

## Absorption digestive du fer lié au caséinophosphopeptide 1-25 de la $\beta$ -caséine

JM Peres<sup>1</sup>, S Bouhallab<sup>2</sup>, F Bureau<sup>3</sup>, JL Maubois<sup>2</sup>,  
P Arhan<sup>1</sup>, D Bouglé<sup>1, 4\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de physiologie digestive et nutritionnelle, CHU de Caen, F-14033 Caen cedex ;

<sup>2</sup> Laboratoire de recherches de technologie laitière, Inra, 65, rue de Saint-Brieuc,  
35042 Rennes cedex ; <sup>3</sup> Laboratoire de biochimie A, CHU de Caen, F14033 Caen cedex ;

<sup>4</sup> Service de pédiatrie A, CHU de Caen, F14033 Caen cedex, France

(Reçu le 8 janvier 1997 ; accepté le 18 avril 1997)

### Summary — Digestive absorption of iron bound to the 1–25 caseinophosphopeptide of $\beta$ -casein.

We investigated the digestive absorption of iron using an isolated, perfused rat intestinal loop. Iron bound to the 1–25 caseinophosphopeptide of  $\beta$ -casein ( $\beta$ -CN (1–25)) was compared to iron gluconate. Half of the animals were bled to induce an acute iron deficiency, which enhances iron absorption; the protective effect of  $\beta$ -CN (1–25) against the calcium inhibition of iron absorption was tested as well. In the control or anemic groups, iron disappearance from digestive lumen was higher in the  $\beta$ -CN (1–25) than in the gluconate group. In control animals the amount of iron stored was lower in  $\beta$ -CN (1–25) animals than in animals perfused with gluconate, while both groups of anemic animals also displayed lower enterocyte retention than control animals. As a result, the net iron absorption was higher in animals perfused with  $\beta$ -CN (1–25) than with gluconate, whether the animals were iron depleted or not. Addition of calcium to the perfused solution decreased iron absorption, however, this decrease was significantly reduced in  $\beta$ -CN (1–25) groups. The increased solubility of iron bound to  $\beta$ -CN (1–25) could explain these results, in association with enhancement of the mucosal transfer of iron taken up by the enterocyte.

### iron / digestive absorption / caseinophosphopeptide / $\beta$ -CN (1–25)

**Résumé** — L'absorption digestive du fer lié au 1-25 caséinophosphopeptide issu de la  $\beta$ -caséine ( $\beta$ -CN [1-25]) a été comparée à celle du gluconate de fer par le modèle d'intestin perfusé isolé, vascularisé de rat, à l'état basal et dans deux conditions connues pour augmenter l'absorption du fer (saignée) ou l'inhiber (présence de calcium). Chez l'animal normal ou après saignée, la disparition du fer de la lumière intestinale du groupe  $\beta$ -CN (1-25) est supérieure à celle du groupe gluconate. Chez l'animal normal, la rétention entérocytaire du fer est plus faible dans le groupe  $\beta$ -CN (1-25) que

\* Correspondence and reprints

dans le groupe gluconate. Après saignée, elle est semblable dans les deux groupes et est significativement inférieure à celle des animaux normaux. En conséquence, chez les animaux normaux ou anémiques, l'absorption nette est plus élevée dans les groupes  $\beta$ -CN (1-25) que dans les groupes perfusés avec du gluconate. La fixation du fer au  $\beta$ -CN (1-25) limite significativement l'effet inhibiteur du calcium sur son absorption, chez l'animal contrôle et anémique. Ces résultats semblent dus à la protection intraluminaire apportée au fer par sa liaison au  $\beta$ -CN (1-25) soluble, associée à une modification du transport entérocytaire du fer capté.

