

Identification des protéines de pois indigestibles au niveau iléal chez le porc en croissance, effet variétal et technologique

Maud LE GALL (1, 2), Paulo SALGADO (2, 3), Vincent HESS (2, 4), Gérard DUC (5),
Laurence QUILLIEN (1), Bernard SÈVE (2)

(1) I.N.R.A., Unité de Recherche sur les Protéines Végétales et leurs Interactions (URPVI)
rue de la géraudière, 44072 Nantes Cedex 03.

(2) I.N.R.A. - E.N.S.A.R., Unité Mixte de Recherche sur le veau et le porc, 35590 Saint-Gilles.

(3) CIRAD – EMVT, TA 30/A, Campus international de Baillarguet, 34398 Montpellier, Cedex 5.

(4) Degussa France, 37-39 Avenue Marceau, 92400 Courbevoie.

(5) I.N.R.A., Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes, 17, rue Sully, 21034 Dijon Cedex.

Identification des protéines de pois indigestibles au niveau iléal chez le porc en croissance, effet variétal et technologique

Un essai a été réalisé pour mesurer au niveau de l'iléon terminal du porc la digestibilité réelle des protéines de pois et les pertes d'azote endogène par la technique de la dilution isotopique. Trois variétés de pois (Solara, Eiffel et Madria) et l'effet du micro broyage ont été testés sur des porcs ayant subi une anastomose iléo-rectale. Après calculs des digestibilités réelles, vraies et apparentes de l'azote, la composition protéique des digestas iléaux a été analysée par une étude densitométrique des profils électrophorétiques et immunoblotting. Le flux iléal de protéines varie de manière significative ($P < 0,05$) selon les variétés : le régime Madria provoque un flux de protéines important au contraire du régime Solara, le régime Eiffel étant intermédiaire et non différent statistiquement de Solara. Le micro broyage diminue ce flux iléal. Aucune relation n'a pu être établie entre la digestibilité réelle des protéines de pois et les pertes endogènes. Les globulines (légumine et viciline) sont hydrolysées, aucun peptide de taille supérieur à 10 kDa issu de l'hydrolyse de ces protéines majeures n'est détecté au niveau iléal. Parmi les albumines, la lectine est présente sous sa forme native et la PA₂ (albumine majeure) est dégradée en un peptide de 20 kDa.

Effect of variety and processing technology on the identification of undigested pea proteins in the ileum of the growing pig

An experiment was performed to measure the real digestibility of pea proteins and ileal endogenous losses of nitrogen using the isotopic dilution method. Three pea cultivars (Solara, Eiffel and Madria) and the effect of micro-grinding were tested using ileorectal anastomosed growing pigs. Apparent, true and real digestibilities were calculated and proteins in ileal digesta were analysed using gel electrophoresis, densitometry and identified by immunoblotting. The ileal flow of proteins was significantly affected ($P < 0.05$) by the pea cultivar (Madria > Eiffel = Solara). The flow of proteins was reduced by micro-grinding. A relationship between true digestibility of pea proteins and endogenous losses was not observed. The globulin storage proteins (legumin and vicilin) were hydrolysed in the digestive tract. Peptides > 10 kDa resulting from this hydrolysis were not detectable in at the end of the ileum. Amongst the albumins, lectin was not hydrolysed and PA₂ (a major albumin) was degraded to a peptide of 20 kDa.

INTRODUCTION

L'Europe importe de grandes quantités de protéines végétales pour l'alimentation animale en particulier des graines de soja ou ses dérivés (tourteau, concentrats et isolats). Du fait de ses importations, l'Europe est dépendante économiquement des pays producteurs, les pays d'Amérique du Sud ou les Etats Unis. Afin de limiter cette dépendance, l'Union Européenne favorise la culture de légumineuses (pois chiche, lupin, féverole et pois). Cependant, l'utilisation du pois en nutrition animale nécessite une meilleure connaissance et un meilleur contrôle de la digestibilité de ses protéines. En effet, les protéines du pois présentent une digestibilité en général inférieure à celle d'aliments témoins comme ceux contenant du soja. La digestibilité de ces protéines peut varier à plusieurs niveaux (hydrolyse des protéines par les enzymes digestives, absorption de ces produits d'hydrolyse ou effet de ces protéines sur l'animal en particulier sur les pertes endogènes). Si la digestibilité réelle de ces protéines semble forte, il apparaît une digestibilité apparente souvent plus faible liée à une augmentation des pertes endogènes (HUISMAN et al., 1992). De plus, la qualité nutritionnelle des protéines de pois peut varier selon les conditions de culture (lieu de culture, conditions climatiques) (BACON et al., 1995 ; CANIBE et EGGUM, 1997).

