



**HAL**  
open science

# Développement d'outils et de méthodes *in vitro* pour comprendre et simuler la digestion d'aliments à base de protéines végétales

Yohan Reynaud

► **To cite this version:**

Yohan Reynaud. Développement d'outils et de méthodes *in vitro* pour comprendre et simuler la digestion d'aliments à base de protéines végétales. Biologie animale. Agrocampus Ouest, 2020. Français. NNT : 2020NSARB334 . tel-03279438v2

**HAL Id: tel-03279438**

**<https://theses.hal.science/tel-03279438v2>**

Submitted on 6 Jul 2021

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE YOHAN REYNAUD

AGROCAMPUS OUEST

COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600

*Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation*

Spécialités : *Biologie et physiologie animales*

*Sciences de l'aliment*

## **Développement d'outils et de méthodes *in vitro* pour comprendre et simuler la digestion d'aliments à base de protéines végétales**

**Thèse présentée et soutenue à Paris, le 3 février 2020**

**Unités de recherche :**

IMPROVE SAS, F-80480, Dury, France

STLO, INRA, AGROCAMPUS OUEST, F-35042, Rennes, France

GMPA, INRA, AgroParisTech, Université Paris Saclay, F-78850, Thiverval-Grignon, France

UNH, INRA, Université Clermont Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

**Thèse CIFRE n°2016/0719**

**Rapporteurs avant soutenance :**

Claire GAUDICHON Professeure, AgroParisTech

Benoit CUDENNEC Maître de conférences, Université de Lille

**Composition du Jury :**

Président : Françoise NAU

Professeure, Agrocampus Ouest

Examineurs : Adeline BOIRE

Chargée de recherche, UR BIA

Sylvain DENIS

Ingénieur de recherche, UMR MEDIS INRA – Université Clermont Auvergne

Dir. de thèse : Didier DUPONT

Directeur de recherche, UMR STLO INRA – Agrocampus Ouest

**Invités**

Isabelle SOUCHON

Co-dir. de thèse ; Directrice de recherche, UMR INRA GMPA – AgroParisTech

Didier REMOND

Directeur de recherche, UMR UNH INRA – Université Clermont Auvergne

Michel LOPEZ

Directeur scientifique, IMPROVE SAS



## Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Claire Gaudichon, professeure à AgroParisTech, et Benoit Cudennec, maître de conférences à l'université de Lille, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je souhaite également remercier Adeline Boire, chargée de recherche à l'INRAE, Sylvain Denis, ingénieur de recherche à l'INRAE – Université Clermont Auvergne, et Françoise Nau, professeure à l'Agrocampus Ouest d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à évaluer ce travail.

Je tiens à remercier Didier Dupont, mon directeur de thèse, pour ton soutien et ton implication dans ce projet de recherche. Merci pour tous tes conseils avisés sur la digestion *in vitro* que tu m'as donné au cours de ces trois années ! Malgré la distance, tu as toujours su être présent quand il le fallait. Merci pour ta réactivité et pour toute l'aide précieuse que tu m'as accordée. Je voudrais aussi remercier chaleureusement ceux qui tour à tour m'ont accueilli au sein de leur équipe et fait partager leur expérience et connaissances. Par ordre chronologique, Michel Lopez, tu m'as fait partager ta passion de la recherche, fait découvrir le monde merveilleux des protéines végétales et ton fourmillement d'idées a toujours été moteur ! Je suis très reconnaissant envers Didier Rémond, je tiens à te remercier pour avoir désigné les protocoles expérimentaux tout en me laissant une flexibilité dans l'exécution de ceux-ci. Je te suis reconnaissant de m'avoir montré les arcanes de la physiologie digestive et de l'expérimentation animale, ainsi que pour nos discussions toujours fructueuses et enrichissantes sur la nutrition. Enfin, je remercie Isabelle Souchon, co-directrice de thèse, pour m'avoir fait partager ta connaissance sur les aliments, pour ton soutien et tes réflexions toujours éclairées. Je n'oublie pas Alain Riaublanc, qui a toujours été là lorsqu'il était question de conformation des protéines et Daniel Picque pour nos réflexions autour du DiDGI®. Je vous remercie à tous pour avoir initié et monté ce projet, ainsi que de m'avoir fait confiance pour le mener à terme. Un grand merci pour votre implication et pour avoir répondu présent à chacune de nos réunions, toujours de plus en plus fréquentes : je vous remercie pour votre esprit d'équipe, votre bonne entente et votre bonne humeur, qui m'ont permis de conserver un haut niveau de motivation.

Je voulais aussi remercier les différents membres de mon comité de thèse : Valérie Micard, Véronique Chevalier et Jaap Van Milgen, merci pour vos commentaires, vos regards extérieurs et vos remarques constructives qui ont permis de faire avancer ce travail lors des comités de pilotage.

Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai rencontrées à IMPROVE. Tout d'abord Denis Chéreau, pour ton suivi de la thèse, ton aide dans les moments d'interrogations et tes remarques judicieuses ! Plusieurs mentions spéciales : tout d'abord aux collègues du laboratoire

☺ : Angélique Couvent, Ariane Krenkiewick, Valérie Dumontois, Marion Simonot, et Florent Bordet, laboratoires dans lesquelles l'ambiance a toujours été au rendez-vous. Merci de m'avoir donné vos trucs et astuces pour manipuler et de m'avoir dédié le labo 5 pour digérer en toute tranquillité ! Un grand merci au Service Commun pour avoir dosé les séries interminables de Kjeldahl que j'apportais au fur et à mesure, cela a grandement contribué aux présents résultats en termes qualitatifs et quantitatifs ! Un remerciement aux deux corneilles, Florian Dumesnil, maître du Panda, et Teddy Muchembled, sans qui les marcheurs blancs auraient gagné ☺ ! Merci à Jérôme Schwab pour nos séances de levage de fonte et de footing qui nous ont permis de traverser la baie du Crotoy avec succès, et avec Teddy ! Je voudrais remercier également la team humide pour la bonne ambiance : Alexis Robe, Maxime Dupont, Maxime Aviez, Quentin Catieau, Cécile Ruffieux, Simone Scussat et Amadou Sidibé. Spéciale dédicace à Jonathan Taugis pour m'avoir hébergé pendant un mois d'hivers où on a pu augmenter nos skills en cookéo et en grogs ! Merci à tous pour nos afterworks en tout genre, de l'Ours Noir au Tokyo, en passant par les sessions de badminton ! Je suis très reconnaissant aussi envers Jacques Guéguen, Saliha Belaid, Jorge Ventureira, Jean-Luc Mession, Thomas Auxenfans (merci pour les super clichés de MEB) et Jean-Charles Motte qui m'ont prodigué de nombreux conseils et appris beaucoup sur la biochimie des protéines et les procédés technologiques au début de ma thèse. Un grand merci aussi à Frédéric Baudoin pour avoir partagé son savoir-faire en rhéologie et fonctionnalité des protéines et surtout en ukulélé ! Je remercie également Jean-Baptiste Taillez pour son écoute toujours attentive. Enfin je souhaite adresser de chaleureux remerciements à Chantal Lambert et Stéphanie Franclin, qui ont toujours été là pour les affaires administratives qui n'étaient pas toujours simples, et vous avez su les rendre limpides et fluides !

Je suis très reconnaissant envers Gwenaele Henry pour m'avoir initié à l'art de la digestion *in vitro*. Un grand merci à Olivia Ménard et Samira Cássia De Oliveira pour vos précieux conseils sur l'utilisation du DiDGI®. Je souhaite également remercier Valérie Briard-Bion et Julien Jardin pour votre temps à m'expliquer la peptidomique, toujours avec enthousiasme, et pour avoir réussi à trouver des disponibilités malgré votre agenda !! Mention spéciale à Manon Hiolle et à Linda Le Roux pour nos conversations autour de la digestion, de nos problèmes de doctorant et nos expéditions dans Grenade ! Merci à Sophie Legall pour notre discussion avec Alain sur les fibres et pour les avoir dosées dans nos aliments.

Je voudrais remercier l'ensemble de l'équipe Improving (UMR UNH) pour votre accueil chaleureux et toujours bienveillants : Dominique Dardevet, Laurent Mosoni, Marianne Jarzaguet, Sergio Polakof, Isabelle Savary-Auzeloux. Merci pour nos échanges au cours des pauses café ou à la

cantine, parfois enflammés, et je ne vise personne 😊 ! Des mercis spéciaux à Isabelle Papet pour ton aide sur XLSTAT et à Marie-Agnès Peyron pour m'avoir permis de visiter le CROC et de passer quelques heures à tamiser les aliments ! Un énorme merci (j'en suis arrivé à un point où j'essaye de trouver un maximum de manière de dire merci avec un large éventail de degré de reconnaissance !) à Caroline Buffière sans qui l'expérimentation animale serait restée une énigme pour moi ! Merci pour ton support au quotidien, toutes les astuces d'expérimentation et de logistique que tu m'as apprises et ton optimisme sans faille ! Cela a été un plaisir de travailler avec toi ! Tout comme avec Mélissa Vauris et Kévin Liebermann, merci notamment pour votre bonne humeur et votre entrain lors des journées de prélèvements. Les petits-déjeuners restent mémorables ! Merci à Mélissa de m'avoir embarqué dans la foire de la Sainte-Paule d'Issoire, c'était génial ! Je voudrais aussi remercier Benoît Cohade pour ton aide précieuse, toujours avec l'esprit taquin, ce qui est parfait pour affûter sa répartie 😊 ! Également les animaliers : Philippe Lhoste, Julien Hermet, Yohan Delorme avec qui cela a été un plaisir de travailler et de jouer au foot pendant le repas de Noël ! Les expérimentations n'auraient pu avoir lieu sans les chirurgies : je suis très reconnaissant à Denys Durand et Didier Rémond (une nouvelle fois), qui les ont réalisées avec Simon Collange, Julien Mongiat, Benoît Cohade et Jérémie David. Merci d'avoir trouvé des créneaux pour ces trois chirurgies dans la plage courte de temps qui nous était donnée ! Je voudrais remercier Noureddine Hafnaoui pour avoir pris le temps de m'expliquer les dosages d'acides aminés et de les avoir réalisés ! Merci beaucoup à mes deux compères d'Auvergne, Jérémie David, l'homme au doigt magique – merci de m'avoir fait découvrir le Saint-Nectaire du marché d'Aubière et la beauté de la région, chaque week-end était en quelque sorte des vacances – et Ben Mohamed, maitre Ben Kenobi, pour ton calme et ta zenitude implacable ! Merci pour ces sessions repas – jeux vidéo – film qui terminaient en dodo canapé, cela m'a permis de tester quelques cocktails ! Je souhaite enfin remercier toutes les cochonnes qui ont participé aux expérimentations. Sans vous, cette thèse n'aurait pas existé. Je vous remercie profondément.

Enfin un grand merci à toutes les personnes de mon dernier laboratoire d'accueil, le GMPA, dans lequel j'ai apprécié travailler et partager vos traditions, des Discusciences à la journée AQR ! Merci à toute l'équipe ADP pour votre soutien et votre disponibilité, en particulier à Anne Saint-Eve, pour tes conseils en statistiques et Vincent Mathieu pour ton aide toujours bienvenue et bienveillante (en particulier la préparation à la soutenance où sans toi, et bien, je ne me serais pas préparé !). Merci, à Steven LeFeunteun, avec qui à chaque fois nos conversations ou réunions ont permis un déblocage et une avancée dans l'interprétation des résultats. Merci d'avoir mis le holà sur mes vellétés de modélisation, sans quoi je serai encore en train de rédiger l'état de l'art. En parlant de modèle, merci à Cristian Trelea pour ses tuyaux sur les équations pour la régression des courbes de pH gastrique. Je

suis très reconnaissant à Thomas Cattenoz et Hervé Guillemain pour votre aide primordiale et votre bonne humeur pour initier les expériences sur le DiDGI<sup>®</sup>, formaliser et fixer les paramètres ! Un grand merci à David Forest, avec qui ça a été un plaisir de manipuler, tout en parlant de rap, de poèmes et de films d'horreur, j'ai toujours les « to watch/hear list » que je complète au fur et à mesure ! Je tiens aussi à remercier Pablo Granda et Brigitte Deau pour l'organisation de la fabrication des émulsions sur le Panda de GENIAL, qui se sont toujours très bien déroulées. Un grand merci à Aline Manach, pour ta motivation et ta pertinence, qui nous ont réussi à faire avancer notre expertise sur le DiDGI<sup>®</sup>. Ce stage n'aura pas été de tout repos, mais j'espère qu'il aura été formateur ! Je remercie également Thierry Feugnet, Laurence Fruchart, Anne Blivet, Laurence Fauvel et Laurence Adamandidis pour votre aide pour naviguer dans les méandres administratifs et de toujours avoir répondu présents pour gérer les situations inextricables. Merci à mes colocataires, Valentine Chartrel, Mathieu Mantelet, Christophe Gigot, Rong Jiang, puis Cynthia El Youssef, Pedro Arana et Thomas Payet pour les soirées, repas, apéros, barbecues, nouvel an chinois, sessions musique/ciné/série/gaming partagés sur la verdoyante et mythique terrasse ou dans notre merveilleux salon ! Je remercie en particulier deux d'entre eux qui m'ont permis de ne pas me refermer sur moi-même et de m'avoir fait découvrir des dimensions de la musique inconnues jusqu'alors : d'Aya au Maître, en passant par Emile. Spéciale dédicace à Valentine, qui a tué toutes les araignées et gendarmes de la maison (j'étais contre !) ce qui m'a permis d'installer mon hamac en toute tranquillité, dans lequel j'ai pu travailler, mais surtout dormir. Bien sûr à la super team futsal, dont les matchs du mardi midi, jour tant attendu de la semaine, ont pu expliquer le décalage de quelques points de cinétique ! D'autres remerciements en particulier aux MVPs, Bastien Maurice, grand homme – merci pour nos échanges sur la nutrition – et à la tour de contrôle, aussi fameux collègue de bureau, Camille Quantier. Spéciale dédicace au Bro Rohit Srivastava, grand cuisinier (10 kg de cuisine indienne en 6 heures) et membre imminent du road trip Pentecôte avec « Docteur Mantelette » et explorateur de Saint-Laurent-de-Cuves et de Londres à pied ! Merci au collectif des doctorants et autres amateurs d'afterworks, raclettes et piñata pour la super bonne ambiance : Loulou Maria Tovilla, Ana-Karen Sanchez, Juan Buceta, Alice Danel, Florence De Fouchécourt, Amélie Girardeau, Phuong Nguyen (dite Maman), Phuong Pham (dite Casquette), Cécilia Arnaud, Audrey Cosson, Daniela Freitas et Nan Yang.

J'aimerais remercier mes amis de longue date, qui ont toujours été là malgré les distances et les peu de moments disponibles, on aura quand même trouvé du temps pour caser quelques road trips, soirées et apéros ! A Rapha et Maéva, Max, Thibaut et Yuri, je ne vais pas m'épancher plus, et vais simplement vous dire merci ! Enfin je suis infiniment reconnaissant à ma famille, mes parents, mon frère et mes sœurs qui m'ont récupéré les weekends et les vacances à dormir non-stop ! Merci de

m'avoir soutenu en toute circonstance, du début à la fin de la thèse, de l'emménagement à Amiens à l'organisation du pot de thèse !

Et bien sûr, à toutes les personnes qui j'ai croisé sur ma route et qui m'ont forcément influencées et apportées quelque chose, je les remercie. Ecrivant les remerciements en période de confinement – il fallait au moins cela pour rédiger des remerciements – je souhaite bon courage à tout le monde au sens littéral du terme.



