

Mesure de la digestibilité des protéines par la méthode des différences porto-artérielles chez l'espèce porcine

Assessing the digestibility of proteins using the porto-arterial difference method in pigs

Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Volume 10, Numéro 1, 25-30, Janvier - Février 2003, Protéines et lipides végétaux : interactions nutritionnelles et fonctionnelles

Auteur(s) : Guido RYCHEN, Laboratoire de Sciences Animales ENSAIA-INRA, 2 av. de la Forêt de Haye 54505 Vandœuvre cedex.

Author(s) : Guido RYCHEN

Summary : This paper gives an overview of the current in vivo methods used to evaluate nutritional quality of proteins. It present in the first part methods used to assess digestibility of proteins, the interest and constraints of portal measurements and finally questions regarding digestive interactions between alimentary nitrogen and endogenous nitrogen are discussed. The second part of this paper is focused on the presentation of a study which was aimed to determine ^{15}N porto-arterial kinetics after ingestion of ^{15}N labelled milk, yogurt or heat treated yogurt. It indicates an original method which combines ^{15}N isotope protein labelling and postprandial porto-arterial measurements in growing pigs. ^{15}N portal absorption in the growing pig were performed after ingestion of uniformly (0.2509 APE) labelled ^{15}N milk (M), yogurt (Y) and heat treated yogurt (HY). The highest porto-arterial differences of ^{15}N were found in the period between 30 min and 90 min after ingestion. Main absorption of nitrogen from M and HY occurs during the 0-120 min time period (about 74% for M and 68% for HY). For Y, a larger displayed absorption period over the 0-240 min time period was observed. ^{15}N absorption rate is close to 75% for each studied milk product, suggesting that M, Y and HY deliver nearly the same amounts of nitrogen to the organism. These results also indicate that major part of proteins are absorbed within the 240 min postprandial period.

Keywords : Absorption, milk, yogurt, pig.

ARTICLE

Introduction

La valeur nutritionnelle des protéines peut être définie par leur aptitude à fournir des acides aminés à l'organisme. L'étude de la qualité nutritionnelle des protéines peut être abordée qualitativement et quantitativement par deux voies complémentaires : la disparition (classiquement utilisée) des nutriments de la lumière digestive et l'apparition portale des nutriments dans le compartiment où ils sont captés pour leur future utilisation. La technique d'apparition portale des nutriments ne peut cependant être appliquée à l'homme pour des raisons évidentes d'éthique, d'où l'intérêt des modèles animaux tels que le porc, souvent utilisé dans les études de physiologie digestive. Pour

étudier l'absorption d'un nutriment, il est indispensable de pouvoir le distinguer des autres nutriments d'origine exogène ou endogène. Le développement des techniques de marquage isotopique des aliments rend possible cette distinction. Le marquage peut être intrinsèque ou extrinsèque et faire appel à des isotopes stables ou radioactifs.

Le lait est un aliment qui contient la plupart des éléments nécessaires au développement et au maintien des fonctions de l'organisme. Les laits sécrétés par différentes espèces de mammifères présentent des caractéristiques communes et contiennent les mêmes catégories de composants : eau, protéines, lactose, matières grasses et minérales. La fermentation du lait par des bactéries lactiques spécifiques conduit à la formation des produits laitiers. Sont rassemblés sous ce terme différents produits obtenus par fermentation du lait par des bactéries lactiques et éventuellement par d'autres micro-organismes, notamment les levures. Les laits fermentés fournissent à l'organisme les éléments nutritifs du lait, mais du fait de leur processus de fabrication (une fermentation contrôlée), ils pourraient acquérir également des propriétés nutritionnelles originales et spécifiques.

Méthodes d'estimation de la qualité nutritionnelle des protéines

La balance azotée (quantité d'azote ingérée-quantité d'azote rejetée) constitue la pierre angulaire des méthodes d'évaluation de la qualité nutritionnelle des protéines et permet d'apprécier leur valeur biologique. Au cours des dernières décennies, plusieurs indicateurs ont été proposés par les nutritionnistes pour évaluer les caractéristiques nutritionnelles des protéines alimentaires : citons par exemple le CEPN (coefficient d'efficacité protéique), l'UPN (utilisation protéique nette) ou encore la VPR (valeur protéique relative) [11]. La multiplicité des méthodes témoigne cependant qu'aucune d'elle ne fait l'unanimité. De manière générale, la qualité nutritionnelle des protéines peut être définie comme l'aptitude d'une protéine à fournir des acides aminés nécessaires aux cellules de l'organisme.

Les étapes qui caractérisent l'assimilation des protéines sont multifactorielles : elles sont dépendantes de la nature des protéines, des traitements technologiques précédant l'ingestion alimentaire, ainsi que de la nature des autres constituants du repas [1, 37, 38, 52]. Au niveau gastrique, les protéines sont dénaturées et partiellement dégradées par la pepsine en présence d'HCl. Les produits de cette première étape digestive sont progressivement évacués par le pylore, délivrés dans l'intestin grêle où ils sont hydrolysés par des enzymes pancréatiques et des enzymes de la bordure en brosse, et absorbés au niveau de la muqueuse intestinale [1]. Parmi ces paramètres, le transit alimentaire et les capacités enzymatiques de l'hôte revêtent une importance particulière. Le transit digestif conditionne notamment les temps de contact d'une part entre l'aliment et les enzymes digestives et d'autre part entre les produits de la digestion et les surfaces absorbantes. Il existe donc une interdépendance des divers mécanismes qui assurent la digestion, qu'ils soient moteurs, sécrétoires ou d'absorption. Ces mécanismes sont du reste contrôlés par les hormones gastroentérohépatiques [21, 27]. En raison des faibles niveaux des réserves corporelles sous forme d'acides aminés libres, le synchronisme de l'arrivée des acides aminés d'origine alimentaire sur les lieux de la synthèse protéique a une influence marquée sur l'efficacité de cette synthèse et le

rendement alimentaire. Ainsi, les cinétiques d'absorption des acides aminés définissent les caractéristiques des apports d'acides aminés pour la synthèse protéique dans les tissus de l'organisme. Cette notion de chronologie des apports d'acides aminés se superpose à la notion de digestibilité pour aboutir à celle de disponibilité [28]. La qualité nutritionnelle des protéines alimentaires est donc liée à la disponibilité de ses acides aminés pour les tissus de l'organisme.

