



**HAL**  
open science

## Intégrité de la paroi cellulaire du pois et impact sur la digestibilité des protéines

Myriam Grundy, Marie-Hélène Perruchot, David Renaudeau, Jaap J. van Milgen

### ► To cite this version:

Myriam Grundy, Marie-Hélène Perruchot, David Renaudeau, Jaap J. van Milgen. Intégrité de la paroi cellulaire du pois et impact sur la digestibilité des protéines. 56. Journées de la Recherche Porcine (JRP), INRAE; Ifip, Feb 2024, Saint-Malo, France. pp.127-132. hal-04448076

**HAL Id: hal-04448076**

**<https://hal.inrae.fr/hal-04448076>**

Submitted on 13 Feb 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



# Intégrité de la paroi cellulaire du pois et impact sur la digestibilité des protéines

Myriam GRUNDY, Marie-Hélène PERRUCHOT, David RENAUDEAU, Jaap VAN MILGEN

PEGASE, INRAE, Institut Agro, 35590 Saint Gilles, France

[Myriam.grundy@inrae.fr](mailto:Myriam.grundy@inrae.fr)

Avec la collaboration de Linda GIBLIN, Sandra WIART-LETORT, Frédérique MAYEUR-NICKEL, Gaëlle BOUDRY, Etienne LABUSSIÈRE, Guillaume POUPEAU, Julien GEORGES, Maxence NOEL et Yannick LE NEVANEN

## Intégrité de la paroi cellulaire du pois et impact sur la digestibilité des protéines

Les fibres alimentaires contenues dans les régimes alimentaires du porc peuvent influencer de manière négative la digestibilité des protéines, et de ce fait les performances des animaux. Cette étude avait pour but d'étudier un mécanisme spécifique des fibres, l'encapsulation des nutriments, compromettant la digestibilité et l'absorption de la matière azotée du pois (ingrédient modèle) chez le porc. Pour ce faire, une étude chez le porc en croissance (six mâles entiers de race Piétrain × (Large White × Landrace) inclus dans un dispositif en carré latin 2 x 2 répété sur deux périodes de 14 jours) combinée à des expériences *in vitro* ont été réalisées. Ainsi, du pois, sous différentes formes (farines, protéines extraites, particules de différentes tailles et cellules isolées), a été analysé, avant et après digestion, en utilisant différentes méthodes biochimiques et biophysiques. De manière générale, les données *in vitro* montrent qu'une faible taille des particules de pois augmente leur digestibilité de 30 % ( $P < 0,05$ ). Ces résultats concordent avec ceux obtenus chez l'animal qui montrent une augmentation de 20 % ( $P < 0,05$ ) de la digestion des protéines entre farine structurée et déstructurée. La pénétration des enzymes digestives dans les parois cellulaires du pois semble dépendre de la taille des particules. Des particules de pois plus grosses nécessitent un temps de digestion plus élevé pour permettre une hydrolyse des protéines (une fraction restant intacte pour les particules les plus larges). D'un point de vue physiologique, les fibres du pois semblent avoir un effet abrasif sur les cellules intestinales. Cette étude confirme que la structure de l'aliment influence la digestion des protéines et leur utilisation par l'animal. Les fibres alimentaires, en fonction de leur intégrité, ont différents effets sur la physiologie intestinale.

## Pea cell wall integrity and impact on protein digestibility

Dietary fibre in pig diets can decrease protein digestibility and absorption, and thus animal performance. The aim of this study was to investigate a specific fibre mechanism, nutrient encapsulation, which decreases the digestibility and absorption of pea nitrogen (a model ingredient) in pigs. To this end, a study of growing pigs (six entire males of the Pietrain × (Large White × Landrace) in a 2 x 2 Latin square design, replicated over two 14-day periods), combined with *in vitro* experiments, was performed. Peas in various forms (flours, extracted proteins, particles of different sizes and isolated cells) were analysed, before and after digestion, using a variety of biochemical and biophysical methods. Overall, *in vitro* data showed that smaller particle sizes of pea increase digestibility of 30 % ( $P < 0.05$ ). These results agree with those obtained in the pigs, which showed a 20 % ( $P < 0.05$ ) increase in protein digestibility between structured and unstructured flour. The particle size appeared to influence how well digestive enzymes could penetrate the pea cell wall. Larger pea particles required more digestion time to enable protein hydrolysis (and a fraction of the larger particles remained intact). From a physiological viewpoint, pea dietary fibre appears to abrade intestinal cells. This study confirms that the structure of the feed influences protein digestion and use by pigs. Effects of dietary fibre on intestinal physiology depend on the cell wall integrity.

