

ETUDE DE LA DIGESTION DES PROTEINES DE POIS CHEZ LE POULET

Créviu Irène¹, Carré Bernard¹, Guéguen Jacques², Melcion Jean-Pierre³, Quillien Laurence²,
Chagneau Anne-Marie¹, Bérôt Serge²

¹ Station de Recherches Avicoles, Centre INRA de Tours, 37380 Nouzilly,

² Laboratoire de Biochimie et Technologie des Protéines, Centre INRA de Nantes, Rue de la Géraudière,
44072 Nantes,

³ Laboratoire de Technologie des Aliments des Animaux, Centre INRA de Nantes, Rue de la Géraudière,
44072 Nantes

Résumé

La digestion des protéines de pois a été étudiée chez de jeunes poulets. Deux régimes à base de pois, l'un de granulométrie grossière (PG), l'autre de granulométrie fine (PF), ainsi qu'un régime protéoprive (NF) ont été utilisés. La digestion des protéines a été étudiée par gel filtration et électrophorèse. La digestibilité fécale apparente des protéines est plus faible pour le PG (71,0 %) que le PF (77,9 %). Les digesta du PF contiennent des quantités plus importantes de faibles PM, en particulier les peptides intermédiaires (15 000-3 500) représentent des quantités non négligeables. Les profils électrophorétiques des digesta de PG sont similaires au régime, alors que dans le cas des fines particules, seuls quelques polypeptides persistent : l'albumine PA2, la lectine, et des peptides de légumine de PM 19 500-25 000. Trois facteurs limitants de la digestion des protéines de pois ont ainsi été mis en évidence: la granulométrie de l'aliment, la structure de certaines protéines et l'accumulation de peptides dans l'intestin.

Abstract

Pea protein digestibility by broilers

Pea protein digestion was studied in broilers. Birds were fed coarse pea (CP), fine pea (FP), or nitrogen-free (NF) diets. Protein digestion was studied in gastro-intestinal contents of chicks by gel filtration and electrophoresis. Apparent fecal protein digestibility was lower for CP (71.0 %) than FP (77.9 %) diets. Amounts of low MW compounds were higher in the case of CP than FP, intermediate peptides (15 000-3 500) were particularly high. Similar electrophoresis pattern appeared for CP digesta and pea diet, whereas fine particles showed only some protein bands : albumin PA2, lectin, and polypeptides of legumin of MW in the range 19 500-25 000. In this study, three limiting factors appeared : particle size, protein structure and peptide accumulation in intestine.

Introduction

Le pois (*Pisum sativum* L.) est une matière première (MP) riche en protéines (18-30 %) dont la digestibilité chez les monogastriques, aussi bien chez les oiseaux (Conan et Carré, 1989) que chez les porcs (Perez et Bourdon, 1992), présente des variations importantes. Par analogie avec d'autres légumineuses telles que le soja, les facteurs antinutritionnels (ANF), tels que les inhibiteurs tryptiques (IT) ont été incriminés. Or il n'existe pas de relation évidente entre teneur en IT et digestibilité des protéines. D'autres facteurs doivent donc intervenir dans l'explication de la variabilité de digestibilité des protéines de cette graine. Contrairement aux graines de céréales qui montrent un effet de la taille des particules sur la digestibilité des protéines chez les oiseaux (Saunders et al, 1969), ce n'est pas le cas pour les graines de légumineuses (Lacassagne et al, 1991; Conan et al, 1992). Plusieurs études *in vitro* (Deshpande et Damodaran, 1989; Perrot, 1994), et *in vivo* (Spencer et al, 1988; Aufrère et al, 1994; Lallès et al, 1996) ont montré l'influence de la structure des protéines sur leur hydrolyse. Dans le cas du pois, les protéines sont constituées de deux grandes classes de protéines, les albumines et les

globulines (légumine et vicilines), de structure différente.

Dans le but de comprendre l'origine de la variabilité de la digestibilité des protéines de pois, une étude a été menée sur des poulets pour étudier d'une part l'influence de la granulométrie de l'aliment et d'autre part l'effet de la structure des protéines sur leur digestibilité.

1. Matériels et méthodes

1.1. Alimentation expérimentale des animaux

Le pois (variété Messire) a été broyé selon deux granulométries différentes et homogènes, une farine fine (30,9 µm) et une farine grossière (920,0 µm) contenant le moins possible de fines particules. Ces deux farines ont été utilisées comme source unique de protéines dans deux aliments différents, pois grossier (PG) et pois fin (PF). De plus on utilise un régime protéoprive (NF). Un marqueur indigestible (0,5 % de polyéthylène glycol 4 000, PEG) est ajouté dans chaque aliment.