### fer / absorption digestive / caséinophosphopeptide $\beta$ -CN (1-25)

## INTRODUCTION

La carence en fer est la première cause mondiale de carence nutritionnelle (Hercberg et al, 1991). Elle est responsable d'anémie, perturbe l'immunité et le développement psychomoteur (Walter et al, 1989). La prévention et la correction de la carence en fer sont rendues difficiles par la faible absorption des différentes formes de fer non héminique et son extrême variabilité en présence des différents constituants de l'alimentation ; en particulier, l'inhibition exercée par le calcium semble responsable de la faible absorption du fer apporté par le lait de vache, comparé au lait humain (Barton et al, 1983 ; Cook et al, 1991 ; Hallberg et al, 1991). Classiquement, il est admis que seul le fer ferreux est absorbé par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques, alors que le fer ferrique forme des composés insolubles dans la lumière intestinale sous l'effet de l'alcalinisation duodénale (Conrad, 1993 ; Bothwell, 1995). Le fer entérocytaire est transféré dans l'organisme en fonction de ses besoins, quelle que soit son origine alimentaire.

Les protéines alimentaires influencent l'absorption du fer en relation directe avec la solubilité qu'elles lui confèrent (Slatkavitz et Clydesdale, 1988 ; Kim et al, 1995). L'absorption du fer est faible en présence des protéines du lait de vache (Hurrell et al, 1989), lorsqu'elles sont entières, mais leur hydrolyse enzymatique augmente leur solubilité et limite cet effet inhibiteur (Hurrell et al, 1989). Au cours de la digestion, l'hydro-

lyse des caséines libère des phosphopeptides fixant le calcium par leurs résidus phosphosériques (West, 1986 ; Baomy et Brulé, 1988). Le  $\beta$ -CN (1-25) issu de l'hydrolyse trypsique de la  $\beta$ -caséine est trouvé physiologiquement dans la lumière intestinale au cours de la digestion (Meisel et Frister, 1989 ; Naito et al, 1972). Il est lui-même partiellement résistant aux enzymes digestives et soluble dans le milieu intestinal (Sato et al, 1986 ; Bouhallab et al, 1991 ; Brommage et al, 1991). Les résidus phosphorylés des caséines fixent le calcium et le maintiennent à l'état soluble dans l'intestin (Sato et al, 1986 ; Yuan et Kitts, 1991) ; ils ont également la capacité de fixer d'autres cations divalents à la place du calcium, proportionnellement à leur degré de phosphorylation et en fonction du cation (Demott et Dincer, 1976 ; Brulé et Fauquant, 1982 ; West, 1986 ; Causeret, 1986 ; Bouhallab et al, 1991). Le  $\beta$ -CN (1-25) possède quatre des cinq phosphosérines de la protéine native : 1 mole peut fixer 4 moles de fer, avec une affinité 100 fois plus forte que pour le calcium (Bouhallab et al, 1991). De plus, cette liaison est résistante aux variations de pH (acide dans l'estomac puis alcalin dans le duodenum) du tube digestif (Causeret, 1986 ; Bouhallab et al, 1991 ; Brommage et al, 1991).

La stabilité et la solubilité conférées au fer par la fixation au  $\beta$ -CN (1-25) pourraient le protéger contre la précipitation par les interactions avec les autres nutriments et les variations des conditions intraluminales.

Chez l'animal carencé, le fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) permet une meilleure correction de l'anémie et des réserves hépatiques que le sulfate ferreux (Aït-oukhatar et al, 1997). Dans cette étude, cependant, le bilan métabolique réalisé pendant la période de réplétion n'a pas mis en évidence une meilleure absorption du fer lié au  $\beta$ -CN (1-25).

Le modèle de l'intestin isolé mais vascularisé permet de maîtriser les conditions intraluminales du tube digestif. Il a été utilisé pour comparer l'absorption intestinale de différentes formes de fer (sel métallique ou lié au  $\beta$ -CN [1-25]) chez des animaux ayant un statut normal en fer ou carencés par spoliation sanguine, en présence ou non de calcium, inhibiteur de l'absorption du fer.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les animaux de l'étude étaient des rats Sprague Dawley, femelles, adultes, pesant 250-300 g, recevant une alimentation standard (semi-synthétique) pour rats adultes. L'étude a été réalisée (le matin) sur des animaux à jeun depuis 12 heures. Huit groupes ( $n = 6$ /groupe) ont été étudiés, selon le statut en fer (normal ou carencé), le type de fer perfusé et la présence de calcium.

La carence en fer a été créée par deux ponctions rétroorbitaires réalisées à 24 heures d'intervalles dans les 48 heures précédentes, représentant 25 % du volume sanguin total.