*Pourquoi, dans les villes où l'on passe, s'applique-t-on à choisir douze cartes postales différentes -  
puisqu'elles sont destinées à douze personnes différentes ?*

Pensées, maximes et anecdotes, Sacha Guitry

*Pourtant intelligent, un tel, il est til-gen ? Nan... Il tient les ficelles de ton cerveau lent.  
Lis tes ratures, c'est dans l'erreur qu'on se culture, moins t'en as, plus tu l'étales et t'as niqué  
toute la confiture.*

#31#, Virus

*Éloignés, nous sommes à court d'idées. Enlacés nous sommes un bouquet d'orchidées.*

La Danse couchée, Oxmo Puccino

*Citer les pensées des autres, c'est regretter de ne pas les avoir trouvées soi-même.*

Sacha Guitry

## Sommaire

<b>Introduction générale .....</b>	<b>30</b>
<b>Chapitre 1. Revue bibliographique.....</b>	<b>34</b>
<b>1.1 Contexte et enjeux : des protéines végétales de qualités.....</b>	<b>34</b>
<b>1.2 Protéines végétales et aliments à base de protéines végétales .....</b>	<b>38</b>
1.2.1 Origines et caractéristiques des protéines végétales.....	38
1.2.2 Méthodes d'extraction des protéines .....	49
1.2.3 Conception d'aliments à base de protéines végétales.....	51
1.2.4 Impact des procédés technologiques sur la structure des protéines.....	53
1.2.5 Caractérisation multi-échelle des aliments et des protéines .....	59
<b>1.3 Mécanismes de la digestion protéique chez les Monogastriques .....</b>	<b>61</b>
1.3.1 Protéolyse digestive globale .....	61
1.3.2 Régulations neuro-hormonales et biomécanique du processus digestif .....	76
1.3.3 Devenir des produits de dégradation protéique : l'absorption.....	80
1.3.4 Notions de biodisponibilité et bioaccessibilité .....	82
<b>1.4 Détermination de la qualité nutritionnelle d'une protéine.....</b>	<b>83</b>
1.4.1 La teneur en acides aminés indispensables et les recommandations nutritionnelles	83
1.4.2 Définition de la digestibilité .....	84
1.4.3 Les indices définissant la qualité nutritionnelle des protéines : PDCAAS et DIAAS	87
<b>1.5 Modèles de digestion humaine pour l'étude de la digestion.....</b>	<b>90</b>
1.5.1 Modèles animaux.....	90
1.5.2 Protocoles <i>in vitro</i> de digestion .....	98
1.5.3 Simulations mathématiques : modèles <i>in silico</i> .....	114
<b>1.6 Les méthodes analytiques pour le suivi de la digestion des protéines .....</b>	<b>115</b>
1.6.1 Une combinaison de techniques pour une analyse en cinétique.....	115
1.6.2 Suivi d'hydrolyse avec un pH-stat.....	118
1.6.3 La quantification de la matière protéique pour réaliser des bilans de digestions	119
<b>1.7 Facteurs de variation de la digestion et de la biodisponibilité protéique.....</b>	<b>121</b>
1.7.1 Les protéines alimentaires .....	121
1.7.2 Matrice alimentaire.....	124
1.7.3 Effets des traitements technologiques : exemple de l'augmentation de la température	130
1.7.4 Facteurs liés à l'expérimentation.....	133
<b>1.8 La digestion des protéines végétales et aliments à base de protéines végétales..</b>	<b>133</b>

1.8.1	Données <i>in vitro</i> sur la digestion de protéines végétales et les aliments étudiés	133
1.8.2	Indicateurs de la qualité nutritionnelle des protéines végétales parmi la diversité des protéines alimentaires : comparaison du PDCAAS et du DIAAS	135

**Chapitre 2. Comparaison de l'évolution du degré d'hydrolyse pendant la digestion *in vitro* de fractions de protéines végétales par rapport à celle de matrices alimentaires protéiques végétales..... 169**

<b>2.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>171</b>
<b>2.2</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>172</b>
2.2.1	Preparation of products.....	172
2.2.2	Food Characterisation.....	173
2.2.3	<i>In vitro</i> digestion protocol .....	174
2.2.4	Release of $\alpha$ -amino groups and determination of degree of hydrolysis (DH)....	176
2.2.5	Data & Statistical Analysis.....	176
<b>2.3</b>	<b>Results and Discussion.....</b>	<b>177</b>
2.3.1	Nutritional and structural characterisation .....	177
2.3.2	Degree of Hydrolysis (DH) .....	180
2.3.3	Effect of the food structure on proteolysis .....	181
2.3.4	Protein source and effect on proteolysis.....	186
<b>2.4</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>188</b>

**Chapitre 3. Evolution postprandiale du pH intragastrique : comparaison des techniques de mesures, effets de la structure de l'aliment et modélisation des cinétiques ..... 194**

<b>3.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>196</b>
<b>3.2</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>197</b>
3.2.1	Animal Handling & Surgery .....	197
3.2.2	Experimental foods and meals.....	197
3.2.3	Measuring intragastric pH .....	198
3.2.4	Physicochemical analysis .....	199
3.2.5	Data and statistical analysis.....	200
3.2.6	Regression equations .....	200
<b>3.3</b>	<b>Results .....</b>	<b>200</b>
3.3.1	Meal characteristics and basal pH .....	200
3.3.2	Postprandial kinetics of intragastric pH.....	202
3.3.3	Modelling the kinetics of postprandial intragastric pH .....	206
<b>3.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>207</b>
3.4.1	Comparison of the pH measurement methods.....	207

3.4.2	pH spatial distribution and chyme heterogeneity .....	208
3.4.3	Effects of food type on gastric pH kinetics .....	209
3.4.4	Regression analysis of gastric pH kinetics .....	210
<b>3.5</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>211</b>
<b>Chapitre 4. Digestibilité vraie des acides aminés et score des acides aminés indispensables digestibles d'aliments à base de protéines végétales .....</b>		
<b>217</b>		
<b>4.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>219</b>
<b>4.2</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>220</b>
4.2.1	Animal handling and surgery .....	220
4.2.2	Food types .....	220
4.2.3	Sampling and chemical analysis.....	221
4.2.4	Calculations .....	223
4.2.5	Data and statistical analysis .....	224
<b>4.3</b>	<b>Results .....</b>	<b>224</b>
4.3.1	Amino acid profiles of the foods .....	224
4.3.2	Flow of crude protein and amino acids in the ileum .....	227
4.3.3	Ileal digestibilities of crude protein and amino acids for the different food types .....	228
4.3.4	Levels of $\alpha$ -amino groups in the plasma.....	237
4.3.5	Nutritional protein quality of the foods .....	237
<b>4.4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>238</b>
<b>4.5</b>	<b>Conclusions.....</b>	<b>240</b>
<b>4.6</b>	<b>Résultats complémentaires.....</b>	<b>245</b>
4.6.1	Caractéristiques des effluents duodénaux : la teneur en matières sèche et les concentrations en marqueurs indigestibles .....	245
4.6.2	Les paramètres de vidange gastrique des quatre aliments déduits des marqueurs indigestibles quantifiés dans les effluents duodénaux des mini-porcs. ....	247
4.6.3	La protéolyse in vivo dans l'estomac et le duodénum estimée en réalisant le ratio de la teneur en amines libres sur l'azote total de l'échantillon.....	248
4.6.4	Solubilité de l'azote alimentaire en condition <i>in vitro</i> gastrique.....	250
<b>Chapitre 5. Programmation aliment-spécifique du système <i>in vitro</i> dynamique DiDGI® : corrélation avec la digestion protéique d'aliments à base de soja dans un modèle porcin .....</b>		
<b>251</b>		
<b>5.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>253</b>
<b>5.2</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>254</b>
5.2.1	Test meals .....	254
5.2.2	<i>In vivo</i> digestion study on mini-pigs.....	255

5.2.3	Determination of operating parameters for the DiDGI® dynamic <i>in vitro</i> system	257
5.2.4	<i>In vitro</i> digestion study using DiDGI®	260
5.2.5	Values to be correlated between <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> experiments	261
5.2.6	Data & statistical analysis	262
<b>5.3</b>	<b>Results</b>	<b>263</b>
5.3.1	Effect of the model on dry matter content	263
5.3.2	Effect of the model on local apparent degree of proteolysis	264
5.3.3	Effect of the model on the molecular weight distribution of gastric peptides	270
5.3.4	Effect of the model on ileal digestibility	271
<b>5.4</b>	<b>Discussion</b>	<b>272</b>
<b>5.5</b>	<b>Conclusion</b>	<b>274</b>
<b>5.6</b>	<b>Résultats complémentaires : comparaison des digestions de tofu et de jus de soja sur le DiDGI®</b>	<b>281</b>
<b>Chapitre 6.</b>	<b>Discussion générale</b>	<b>286</b>
6.1	Comparaison des différents modèles de digestion	286
6.2	Impact des autres macronutriments sur la digestion des protéines : les protéines seules, l'aliment seul ou le repas	297
6.3	Comparaison de la digestion des protéines végétales et des protéines animales	304
<b>Chapitre 7.</b>	<b>Conclusion générale et perspectives</b>	<b>307</b>
<b>Annexes</b>		<b>314</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Consommation énergétique alimentaire journalière (kcal) par individu en fonction de son revenu. Relations fondées sur des données de 2001 issues de 57 pays (adapté de(Gerbens-leenes, Nonhebel and Krol, 2010). La courbe noire provient d'une régression des données et l'aire grisée représente l'intervalle de confiance à 90 %.	35
Figure 2 : Contribution à l'énergie apportée par l'alimentation des différents macronutriments en fonction du revenu de la population. Relations fondées sur des données de 2001 issues de 57 pays (adapté de(Gerbens-leenes, Nonhebel and Krol, 2010). Les aires colorées sont indicatives représentant les différents macronutriments et n'ont aucune valeur statistique.	35
Figure 3 : Régionalisation de la consommation journalière par habitant en protéine de 1961 à 2013 (FAOSTAT, 2017).	36
Figure 4 : Part énergétique des produits d'origine animale dans l'alimentation en fonction du revenu de la population. Relations fondées sur des données de 2001 issues de 57 pays (adapté de(Gerbens-leenes, Nonhebel and Krol, 2010).	36
Figure 5 : Teneur en protéines de 84 aliments communs en fonction de la quantité de protéines produite pour l'émission d'un kilogramme d'équivalent CO <sub>2</sub> . Les produits d'origine végétale sont représentés par carré noir, les produits d'origine animale par un cercle blanc (adapté de(González, Frostell and Carlsson-Kanyama, 2011).	37
Figure 6 : Nombre de produits commercialisés contenant des protéines végétales en France de 1989 à 2019 (GEPV, 2019).	37
Figure 7 : Composition globale des graines de soja, de blé et de pois, en % de la matière sèche (d'après (Godon, 1996).	40
Figure 8 : Coupes transversales des graines de Monocotylédones et Dicotylédones.	40
Figure 9 : Voies de transposition de l'azote exogène dans les acides aminés pour la synthèse protéique dans les cellules parenchymateuses (endosperme) ou le cotylédon (tiré de(Smith, 1984).	41
Figure 10 : Schéma des liaisons possibles entre les acides aminés d'une chaîne protéique (d'après(Nesterenko, 2012).	42
Figure 11 : Classification des structures III <sup>aires</sup> (selon(Levitt and Chothia, 1976).	44
Figure 12 : Schéma des différentes conformations au cours du repliement de la $\beta$ -lactoglobuline (tiré de(Kuwata <i>et al.</i> , 2001).	49
Figure 13 : Schéma global de l'extraction des protéines des matières végétales et devenir des différents constituants (tiré de(Godon, 1996).	51
Figure 14 : Diagramme de fabrication des aliments étudiés et des prétraitements qu'ils ont subis (UHT : traitement Ultra-Haute Température).	53
Figure 15 : Etapes classiques de déstructuration des globulines sous l'influence de la chaleur (adapté de(Tang, 2017). Les fourchettes de température sont globales.	54
Figure 16 : Courbe de solubilité classiques des protéines natives étudiées en solution aqueuse en fonction du pH (adapté de(Godon, 1996; Shand <i>et al.</i> , 2007).	58
Figure 17 : Mécanisme global de dénaturation des globulines sous l'effet des variations de condition de température et de l'environnement chimique (pH, FI : Force Ioniques) (adapté de(Mession, 2012)et fondé sur (Bryant and McClements, 1998; Clark, Kavanagh and Ross-Murphy, 2001).	58
Figure 18 : Echelles approximatives de la structure des éléments et composés contenus dans les aliments. Les méthodes d'observations associées à l'échelle sont données par les étiquettes grise en haut de la figure (tiré de(Aguilera, 2006).	60
Figure 19 : Schéma général de la dégradation des protéines chez un Monogastrique.	60

Figure 20 : Division anatomique et fonctionnelle de l'estomac. Le bol alimentaire est mixé et déstructuré par pression, péristaltisme et broyage (adapté de(Adler, 2010). .....	66
Figure 21 : Différentes cinétiques d'acidification gastrique enregistrées chez l'Homme grâce à une sonde naso-gastrique (Malagelada <i>et al.</i> , 1976; Dressman, 1986; Van Wey <i>et al.</i> , 2014; Sams <i>et al.</i> , 2016). Un repas solide - liquide comporte des aliments solides, e.g. de la viande ou du pain, et de l'eau (représentant au moins 50 % du poids du repas). .....	68
Figure 22 : Carte de distribution des pH au cours de la digestion de riz, d'amandes ou de gels de protéines de blanc d'œuf dans des estomacs de Porcs (adaptés de(Bornhorst <i>et al.</i> , 2014; Nau <i>et al.</i> , 2019). .....	68
Figure 23 : Les cinétiques de vidange gastrique du bol alimentaire qui varient suivant : A) ses propriétés physiques, B) sa densité calorique (pourcentage de fraction de chyme restante dans l'estomac en fonction du temps) (tiré de(Goyal, Guo and Mashimo, 2019). .....	69
Figure 24 : Les protéases libres dans la lumière intestinale (Floc'h and Seve, 2000).....	72
Figure 25 : Sites actifs de la chymotrypsine et de l'élastase (Fersht, 1999). .....	72
Figure 26 : La nature des sécrétions bilio-pancréatiques postprandiales et les mécanismes généraux de régulation.....	76
Figure 27 : Synthèse des effets de rétrocontrôle biomécanique sur la digestion des protéines alimentaires. ....	77
Figure 28 : Schéma de l'absorption des protéines par les entérocytes (adapté de(Ganapathy, 2012). .....	80
Figure 29 : Principaux flux azotés (FAO, WHO and UNU, 2007). Les valeurs en grammes d'azote par jour sont obtenues chez le porc en croissance ; celles présentées en moyennes ± écart-type sont mesurées et les valeurs seules sont estimées (Souffrant, 1991). .....	82
Figure 30: Schéma résumant les différentes digestibilités calculables. ....	86
Figure 31 : Schémas illustrant la répartition de la leucine marquée (marquage de l'organisme via une perfusion continue de leucine marquée (ici de <sup>13</sup> C-leucine) dans le plasma), représentée par des cercles pleins rouges dans les différents pools protéiques de l'organisme en phases inter- et postprandiales (adapté de (Wolfe <i>et al.</i> , 2019);(Fouillet <i>et al.</i> , 2001). .....	99
Figure 32 : Schéma du DiDGI® et des données nécessaires au paramétrage. ....	114
Figure 33 : Trypsinolyse de protéines de pois suivie par les trois méthodes de dosages des amines libres (d'après(Panasiuk <i>et al.</i> , 1998). .....	116
Figure 34 : Pourcentage relatif de la bande des feuillettes β sur un spectre FTIR (1630 – 1638 cm <sup>-1</sup> ) en fonction de la digestibilité in vitro de différentes protéines (tiré de(Carbonaro, Maselli and Nucara, 2015). .....	123
Figure 35 : Diagramme de l'élaboration d'un aliment, l'impact sur la nature de sa matrice et in fine sur les processus digestifs et son utilisation métabolique (adapté de(Fardet, Souchon and Dupont, 2013). .....	126
Figure 36 : Evènements physiques que subit la fraction particulaire du digestat pendant et après la digestion enzymatique (d'après(Lentle, 2018). .....	126
Figure 37 : PDCAAS non tronqué (calculé avec la digestibilité standard iléale suivant (FAO and WHO, 1991) avec les besoins en AAI des enfants de 2 à 5 ans comme référence) en fonction du DIAAS (calculé suivant (FAO, 2013) avec les besoins en AAI des enfants âgés, adolescents et adultes comme référence) de 210 produits dont les aminogrammes et les digestibilités iléales standardisées obtenues chez l'Homme ou le Porc sont disponibles dans la littérature (AFZ <i>et al.</i> , 2000; Gaudichon <i>et al.</i> , 2002; Petersen and Stein, 2005; Deglaire <i>et al.</i> , 2009; Hackl <i>et al.</i> , 2010; Hu <i>et al.</i> , 2010; Rojas and Stein, 2013; Cervantes-Pahm, Liu and Stein, 2014; CVB Feed Table 2016, 2016; Abelilla, Liu and Stein, 2017; Mathai, Liu and Stein, 2017; Bindari, Lærke and Nørgaard, 2018; Hodgkinson <i>et al.</i> , 2018). La droite en	

trait plein noir est la première bissectrice et la droite en pointillés noirs est la régression linéaire de $f(\text{DIAAS}) = \text{PDCAAS}$ .	136
Figure 38 : Schéma de la stratégie globale de thèse.	137
Figure 39: Representative images from confocal laser scanning microscopy of seitan and tofu, before and after freeze-drying. Proteins were labelled in green and lipids in red (scale bar is 100 $\mu\text{m}$ ).	178
Figure 40: Representative images from scanning electron microscopy of seitan and tofu (scale bar is 100 $\mu\text{m}$ ).	179
Figure 41: Amount of total food nitrogen in the reactor ( $N_{\text{tot food}}$ ) compared to the total amount of nitrogen in $\alpha$ -amino groups released after total acid hydrolysis ( $N_{100\%}$ ) (bars are shown with standard deviations, $n = 2$ total hydrolyses). The black line indicates the amount of $\alpha$ -amino nitrogen contributed by pancreatin in the intestinal phase. Percentages above bars are relative differences between $N_{\text{tot food}}$ and $N_{100\%}$ : $(N_{\text{tot food}} - N_{100\%})/(N_{\text{tot food}})$ . SMP: Skim milk powder.	181
Figure 42: Profiles of degree of hydrolysis, calculated with $N_{\text{tot food}}$ (DH), of protein during <i>in vitro</i> gastric digestion. Bars represent mean $\pm$ SD; $n = 3-7$ digestions. Panels show the DH of foods before and 1, 5, 10, 30, 60, and 120 min after incubation with pepsin. A) Seitan group; B) Tofu group; C) Pea group; D) Soya milk group. Letters (a – b) above bars indicate results of statistical comparison with post-hoc Tukey tests.	183
Figure 43: Profiles of the degree of hydrolysis, calculated with $N_{\text{tot food}}$ (DH), of protein during <i>in vitro</i> intestinal digestion. Bars represent mean $\pm$ SD; $n = 3-6$ digestions. Panels show the DH of foods before and 1, 5, 10, 30, 60, and 120 min after incubation with pancreatin. A) Seitan group; B) Tofu group; C) Pea group; D) Soya milk group. Letters (a – b) above bars indicate results of statistical comparison with post-hoc Tukey tests.	184
Figure 44: Approximate position of the pH monitoring equipment within the stomach. The dark red line represents the pH catheter, and the two sensors are depicted using circles (Cat1 & Cat2). The thin blue line is the silk thread that was attached to the wireless pH capsule, which is represented by a rectangle (WCap). Cat1 and Cat2 were connected to a pH meter via the catheter. In contrast, the pH capsule wirelessly transmitted data to a pH meter.	198
Figure 45: Graphical explanation of parameters from the modelled gastric pH kinetics after ingestion of A) the tofu and B) the pea emulsion. Modelled curves of the gastric pH recorded with the catheter (average of values measured with both probes of the catheter Cat1 and Cat2) are black full curves. First time derivatives multiplied per a factor 10 are grey full curves. Some parameters of regression ( $t_1$ , $t_2$ , $t_3$ , $\text{pH}_{\text{MAX}}$ , $\text{pH}_{\text{Inf}}$ , $\text{pH}_{\text{MIN}}$ ) are set on graphics to give some clues for interpreting them.	201
Figure 46: Temporal changes in postprandial intragastric pH ( $n = 4$ animals) characterised with each of the catheter sensors over a 300-min period after (A) seitan, (B) tofu, (C) pea emulsion, and (D) soymilk ingestion. The measurements were averaged over 6-min intervals. The circles are the means for each interval, and the bars represent the SEM. The filled dark circles represent the data from the first pH catheter sensor (Cat1). The empty grey circles represent the data from the second pH catheter sensor (Cat2).	202
Figure 47: Temporal changes in postprandial intragastric pH ( $n = 4$ animals) characterised with the three measurement methods over a 300-min period following meal ingestion. The effects of different food types were tested: (A) seitan, (B) tofu, (C) pea emulsion, and (D) soymilk. For the <i>in situ</i> methods, measurements were averaged over 6-min intervals. The circles are the means for each interval, and the bars represent the SEM. The filled dark circles represent the data from the pH catheter method (averaged across the two sensors; Cat). The empty grey circles represent the data from the wireless pH capsule method (WCap). The filled grey squares represent the data from the <i>ex vivo</i> chyme sampling method (ExV). The stars indicate time points where there were significant differences. For each food type, relative standard error ( $\text{SEM} \times 100 / \text{MEAN}$ ) was calculated for each 6-min interval for the Cat and WCap methods and for the chyme sampling points for the ExV method. The results are represented in the boxplots below. The values near the boxplots are the mean relative standard errors.	204