Les recherches en physiologie digestive sont principalement menées chez les animaux monogastriques dont les mécanismes s'apparentent à ceux de l'homme. Ainsi, c'est grâce aux modèles animaux (rat, porc) que les progrès les plus spectaculaires ont été obtenus. Parmi les mammifères, le porc constitue un excellent sujet d'étude des processus digestifs et probablement un des meilleurs modèles pour l'homme [9]. En comparant la digestibilité iléale et fécale des protéines alimentaires chez l'homme et le porc, le modèle porcin a été proposé comme modèle de la digestion protéique de l'homme [35]. Darragh et Moughan [9] ont à leur tour mis en évidence que le porcelet de 3 semaines constitue un bon modèle pour l'étude de la digestion des protéines chez le nourrisson. De plus, le porc est un animal facile à apprivoiser qui supporte une large gamme de régimes et l'implantation chronique d'instruments qui permettent d'analyser les différentes étapes de la digestion et de l'absorption.

Les méthodes de digestibilité donnent des mesures précises de la disparition des nutriments de la lumière intestinale, la méthode des différences porto-artérielles permet, elle, un bilan d'apparition des acides aminés disponibles pour l'organisme. L'artère étant utilisée comme témoin, la différence de concentration en acides aminés entre les deux vaisseaux est indicatrice de la cinétique d'absorption des acides aminés issus de la digestion des protéines.

Mesures de digestibilité

La mesure de la digestibilité, qui représente le taux d'utilisation des aliments par l'organisme, est basée sur le calcul de la disparition des aliments entre l'extrémité orale et aborale du tube digestif. On distingue notamment la digestibilité fécale et la digestibilité iléale. La digestibilité fécale est simple à réaliser puisqu'elle est basée sur le calcul de la différence entre les quantités ingérées et celles retrouvées dans les fèces de l'élément recherché. Cette technique qui a l'avantage de ne pas nuire à l'animal pose néanmoins des problèmes pour l'étude de la digestibilité des protéines. En effet, elle ne tient pas compte du rôle des micro-organismes du côlon qui remanient fortement les peptides et les acides aminés. De plus, il est considéré que la fraction protéique qui pénètre dans le gros intestin a une valeur nutritionnelle très réduite pour l'hôte [35]. Par conséquent, la digestibilité iléale qui consiste à mesurer la disparition des éléments entre l'orifice oral et la valvule iléo-caecale est une technique préférée à celle de la digestibilité fécale. Différentes techniques de canulation (latérales et uniques, termino-terminales et réintrales ou iléocaecoliques post-valvulaires) ainsi qu'une méthode d'anastomose termino-latérale de l'iléon au rectum (court-circuit du gros intestin) ont été mises au point chez l'animal monogastrique [28]. Les mesures de digestibilité iléale permettent ainsi d'estimer les quantités de nutriments qui disparaissent de l'intestin grêle et il est

couramment admis que les quantités disparues correspondent aux nutriments absorbés au niveau de la muqueuse intestinale [13, 15, 24]. Chez l'homme, la mesure des cinétiques de disparition des nutriments dans l'intestin grêle est réalisée grâce à des sondes naso-jéjunales qui autorisent des prélèvements réguliers d'effluents jéjunaux [13, 24].

Toutefois, la disparition d'un principe alimentaire au cours de son transit, ne correspond pas forcément à une absorption de ce principe et ne permet pas de préjuger de la forme sous laquelle il apparaît dans l'organisme. La paroi intestinale est une paroi vivante qui métabolise partiellement les nutriments au cours de l'absorption [28]. Ainsi, une partie substantielle des acides aminés apparemment absorbée dans l'intestin grêle n'atteint jamais la veine porte. Chez la brebis, Tagari et Bergman [46] ont observé que malgré les taux de disparition intestinaux élevés de Glu et d'Asp, leur absorption réelle dans la veine porte était faible. Ce phénomène s'explique par l'utilisation intense de ces acides aminés pour la production d'énergie dans le métabolisme gastro-intestinal, à l'identique de la Gln [50]. L'azote libéré au cours de ce métabolisme est utilisé pour la synthèse de Gly et d'Ala [3]. L'Ala est d'ailleurs l'acide aminé le plus relâché par les organes drainés par la veine porte chez les ruminants [19, 51]. Tagari et Bergman [46] ont aussi montré que le rapport (disparition intestinale/apparition portale) était faible (entre 58 et 72 % en fonction de la teneur en protéines de la ration) pour un groupe hétérogène d'acides aminés dont la Lys et la Met. Le caractère limitant de ces acides aminés en nutrition animale pourrait par exemple être expliqué par leur métabolisme dans la paroi intestinale.