## INTRODUCTION

Un apport élevé en fibres dans l'alimentation peut avoir une influence néfaste sur l'utilisation des nutriments chez le porc (Le Sciellour *et al.*, 2018 ; Noblet et Le Goff, 2001). Toutefois, d'un point de vue fonctionnel, les fibres permettent d'améliorer la santé intestinale et la fonction immunitaire via notamment l'activité microbienne (Jha *et al.*, 2019). L'effet des fibres sur le tube digestif et la digestion dépend de leur nature et des propriétés physico-chimiques qui leur sont associées (Bach Knudsen, 2001 ; Williams *et al.*, 2019). Les mécanismes par lesquels les fibres constitutives des parois cellulaires influencent la digestion des protéines sont encore mal compris. En pratique, cette méconnaissance peut avoir des conséquences importantes sur la manière d'évaluer la valeur protéique des ressources riches en fibres. D'après les données disponibles dans la littérature, les polysaccharides complexes pourraient avoir un effet direct sur l'accessibilité des enzymes digestives aux protéines (phénomène d'encapsulation des nutriments) mais également un effet indirect via une modification du transit et plus généralement des particularités physico-chimiques du bol alimentaire (Bach Knudsen, 2001 ; Bach Knudsen *et al.*, 2012). En particulier, le phénomène d'encapsulation influence la quantité de protéines libérées de la matrice végétale (bioaccessibilité) et la vitesse à laquelle elles sont hydrolysées ; ces paramètres vont influencer le site d'absorption des produits de digestion ainsi que la vitesse et étendue d'apparition des acides aminés dans le sang. Pour être compris, ces processus complexes nécessitent à la fois des analyses *in vitro* afin de déterminer les comportements des fibres durant la digestion et des études *in vivo* pour confirmer les données obtenues et relier ces mécanismes aux réponses physiologiques mesurées chez l'animal.

Ce projet visait à déterminer l'effet de la structure de la matrice alimentaire (encapsulation par les parois cellulaires) sur la biodisponibilité et la digestibilité de la fraction azotée. Pour cela, nous avons utilisé le pois comme modèle car ses parois cellulaires sont principalement composées de polysaccharides insolubles (pectine et hémicellulose insolubles) en milieu aqueux (tel que le lumen du tube digestif). Cette étude a combiné des approches *in vivo* et *in vitro* pour étudier l'impact de l'encapsulation des protéines par les parois cellulaires sur leur digestibilité. En particulier, des cellules épithéliales intestinales porcines provenant du jéjunum (IPEC-J2) ont été utilisées pour évaluer l'effet des fibres du pois sur l'intégrité des cellules intestinales.

## 1. MATERIEL ET METHODES

### 1.1. Matières premières

Les graines (*Pisum sativum* L.), les protéines (Prot), l'amidon et les fibres de pois (Fib) ont été fournis par l'entreprise Roquette (Vic-sur-Aisne, France). Les graines de pois ont été broyées à l'aide d'un broyeur à marteaux équipé d'une grille de 2,5 mm pour produire de la farine de pois. Les ingrédients du pois ont été inclus dans deux formulations d'aliments de composition chimique identique mais de deux formes différentes : farine brute (R1, parois cellulaires intactes et protéines encapsulées au sein des fibres) ou farine reconstituée à partir des différentes fractions isolées du pois : protéines, fibres, amidon (R2, Tableau 1). De plus, la farine a été fractionnée en particules de différentes tailles à l'aide de tamis (1000, 600 et 300 µm) afin de déterminer à partir de quelle taille la digestion de la fraction

azotée était diminuée. Enfin, des cellules isolées à partir du pois ont été utilisées comme échantillon contrôle pour lequel les protéines étaient totalement encapsulées par les parois cellulaires - évaluation de la porosité des parois cellulaires du pois aux enzymes digestives. Les cellules ont été isolées par incubation des graines de pois dans une solution contenant du bicarbonate (1,5 %, w/v) et du carbonate (0,5 %, w/v) de sodium pendant 16 h, puis cuisson à 60°C pendant 1 h, séparation au mortier et au pilon, et collection sur tamis (150 et 71 µm) comme réalisé précédemment (Junejo *et al.*, 2021).

**Tableau 1** – Ingrédients inclus dans les formulations R1 et R2

Formulation	R1	R2
Ingrédients (%)		
Pois	82,0	
Fibres de pois		24,8
Protéines de pois		20,2
Amidon de pois	14,7	51,7
Phosphate bicalcique	1,1	1,1
Carbonate de calcium	1,0	1,0
Premix 0,5%	0,5	0,5
Sel	0,4	0,4
Dioxyde de titane	0,3	0,3
Total	100,0	100,0

### 1.2. Caractérisation chimique et physique des matières premières et digestats

#### 1.2.1. Composition nutritionnelle

La teneur en protéines a été mesurée selon la méthode Dumas (LECO, FP828 Carbon/Nitrogen/Protein Determinator, Villepente, France, AOAC 968.06) en utilisant un facteur de conversion de l'azote de 5,4 (Mariotti *et al.*, 2008). Les teneurs en matières sèches (à 104°C jusqu'à obtention d'un poids constant, AOAC 935.29) ont également été déterminées. Les teneurs en fibres insolubles dans les détergents neutres (NDF), en fibres insolubles dans les détergents acides (ADF) et en lignine ont été déterminées à l'aide de sacs à fibres (modèle F57, Ankom Technology, Macedon, NY, USA) et d'un analyseur de fibres (ANKOM DELTA Automated Fiber Analyzer, Ankom Technology). Les échantillons ont également été analysés pour leur composition en fibres solubles (SDF) et insolubles (IDF) en utilisant la méthode AOAC 991.43 (Megazyme kit assay, Megazyme, Product Code : K-TDFR). Les fibres alimentaires totales (TDF) ont ensuite été calculées en ajoutant le SDF à l'IDF. Chaque série d'échantillons a été analysée en trois exemplaires.