La digestibilité des protéines de pois chez le porc en croissance a été étudiée par analyse électrophorétique des contenus iléaux d'animaux anastomosés nourris avec des régimes

contenant trois variétés différentes de pois (Solara, Madria, Eiffel). La variété Solara est présentée sous forme broyée et microbroyée afin d'étudier l'influence du traitement technologique appliqué au pois sur la digestibilité des protéines. Des anticorps dirigés contre les protéines majeures, les globulines (viciline (7S) et légumine (11S) et les albumines (lectines et PA₂) ont permis de rechercher l'origine protéique des peptides résistant à la digestion.

1. MATÉRIELS & MÉTHODES

1.1. Matériels végétaux

Trois variétés de pois Solara, Madria et Eiffel ont été cultivées durant la saison 1995-1996 en Côte d'Or (INRA Dijon). Dans chaque cas, une parcelle a reçu de l'engrais marqué à l'¹⁵N (nitrate d'ammonium doublement marqué 11,5 % d'enrichissement ; Cambridge Isotope Labs., Inc., Andover, Massachusetts) au lieu de nitrate d'ammonium standard.

Les pois ont été broyés à l'aide d'un broyeur à marteau sur une grille de 2,4 mm. Un lot de pois Solara a été microbroyé à l'aide d'un broyeur ALPINE 160 UPZ afin de tester l'influence de la granulométrie sur la digestibilité.

1.2. Plan expérimental

4 régimes azotés renfermant les différentes variétés de pois non marquées et un régime protéoprive ont été préparés

Tableau 1 - Composition centésimale des régimes

| | Protéoprive | Solara | Eiffel | Madria | Solara Microbroyé |
|--------------------------------|--------------------|---------------|---------------|---------------|--------------------------|
| Composition en % | | | | | |
| Pois | 0 | 78,37 | 78,84 | 84,4 | 73,59 |
| Amidon de maïs | 79,42 | 10,14 | 9,7 | 4,4 | 14,92 |
| Cellulose de bois | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Huile | 3 | 1,75 | 1,74 | 1,65 | 1,75 |
| Sucre | 5 | 3,35 | 3,34 | 3,23 | 3,35 |
| KCl | 0,27 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NaCl | 0,84 | 0,84 | 0,84 | 0,84 | 0,84 |
| Bicarbonate de Na | 1,46 | 1,43 | 1,43 | 1,43 | 1,43 |
| MgCl | 0,33 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Phosphate monocalcique | 2,03 | 0,76 | 0,75 | 0,66 | 0,76 |
| CaCO ₃ | 1,57 | 1,91 | 1,91 | 1,94 | 1,91 |
| Méthionine | 0 | 0,29 | 0,29 | 0,28 | 0,29 |
| Tryptophane | 0 | 0,08 | 0,08 | 0,09 | 0,08 |
| OVA ⁽¹⁾ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Vit Shunt ⁽²⁾ | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,08 | 0,08 |
| Analyses : | | | | | |
| MS | 89,37 | 89,34 | 88,38 | 88,32 | 89,42 |
| N | 0,07 | 2,42 | 2,43 | 2,40 | 2,42 |
| ED (kcal/kg) ⁽³⁾ | 3114 | 3218 | 3217 | 3209 | 3218 |
| Enrichissement (APE) | | | | | |
| Régimes normaux | - | 0,0017 | 0,0013 | 0,0008 | 0,0013 |
| Régimes marqués ⁽⁴⁾ | - | 0,7327 | 0,6733 | 0,8139 | 0,7287 |

⁽¹⁾ g par kilo de prémélange : Vitamines : A, 1 ; D3, 0.2 ; E, 4 ; K3, 0.8 ; B1, 0.2 ; B2, 0.5 ; PP, 1.5 ; B6, 0.1 ; B8, 1 ; B9, 0.1 ; B12, 0.2 ; choline, 80 ; pantothénate de Ca, 1 ; Fe, 7.98 ; Cu, 1 ; Mn, 4.34 ; Zn, 10.2 ; Co, 0.01 ; I, 0.02 ; Se, 0.015.