Mesures d'absorption portale

Rérat *et al.* [33] ont mis au point une technique permettant de mesurer l'apparition des nutriments dans la veine porte qui draine l'intestin grêle. Cette technique met en œuvre le porc muni de deux cathéters permanents dans la veine porte et l'artère brachio-céphalique et d'une sonde débitométrique placée autour de la veine porte. Elle consiste à quantifier les échanges entre sang et lumière digestive par la mesure simultanée des différences porto-artérielles des concentrations en nutriments et du débit de la veine porte. Si cette technique néglige une partie des nutriments catabolisés durant le passage de la paroi intestinale [27], elle révèle le profil horaire d'arrivée des nutriments sur les lieux de la synthèse protéique [12]. Également nommée « méthode des différences porto-artérielles », elle permet ainsi un bilan d'apparition des nutriments (acides aminés..) disponibles pour l'organisme et contribue à une meilleure compréhension et définition de la valeur nutritionnelle des protéines. Une meilleure connaissance des conditions d'apparition des acides aminés dans la veine porte permettrait de mieux définir l'influence du facteur temps dans l'utilisation tissulaire des acides aminés pour la synthèse protéique [12]. Comme les sites d'absorption des acides aminés et des oligo-peptides ne sont probablement pas distribués de manière uniforme tout au long du tube digestif [25], il est vraisemblable que les acides aminés de différentes protéines alimentaires apparaissent dans le sang portal selon des cinétiques différentes [12].

Les interférences nutritionnelles entre l'azote exogène et l'azote endogène

Les méthodes d'étude de la digestibilité et de l'absorption des protéines alimentaires que nous venons d'évoquer ne permettent pas de distinguer les matières azotées d'origine alimentaire des matières azotées endogènes constituées des enzymes digestives, des cellules desquamées, des acides aminés d'origine sanguine et de l'urée. Ainsi, une quantité non négligeable d'azote endogène est sécrétée dans la lumière intestinale et mélangée avec l'azote alimentaire au cours de la digestion. L'importance de cette sécrétion dépend en outre de la nature des constituants des repas, des niveaux énergétiques et azotés de la ration et du taux de cellulose [7, 16, 22, 49]. L'étude de la digestion et de l'absorption spécifique d'une protéine donnée n'est donc pas aisée en raison de cette contribution d'azote endogène difficile à estimer [2, 20, 23, 44]. Ainsi, Rérat *et al.* [34] ont observé des niveaux d'absorption supérieurs à 100 % pour plusieurs acides aminés (Thr, Val, His) liés vraisemblablement à l'apport digestif d'acides aminés provenant de protéines endogènes. Afin d'estimer la part de l'azote endogène, des expérimentations mettant en jeu des régimes protéoprivés ont été réalisées. Il est toutefois admis que cette technique tend à sous-estimer la sécrétion d'azote endogène [10]. La contribution des protéines endogènes représente donc un problème majeur dans l'étude de la digestion et de l'absorption des protéines alimentaires. Il apparaît donc indispensable d'identifier et de marquer de manière spécifique les protéines que l'on veut étudier. Comme l'usage de marqueurs isotopiques constitue une technique appropriée pour étudier le métabolisme des protéines [10], nous avons cherché à mettre au point plusieurs techniques de marquage des protéines du lait en ^{15}N . La production de protéines du lait de vache intrinsèquement enrichi aux isotopes représente une étape importante pour l'étude de leurs caractéristiques ou qualités nutritionnelles. Le marquage isotopique des protéines du lait peut être obtenu par l'administration orale de ^{15}N inorganique (sous la forme de sulfate d'ammonium ou d'urée). Celui-ci est utilisé par les micro-organismes du rumen pour la synthèse d'acides aminés microbiens enrichis en ^{15}N qui seront ensuite absorbés et prélevés par la glande mammaire puis utilisée pour la synthèse protéique du lait. Des travaux ont été conduits au Laboratoire de Sciences Animales (ENSAIA) avec pour but l'étude des cinétiques de marquage isotopique des protéines du lait suite à différents apports alimentaires de sulfate d'ammonium enrichi en ^{15}N [5, 6]. Un plateau d'enrichissement des protéines de lait en azote ^{15}N [0.274 APE, atom percent isotopic enrichment) a été obtenu entre 36 et 84 heures après ingestion par des vaches laitières de sulfate d'ammonium (enrichi à 10 % Atompercent). L'enrichissement en ^{15}N de l'azote du lait a été croissant jusqu'à la traite effectuée 36 heures après l'administration orale du marqueur, puis une décroissance quasi exponentielle de l'enrichissement a été observée. Les niveaux d'enrichissement en ^{15}N obtenus apparaissent élevés au regard du niveau minimal requis de 0,05 APE pour des études de digestibilité chez l'homme [24]. Afin de déterminer l'enrichissement spécifique des acides aminés individuels et des groupes d'acides aminés issus des caséines enrichis, la méthode de séparation des acides aminés par chromatographie liquide d'échange d'ions couplée à la mesure par spectrométrie de masse des rapports isotopiques a été utilisée [4]. Ce travail a montré un degré d'incorporation du ^{15}N élevé dans tous les acides aminés. L'obtention des protéines enrichies en ^{15}N a ensuite permis de réaliser nos travaux sur l'absorption portale des constituants du lait et des produits laitiers.

Détermination des profils d'absorption de ^{15}N suite à l'ingestion de lait, de yaourt et de yaourt

thermisé chez le porc en croissance

La fermentation du lait en yaourt entraîne des modifications de composition (présence des bactéries lactiques vivantes, augmentation minime de la fraction azotée non protéique) et de structure (augmentation de la viscosité à la suite de la formation du gel). De même, la thermisation permet la destruction de la flore lactique du yaourt et modifie considérablement la structure du yaourt (agrégation des micelles de caséines). L'ensemble de ces variations pourrait perturber l'absorption des protéines. Cette étude a été conçue pour déterminer, *in vivo*, l'absorption portale postprandiale de l'azote du lait, du yaourt et du yaourt thermisé chez le porc en croissance.