La composition du liquide de perfusion est une adaptation de la solution de Ringer-Lavoisier, de pH ajusté à celui du duodénum proximal (pH 4,5), isotonique au plasma (osmolarité 285-300), contenant 5 mmol de fer. La source de fer était du gluconate de fer choisi en raison de sa solubilité aux pH supérieurs à 4 ou du fer fixé sur le  $\beta$ -CN (1-25). L'ajout de calcium a été fait avec du gluconate, à la concentration de 10 mmol.

Après anesthésie par kétamine (Kétalar<sup>R</sup>), qui ne perturbe pas la motricité digestive, il a été réalisé une numération-formule sanguine et une laparotomie permettant d'exposer l'intestin. La perfusion duodénale a été réalisée au moyen d'un cathéter inséré au niveau du pylore, le liquide effluent étant recueilli au niveau de l'angle de Treitz. L'ensemble des cathéters en polypropy-

lène et des flacons étaient rincés par du triton X100 pour supprimer toute contamination. Le liquide de perfusion, thermostaté par passage dans un bain marie, était perfusé au débit de 0,16 mL/min par une pompe péristaltique en évitant toute distension d'anse. Les volumes perfusés et recueillis à l'angle de Treitz ont été mesurés ; de plus, un marqueur non absorbable (polyéthylène glycol 4000) était ajouté afin de mesurer le flux liquidien net à travers la membrane intestinale. A l'issue des 2 heures de perfusion, l'animal était sacrifié au moyen d'une dose létale de Doléthol<sup>R</sup> ; l'intestin perfusé préalablement lavé par perfusion de sérum physiologique était prélevé et séché à l'étuve jusqu'à obtention d'un poids stable.

Le fer a été dosé au laboratoire de biochimie du CHU de Caen sur le liquide de perfusion, l'effluent et dans la muqueuse intestinale du segment perfusé (après digestion tissulaire par l'acide sulfurique à température ambiante pendant 24 heures), par spectrométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer 3030) en utilisant la solution de Ringer-Lavoisier comme blanc. Le polyéthylène glycol a été dosé dans le liquide de perfusion et l'effluent par turbidimétrie, suivant la technique de Hyden (1955).

La quantité de fer Q1 (mmol) disparue du milieu intraluminal pendant la durée de l'étude (2 heures dans tous les groupes) est calculée comme suit :

$$Q1 = \left( 1 - \frac{[\text{PEG}]^T}{[\text{PEG}]^E} * \frac{[\text{Fe}]^E}{[\text{Fe}]^T} \right) * D * t * [\text{Fe}]^T$$

où [PEG] et [Fe] représentent respectivement les concentrations du polyéthylène glycol et du fer dans le liquide perfusé (<sup>T</sup>) et l'effluent (<sup>E</sup>). D et t sont le débit de perfusion (mL/min) et le temps de recueil.

La quantité de fer Q2 (mmol) captée par la muqueuse intestinale pendant la durée de la perfusion est calculée comme suit :

$$Q2 = ([\text{Fe}]^M - [\text{Fe}]^{M0}) * P^M$$

avec <sup>M</sup> : segment de muqueuse intestinale perfusé pendant l'étude, prélevé après sacrifice de l'animal ; <sup>M0</sup> : segment de muqueuse intestinale perfusé avec un soluté dépourvu de fer ; P<sup>M</sup> : poids sec (g) de la muqueuse intestinale perfusée pendant l'étude et prélevée après sacrifice de l'animal.

La quantité de fer réellement absorbée (mmol) pendant la perfusion est :