Figure 48: (A) Temporal patterns in postprandial intragastric pH (n = 4 animals) characterised with the pH catheter method (Cat; pH values averaged across the two sensors) over a 300-min period following meal ingestion. Measurements were averaged over 6-min intervals. The circles are the means for each interval, and the bars represent the SEM. The filled dark circles represent the seitan data, the empty grey circles represent the tofu data, the filled dark squares represent the pea emulsion data, and the empty grey squares represent the soymilk data. Significant differences at a given time point are indicated by the presence of black lines above the plot. (B) Results of the regression analysis of temporal patterns in postprandial intragastric pH as characterised by the pH catheter method (Cat; pH values averaged across the two sensors; solid lines) and by the wireless pH capsule method (WCap; dashed lines) over a 300-min period following food ingestion. The different food types are indicated by different shades of grey. .... 205

Figure 49: Profiles of indispensable AAs for the different food types compared to the standard amino acid profile for the oldest age group (older child, adolescent, and adult; in  $g_{AA}.100g_{Protein}^{-1}$ , His: 1.6; Ile: 3; Leu: 6.1; Lys: 4.8; sulphur-containing amino acids [SAAs]: 2.3; aromatic amino acids [AAAs]: 4.1; Thr: 2.5; Trp: 0.66; Val: 4). .... 226

Figure 50: Profiles of indispensable AAs for the different food types compared to the standard amino acid profiles for the three age groups: A) infant (birth to 6 months) (FAO, 2013); B) child (6 months to 3 years) (FAO, 2013); and C) older child, adolescent, and adult (FAO, 2013) ..... 227

Figure 51: Basal and specific flows of endogenous amino acids (g) and the flow of undigested amino acids (g) in the ileum after the consumption by miniature pigs of A) the seitan, B) the pea emulsion, C) the soya milk, and D) the tofu (the bars represent the SEMs for the six pigs). The data were analysed using mixed model ANOVAs, where pig identity was a random effect and food type was a fixed effect. Food type had a significant effect on total flows of cysteine ( $P = 0.0021$ ) and methionine ( $P = 0.0026$ ) and on some of the undigested amino acids. Post-hoc comparisons were carried out using the least-square means. Differences in the letters (a–b) below the bars indicate there were significant differences between food types for the total flow of that amino acid; differences in the Greek letters ( $\alpha$ – $\beta$ ) above the bars indicate that there were significant differences between food types for the flow of the undigested form of that amino acid. For marginally insignificant effects ( $0.05 < P < 0.10$ ), the letters are in italics (e.g., tyrosine)..... 230

Figure 52: Levels of  $\alpha$ -amino groups in the plasma after the consumption of the seitan, tofu, pea emulsion, and soya milk (n = 6 pigs). These patterns were analysed using mixed model repeated measures ANOVAs, where pig identity was a random effect and food type, sampling time, and their interaction were fixed effects. There were significant differences between liquid meals (pea emulsion and soya milk) and solid meals (seitan and tofu) 30–210 min after food intake, as indicated by the horizontal line and asterisk. At 270 min, only the seitan and pea emulsion still differed ( $P = 0.0018$ ), as shown by the differing letters (a–b). .... 237

Figure 53: Dry Matter content (A), Chromium (B) and Ytterbium (C) recovered fractions in samples taken through the duodenal cannula at different time after ingestion (MEAN  $\pm$  SEM; n = 6). Mixed models of repeated measures ANOVA with animal as random effect, and, meal, time and meal\*time as fixed effects were performed on data. Significant interactions were found for Dry Matter content ( $P < 0.0001$ ) and percentage of recovered Ytterbium ( $P = 0.0015$ ), thus post hoc LSMEANS test was performed. Letters (a – c) shows significant difference at each time ( $P < 0.05$ ). .... 246

Figure 54: Curves of modelled gastric emptying of liquid phase (A) or solid phase (B) (MEAN  $\pm$  SEM; n = 5 - 6)..... 247

Figure 55: Evolution of the proteolysis in the stomach and the duodenum. Total Nitrogen content in gastric (A) and duodenal samples (A').  $\alpha$ -amino group content in gastric (B) and duodenal samples (B'). Local Apparent Degree of Proteolysis (LADP) in gastric (C) and duodenal samples (C'). Data are MEAN  $\pm$  SEM; n = 4 animals in gastric assays; n = 6 animals in duodenal assays. Mixed models of repeated measures ANOVA with animal as random effect, and, meal, time and meal\*time as fixed effects were performed on data. Significant interactions were found for data, thus post hoc LSMEANS test was performed. Letters (a – c) shows significant difference at each time ( $P < 0.05$ ). .... 249

Figure 56: Parameters of gastric emptying (MEAN $\pm$ SEM; n = 5–6). Mixed model ANOVA was performed on regression parameters ( $\beta$ , t1/2, A), with animal as random effect and meal as fixed effect. No significant difference was observed between soya milk and tofu meals. ....	258
Figure 57: Parameters of the intestinal flow after tofu meal (broken blue curve) or soya milk meal (solid red line) ingestion (MEAN $\pm$ SEM; n = 5–6). ....	258
Figure 58: pH of the duodenal content collected in vivo after tofu (solid blue curve) or soya milk meal (solid red line) ingestion (MEAN $\pm$ SEM; n = 6). ....	259
Figure 59: Comparison of duodenal dry matter content in the DiDGI <sup>®</sup> (MEAN $\pm$ SD; n = 3) and in mini-pigs (MEAN $\pm$ SD; n = 6) after ingestion of (A) the soya milk meal and (B) the tofu meal (MEAN $\pm$ SEM; n = 6). Repeated measures ANOVA was performed with model, time, and model*time as fixed effects. Significant interactions were found for both the soya milk meal (P = 0.0435) and the tofu meal (P < 0.0001); a post-hoc LSMEANS test was therefore performed. Stars above curves indicate a significant difference between models at the given sampling time (P < 0.05). ....	263
Figure 60: Comparison of ileal dry matter content in DiDGI <sup>®</sup> (MEAN $\pm$ SD; n = 3) and in mini-pigs (MEAN $\pm$ SD; n = 6) after ingestion of (A) the soya milk meal and (B) the tofu meal. Repeated measures ANOVA was performed, with model, time, and model*time as fixed effects. Significant interactions were found for the soya milk meal (P = 0.0113) and the tofu meal (P = 0.0329); a post-hoc LSMEANS test was therefore performed. Stars above bars indicate significant differences between models at each sampling time (P < 0.05). ....	264
Figure 61: Kinetics of proteolysis in the stomach and the duodenum, as measured by the evolution of the local apparent degree of proteolysis (LADP) in gastric (A: soya milk meal and A': tofu meal) and duodenal samples (B: soya milk and B': tofu). Data are MEAN $\pm$ SEM; n = 4 animals in gastric assays; n = 6 animals in duodenal assays. Repeated measures ANOVA was performed, with model, time, and model*time as fixed effects. Significant interactions were found for gastric LADP following tofu input (P = 0.0444) and duodenal LADP following soya milk input (P = 0.0002); a post-hoc LSMEANS test was therefore performed. Stars above curves indicate a significant difference between models at the given sampling time (P < 0.05). ....	265
Figure 62: Values for local apparent degree of proteolysis in the duodenum were plotted against duodenal dry matter content following ingestion of A) the soya milk meal or B) the tofu meal. DiDGI <sup>®</sup> data (3 repetitions) are represented by crosses and mini-pig data (6 animals) are represented by solid squares. Colours indicate the time elapsed since ingestion (dark green: 20 min; light green: 60 min; orange: 120 min; red: 180 min). ....	266
Figure 63: Results from animal/in vitro trials visualised using a Principal Component Analysis (PCA) of the molecular weight distributions of peptide fractions and the local apparent degree of proteolysis in the stomach. A) depicts the circle of correlation and contribution of each variable to the x- and y-axes. B) is a graphical representation of digestion of the soya milk meal (dotted arrows) or the tofu meal (solid arrows) in the stomach of a mini-pig (blue arrows) or in the first compartment of the DiDGI <sup>®</sup> (green arrows). C) highlights the evolution of a selection of peptide fractions determined by molecular weight (range): i) 10–18 kDa; ii) 2.5–3 kDa; iii) 1.5–2 kDa; iv) 1–1.5 kDa; v) 0.8–1 kDa. Standard errors of the mean are shown for each bar. Statistical results are shown for the interactions model*time, food*time, and model*food*time. n = 4 animals and n = 3 in vitro assays. ....	269
Figure 64 : A) et A') représentent l'évolution de la proportion massique du surnageant dans les prélèvements gastriques et duodénaux respectivement. B) et B') montrent l'évolution de la quantité d'azote total dans les prélèvements gastriques et duodénaux respectivement. C) et C') présentent l'évolution de la proportion d'azote soluble dans les prélèvements gastriques et duodénaux respectivement. ....	283
Figure 65 : Evolution des proportions des poids moléculaires des peptides lors de la digestion <i>in vitro</i> dynamique du jus de soja.....	284
Figure 66 : Evolution des proportions des poids moléculaires des peptides lors de la digestion <i>in vitro</i> dynamique du tofu.....	285

Figure 67 : Evolution des concentrations en activités enzymatiques (pepsine dans l'estomac, trypsine dans le duodénum) dans les systèmes <i>in vitro</i> statique et dynamique. Les calculs ont été réalisés à partir des quantités d'activité enzymatiques incorporées, où les effets du pH sur les activités enzymatiques ne sont pas pris en compte. ....	287
Figure 68 : Dosage de la teneur en acides biliaires dans les contenus duodénaux prélevés sur deux cochons (nommés H (courbes en bleu) et L (courbes en orange)) et congelés avant dosage. Dans le coin supérieur droit des graphiques, les valeurs minimales et maximales de teneurs en acides biliaires sont présentées pour chaque couple animal/aliment. Les points aberrants sont encadrés en rouge. ....	290
Figure 69 : Comparaison des évolutions des taux d'hydrolyse lors des digestions, gastrique (A et B) et duodénale (C et D), du jus de soja (B et D) et du tofu (A et C) dans les modèles <i>in vitro</i> statiques, dynamiques et <i>in vivo</i> porcin. Les barres d'erreur sont les écart-types. ....	291
Figure 70 : Les différentes manières de calculer un taux d'hydrolyse des protéines. ....	293
Figure 71 : Evolutions des concentrations en activités enzymatiques dans les compartiments gastrique et duodéal du DiDGI® dans les essais sur le tofu seul ou dans un repas complet. Ces différences sont dues aux conditions initiales. ....	298
Figure 72 : Evolution des pH gastrique et duodéal dans le système <i>in vitro</i> dynamique DiDGI® pour le tofu seul ou incorporé dans un repas. ....	299
Figure 73 : Teneurs en amines libres dans le premier compartiment du DiDGI® (estomac) du tofu seul ou incorporé dans un repas. ....	300
Figure 74 : Taux d'hydrolyse dans le premier compartiment du DiDGI® (estomac) du tofu seul ou incorporé dans un repas. ....	300
Figure 75 : Teneurs en amines libres dans le second compartiment du DiDGI® (duodénum) du tofu seul ou incorporé dans un repas. ....	301
Figure 76 : Taux d'hydrolyse dans le second compartiment du DiDGI® (duodénum) du tofu seul ou incorporé dans un repas. ....	301
Figure 77 : Dosage de l'activité spécifique de la pepsine dans les contenus duodénaux prélevés sur deux animaux (l'animal L en haut et l'animal H en bas) pour le seitan à trois temps de digestion (graphiques de gauche) ou pour les quatre aliments à 270 min (graphiques de droite). Avant le dosage, les contenus ont été, soit congelés (barres bleus), soit lyophilisés (barres oranges). La courbe rouge donne le pH des différents prélèvements (échelle de pH à droite des graphiques). Les valeurs intéressantes et les écarts (notés $\Delta$ , en %) entre échantillons au préalable congelés ou lyophilisés sont écrits en rouge au-dessus des barres. ....	309

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition (en % des protéines totales) des différentes classes de protéines dans les graines de céréales et de légumineuses suivant la classification d'Osborne (valeurs moyennes) (d'après(Jarrige, 1995)).	39
Tableau 2 : Caractéristiques des liaisons qui structurent les protéines (tiré de(Liu and Hsieh, 2008; Salazar-Villanea, 2017)).	43
Tableau 3 :Composition protéique des graines soja (Wolf, 1970; Godon, 1996; Nakai and Modler, 1996).	46
Tableau 4 : Composition protéique des graines pois (Shewry, Napier and Tatham, 1995; Godon, 1996; Lefranc-Millot and Teichman-Dubois, 2019).	47
Tableau 5 : Composition protéique des graines blé (Wieser, Seilmeier and Belitz, 1994; Shewry, Napier and Tatham, 1995; Godon, 1996; Wieser, 2007).	48
Tableau 6 : Effet des traitements thermiques sur la dénaturation et la dégradation des protéines (Yu <i>et al.</i> , 2002).	55
Tableau 7 : Températures de dissociation des sous-unités et de dénaturation des globulines étudiées dans l'eau.	56
Tableau 8 : Caractéristiques biochimiques des protéines majoritaires étudiées (adapté de(Salazar-Villanea, 2017)).	57
Tableau 9: Caractéristique des protéases digestives majoritaires.	62
Tableau 10 : Les compartiments digestifs de l'Homme, leurs pH, teneurs et compositions en micro-organismes (adapté de(Walter and Ley, 2011)).	62
Tableau 11 : Composition moyenne d'une salive humaine en terme de composés azotés et les activités enzymatiques détectées (adapté de(Féron and Salles, 2013)).	64
Tableau 12 : Les protéases membranaires dans le petit intestin (Floc'h and Seve, 2000).	72
Tableau 13 : Enzymes pancréatiques (Floc'h and Seve, 2000).	74
Tableau 14 : Composition des acides biliaires.	74
Tableau 15 : Caractéristiques des hormones gastro-intestinales et leur action sur les fonctions digestives, notamment la vidange gastrique (adapté de(Coate, Kliewer and Mangelsdorf, 2014; Yau, 2014);(Janssen and Depoortere, 2013)).	78
Tableau 16 : Diversité et spécificités des transporteurs d'acides aminés libres, di- et tripeptides sur les membranes des entérocytes chez l'Homme (tiré de(Jochems <i>et al.</i> , 2018)).	81
Tableau 17 : Profils d'AAI recommandés des protéines pour le bébé, l'enfant de 6 mois à 3 ans, l'enfant âgé, l'adolescent et l'adulte (FAO, 2013), pour l'enfant d'âge préscolaire (de 2 à 5 ans) (FAO, WHO and UNU, 2007) (SAA : acides aminés soufrés, AAA : acides aminés aromatiques).	84
Tableau 18 : Digestibilités iléales apparentes et fécales d'AA après prise de différents repas par des porcs en croissance (tiré de(Moughan <i>et al.</i> , 2012) (I : digestibilité iléale apparente ; F : digestibilité fécale ; Δ : différence entre les digestibilités fécale et iléale).	87
Tableau 19 : Les différentes techniques de fistulation du Porc pour l'étude de la digestion : leurs avantages et inconvénients (tiré de(Wilfart, 2007)).	93
Tableau 20 : Principaux systèmes de digestion in vitro dynamiques et leurs caractéristiques (adapté de(Guerra <i>et al.</i> , 2012; Verhoeckx <i>et al.</i> , 2015; Dupont <i>et al.</i> , 2019; Gouseti <i>et al.</i> , 2019)).	103
Tableau 21 : Paramètres clés dans l'élaboration d'une digestion <i>in vitro</i> .	113
Tableau 22 : Comparaison des protocoles de dosage d'amines libres utilisant l'OPA ou la ninhydrine, tiré de (Turgeon, Bard and Gauthier, 1991).	115
Tableau 23 : Récapitulatif des méthodes pour suivre la protéolyse.	118