Matériels et méthodes

Opérations chirurgicales

Les porcs issus d'un élevage (EARL BIMA, 54160 Pulligny) ont été livrés à l'animalerie du Laboratoire de Sciences Animales une semaine avant l'opération. Les opérations des animaux se sont déroulées au Laboratoire de Chirurgie Expérimentale de la Faculté de Médecine de Nancy où nous avons disposé de l'infrastructure nécessaire (tables d'opérations, scalytiques, équipements et instruments stériles, etc.). Chaque animal a subi l'implantation de deux cathéters permanents au niveau de la veine porte et de l'artère brachiocéphalique. Les porcs ont été placés dans des cages individuelles dans un local éclairé naturellement et régulièrement nettoyé. Les animaux retrouvent généralement leur capacité d'ingestion pré-opératoire en cinq jours. Les cathéters sont rincés (solution stérile de chlorure de sodium à 0,9 %) deux fois par jour pendant la période expérimentale afin d'éviter la formation des caillots.

Alimentation

L'alimentation de base est composée de céréales et de tourteau de soja fournis par l'éleveur. Les animaux ont été rationnés volontairement à $1\,400\text{ g}\cdot\text{j}^{-1}$ pour éviter une croissance trop rapide qui pourrait affecter le maintien et le bon positionnement des cathéters dans les vaisseaux sanguins. Les animaux ont été habitués à ingérer du lait et des produits laitiers dans la période pré-expérimentale. Lors des journées expérimentales, les animaux, à jeun depuis au moins 12 heures, ont reçu exclusivement l'un des produits laitiers selon les protocoles expérimentaux utilisés. A la fin de l'expérimentation, les porcs ont été anesthésiés par une solution de pentobarbital (vétuquinol[®]) puis occis par injection d'une solution de KCl saturée dans l'artère brachiocéphalique. Ils ont ensuite été livrés à l'équarrissage pour incinération. Cette expérimentation sur les animaux a été conçue en respect des directives du conseil européen n° 86/609/CEE relatives à la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins d'expérimentation et à d'autres fins scientifiques.

Préparation du lait, du yaourt et du yaourt thermisé enrichis en ¹⁵N

Le lait utilisé a été intrinsèquement enrichi en ^{15}N selon la technique décrite par Colin-Schoellen *et al.* [5, 6]. Les vaches ont reçu trois doses orales, quotidiennes et successives (300, 150 et 150 g) de sulfate d'ammonium ($^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$). L'ingestion des doses répétées de sulfate de l'ammonium ^{15}N s'est traduite en un plateau d'enrichissement du lait entre 36 h et 84 h [0,2509 APE) après l'ingestion du produit marqué [5, 6]. L'incorporation élevée de ^{15}N a été démontrée dans tous les acides aminés des caséines [4]. Dans cette étude, nous avons reconstitué ce lait enrichi par la dilution de 150 g de lait en poudre dans un litre d'eau. Le yaourt et le yaourt thermisé intrinsèquement enrichis ont été fabriqués à partir du même lait ^{15}N reconstitué selon la technique présentée antérieurement

Prélèvement et traitement des échantillons

Pour chaque journée expérimentale, des prélèvements de sang portal et artériel (environ 5 mL) ont été effectués simultanément 15 minutes avant l'ingestion du lait, du yaourt ou du yaourt thermisé (point 0, témoin) et à 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 et 240 minutes après l'ingestion orale de 1 000 mL de lait ou des produits laitiers étudiés. Le sang prélevé a été remplacé par des quantités équivalentes de solution NaCl stérile (9 g.L⁻¹) héparinée. L'hématocrite a été contrôlé et a été stable au cours des cinétiques. Dès la collecte, les échantillons de sang (environ 10 mL) sont recueillis dans des tubes héparinés puis immédiatement transférés vers le laboratoire. Le sang prélevé simultanément au niveau portal et artériel a été réparti en fonction des analyses à effectuer et immédiatement déprotéinisé en présence d'acide sulfosalicylique. Un millilitre de sang prélevé est déprotéinisé par addition de 3 mL d'une solution d'acide sulfosalicylique-thiodiglycol (65 g.L⁻¹ acide sulfosalicylique, 6 g.L⁻¹ thiodiglycol). Après agitation, ces échantillons sont centrifugés (3 000 xg, 4 °C) pendant 10 minutes. Cette solution provoque l'éclatement des globules rouges et la précipitation des protéines. Les surnageants récupérés sont placés d'abord à -80 °C, pour une congélation rapide, puis stockés à 20 °C en attente d'analyses.

Analyses biochimiques

Pour les mesures d'enrichissement en ^{15}N , chaque échantillon de sang déprotéinisé est lyophilisé, pesé (5,5-6 mg) puis enveloppé dans des capsules en étain. Les dosages ont été effectués au laboratoire des isotopes de l'INRA de Champenoux où l'enrichissement en ^{15}N a été mesuré par spectrométrie de masse (Delta E, Finnigan Mat). Un échantillon standard est analysé après chaque passage d'une série de 10 échantillons, ceci dans le but de contrôler les problèmes de contamination de colonne qui peuvent intervenir. Les résultats sont exprimés en delta % à partir de la relation : $\text{Delta \%} = (\text{Re}/\text{Rstd}-1)*1000$; Re = rapport isotopique de l'échantillon $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$; Rstd = rapport isotopique du standard. Conventionnellement on utilise le rapport isotopique de l'air (R air = 0,0036765).

Détermination du flux portal et estimation de l'absorption

Pour chaque temps de prélèvement, la différence des concentrations porto-artérielles a été calculée ($C_p - C_a$). L'absorption portale de ^{15}N a été calculée comme suit : \int différences porto-artérielles * flux portal * temps \int . Le taux d'absorption ^{15}N a été obtenu en faisant le rapport entre la quantité de ce nutriment retrouvé dans le sang porte et la quantité du nutriment dans l'aliment. Le débit portal souvent exprimé en $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ a été estimé en utilisant les données rapportées dans la littérature pour le porc en croissance [17, 18, 26, 30, 31, 32, 36, 41]. L'ingestion du repas est suivie d'une petite élévation du débit portal pendant les deux premières heures postprandiales. Cette variation de flux portal représente de 2,8 à 5,7 % [40, 41]. Guillot *et al.* [17, 18] et Lang *et al.* [48] ont par contre trouvé des valeurs de flux portal relativement constantes après l'ingestion du repas. Dans les conditions de nos études (carré latin) nous considérons que les variations de flux portal sont semblables pour tous les animaux qui sont homogènes et subissent le même traitement. Nous admettons donc que les variations éventuelles liées aux différents traitements ne sont pas significatives. De plus le dispositif en carré latin permet également de considérer l'animal comme son propre témoin. Nous avons calculé l'absorption portale avec une valeur constante de flux, soit $41 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ de poids corporel, valeur correspondant à la moyenne des observations de différents auteurs [17, 18, 26, 30-32, 36, 40, 41, 48].

