. Trisacryl M. (pic V)
- D) Sortie de Sépharose 6B

A partir de rats axéniques, on obtient des résultats similaires à ceux obtenus à partir de rats normaux. Les comportements chromatographiques des activités maltase et "maltitol-hydrolase" sont, en effet, identiques. En fin de purification, on obtient une maltase/glucoamylase ayant une activité spécifique de 15 U. mg^{-1} et ne présentant pas d'activité saccharase. De plus, le rapport R_1 reste constant au cours de la purification, il est, d'ailleurs, pratiquement identique à celui obtenu à partir de rats normaux ($R \simeq 0,1$).

On peut donc conclure que le rat axénique possède une maltase qui a, non seulement, le même comportement que le complexe maltase/glucoamylase de rat normal, mais possède aussi une activité "maltitol hydrolase". L'hydrolyse du maltitol n'est donc pas, comme l'affirment certains auteurs (95, 121), exclusivement réalisée par la microflore intestinale.

2) Chien

Nous avons essayé d'isoler un complexe maltase/glucoamylase, dans le but de comparer ce système enzymatique à celui obtenu à partir du rat, pour ensuite, dégager d'éventuelles variations en fonction de l'espèce animale.

Les morceaux d'intestin utilisés, d'une longueur de 4 à 5 cm, ont été traités de la même manière qu'un intestin de rat ; (protocole décrit page 26). Ils nous ont été fournis par la société ROQUETTE Frères.

En ce qui concerne les rapports d'activités, R_1 et R_2 , on ne remarque pas de différences significatives (tableau X page 55) avec ceux obtenus à partir de rats. Par contre les activités totales maltase, "maltitol hydrolase" et saccharase sont environ 3 fois plus faibles.

C'est en étudiant l'action de la papaïne, que l'on s'est aperçu que l'activité maltasique chez le chien est très sensible à la quantité de protéases ajoutées lors de la solubilisation des disaccharidases intestinales. Par contre, chez le rat nous n'avons pas mis en évidence de phénomène semblable. En effet, si on examine la figure 12, page 56 , on remarque que, pour le rat, à partir d'une certaine quantité de papaïne l'activité maltase est stable. A l'opposé, les protéines solubilisées du chien semblent être dénaturées par un excès de protéase.

TABLEAU X

ACTIVITES DISACCHARIDASQUES PRESENTES DANS
LE SURNAGEANT S₂ DE RATS ET DE CHIENS

	RATS NORMAUX	NORMAUX	CHIENS : NOURRIS AU LYCASIN® 80/55
PROTEINES totales mg	7	8	5
Maltase	4,2	1,7	2,65
Maltitol HYDROLASE	0,45	0,16	0,25
Saccharase	1,7	0,63	1,08
R ₁ ± 0,01	0,11	0,09	0,09
R ₂ ± 0,01	0,4	0,37	0,41

(1) R₁ = Activité spécifique $\frac{\text{"Maltitol-hydrolase"}}{\text{Maltase}}$

(2) R₂ = Activité spécifique $\frac{\text{Saccharase}}{\text{Maltase}}$

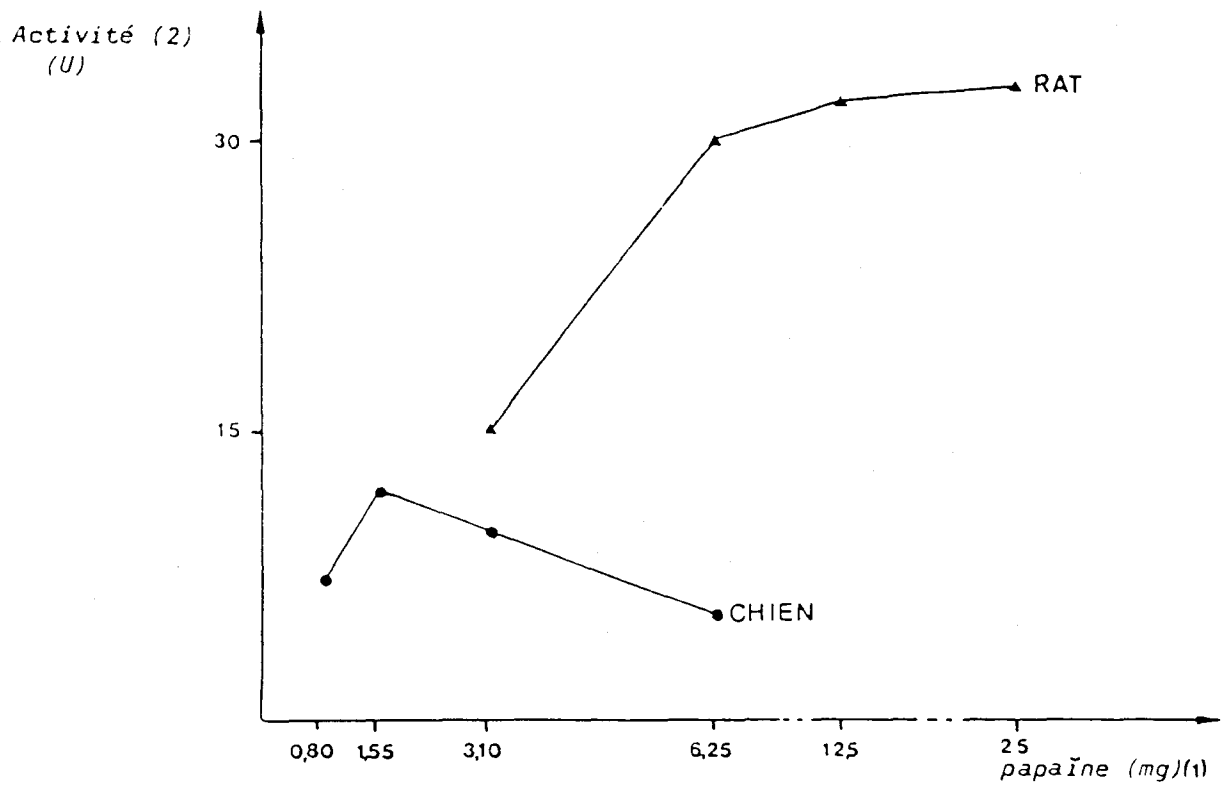


FIGURE 12
= : = : = : = : =

SOLUBILISATION DE L'ACTIVITÉ MALTASE INTESTINALE

PAR LA PAPAÏNE

= : = : = : = : = : = : = : = : = : = : = : = : = : = : = : = : = : = : =

(1) quantité de papaïne ajoutée à 3 g de culot humide après la lère centrifugation (voir traitement de la muqueuse intestinale figure 6 page

(2) Activité maltase totale présente dans le surnageant S₂

Par la suite, nous avons essayé d'isoler un complexe maltase/glucoamylase sans activité saccharase en utilisant, comme pour le rat, la chromatographie sur D.E.A.E. Trisacryl M. Le comportement des disaccharidases de chien est totalement différent de celles du rat. Quelque soit le gradient de pH ou de force ionique utilisé, ce procédé ne nous a pas permis de séparer les activités maltase et saccharase.

A ce stade, on peut se poser le problème de l'existence, dans les fragments intestinaux utilisés, d'un complexe maltase/glucoamylase analogue à celui de rat.

II) CARACTERISATION DU COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE

a) POINT ISOELECTRIQUE

Le point isoélectrique, obtenu par isoélectrofocalisation en veine liquide, se situe aux environs du pH 4,1 (figure 13, page 58).

b) MASSE MOLECULAIRE

Par chromatographie de tamisage moléculaire sur Sepharose 6B, la masse moléculaire du complexe maltase/glucoamylase a été estimée à 220 KD. Cette valeur est voisine de celle obtenue par d'autres auteurs qui la situe à 240 KD (82).

c) PROPRIETES ENZYMATIQUES

1) pH optimum

Les résultats sont illustrés par la figure 14 page 59 . On remarque que le profil présente après un maximum, un épaulement que ce soit pour l'activité maltase ou maltitol hydrolase.

2) stabilité à la température

La stabilité à la température a été mesurée à 55°C car il a été démontré que contrairement au complexe saccharase/isomaltase, la maltase/glucoamylase était thermorésistante.

Tout d'abord, l'activité "maltitol-hydrolase" a le même comportement que l'activité maltase. Par contre, la saccharase ne résiste pas à la température (figure 15, page 60), en effet, le complexe saccharase/isomaltase est dénaturé, à 55°C, en moins de 30 minutes.