#### 1.2.2. Taille des particules

La distribution de la taille des particules des échantillons (matières premières et digestats, *in vivo* et *in vitro* comme décrit ci-dessous) a été mesurée à l'aide d'un granulomètre à diffraction laser Malvern 3000 couplé à une unité de dispersion (Hydro LV) remplie d'eau distillée (Malvern Instruments Ltd.). L'indice de réfraction de l'eau était de 1,330 et de 1,600 pour les matières premières, et la valeur d'absorbance était de 0,001. Les distributions des tailles des particules, exprimées en pourcentage de volume moyen, sont présentées comme les moyennes d'au moins trois répétitions par échantillon.

**Tableau 2** – Composition nutritionnelle<sup>1</sup> des régimes et ingrédients utilisés dans cette étude

Composition	R1	R2	Farine	Cellules
EB (MJ/kg)	17,31	17,78	18,17	
Matières sèches (%)	87,48	90,58	87,68	21,07
Protéines (% N x 5,4)	17,01	17,01	20,79	8,57
Amidon (%)	53,63	55,28	49,04	
TDF (%)	18,20	18,2	19,58	13,83
IDF (%)	13,95	13,52	13,75	13,22
SDF (%)	4,23	4,68	5,83	1,24
NDF (%)	5,90	6,76	7,24	
ADF (%)	1,42	2,15	1,75	
ADL (%)	0,04	0,03	0,06	

<sup>1</sup> EB : énergie brute, MS : matière sèche, TDF : fibres alimentaires totales, IDF : fibres alimentaires insolubles, SDF : fibres alimentaires solubles, NDF : fibres insolubles dans les détergents neutres, ADF : fibres insolubles dans les détergents acides, ADL : lignine insoluble dans les détergents acides.

### 1.2.3. Observation microscopique des digestats

Les échantillons destinés à la microscopie ont été prélevés avant et après digestion, montés sur des lames de microscopie, puis visualisés à l'aide d'un microscope apotome et du logiciel Zen (Apotome™, Zeiss, France). Les images ont été capturées à l'aide d'objectifs 10x et 20x.

## 1.3. Etude *in vivo*

Huit porcs mâles entiers, croisés Piétrain × (Large White × Landrace), ont été étudiés dans un dispositif en carré latin répété sur deux périodes de 14 jours. Les porcs ont été logés dans des enclos individuels et ont reçu le régime expérimental (R1 ou R2) six fois par jour. À la fin de l'expérience, les animaux ont été sacrifiés, le contenu de leur système digestif et des biopsies d'intestin grêle ont été collectés (5 h après l'ingestion du repas). Les échantillons prélevés ont été observés par microscopie optique (voir section 1.2.3.). La taille des particules des matières premières et des digestats a également été déterminée comme décrit dans la section 1.2.2.

Les échantillons de tissus d'intestin grêle ont été prélevés au niveau du jéjunum (environ 3 cm). Après avoir recueilli le contenu, ils ont été lavés avec une solution saline (PBS) et fixés dans du formol (4%). Après des bains successifs d'éthanol et de butan-1-ol, les échantillons ont été intégrés dans de la paraffine, sectionnés et colorés à l'hématoxyline et l'éosine des coupes en vue de l'analyse morphométrique des villosités.

## 1.4. Etude *in vitro*

### 1.4.1. Modèle de digestion

Les régimes et ingrédients (R1, R2, les particules de farine de pois de différentes tailles, les cellules isolées, et les protéines et les fibres pures de pois) ont été digérées *in vitro*. Un modèle simulant la digestion gastro-intestinale porcine a été adapté d'une méthode standardisée (Brodkorb *et al.*, 2019). Brièvement, après 2 min d'incubation à 39°C à pH 7 pour simuler la phase orale, les échantillons ont été soumis à des digestions gastrique (120 min à 39°C, pH 3 ; en présence de pepsine) et duodénale (120 min à 39°C, pH 7 ; en présence de sels biliaires et de pancréatine). La composition des fluides

simulés utilisés pour chaque phase de digestion peut être consultée ailleurs (Brodkorb *et al.*, 2019). La quantité d'échantillon utilisée a été ajustée en fonction de la teneur en protéines pour maintenir un ratio substrat/protéases constant et correspondait à 0,130 g de protéines sur la base du poids sec. Les réactions enzymatiques ont été arrêtées en augmentant le pH à 9 avec NaOH 5 N à la fin de la phase intestinale. Chaque digestion a été réalisée en trois exemplaires sans (protéines bioaccessibles) et avec (protéines hydrolysées) enzymes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (2 500 g à 4°C pendant 10 min) ; une partie du surnageant collecté (pour les expériences d'absorption, section 1.4.2.) et le culot lavé et filtré à l'aide d'un tamis cellulaire (Falcon®, pores de 40 µm). L'étape de lavage est indispensable à l'analyse des protéines avec les LECO car elle permet d'éliminer les enzymes et autres protéines des préparations de pepsine, de pancréatine et de sels biliaires.