$$\text{Fe}^{\text{Abs}} = \text{Q1} - \text{Q2}$$

### Préparation du 1-25 caséinophosphopeptide

La  $\beta$ -caséine était isolée d'un caséinate de sodium industriel (Armor Protéines, Saint-Brice-en-Coglès, France) par solubilisation à froid (pH 4,5 ; 4 °C). Le  $\beta$ -CN (1-25) était obtenu par hydrolyse trypsique de la  $\beta$ -caséine et précipitation du phosphopeptide par un mélange calcium/éthanol selon la méthode décrite par Adamson et Reynolds (1995), la fixation du fer étant obtenue par addition d'une solution de  $\text{FeCl}_2$  sur le  $\beta$ -CN (1-25). Le fer non lié était éliminé par ultrafiltration et diafiltration sur une membrane en cellulose régénérée à seuil de coupure de 3000 Da (membrane SIOY3, Amicon, Lexington, MA, États-Unis). Le complexe obtenu était ensuite lyophilisé. Le fer complexé ainsi que le calcium résiduel étaient dosés au laboratoire de technologie laitière par spectrométrie d'absorption atomique (Varian AA 1275). Une mole de peptides fixe 4 moles de fer. Un contrôle sans  $\beta$ -caséine était incubé et dialysé dans les mêmes conditions.

### Statistiques

Les paramètres de la numération formule sanguine, les quantités de fer disparues de la lumière, retenues par l'entérocyte et réellement absorbées ont été comparées par Anova suivie du test exact de Fischer sur « statView SE + Graphics™ », Abacus Concept, Inc. Au sein de chaque groupe (normal ou anémique, gluconate de fer ou  $\beta$ -CN [1-25]) l'inhibition exercée par le calcium a été exprimée en pourcentage de la moyenne des animaux du même groupe perfusés sans calcium. Ces pourcentages ont également été comparés par Anova et test de Fischer.

### RÉSULTATS

La spoliation sanguine sur la numération sanguine a entraîné une anémie significative ( $p < 0,05$ ) : l'hémoglobine était de 13,4 et 13,6 g/dL chez les rats normaux perfusés avec gluconate de fer ou le fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) respectivement (NS) et de 10,0 et 9,7 g/dL chez les rats saignés (NS).

Les résultats des perfusions sans calcium sont donnés dans le tableau I.

**Tableau I.** Effets de la liaison du fer au  $\beta$ -CN (1-25) sur son absorption par l'intestin isolé, perfusé de rat.

*Influence of binding Fe to  $\beta$ -CN (1-25) on its digestive absorption, using the isolated, vascularized rat loop model.*

	Rats contrôles		Rats carencés en fer		Anova
	Gluc Fe n = 14	Fe- $\beta$ -CN n = 6	Gluc Fe n = 6	Fe- $\beta$ -CN n = 6	
<b>Q1</b>	27,3 $\pm$ 4,0*	33,3 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	31,8 $\pm$ 2,8 <sup>a, b</sup>	36,8 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	$p = 0,0001$
<b>Q2</b>	1,6 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1 <sup>a, b</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a, c</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	$p = 0,0001$
<b>Fe<sup>Abs</sup></b>	25,7 $\pm$ 4,0	32,1 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	30,9 $\pm$ 2,9 <sup>a, b</sup>	34,9 $\pm$ 1,8 <sup>a</sup>	$p = 0,0001$

\* moy  $\pm$  1DS. Concentration initiale en fer du milieu de perfusion : 5 mmol ; Gluc Fe : gluconate de fer ; Fe- $\beta$ -CN : fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) ; Q1 : fer disparu du milieu intestinal ( $\mu\text{mol}$ ) ; Q2 : fer retenu par la muqueuse ( $\mu\text{mol}$ ) ; Fe<sup>Abs</sup> : fer absorbé ( $\mu\text{mol}$ ) ; <sup>a</sup> : différent ( $p < 0,05$ ) du groupe contrôle Gluc Fe ; <sup>b</sup> : différent ( $p < 0,05$ ) du groupe carencé Fe- $\beta$ -CN ; <sup>c</sup> : différent ( $p < 0,05$ ) du groupe contrôle Fe- $\beta$ -CN.

\* Group; mean  $\pm$  1SD. Initial iron concentration of the perfusion solute: 5 mmol; Gluc Fe: iron gluconate; Fe- $\beta$ -CN: iron bound to  $\beta$ -CN (1-25); Q1: iron disappeared from digestive lumen ( $\mu\text{mol}$ ); Q2: iron stored by the mucosa ( $\mu\text{mol}$ ); Fe<sup>Abs</sup>: absorbed iron ( $\mu\text{mol}$ ); <sup>a</sup>: different ( $P < 0.05$ ) from control group Gluc Fe; <sup>b</sup>: different ( $P < 0.05$ ) from deficient group Fe- $\beta$ -CN; <sup>c</sup>: different ( $P < 0.05$ ) from control group Fe- $\beta$ -CN.