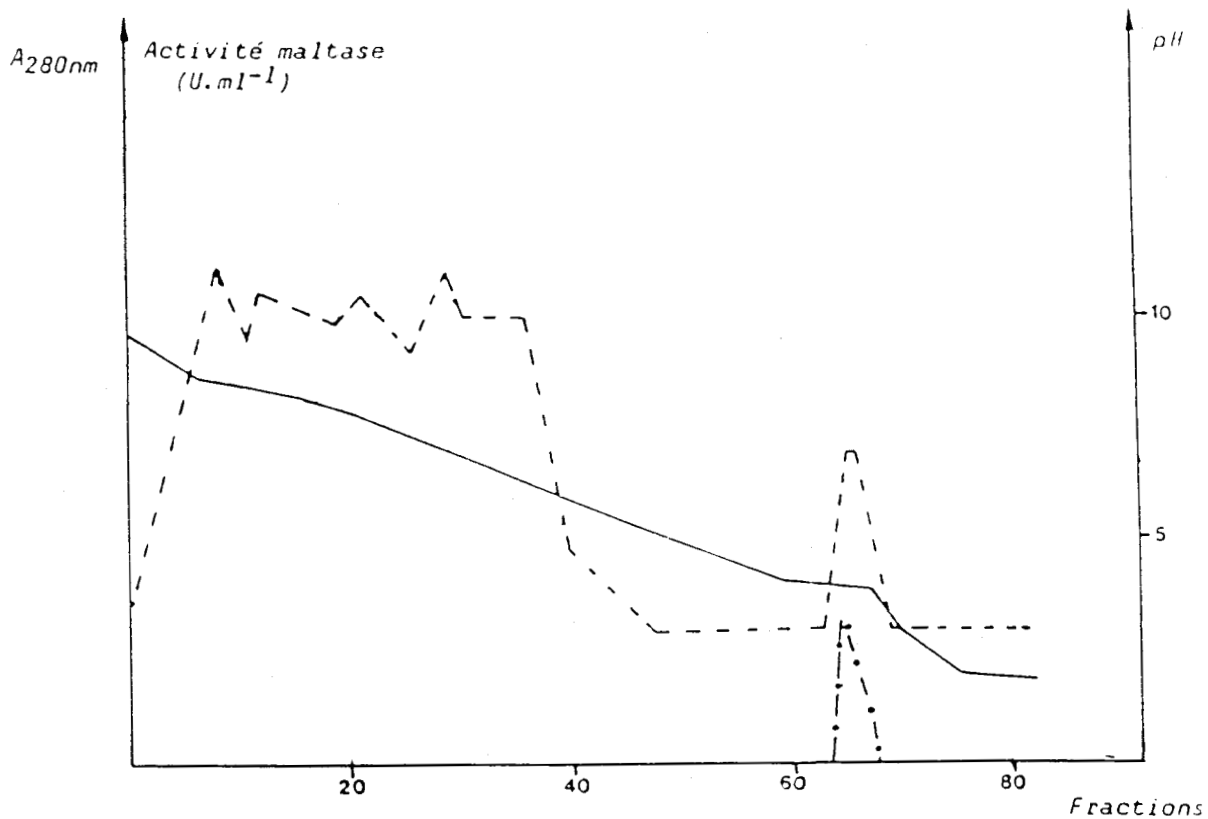


FIGURE 13
 =:~::~::~~::~=

DÉTERMINATION DU POINT ISOÉLECTRIQUE DU COMPLEXE
 MALTASE/ GLUCOAMYLASE

=:~::~::~~::~=

- pH
- - - - - $A_{280\text{ nm}}$
- Activité maltase

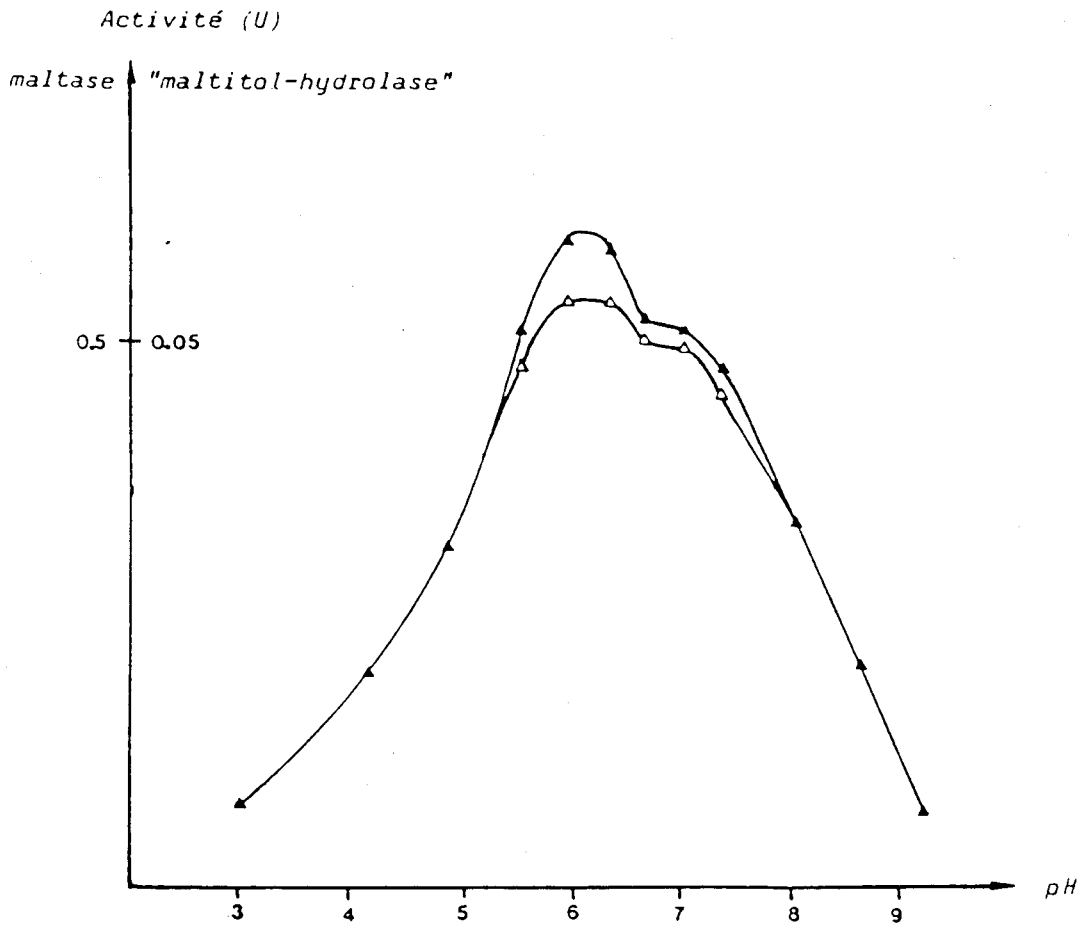


FIGURE 14 : DÉTERMINATION DU PH OPTIMUM DES ACTIVITÉS
 MALTASE (▲) ET "MALTITOL-HYDROLASE" (△)

Activite residuelle
(p.100)

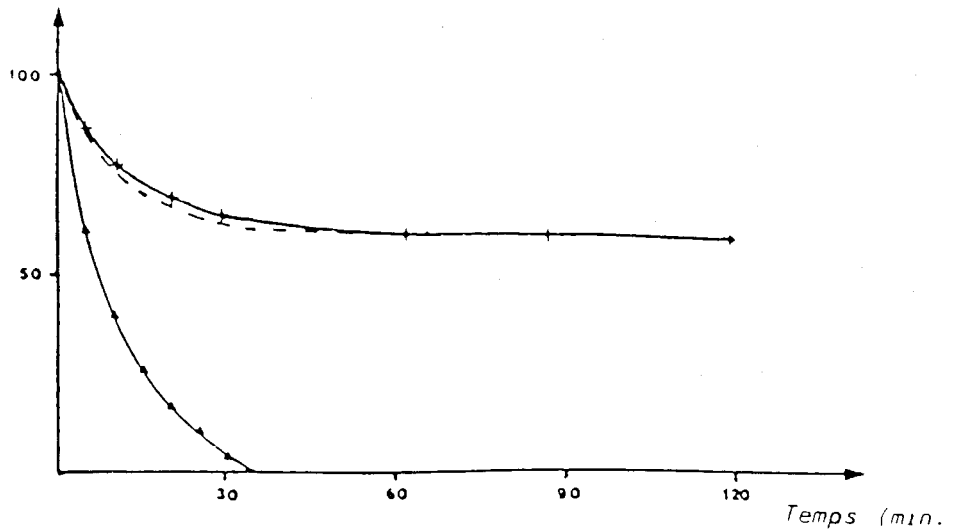


FIGURE 15

====

STABILITE A 55°C

DES ACTIVITÉS MALTASE (+); MALTITOL-HYDROLASE (---) ET SACCHARASE (▲)

====

Activité maltase
résiduelle (p.100)

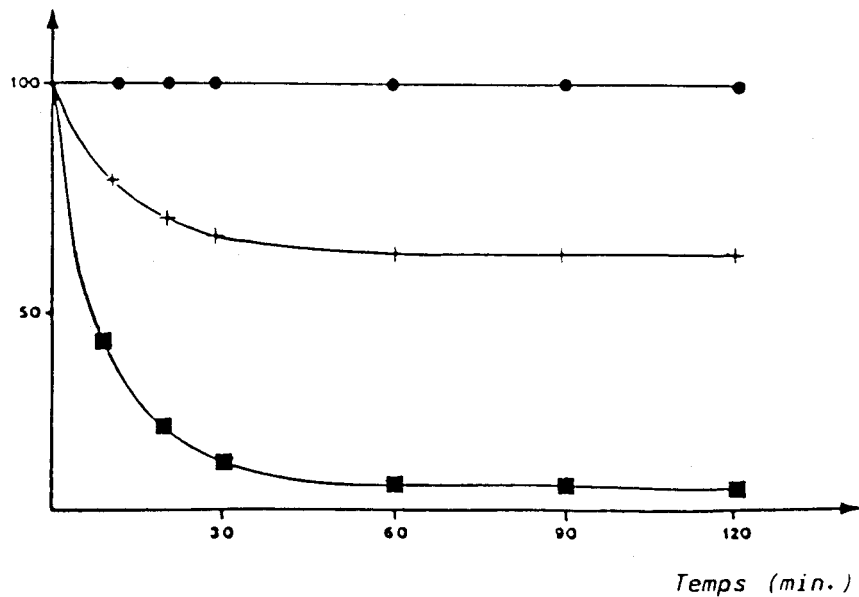


FIGURE 16

====

STABILITÉ A 55°C DE L'ACTIVITE MALTASE

D'UN S₂ (+), DU PIC I (■) (COMPLEXE SACCHARASE/ISOMALTASE) ET
DU PIC V (●) (COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE) DE SORTIE DE D.E.A.E TRISACRYL M.

====

Nous avons ensuite étudié la stabilité de l'activité maltase a différents stades de purification. On constate sur la figure 16, page que :

- 60 p.100 de l'activité maltase présente dans un surnageant S_2 sont stables à 55°C au bout de 2 heures. Il faut noter que l'on se trouve, dans un S_2 , en présence d'un mélange de plusieurs systèmes enzymatiques ayant une action sur le maltose. On peut citer, entre autre enzyme, le complexe saccharase/isomaltase qui est dénaturé en moins de 30 minutes.
- 95 p.100 au minimum de l'activité maltase présente dans la fraction V de D.E.A.E Trisacryl M résistent à la température.

A priori, on peut conclure que l'activité maltase liée au complexe saccharase/isomaltase est détruite par la chaleur, alors que celle qui associée au complexe maltase/glucoamylase est stable à 55°C.

α) chien

Une étude similaire a été effectuée sur les enzymes de la muqueuse intestinale de chien. La figure 17, page 62 montre bien que l'activité maltase, présente dans le surnageant S_2 , est sensible à la température. Seulement 20 à 25 p.100 de l'activité résistent 2 heures à 55°C.

Par ailleurs, aucune fraction en sortie de D.E.A.E Trisacryl M ne présente une stabilité analogue à celle du complexe maltase/glucoamylase de rat.

Si ce complexe maltase/glucoamylase existe chez le chien, les résultats obtenus peuvent être expliqués, soit par la présence du complexe en très faible quantité, soit par un comportement tout à fait différent de celui isolé chez le rat.

3) paramètres cinétiques

α) en fonction de l'étape de purification.

Nous avons, tout d'abord, étudié les paramètres cinétiques, vis-à-vis du maltose et du maltitol, en fonction du stade de purification. En effet, initialement, on se trouve dans le cas d'un mélange de complexes enzymatiques dont plusieurs présentent une activité maltase.

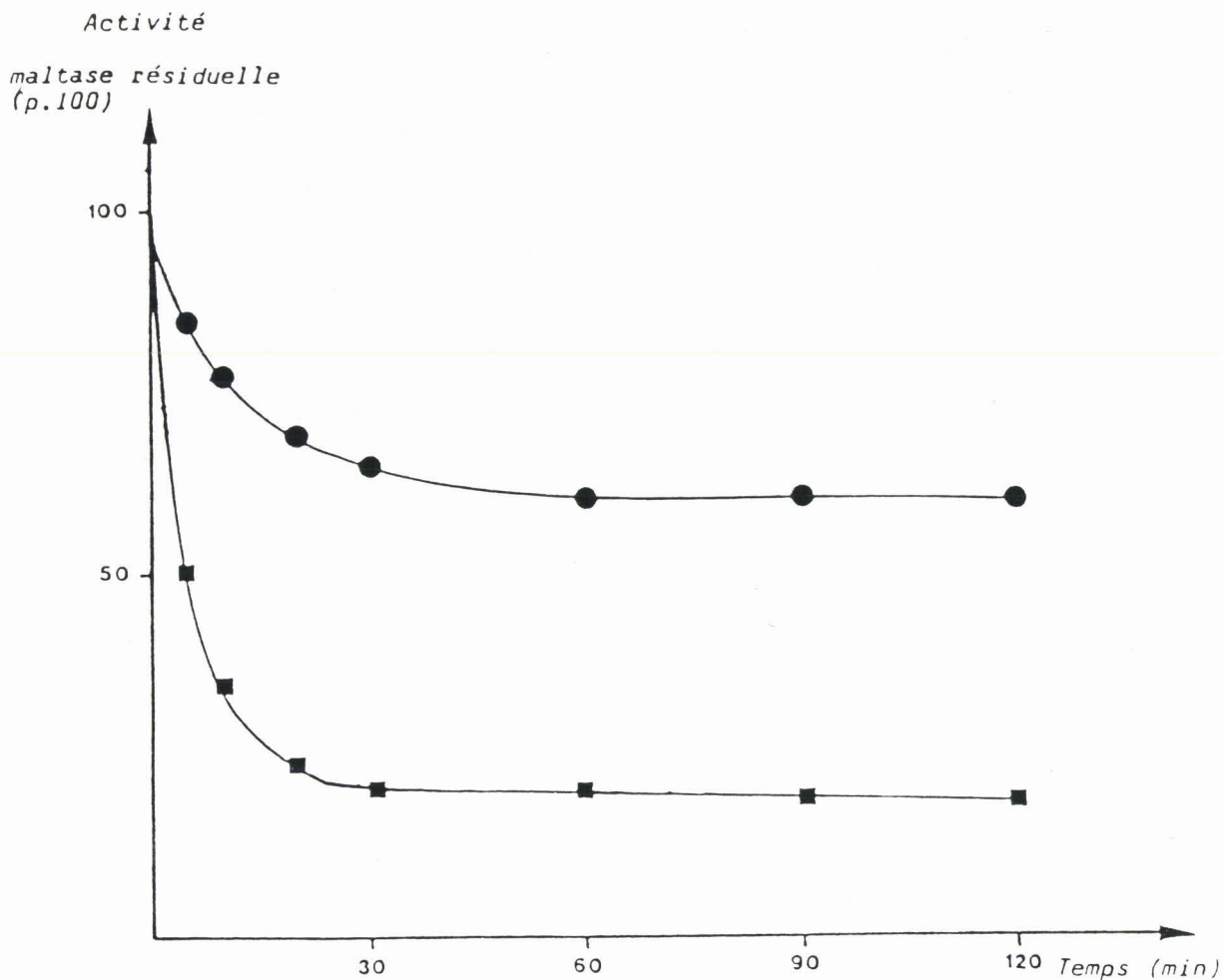


FIGURE 17

====

STABILITE A 55°C DE L'ACTIVITE MALTASE
 D'UN S₂ DE RAT (●) ET D'UN S₂ DE CHIEN (■).
 =====

On peut remarquer, tableau XI, page 64, que la vitesse maximale de réaction reste constante alors que l'affinité, vis-à-vis des deux types de substrats, augmente. Ce phénomène peut être expliqué en partie par la disparition progressive de la contamination due au complexe saccharase/isomaltase lors de la purification du système maltase/glucoamylase.

β) Comparaison : rats normaux et rats nourris au lycasin* 80/55

Cette étude a été effectuée dans le but de déterminer s'il existait une forme d'adaptation de la maltase/glucoamylase à la composition du régime alimentaire chez le rat.

A la vue du tableau XII, page 65, on peut conclure que les paramètres cinétiques vis-à-vis du maltose et du maltitol ne varient pas en fonction de la diète. De plus, nous avons comparé le potentiel enzymatique maltase et "maltitol-hydrolase" d'un rat normal et d'un rat nourri au lycasin* 80/55. A ce niveau non plus, il n'y a pas de différence.

La présence de maltooligosaccharides hydrogénés dans une diète n'influencent en aucune manière le complexe maltase/glucoamylase.

γ) Comparaison : rats Wistar et Sprague Dawley

Les études, in vivo, effectuées par la société ROQUETTE Frères sont réalisées sur des rats Sprague Dawley ; alors que d'autres travaux, et notamment ceux réalisés au Japon se font à l'aide de rats de race Wistar. C'est pourquoi, même si cela paraît évident, nous avons voulu comparer les paramètres cinétiques de ces deux lignées.