⁽²⁾ mg par kilo de prémélange : Vitamines : A, 44 ; E, 50 ; K, 24 ; B1, 5 ; B2, 5 ; B6, 4 ; B8, 1%, 8.75 ; B9, 1 ; B12, 25 ; C, 50 ; PP, 25.

⁽³⁾ Selon les tables INRA (1989).

⁽⁴⁾ Régimes obtenus par substitution de pois non marqué par des pois marqué à l'¹⁵N et par substitution à l'amidon de maïs de 0,3 % de chrome.

(tableau 1). Des régimes marqués à l'azote ^{15}N ont été réalisés suivant la même formule que les régimes non marqués avec une substitution d'oxyde de chrome (0,3 %) à l'amidon de maïs.

Tous les animaux ont subi une anastomose iléo-rectale termino-terminale à 35 kg de poids vif et ont reçu successivement les 4 régimes azotés et le régime protéoprive selon le schéma d'un carré latin 5X5.

Le niveau d'alimentation des animaux est fixé à 80 g de matière sèche ingérée par kilo de poids métabolique ((poids vif) 0,75) représentant un apport énergétique de 2,5 fois l'entretien. Les aliments sont servis sous forme de soupe 2 fois par jour. Après 4 jours d'adaptation, des collectes complètes ont été effectuées sur 2 jours dans des bacs contenant 500 mL d'acide sulfurique 5 %, deux fois par jour au moment du repas.

Le matin du 7^{ème} jour, les animaux reçoivent un repas d'épreuve doublement marqué au chrome et à l'azote ^{15}N représentant une demi ration quotidienne. La seconde moitié de la ration est distribuée à 15 h 30 et n'est pas marquée. Les digestas sont collectés sans acide toutes les heures de 10 à 17 h puis à 8 h 30 le lendemain matin, ils sont immédiatement pesés et congelés.

1.3. Préparation des échantillons de digestas iléaux

Tous les échantillons sont lyophilisés. Les analyses d'N, de ^{15}N , de matière sèche, d'oxyde de chrome, sont réalisées selon le protocole décrit par HESS et al. (1998).

Les calculs de flux digestifs de l'azote sont faits selon la méthode décrite par HESS et al. (1998).

Les protéines solubles sont extraites des digestas iléaux dans un tampon borate (100 mM H_3BO_3 , 150 mM NaCl, pH8) pendant 1 heure 30 sous agitation à température ambiante (300 mg/mL de tampon) et centrifugées à 12000 g pendant 10 minutes à température ambiante. Les surnageants sont collectés et conservés à - 20 °C jusqu'à analyse électrophorétique. Les protéines solubles sont dosées par une méthode colorimétrique (BCA ; Pierce).

1.4. Electrophorèse

Les gels d'acrylamide et les tampons utilisés sont réalisés selon le protocole de LAEMMLI (1970). Les digestas sont extraits dans un tampon de solubilisation Tris-HCl 0.16 M, pH 8,8 contenant 10 % de glycérol, 2 % de SDS et 0,002 % de bleu de bromophénol. La réduction des ponts disulfures se fait par chauffage à 100 °C en présence de 5 % de β -mercaptoéthanol. Les protéines sont déposées à raison de 20 et 250 μg par puits pour l'extrait total du régime et les extraits de digestas iléaux, respectivement. L'un des puits reçoit un mélange de protéines de masses moléculaires connues comprises entre 10 et 95 kDa. Les autres puits reçoivent les extraits de digesta. Sur chaque gel, les pistes de migration sont colorées au bleu G250.

Des mesures de densitométrie sont réalisées sur des images scannées des gels (Quantity One, Version 4.1 ; Biorad,

France). Chaque piste est divisée en une échelle de 28 bandes de même épaisseur caractérisées chacune par une valeur densitométrique. Des pics de coloration occupant une ou plusieurs bandes sont identifiés sur chaque piste. Ils correspondent à des protéines dont les flux iléaux sont exprimés en unité densitométrique (UD) par kg de matière sèche ingérée sur la base des concentrations respectives des digesta extraits et de l'aliment en oxyde de chrome. Ces flux de protéines sont analysés statistiquement de la même manière que les flux azotés endogènes et alimentaires précédemment mesurés (HESS et al. 1998).