La disparition du fer de la lumière intestinale (Q1) a été significativement inférieure dans le groupe témoin comparé aux trois autres groupes. La disparition du fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) s'est avérée supérieure au gluconate de fer, chez l'animal normal et l'animal carencé.

La rétention de fer par la muqueuse intestinale (Q2) du groupe témoin était significativement différente de celle des trois autres groupes ; il n'y avait pas de différence significative entre les deux groupes carencés qui montraient le stockage le plus faible. Chez l'animal non carencé, la rétention de fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) était plus faible que celle du gluconate.

Les deux groupes carencés ont montré une absorption nette ( $\text{Fe}^{\text{Abs}}$ ) plus élevée que le groupe témoin. L'absorption nette du fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) était plus élevée que celle du gluconate, que les rats aient été carencés ou non.

Il existe un effet significatif du statut en fer ( $p < 0,0005$ ) et de la forme du fer perfusé ( $p < 0,0005$ ) sur la disparition, la rétention et l'absorption du fer ; il n'a pas été montré d'interaction entre les deux paramètres ( $p > 0,08$ ).

L'influence de la forme du fer sur l'inhibition exercée par le calcium est donnée dans le tableau II. Cette inhibition était significativement plus faible lorsque le fer était lié au  $\beta$ -CN (1-25), chez les rats normaux ou anémiques. De plus, chez les rats anémiques, comparés aux sujets normaux, la disparition du fer intestinal était significativement plus élevée lorsqu'il était lié au  $\beta$ -CN (1-25) que sous forme de gluconate.

Il existe un effet significatif du statut en fer ( $p < 0,0005$ ) et de la forme du fer perfusé ( $p < 0,0001$ ) sur la disparition, la rétention et l'absorption du fer ; il n'a pas été montré d'interaction entre les deux paramètres ( $p > 0,10$ ).

**Tableau II.** Effet inhibiteur du calcium sur l'absorption du fer par l'intestin isolé, perfusé de rat. Influence de la liaison du fer au  $\beta$ -CN (1-25).

*Calcium inhibition of iron absorption by the isolated, vascularized rat loop. Influence of binding iron to  $\beta$ -CN (1-25).*

	Rats contrôles		Rats carencés en fer		Anova
	Gluc Fe n = 14	Fe- $\beta$ -CN n = 6	Gluc Fe n = 6	Fe- $\beta$ -CN n = 6	
% Q1	56,9 $\pm$ 6,5*	28,5 $\pm$ 1,0 <sup>a, b</sup>	53,6 $\pm$ 1,4 <sup>b, c</sup>	27,2 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	$p < 0,001$
% Q2	52,6 $\pm$ 5,9	22,8 $\pm$ 13,6 <sup>a</sup>	45,9 $\pm$ 9,8 <sup>b, c</sup>	10,1 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	$p < 0,001$
% Fe <sup>Abs</sup>	57,4 $\pm$ 7,2	28,8 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	53,9 $\pm$ 1,3 <sup>b, c</sup>	27,6 $\pm$ 1,1 <sup>a</sup>	$p < 0,001$

\* % de la moyenne du groupe sans calcium ; moy  $\pm$  IDS ; concentration initiale en fer du milieu de perfusion : 5 mmol ; concentration initiale en calcium du milieu de perfusion : 10 mmol ; Gluc Fe : gluconate de fer ; Fe- $\beta$ -CN : fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) ; Q1 : fer disparu du milieu intestinal ; Q2 : fer retenu par la muqueuse ; Fe<sup>Abs</sup> : fer absorbé. <sup>a</sup> : différent ( $p < 0,05$ ) du groupe contrôle Gluc Fe ; <sup>b</sup> : différent ( $p < 0,05$ ) du groupe carencé Fe- $\beta$ -CN ; <sup>c</sup> : différent ( $p < 0,05$ ) du groupe contrôle Fe- $\beta$ -CN.