Les résultats, résumés dans le tableau XII page 65, montrent que la lignée n'a pas d'influence sur l'hydrolyse du maltose et du maltitol.

δ) Comparaisons : rats normaux et rats axéniques

Le rat axénique est un modèle de laboratoire bien souvent utilisé lors de l'étude de la microflore intestinale et de son action. Nous avons déjà mis en évidence page 54, que le rat axénique possède un complexe maltase/glucoamylase analogue à celui d'un rat normal. Les résultats obtenus, tableau XIII, page 65, montrent que les affinités du complexe de rat axénique vis-à-vis des substrats maltose et maltitol sont

TABLEAUX XI : PARAMÈTRES CINÉTIQUES EN FONCTION DU STADE DE
 PURIFICATION DU COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE

	MALTOSE			MALTITOL		
	K_m	V_{max}	K_m/V_{max}	K_m	V_{max}	K_m/V_{max}
Avant D.E.A.E	2,5	190	76	55	13	0,24
Après D.E.A.E	1,3	200	154	30	15	0,50
Après Sépharose 6B	1,2	200	167	30	14	0,47

TABLEAU XII : COMPARAISON DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES DE RATS
 SPRAGUE DAWLEY NORMAUX ET NOURRIS AU LYCASIN*
 ET DES RATS WISTAR

	MALTOSE		MALTITOL	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Rat Sprague Dawley	2,5	190	55	13
Rat Sprague Dawley nourri au Lycasin*	2,5	200	57	15
Rat Wistar	2,5	205	55	13

TABLEAU XIII : COMPARAISON DES PARAMÈTRES CINÉTIQUES DE RATS NORMAUX ET
 AXÉNIQUES

	MALTOSE		MALTITOL	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Rat normal	1,2	200	30	15
Rat axénique	1,45	100	30	8

identiques à celles de rats normaux, par contre les vitesses d'hydrolyse sont deux fois plus faibles. Cette différence pourrait être due à un renouvellement plus lent des entérocytes des rats axéniques.

4) Inhibition croisée

Les résultats obtenus jusqu'à présent sont en faveur d'un ensemble moléculaire homogène hydrolysant maltose et maltitol. Il reste cependant à démontrer l'identité du ou des sites catalytiques hydrolysant ces deux substrats.

Le tableau XIV, page 67, donne les valeurs expérimentales obtenues et en parallèle les valeurs théoriques dans les deux hypothèses possibles : 1 site - 2 activités ou 2 sites - 2 activités. Les résultats obtenus nous permettent d'affirmer que l'hydrolyse du maltose et du maltitol s'effectue au niveau d'un même site catalytique. Il faut cependant reconnaître que l'affinité et la vitesse maximale d'hydrolyse sont plus faibles pour le maltitol que pour le maltose (respectivement 20 ou 10 fois moins).

5) action des inhibiteurs

Jusqu'à présent, le système enzymatique a été caractérisé par ses paramètres cinétiques classiques : K_m et V_{max} .

S'il existe effectivement un seul site de catalyse, les inhibiteurs doivent agir de la même façon quelque soit l'activité enzymatique.

Les résultats sont résumés par le tableau XV, page 68

On peut remarquer que :

- le maltose et le maltitol se comportent comme des inhibiteurs compétitifs l'un vis-à-vis de l'autre.
- l'isomaltitol et la δ -gluconolactone inhibent de façon identique les activités maltase et "maltitol - hydrolase"

TABLEAU XIV

INHIBITION CROISEE MALTOSE-MALTIITOL

SUBSTRAT MALTOSE	SUBSTRAT MALTIITOL	SUBSTRAT MALTOSE - MALTIITOL
		HYPOTHESE
		2 sites - 2 activités
		1 site - 2 activités
K_{mA}	K_{mB}	$\alpha \approx 0,33$
$V_{max A}$	$V_{max B}$	$\alpha = 0,10$
		$V_{max th.} : V_{max exp.} : V_{max th.} : V_{max exp.}$
COMPLEXE		
1,3	200	30
		15
		215
		95
		105
		145
		140

$$* V_{max} \text{ théorique} = V_{max A} + V_{max B}$$

$$** V_{max} \text{ théorique} = \frac{V_{max A} \cdot \alpha \cdot K_{mB} + V_{max B} \cdot K_{mA}}{K_{mA} + \alpha \cdot K_{mB}}$$

TABLEAU XV
 =:~::~~::~~::~~::~=

ACTION DES INHIBITEURS
 SUR LE SYSTEME MALTASE/"MALTITOL HYDROLASE"
 =:~::~~::~~::~~::~=

	<i>K_i</i> (mM)	
	MALTASE	MALTITOL HYDROLASE
MALTOSE	-	2,7
MALTITOL	20	-
δ - GLUCONOLACTONE	13	12,5
ISOMALTITOL	20	19

6) Action du système enzymatique maltase/"maltitol hydrolase"
sur des analogues structuraux.

Cette étude de la variation des paramètres cinétiques a été réalisée pour deux raisons principales :

- le Lycasin® 80/55 renferme des homologues supérieurs du maltitol
- la maltase est toujours associée à une activité glucoamylase.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XVI, page 70.

En ce qui concerne les substrats synthétiques, ni le Naphtyl - α -D - glucopyranoside ni le méthylumbelliferyl - α -D - glucopyranoside ne sont hydrolysés par le complexe maltase/glucoamylase. Par contre le p - nitrophenyl - α -D - glucopyranoside est dégradé. Sa constante d'affinité ($K_m = 6,7$ mM) est intermédiaire entre celle du maltose (1,3 mM) et celle du maltitol (30 mM), alors que sa vitesse maximale de réaction est semblable à celle du maltitol (respectivement 13 et 15 n.moles.min.⁻¹). Ce phénomène peut être expliqué par l'encombrement stérique plus important des groupements naphtyl et méthylumbelliferyl.

Quant aux oligosaccharides tels que maltotriose, maltotriitol, maltopentaitol et maltoheptaitol, plusieurs remarques sont à faire :

- leur affinité est plus grande que celle du maltose
- leur vitesse globale de réaction est inversement proportionnelle au nombre d'unité glucose ; mais la liaison α -(1 \rightarrow 4)-glucosidique est pratiquement hydrolysée à vitesse constante.
- ils produisent une inhibition par excès de substrat (respectivement à partir de 1,1 - 1,5 - 1,3 et 1,3 mM)

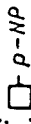
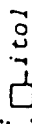





III) LOCALISATION DU COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE

Nous avons essayé de déterminer si le complexe maltase/glucoamylase était réparti uniformément le long de l'intestin ou au contraire localisé dans certaines régions du tractus digestif. Pour cela nous avons utilisé deux méthodes différentes :

- le dosage de l'activité enzymatique présente dans le surnageant

TABLEAU XVI

ACTION DU SYSTEME MALTASE/GLUCOAMYLASE SUR DES ANALOGUES STRUCTURAUX

	K_m (mM)	V_{max} (nM/mn)	M (liaisons/mn-10 ⁻⁹)
p-NP- α -GLUCOSIDE : 	6,7	13	13
MALITOL : 	30	15	15
MALTOSE : 	1,3	200	200
MALTOTRIITOL : 	0,4	40	80
MALTOTRIOSE : 	0,4	30	60
MALTOPENTAITOL : 	0,46	15	60
MALTOHEPTAITOL : 	0,45	8	50

S_2 de chaque fragments intestinaux de 2 a 3 cm de longueur.

- la localisation de la fluorescence dans des coupes intestinales de 7 μ m espacées les unes des autres de 2 à 3 cm, et cela après réaction immunitaire au moyen de l'antisérum spécifique "anti-Sépharose 6B" et d'anticorps de lapin marqué au F.I.T.C.

a) PAR DOSAGE ENZYMATIQUE

La répartition de l'activité n'est pas homogène comme on peut le remarquer figure 18, page 72 . L'histogramme de l'activité maltase montre en effet que cette dernière est localisée de façon diffuse le long de l'intestin. D'une façon globale, on peut distinguer 3 zones où l'activité est plus importante. Elles se situent dans le jéjunum, dans la région jejuno-iléale et dans l'iléon.

b) PAR IMMUNOFLOUORESCENCE

On peut observer (figure 19 , page 74) que les coupes intestinales traitées contre un antisérum total présentent une fluorescence intense diffuse et dispersée, contrairement à celles traitées contre un anti-sérum d'un lapin non immunisé. On constate aussi que le maximum de fluorescence se trouve localisé au niveau de la bordure en brosse. Les amas fluorescents que l'on remarque à l'intérieur des villosités sont dus à la présence de macrophages.

Dans la figure 20, page 75 on peut observer que l'intensité de fluorescence est variable en fonction du fragment intestinal dans lequel la coupe a été effectuée.

Ainsi, nous avons essayé d'évaluer l'intensité de la fluorescence de chacune des 24 coupes. Nous en avons ensuite dégager un profil qui est représenté dans la figure 21, page 76 . A ce niveau, il est nécessaire de préciser que la mesure de l'intensité de fluorescence n'est pas très précise, il s'agit d'une méthode d'évaluation effectuée en comparant les coupes les unes aux autres. On peut quand même remarquer qu'on retrouve trois zones où la fluorescence est plus intense. Elles se situent dans le jéjunum, dans la région jéjuno iléale et dans l'iléon.

Cependant, il est délicat de superposer ce profil avec celui obtenu après le dosage de l'activité enzymatique. En effet, non seulement l'évaluation de la fluorescence est peu précise, mais aussi la coupe de 7 μ m

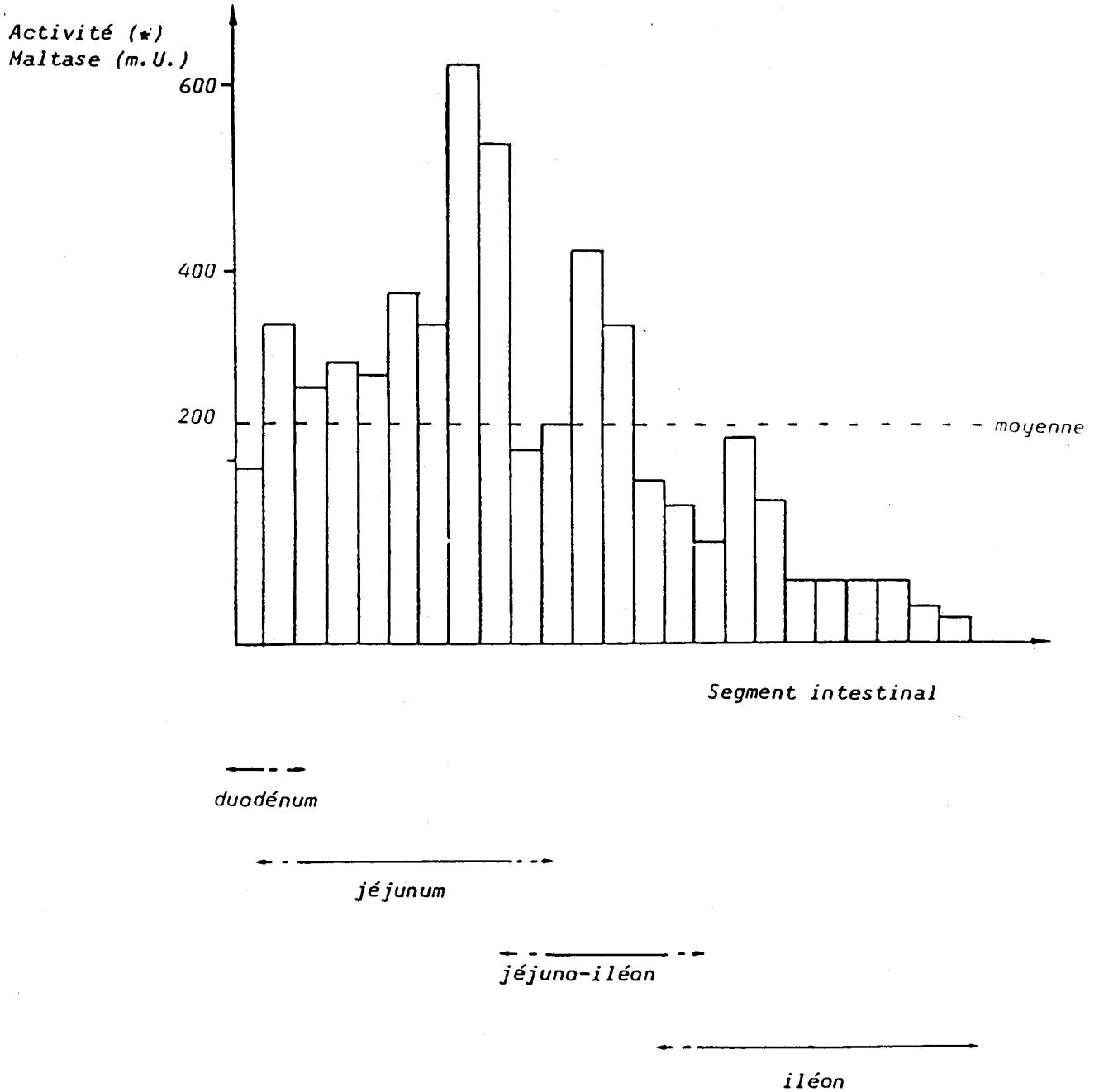
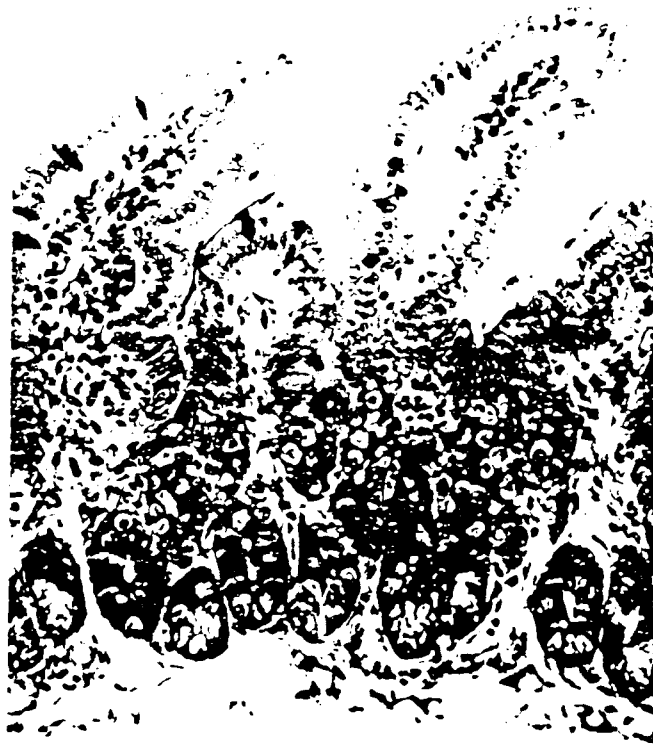
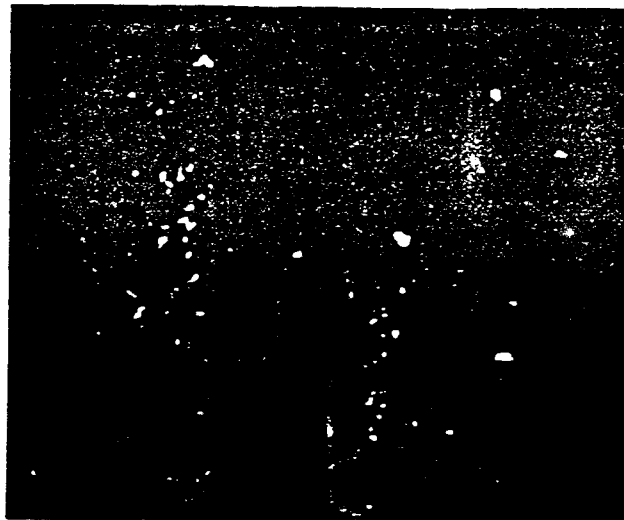