### 1.4.2. Modèle d'intégrité et de perméabilité cellulaire

Les expériences sur l'intégrité des cellules intestinales ont été réalisées à partir de la lignée cellulaire IPEC-J2 (cellules épithéliales intestinales porcines du jéjunum). Les IPEC-J2 ont été cultivées en insert (inserts de membrane en polyester de taille de pore 0,4 µm) dans un milieu de culture contenant du DMEM (Milieu de Eagle modifié par Dulbecco) / Ham's F-12, 5 % de sérum de porc, 1 % de mélange antibiotique-antimycosique, 1 % ITS (insuline humaine recombinante 1 mg/mL, transferrine 0,6 mg/mL et sélénium 0,6 µg/mL), et 5 ng/mL d'EGF (Epithelial Growth Factor). L'intégrité de la monocouche cellulaire a été évaluée via la mesure, tous les deux jours, de la résistance électrique transépithéliale (TEER). La perméabilité paracellulaire gastro-intestinale a été évaluée grâce à l'utilisation de macromolécules conjuguées à des fluorophores (l'isothiocyanate-dextran de fluorescéine FITC-dextran de 4kDa ou FD4).

Au bout de 11 jours de culture, les surnageants des digestats *in vitro* (protéines, ProtT ; fibres, FibT ; R1, R1T ; et R2, R2T) dilués au 10<sup>ème</sup> dans du milieu de culture et contenant du Pefabloc à 1 mM pour inhiber les protéases, ont été appliqués aux cellules. Afin de tester l'effet des différents agents de digestion, en particulier les électrolytes présents dans les fluides simulés, les sels biliaires, et les enzymes, différents contrôles ont été utilisés. Ainsi, le contrôle C correspond aux cellules sans digestat (milieu de culture seulement). Les échantillons H<sub>2</sub>O-bile et H<sub>2</sub>O+bile correspondent à de l'eau sans et avec bile, respectivement. Les Prot, Fib, R1 et R2 sont les ingrédients sans enzyme ni bile. Le FD4 à raison de 10 mg/mL a été ensuite ajouté, et sa diffusion suivie pendant 4 h en prélevant 100 µL du milieu basal et en lisant l'absorbance à 495/525 nm en spectrophotométrie.

Pour l'analyse par immunofluorescence, des protéines des jonctions serrées des cellules IPEC-J2, les Zonula Ocludens-1 (ZO-1), ont été marquées. Après fixation au méthanol, les cellules ont été perméabilisées avec 0,5 % de Triton X-100 et bloquées avec 5 % d'albumine de sérum bovin. Après lavage, les échantillons ont été incubés avec l'anticorps monoclonal de souris anti-ZO-1 (ZO1-1A12, Thermofisher, Saint-Herblain) couplé à de l'Alexa 594. Les images ont été capturées avec un microscope apotome en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 550 nm et d'émission de 605 nm.

## 1.5. Analyses statistiques

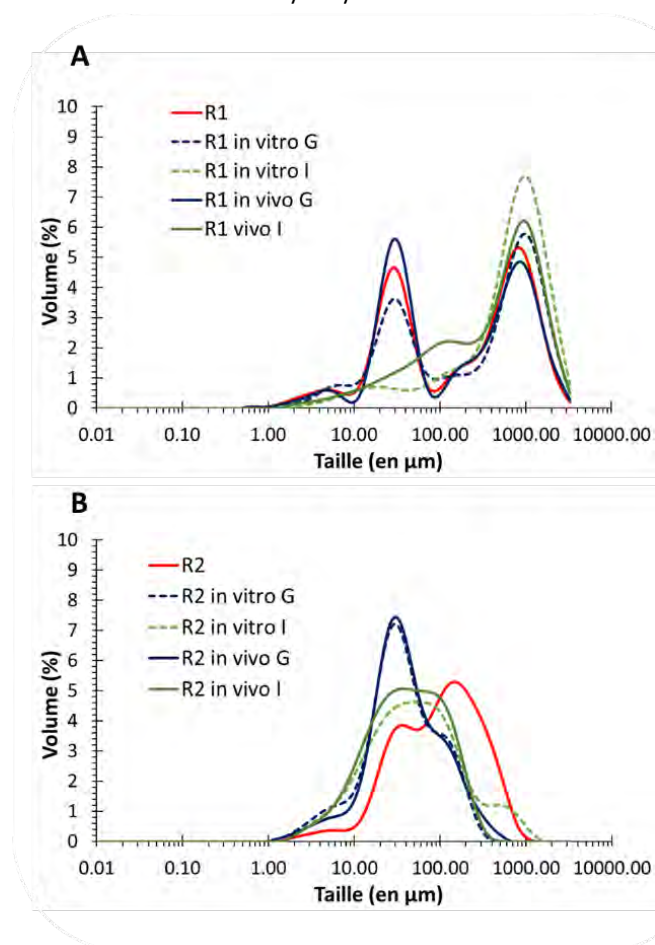
Les données ont été analysées à l'aide de R Studio (version 4.1.2) par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test *post hoc* non

paramétrique de Dunn. Pour tous les tests, le niveau de signification a été fixé à  $P < 0,05$  (bilatéral). Les données sont exprimées en tant que moyennes des répliquats (biologiques pour l'étude *in vivo* et les cellules IPEC-J2)  $\pm$  écart-type (SD).