\* Ratio to the mean value of the calcium free group (%); mean  $\pm$  ISD; initial iron concentration of the perfusion solute: 5 mmol; initial calcium concentration of the perfusion solute: 10 mmol; Gluc Fe: iron gluconate; Fe- $\beta$ -CN: iron bound to  $\beta$ -CN (1-25); Q1: iron disappeared from digestive lumen; Q2: iron stored by the mucosa; Fe<sup>Abs</sup>: absorbed iron; <sup>a</sup>: different ( $P < 0.05$ ) from control group Gluc Fe; <sup>b</sup>: different ( $P < 0.05$ ) from deficient group Fe- $\beta$ -CN; <sup>c</sup>: different ( $P < 0.05$ ) from control group Fe- $\beta$ -CN

## DISCUSSION

La carence martiale est difficile à corriger, en raison de la faible absorption du fer et de sa sensibilité aux variations des conditions intraluminales (Conrad, 1993). L'hydrolyse des caséines par les enzymes digestives libère physiologiquement des phosphopeptides (CPP) solubles et partiellement résistants à une hydrolyse enzymatique ultérieure (Bouhallab et al, 1991 ; Brommage et al, 1991) qui sont donc retrouvés dans la lumière intestinale aux différents niveaux du tractus digestif (Naito et al, 1972 ; Brommage et al, 1991) et dans les selles (Kasai et al, 1995). L'absorption du fer pourrait bénéficier de la présence d'un ligand susceptible de le maintenir à l'état soluble jusqu'au contact de l'entérocyte, à l'intérieur duquel son devenir dépend de l'homéostasie de l'organisme (Conrad, 1993 ; Bothwell, 1995). Des travaux antérieurs ont montré que chez l'animal jeune carencé par défaut d'apport, la fixation du fer au  $\beta$ -CN (1-25) permet une correction plus complète de l'anémie et des réserves tissulaires en fer (Aït-oukhatar et al, 1997). L'étude présentée complète ces résultats en montrant que chez l'animal présentant ou non une carence martiale aiguë, le fer fixé au  $\beta$ -CN (1-25) est mieux absorbé que le fer du gluconate, à l'état basal et en présence d'un inhibiteur puissant de cette absorption, le calcium. Les effets de la liaison au  $\beta$ -CN (1-25) s'exercent aux deux phases de la digestion, intraluminaire et entérocytaire.

La disparition du fer du milieu intestinal est le témoin des phénomènes intraluminaux, jusqu'à la fixation du fer sur les récepteurs membranaires de l'entérocyte. En l'absence de calcium, la disparition du fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) est supérieure à celle du gluconate, de 20 % en moyenne chez les animaux normaux et de 11 % chez les rats anémiques. La présence de calcium dans le soluté de perfusion diminue de moitié (53-57 %) l'élimination du gluconate de fer, quel que soit le statut en fer de l'animal ;

cette inhibition est réduite de moitié (26-28 %) par la fixation du fer au  $\beta$ -CN (1-25). L'absence de phytates susceptibles de former des complexes insolubles avec les deux minéraux dans le milieu de perfusion montre qu'il s'agit d'interactions directes, qui peuvent intéresser la solubilité intestinale du fer et son transfert membranaire : la fixation du fer aux groupements phosphorylés des caséines est forte et résistante aux variations du pH intestinal (Causeret, 1986 ; Bouhallab et al, 1991 ; Brommage et al, 1991) ; l'hydrolyse du  $\beta$ -CN (1-25) par les enzymes digestives et sa déphosphorylation sont lentes (Bouhallab et al, 1991 ; Brommage et al, 1991) ; il est donc vraisemblable que le fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) soit maintenu soluble malgré les variations de conditions intestinales et libéré progressivement, prolongeant ainsi sa possibilité d'absorption par la muqueuse digestive durant le transit intestinal. Au contact de la muqueuse, la constante d'association du fer aux phosphosérines semble permettre facilement son transfert au récepteur membranaire (Galdi et Valencia, 1988). Par ailleurs, le calcium ne semble pas être en compétition avec le fer au niveau de la captation par la bordure en brosse (Wien et al, 1994). Ainsi les conditions de fixation du fer sur le  $\beta$ -CN (1-25) facilitent la phase intraluminaire de sa digestion et le protègent contre les interactions inhibitrices avec les autres nutriments.