FIGURE 18; L'ACTIVITE MALTASE LE LONG DE L'INTESTIN GRELE DE RAT

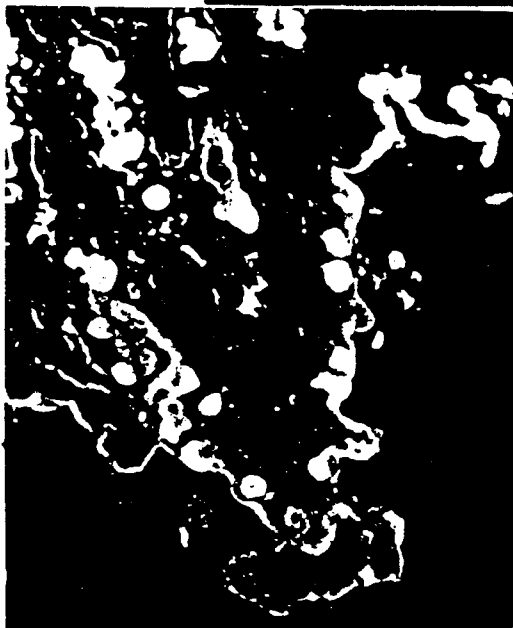
*Activité maltase totale présente dans les surnageants S_2 de chacun des 24 segments intestinaux.



A



B



C



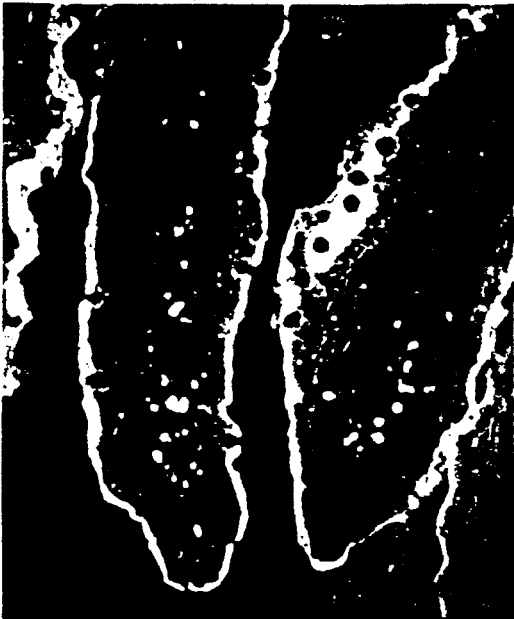
D



A



B



C



D

FIGURE 20

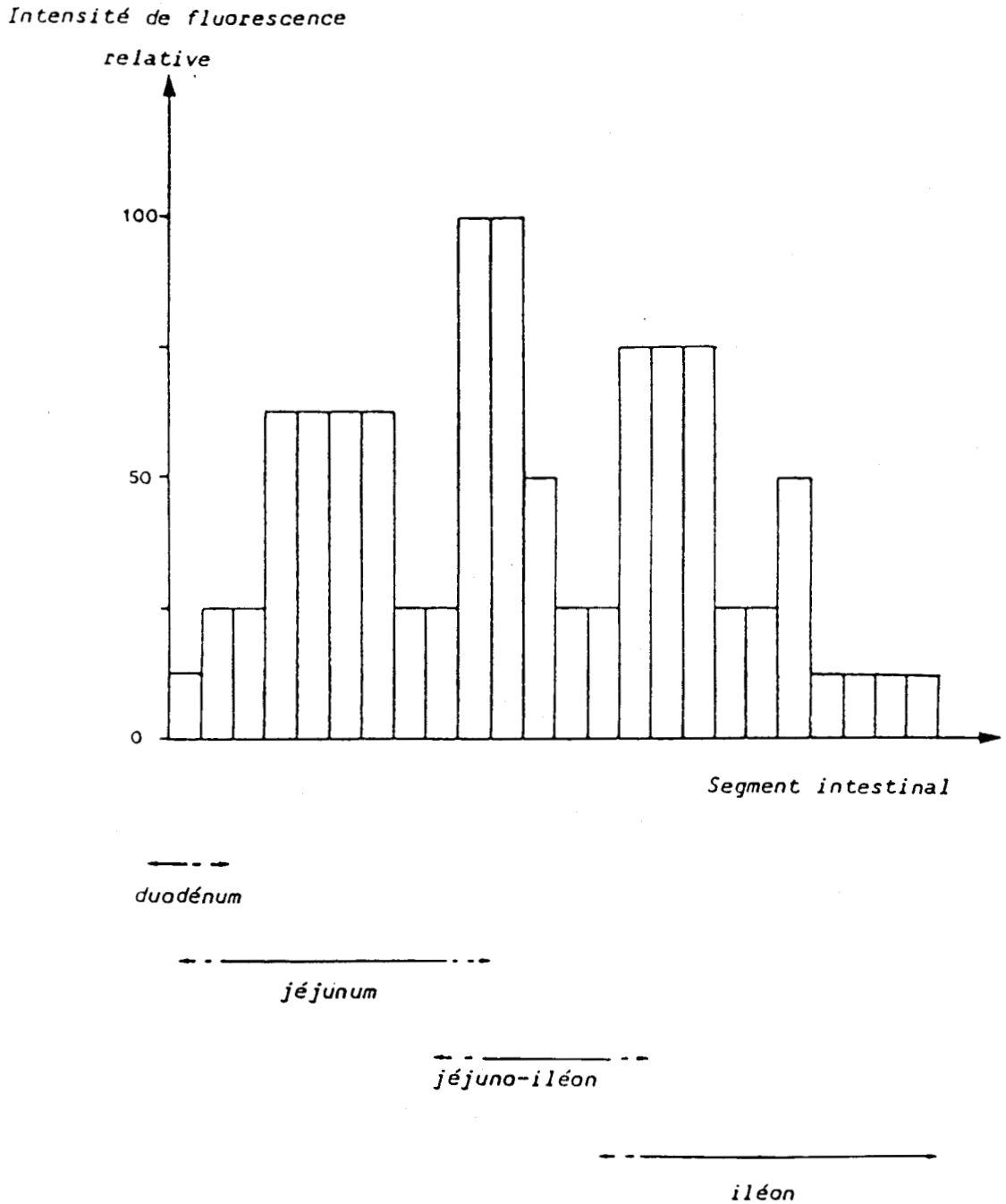


FIGURE 21 : INTENSITE DE FLUORESCENCE PRESENTE AU NIVEAU DES
 COUPES INTESTINALES DE RAT
 (Estimation visuelle effectuée par 4 personnes)

ne représente, peut être pas le fragment intestinal dans lequel elle a été effectuée. De plus, il faut ajouter que ces coupes ont été réalisées sur un même animal, alors que l'activité enzymatique a été déterminée à partir de 3 animaux.

En conclusion, nous avons jusqu'à présent isolé, à partir de la bordure en brosse de l'intestin de rat, le complexe maltase/glucoamylase qui hydrolyse le maltose et le maltitol au niveau d'un même site de catalyse. Cette enzyme, du fait de son activité glucoamylase hydrolyse les maltooligosaccharides qu'ils soient hydrogénés ou non. La localisation de ce complexe, semble diffuse le long de l'intestin grêle, mais, à priori, il existe des zones où elle se trouve en plus grande quantité.

Nous allons maintenant nous attacher à un aspect plus appliqué, à savoir : la dégradation du lycasin® 80/55 et du maltitol dans l'intestin.

B) ETUDE, IN VITRO, DE LA DEGRADATION DU LYCASIN® 80/55 ET DU MALTITOL

Les travaux effectués jusqu'à présent sur le complexe maltase/
glucoamylase se situent dans le contexte, plus général, d'une étude de
la digestion du lycasin® 80/55 qui contient plus de 50 p. 100 de maltitol.

C'est pourquoi, nous nous proposons d'examiner :

- 1 - l'action du complexe maltase/glucoamylase sur le maltitol
et le lycasin® 80/55, en comparaison avec le maltose et le
sirop de glucose 545 qui permet d'obtenir par hydrogénation
le lycasin® 80/55.
- 2 - l'action de l' α -amylase pancréatique qui peut notamment
intervenir au niveau de la dégradation des maltooligosac-
charides.
- 3 - l'intervention éventuelle de la microflore dans la dégra-
dation du maltitol.

I) ACTION DU COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE SUR DIFFERENTS SUBSTRATS

a) CINETIQUES DE TEMPS

Le tableau XVII, page 79 et la figure 22 page 80 , illustrent
les résultats obtenus lors de l'étude de la dégradation du Lycasin® 80/55
et du sirop de glucose 545.

On peut constater que :

- α - Les oligosaccharides disparaissent très rapidement qu'ils
soient hydrogénés ou non.

TABLEAU XVII: POURCENTAGE D'HYDROLYSE DU MALTOSE, DU SIROP DE
 GLUCOSE 545 ET DE LEURS HOMOLOGUES HYDROGÉNÉS PAR
 LE COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE

	MALTOSE	MALTITOL	SIROP DE GLUCOSE 545	LYCASIN® 80/55
3 h 30	98	22	80	33
8 h	100	32	92	45
24 h	100	73	97	74
48 h	100	86	97	85

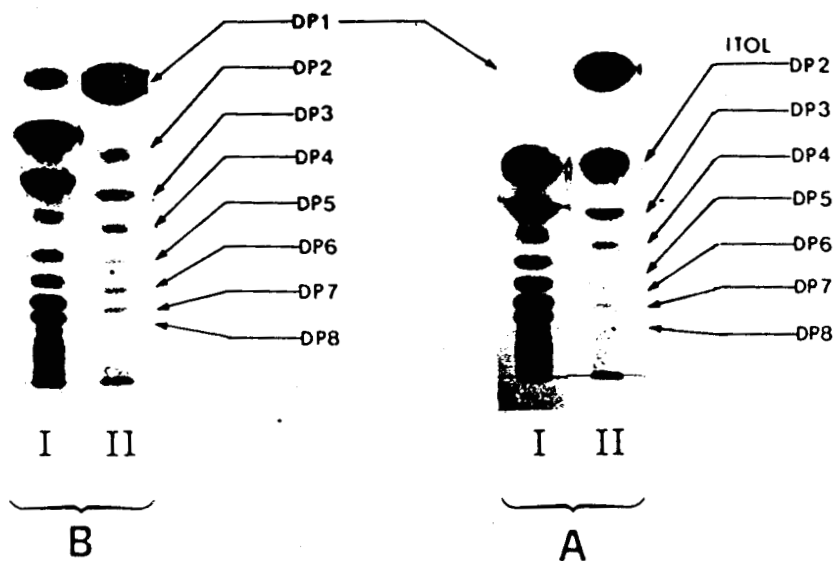


FIGURE 22

HYDROLYSE DU LYCASIN® 80/55 (A)
 ET DU SIROP DE GLUCOSE 545 (B) PAR LE
 COMPLEXE MALTASE / GLUCOAMYLASE.