L'aliment contenant du pois de fine granulométrie (PF) est administré *ad libitum* (al) ou par gavage humide (gav), et celui de granulométrie grossière (PG) *ad libitum*. Le régime protéoprive est administré par gavage.

Ces régimes expérimentaux ont été administrés à sept animaux par lot, pendant cinq jours. Les deux derniers jours ont été utilisés pour effectuer un bilan. 4 h 30 après le dernier repas, les animaux ont été abattus et leurs contenus gastro-intestinaux ont été collectés, puis immédiatement congelés et lyophilisés. Dans le cas des digesta de pois grossier, les grosses particules sont séparées des fines.

1.2. Analyse des contenus digestifs

Dans l'intestin grêle, les quantités de protéines ont été déterminées par dosage d'azote selon la méthode de Kjeldahl (AFNOR, 1985). Dans les excréta l'azote protéique a été déterminé selon la méthode de Terpstra et de Hardt (1974). Dans l'iléon terminal et les excréta, les protéines ont aussi été déterminées à partir du dosage des acides aminés. La digestibilité apparente des protéines a été déterminée à l'aide du PEG dosé selon la méthode de Malawer et Powel (1967).

Dans les extraits SDS (95 °C, 20 min) des contenus digestifs, la répartition des poids moléculaires (PM) des composants azotés (CA) a été étudiée par gel filtration avec une colonne TSK de type PW en haute pression. Les éluats ont été détectés par dosage des extrémités NH₂ par la méthode de l'orthophthaldialdéhyde (Frister *et al*, 1988) après hydrolyse acide des fractions chromatographiques. Les extraits SDS des contenus digestifs ont été analysés par électrophorèse. Les protéines de pois résistantes ont été reconnues par des anticorps spécifiques.

2. Résultats et discussions

2.1. Effet de la granulométrie

Tout le long du tube digestif, la digestibilité des protéines est supérieure dans le cas des fines particules par rapport aux grosses particules quelque soit le mode d'alimentation et la quantité ingérée (TABLEAU 1).

Les CA des régimes sont constitués majoritairement de PM > 15 000 (55,0 %). Les quantités relatives de très petits PM dans les contenus digestifs des animaux sont toujours plus faibles dans le cas du PG que du PF (TABLEAU 2). Dans l'intestin, les proportions de PM > 15 000 sont plus élevées pour PG que pour PF.

L'électrophorèse des grosses particules des iléons des animaux nourris avec du pois gros montrent des profils similaires à l'aliment alors que dans le cas du pois fin ou des fines particules du pois grossier, seules quelques bandes persistent (FIGURE 1).

Le devenir des protéines le long du tube digestif dépend donc de la taille des particules de la farine de pois. Les protéines présentes dans les grosses particules sont moins bien dégradées, entraînant de moins bonne digestibilité. Les parois cellulaires pourraient en être la cause. Par contre dans le cas des fines particules, l'hydrolyse pourrait être améliorée par augmentation des surfaces de contact enzymes/substrat. Cependant, cette hydrolyse rapide des protéines entraîne l'accumulation de peptides de PM intermédiaires (15 000-3 500) qui pourraient représenter un facteur limitant de la digestion des protéines.

Cet effet de la granulométrie des aliments à base de légumineuses n'a probablement pas été observé jusqu'alors (Wünsche *et al*, 1988; Lacassagne *et al*, 1991; Conan *et al*, 1992), à cause de l'utilisation de farines hétérogènes. Par contre dans le cas des céréales qui contiennent des protéines résistantes à l'hydrolyse (Oria *et al*, 1995), ne conduisant pas à l'accumulation de peptides (Amiot, 1981), l'effet de la taille des particules a déjà été montré (Saunders *et al*, 1969).

Au niveau des excréta, les digestibilités apparentes baissent sauf pour le pois grossier. Ce phénomène est vraisemblablement dû à un transit différent des aliments selon leur granulométrie.

2.2. Protéines résistantes

Plusieurs protéines de pois s'avèrent résistantes jusqu'à la fin de l'iléon (FIGURE 1). Ainsi parmi les globulines, seuls des polypeptides de PM 19 500-25 000, issus de légumine, persistent. Ils pourraient provenir en particulier des sous-unités basiques de structure compacte et hydrophobe. Les vicilines et les légumine α disparaissent totalement. Ces observations confirment des études *in vitro* (Perrot, 1994) et *in vivo* (Lalles *et al*, 1996).

Parmi les albumines, la lectine et l'albumine majeure PA2 persistent jusqu'à l'iléon terminal. La résistance de la lectine avait déjà été observée *in vitro* (Perrot, 1994) et *in vivo* (Aubry et Boucrot, 1986). Elle pourrait être due à sa structure compacte, sa teneur élevée en feuillet β (Foriers *et al*, 1981) et sa liaison à des ligands pourrait la protéger de l'hydrolyse (Pusztai *et al*, 1993). La résistance de la PA2 observée aussi *in vivo* (Spencer *et al*, 1988) et *in vitro* (Gruen *et al*, 1987) pourrait être liée à sa teneur élevée en cystéine (Schroeder *et al*, 1984) et donc en ponts disulfures.