## 2. RESULTATS

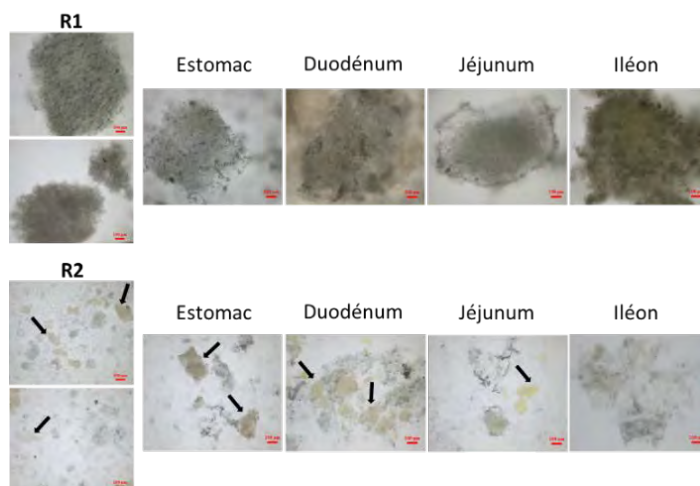
### 2.1. Caractérisation des digestats collectés *in vivo* et *in vitro*

La taille moyenne des particules des deux régimes, R1 et R2, avant et après digestion gastro-intestinale est représentée sur la figure 2. Les données *in vitro* et *in vivo* sont similaires et on observe un déplacement dans la distribution des tailles des particules de R1 vers la droite, indiquant une disparition des petites particules (c'est-à-dire des protéines solubilisées et des granules d'amidon) et un gonflement de certaines des grosses particules. En ce qui concerne R2, une tendance opposée est observée, les particules de plus grande taille étant décomposées, ceci suggère que les agrégats de protéines ont été dissous et finalement hydrolysés.



**Figure 1** – Taille des particules avant et après digestion de R1 (A) et R2 (B), *in vitro* et *in vivo*, G : phase gastrique et I : phase intestinale

La figure 2 confirme ces résultats et montre pour R1 la présence de particules de pois quasiment intactes même au dernier stade (iléon) de la digestion. Pour R2, la majorité des protéines semble avoir été digérée durant leur trajet à travers l'intestin grêle et n'est ainsi plus visible dans les échantillons issus de l'iléon.

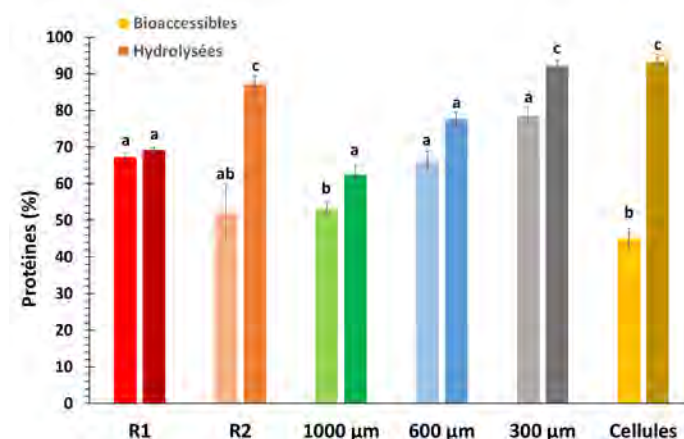


**Figure 2** – Images de particules récupérées avant (photos de gauche, R1 et R2) et après la digestion *in vivo* de R1 et R2 dans les différents compartiments du tube digestif. Les flèches noires indiquent les protéines (agrégats).

### 2.2. Etude *in vitro*

#### 2.2.1 Expériences de digestion *in vitro*

Le pourcentage de protéines libérées (protéines bioaccessibles) à partir des ingrédients du pois diffèrent entre eux (Figure 3). Bien que totalement bioaccessibles (non encapsulées par les fibres), les protéines de R2 n'étaient pas solubles, une proportion importante d'entre elles a donc précipité, d'où la faible valeur de protéines « bioaccessibles » (52 % comparé à 67 % pour R1). Les cellules quant à elles avaient le pourcentage de protéines bioaccessibles le plus bas, démontrant l'effet encapsulateur de la paroi cellulaire du pois. Comme attendu, lorsque la taille des particules diminuait la bioaccessibilité des protéines augmentait. La même tendance est observée pour les échantillons hydrolysés. La déstructuration des fibres du pois, R2 par rapport à R1, a entraîné une augmentation de 18 % de la digestion des protéines ( $P < 0,05$ ). Les cellules avaient une proportion de protéines hydrolysées élevée, similaire à R2, suggérant que les protéases ont pu pénétrer la paroi cellulaire.