- I) TÉMOIN SUBSTRAT
- II) 40 HEURES D'HYDROLYSE

- β - En ce qui concerne le Lycasin® 80/55, l'étape limitante se situe au niveau du maltitol. De ce fait l'hydrolyse totale nécessite un temps d'incubation plus long.

- γ - Le maltitol est dégradé beaucoup plus lentement que le maltose, respectivement 32 et 100 p. 100 après 8 h. d'hydrolyse.

Ces essais mettent donc en évidence l'hydrolyse enzymatique du lycasin® 80/55, et du maltitol qu'il contient. Il faut cependant noter que ce dernier est lentement hydrolysé.

On peut aussi remarquer qu'au bout de 4 heures, l'hydrolyse du maltitol est environ 5 fois plus faible que celle du maltose ; alors que pour le lycasin® 80/55 on note une dégradation 2,5 fois plus faible que celle du sirop de glucose.

b) CINETIQUES EN PRESENCE DE MELANGE DE SUBSTRATS HYDROGENES ET NON HYDROGENES

1) Maltose-maltitol

La figure 23, page 82 montre que l'hydrolyse du maltitol débute lorsqu'il est 10 fois plus concentré que le maltose. On confirme donc ici que le maltitol est un substrat hydrolysé très lentement par le complexe maltase/glucoamylase.

2) sirop de glucose 545 - lycasin® 80/55

Dans le cas d'un mélange contenant 90 p.100 de lycasin® 80/55 et 10 p.100 de sirop de glucose 545, la présence de sucres hydrogénés, même en grande quantité, ne semble pas modifier l'hydrolyse du sirop de glucose. En effet, ce dernier est dégradé à 100 p. 100 en 48 heures, alors que le lycasin® l'est à 73 p.100 (figure 24, page 83).

II) ACTION DE L' α -AMYLASE PANCREATIQUE

L' α -amylase pancréatique est impliquée dans la digestion de glucides complexes, tels que l'amidon et le glycogène. C'est pourquoi, nous avons testé ce type d'enzyme sur le lycasin® 80/55 et le sirop de glucose 545.

Nombre de n.moles hydrolysées

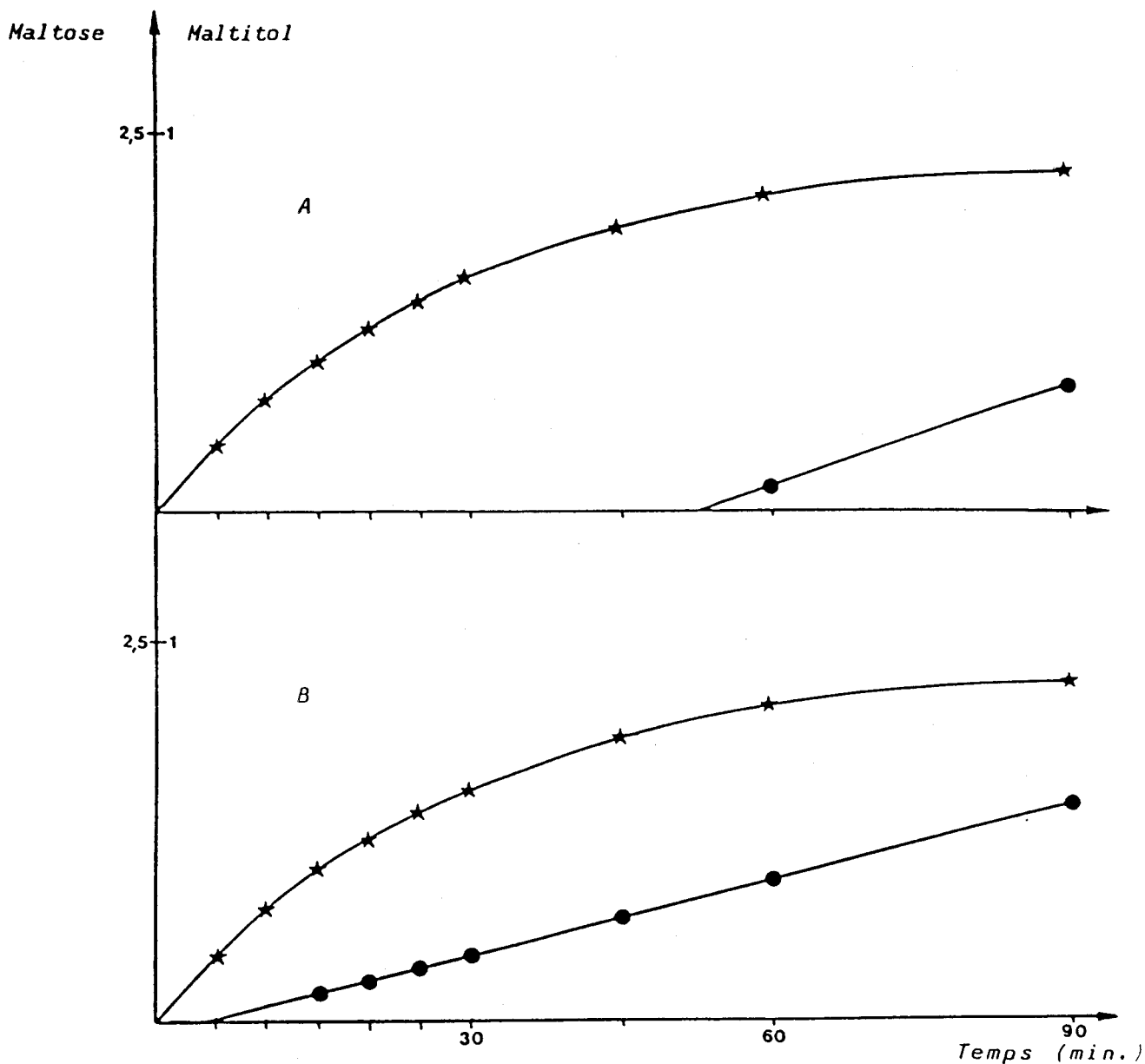


FIGURE 23 : HYDROLYSE DU MALTOSE (★) ET DU MALTITOL (●) EN MELANGE
 PAR LE COMPLEXE MALTASE/GLUCOAMYLASE

RAPPORT MOLAIRES MALTOSE/MALTITOL A T = 0

A : 0,12

B : 0,1

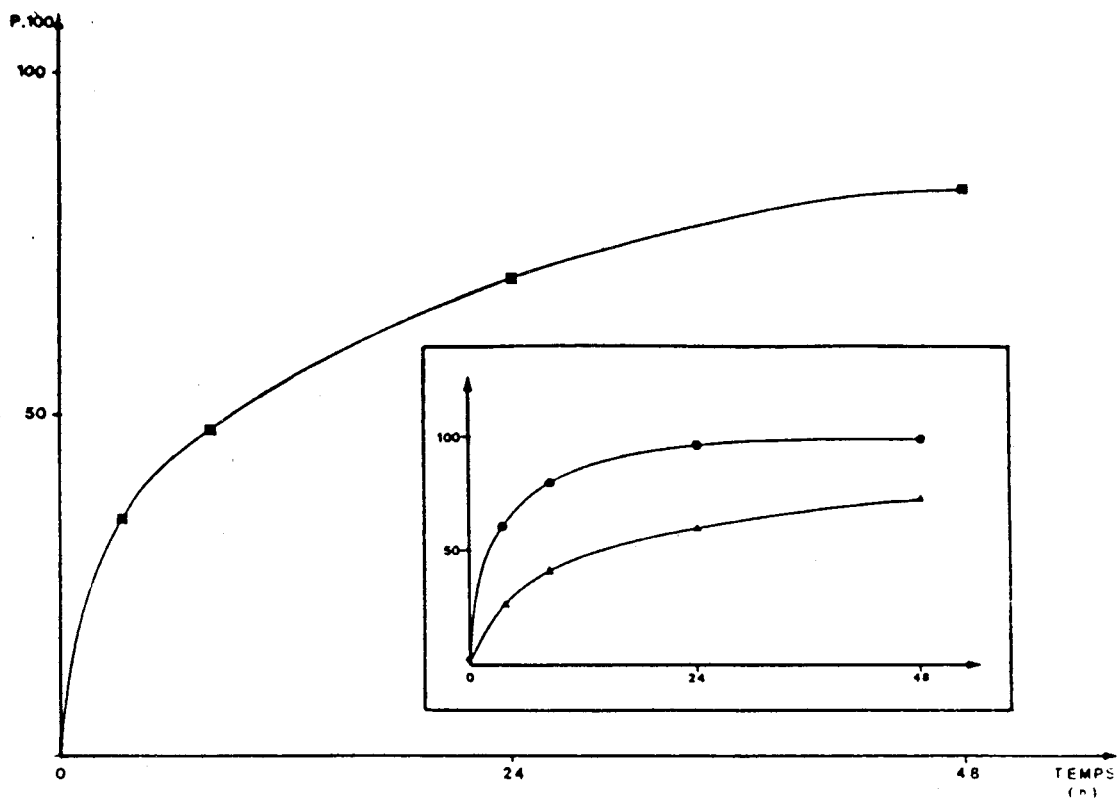


FIGURE 24

====

HYDROLYSE D'UN MELANGE (■) CONTENANT 90P.100 DE
LYCASIN® 80/55 ET 10 P.100 DE SIROP DE GLUCOSE 545

*Dans l'encadré : pourcentage d'hydrolyse de chacun des deux
substrats pris séparément*

●) sirop de glucose 545

▲) Lycasin® 80/55

Tout d'abord, ni le maltose ni le maltitol ne sont hydrolysés par les α -amylases utilisées (α -amylases pancréatiques de porc purifiées - α -amylase pancréatique humaine non purifiée).

Ensuite en comparant l'hydrolyse du lycasin® 80/55 à celle du sirop de glucose, on peut remarquer (figure 25 page 85) que :

Dans les 2 cas les polymères supérieurs sont dégradés très rapidement.

Les produits d'hydrolyse du sirop de glucose 545 sont principalement le glucose et les maltooligosaccharides dont le degré de polymérisation est de 5 et 6.

Quant au lycasin® 80/55, il n'y a pratiquement pas de glucose libéré, le maltotriitol n'est pas hydrolysé et on peut noter l'apparition de maltose en faible quantité.

En fait l' α -amylase pancréatique hydrolyse préférentiellement la 1ère et la 2ème liaison α -(1+4) - O - glucosidique à partir d'une fonction réductrice et la 3ème liaison à partir de l'extrémité réduite (voir page 16)

Comme on peut le voir figure 26 , page 86 , le maltotriitol n'affecte pas la dégradation de maltooligosaccharides par l' α -amylase pancréatique, contrairement à l' α -amylase salivaire (162,163). Il en est de même pour le maltitol.

On peut aussi noter, que lors d'essais avec l'extrait pancréatique et la maltase/glucoamylase en mélange figure 27, page 87 nous n'avons pas mis en évidence l'effet additif de ces 2 types d'enzymes. Le complexe maltase / glucoamylase est capable d'hydrolyser le lycasin® 80/55. A priori, une dégradation préalable des polymères supérieurs ne favorise pas son action. Au contraire, il semble que ce complexe éprouve plus de difficultés à hydrolyser les petits polymères lorsque les oligosaccharides à plus haut poids moléculaire sont absents. Ces résultats sont à rapprocher de ceux observés lors des cinétiques d'hydrolyse du lycasin® 80/55 et du maltitol, à savoir une hydrolyse respectivement 2,5 et 5 fois plus faible que celle de leur homologue non hydrogéné.

Il semble donc y avoir un effet d'activation qui serait dû à la présence des polymères supérieurs dans lesquels la fonction alcool n'a que peu d'influence sur la mise en conformation du complexe enzyme-susbtat, ce qui ne sembe pas être le cas pour le maltitol.