La présence de ces protéines non hydrolysées montre une résistance à la protéolyse de certaines protéines de pois chez le poulet.

D'autres part une protéine endogène de PM élevé (56 000) persiste jusqu'à la fin de l'iléon.

Conclusion

Au cours de ce travail sur l'étude des facteurs responsables des limitations de la digestion des protéines de pois, trois facteurs responsables ont été mis en évidence.

- la granulométrie : les protéines bloquées dans les structures cellulaires s'avèrent très mal hydrolysées
- l'accumulation de peptides intermédiaires (15 000-3 500) dans la lumière intestinale dans le cas de régime de fine granulométrie.
- la structure de certaines protéines de pois : polypeptides de légumineuses, les PA2 et les lectines.

Références

AFNOR, 1985. In : Aliment des animaux, méthodes d'analyses françaises et communautaires. 2ème édition. AFNOR, Paris-La défense, pp 87-93

Amiot J., Brisson G.J., Delisle J., Goulet G., Savoie L., Jones J.D., 1981. Nutr. Rep. Int., 24, 513-529.

Aubry M., Boucrot P., 1986. Ann. Nutr. Metab., 30, 175-182

Aufrère J., Graviou D., Michalet-Doreau B., 1994. Reprod. Nutr. Dev., 34, 483-490

Conan L., Carré B., 1989. Anim. Feed Sci. Techn., 26, 337-345

Conan L., Barrier-guillot B., Widiez J.L., Lucbert J., 1992. In: Proceedings of the 1st european conference on leguminous grain. Improving production and utilisation of grain legumes, ed EAP, Angers, France, 479-480

Foiers A., Lebrun E., Van Rapenbusch R., De Neve R., Strosberg A.D., 1981. J. Biol. Chem., 256, 550-5560

Frister H., Meisel H., Schlimme E., 1988. Fresenius Zeitung Anal. Chem., 330, 631-633

Gruen L.C., Guthrie E., Blagrove R.J., 1987. J. Sci. Food Agric., 41, 167-178

Lacassagne L., Melcion J.P., de Monredon F., Carré B., 1991. Anim. Feed Sci. Techn., 34, 11-19

Lalles J.P., Quillien L., Toullec R., 1996. In : Proceedings of the Conference on plant proteins from European crops, Nov 25-26, Nantes, pp 55

Malawer S.J., Powel D.W., 1967. Gastroenterol., 53, 250-256

Oria M.P., Hamaker B.R., Shull J.M., 1995. J. Cereal Sci., 22, 85-93

Perez J.M., Bourdon D., 1992. In : Proceedings of the 1st european conference on leguminous grain.

Improving production and utilisation of grain legumes, ed EAP, Angers, France, pp 489-490

Perrot C., 1994. Thèse, Université Paris VII

Pusztai A., Begbie R., Grant G., Ewen S.W.B., Bardocz S., 1993. In : *In Vitro* Digestion For Pigs and Poultry; Fuller, M. F.; Ed.; CAB International, Wallingford, UK, 1993; pp 45-61

Saunders R.M., Walker, H.G., Kohler, G.O., 1969. Poult. Sci., 48, 1497-1503

Schroeder H.E., 1984. J. Sci. Food Agric., 35, 191-198

Spencer D., Higgins T.J.V., Preer, M., Dove, H., Coombe, J.B., 1988. Br. J. Nutr., 60, 241-247

Terpstra K., de Hart N., 1974. Z. Tierphysiol. Tierernähr. u. Futtermittel., 32, 306-320

Wünsche J., Herrmann U., Meinel M., Henning U., 1988. Arch. Anim. Nutr., 38, 37-52

TABEAU 1 : Digestibilité des protéines le long du tractus gastro-intestinal pour les régimes pois grossier, pois fin et protéoprive¹

Régimes ²	PG	PF	FP	NF	ESM
Modes d'alimentation ³	A.l.	Gav.	A.l.	Gav.	
Aliment ingéré (2 jours)	172,6	145,6	110,0	147,2	4,23
Jéjunum proximal	27,4 ^a	62,5 ^a	58,0 ^a		9,85
Iléon distal	70,2 ^a	89,5 ^b	86,9 ^b		0,94
Iléon distal (Acides aminés)	68,0 ^a	89,5 ^b	—		2,09
Excréta ^{4,5}	71,0 ^a	77,9 ^b	78,7 ^b		1,77
Excréta ⁴ (Acides aminés)	70,1 ^a	77,1 ^b	—		2,21

¹ Les moyennes sur la même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes (p < 0,05)

² PG : pois grossier, PF : pois fin; NF : protéoprive.