1.5. Immunoblotting

Les anticorps polyclonaux spécifiques des différentes protéines de pois (légumine, viciline, lectine et PA_2) ont été produits au laboratoire, URPIV. Les protéines de pois purifiées sont injectées par voie intradermique à des lapins. Les injections contiennent 1 mg de protéines dans un tampon phosphate (10 mM Na_2HPO_4), 150 mM NaCl, pH7,2). La première injection et une tous les 15 jours contiennent un adjuvant de Freund. Le sérum est collecté à partir de la quatrième injection.

Les protéines séparées par électrophorèse sont transférées sur membrane de nitrocellulose (pores de 0,2 μm de diamètre) pendant 1 heure dans un tampon tris, 25 mM, glycine, 192 mM et éthanol 20 %, selon le protocole de transfert de TOWBIN (1979). Les membranes sont saturées par de la BSA, 1% en solution dans un tampon tris-HCl 150 mM (pH 7,6) pendant 1 heure. Après lavage avec du PBS-tween, elles sont incubées pendant 1 h avec des anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les protéines du pois, puis avec un anticorps secondaire anti IgG de lapin couplé à la peroxydase pendant 1 h au 1/3000. La révélation se fait par mise en solution d'un substrat de l'enzyme, le HRP.

2. RÉSULTATS & DISCUSSION

2.1. Flux digestifs iléaux d'azote

Les pertes endogènes et alimentaires varient selon le régime et donc la variété de pois ingérée : Madria entraîne les pertes endogènes les plus élevées (3,75 g d'N/kg MSI), Eiffel (2,88 g) est intermédiaire, Solara (2,41 g) et Solara microbroyée (2,52 g) donnent les pertes les plus faibles. Les flux iléaux alimentaires se classent différemment, 6,58 g d'N/kg MSI pour Madria, 5,75 g pour Solara, 4,73 g pour Eiffel et 2,33 g pour Solara microbroyé. Ces résultats démontrent une certaine indépendance des flux alimentaire et endogène. Ceci explique que les digestibilités apparentes de l'azote de Solara et Eiffel soient identiques et supérieures à celles de Madria et que la digestibilité réelle de Eiffel soit la plus élevée, celle de Madria étant la plus faible (HESS et al. 1998).

2.2. Flux digestifs iléaux des protéines selon leur masse moléculaire

Les échantillons de digestas iléaux étudiés proviennent du pool des collectes horaires représentatif de la matière sèche

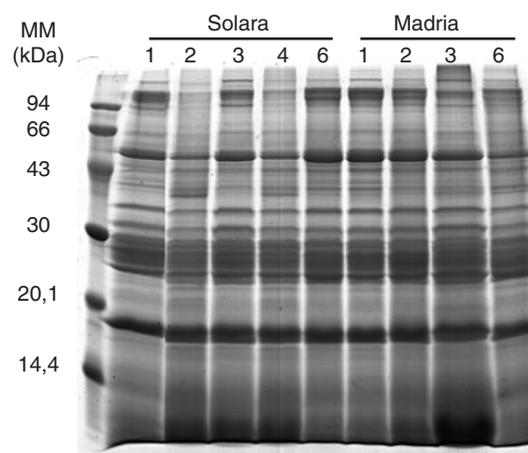
excrétee après le repas d'épreuve. Un exemple des séparations sur gel effectuées par électrophorèse SDS-PAGE en conditions réductrices est présenté à la figure 1. Les masses moléculaires sont estimées à partir de l'étalonnage effectué entre 10 et 95 kDa. Les profils des protéines apparues au niveau iléal sont très similaires. Sur le diagramme des valeurs densitométriques moyennes de chaque bande pour chaque régime, on repère 4 pics de flux iléaux (figure 2). Le premier et le quatrième pic, constitués d'une seule bande (7 et 20), correspondent aux protéines de masses moléculaires 100 et 19 kDa respectivement. Le deuxième et le troisième pic, plus étalés (bandes 7-8 et 14-16), correspondent à des protéines de masses moléculaires de 50 et 25-30 kDa, respectivement. Les valeurs densitométriques des bandes constituant les pics, des pics eux-mêmes et de leur somme, rapportées à la matière sèche ingérée sont présentées pour chaque régime au tableau 2. Cette expression des résultats permet de retrouver des différences entre régimes ($P < 0,05$ ou $P < 0,01$) conformes aux variations de flux iléal total d'azote calculable d'après les valeurs de digestibilité apparentes rapportées précédemment (HESS et al., 1998). Le régime Madria provoque un flux iléal de protéines important (1183 UD/ kg MSI) au contraire du régime Solara (886 UD/ kg MSI) plus digestible. Le régime Eiffel (941 UD/ kg MSI) ne diffère pas statistiquement de Solara. Le micro broyage diminue ce flux iléal. Des corrélations entre les valeurs individuelles de flux protéiques et celles des flux endogène et alimentaire d'azote précédemment déterminées ont été calculées (tableau 3). Elles montrent que le flux protéique est de plus en plus lié au flux iléal endogène d'azote lorsque la masse moléculaire augmente. Cependant, ces données montrent également que les pics formés des bandes 7-8, 14-16 et 20 sont expliqués indépendamment par les pertes endogènes et alimentaires d'azote. Les bandes correspondant à des masses moléculaires comprises entre 25 et 30 kDa (bandes 14-16), ont été identifiées précédemment comme des protéines endogènes (SALGADO et al., 2002). Les présents résultats ne contredisent pas cette dernière observation, mais permettent de penser que l'on trouve aussi des protéines alimentaires non digérées dans cet intervalle de masse moléculaire.