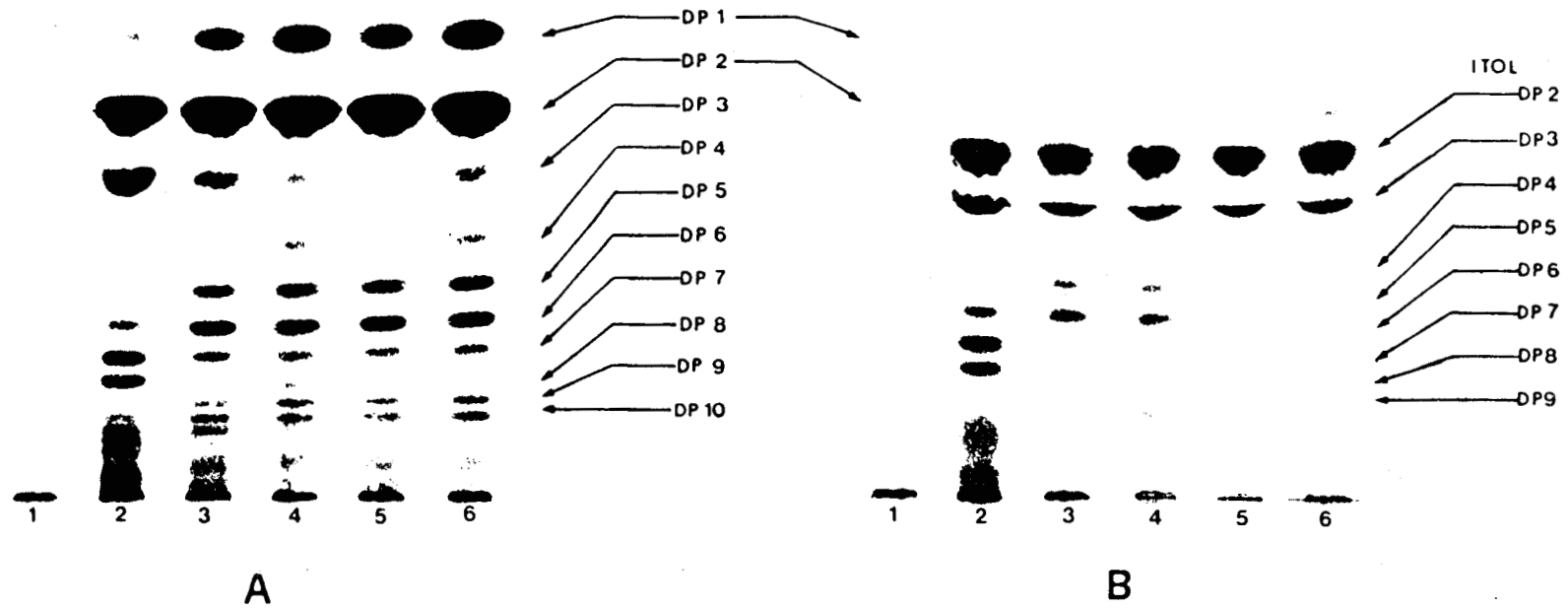


FIGURE 25 : HYDROLYSE DU LYCASIN® 80/55 (B) ET DU SIROP DE GLUCOSE 545 (A) PAR UN EXTRAIT PANCRÉATIQUE HUMAIN.

(1) *Témoin enzyme*; (2) *Témoin substrat*; *hydrolysats après 1 heure (3), 4 heures (4), 24 heures (5), 48 heures (6), d'incubation à 37° C.*

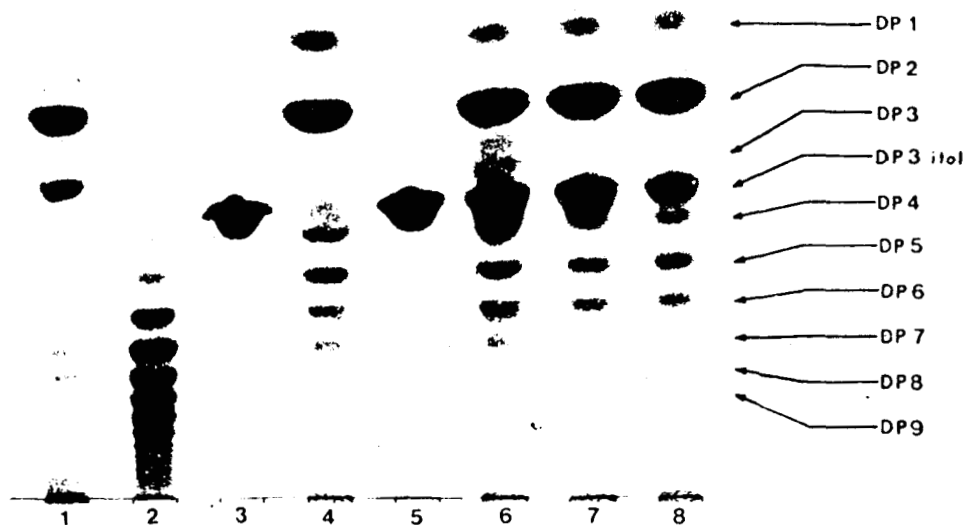


FIGURE 26 : ACTION DU MALTOTRIITOL SUR L'HYDROLYSE
DE MALTOOLIGOSACCHARIDES PAR L' α -AMYLASE
PANCRÉATIQUE.

- (1) *Témoin sirop de glucose 545 - 0,85 p.100 (P/V).*
 (2) *Témoin maltooligosaccharides - 0,85 p.100.*
 (3) *Témoin maltotriitol - 0,42 p.100.*
 (4) *Témoin d'hydrolyse des maltooligosaccharides.*
 (5) *Témoin maltotriitol*
 (6) } *Hydrolyse des maltooligosaccharides en présence de quantités*
 (7) } *décroissantes de maltotriitol (0,41 p.100, 0,21 p.100, 0,1 p.100).*
 (8) }

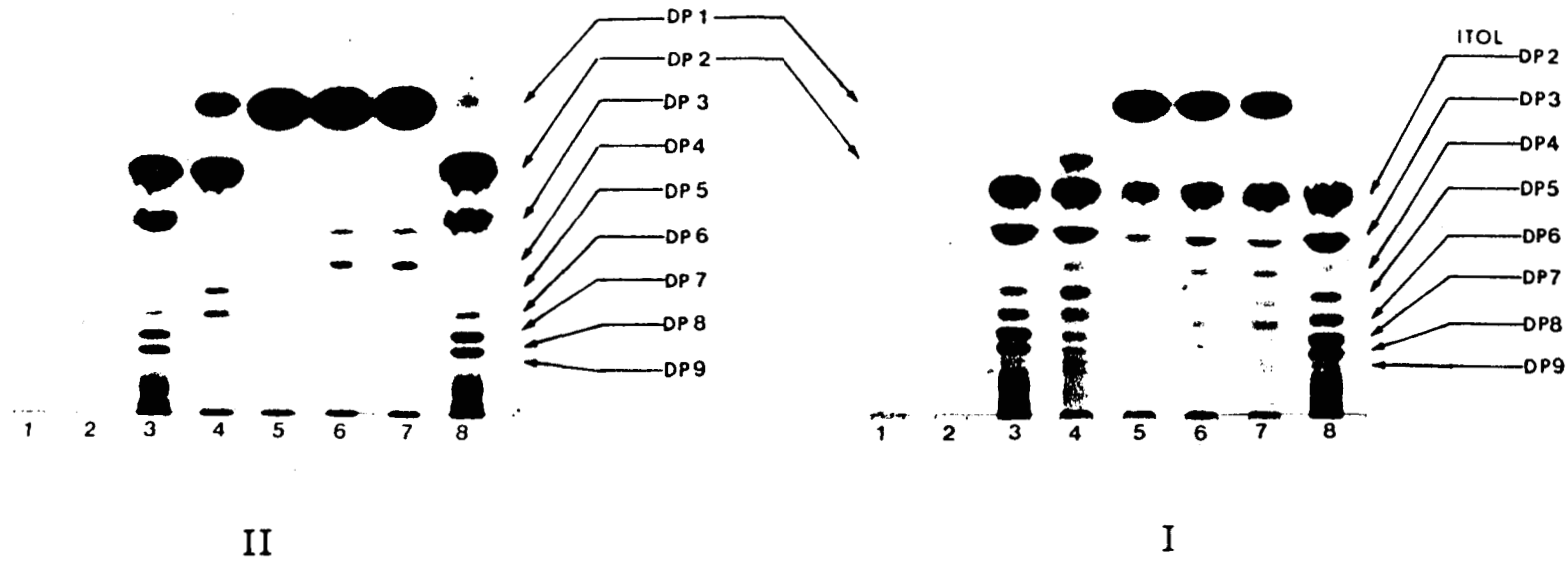


FIGURE 27 : HYDROLYSE DU LYCASIN[®] 80/55 ET DU SIROP DE GLUCOSE 545 (II) PAR L' α -AMYLASE PANCRÉATIQUE (A) ET LE COMPLEXE MALTASE / GLUCOAMYLASE (B)

(1) *Témoin α -amylase pancréatique : A*; (2) *Témoin maltase/glucoamylase : B*;
(3) et (8) *Témoin substrat; hydrolysats par A (4), par B (5), par A + B (6), par A puis par B (7).*

III) ACTION DE LA MICROFLORE INTESTINALE

ESSAIS PRELIMINAIRES SUR L'UTILISATION DU MALTITOL PAR

FLORE CAECALE

Ces essais préliminaires ont été entrepris pour 3 raisons principales :

- 1 - *Le dénombrement de la flore a montré un doublement de la population aerobie stricte et facultative contenue dans les fécés de rats nourris au lycasin® 80/55 par rapport à celles de rats normaux.*
- 2 - *Lorsqu'un rat est nourri avec du lycasin® 80/55, il passe par une période d'adaptation qui se traduit par l'augmentation du volume du caecum qui redevient normal par la suite.*
- 3 - *Au cours des études sur le complexe maltase/glucoamylase aucun phénomène d'adaptation enzymatique n'a pu être mis en évidence tant sur le plan potentiel d'hydrolyse que sur le plan des paramètres cinétiques.*

Le tableau XVIII page 89 , permet de suivre la dégradation des substrats et le développement de la population microbienne

Si on met en parallèle, le développement bactérien et l'utilisation des substrats, on peut remarquer que :

- *le glucose est très rapidement utilisé par une flore en croissance exponentielle.*
- *la population bactérienne se développe pratiquement de la même façon sur maltose et maltitol.*
- *le sorbitol parait être moins favorable à la croissance de la microflore caecale. Il faut cependant noter que le sorbitol produit par l'hydrolyse du maltitol est utilisé au fur et à mesure de son*

TABLEAU XVIII: UTILISATION DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS PAR LA
 MICROFLORE CAECALE DE RAT

	GLUCOSE		SORBITOL		MALTOSE		MALTITOL	
	% ⁽¹⁾	ATP ⁽²⁾	%	ATP	%	ATP	%	ATP
T0	100	20	100	30	100	25	100	25
T1	85	230	85	340	85	365	85	225
T2	< 1	2500	60	350	30	500	20	2000
T3	≈ 0	25	60	720	8	1200	3	2400
T4	≈ 0	50	40	20	≈ 0	2500	≈ 0	2600

(1) : substrat résiduel en pourcentage par rapport à la quantité initiale présente dans le milieu

(2) : Concentration en A.TP. présent dans le milieu exprimée en 10^{-11} g.ml⁻¹

- T0 - avant ensemencement
- T1 - juste après
- T2 - Après 3 jours de culture
- T3 - Après 1 semaine
- T4 - Après 2 semaines

apparition. Il est possible que le sorbitol ne permette pas une croissance identique à celle provoquée par le glucose ; par contre il serait normalement utilisé par une flore en développement.

IL s'agit ici d'essais préliminaires, il serait donc hâtif d'apporter des conclusions définitives à partir de ces résultats. Il serait, par contre, intéressant de poursuivre cette étude de façon à déterminer si la présence de sucres hydrogénés induit le développement d'une flore particulière.

Il s'agirait alors de caractériser les souches induites et de déterminer les produits de dégradation du maltitol avec en parallèle une étude de la flore caecale de rats nourris au lycasin® 80/55.

CONCLUSIONS

a) Le complexe maltase/glucoamylase isolé à partir de la bordure en brosse de l'intestin de rat, a été purifié 145 fois. Jugé homogène en électrophorèse, il présente un arc unique de précipitation en immunoelectrophorèse.

- Dans un premier temps, la similitude du comportement chromatographique des activités maltase et "maltitol-hydrolase" ainsi que l'identité des paramètres enzymatiques (pH optimum, masse moléculaire, point isoélectrique, stabilité à la température), ont permis d'affirmer que ces 2 activités sont portées par le même support protéique. Les résultats cinétiques obtenus, lors des expériences d'hydrolyse en présence de 2 substrats (maltose et maltitol) et lors des réactions d'inhibition, montrent que maltose et maltitol sont dégradés par le complexe maltase/glucoamylase au niveau d'un même site de catalyse.

- L'activité de ce complexe se trouve réparti le long de l'intestin. Il existe cependant des zones où la quantité d'enzyme est plus importante. Nous n'avons pas réussi, par les techniques de localisation en immunofluorescence, à démontrer si ces zones étaient constantes ou s'il s'agissait d'une répartition aléatoire liée à la biosynthèse des cellules de la bordure en brosse.

b) Le complexe maltase/glucoamylase possède une large spécificité d'action sur les substrats possédant des liaisons α -(1 → 4)-glucosidiques.

- L'affinité et la vitesse maximale de réaction vis-à-vis du maltitol sont respectivement 10 et 20 fois plus faibles que celles du maltose..

- Par contre, en ce qui concerne les polymères supérieurs, la présence d'une fonction alcool n'a pas d'influence sur les paramètres cinétiques. De plus, les maltooligosaccharides semblent avoir un effet activateur sur la dégradation du maltitol. Ce phénomène peut être ex-

pliqué par le fait que les polymères supérieurs possèdent une conformation très voisine des substrats naturels et permettent ainsi une meilleure association avec le complexe enzymatique. La probabilité d'avoir une bonne orientation est très largement diminuée dans le cas du maltitol.

c) D'un point de vue plus métabolique, le rat possède le potentiel enzymatique nécessaire à la dégradation du maltitol et du lycasin® 80/55.