**Figure 3** – Quantité de protéines, en pourcentage, libérées de la matrice (bioaccessibles) et hydrolysées pour chaque ingrédient.

Lettres communes :  $P > 0,05$ .

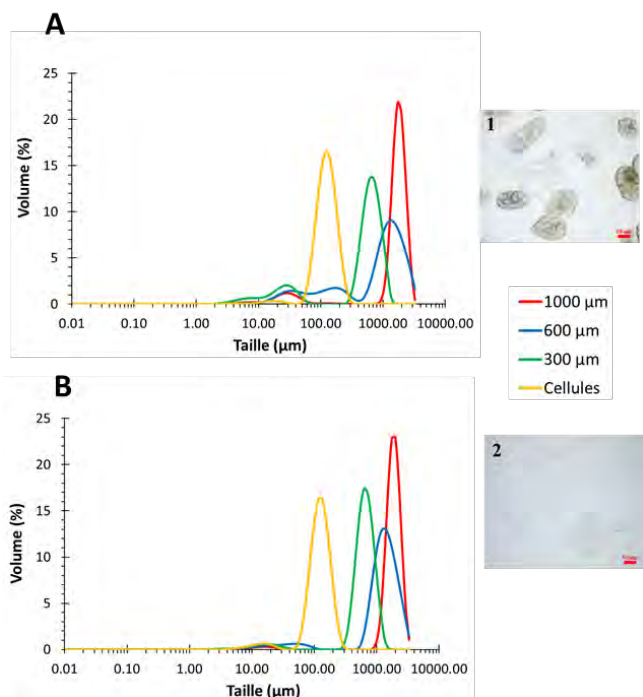


Ceci est confirmé par les données de la figure 4, en particulier l'image 2 qui montre des cellules vidées de leur contenu. La taille des cellules reste inchangée après digestion alors qu'une légère augmentation de la taille moyenne est observée pour les différentes fractions de la farine (1000, 600 et 300 µm). Cette tendance est certainement due à la disparition des petites particules (amidon et protéine libres) et un gonflement des particules comme observé pour R1.

### 2.2.2. Impact des digestats sur les cellules épithéliales

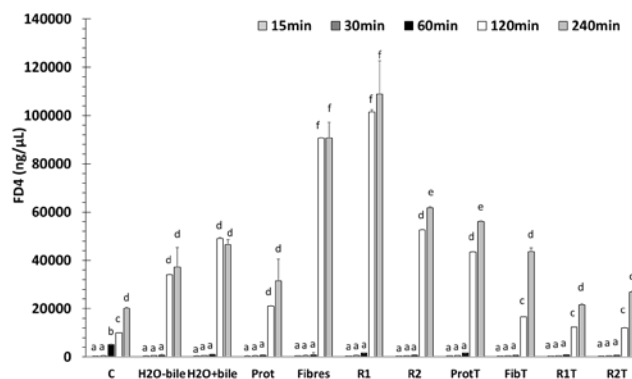
Les tissus intestinaux prélevés sur les animaux ont été observés par microscopie optique après fixation, et la taille des villosités et des cryptes mesurée. Les animaux ayant reçu R2 comme dernier traitement avaient des villosités de taille plus importante ( $P < 0,05$ ) au niveau du jéjunum (aire de 537 cm<sup>2</sup> et longueur moyenne de 383 µm) que les animaux ayant consommé R1 (aire de 488 cm<sup>2</sup> et longueur moyenne de 403 µm). Pour compléter ces résultats et comprendre les mécanisme derrière ces observations, l'intégrité et la perméabilité d'une lignée cellulaire, IPEC-J2, ont été évaluées.

La TEER augmente jusqu'au 9<sup>ème</sup> jour de culture (400 Ohms/cm<sup>2</sup> correspondant à une valeur physiologique), et reste stable jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour, quand commencent les expériences avec les digestats.



**Figure 4** – Taille de particules des ingrédients de pois après incubation sans (A, bioaccessibles) et avec (B, hydrolysées) enzymes. Les images à droite montrent les cellules isolées récupérées après incubation sans (1) et avec (2) enzymes