Tableau 24 : Comment quantifier les protéines et/ou l'azote. ....	120
Tableau 25 : Hydrolyses préalables de l'échantillon pour quantifier les acides aminés incorporés dans les protéines. ....	121
Tableau 26 : Les inhibiteurs enzymatiques. ....	124
Tableau 27 : Substances indésirables associées aux matières végétales étudiées (d'après(Godon, 1996). ....	132
Tableau 28 : Liste des publications relative à la digestion in vitro d'aliments à base de soja. ....	134
Table 1: Nutritional composition of studied products (g per 100 g (wet base)).....	179
Table 2: Buffering capacity (BC) of the different food types for different pH ranges (n = 3, expressed in terms of 10 <sup>3</sup> ; mean ± SEM). The results were analysed using a repeated-measures ANOVA where food type and pH*food type were fixed effects, and pH was a repeated effect. As all the effects were significant (P < 0.0001), a post-hoc LSMEANS test was performed. The letters (a through e) indicate when significant differences were present (P < 0.05). ....	201
Table 3: Parameter values and coefficients of determination obtained from the logistic regression analysis of intragastric pH kinetics for the different food types as assessed via the two in vivo measurement methods (pH catheter = Cat, wireless pH capsule = WCap). ....	207
Table 4: Dry matter content (%; as-fed basis), crude protein (CP) levels (N x 6.25, in g.100g <sup>-1</sup> of dry matter intake [DMI]), and amino acid (AA) levels (in g.100g <sup>-1</sup> of DMI) in the different food types. ....	225
Table 5: Postprandial ileal flows of crude protein (CP; N x 6.25, in g) and of amino acids (AAs; in g) for the different food types in miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. Food types differed significantly in ileal flow of methionine (P = 0.0026), cysteine (P = 0.0021) and crude protein (P = 0.0160). Differences in letters (a–b) indicate there were significant differences between food types in amino acid digestibility (P < 0.05, letters are in italics if 0.10 < P < 0.05). ....	229
Table 6: Postprandial total ileal endogenous flows (g) of crude protein (CP; N x 6.25) and amino acids (AAs) for the different food types in miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. ....	231
Table 7: Postprandial ileal specific endogenous flows of crude protein (CP; N x 6.25) and amino acids (AAs) for the different food types in miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. ....	232
Table 8: Postprandial ileal flow of undigested protein (N x 6.25) and amino acids (AAs) for the different food types in miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. Food types differed significantly in ileal flow of undigested isoleucine (P = 0.0105), leucine (P = 0.0051), valine (P = 0.0444), aspartic acid/asparagine (P = 0.0110), and tyrosine (P = 0.0305). Differences in letters (a–b) indicate there were significant differences between food types in amino acid digestibility (P < 0.05, letters are in italics if 0.10 < P < 0.05). ....	233
Table 9: Standardised ileal digestibility (%) of the crude protein (CP) and amino acids (AAs) in the food types given to miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. Food types differed significantly in the standardised ileal digestibility of methionine (P = 0.0085) and crude protein (P = 0.0460). Differences in letters (a–b) indicate there were significant differences between food types in amino acid digestibility (P < 0.05, letters are in italics if 0.10 < P < 0.05). ....	234
Table 10: Apparent ileal digestibility (%) of the amino acids (AAs) and crude protein (CP) in the different food types in the miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. The data were analysed using mixed model ANOVAs, where pig identity was a random effect and food type was a fixed effect. Food types differed significantly in the digestibility of lysine (P = 0.0039), methionine (P = 0.0003), aspartic acid/asparagine (P = 0.0193), cysteine (P = 0.0035), and glutamic acid/glutamine (P = 0.0315). Post-hoc comparisons were carried out using the least-square means. Differences in letters (a–b) indicate there were significant differences between food types in amino acid digestibility (P < 0.05, letters are in italics if 0.10 < P < 0.05). ....	235
Table 11: True ileal digestibility (%) of the amino acids (AAs) and crude protein (CP) in the different food types in the miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. The data were analysed using	

mixed model ANOVAs, where pig identity was a random effect and food type was a fixed effect. Food types differed significantly in the true ileal digestibility of isoleucine ( $P = 0.0438$ ), leucine ( $P = 0.0092$ ) and methionine ( $P = 0.0300$ ). Post-hoc comparisons were carried out using the least-square means. Differences in letters (a–b) indicate there were significant differences between food types in amino acid digestibility ( $P < 0.05$ , letters are in italics if $0.10 < P < 0.05$ ).....	236
Table 12: Untruncated PDCAASs (%), DIAASs (%), and limiting amino acids for the different food types in the miniature pigs (SAAs: methionine+cysteine). To calculate the scores, we used the standard amino acid profiles for three age groups. ....	238
Table 13: Parameters of gastric emptying (MEAN $\pm$ SEM; $n = 5 - 6$ ). Mixed model of ANOVA was operated with animal as random effect and meal as fixed effects was performed on regression parameters ( $\beta$ , $t_{1/2}$ , A). Significance level was only reached for the parameter A relative to solid phase ( $P = 0.0468$ ). Post hoc LSMEANS test distinguished pea emulsion and seitan on this parameter ( $P = 0.0478$ ). ....	247
Table 14: Nitrogen Solubility Index (NSI) of meals under <i>in vitro</i> gastric condition ( $n = 3$ , MEAN $\pm$ SEM). Repeated measures ANOVA with meal and pH*meal as fixed effects and pH as repeated effect was operated. As all effects were significant ( $P < 0.0001$ ), post hoc LSMEANS test was performed. Letters (a – e) shows significant difference ( $P < 0.05$ ).....	250
Table 15: Meal composition for mini-pigs (in g, except for calories expressed in kcal). Meals used for DiDGI® digestion had the same proportion of each ingredient, but the quantities were divided by four. ....	255
Table 16: Parameters of the DiDGI® digestion.....	261
Table 17: Statistical significance of results from repeated analysis of variance for proportions of gastric peptides (grouped by molecular weight range), duodenal and ileal dry matter content, and gastric and duodenal local apparent degree of proteolysis. The effects tested were time (20, 60, 120, 180 min), model (DiDGI®, mini-pig), and food (soya milk meal, tofu meal), as well as their interactions. P-values in bold indicate that the level of significance was reached ( $P < 0.05$ ). P-values in bold and italics indicate when a statistical trend was detected ( $0.10 > P > 0.05$ ).....	267
Table 18: Comparison of digestibility values obtained <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> for meals based on tofu and on soya milk. Values indicate percentage of crude protein (%) (MEAN $\pm$ SEM). A two-way ANOVA was performed on the <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> apparent digestibilities. P-values of effects were: model: $P = 0.4207$ ; food: $P = 0.0365$ ; model*food: $P = 0.5805$ . Different letters (a and b) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ). ....	271
Tableau 29 : Ratios des activités protéasiques totales par rapport à la quantité de protéines alimentaires en phases gastrique et duodénale dans les systèmes <i>in vitro</i> statique et dynamique ...	287
Tableau 30 : Variation des paramètres de digestion des repas à base de protéines de soja suivant les modèles utilisés .....	288
Tableau 31 : Comparaison des bilans azotés en points finaux après ingestion du tofu suivant les trois modèles étudiés, plus des données issues d'une étude <i>in vitro</i> (Rui <i>et al.</i> , 2016). $n$ : nombre d'essais ou d'animaux et les résultats sont présentés comme moyenne $\pm$ écart à la moyenne.....	294
Tableau 32 : Les taux d'hydrolyses calculés de différentes façons en prenant des exemples de digestion de seitan et tofu suivant le protocole <i>in vitro</i> statique INFOGEST : en prenant en compte les prélèvements ou pas et/ou les apports endogènes et/ou l'azote total du prélèvement ou du surnageant ou l'azote impliqué dans les aminés libres après hydrolyse totale. A) est le tableau avec les différentes données nécessaires aux calculs de taux d'hydrolyse. B) présente les quantités d'aminés libres avec différentes corrections appliquées. C) montrent les différents taux d'hydrolyse. $N\alpha$ signifie azote impliqué dans les fonctions amines libres.....	295
Tableau 33 : Paramètres variant sur le DiDGI® d'un essai avec l'aliment seul à un essai avec le repas.....	298

Tableau 34 : Comparaison des caractéristiques, identifiées comme importantes dans la digestion, des protéines végétales et animales .....	305
Tableau 35 : PDCAAS et DIAAS de 210 produits calculés à partir d'aminogrammes et de digestibilités standardisées iléales des AA disponibles dans la littérature en prenant différents aminogrammes présentés dans le Tableau 17 comme référence. ....	314
Tableau 36 : Paramétrages du DiDGI® utilisés dans la littérature (en rouge les données non disponibles) .....	325

## Liste des abréviations

**AA** : Acides Aminés (**Trp** : tryptophane ; **Lys** : lysine ; **Met** : méthionine ; **Phe** : phénylalanine ; **Thr** : thréonine ; **Val** : valine ; **Leu** : leucine ; **Iso** : isoleucine ; **His** : histidine ; **Arg** : arginine ; **Cys** : cystéine ; **Tyr** : tyrosine ; **Gln** : glutamine ; **Asn** : asparagine ; **Pro** : proline ; **Ala** : alanine ; **Ser** : sérine ; **Gly** : glycine ; **Glu** : acide glutamique ; **Asp** : acide aspartique)

**AAA** : Acides Aminés Aromatiques

**AAI** : Acides Aminés Indispensables

**Ach** : Acétylcholine

**AG** : Acides Gras

**AIAAD** : Apparent Ileal Digestibility of Amino Acids (Digestibilité Iléale Apparente des Acides Aminés)

**AID** : Apparent Ileal Digestibility (Digestibilité Iléale Apparente)

**BC** : Buffering Capacity (Pouvoir Tampon)

**CCK** : Cholecystokinine

**CEMEEA** : Auvergne Animal Experimentation Ethics Committee (Comité Ethique d'Expérimentation Animal d'Auvergne)

**COST** : Coopération scientifique et technologique européenne (European Cooperation in Science and Technology)

**CP** : Crude Protein (Protéines brutes)

**Da** : Dalton

**DH** : Degree of Hydrolysis (Degré d'Hydrolyse)

**DLS** : Diffusion dynamique de la lumière

**DIAAS** : Score de de la Digestibilité des Acides Aminés Indispensables (Digestible Indispensable Amino Acid Score)

**DiDGI**<sup>®</sup> : Digesteur Dynamique Gastro-Intestinale

**DM** : Dry Matter content (Teneur en Matière Sèche)

**DA** : Digestibilité Apparente

**DS** : Digestibilité Standard ou Vraie



**DR** : Digestibilité Réelle

**FAO** : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organisation ou FAO)

**FI** : Force Ionique

**GIP** : Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide ou Gastric Inhibitory Peptide

**GLP-1** : Glucagon Like Peptide-1

**GLP-2** : Glucagon Like Peptide-2

**HCl** : Acide chloridrique

**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance)

**HPSEC** : Size-Exclusion HPLC (Chromatographie d'Exclusion Stérique)

**INFOGEST** : Amélioration des effets santé de l'aliment par le partage des connaissances sur le processus digestif (Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process)

**kDa** : kilo Dalton

**LADP** : Local Apparent Degree of Proteolysis (Degré Apparent Local de Protéolyse)

**Leu** : Leucine

**MP-AES** : Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometry (Spectrométrie d'Emission Atomique à Plasma Microonde)

**MS** : Matière Sèche

**N** : Nitrogen (Azote)

**NaOH** : Hydroxyde de sodium

**OPA** : Ophthaldialdehyde

**OXM** : Oxyntomoduline

**PDCAAS** : Score en Acides Aminés Corrigé de la Digestibilité des Protéines (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score)

**pH** : potentiel Hydrogène

**pI** : point Isoélectrique

**PYY** : Peptide YY

**SAA** : Sulphur-containing Amino Acids (Acides Aminés Soufrés)

**SD** : Standard Deviation (Ecart-Type)

**SEM** : Scanning Electron Microscopy (Microscopie Electronique à Balayage)

**SEM** : Standard Error of the Mean (Erreur-Type de la Moyenne)

**SGF** : Simulated Gastric Fluid (Solution Simulant les Fluides Gastriques)

**SIAAD** : Standard Ileal Digestibility of Amino Acids (Digestibilité Iléale Standard des Acides Aminés)

**SID** : Standard Ileal Digestibility (Digestibilité Iléale Standard ou Vraie)

**SIF** : Simulated Intestinal Fluid (Solution Simulant les Fluides Intestinaux)

**SSF** : Simulated Salivary Fluid (Solution Simulant la Salive)

**TAA** : Total Amino Acid

**TIAAD** : True Ileal Digestibility of Amino Acids (Digestibilité Iléale Réelle des Acides Aminés)

**TID** : True Ileal Digestibility (Digestibilité Iléale Réelle)

**TCA** : Acide Trichloroacétique

**TNBS** : Acide trinitrobenzènesulfonique

**UHT** : Ultra-High Temperature (Ultra Haute Température)

**WHO** : Organisation mondiale de la santé (World Health Organisation)

**Yb** : Ytterbium

## **Avant-propos**

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un dispositif CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la Recherche) entre la société IMPROVE (SAS IMPROVE, Amiens, France) et l'INRA, subventionné par l'Association Nationale Recherche Technologie (ANRT-Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche). Quatre laboratoires INRA ont été partenaires de ce projet :

- L'UMR STLO (Sciences et Technologie du Lait et de l'œuf, Rennes, France)
- L'UMR GMPA (Génie et Microbiologie des Procédés Alimentaires, Thiverval Grignon, France)
- L'UNH (Unité de Nutrition Humaine, Clermont Ferrand, France)
- BIA (Biopolymères Interactions Assemblages, Nantes, France)

Après une rapide présentation des partenaires impliqués dans ce projet, les valorisations issues de ce travail de thèse sont présentées.

### **La SAS IMPROVE**

Située à Dury près d'Amiens, la SAS IMPROVE est la première plateforme européenne ouverte totalement dédiée à la valorisation des protéines du futur, fruit d'un partenariat public / privé français, elle a vocation à rassembler tous les acteurs du domaine. IMPROVE travaille en partenariat avec des structures académiques telles que l'INRA, UPJV, L'Institut Polytechnique LaSalle Beauvais, UTC et l'ESCOM et des partenaires techniques comme le CVG, PIVERT, BRI...

L'expertise scientifique apportée par IMPROVE dans le domaine des protéines végétales s'étend de la recherche fondamentale à la mise sur le marché. Avec ses 800 m<sup>2</sup> de halle technique et 170 m<sup>2</sup> de laboratoires IMPROVE propose une combinaison unique de compétences et d'équipements permettant de booster l'innovation et la génération de valeur pour :

- Accélérer la mise sur le marché de nouveaux produits à base de protéines végétales
- Permettre des innovations de rupture répondant aux besoins du marché
- Mettre au point des produits à base de protéines végétales ayant des caractéristiques comparables ou meilleures (performance, prix, disponibilité, durabilité) aux produits existants.

### **L'UMR 1253 STLO – INRA, Agrocampus-Ouest**

L'UMR STLO (Science & Technologie du Lait & de l'Œuf) développe des activités de recherche sur les composants du lait et de l'œuf en explorant leur structure, leurs multiples fonctionnalités, leur digestibilité, qu'ils soient natifs ou soumis à divers procédés. Ces travaux visent à augmenter la qualité et la sécurité des produits laitiers et notamment fermentés et des ovoproduits, par la connaissance de l'expression *in situ* des bactéries, la préservation et l'exploration de leur biodiversité. Au sein de l'UMR STLO, c'est avec l'équipe « Bioactivité et Nutrition » que cette thèse a été réalisée. Cette équipe étudie les liens entre structure des aliments et santé afin de maximiser les bénéfices de l'alimentation en termes de valeurs nutritionnelle et biologique. Ces travaux visent à :

- Explorer les mécanismes de déstructuration des aliments dans le tractus gastro-intestinal
- Modéliser le devenir des protéines dans le tube digestif afin de prédire leur comportement en fonction de leur structure
- Proposer de nouvelles conceptions d'aliments par ingénierie inverse
- Améliorer les connaissances sur la balance bénéfico-risque associée à la consommation de produits laitiers et d'œufs
- Evaluer l'impact de la digestion sur la santé et le bien-être de certaines catégories de la population, comme les nourrissons, les personnes souffrant d'obésité ou les personnes âgées, en collaboration avec d'autres équipes.

### **L'UMR 782 GMPA – INRA, AgroParisTech, Université Paris Saclay**

Créée en 1988 sur le campus de Thiverval-Grignon, l'UMR GMPA (Génie Microbiologique des Procédés Alimentaires) assure une double mission de recherche et d'enseignement dans le domaine de l'ingénierie des transformations des produits agricoles, alimentaires et biologiques. Ses travaux portent sur la maîtrise des processus physiques et biologiques qui gouvernent les transformations, des bioprocédés jusqu'à l'homme, dans la perspective de délivrer des connaissances et des outils d'aide à l'élaboration de produits ou bio-produits aux qualités optimisées (sensorielles, nutritionnelles, sanitaires, d'usage et/ou environnementale). L'analyse systémique des mécanismes de dégradation des aliments en bouche et dans le système digestif fait partie intégrante des opérations de transformations et des processus étudiés. Ces travaux sont conduits plus spécifiquement au sein de l'équipe ADP (Aliment, Digestion, Perception) de l'UMR GMPA. Ces derniers s'intéressent aux mécanismes de dégradation de l'aliment en bouche (phases buccale et pharyngée) et dans la partie haute du tube digestif (partie gastro-duodénale) ainsi qu'à la modélisation mathématique des

cinétiques de libération des composés cibles associés. Ils s'appuient sur des équipements originaux, dont un digesteur dynamique *in vitro*, appelé DiDGI<sup>®</sup>, développé par l'UMR GMPA en collaboration avec l'UMR STLO et qui a pu être utilisé pendant la thèse.

### **L'UMR 1019 UNH – INRA, Université Clermont Auvergne**

Les objectifs des travaux de recherche de l'UMR UNH (Unité de Nutrition Humaine) visent à contribuer aux stratégies nutritionnelles innovantes pour soutenir une longue durée de vie sans incapacité, réduire les risques pour la santé, et préserver la mobilité et la qualité de vie de la personne âgée. Cette unité possède une réelle expertise en nutrition protéique et notamment au sein de l'équipe iMPROVINg (Métabolisme PROtéique Vieillesse Nutrition) avec laquelle j'ai pu travailler pendant ma thèse. Cette équipe conduit des recherches sur les déterminants des dérégulations métaboliques observés lors de transition alimentaire et/ou au cours du vieillissement. La recherche de biomarqueurs précoces, et une vision intégrée des métabolismes, permet de proposer des stratégies nutritionnelles destinées à prévenir ces dérégulations. Cette équipe s'appuie sur des études cliniques chez l'Homme ainsi que sur des études animales. C'est en particulier sur ce dernier volet que j'ai pu m'appuyer pour réaliser les expérimentations *in vivo* sur le modèle mini-porc.