- En effet, des essais de digestion in vitro, ont montré que le maltitol est hydrolysé par le complexe maltase/glucoamylase à 85 p.100 en 48 heures. Il faut cependant reconnaître que cette hydrolyse est nettement plus faible que celle du maltose (respectivement 32 et 100 p.100 en 8 heures). Il apparait de ce fait difficile d'affirmer, comme l'ont fait certains auteurs (79,80), que le maltitol est acalorique.

- Quant à la dégradation du lycasin® 80/55, les polymères supérieurs sont rapidement hydrolysés; l'étape limitante se situant au niveau du maltitol qui nécessite un temps d'hydrolyse plus long.

- Par ailleurs, des essais préliminaires ont permis de constater que l' α -amylase pancréatique décompose le lycasin® 80/55 en maltose et en polymères supérieurs hydrogénés ou non. Il n'existe cependant pas de synergie entre α -amylase et complexe maltase/glucoamylase dans la dégradation in vitro du lycasin®, le complexe maltase/glucoamylase étant capable d'effectuer la totalité de l'hydrolyse.

d) Enfin, nous avons pu montrer que le rat axénique possède pratiquement le même potentiel de dégradation du maltitol et du lycasin® 80/55 que le rat normal.

Cela implique, que l'hydrolyse du maltitol n'est pas exclusivement réalisé par la microflore intestinale (95).

Il faut cependant ajouter, que la flore caecale de rat semble capable d'utiliser le maltitol en tant que source carbonée.

Ainsi, au cours des différentes expériences effectuées, nous avons pu constater que la dégradation du lycasin® 80/55 présente de nombreuses

similitudes avec celle de l'amidon. Mais les résultats obtenus soulèvent d'autres problèmes relevant à la fois de la recherche fondamentale et appliquée.

- D'une part, dans le cadre du secteur biochimique, il reste à étudier la conformation du complexe maltase/glucoamylase. Il serait intéressant de comparer cette structure à celle, déjà connue, du complexe saccharase/isomaltase. Cette étude permettrait de savoir s'il y a des sous-unités et s'il existe vraiment une activité maltase différente de l'activité glucoamylase comme le préconise certain auteur (145).

- D'autre part, dans le cadre du secteur microbiologique, il serait utile de connaître le rôle exact joué par la microflore intestinale. Lorsque l'alimentation renferme des produits hydrogénés, la microflore intestinale, adapte-t-elle son potentiel enzymatique ou subit elle des variations de composition ?

Enfin d'un point de vue physiologique, les résultats que nous avons obtenus chez le rat sont ils un cas particulier ou une règle générale ? Il faudrait étendre cette étude à d'autres animaux.

BIBLIOGRAPHIE

==:==:==:==:==:==:==:==:==:==:==

- | | <u>PAGE</u> |
|--|-------------|
| - 1 - ALPERS, D.H. et TEDUSCO, F.J., <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , (1975), <u>401</u> , 28- 40 | 19 |
| - 2 - AMINOFF, C., in <i>Sugar in Nutrition</i> , SIPPLE et Mc NUTT (Eds), Acad. Press N.Y., (1974), PP : 136-145 | 14 |
| - 3 - ASADA, S., SHIMMEI, H., TSUCHIDA, E. et MATSUOKA, Y., <i>Nutrition et Alimentation</i> , (1972), <u>25</u> , 703 - 708 | 17-12 |
| - 4 - AURICCHIO, S., RUBINO, A., TOSI, R., SEMENZA, G., LANDOLT, M., KISTLER, H. et PRADER, A., <i>Enzymol. Biol. Clin.</i> , (1963), <u>3</u> , 498-507 | 19 |
| - 5 - AURICCHIO, S., SEMENZA, G. et RUBINO, A., <i>Biochim. Biophys. Acta</i> , (1965), <u>96</u> , 498 - 507. | 19 |
| - 6 - BENSON, R.L., SACKTOR, B. et GREENAWALT, J.W., <i>J. Cell. Biol.</i> , (1971), <u>48</u> , 711 | 17 |
| - 7 - BERCY, P., <i>Cah. Nut. Diet</i> , (1980), XV, 51 - 59 | 12 |
| - 8 - BERGMEYER, H.V., in "Methods of enzymatic analysis", Acad. Press N.Y., 2nd Edition, (1965), PP 117 - 123 | 31 |
| - 9 - BERMEYER, H.V., in "Methods of enzymatic analysis, Acad. Press N.Y., 2nd Edition, (1965), PP 167 - 170 | 32 |
| - 10 - BERNFELD, P., DUCKERT, F. et FISCHER, M., <i>Helv. Chim. Acta</i> , (1950), <u>33</u> , 1064 - 1070 | 15 |
| - 11 - BERNFELD, P., <i>Advances in enzymology</i> , (1951), <u>12</u> , 319 - 324 | 15 |

- 12 - BERNIER, J.J., *Physiologie de la digestion*, DOIN Ed., (1980) 12
- 13 - BIRCH, G.G., *Communication personnelle*, (1980) 14
- 14 - BIRKHED, D., WICKHOLM, H. et FROSTELL, G., *Odont. Revy*, (1975), 26, 7 - 16 10
- 15 - BIRKHED, D., *Caries Res.*, (1978), 12, 128 - 136 10
- 16 - BIRKHED, D. et SKUDE, G., *Scand. J. Dent. Res.*, (1978), 86, 248 - 258 10
- 17 - BIRKHED, D., EDWARDSSON, S., AHLDEN, M.R. et FROSTELL, G., *Acta Odontol. Scand.*, (1979), 37, 103 - 115 10
- 18 - BJÖRLING, S., FROSTELL, G. et DALHQVIST, A., *Acta Odontol Scand.*, (1971), 29, 31 - 41 14
- 19 - BLAIR, D.G., YAKIMETS, W. and TUBA, J., *Can. J. Biochem. Physiol.*, (1963), 95, 413 - 419 18-22-17
- 20 - BØG - HANSEN, T.C., PRAHL, P. et LOWENSTEIN, H., *J. Immunol. Methods*, (1978), 22, 293 - 307 35
- 21 - BÖRGSTROM, B., DAHLQVIST, A., LUNDH., G. et SJÖVALL, J., *J. Clin. Invest.*, (1957), 36, 1521 17
- 22 - BORGSTROM, B. et DAHLQVIST, A., *Acta Chem. Scand.*, (1958), 12, 1997 17
- 23 - BOUSSINGAULT, I., *Ann. Chim. Phys.*, (1872), 26, 376 5
- 24 - BRADFORD, M., *Anal. Biochem.*, (1976), 72, 248 34
- 25 - BRAUN, H., COGOLI, A. et SEMENZA, G., *Eur. J. Biochem.*, (1975), 52, 475 - 480 19

- 26 - BRUNNER, J., HAUSER, H. et SEMENZA, G., *J. Biol. Chem.*, (1978), 253, 7538 - 7546 21
- 27 - CATALA, J. et BONNAFOUS, R., *Digestion*, (1982), 24, 234 - 240 19
- 28 - CEZARD, J.D., CONKLIN, K., DAS, B. et GRAY, G., *J. Bio. Chem.*, (1979), 254, 8969 - 8975 19
- 29 - CHANG, G.W., FUKUMOTO, H., GYORGY, C.P., BLOCK, A.B., KRETSCH, M.J. et CALLOWAY, D.H., *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, (1979), 38, 767 - 789 24
- 30 - CHIBA, S., KUNG, C.K.M. et GOLWASSER, E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (1972) 47, 1372 - 1377. 29
- 31 - CONKLIN, K., YAMASHIRO, K. et GRAY, G., *J. Biol. Chem.*, (1975), 250, 5735 - 5741 19
- 32 - CRANE, R.K., *Physiol. Rev.*, (1960), 40, 789 - 825 12
- 33 - CUMMINGS, J.H., *Proceedings of the Nutrition Society*, (1984), 43, 35 - 44 24
- 34 - DAHLQVIST, A., *Biochem. J.*, (1961), 78, 282 19
- 35 - DAHLQVIST, A. et BORGSTROM, B., *Biochem. J.*, (1961), 81, 411 - 418 18-17
- 36 - DAHLQVIST, A., *J. Clin. Invest.*, (1962), 41, 463 18-19
- 37 - DAHLQVIST, A., *Gastroenterology*, (1962), 43, 694 20
- 38 - DAHLQVIST, A., AURICCHIO, S., SEMENZA, G. et PRADER, A., *J. Clin. Invest.*, (1963), 42, 556 18
- 39 - DAHLQVIST, A. et THOMSON, J., *Acta Physiol. Scand.*, (1963), 59, 111 - 125 18
- 40 - DAHLQVIST, A. et TELENIOUS, V., *Acta Physiol. Scand.*, (1965), 63, 156 - 163. 17

- 41 - DAHLQVIST, A. et NORDSTROM, C., *Biochim. Biophys. Acta*, (1966), 113, 19
624
- 42 - DAHLQVIST, A., in "Methods in enzymology", vol 8, (1966), 19
P 484 - 591, Acad. Press N.Y
- 43 - DEREN, J.J., BROITMAN, S.A. et ZANCHECK, N., *J. Clin. Invest.*, 22
(1967), 46, 186 - 195
- 44 - DIXON, M. et WEBB, E.C., in "Enzymes" (1964), P 315 - 359, 44
Longmans Greens and Co Ltd Ed.
- 45 - DRASAR, B.S. et HILL, M.J., in "Human intestinal microflora," Acad. 24
Press. N.Y., (1974), PP 54 - 71
- 46 - DUCLUZEAU, R., BELLIER, M. et RAIBAUD, P., *Zbl. Bakt. I. Abt.* 22
Orig., (1970), 213, 533
- 47 - DUCLUZEAU, R., RAIBAUD, P., DUBOS, F., CLARA, A. et LHUILLERY, 24
C., *Amer. J. clin. Nutr.*, (1981), 34, 520
- 48 - DWIOEBI, B., in "Carbohydrates an Health", chap 3, HOOD L. WARDRIP 3
and BOLLENBACK ed. N.Y., (1977)
- 49 - EICHHOLZ, A., *Biochim. Biophys. Acta*, (1968), 163, 101 - 107 17
- 50 - EICHHOLZ, A., *Fed. Proc. and Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, (1969), 17
28, 30
- 51 - FISCHER, E. et STAHEL, R., *Ber.*, (1891), 24, 538 5
- 52 - FLANAGAN, P. et FORSTNER, G., *Biochem. J.*, (1978), 173, 553 - 564 19
- 53 - FORSTER, H., NOOS, K. et ZIEGE, M., *Communication personnelle*, 14
(1975).
- 54 - FORSTER, H., in "Xylitol", *Applied Science (Eds), Counsell Ed.* 12
London, (1978), PP 48 - 54

- 55 - FORSTER, H. *Communication personnelle*, (1978) 15-10
- 56 - FORSTER, H. et MEHNERT, H., *Akt. Ernährungsmedizin*, (1979), 5, 12
245
- 57 - FORSTER, G., *Biochem. J.*, (1971), 121, 781 - 789 17
- 58 - FORSTNER, G., SALVATORE, A. et LEE, L., *Can. J. Biochem.*, 19
(1982), 60, 1007 - 1013
- 59 - FOSSATI, P., ASFOUR, M., ROMON, M. et BONNETERRE, J., *Communi-* 14
cation personnelle (1976)
- 60 - FOSSATI, P., ASFOUR, M., ROMON, M. et BONNETERRE, J., *Communi-* 14
cation personnelle, (1978)
- 61 - FRIEND, D. et CHANG, G., *J. Med. Chem.*, (1984), 27, 261-266 24
- 62 - FROSTELL, G., HEYES, P.H. et LARSON, R.H., *J. Nutr.*, (1967), 10
93, 65 - 76
- 63 - FROSTELL, G. et BIRKHED, D., *Caries Res.*, (1978), 12, 256-263 10
- 64 - GALANO, G. et FORSTNER, G., *Biochem. J.*, (1974), 144, 281-292 19
- 65 - GARTNER, H., ZUNFT, H.J., SCHULZE, J., MULLER, W. et GRÜTTE, 14
F.K., *Folia Microbiol.*, (1979), 24, 44 - 46
- 66 - GITZELMANN, R., BACHI, T., BINZ, H., LINDENMANN, J. et SEMENZA, 19
G., *Biochim. Biophys. Acta*, (1970), 196, 20 - 28
- 67 - GRACEY, M., THOMAS, J. et HOUGHTON, M., *Aust. N.Z.J. Med.*, 22
(1975), 5, 141 - 144
- 68 - GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A., *Biochim. Biophys. Acta*, (1955), 17, 35
65 - 67
- 69 - HAWKSWORTH, G., DRASAR, B.S. et HILL, M.J., *J. Med. Microbiol.*, 24
(1971), 4, 451 - 453