La phase entérocytaire de l'absorption du fer dépend de la forme sous laquelle le fer est apporté et des besoins de l'organisme : la rétention du fer par l'entérocyte est plus faible chez l'animal carencé que chez les témoins, confirmant la rapidité de réponse de la régulation entérocytaire de l'absorption du fer (Bothwell, 1995). En revanche, le stockage entérocytaire n'est pas différent entre les groupes perfusés avec le fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) ou sous forme de gluconate montrant que la régulation entérocytaire déterminant le transfert du fer absorbé vers l'organisme s'exerce de façon semblable sur les deux formes de fer. La diminution

du contenu entérocytaire en fer sous l'effet du calcium suggère, à la suite des observations de Hallberg, que les interactions entre les deux minéraux se produisent non seulement à la phase intraluminaire de l'absorption digestive du fer, mais aussi lors de son transfert muqueux (Hallberg et al, 1991).

Le mécanisme du transfert muqueux du fer lié au  $\beta$ -CN (1-25) n'est pas déterminé ; il est admis que le fer est absorbé essentiellement sous forme ferreuse (Conrad, 1993) ; l'oxydation du fer en  $Fe^{+++}$  lors de sa fixation au phosphopeptide (Bouhallab et al, 1991 ; Emery, 1992) aurait donc dû diminuer, plutôt que favoriser sa captation entérocytaire. Cela pourrait suggérer que lorsqu'il est lié au  $\beta$ -CN (1-25), le fer pénètre dans la cellule intestinale sous forme liée ; cependant, l'existence d'une réductase de la bordure en brosse (Ekmekcioglu et al, 1996) peut également favoriser l'absorption de  $Fe^{+++}$ , si celui-ci a été maintenu soluble jusqu'au contact de la bordure en brosse et libéré de son ligand à ce niveau. Cette libération du fer sur le versant luminal de la muqueuse pourrait être contemporaine de l'hydrolyse du phosphopeptide par les peptidases de la bordure en brosse, l'absorption se faisant alors sous forme ionique suivant le système de transport du fer non hémique. L'effet d'entraînement non spécifique de l'absorption des acides aminés issus de la digestion du  $\beta$ -CN (1-25), de toute façon limitée pendant la durée du transit duodénal, sur l'absorption de l'eau et des minéraux ne semble pas en cause : les résultats bruts ne sont pas modifiés par la correction en fonction des dosages de PEG non absorbé. Cependant, le fer pourrait être absorbé sous forme de complexe lié au  $\beta$ -CN (1-25) : de nombreux peptides peuvent être absorbés par endocytose ; ils sont ensuite dégradés à 90 % dans l'entérocyte, libérant le fer et le mettant à la disposition des systèmes de régulation cellulaire (Heyman et Desjeux, 1992).

Cette étude confirme que la liaison du fer au  $\beta$ -CN (1-25) de la  $\beta$ -caséine améliore sa biodisponibilité : son absorption digestive est augmentée et protégée contre l'effet inhibiteur du calcium.

Les mécanismes en cause restent à préciser : le maintien du fer à l'état soluble dans la lumière digestive est vraisemblablement un facteur important ; d'autres facteurs concernant le transfert entérocytaire du fer restent à étudier.