### **L'UR 1268 BIA – INRA**

L'UR BIA (Biopolymères Interactions Assemblages), construit des travaux de recherche dans un contexte de transformation durable des ressources agricoles et de la biomasse végétale. Il s'agit d'intégrer l'ensemble de la chaîne de transformation de ces ressources depuis leur construction jusqu'à leur déconstruction lors de leur utilisation finale. Pour atteindre cet objectif, trois priorités scientifiques sont identifiées :

- Maîtrise de la qualité des productions végétales pour répondre aux différents usages dans un contexte d'agriculture durable
- Amélioration et développement d'aliments formulés sains et durables pour des fonctionnalités ciblées
- Conception de matériaux biosourcés composites dans une perspective de valorisation de la biomasse

Au sein de l'unité BIA c'est avec l'équipe ISD (Interfaces et Systèmes Dispersés) que j'ai pu collaborer. Cette équipe s'intéresse à la construction et la stabilisation des matrices complexes par des assemblages de protéines, de polysaccharides et/ou de lipides, et, d'autre part, l'ensemble du cycle

de vie des matrices en intégrant leur déconstruction au cours de leur utilisation, notamment dans le tractus gastro-intestinal simulé (digestion). Elle possède une grande expertise sur la caractérisation des structures aux différentes échelles et a pu accompagner mon travail sur ce volet.

## **Valorisations issues de la thèse**

Certains des travaux de cette thèse ont fait l'objet de communications dans des revues scientifiques ou des congrès.

### **Article scientifique accepté**

Reynaud, Y., Buffière, C., David, J., Cohade, B., Vauris, M., Lopez, M., Souchon, I., Dupont, D. & Rémond, D. (2019). Temporal changes in postprandial intragastric pH: comparing measurement methods, food structure effects, and kinetic modelling. *Food Research International*, 108784. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108784>

### **Communications orales lors de conférences internationales**

Reynaud, Y., David, J., Buffière, C., Cohade, B., Vauris, M., Lopez, M., Souchon, I., Dupont, D. & Remond, D. (2019, April). Comparison of methods for postprandial intragastric pH measurement in a pig model during digestion of plant-based foods with different structures. In 6<sup>th</sup> International Conference on Food Digestion (INFOGEST)

Reynaud, Y., Manach, A., Cattenoz, T., Forest, D., M., Lopez, M., Riaublanc, A, Souchon, I., Picque, D., Jardin, J., Briard-Bion, V., Dupont, D. & Remond, D. (2019, November). *in vivo in vitro* correlation on protein digestion. In 33<sup>th</sup> European Federation of Food Science and Technology (EFFoST)

### **Communication par affiche lors de conférence internationale**

Reynaud, Y., Riaublanc, A., Lopez, M., Souchon, I., Dupont, D. (2019, April). Food structure effects on *in vitro* plant protein digestion. In 6<sup>th</sup> International Conference on Food Digestion

## Introduction générale

L'alimentation est un des leviers pour optimiser la santé humaine et la durabilité environnementale des systèmes alimentaires (Willett *et al.*, 2019). Toutes les études prospectives et les différents scénarii montrent qu'une transition vers une alimentation plus durable d'ici 2050 nécessitera d'importants changements dans les régimes alimentaires, notamment au niveau de la part relative des produits animaux et des produits végétaux dans les diètes. Par exemple, le scénario « sains » de la prospective Agrimonde 2050 propose la substitution partielle de la viande par des protéines de légumineuses dans les régimes, qui permettrait l'amélioration de la qualité nutritionnelle couplé à une réduction des émissions de gaz à effet de serre de l'alimentation (Mouël and Mora, 2019). Cette substitution induit une augmentation nette de la consommation de tels produits végétaux, à laquelle il s'agira d'y répondre en augmentant et diversifiant l'offre d'aliments d'origine végétale et notamment à base de légumineuses. L'augmentation prévisionnelle de la population mondiale qui atteindra entre 8 et 10,5 milliard (Alexandratos and Bruinsma, 2012) devrait conduire pour des systèmes plus sains et plus durables, à une consommation mondiale de fruits, légumes, noix et légumineuses qui devra doubler alors que la consommation d'aliments tels que la viande rouge et le sucre devra être réduite de plus de 50% (Willett *et al.*, 2019). Le contexte socio-démographique favorise donc l'augmentation de la consommation mondiale de protéines (Alexandratos & Bruinsma, 2012) et répondre à ce besoin croissant en protéines, tout en respectant les contraintes du développement durable reste un challenge important à relever.

La production de protéines d'origine végétale induit de moindres émissions de gaz à effet de serre, de moindres consommations d'eau et autres intrants, ainsi qu'un meilleur taux de conversion protéique entre autres (Agribalyse<sup>®</sup>, 2017). Elle bénéficie également d'une image plus positive auprès des consommateurs que les protéines animales et notamment pour le respect du bien-être animal. Elles sont également aujourd'hui de plus en plus utilisées dans de nombreuses formulations d'aliment pour leurs excellentes propriétés techno-fonctionnelles (propriétés émulsifiante, moussante ou gélifiante par exemple) en remplacement de protéines animales, et notamment de celles issues du fractionnement du lait. Cependant, les protéines végétales et notamment les fractions de type isolat ou concentrat issues du fractionnement des matières premières végétales, possèdent des inconvénients, autant des points de vue organoleptiques (couleur, odeur, goût) que nutritionnel (composition en acides aminés indispensables, facteurs antinutritionnels, effet de la matrice alimentaire). Les connaissances relatives aux défauts des protéines végétales restent un frein au développement d'aliments à base de protéines végétales à destination de l'alimentation humaine.



Dans cette thèse, nous nous intéresserons à la qualité nutritionnelle de ces protéines, dont la composition en acides aminés est souvent déséquilibrée, ce qui peut être rétabli en mélangeant des protéines végétales complémentaires dans une ration. La présence de facteurs antinutritionnels est aussi un inconvénient car ces facteurs réduisent la digestibilité des protéines, et donc la part qui est utilisable par l'organisme. La présence et l'activité de ces composés peuvent être réduites par la sélection variétale des plantes et les traitements physico-chimiques de la matière première. Toutefois les connaissances restent parcellaires et si certaines données sont disponibles dans la littérature, celles-ci ont été obtenues à partir l'isolat protéique et très rarement à partir de matrices alimentaires complexes. Par ailleurs les méthodes d'obtention de ces données restent diverses et donc pas toujours faciles à comparer. Ainsi, mieux connaître la digestibilité de ces protéines dans des matrices complexes est donc un enjeu qui permettra d'améliorer la qualité des produits à base de protéines végétales du point de vue nutritionnel.

Les méthodes pour étudier la digestion se divisent en deux groupes : les modèles animaux et les systèmes *in vitro*. Les expérimentations *in vivo* sont coûteuses en temps et en argent, et de plus en plus contrôlées pour des raisons d'éthique. Bien que ces études soient les plus informatives, elles ne sont raisonnablement utilisables que pour un nombre limité d'aliment. Les protocoles *in vitro* sont plus rapides et moins onéreux à réaliser, et permettent d'étudier un large spectre d'aliments sous différentes modalités de préparations. De plus, l'usage de telles méthodes permettent de s'affranchir d'une grande variabilité interindividuelle observée chez les animaux. Parmi les systèmes *in vitro*, les digesteurs dynamiques sont ceux qui s'approchent le plus de la physiologie digestive car ils simulent les événements cinétiques et le transit qui s'opèrent dans le tractus digestif, ce qui n'est pas le cas des protocoles statiques, dans lesquels il s'agit de mettre en présence l'aliment dans les différents environnements représentant les compartiments digestifs de manière successive. Les verrous au développement de tels digesteurs sont principalement liés à la validité de l'approche *in vitro* dynamique pour reproduire les conditions physiologiques complexes qui prévalent au niveau de l'appareil digestif des Monogastriques. En effet, la fonction digestive chez l'Homme ou l'animal est fonction de l'âge, de l'alimentation et dépend également de la variabilité interindividuelle. Ces données et connaissances sont nécessaires pour conduire de façon pertinente des digestions en conditions dynamiques *in vitro*.

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit visent à disposer d'un modèle *in vitro* de digestion de matrices protéiques végétales qui permette de s'affranchir de l'expérimentation animale et qui soutienne l'innovation au sein de l'industrie agroalimentaire afin de répondre aux défis de l'alimentation. Afin de répondre à cet objectif, cette thèse propose de combiner les savoirs de plusieurs domaines :

- **La physiologie digestive et en particulier les manières de simuler ce processus** pour estimer la digestibilité d'un produit. De la théorie à la pratique, quelles sont les méthodes pour mesurer la bioaccessibilité des nutriments d'intérêts, plus particulièrement les protéines : méthodes *in vitro* statiques et dynamiques, ainsi que les différents modèles animaux.
- **Les protéines végétales.** Quelles sont leurs spécificités par rapport aux protéines laitières notamment ? Nous nous focaliserons sur les protéines contenues dans les matrices végétales étudiées : les protéines du soja, du pois et du gluten de blé. La science des aliments, la rhéologie et la biochimie.
- **Les aliments ou matrices alimentaires à base de protéines végétales.** Les protéines ne sont pas seules dans les aliments de tous les jours, elles sont associées et interagissent avec d'autres macro- et micronutriments pour former une structure appelée la matrice alimentaire. C'est une structure complexe, notamment à cause des interactions multiples entre ces différents constituants. Il s'agira d'étudier l'influence de la matrice sur la digestion des protéines.

Après un état de l'art sur les caractéristiques des protéines végétales alimentaires et leur étude dans le contexte digestif chez l'Homme (Chapitre 1), la stratégie de recherche élaborée pour comprendre et simuler la digestion des protéines végétales sera présentée. Après une première étude de caractérisation structurale et de sensibilité aux enzymes digestives des aliments modèles utilisés (Chapitre 2), les données physiologiques relatives à la digestion de ces aliments chez le mini-porc seront présentées dans les chapitres 3 et 4. Le chapitre 5 est dédié à l'élaboration d'un programme de digestion aliment-spécifique sur un système *in vitro* dynamique à partir des données récoltées *in vivo*. Les résultats de corrélation entre les modèles *in vitro* dynamique et *in vivo* seront présentés. Enfin, à partir de l'ensemble des résultats obtenus, le chapitre 6 présente une discussion générale autour de la pertinence des différents modèles utilisés et des spécificités de la digestion des protéines végétales. Le manuscrit se termine par une conclusion générale qui replace les principaux résultats de ce travail répondant aux objectifs de la thèse et ouvre sur des perspectives.

## Références

Agribalyse® (2017) <https://simapro.com/products/agribalyse-agricultural-database/>.

Alexandratos, N. and Bruinsma, J. (2012) *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision*. doi: 10.1016/S0264-8377(03)00047-4.

Mouël, C. L. E. and Mora, O. (2019) 'Productions animales, usage des terres et sécurité alimentaire en 2050: l'éclairage de la prospective Agrimonde-Terra', *INRA Prod. Anim.*, 32(2), pp. 95–110.

Willett, W. *et al.* (2019) 'The Lancet Commissions Food in the Anthropocene : the EAT – Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems', *The Lancet*, 393(10170), pp. 447–492. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31788-4.

## Chapitre 1. Revue bibliographique

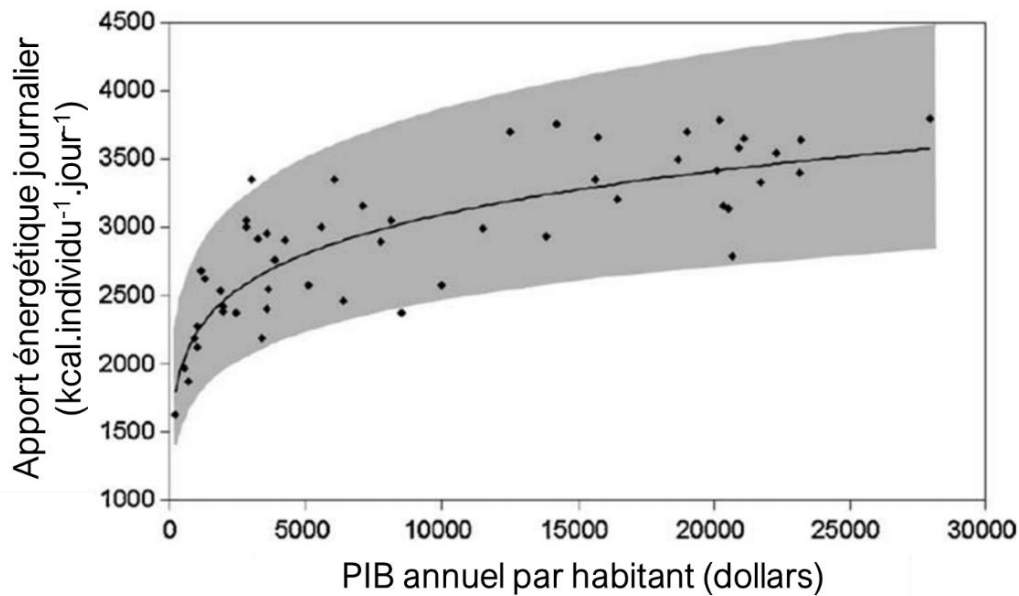
### 1.1 Contexte et enjeux : des protéines végétales de qualités

Les protéines sont essentielles au bon fonctionnement du métabolisme chez tous les organismes vivants. Constituées d'acides aminés (AA), elles participent au niveau cellulaire à de nombreuses fonctions comme la structure cellulaire, le transport de composés ou encore la production d'énergie. Les protéines corporelles sont continuellement renouvelées et un apport externe d'AA est nécessaire, pour combler les pertes occasionnées par leur métabolisme ou pour assurer les besoins de croissance ou reproduction. Chez les Mammifères, l'unique moyen de répondre à ce besoin est l'alimentation. Chez l'Homme adulte, l'apport journalier conseillé en protéines (sans entrer dans des considérations qualitatives des protéines) est de  $0,83 \text{ g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$  (AFSSA, 2007).

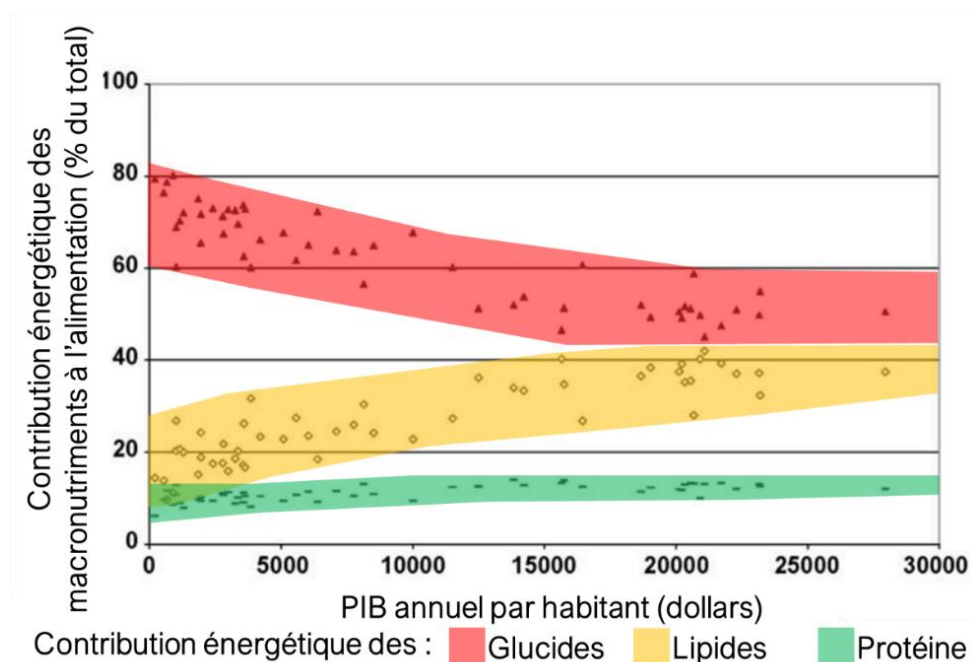
L'augmentation de la demande globale en protéines s'explique d'une part par la corrélation positive entre le niveau de vie et la consommation journalière de calories et d'autres part par l'augmentation des revenus des foyers dans de nombreux pays au cours des dernières décennies. Ainsi, même si la proportion de calories apportée par les protéines est globalement stable (Figure 2), la consommation de protéines a augmenté de plus de 20 g par jour et par habitant à l'échelle du monde (Figure 3).

L'évolution de la consommation de protéines au niveau mondial depuis 1961, montre une forte augmentation entre 1961 et 2013 pour presque tous les continents (Figure 3). Toutefois, des disparités d'évolution de la consommation protéique sont observables entre les différents continents : les pays « émergents » observent une forte croissance de cette consommation sur toute la période 1961-2013 (en 1961 :  $50 - 60 \text{ g.hab}^{-1}.\text{j}^{-1}$  et en 2013 :  $70 - 90 \text{ g.hab}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ) alors que les pays « développés » ont tendance à plafonner à de hauts taux ( $90 - 110 \text{ g.hab}^{-1}.\text{j}^{-1}$ ).

Par ailleurs, un phénomène intéressant à noter, est la corrélation positive entre le niveau de revenu et la part des produits d'origine animale dans les calories alimentaires (Figure 4). En effet, il a été montré, qu'un accroissement des conditions de vie était couplé à une augmentation de la proportion de viande dans les repas, déjà considéré comme un symbole de force et richesse au Moyen-Age en Europe (Montanari, 1983), et ceci semble persister encore actuellement. Cependant, depuis la révolution industrielle du XIX<sup>ème</sup> siècle, la viande est devenue un plat de plus en plus accessible et de moins en moins onéreux à produire en temps de paix. Jusqu'à s'en retrouver déclassée depuis les années 80, amenant à une diminution de sa consommation. Ceci peut être nommé phénomène de « végétarisation » de l'alimentation (Lamine, 2008) ou de 2<sup>ème</sup> transition alimentaire, *i.e.* une augmentation de la part des produits végétaux par rapport à ceux d'origine animale, malgré un niveau de richesse stable.