- 70 - HERS, H.G., *Biochim. Biophys. Acta.*, (1959), 37, 227 - 232 12
- 71 - HOSOYA, N., in *Proc. 9 th. Int. Congr. Nutrition*, (1972),
I, P 164 - 168 14
- 72 - IITOYO, N., MORIUCHI, S. et HOSOYA, N., *J. Jap. Soc. Food
and Nutr.*, (1974), 27, 77 - 89 14
- 73 - IMFELD, Th. et MUHLEMANN, H.R., *Journal of Preventive Dentistry*,
(1977), 4, 8 - 4 10
- 74 - IMFELD, Th. et MUHLEMANN, H.R., *Caries Res.*, (1978), 12,
262 - 263 10
- 75 - INAGAKI, O., MORI, H., SHIMOMURA, R., INOVE, S. et FUJITA, Y.,
Nephron, (1982), 30, 345 - 347 22
- 76 - INOVE, Y., MORIUCHI, S. et HOSOYA, N., *Nutrition and Food*,
(1970), 23, 625 17
- 77 - JONES, S.F., *Tropical Development and Research Institutè*,
(1983), 173 3
- 78 - KACZMAREK, J. et ROSENMUND, H., *Clin. Chim. Acta*, (1977) 79,
69 - 73 22-15
- 79 - KAMOI, *Igaku-NO- Ayumi*, (1972), 82, 208 93-14
- 80 - KAMOI, SHIMIZU, et KAWAUHI, *Igaku-no-Ayumi*, (1972), 82, 355 93-14
- 81 - KEARSLEY, M.W., BIRCH, G.G. et LIAN-LOH, R.H.P., *Starch*,
(1982), 34, 279-283 15
- 82 - KELLY, et ALPERS, *Biochim. Biophys. Acta*, (1973), 315, 113-120 57-19
- 83 - KENNY, A.J. et MAROUX, S., *Physiol. Rev.*, (1982), 62, 91 - 128 17
- 84 - KERCKAERT, J.P., *Anal. Biochem.*, (1978), 84, 354 - 360 34

- 85 - KOLDOVSKY, O., GASPARD, M. et LAU, H., *Fed. Proc.*, (1980), 39, 500 22
- 86 - KOLINSKA, J. et SEMENZA, G., *Biochim. Biophys. Acta*, (1967), 146, 181 - 195 19
- 87 - KOLINSKA, J. et KRAML, J., *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 284, 235 - 247 20-19
- 88 - LARNER, J. et Mc NICKLE, C.M., *J. Amer. Chem. Soc.*, (1954), 76 18
47
- 89 - LARNER, J. et Mc NICKLE, C.M., *J. Biol. Chem.*, (1955), 215, 723 18
- 90 - LEDERER, J., DELVILLE, P. et CREVECOEUR, E., *La Sucrierie Belge*, (1974), 93, 311 - 319 14
- 91 - LEE, L., SALVATORE, A., FLANAGAN, P. et FORSTNER, G., *Biochem J.*, (1980), 187, 437 - 446 17
- 92 - LE MOAN, G., *Bulletin national des pharmaciens*, (1983), 261, 1 - 6 5
- 93 - LEROY, P. in "Guggenheim Health and Sugar Substitutes", (1979), KARGER and BASEL Ed., PP 114 - 119 14
- 94 - LEVANTI, G., FEHLMANN, M., STARITA-GERIBALDI, M. et SUDAKA, P., *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, (1978), 18, 1155 - 1159 20
- 95 - LIAN-LOH, R. et BIRCH, G., *Br. J. Nutr.*, (1982), 48, 477-481 93-54-14
- 96 - LINEWEAVER, H. et BURK, D., *J. Amer. Chem. Soc.*, (1934), 56, 568 - 666 37

- 97 - LOUVARD, D., MAROUX, S., VANNIER, C. et DESNUELLE, P., *Biochim. Biophys. Acta*, (1975), 375, 236 - 248 26-17
- 98 - LOUVARD, D., MAROUX, S. et DESNUELLE, D., *Biochim. Biophys. Acta*, (1975), 389, 385 - 400 17
- 99 - MAESTRACCI, *Biochim. Biophys. Acta*, (1976), 433, 469 - 481 17
- 100 - MAIN, M., KARE, M.R. et INGLE, D.E., *J. Nutr.*, (1977), 107, 1652 - 1658 2
- 101 - MALHOTRA, O. et GEORGE, P., *Indian J. Med. Res.*, (1964), 52, 68 - 74 20
- 102 - MALHOTRA, O. et GEORGE, P., *Indian J. Med. Res.*, (1965), 53, 410 - 416 20
- 103 - MARA, D. et ORAGUI, J., *J. Appl. Bacteriology*, (1983), 55, 349 - 357 24
- 104 - MARSCHALL, J., STURGEON, C. et WHELAN, W., *Anal. Biochem.*, (1977), 82, 435 - 444 17
- 105 - MAROUX, S. et LOUVARD, D., *Biochim. Biophys. Acta*, (1976), 419, 189 - 195 19
- 106 - MEYER, P., in "Physiologie humaine", (1977), vol 1, P 197- 204, Flammarion Medecine Sciences Ed. 22
- 107 - MILLER, D. et CRANE, R., *Biochim. Biophys. Acta*, (1961), 52, 293 - 319 17
- 108 - MIYAKAWA et KAWANURA, *Medecine and Biology*, (1978), 96, 427 15
- 109 - MUHLEMANN, H.R., *Communication personnelle*, (1969) 10
- 110 - O'BRIEN, M., SCHOFIELD, P. et EDWARDS, M., *Biochem J.*, (1983), 211, 81-90 17

- 111 - OKU, T., INOUE, Y. et HOSOYA N. J. Jap. Soc. Food and Nutr., (1971), 24, 305 - 404 14
- 112 - OKU T., HIM, et HOSOYA, N., J. Jap. Soc. Food and Nutr. (1981), 34, 17-14
- 113 - OMICHI, K. et IKENAKA, T., J. Biochem., (1983), 94, 1757 - 1802 17
- 114 - OUCHTERLOHY, O., Acta Pathol. Microbiol. Scand., (1949), 26, 507 35
- 115 - PARRISH, F., SMITH, E. et WHELAN, W., Biochem. Biophys. Acta, (1970), 137, 185 15
- 116 - PELISSIER, J.P. et DUBOS, F., Reprod. Nutr. Develop., (1983) 23, 29 24
- 117 - RAIBAUB, p. et DUCLUZEAU, R., La recherche, (1984), 15, 12 -21 22
- 118 - RAUL, F., NORIEGA, R., DOFFOEL, H., GRENIER, J. et HAFFEN, K., Enzyme, (1982), 28, 328 - 335 22
- 119 - REDDY, B. et WOSTMANN, B., Arch. Biochem. Biophys., (1966), 113, 609, 616 19
- 120 - REDDY, B., PLEASANTS, J. et WOSTMANN, B., J. Nutr., (1968), 95, 413 - 419 19
- 121 - RENNARD, H. et BIANCHINE, J., J. Agric. Food Chem., (1976), 24, 288 - 291 95-15-14
- 122 - ROBYT, J. et DEXTER, F., J. Biol. Chem., (1970), 245, 3917 - 3927 16-15
- 123 - ROQUE, J. Biofutur, (1984), 22, 19 - 31 5
- 124 - ROSENSWEIG, N. et HERMAN, R. J. Clin. Invest., (1968), 47, 2255 - 2262 22

- 125 - RUSSEL, J., YOUNG, A. et JURGFENSEN, N., *J. Anim. Sci.* (1981), 52, 1177 - 1182 15
- 126 - SAITO, N., HORIUCHI, T., YOSHIDA, M. et IMAI, T., *Clin. Chim. Acta*, (1979), 97, 253 - 260 16-15
- 127 - SAITO, N. et HORIUCHI, T., *Carbohydr. Res.*, (1981), 96, 138 15
- 128 - SANKARAN, K., SIVAKAMI, S. et RADHAKRISHMAN, A., *Biochem. J.*, (1983), 213, 719 - 725 19
- 129 - SCHEIDEGGER, J., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, (1955), 7, 103 35
- 130 - SCHLEGEL-HAUETER, S., HORE, H., KERRY, A., et SEMENZA, G., *Biochim. Biophys. Acta*, (1972), 258, 506 - 519 19
- 131 - SCHELL-DOMPERT, E. et SIEBERT, G., *Physiol. Chem.*, (1980), 361, 1069 - 1075 12
- 132 - SCHMITZ, J., PREISER, H., MAESTRACCI, D., GHOSH, B., CERDA, J. et CRANE, R., *Biochim. Biophys. Acta*, (1973), 323, 98- 112 17
- 133 - SEMENZA, G., et AURICCHIO, S., *Biochim. Biophys. Acta*, (1962), 62, 173 19
- 134 - SEMENZA, G., in "Intestinal permeation", Karamer M. et LAUTERBACH F. Eds, *Excerpta Medica Amsterdam*, (1977). 21
- 135 - SEMENZA, G., in "Preceedings of the 12 th. Febs meeting, Dresden, RAPAPORT S. et SCHEWE T. Eds, *Pergamon Press - Oxford*, (1978), 53, 21 - 28 21
- 136 - SEMENZA, G., *Ciba Found. Symp. 70*, *Elsvier/north - Ed.* (1979), P. 133 - 146 21

- 137 SEMENZA, G., in "The enzymes of biological Membranes", 19
A. Martonosi Eds, Plenum Press. N.Y., (1980), 349- 360
- 138 - SEMENZA, G. in "Carbohydrate metabolism and its disorders, 21
PKJ. RANDLE eds., Acad. Press N.Y., (1981) Vol 3.
- 139 - SHIAU, S.Y. et CHANG, G.W., J. Nutr., (1983), 113, 136-151 24
- 140 - SICARD, P.J., in "Nutritive Sweeteners", BIRCH G. and PARKER 3-6
K. Eds, Applied Science - publishers London, (1982), 145-170
- 141 - SIDMONS, R., Biochem. J., (1968), 108, 839 19
- 142 - SIDMONS, R., Biochem. J., (1970), 116, 71 -78 17
- 143 - SIVAKAMI, S. et RADHAKRISHNAN, A., Biochem. J., (1976), 153, 19
321- 327
- 144 - SJÖSTRÖM, H., NOREN, O. et CHRISTIANSEN, L., J. Biol. Chem., 18-19
(1980), 255, 11332 - 11338
- 145 - SJÖSTRÖM, H., NOREN, O., DANIELSEN, E. et SKOVBJERG, H., in 54-19-17
"Brush Border membranes", Ciba Foundation Symposium 95,
PITMAN Ed., (1983), P 50 - 72
- 146 - SKOVBJERG, H., SJÖSTRÖM, O. et NOREN, O., Elsevier/North-holland. 18-19
Biomédical Press, (1979), 108, 399 - 402
- 147 - SORENSEN, H., NOREN, O., SJÖSTRÖM, H. et DANIELSEN, E., 18-19
Eur. J. Biochem, (1982), 126, 559 - 568
- 148 - TAKAI, Y., MINE, A. and IWAQ, H., Conférence du 35ème congrès 14
de la société d'hygiène alimentaire du Japon. (1978), TOKYO
- 149 - TAKESUE, Y., J. Biochem., (1969), 65, 545 - 552 19

- 150 - TAKESUE, Y. et KASHIWAGI, J. *Biochem.*, (1969), 65, 427 - 435 19
- 151 - TREMOLIERES J., *Nutrition et physiologie*, DUNOD Ed., (1973) 2
- 152 - TSUBOI, K., KWONG, L., BURRIL, P. et SUNSHINE, P., *J. Membrane Biol.*, (1979), 50, 101 - 122 17
- 153 - TSUBOI, K., SCHWARTZ, S., BURRIL, P., KWONG, L. et SUNSHINE, P., *Biochim. Biophys. Acta*, (1979), 554, 234 - 248 19
- 154 - UGOLEV, A.M., *Physiol. Rev.*, (1965), 45, 555 17
- 155 - VAALER, S., HANSEN, K. et AAGENAES, *Acta Med. Scand.*, (1980) 207, 371 - 373 3
- 156 - VAITUKAITIS, J. ROBBINS, J. NIESCHLAG, E. et ROOS, T., *J. clin. Endocr. Metab.*, (1971), 33, 988 - 991 34
- 157 - VERWAERDE, F., LELEU, J.B. et HUCHETTE, M., *Swiss patent N° 109 72179*, (Déc 1979) 10
- 158 - VESTERBERG, et BERGGREN, *arkiv for kemi*, (1966), 27, 119 36
- 159 - WACKERT, H., AGGELER, R., KRETCHMER, N., O'NEIL, B., TAKESUE, Y. et SEMENZA, G., *J. Biol. Chem.*, (1984), 259, 4878 - 4884 19
- 160 - WELSH, J. and WALKER, A. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* (1965) 120, 525 - 527 20-19
- 161 - WILSON, T., in "Intestinal Absorption", SAUNDERS Ed., (1962), P 69 - 82 12
- 162 - WÜRSCH, P. et DEL VEDOVO, S., *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, (1981), 51, 161 - 165 84-15-12
- 163 - WÜRSCH, P. et KOELLREUTTER, B., *Caries Res.*, (1982), 16, 90 - 95 84-10

- 164 - YAMADA, K. et MORIUCHI, S. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 1979, 25, 543 - 552 19
- 165 - YOSHIZAWA, S., MORIUCHI, S. et HOSOYA, N., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, (1975), 21, 31 - 37 17
- 166 - ZUNFT, H., SCHULZE, J., GARTNER, H. et GRUTTE, F., *Ann. Nutr. Métab.*, (1983), 27, 470 - 476 14
- 167 - *Les cahiers techniques de la F.A.O.*, (1980), 15, 2
(les glucides en nutrition humaine).