Tableau 2 - Flux iléal des protéines correspondant aux différentes bandes d'électrophorèse, en unité densitométrique par kg de matière sèche ingérée

| Régime | Pois Solara | Pois Solara microbroyé | Pois Madria | Pois Eiffel | Signification statistique 1, 2 | | | | |
|-----------------|-------------|------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------------|-----|------|------|----|
| | | | | | ETR | A | P | R | |
| Bande (pic) | | | | | Masse moléculaire (kDa) | | | | |
| 3 (pic 1) | 100 | 87 ^a | 88 ^a | 130 ^b | 127 ^b | 13 | ns | ** | ** |
| 7 | 70 | 111 ^a | 87 ^a | 157 ^b | 146 ^{ab} | 26 | 0,10 | ns | * |
| 8 | 68 | 77 ^{ab} | 52 ^a | 98 ^b | 78 ^b | 15 | * | ns | * |
| 7 à 8 (pic 2) | | 187 ^b | 139 ^{ab} | 255 ^c | 224 ^{bc} | 34 | * | ns | ** |
| 14 | 30 | 133 ^b | 101 ^a | 162 ^c | 117 ^{ab} | 12 | * | 0,10 | ** |
| 15 | 28 | 153 ^{ab} | 125 ^a | 199 ^c | 156 ^b | 11 | 0,10 | ns | ** |
| 16 | 25 | 140 ^{ab} | 105 ^a | 198 ^b | 153 ^{ab} | 35 | ns | ns | * |
| 14 à 16 (pic 3) | | 425 ^{ab} | 330 ^a | 559 ^c | 426 ^b | 59 | 0,10 | ns | ** |
| 20 (pic 4) | 19 | 186 ^b | 121 ^a | 240 ^c | 164 ^{ab} | 30 | * | 0,10 | ** |
| Total des pics | | 886 ^b | 678 ^a | 1183 ^c | 941 ^b | 105 | * | 0,10 | ** |

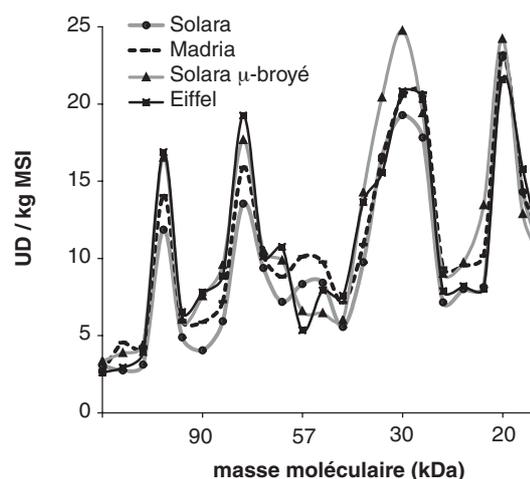
¹ETR = écart-type résiduel, A = effet animal, P = effet période, R = effet régime

² Les moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement au seuil $P < 0,05$



Chaque piste, notée 1, 2, 3, 4 ou 6, correspond à l'extrait du pool de digestas par animal. Dépôt de 10 μ L d'un extrait de digesta à 300 mg/mL. Les marqueurs de masses moléculaires (MM) sont indiqués sur le côté gauche de la figure.