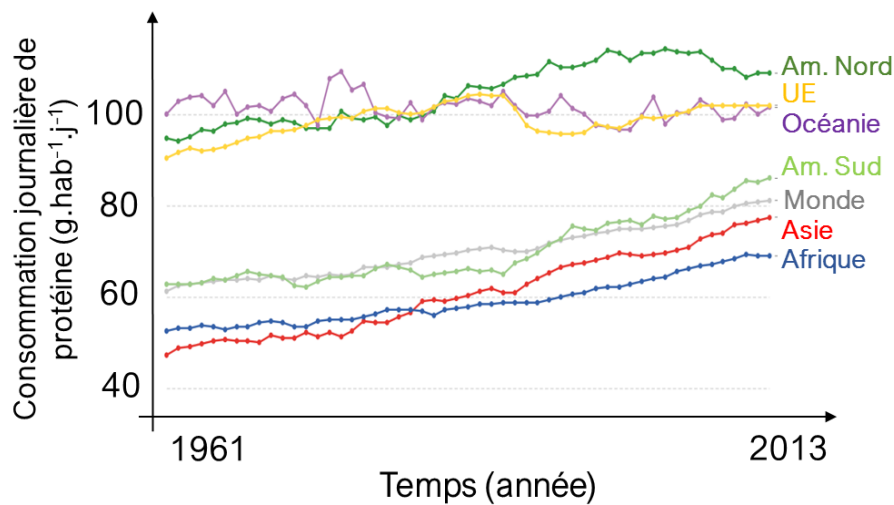
**Figure 1 :** Consommation énergétique alimentaire journalière (kcal) par individu en fonction de son revenu. Relations fondées sur des données de 2001 issues de 57 pays (adapté de Gerbens-leenes, Nonhebel and Krol, 2010). La courbe noire provient d’une régression des données et l’aire grisée représente l’intervalle de confiance à 90 %.



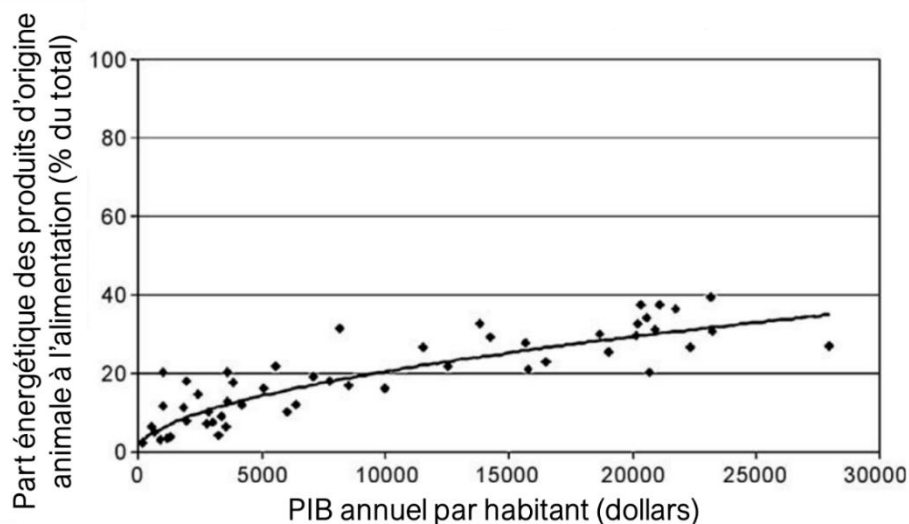
**Figure 2 :** Contribution à l’énergie apportée par l’alimentation des différents macronutriments en fonction du revenu de la population. Relations fondées sur des données de 2001 issues de 57 pays (adapté de Gerbens-leenes, Nonhebel and Krol, 2010). Les aires colorées sont indicatives représentant les différents macronutriments et n’ont aucune valeur statistique.

D'autre part, les protéines d'origines végétales ont une empreinte environnementale plus faible que celles d'origines animales, comme le montre la Figure 5, ce qui tend à supporter cette tendance.

En prenant le cas de la France, on peut observer ce phénomène au niveau des produits protéiques végétaux disponibles en rayons, dont le nombre a connu un essor considérable entre 2004 et 2014, comme l'illustre la Figure 6, et dont les sources végétales les plus représentées sont, dans l'ordre, le blé, le soja puis le pois (GEPV, 2019) expliquant le choix de ces trois sources protéiques dans le cadre de la thèse. Nous nous intéresserons à la digestion de ces trois protéines incorporées dans des aliments consommés par l'Homme.

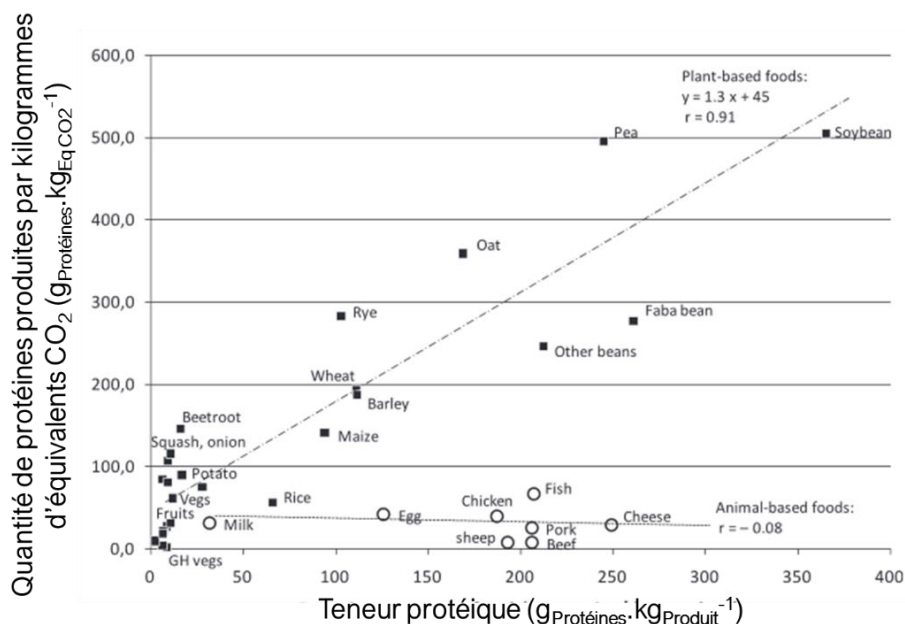


**Figure 3 :** Régionalisation de la consommation journalière par habitant en protéine de 1961 à 2013 (FAOSTAT, 2017).

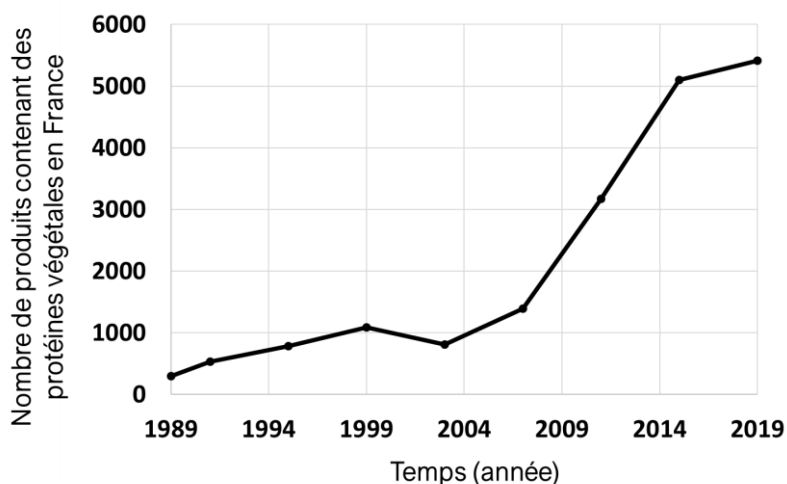


**Figure 4 :** Part énergétique des produits d'origine animale dans l'alimentation en fonction du revenu de la population. Relations fondées sur des données de 2001 issues de 57 pays (adapté de Gerbens-leenes, Nonhebel and Krol, 2010).

Dans un contexte de développement durable, la réduction des pertes et l'optimisation de l'usage des protéines alimentaires sont des enjeux actuels majeurs. Cet exercice peut être réalisé tout au long des chaînes de valeurs alimentaires (FAO, 2015), « du champ à l'assiette », et même au-delà, en intégrant l'individu en bout de chaîne. En effet, il existe des pertes au niveau du tractus digestif de l'individu, lorsqu'une fraction des protéines alimentaires ingérées ne peut pas être absorbée et utilisée par l'organisme. Ces pertes qui sont à éviter, sont notamment observées pour les protéines végétales.



**Figure 5 :** Teneur en protéines de 84 aliments communs en fonction de la quantité de protéines produite pour l'émission d'un kilogramme d'équivalent CO<sub>2</sub>. Les produits d'origine végétale sont représentés par carré noir, les produits d'origine animale par un cercle blanc (adapté de González, Frostell and Carlsson-Kanyama, 2011).



**Figure 6 :** Nombre de produits commercialisés contenant des protéines végétales en France de 1989 à 2019 (GEPV, 2019).

La présence de facteurs antinutritionnels ou la structure des protéines au sein des matrices alimentaires peuvent, par exemple, augmenter cette part non absorbable par différents mécanismes (inhibition enzymatique, limitation de l'accès des enzymes digestives au substrat enzymatique, modulation des temps de résidence dans les différents compartiments digestifs). Estimer cette fraction indigestible peut s'avérer intéressant, pour orienter des stratégies de développement de produits alimentaires par exemple. Ce caractère digestible est un des paramètres à prendre en compte, parmi de nombreux autres facteurs, pour apprécier la qualité nutritionnelle des protéines alimentaires au sein d'un aliment, et plus généralement, de l'aliment dans sa globalité. Différents modèles et protocoles existent pour estimer la fraction indigestible des protéines alimentaires : les modèles *in vivo* et *in vitro*. Les modèles animaux restent le « gold standard » pour estimer la digestibilité des protéines. Cependant, dans un contexte sociétal de prise de conscience des questions éthiques que soulèvent les expérimentations *in vivo*, les modèles *in vitro* sont en plein essor. Ces modèles sont souvent imparfaits car des simplifications sont nécessaires pour tenter de copier la physiologie digestive. Pour qu'ils puissent reproduire au mieux les processus simulés et que l'on puisse limiter les expérimentations animales, des études comparatives de validation entre modèles *in vitro* et *in vivo* sont nécessaires. Dans le but de calculer la digestibilité protéique, le présent travail s'attache à proposer un protocole de digestion protéique *in vitro* d'aliments à base de protéines végétales les plus consommées par l'Homme, *i.e.* le blé, le soja et le pois, en se fondant sur la digestion de ces aliments par le mini-porc.

Après une présentation du matériel végétal protéique utilisé, des aliments modèles qui en sont issus, ce chapitre présentera le processus global de la digestion chez les Monogastriques, puis exposera les méthodes et modèles existants pour étudier et simuler la digestion humaine et les moyens d'exprimer la qualité nutritionnelle d'une protéine. Enfin, les objectifs et la stratégie poursuivie pendant la thèse seront expliqués.

## **1.2 Protéines végétales et aliments à base de protéines végétales**

### **1.2.1 Origines et caractéristiques des protéines végétales**

#### *1.2.1.1 Composition, localisation dans les graines et variation*

Les grains et les graines renferment un grand nombre de protéines : protéines de structures, protéines biologiquement actives et protéines de réserve. A la suite des travaux d'Osborne (1924), on a coutume de les classer selon leur solubilité dans différents solvants. Les fractions définies dans cette classification sont : les albumines, solubles dans l'eau ; les globulines, solubles dans les solutions salines ; les prolamines, solubles dans les solutions alcooliques et les glutélines, qui constituent le



résidu insoluble. Les protéines de réserve constituent la majeure partie des protéines contenues dans les graines (Jarrige, 1995).

Si l'on s'intéresse aux principales familles de graines on distingue : (i) les céréales qui regroupent des plantes de la famille des Poacées (ou Graminées) e.g. le maïs, le blé, le riz, l'orge, et l'avoine ; (ii) les légumineuses ou *Fabaceae*, une famille de plantes à laquelle appartiennent le soja et le pois. Les céréales et les légumineuses sont principalement cultivées pour leurs graines appartenant respectivement aux taxons des Monocotylédones et des Dicotylédones ou Magnoliopsides.

Alors que toutes les classes définies par Osborne existent en proportions variables dans les céréales, les protéines de légumineuses et d'oléagineux sont essentiellement constituées d'albumines et de globulines, donc essentiellement de protéines solubles (Jarrige, 1995). Le Tableau 1 donne quelques exemples des proportions de classes de protéines dans différentes graines communes. Les différentes classes de protéines citées seront détaillées dans le paragraphe 1.2.1.4.

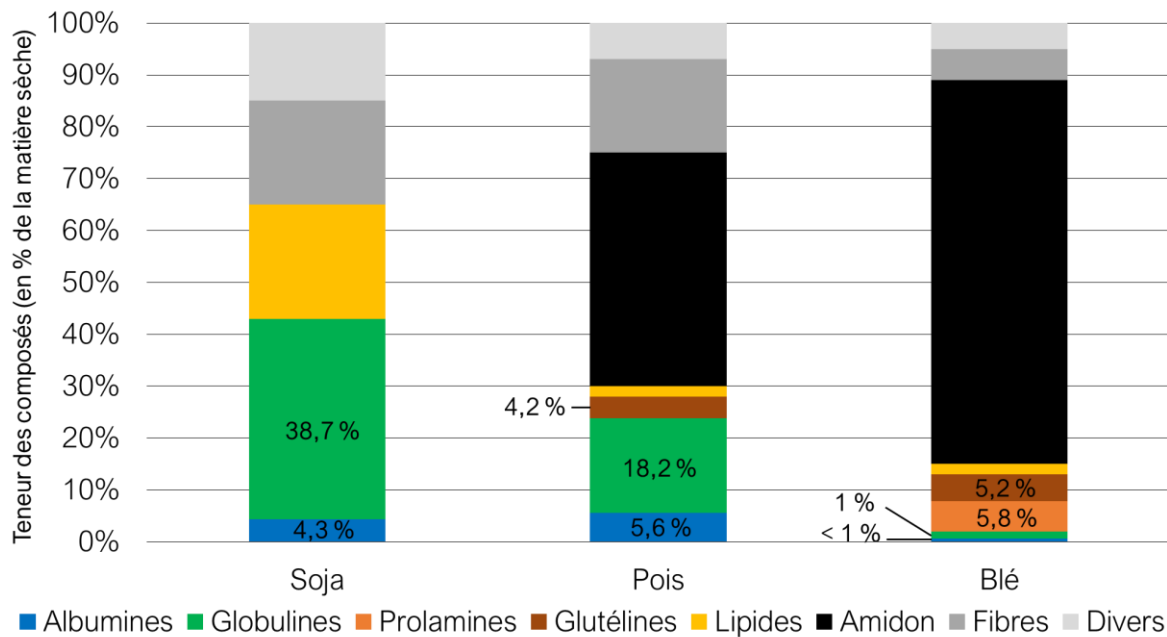
**Tableau 1** : Répartition (en % des protéines totales) des différentes classes de protéines dans les graines de céréales et de légumineuses suivant la classification d'Osborne (valeurs moyennes) (d'après Jarrige, 1995).

	Albumines	Globulines	Prolamines	Glutélines
Solubilité	Eau	Solutions salines	Alcool 70° GL réserves	pH > 11
Rôle dans la plante	Physiologiques	Réserves		
Soja	10 %	90 %		
Pois	20 %	65 %		15 %
Féverole	25 %	55 %		20 %
Tournesol	20 %	60 %	5 %	15 %
Colza	50 %	25 %	5 %	10 %
Mil	8 %	4 %	46 %	42 %
Blé	5 %	10 %	45 %	40 %
Orge	12 %	8 %	25 %	55 %
Avoine	12 – 14 %	38 %	14 %	12 – 14 %
Maïs	4 %	3 %	53 %	46 %

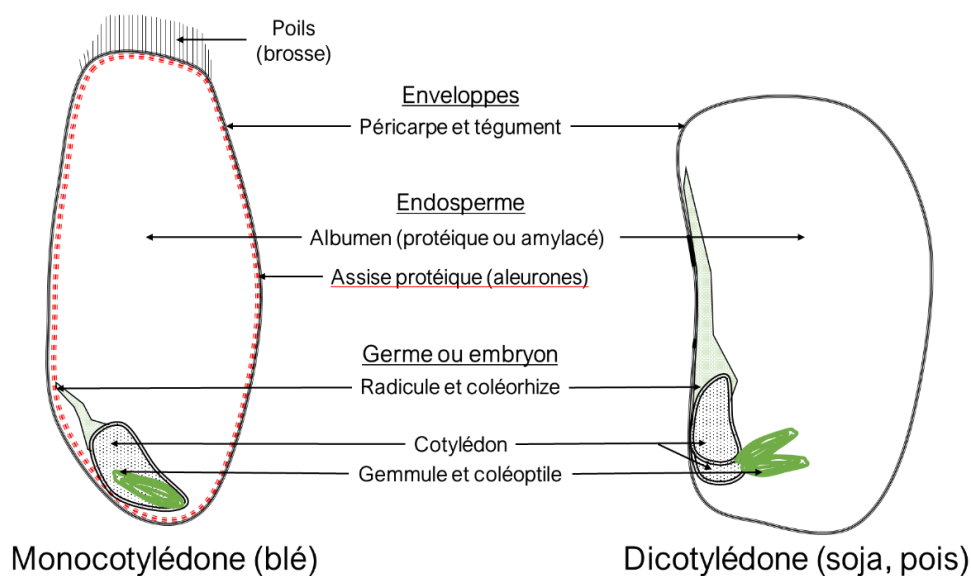
Les légumineuses présentent la spécificité de fixer l'azote de l'air, expliquant leur intérêt en termes de durabilité et de réduction d'intrants azotés, dans les itinéraires techniques en agronomie (rotations de cultures ou cultures associées). Les céréales sont des Monocotylédones, e.g. le blé, les protéines de réserve sont localisées dans l'endosperme, proche de la plantule, et secondairement dans le scutellum. Par contre, chez les Dicotylédones, e.g. les légumineuses, les protéines de réserve se retrouvent autant dans l'endosperme que dans les cotylédons (Figure 8). L'endosperme est de manière générale utilisé pour la croissance de la plantule et disparaît dès les premières étapes de la croissance

du végétal, suite à la germination. A maturité l'endosperme n'existe plus dans des légumineuses, exception faite du ricin, dont les graines mûres conservent un endosperme développé.