A un instant donné, les différences de concentrations porto-artérielles permettent d'apprécier le flux net des nutriments vers la veine porte. Les données obtenues correspondent donc à l'excédent brut d'absorption vis-à-vis du métabolisme tissulaire [28]. L'estimation de l'apparition nette d'azote aminé et de ^{15}N dans la circulation portale est calculée grâce à la formule [29] :

$q = (C_p - C_a) \phi dt$; $Q = \int_{t_0}^{t_1} q$ où q est la quantité absorbée par unité de temps dt pendant lequel les paramètres étudiés peuvent être considérés comme constants, C_p est la concentration portale, C_a la concentration artérielle, ϕ le flux portal et Q la quantité apparaissant durant la période écoulée entre t_0 et t_1 .

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé obéit à un carré latin 3 x 3. Chaque animal est son propre témoin (ce qui permet entre autre de réduire les variations individuelles) et va ingérer chacun des trois produits selon le protocole décrit ci dessous. Le carré latin 3 x 3 met donc en jeu trois porcs en croissance, mâle castrés (porcs Large White) de 43 à 47 kg et trois produits le lait, le yaourt, le yaourt thermisé. L'ordre de distribution des produits pour chaque porc a été effectué de façon aléatoire. La première journée expérimentale intervient 10 jours après l'intervention chirurgicale. Le porc 1 par exemple recevra au cours de la phase expérimentale le lait, le yaourt puis le yaourt thermisé. Chaque journée expérimentale pour un même porc est espacée de 5 jours. Afin d'obtenir une puissance statistique satisfaisante, le protocole expérimental retenu a été un double carré latin 3 x 3. Pour des besoins statistiques, nous avons répété le même dispositif deux fois. Ainsi nous avons utilisé deux séries de

trois animaux (double carré latin 3 x 3).

Traitements statistiques

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse de variance en utilisant la procédure GLM (modèle linéaire général) du logiciel statistique de SAS (Statistical Analysis System). Le test t de Student et de Newman-Keuls ont été utilisés pour la comparaison des moyennes à un niveau significatif de 0,05 [43].

Résultats

La *figure 1* indique les différences porto-artérielles de ^{15}N dans le sang déprotéinisé suite à l'ingestion de 1 000 ml de lait, de yaourt ou de yaourt thermisé. Pour le lait, elles sont maximales pour la période 30-90 min. Pour le yaourt, elles sont croissantes jusqu'à 90 minutes et présentent une persistance plus grande comparativement au lait ou au yaourt thermisé. Les cinétiques porto-artérielles concernant le yaourt thermisé apparaissent intermédiaires entre celles du lait et du yaourt. L'analyse statistique de ces données révèle des différences significatives entre les trois produits au cours des 60 premières minutes et pour la période 180-240 min. Ainsi les protéines du lait et du yaourt thermisé sont significativement plus vite absorbées au niveau de la veine porte que les protéines du yaourt (*figure 1*). Entre 90 et 150 min, les niveaux d'absorption porto-artérielle sont comparables pour les trois produits laitiers. Pour la dernière période (180-240 min), les différences porto-artérielles sont significativement plus élevées pour le yaourt.

L'estimation des quantités de ^{15}N absorbées est présentée dans le *tableau 1*. Pendant les quatre premières heures postprandiales, le niveau d'absorption de ^{15}N est voisin de 80 % pour chaque produit laitier, ce qui laisse supposer que le lait, le yaourt et le yaourt thermisé délivrent à l'organisme des quantités semblables de ^{15}N . Le pourcentage d'absorption au bout des 4 h postprandiales est estimé à 83,6 %, 79,9 % et 82,5 % pour le lait, le yaourt et le yaourt thermisé respectivement. Cependant comme cela a été noté pour les cinétiques porto-artérielles, les taux d'absorption de ^{15}N du lait et du yaourt thermisé (exprimé par rapport au quantité ingérée) les plus élevés sont obtenus pour la période de 0-120 min (environ 70 % pour le lait et 67 % pour le yaourt thermisé). Le yaourt présente au contraire un niveau d'apparition portale d'azote plus étalé sur les quatre heures postprandiales (*tableau 1*).

Discussion

Le but de cette étude était de déterminer les profils d'absorption de ^{15}N après l'ingestion de 1 000 mL de lait, de yaourt et de yaourt thermisé. La mesure de ces cinétiques est importante sur le plan physiologique puisqu'elle nous a permis de déterminer le profil spécifique d'absorption de

l'azote pour ces produits. Les différences de concentration porto-artérielles postprandiales de ^{15}N sont positives dès le premier prélèvement après l'ingestion des produits laitiers (*figure 1*). Ces résultats peuvent être rapprochés des observations de Sleisenger *et al.* [42] qui ont décrits chez le mini-porc une augmentation de la concentration portale d'acides aminés 5 minutes après une perfusion duodénale d'un hydrolysate de caséines. D'autres auteurs [8, 12, 40] ont observé une apparition nette de l'azote et des acides aminés 30 minutes après l'ingestion d'un régime contenant la caséine comme source exclusive de protéines. D'autres auteurs [24] ont également estimé l'absorption de ^{15}N à partir des quantités disparues dans l'intestin grêle. Ils ont constaté que l'azote exogène commence à être absorbé au cours des 20 premières minutes suivant l'ingestion orale de la caséine. L'absorption des constituants du lait et du yaourt a été étudiée à partir de leur disparition nette dans l'intestin grêle [13, 14]. Ces auteurs ont noté que dans le contenu jéjunal la teneur maximale en azote exogène a été mesurée 20 minutes après l'ingestion de lait et 60 minutes après l'ingestion de yaourt : une vidange gastrique plus lente pour le yaourt expliquerait ce décalage. Les cinétiques d'apparitions de l'azote aminé et de ^{15}N obtenues dans notre étude confirment cette observation.