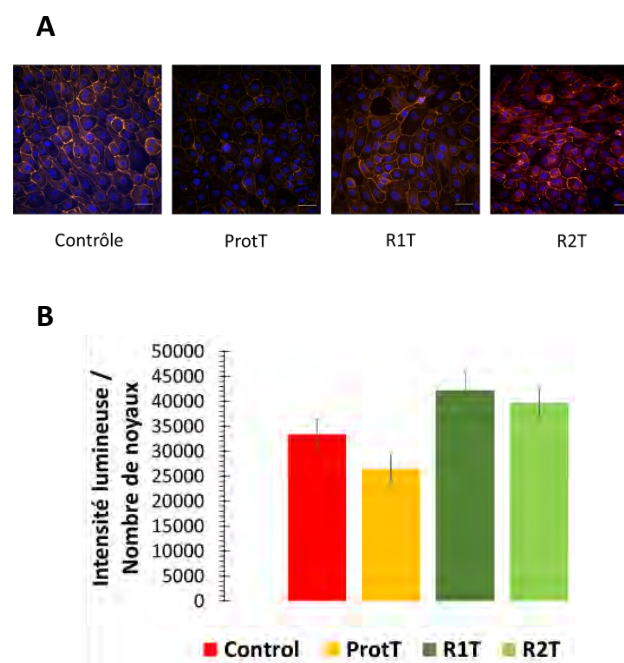
La figure 5 présente la quantité de FD4, en ng/mL, ayant diffusé entre 15 min et 4 h pour chacun des traitements expérimentaux, En absence d'agent de digestion (sels biliaires et enzymes), R1 permet le passage d'une plus grande quantité de FD4 au bout de 2 et 4 h, suggérant un effet abrasif plus important que pour R2 ou les protéines seules (Prot) ( $P < 0,05$ ). Les fibres seules (Fib) ont également un effet abrasif important permettant ainsi la diffusion du FD4. Par contre, en présence de sels biliaires et d'enzymes, R2 affecte le tapis cellulaire, et donc sa perméabilité au FD4, de manière similaire à R1 et aux fibres pures.



**Figure 5** – Mesure du passage du FD4 (ng/µL) à travers les cellules IPEC-J2 en présence des différents digestats (mesure de la perméabilité)

Lettres communes :  $P > 0,05$

Les protéines de jonction serrée ZO-1 ont été localisées dans les régions de contact cellule-cellule, comme montré dans la figure 6. Après 2 h d'incubation, les cellules en contact du digestat issu des protéines pures montrent une diminution de l'expression de ZO-1 (-20 %, en intensité de marquage). Cependant, aucune différence n'est observée entre R1 et R2 et ni entre ces échantillons et le contrôle. Ces résultats concordent avec les expériences de diffusion du FD4 (Figure 5).



**Figure 6** – A) Immunomarquage ZO-1 en rouge et contre-marquage DAPI des noyaux en bleu à 2 h d'incubation (barre d'échelle = 10 µm) ; B) intensité lumineuse mesurée en fonction du nombre de noyaux

### 3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette étude, combinant expériences *in vivo* et *in vitro*, avait pour objectif d'explorer l'effet des fibres à la fois sur la digestion (hydrolyse par les protéases) des protéines mais également sur la physiologie intestinale du porc.

Les expériences de digestibilité ont permis d'estimer le niveau de bioaccessibilité et d'hydrolyse des protéines en fonction de l'intégrité des parois cellulaires. On a ainsi pu démontrer que la

paroi cellulaire diminuait l'hydrolyse des protéines en comparant R1 et R2. Nous avons voulu aller plus loin et évaluer à partir de quelle taille de particules la digestibilité était compromise. Ainsi, des particules d'une taille moyenne de 300 µm aboutissaient à une hydrolyse comparable à celle de R2. La porosité de la paroi cellulaire du pois a également été étudiée en utilisant des cellules isolées à partir de graines de pois. Là encore, les résultats d'hydrolyse des protéines sont proches de ceux de R2. Il est cependant possible que la préparation de ces cellules ait pu aboutir à une dégradation partielle de la paroi cellulaire.

Les expériences menées *in vivo* ont montré un effet abrasif plus important au niveau du jéjunum pour R1 comparé à R2. Ou bien, il pourrait s'agir d'un effet de stimulation de la prolifération cellulaire avec R2. Pour étudier plus précisément l'impact des fibres présentes dans le milieu liquide (en contact avec l'épithélium intestinal) les IPEC-J2 ont été utilisées. Les digestats obtenus *in vitro* ont ainsi servi de substrat pour ces expériences pour lesquelles à la fois la perméabilité (diffusion de FD4) et l'intégrité (jonctions serrées) de la monocouche cellulaire ont été évaluées. La perméabilité intestinale est une fonction primordiale de l'épithélium pour contrôler l'apport en nutriments et empêcher le passage de pathogènes. Notre étude a montré que lorsque les matières premières étaient appliquées seules sur les cellules IPEC-J2, on observait la même tendance qu'avec les données *in vivo*. Ainsi, à partir de 2 h d'incubation, R1 compromettait de manière plus importante la perméabilité de la monocouche cellulaire comparé à R2 et aux protéines pures. Cependant, la tendance était différente pour les digestats. L'effet négatif des sels biliaires présents dans les digestats est bien connu sur d'autres lignées cellulaires, comme les Caco-2, lignée cellulaire immortalisée de cellules humaines d'adénocarcinome colorectal (Kondrashina *et al.*, 2023).

Cependant cette tendance n'a pas été retrouvée dans notre étude, Il est possible que les fibres aient séquestré les sels biliaires diminuant ainsi leur toxicité pour les cellules IPEC-J2 (Naumann *et al.*, 2020).