Figure 1 - Profils électrophorétiques des pools de digestas de porcs nourris avec le régime contenant le pois Solara, le pois Madria



Flux iléal de protéines exprimé en unités densitométriques (UD/ kg MSI)

Figure 2 - Profils densitométriques des gels d'électrophorèse des extraits de protéines de digestas iléaux

Tableau 3 - Corrélations simples (r^2) et doubles (R^2) des flux de protéines identifiées par les bandes électrophorétiques, flux d'azote endogène (endo) et flux d'azote alimentaire (pois)

| Bandes (masse moléculaire, kDa) | 100 | 70 et 68 | 30, 28 et 25 | 19 | total |
|------------------------------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| r^2 endo | 0,21 * | 0,42 *** | 0,31 *** | 0,19 ** | 0,36 **** |
| r^2 pois | 0,07 ns | 0,23 0,10 | 0,53 **** | 0,58 **** | 0,47 **** |
| R^2 endo, pois | 0,21 0,10 | 0,63 *** | 0,80 **** | 0,75 **** | 0,80 **** |

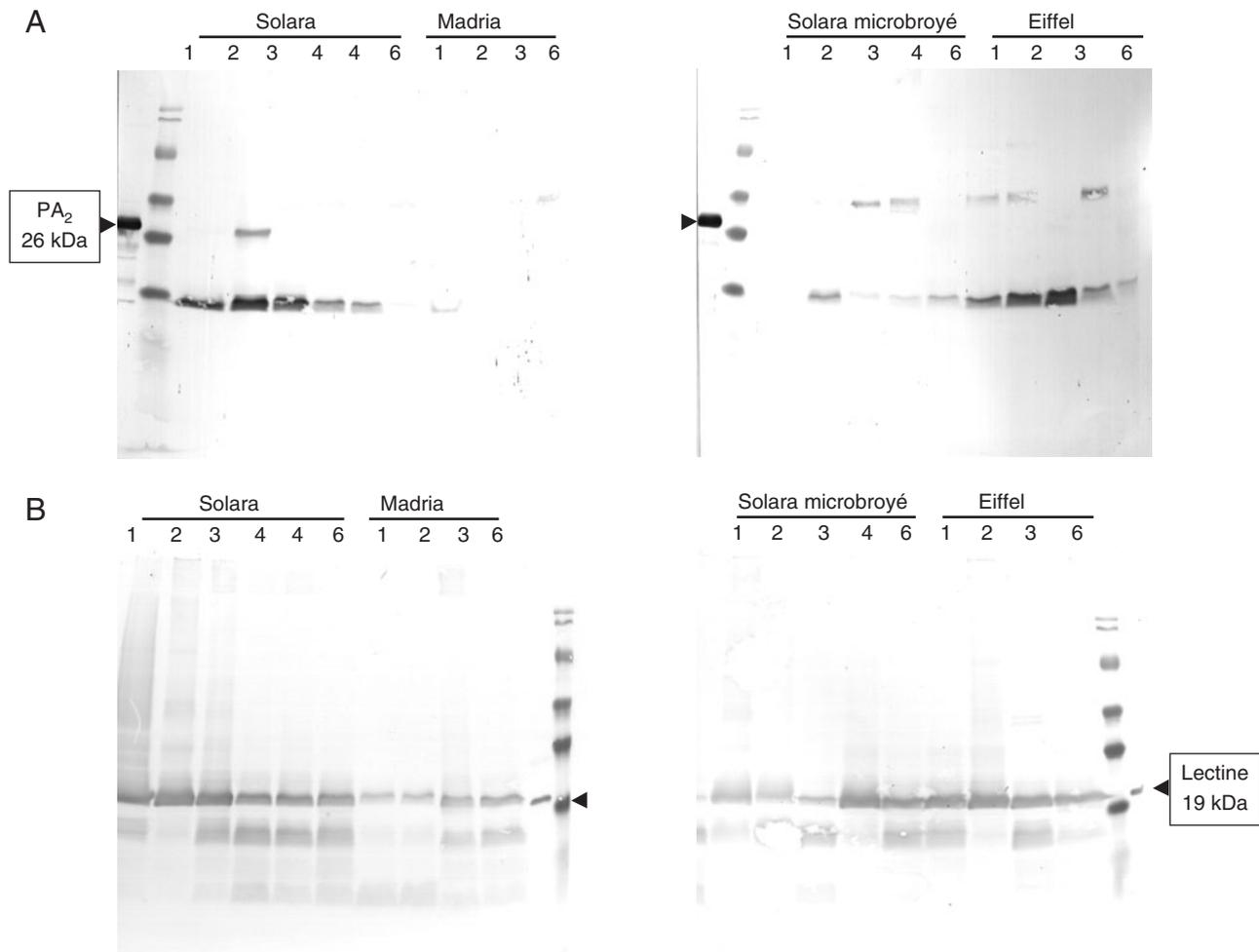
ns : $P > 0,10$, 0,10 : $P < 0,10$, * : $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$, *** : $P < 0,001$, **** : $P < 0,0001$