³ A.l. : ad libitum; Gav. : gavage.

⁴ Excréta collectés durant les deux jours de période de bilan

⁵ Mesuré avec la méthode de Terpstra et de Hart (1974)

TABLEAU 2. : Distribution des poids moléculaires (pourcentage du total) des composés azotés des digesta pour les régimes pois grossier, pois fin et protéiprive¹

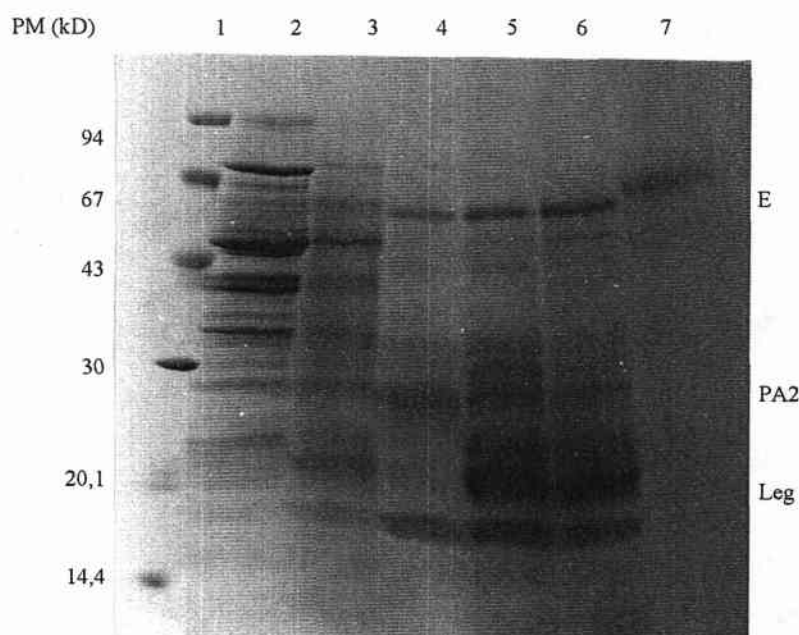
Digesta	Régimes ²	Modes d'alimentation ³	Fractions de PM			
			+15000	15-3500	3500-500	- 500
Gésier	PG	A.l.	21,1 ^b	32,4 ^b	34,4 ^c	12,1 ^a
	PF	Gav.	22,3 ^b	19,7 ^a	25,3 ^{ab}	32,7 ^{bc}
	PF	A.l.	6,1 ^a	13,6 ^a	30,7 ^{bc}	49,6 ^c
	NF	Gav.	33,3 ^b	22,0 ^a	18,7 ^a	26,1 ^{ab}
	ESM		3,65	2,23	1,96	4,71
Jéjunum supérieur	PG	A.l.	29,1 ^b	28,6 ^b	26,6 ^{ab}	15,7 ^a
	PF	Gav.	18,4 ^a	25,6 ^{ab}	31,1 ^b	24,9 ^b
	PF	A.l.	18,9 ^a	23,4 ^a	30,8 ^b	26,9 ^b
	NF	Gav.	30,4 ^b	25,4 ^{ab}	21,7 ^a	22,6 ^{ab}
	ESM		2,04	1,29	1,26	2,18
Iléon inférieur	PG	A.l.	34,2 ^b	30,1 ^b	26,4 ^{ab}	9,2 ^a
	PF	Gav.	24,9 ^a	28,6 ^b	30,2 ^{bc}	16,4 ^{bc}
	PF	A.l.	21,8 ^a	27,4 ^{ab}	30,8 ^c	20,0 ^c
	NF	Gav.	40,6 ^b	24,1 ^a	25,3 ^a	10,0 ^{ab}
	ESM		2,09	0,98	1,17	1,64

¹ Les moyennes dans la même colonne suivie de lettres différentes pour le même digesta sont significativement différentes (P < 0,05)

² Voir la légende du Tableau 1

³ Voir la légende du Tableau 1

FIGURE 1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (gradient 10-25 %) en milieu SDS dans des conditions réductrices, détectée au bleu de Coomassie : Régime pois et iléons des animaux alimentés avec du pois gros (grosses et fines particules), du pois fin et un régime protéiprive.



De gauche à droite : (1) marqueurs de poids moléculaires (voir figure 10); (2) protéines de pois; (3) grosses particules de digesta iléal de pois grossier; (4) fines particules de digesta iléal de pois grossier; (5) digesta iléal de pois fin ad libitum; (6) digesta iléal de pois fin gavé; (7) digesta iléal de protéiprive.

Légende : E : endogène; PA2 : albumine PA2; Leg : légumine.