Peu d'études utilisant les cultures cellulaires pour évaluer la diffusion des produits de l'hydrolyse de macronutriments (protéines, amidon ou lipides) sont retrouvées dans la littérature. La plupart des expériences s'intéressent à des produits pharmaceutiques, des micronutriments (vitamines et minéraux) ou des toxines, et surtout au niveau du colon, Ici, nous souhaitons comprendre l'effet des fibres sur l'intégrité des cellules au niveau de l'intestin grêle. Les études sur l'impact des nutriments sur la barrière intestinale concernent principalement les effets de dérivés de produits bactériens (Karancsi *et al.*, 2020). Dans la littérature, le maintien de la fonction de barrière épithéliale intestinale repose principalement sur une couche contiguë de cellules épithéliales intestinales et sur des jonctions serrées entre les cellules épithéliales (Li *et al.*, 2012). La réduction de ZO-1, comme étudié ici, peut augmenter la perméabilité épithéliale dans un certain nombre de systèmes cellulaires (Zhao *et al.*, 2011).

Ces données démontrent la complexité des mécanismes impliqués dans les interactions entre fibres/protéines et le tissu intestinal, et l'importance de l'étape de préparation du digestat. Des travaux sont en cours pour raffiner cette méthode de détoxification.

En conclusion, la composition seule en protéines et/ou fibres alimentaires n'est pas suffisante pour prédire la digestibilité des protéines et l'impact des aliments sur la santé intestinale du porc. Des informations supplémentaires sur le degré d'intégrité de la paroi cellulaire des aliments riches en fibres sont ainsi nécessaires.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bach Knudsen K.E., 2001. The nutritional significance of "dietary fibre" analysis. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 90, 3-20.
- Bach Knudsen K.E., Hedemann M.S., Lærke H.N., 2012. The role of carbohydrates in intestinal health of pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 173, 41-53.
- Brodkorb A., Egger L., Alming M., Alvito P., Assuncao R., Ballance S., Bohn T., Bourlieu-Lacanal C., Boutrou R., Carriere F., Clemente A., Corredig M., Dupont D., Dufour C., Edwards C., Golding M., Karakaya S., Kirkhus B., Le Feunteun S., Lesmes U., Macierzanka A., Mackie A.R., Martins C., Marze S., McClements D.J., Menard O., Minekus M., Portmann R., Santos C.N., Souchon I., Singh R.P., Vegarud G.E., Wickham M.S.J., Weitschies W., Recio I., 2019. INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nat. Protoc.*, 14, 991-1014.
- Junejo S.A., Ding L., Fu X., Xiong W., Zhang B., Huang Q., 2021. Pea cell wall integrity controls the starch and protein digestion properties in the INFOGEST in vitro simulation. *Int. J. Biol. Macromol.*, 182, 1200-1207.
- Jha R., Berrococo J.D., 2015. Review: Dietary fiber utilization and its effects on physiological functions and gut health of swine. *Animal*, 9, 1441-1452.
- Karancsi Z., Mórítz A.V., Lewin N., Veres A.M., Jerzsele Á., Farkas O., 2020. Beneficial effect of a fermented wheat germ extract in intestinal epithelial cells in case of lipopolysaccharide-evoked inflammation. *Oxid. Med. Cell Longev.*, 2020, 1482482.
- Kondrashina A., Arranz E., Cilla A., Faria M.A., Santos-Hernández M., Miralles B., Hashemi N., Rasmussen M.K., Young J.F., Barberá R., Mamone G., Tomás-Cobos L., Bastiaan-Net S., Corredig M., Giblin L., 2023. Coupling in vitro food digestion with in vitro epithelial absorption; recommendations for biocompatibility. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1-19.
- Le Scellour M., Labussière E., Zemb O., Renaudeau D., 2018. Effect of dietary fiber content on nutrient digestibility and fecal microbiota composition in growing-finishing pigs. *PLoS ONE*, 13, 1-20.
- Li X., Akhtar S., Choudhry M., 2012. Alteration in intestine tight junction protein phosphorylation and apoptosis is associated with increase in IL-18 levels following alcohol intoxication and burn injury. *Biochim. Biophys. Acta*, 1822, 196-203.
- Mariani V., Palermo S., Fiorentini S., Lanubile A., Giuffra E., 2009. Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and IPI-2I. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 131, 278-284.
- Mariotti F., Tomé D., Mirand P.P., 2008. Converting nitrogen into protein - Beyond 6.25 and Jones' factors. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 48, 177-184.
- Naumann S., Haller D., Eisner P., Schweiggert-Weisz U., 2020. Mechanisms of interactions between bile acids and plant compounds—a review. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 1-20.
- Noblet J., Le Goff G., 2001. Effect of dietary fibre on the energy value of feeds for pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 90, 35-52.
- Williams B.A., Mikkelsen D., Flanagan B.M., Gidley M.J., 2019. "Dietary fibre": Moving beyond the "soluble/insoluble" classification for monogastric nutrition, with an emphasis on humans and pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 10, 1-12.
- Zhao J.H., Wang J.H., Dong L., Shi H., Wang Z., Ding H., Shi H., Lu X., 2011. A protease inhibitor against acute stress-induced visceral hypersensitivity and paracellular permeability in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 654, 289-294.