Le traitement thermique entraîne une diminution de la vitesse d'évacuation gastrique [45, 47] et donc de la viscosité normale du yaourt. Ce qui peut expliquer les similitudes des profils d'absorption du lait et du yaourt thermisé par rapport au yaourt. Le lait et le yaourt thermisé sont principalement absorbés pendant les 2 premières heures après l'ingestion, tandis que l'absorption du yaourt est prolongée au cours des 240 min de la période postprandiale. Ces résultats peuvent être expliqués par des différences de rythmes de vidange gastrique comme cela a été suggéré par plusieurs auteurs [14, 38, 39, 47]. Le paramètre ^{15}N utilisé pour évaluer l'absorption portale des protéines des produits laitiers apparaît comme un indicateur valable puisqu'il permet d'établir le profil d'absorption spécifique de l'azote du lait ou des produits laitiers.

CONCLUSION

L'originalité de cette approche a consisté à combiner la technique des cinétiques porto-artérielles à la technique du marquage isotopique pour distinguer l'azote alimentaire de l'azote endogène. Les résultats que nous venons de rapporter constituent une avancée intéressante dans la détermination de la qualité nutritionnelle du lait, du yaourt et du yaourt thermisé. Ils ont révélé l'intérêt du couplage des méthodologies employées. Cette étude indique pour la première fois les profils d'absorption spécifiques et les quantités de nutriments apportés à l'organisme par la veine porte après l'ingestion du lait, du yaourt et du yaourt thermisé. La rapidité de l'absorption portale de ^{15}N montre que les protéines du lait sont rapidement absorbés.

Il ne fait aucun doute que la méthodologie mise en œuvre dans ces travaux se révèle intéressante pour déterminer les profils d'absorption portale d'autres protéines animales ou végétales et de préciser ainsi leurs spécificités nutritionnelles.

REFERENCES

- 1 - Alpers DH. Digestion and absorption of carbohydrates and proteins. In: Physiology of the gastrointestinal tract (Johnson, L.R. ed), vol. 2, pp. 1469-1487. Raven Press, New York, NY ; 1987.
- 2 - Asche GL, Lewis AJ, Peo ER. Protein digestion in weanling pigs: effect of feeding regimen and endogenous protein secretion. J Nutr 1989 ; 119 : 1083-92.
- 3 - Bergman EN, Heitman RN. Metabolism of volatile fatty acids by liver and portal-drained viscera in sheep. Am J Physiol 1978 ; 221 : 586-95.
- 4 - Casseron F, Rychen G, Rubert-Aleman X, Martin GJ, Laurent F. ¹⁵N enrichments of both casein and plasma protein amino acids in cows ingesting (¹⁵NH₄)₂SO₄. J Dairy Res 1997 ; 64 : 367-76.
- 5 - Colin O, Laurent F, Vignon B, Antoine JM. Influence de la dose d'apport sur le niveau d'enrichissement en ¹⁵N des fractions azotées du lait de vache. Communication colloque CEA, Paris 24-25/11/1993. In : Les Isotopes Stables 1993 ; 103-9.
- 6 - Colin-Schoellen O, Claudon C, Rychen G, Antoine JM, Laurent F, Vignon B. [15N] labelling of the nitrogenous fractions of milk using oral administration of [15N]ammonium sulphate in the diet. Le Lait 1997 ; 77 : 307-16.
- 7 - Corring T, Juste C, Lhoste E. Nutritional regulation of pancreatic and biliary secretions. Nutr Res Rev 1989 ; 2 : 161-80.
- 8 - Darcy-Vrillon B, Souffrant WB, Laplace JP *et al.* Exogenous and endogenous contributions to nitrogen fluxes in the digestive tract of pigs fed a casein diet. II. Ileal and fecal digestibilities and absorption of amino acids. Reprod Nutr Dev 1991 ; 31 : 561-73.
- 9 - Darragh AJ, Moughan PJ. The three week old piglet as a model animal for studying protein digestion in human infants. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 1995 ; 21 : 387-93.
- 10 - De Lange C, Souffrant W, Sauer W. Real ileal and amino acid digestibilities in feedstuffs for growing pigs determined with the 15N-isotope dilution technique. J Anim Sci 1990 ; 68 : 409-18.
- 11 - Dillon JC. Les méthodes d'évaluation de la valeur nutritive des protéines en alimentation humaine. Cah Nutr Diet 1991 ; 26 : 224-9.

12 - Galibois I, Simoes Nunes C, Rérat A, Savoie L. Net appearance of amino acids in portal blood during the digestion of casein or rapeseed proteins in the pig. *Can J Physiol Pharmacol* 1989 ; 67 : 1409-17.

13 - Gaudichon C, Mahé S, Roos N *et al.* Exogenous and endogenous nitrogen flow rates and level of protein hydrolysis in the human jejunum after ¹⁵N milk and ¹⁵N yoghurt ingestion. *Br J Nutr* 1995 ; 74 : 251-60.

14 - Gaudichon C, Roos N, Mahé S, Sick H, Bouley C, Tomé D. Gastric emptying regulates the kinetics of nitrogen absorption from ¹⁵N-labeled milk and ¹⁵N-labeled yogurt in miniature pigs. *J Nutr* 1994 ; 124 : 1970-7.