## RÉFÉRENCES

- Adamson NJ, Reynolds EC (1995) Characterization of tryptic casein phosphopeptides prepared under industrially relevant conditions. *Biotechnol Bioeng* 45, 196-204
- Ait-oukhatar N, Bouhallab S, Bureau F, Arhan P, Maubois JL, Drosowsky MA, Bouglé DL (1997) Bioavailability of caseinophosphopeptide bound iron in the young rat. *J Nutr Biochem* 8, 190-195
- Barton JC, Conrad ME, Parmley RT (1983) Calcium inhibition of inorganic iron absorption in rats. *Gastroenterology* 84, 90-101
- Baumy JJ, Brulé G (1988) Effect of pH and ionic strength on the binding of bivalent cations to  $\beta$ -casein. *Lait* 68, 409-418
- Bothwell TH (1995) Overview and mechanisms of iron regulation. *Nutr Rev* 53, 237-245
- Bouhallab S, Léonil J, Maubois JL (1991) Complexation du fer par le phosphopeptide (1-25) de la caséine  $\beta$  : action de l'alkalase et de la phosphatase acide. *Lait* 71, 435-443
- Brommage R, Juillerat MA, Jost R (1991) Influence of casein phosphopeptides and lactulose on intestinal calcium absorption in adult female rats. *Lait* 71, 173-180
- Brulé G, Fauquant J (1982) Interactions des protéines du lait et des oligoéléments. *Lait* 62, 323-331
- Causeret D (1986) Influence de la phosphorylation de la caséine bovine sur sa capacité de fixation des éléments minéraux. Mémoire de DEA, ENSBANA, Dijon
- Cook JD, Dassenko SA, Whittaker P (1991) Calcium supplementation : effect on iron absorption. *Am J Clin Nutr* 53, 106-111
- Conrad M E (1993) Regulation of iron absorption. *J Am Coll Nutr* 6, 720-8
- Demott BJ, Dincer B (1976) Binding added iron to various milk proteins. *J Dairy Sci* 59, 1557-1559
- Ekmekcioglu C, Feyertag J, Marktl W (1996) A ferric reductase activity is found in brush border mem-

- brane vesicles isolated from Caco-2 cells. *J Nutr* 126, 2209-2217
- Emery T (1992) Iron oxidation by casein. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 1047-1052
- Galdi M, Valencia ME (1988) Stability of iron (III) chelates of nutritional interest. *J Food Sci* 53, 1844-1847
- Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg A-S, Rossander-Hultén L (1991) Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 53, 112-119
- Hercberg S, Preziosi P, Galan P (1991) Le fer. In: *Les oligoéléments en médecine et biologie* (P Chappuis, A Favier, eds). Lavoisier Tec et Doc, Paris: 314-346
- Heyman M, Desjeux JF (1992) Significance of intestinal food protein transport. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 15, 48-57
- Hurell RF, Lynch SR, Trinidad P, Dassenko SA, Cook JD (1989) Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am J Clin Nutr* 49, 546-552
- Hyden S (1955) A turbidometric method for determination of higher polyethylene glycols in biological materials. *Ann R Agr Coll Sweden* 22, 139-145
- Kasai T, Iwasaki R, Tanaka M, Kiriya S (1995) Caseinophosphopeptides (CPP) in feces and contents in digestive tract of rats fed casein and CPP preparations. *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 26-30
- Kim M, Lee D-T, Lee Y-S (1995) Iron absorption and intestinal solubility in rats are influenced by dietary proteins. *Nutr Res* 15, 1705-1716
- Meisel H, Frister H (1989) Chemical characterization of bioactive peptides from *in vivo* digests of casein. *J Dairy Res* 56, 343-349
- Naito H, Kawami A, Imamura T (1972) *In vivo* formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. *Agric Biol Chem* 36, 409-415
- Sato R, Noguchi T, Naito H (1986) Casein phosphopeptide enhances calcium absorption from ligated segment of rat small intestine. *J Nutr Sci Vitaminol* 32, 67-76
- Slatkavitz CA, Clydesdale FM (1988) Solubility of inorganic iron as affected by proteolytic digestion. *Am J Clin Nutr* 47, 487-495
- Walter T, de Andraca I, Chadud P, Perales CG (1989) Iron deficiency anemia: adverse effects on infant psychomotor development. *Pediatrics* 84, 7-17
- West DW (1986) Structure and function of the phosphorylated residues of casein. *J Dairy Res* 53, 333-352
- Wien EM, Glahn R, Van Campen DR (1994) Ferrous iron uptake by rat duodenal brush border membranes vesicles: effects of dietary iron level and competing minerals ( $Zn^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ , and  $Ca^{+2}$ ). *J Nutr Biochem* 5, 571-577
- Yuan YV, Kitts DD (1991) Confirmation of calcium absorption and femoral utilization in spontaneously hypertensive rats fed casein phosphopeptide supplemented diets. *Nutr Res* 11, 1257-1272