Il existe au-delà d'une variabilité génétique, une variabilité environnementale qui influence également sur la composition protéique des graines. De plus, ce pool protéique n'est pas figé et peut être mobilisé au cours de la vie végétale. Par exemple, la date de récolte impacte la composition des graines qui seront utilisées pour l'alimentation.



**Figure 7 :** Composition globale des graines de soja, de blé et de pois, en % de la matière sèche (d'après Godon, 1996).

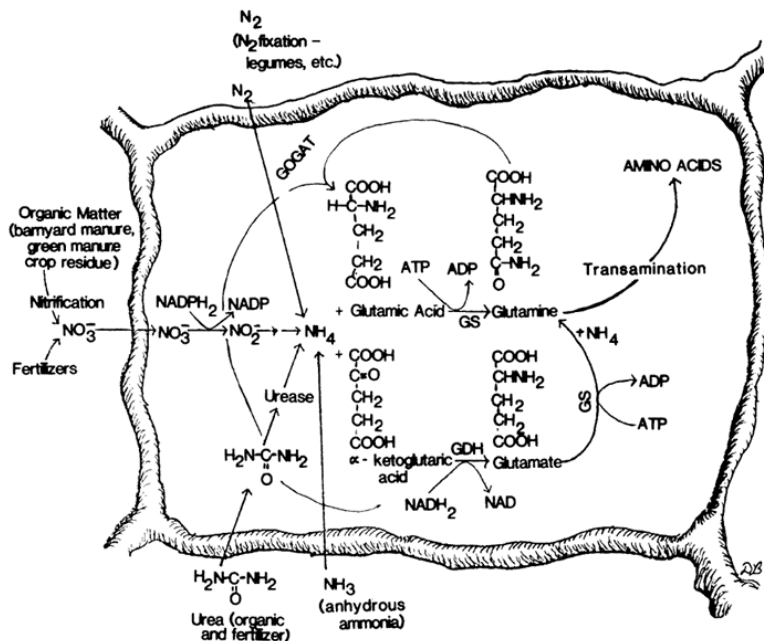


**Figure 8 :** Coupes transversales des graines de Monocotylédones et Dicotylédones.

### 1.2.1.2 Synthèse, transport, mobilisation des protéines au sein de la graine aux différents stades physiologiques

Les protéines des végétaux sont synthétisées à partir d'azote de différentes origines. La Figure 9 présente ces différentes voies de déposition de l'azote exogène, à partir d'urée, d'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ), de nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) ou spécifiquement de diazote atmosphérique pour les légumineuses. Une fois dans la cellule, ces molécules sont métabolisées en ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) qui peuvent être intégrés dans des acides carboxyliques pour former de la glutamine, à partir d'acide glutamique ou de glutamate. La glutamine est le substrat à partir duquel les autres acides aminés (AA) peuvent être synthétisés par transamination.

En résumé, nous pouvons dire que la nature et la quantité des protéines que nous allons retrouver dans les aliments étudiés dépend en premier lieu de la composition protéique des graines utilisées comme matières premières. Celle-ci varie suivant, l'espèce, mais aussi la variété. Par exemple, une étude sur 59 variétés différentes de pois a montré que la composition en protéines sur base sèche variait de 13,7 à 30,7 % (Tzitzikas *et al.*, 2006), ce qui peut être expliqué par des capacités plus ou moins importantes de l'organisme à synthétiser et stocker les protéines.



**Figure 9 :** Voies de transposition de l'azote exogène dans les acides aminés pour la synthèse protéique dans les cellules parenchymateuses (endosperme) ou le cotylédon (tiré de Smith, 1984).

Outre l'aspect génétique, les facteurs environnementaux sont aussi importants : l'itinéraire technique au travers des caractéristiques de la fertilisation azotée joue directement sur les teneurs

protéiques dans la graine (Figure 9) ou encore les dates de récoltes, de graines plus ou moins mûres, i.e. ayant plus ou moins consommé les protéines présentes de leur endosperme.

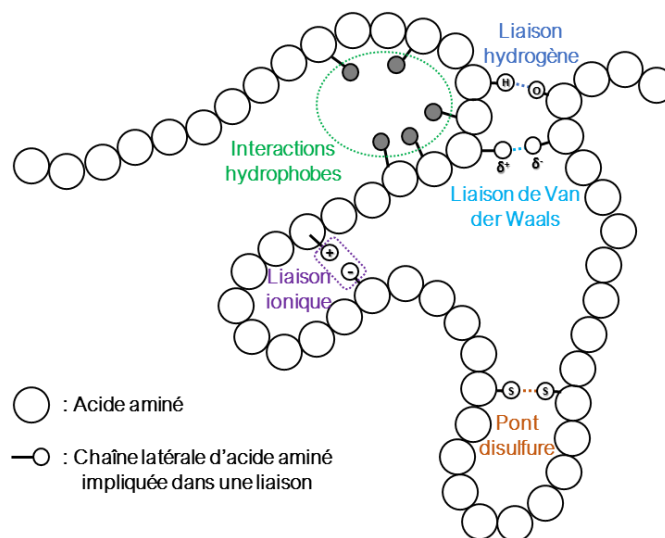
Les sources de variation entre les différentes graines étudiées s'observent au niveau des quantités des différentes protéines. Ces protéines varient en premier lieu par leur séquence primaire, autrement dit l'enchaînement des acides aminés (AA), qui est déterminé par les gènes qui les codent.

### 1.2.1.3 Séquences primaires : acides aminés

Il existe vingt AA protéinogènes qui peuvent être classés selon leur comportement par rapport à l'eau (hydrophobes/hydrophiles, polaire/apolaire), leur charge (négative/positive/neutre) ; leur capacité à capter ou relarguer un proton  $H^+$  (acide/basique), leur radical (ramifié, soufré, amidé, aromatique). L'enchaînement de ces AA est appelé séquence primaire. Elle conditionne la structure tridimensionnelle de la protéine via des liaisons non covalentes (ou covalentes dans le cas des ponts disulfures) entre les AA au sein des différentes séquences, induisant des repliements spécifiques de la structure protéique qui permettent de différencier et de classer les protéines.

### 1.2.1.4 Caractéristiques structurales

Une séquence d'AA s'organise dans l'espace en fonction de l'environnement dans lequel elle se trouve, mais surtout selon la nature des AA qui la composent. La structure spatiale de séquences protéiques est induite par des liaisons faibles et covalentes entre AA. Ces liaisons sont schématisées en Figure 10 et leurs caractéristiques sont répertoriées dans le Tableau 2.



**Figure 10** : Schéma des liaisons possibles entre les acides aminés d'une chaîne protéique (d'après Nesterenko, 2012).

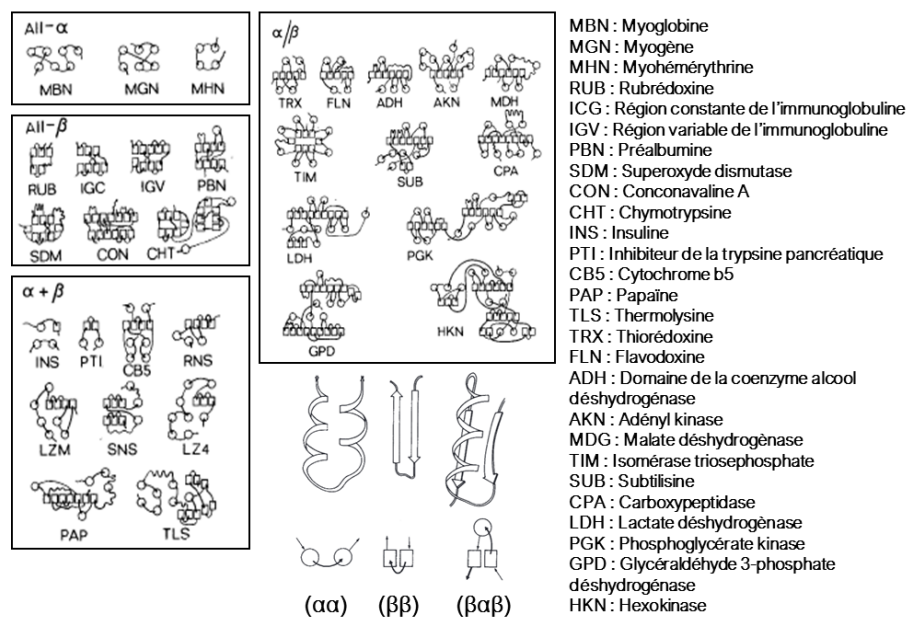
**Tableau 2 :** Caractéristiques des liaisons qui structurent les protéines (tiré de Liu and Hsieh, 2008; Salazar-Villanea, 2017).

Type de liaisons	Description	Force (kJ.mol <sup>-1</sup> )	Longueur	Acides aminés impliqués	Composés non enzymatique pouvant rompre la liaison
<b>Liaisons faibles</b>					
Van der Waals	Interaction induite ou permanente entre dipôle	0,4 – 4	0,30 – 0,60	(AA non polaires) Tyrosine, tryptophane, phénylalanine, proline, méthionine, leucine, isoleucine, valine, alanine, glycine	Détergents ioniques et non-ioniques (e.g. SDS, thiocarbamide, triton, CHAPS, les sels de sodium des acides gras à chaîne longue)
Interactions hydrophobes	Interactions entre les moléculaires apolaires suivant la présence d'eau	< 40	1,00		
Liaisons hydrogène	Entre un atome d'hydrogène et un atome fortement électronégatif	NH–O : 8 NH–N : 13 OH–O : 21 OH–N : 29	0,30 0,31 0,27 0,28	(AA polaires) Asparagine, glutamine, thréonine, sérine, cystéine	Molécules très polaires (urée, thiocarbamide, SDS)
Liaisons ioniques / électrostatiques	Entre deux groupes aux charges opposées	20	0,25	(AA chargés) Acide aspartique, acides glutamique, lysine, arginine, histidine	Solutions salines, alcalines ou acides
<b>Liaisons covalentes</b>					
Ponts disulfures	Deux atomes de soufre reliés ensemble	215 - 251	0,21	Cystéine	Agents réducteurs (e.g. DTT, Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> , 2-mercaptoéthanol)
Liaisons peptidiques	Liaison entre deux acides aminés constituant un amide	C–N : 308	0,13 – 0,15	Tous les acides aminés	Force puissante (e.g. combustion, hydrolyse acide à chaud)
Liaisons isopeptidiques	Amide entre les chaînes latérales des acides aminés	305 – 308	0,13 – 0,15	Lysine, acide glutamique, acide aspartique, glycine	

CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate

DTT : Dithiothréitol

Il est possible de définir plusieurs structures au niveau d'une protéine. Tout d'abord, la composition spécifique en AA de la protéine conditionne les types de liaisons pouvant se créer entre ces AA. Ces liaisons peuvent induire des repliements dans l'espace, c'est ce qui est appelé structure primaire d'une protéine. En outre, ces AA s'agencent dans l'espace suivant des motifs récurrents, principalement en hélices  $\alpha$  et en feuillets  $\beta$ , qui constituent les structures secondaires des protéines. D'autres formes minoritaires existent, comme l'hélice  $\beta$  et les coudes. L'association de ces structures secondaires forme ce qui est appelé la structure tertiaire de la protéine. Ces dernières sont fréquemment présentes dans la nature et les principales d'entre elles sont présentées dans la Figure 11.



**Figure 11** : Classification des structures IIIaires (selon Levitt and Chothia, 1976).

Enfin, le dernier niveau d'organisation structurale des protéines, appelé structure quaternaire, est l'assemblage des différentes sous-unités présentées précédemment, pour constituer un polymère, qui au sein de son organisme est alors fonctionnel.

Il est possible de différencier les protéines suivant leur structure quaternaire à partir du fractionnement qui s'opère entre celles qui sont solubles en solutions salines, appelées globulines, et celles solubles dans l'eau, appelées albumines (Osborne and Campbell, 1898a, 1898b). Ensuite, l'ultracentrifugation a été utilisée pour séparer les protéines suivant leur coefficient de sédimentation (Danielsson, 1949); par exemple les protéines globulaires du pois sont constituées de deux fractions : la 7S et la 11S, appelées viciline et légumine respectivement. Même si les noms donnés aux fractions changent d'une matière protéique végétale à une autre, le principe du fractionnement reste le même.

Il est d'ailleurs intéressant de noter que les 11S, d'une part, et les 7S, d'autre part, du pois et du soja, peuvent posséder des séquences en AA similaires jusqu'à 70 % (Kimura *et al.*, 2008). Ces globulines sont oligomériques et ont un poids moléculaire élevé (entre 150 et 350 kDa). Elles constituent une réserve de carbone, d'azote et de soufre mobilisée lors de la germination de la plantule.

La dernière fraction majoritaire est la 2S, qui est très hétérogène et constitue l'ensemble des albumines et autres petites protéines avec une fonction biologique (inhibiteurs enzymatiques, lectines, lipoxygénases). Ce sont souvent des monomères de masse moléculaire faible comprise entre 5 et 80 kDa. Ces travaux précurseurs ont pour la plupart été réalisés sur des légumineuses. Les céréales, quant à elles, possèdent d'autres fractions protéiques qui sont solubles dans l'éthanol, les prolamines, et dans des solutions à un pH supérieur à 11, les glutélines (Osborne, 1924). Le Tableau 3 répertorie les composés protéiques et facteurs antinutritionnels de la graine de soja, le Tableau 4 pour la graine de pois et le Tableau 5 ceux de la graine de blé.

Comme présenté précédemment, la quantité et de la nature des protéines présentes dans les graines varient au niveau inter- et également intra-espèce. L'étude de Tzitzikas *et al.* (2006), montre pour le pois des proportions en globulines par rapport aux protéines totales de 49,2 à 81,8 %. En effet, selon le cultivar, la proportion de viciline peut représenter de 26,3 à 52,0 % par rapport aux protéines totales (Tzitzikas *et al.*, 2006).

Sans entrer dans le détail de la structure des différentes classes de protéines végétales, nous rappellerons que la structure d'une protéine a un effet déterminant sur sa solubilité. Bien que la solubilité dans l'eau soit favorisée par la présence de groupes chargés portés par les chaînes latérales des AA, l'attraction entre groupes de signes contraires s'oppose à cet effet en raison de la formation de liaisons à l'intérieur de la chaîne protéique ou avec des chaînes protéiques adjacentes. Elle dépend beaucoup moins de la nature et de la teneur en certains AA que de la répartition des groupements ionisés et des groupes apolaires entre la surface et l'intérieur de la molécule de protéine. La solubilité varie aussi avec le pH du milieu et est influencée par la présence de sels (Jarrige, 1995). Ainsi, les différentes classes de protéines végétales mises dans des conditions particulières de pH, température, force ionique, et/ou en présence de solvants particuliers, peuvent se réarranger entre elles grâce à leur structure flexible, sensible à leur environnement.

**Tableau 3 :**Composition protéique des graines soja (Wolf, 1970; Godon, 1996; Nakai and Modler, 1996).

Classe	Nom	Structure et poids moléculaire (kDa)	Fonction dans la plante	Contribution à la teneur totale en protéines de la plante (g.100g <sup>protéines<sup>-1</sup></sup> )
<i>Globulines (90 % des protéines totales)</i>	15 S	Non connu (~ 600 kDa)	Stockage	11
	11/12 S glycinine	Hexamère (300 kDa - 380 kDa) (Polypeptides acides (A3 : 35 kDa ; A1, A2, A4 : 28 kDa) et basiques (20 kDa))	Stockage	31
	7S α- et α'-conglycine	Trimère (Sous-unités : 63-67 kDa)	Stockage	
	7S γ- conglycinine		Stockage	
	7S β- conglycinine	Trimère (150 – 200 kDa) (Sous-unités : 49 kDa) (α' : 72 kDa, α : 68 kDa, β : 52 kDa)	Stockage	30 – 50 γ & β : 37
<i>Albumines (10 % des protéines totales)</i>	2S α-conglycinine			22
	Lipoxygénases	Monomère (102 kDa; 94 – 97 kDa)	Oxydation des acides gras	
	Inhibiteurs des protéases à Sérine/Trypsine	Monomère (10 - 16 kDa) (8 – 21,5 kDa)	Activité antitrypsique	
	Cytochrome c	Monomère (12 kDa)		
	Hémagglutinine - Lectines	Quadrimère (110 kDa) (sous-unités : 25 – 30 kDa)		
	β-amylase	Monomère (61,7 kDa)		
<i>Facteurs antinutritionnels non protéiques</i>	Polyphénols (Tannins, phytoestrogènes)			
	Fibres			
	Saponines			



**Tableau 4 :** Composition protéique des graines pois (Shewry, Napier and Tatham, 1995; Godon, 1996; Lefranc-Millot and Teichman-Dubois, 2019).