2.3. Identification des peptides et protéines non digérées

Les protéines de pois résistantes à l'hydrolyse sont détectées par immunoblotting (figure 3). Un extrait protéique de farine de pois est utilisé comme contrôle pour identifier les peptides natifs reconnus par les anticorps polyclonaux. Seuls les polypeptides α majeur et α mineur de masse moléculaire 40 et 25 kDa respectivement sont reconnus par les anticorps dirigés contre la légumine. Les anticorps dirigés contre la viciline reconnaissent préférentiellement les polypeptides de masse moléculaire élevée à 50, 33, 30 kDa. Les anticorps dirigés contre la lectine reconnaissent un peptide à 19 kDa et ceux dirigés contre la PA_2 , un peptide à 26 kDa.

Les protéines majeures du pois (légumine et viciline) sont bien hydrolysées au cours de la digestion par le porc (résultats non présentés ici). Pour la légumine, aucun peptide de taille supérieur à 10 kDa issu de l'hydrolyse de cette protéine n'est détecté au niveau iléal. Pour la viciline, seules des traces sont observées.

L'anticorps anti- PA_2 ne détecte plus la protéine native à 26 kDa, sauf dans le cas d'un animal nourri avec le régime contenant le pois Solara, mais un peptide de plus petite taille à environ 20 kDa, et seulement avec les régimes Solara microbroyé et Eiffel. Une étude in vivo (CRÉVIEU et al., 1997), chez le poulet, a montré que cette protéine est détectée sous sa forme native de 26 kDa. Les études in vitro de



Chaque piste, notée 1, 2, 3, 4 ou 6, correspond à l'extrait du pool de digestas par animal. Incubation avec des sérums contre la PA_2 (A), la lectine (B). Sur le côté de chaque gel, extrait d'une farine de pois (contrôle). Les marqueurs de masses moléculaires (MM) sont indiqués sur le côté de la figure.

Figure 3 - Immunoblots des pools de digestas de porcs nourris avec le régime contenant le pois Solara, le pois Madria, le pois Solara micro broyé et le pois Eiffel

PERROT et al. (1999) ont montré la sensibilité totale de cette protéine à l'hydrolyse par la pepsine et sa résistance à la trypsine. Ce résultat suggère que la protéine n'est pas dégradée car l'étape correspondant chez le poulet à la digestion gastrique est trop limitée dans le temps.

En revanche, les lectines (19 kDa) sont détectées dans tous les digestas. Leur résistance a été mise en évidence au niveau iléal pour plusieurs légumineuses (soja, haricot, pois...) par plusieurs auteurs (HAJOS et al., 1995 ; SALGADO et al. 2002), alors que dans une étude antérieure, elles n'étaient pas retrouvées dans les fèces (BERTRAND et al, 1988). Sur la base de l'étude densitométrique ci-dessus, elles représenteraient entre 18 et 20 % des protéines alimentaires et endogènes non digérées au niveau iléal alors qu'elles ne constituent que 2,5 à 5 % des protéines de l'aliment. Les équations de régression, non rapportées ici, correspondant aux corrélations doubles présentées au tableau 3 donnent une proportion de protéines alimentaires plus forte dans le pic 4 (19 kDa) que dans l'ensemble des pics. De ce fait, la proportion de lectines dans les protéines de pois non digérées de masse moléculaire supérieure à 15 kDa pourrait s'élever à 25 %.