15 - Gausserès N, Mahé S, Benamouzig R *et al.* The gastro-ileal digestion of ¹⁵N-labelled pea nitrogen in adult humans. *Br J Nutr* 1996 ; 76 : 75-85.

16 - Girard-Globa A, Bourdel G, Lardeux B. Regulation of protein synthesis and enzyme accumulation in the rat pancreas by the amount and timing of dietary protein. *J Nutr* 1980 ; 110 : 1380-90.

17 - Guillot E, Vaugelade P, Lemarchal P, Rérat A. Intestinal absorption and liver uptake of medium-chain fatty acids in non-anaesthetized pigs. *Br J Nutr* 1993 ; 69 : 431-42.

18 - Guillot E, Lemarchal P, Dhorne. Intestinal absorption of medium chain fatty acids: *in vivo* studies in pigs devoid of exocrine pancreatic secretion. *Br J Nutr* 1994 ; 72 : 545-53.

19 - Hume ID, Jacobson DR, Mitchell GE. Quantitative studies on amino acid absorption in sheep. *J Nutr* 1972 ; 102 : 495-503.

20 - Krawielitzki K, Zebrowska T, Schadereit R *et al.* Determination of nitrogen absorption and nitrogen secretion in different sections of the pig's intestine by digesta exchange between ¹⁵N labelled and unlabeled animals. *Arch Anim Nutr* 1990 ; 40 : 25-37.

21 - Longenecker JB, Lo GS. Protein digestibility and amino acids availability assessed by concentration changes of plasma amino acids. In: *Nutrient in Processed Foods*. American Medical Association. Publishing Sciences Group, Inc., Acton, MA ; 1974.

22 - Lurie B, Novis BH, Brom B, Bank S, Marks IN. Pancreatic exocrine responses to test meals of varying compositions in man. *Digestive Disease* 1973 ; 18 : 847-50.

- 23 - Mahé S, Huneau JF, Marteau P, Thuillier F, Tomé D. Gastro-ileal nitrogen and electrolyte movements after bovine milk ingestion in humans. *Am J Clin Nutr* 1992 ; 56 : 410-6.
- 24 - Mahé S, Roos N, Benamouzig R *et al.* Gastrojejunal kinetics and the digestion of [¹⁵N]alpha-lactoglobulin and casein in humans: the influence of the nature and quantity of the protein. *Am J Clin Nutr* 1996 ; 63 : 546-52.
- 25 - Matthews DM, Adibi SA. Peptide absorption. *Gastroenterology* 1976 ; 71 : 151-61.
- 25bis - Moughan PJ, Rowan AM. The pig as a model animal for human nutrition research. *Proc Nutr Soc* 1989 ; NZ 14, 116-23.
- 26 - Reeds PJ, Burrin DG, Jahoor F, Wykes L, Henry J, Frazer ME. Enteral Glutamate is almost completely metabolized in first pass by gastrointestinal tract of infants pigs. *Am J Phys* ; 1996.
- 27 - Rérat A. Some quantitative aspects of protein and carbohydrate absorption in the pig. *Proc Nutr Soc* 1980 ; 39 : 177-84.
- 28 - Rérat A. Résultats expérimentaux concernant la physiologie digestive et l'absorption en relation avec la nutrition et le métabolisme des acides aminés. Edition : Produits Roche, Division F ; Hoffmann-La Roche - Vitamines et Chimie fine, 52 bd du Parc, 92251 Neuilly-sur-Seine cedex ; 1988.
- 29 - Rérat A, Simoes Nunes C, Vaissade P, Roger L. Comparaison de deux techniques d'estimation de l'azote des acides aminés circulants, appliquées à l'étude de l'absorption intestinale de solutions d'acides aminés libres ou de petits peptides. *Repr Nutr Dev* 1987 ; 27 : 955-66.
- 30 - Rérat A, Vaissade P, Vaugelade P. Comparative Digestion of Maltitol and Maltose in Unanesthetized Pigs. *Am Inst Nutr* 1991 ; 731-44.
- 31 - Rérat A, Simoes Nunes C, Mendy F, Vaissade P, Vaugelade P. Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the non-anaesthetized pig. *Br J Nutr* 1992 ; 68 : 111-38.
- 32 - Rérat A, Calmes R, Mendy F, Corring T, Vaissade. Kinetics of amino acids and glucose absorption following the pancreatic diversion in the pig. *Br J Nutr* 1996 ; 75 : 175-93.

33 - Rérat A, Vaissade P, Vaugelade P. Absorption kinetics of amino acids and reducing sugars during digestion of barley and wheat meals in the pig: preliminary data. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 1979 ; 19 : 739-47.

34 - Rérat A, Vaugelade P, Villiers P. A new method for measuring the absorption of nutrients in the pig: critical examination. In: *Current Concepts of Digestion and Absorption in the Pig*. Edited by A.G. Low and I.G. Partridge. The National Institute for Research in Dairying, Reading, U.K. ; 1980 : pp 177-214.

35 - Rowan AM, Moughan PJ, Wilson MN, Maher K, Tasman-Jones C. Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model for digestion studies in man. *Br J Nutr* 1994 ; 71 : 29-42.

36 - Santamaria-Lopez M, Gamez M, Murcia J *et al*. The effect of hepatic vascular exclusion on hepatic blood flow and oxygen supply-uptake ration in the pig. *Eur J Ped Surg* 1997.

37 - Savoie L, Galibois I, Parent G, Charbonneau R. Sequential release of amino acids and peptides during in vitro digestion of casein and rapeseed proteins. *Nutr Res* 1988 ; 8 : 1319-26.

38 - Scanff P, Savalle B, Miranda G, Pelissier JP, Guilloteau P, Toullec R. In vivo gastric digestion of milk proteins: effect of technological treatments. *J Agric Food Chem* 1997 ; 38 : 1623-9.