Des différences sont observées entre les régimes dans le cas de la détection de la PA₂ et, à un moindre degré, des lectines. Elles s'expliquent par l'égalisation des quantités de protéines solubles déposées dans les puits et les proportions relatives de ces protéines, des protéines endogènes et des peptides non analysés de masse moléculaire < 10 kDa. Les proportions de protéines endogènes dans les digestas sont plus élevées avec les régimes Madria et Solara microbroyé pour des raisons différentes. Dans le premier cas, la mauvaise digestibilité apparente est liée aussi bien à d'abondantes pertes endogènes spécifiques qu'à une faible digestibilité réelle. Dans le second cas, les pertes endogènes basales

prennent beaucoup plus d'importance du fait de la forte digestibilité réelle. Dans les deux cas, on peut également supposer que les peptides sont en proportion importante dans le contenu iléal. Donc, même si le peptide issu de la PA₂ était présent dans les digestas de ces régimes, les quantités soumises à l'analyse ont pu être inférieures à la limite de détection. De la même façon, aucune bande correspondant à ce peptide n'était détectable en électrophorèse.

CONCLUSIONS

Les trois variétés de pois et le micro broyage testés en alimentation porcine ont montré peu de différences dans l'analyse immunochimique qualitative de contenus iléaux. Toutefois, les flux iléaux de protéines calculés par kg de matière sèche ingérée à partir de l'analyse densitométrique confirment les calculs de digestibilité apparente et apportent des informations sur les proportions relatives de chaque protéine, selon sa masse moléculaire. Une identification précise de chaque bande permettrait de connaître l'origine des pertes protéiques de 10 à 95 kDa. Il semble que les masses moléculaires élevées correspondent plus à des pertes endogènes et les masses moléculaires faibles plus à des pertes alimentaires. Les protéines majeures du pois ont disparu dans les contenus iléaux. Seules les lectines résistent à la dégradation et représentent jusqu'à 25 % des protéines indigestibles de masse supérieure à 15 kDa, alors qu'elles ne constituent que 2,5 à 5 % des protéines totales de l'aliment. Les autres protéines présentes en quantité plus importantes dans la graine, comme la PA₂, sont à peine détectables et sont donc bien hydrolysées. Cependant, les peptides de moins de 10-15 kDa échappent à la présente analyse. Des techniques plus adaptées (HPLC) devraient permettre de caractériser ces peptides endogènes ou alimentaires et les mécanismes qui limitent leur hydrolyse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BACON J.R., LAMBERT N., ARTHUR A.E., DUCHENE C., 1995. *J. Sci. Food Agric.* 67, 101-108.
- BERTRAND G., SÈVE B., GALLANT D. J., TOMÉ D. 1988. *Sci. Aliments*, 8, 187-212
- CANIBE, N., EGGUM, B.O., 1997. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 293-310.
- CRÉVIEU I., CARRÉ B., CHAGNEAU A.M., QUILLIEN L., GUÉGUEN J., BÉROT S., 1997. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1295-1300.
- GATEHOUSE J.A., GILROY J., HOQUE M.S., CROY R.R.D., 1985. *Biochem. J.*, 225, 239-247.
- HAJOS G., GELENCSE E., PUTZAI A., GRANT G., SAKHRI M., BARDOCZ S., 1995. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 164-170.
- HESS V., THIBAULT J.N., DUC G., MELCION J.P., VAN EYS J., SÈVE B., 1998. *Journées Rech. Porcine en France*, 30, 223-229.
- HUISMAN J., HEINZ T.H., VAN DER POEL A.F.B., VAN LEEUWEN P., SOUFFRANT W.B., VERSTEGEN M.W.A., 1992. *Brit. J. Nutr.*, 68, 101-110.
- LAEMMLI U.K., 1970. *Nature*, 227, 680-685.
- PERROT C., QUILLIEN L., GUÉGUEN J., 1999. *Sci. Aliments*, 19, 377-390.
- SALGADO P., MONTAGNE L., FREIRE J.P.B., FERREIRA R.B., TEIXEIRA A., BENTO O., ABREU M.C., TOULLEC R., LALLÈS J.P., 2002. *J. Nutr.*, 132, 1913-1920.
- TOWBIN H., STAHELIN T., GORDON J., 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76 (9), 4350-4354.