39 - Schaafsma G, Deriks P, Dekker PR, Waard H. Nutritional aspects of yogurt Microbial lactase activity and digestion of lactose. *Neth Milk Dairy J* 1988 ; 42 : 121-34.

40 - Simoes Nunes C, Galibois I, Rérat A, Savoie L, Vaugelade P. Hepatic and portal-drained viscera balances of amino acids, insulin, glucagon and gastrin in the pig after ingestion of casein or rapeseed proteins. *Reprod Nutr Dev* 1991 ; 31 : 217-31.

41 - Simoes Nunes C, Rérat A, Galibois I, Vaugelade P, Vaissade P. Hepatic and gut balances of glucose, amino nitrogen, ammonia and urea in the pig after ingestion of casein or rapeseed proteins. *Nutr Rep Intern* 1989 ; 40 : 901-7.

42 - Sleisenger MH, Pelling D, Burston D, Matthews DM. Amino acid concentrations in portal venous plasma during absorption from the small intestine of the guinea pig of an amino acid mixture simulating casein and a partial enzymic hydrolysate of casein. *Clin Sci Mol Med* 1977 ; 52 : 259-67.

43 - Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods*. Iowa State Univ Press, Ames, IA ; 1967.

44 - Souffrant WB, Darcy-Vrillon B, Corring T, Laplace JP, Kölher R, Gebhardt G, Rérat A. Recycling of endogenous nitrogen in the pig (preliminary results of a collaborative study). Arch Anim Nutr 1986 ; 36 : 2-3.

45 - Staff. Cultured milk and fresh cheeses. In: The technology of dairy products. Second edition Edited by Ralph Early ; 1998 : 123-56.

46 - Tagari H, Bergman EN. Intestinal disappearance and portal blood appearance of amino acids in sheep. J Nutr 1978 ; 108 : 790-801.

47 - Thouvenot P, Laurens MH, Debry G, Bertrand A. Transit gastro-coecal du yoghourt, du lait, du lait fermenté stérilisé, chez le sujet absorbant et non absorbant de lactose. Actualité de la recherche John Libbey Eurotext LTD ; 1989 : 291-3.

48 - Vaugelade P, Hoebler C, Bernard F *et al.* Non starch polysaccharides extracted from seaweed can modulate intestinal absorption of glucose and insulin response in the pig. Reprod Nutr Dev 2000 ; 40 : 33-47.

49 - Vahouny GV. Effects of dietary fiber on digestion and absorption. In: Physiology of the gastrointestinal tract ; 1987: pp 1623-1648 [L.R. Johnson, editor]. New York: Raven Press.

50 - Windmueller HG, Spaeth AE. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate and aspartate. J Biol Chem 1986 ; 255 : 107-15.

51 - Wolff JE, Bergman EN, Williams HH. Net metabolism of plasma amino acids by liver and portal-drained viscera of fed sheep. Am J Physiol 1972 ; 223 : 438-46.

52 - Young VR, Pellet PL. Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. Am J Clin Nutr 1994 ; 59 : 1203-12

Illustrations

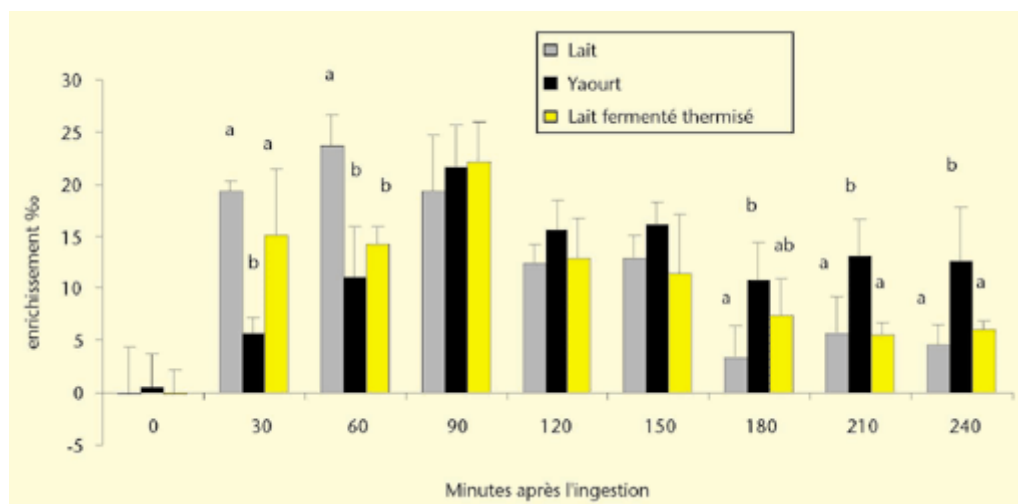


Figure 1 - Différences de concentrations porto-artérielles de ¹⁵N après l'ingestion de 1 000 mL de lait, de yaourt et de lait fermenté thermisé, chez le porc en croissance (moyenne + écart type standard, n = 6)

(a, b) : pour un même temps, les moyennes annotées d'une lettre différente sont significativement différentes (p < 0,05)

	¹⁵ N (mg)		
	L	Y	YT
0-60 min	1 305,7	657,4	1074,5
60-120 min	1 158,8	1 060,7	1176,9
120-180 min	593,1	914,8	657,8
180-240 min	324,6	600,9	373,2
0-240 min (a)	3 382,2	3 233,9	3 339,6
Ingéré (b)	4 046,0	4 046,0	4 046,0
% Absorbé (a/b)	83,6	79,9	81,1

Tableau 1 - Absorption portale de ¹⁵N et d'azote aminé après l'ingestion de 1 000 mL de lait (L), de yaourt (Y) et du lait fermenté thermisé (YT) chez le porc en croissance.