Classe	Nom	Structure et poids moléculaire (kDa)	Fonction dans la plante	Contribution à la teneur totale en protéines de la plante (g.100g <sup>protéines</sup> <sup>-1</sup> )
<i>Globulines (49-82 % des protéines totales)</i>	Légumine	Héxamère (330 - 400 kDa)	Stockage	6 – 24,5
	Viciline	Trimère (150 - 186 kDa)	Stockage	21 – 55
	Conviciline	Trimère (~ 210 kDa)	Stockage	3,9 – 8,3
<i>Albumines (20-35 % des protéines totales)</i>	PA1	Dimère (~ 10 kDa)	Stockage	5 – 9
	PA2	Dimère (~ 50 kDa)	Inconnu	10 – 20
	Lectines	Tétramère (~ 50 kDa)	Protection contre les protéases endogènes	2,5
	Lipoxygénases	Monomère (94 kDa)	Oxydation des acides gras	< 1
	Inhibiteurs des protéases à Sérine/Trypsine	Monomère (10 - 16 kDa)	Activité antitrypsique	< 2
<i>AA libres</i>	Canavaline			
	Ornithine			
<i>Facteurs antinutritionnels non protéiques</i>	Fibres			
	Polyphénols (dont tannins)			
	Glycosides (saponines, glycosides cyanogènes, glucosinolates)			

**Tableau 5 :** Composition protéique des graines blé (Wieser, Seilmeier and Belitz, 1994; Shewry, Napier and Tatham, 1995; Godon, 1996; Wieser, 2007).

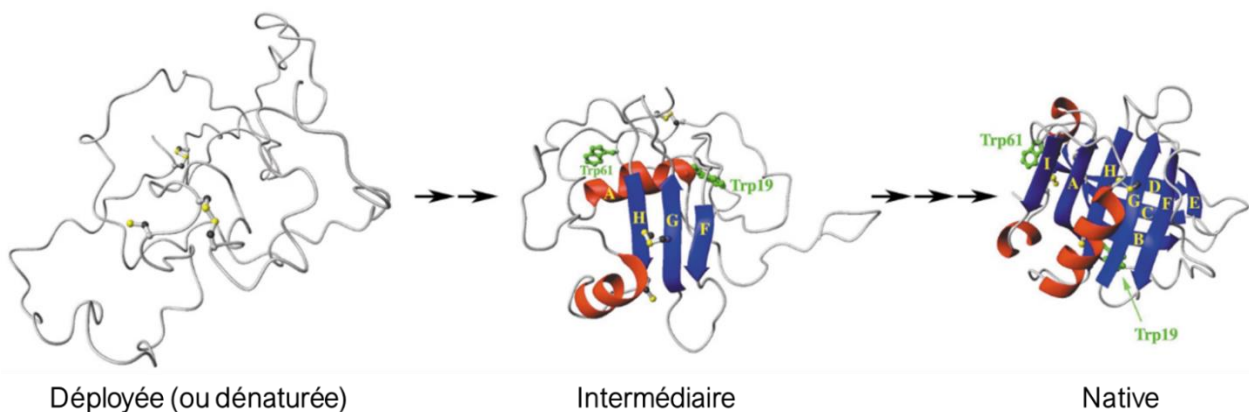
Classe	Nom	Structure et poids moléculaire (kDa)	Fonction dans la plante	Contribution à la teneur totale en protéines de la plante (g.100g <sup>protéines<sup>-1</sup></sup> )
<i>Globulines (5 % des protéines totales)</i>				
<i>Albumines (10 % des protéines totales)</i>	Lectines	Tétramère (~ 50 kDa)	Protection contre les protéases endogènes	
	Inhibiteurs des protéases à Sérine/Trypsine	Monomère (10 - 16 kDa)	Activité antitrypsique	
	Inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase			
<i>Prolamines (45 % des protéines totales (forte teneur en Glu et Pro, faible teneur en AA basiques (His, Arg, Lys))</i>	$\alpha$ -gliadines	Monomère (Groupe A : 31 – 32 kDa)	Stockage d'azote utilisable lors de la germination	$\alpha/\beta$ : 44 – 60 % des gliadines totales
	$\beta$ -gliadines	Monomère (30 kDa)		
	$\gamma$ -gliadines	Monomère (38 – 42 kDa; 27 kDa)		30 – 46 % des gliadines totales
	$\omega$ -gliadines (Absence d'AA soufrés)	Monomère (44 – 74 kDa; 60 kDa - 80 kDa)		6 – 20 % des gliadines totales
	Gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM)	Protéines Agrégées par S-S (64 – 136 kDa Type $\gamma$ : 67 - 74 kDa Type x : 83 - 88 kDa)		$\approx$ 10 % du gluten total
	Gluténines de faible poids moléculaire (SG-FPM)	Protéines Agrégées par S-S (33 – 44 kDa Groupe B : 50 kDa Groupe C : 40 kDa Groupe D : 65 kDa)		$\approx$ 20 % du gluten total
<i>Glutélines (40 % des protéines totales)</i>				
<i>Facteurs antinutritionnels non protéiques</i>	Acide phytique			
	Fibres			

### 1.2.1.5 Caractéristiques fonctionnelles

Les caractéristiques fonctionnelles des protéines étudiées découlent de leurs propriétés biochimiques qui sont résumées par type de protéines dans le Tableau 8.

Comme nous pouvons le voir dans ce tableau, les caractéristiques des protéines parmi celles étudiées sont multiples, autant du point de vue structural que du point de vue physico-chimique et de leur comportement vis-à-vis de leur environnement.

Les protéines peuvent plus ou moins se déformer, plus ou moins se replier sous l'impulsion d'un changement de conditions environnementales. On peut qualifier une protéine de native, lorsqu'elle est sous forme naturelle telle que nous la trouvons dans la plante ou la graine. Au contraire, si elle a subi une déformation, due à un traitement chimique, physique ou biologique, on dit que la protéine est dénaturée. La dénaturation peut intervenir à des degrés plus ou moins intenses, comme l'illustre l'exemple de la  $\beta$ -lactoglobuline en Figure 12, où la protéine se déploie et s'ouvre, contrairement à la structure native très compacte.



**Figure 12 :** Schéma des différentes conformations au cours du repliement de la  $\beta$ -lactoglobuline (tiré de Kuwata *et al.*, 2001).

La capacité des protéines à changer d'état en fonction des conditions de leur environnement est utilisée pour les fractionner et les isoler.

### 1.2.2 Méthodes d'extraction des protéines

Quel que soit l'agroressource, la graine est la matière première utilisée pour l'extraction de protéines végétales. En effet, cette structure qui contient et protège l'embryon végétal est particulièrement riche en protéines. Les graines ont donc suscité le développement de techniques d'extractions très avancées. Des protéines peuvent également être extraites de l'appareil végétatif des plantes comme les feuilles, les tubercules ou les tiges. Nous nous focaliserons sur l'extraction

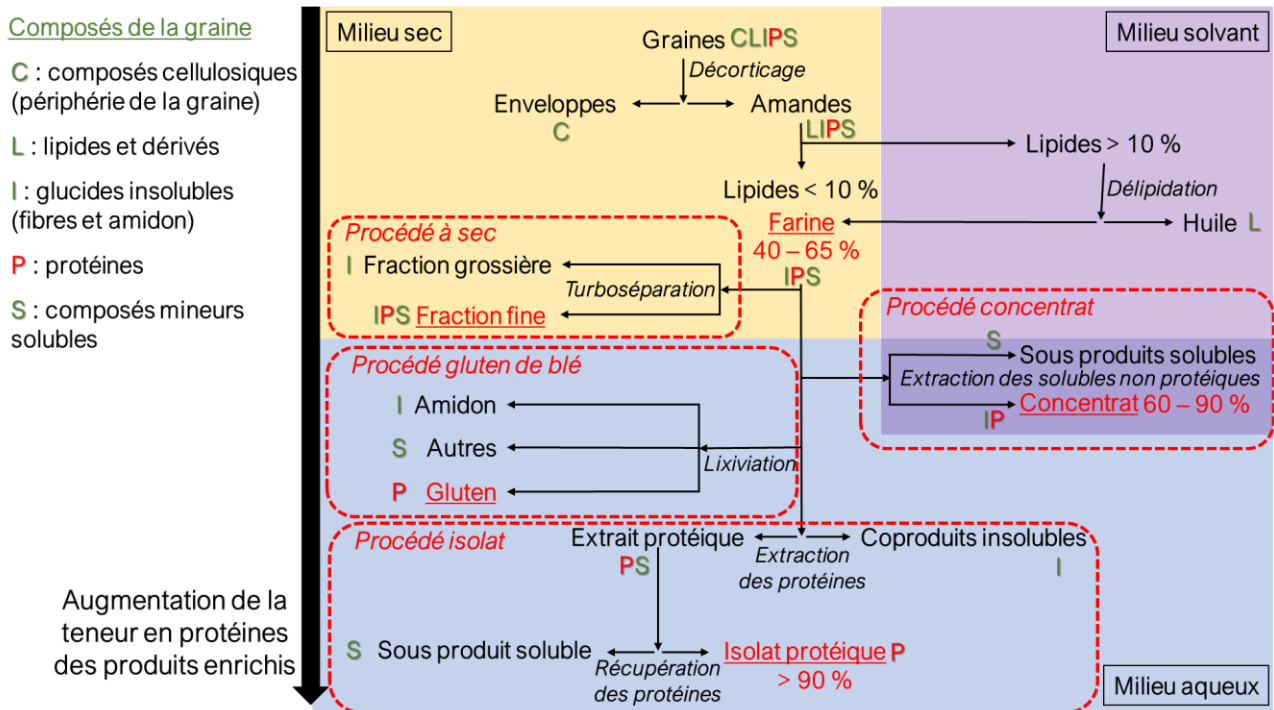
protéique des graines, en particulier de celles du blé, du soja et du pois qui sont les sources protéiques des aliments étudiés dans cette thèse. De manière générale, le principe de l'extraction protéique repose sur la séparation des différents constituants de la graine (composés cellulosiques, lipides, glucides insolubles, composés solubles et protéines), enrichissant relativement la proportion de protéine de la fraction d'intérêt. Au final, deux types d'extraits protéiques existent, les concentrats, qui contiennent entre 60 à 90 % de protéines, et les isolats, dont la teneur en protéines est supérieure à 90 %.

Les procédés, résumés en Figure 13, peuvent s'effectuer en voie sèche, comme par exemple l'élimination des enveloppes cellulosiques par décorticage/broyage ou l'isolement d'une grande partie de l'amidon par turboséparation (par passage de la farine dans un courant d'air qui ségrègue les particules fines contenant les protéines, des plus grosses particules contenant l'amidon). Ils peuvent aussi être réalisés en voie humide et permettent l'extraction sélective des composés non protéiques. C'est par exemple le cas lors de l'élimination des lipides grâce à un solvant lipophile, ou bien de composés antinutritionnels solubles par des solvants hydratés. Concernant les céréales, le blé en particulier, les propriétés agrégatives des protéines leur permettent d'être isolées sous forme de gluten vital correspondant à des gliadines et gluténines entremêlées. Pour cela, la lixiviation, *i.e.* une succession de lavage à l'eau est utilisée et permet d'extraire l'amidon du gluten. Les gluténines offrent une résistance à l'extension au gluten, tandis que les gliadines contribuent à la viscosité et l'extensibilité du gluten. La lixiviation dans le cas des céréales est un procédé plus intéressant à mettre en œuvre, car la teneur en protéines des céréales est plus faible que celles des autres matières protéiques végétales et ces protéines ne sont solubles qu'à pH alcalin. Pour les Légumineuses par contre, le procédé d'isolat est plus indiqué. La Figure 13 résume les différents procédés qui permettent l'enrichissement en protéines d'une fraction par élimination sélectives des autres constituants de la graine.

La production d'un isolat protéique comporte deux étapes. L'objectif de la première étape est de récupérer les protéines de manière aussi sélective que possible. Elle consiste en une solubilisation des protéines et à leur séparation par centrifugation des glucides pariétaux qui restent insolubles dans des conditions spécifiques de pH, de température, de ratio solvant/matière première, temps et nombre d'extractions. Les conditions changent d'une matière première à une autre. Lors de la seconde étape, il s'agit de concentrer les protéines et de les purifier vis-à-vis des autres constituants, ce qui peut être réalisé suivant deux voies :

- La voie membranaire : les molécules solubles non protéiques de faibles poids moléculaires sont séparées des protéines par ultrafiltration.

- La voie pHmétrique : les protéines sont précipitées en abaissant le pH du mélange à leur point isoélectrique (pI), ce qui permet de récupérer principalement la fraction globuline par centrifugation sous forme de crème insoluble concentrée. Des étapes de lavage à l'eau, de centrifugation, de neutralisation et de séchage sont ensuite réalisées pour purifier les protéines des derniers constituants non désirables. Dans ce travail, le gluten et l'isolat de pois sont d'origine commerciale, leur production n'a pas été faite au cours de la thèse, contrairement aux isolats de soja, dont le processus est détaillé dans le Chapitre 2.



**Figure 13** : Schéma global de l'extraction des protéines des matières végétales et devenir des différents constituants (tiré de Godon, 1996).

Cependant, les concentrats (60 – 90 % de protéines) et isolats (supérieur à 90 % de protéines) protéiques ne sont que des produits alimentaires intermédiaires ou des ingrédients, qui sont associés à d'autres composés ou bien transformés pour aboutir à un aliment aux qualités organoleptiques qui sont acceptables pour l'alimentation humaine.

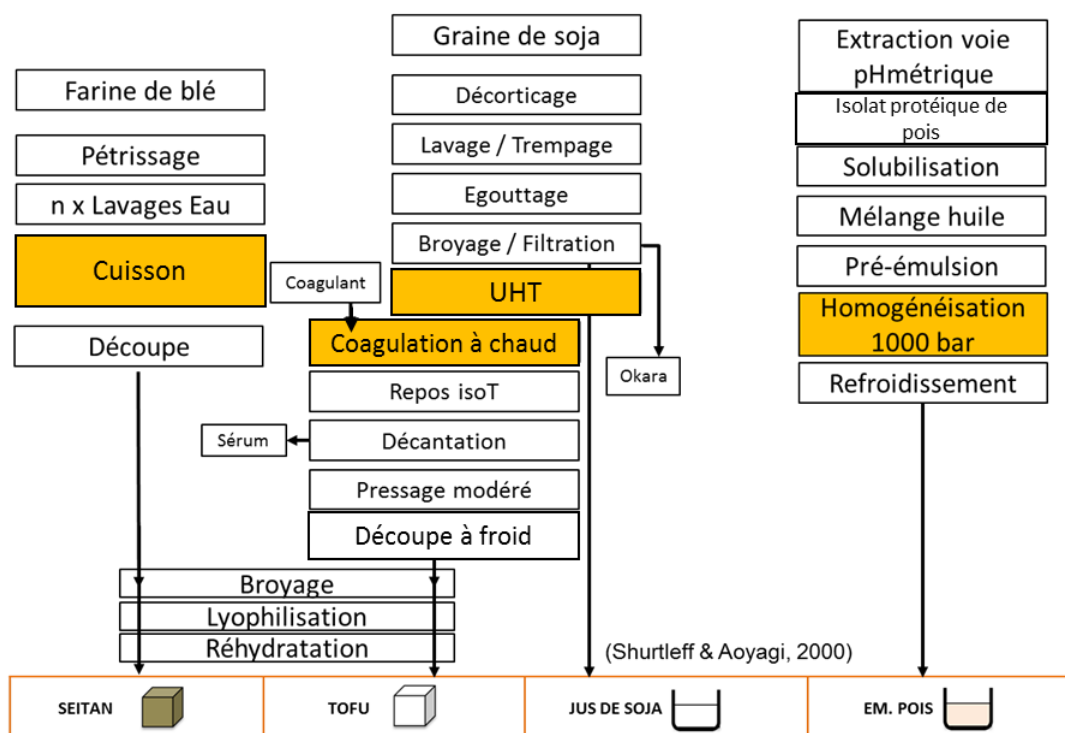
### 1.2.3 Conception d'aliments à base de protéines végétales

Quatre produits alimentaires d'origine végétale ont été choisis comme objets d'études. Deux matrices liquides et deux matrices solides de façon à avoir des aliments totalement différents du point de vue de la macrostructure. Nous focaliserons donc dans cette partie l'analyse de la littérature sur ces quatre types d'aliment.

- Le jus de soja ou « dòujiāng » en chinois ou « tonyu » en japonais désigne le jus obtenu par broyage de graine de soja et d'eau avec une teneur protéique minimale de 3,6 % d'après la norme Afnor NF V29-001. Sur base sèche, la teneur en protéines varie entre 47 % et 61 % (Lindner, 1989). Il serait apparu en Chine en 1365 et depuis utilisé comme boisson nutritive ou aliment protéique à associer à d'autres plats (Godon, 1996). La production industrielle a débuté à Shanghai en 1936 après le dépôt d'un brevet en 1910 (Chen, 1989). Depuis, la production et la consommation du jus de soja n'ont cessé de croître et de s'étendre au niveau mondial ; il est d'ailleurs consommé par quatre Français sur dix (Baromètre Soxaja 2015). Le jus de soja est généralement obtenu directement à partir des graines et non de l'isolat protéique. Un diagramme type de fabrication est présenté dans la Figure 14.
- Une émulsion de pois a été réalisée extemporanément par homogénéisation haute pression et créée de telle manière à ce qu'elle soit similaire au jus de soja commercial utilisé du point de vue nutritionnel et structural. Les comparaisons des différences au niveau des paramètres mesurés permettront de détecter d'éventuels effets de la source protéique (entre soja et pois). Cette émulsion de pois se rapproche des produits commercialisés de type *ready-to-drink*, en particulier les boissons ou milk-shake protéinés végétaux. Ces boissons *ready-to-drink* sont relativement récentes, avec un marché en expansion depuis 2010 (Market Research.com, 2019). La majorité de ces breuvages sont des émulsions complexes, grâce aux tensioactifs et autres additifs ajoutés. Dans la thèse, nous fabriquerons une émulsion simple, huile de soja dans eau, avec un isolat protéique commercial de pois comme tensioactif.
- Le tofu, un produit protéique (6 – 12 % de protéines sur base humide, 46 – 54 % de protéines sur base sèche) formé à partir de la coagulation du jus de soja par traitement donné, *e.g.* ajout de sels alcalins ou d'acide citrique (méthode indienne du paneer) ou encore un traitement thermique, et dont le sérum excédentaire est éliminé par décantation. « Tofu » vient du japonais « tōfu », emprunté au chinois « dòufu », qui veut dire littéralement haricot et caillé/fermenté. Il est consommé depuis des millénaires en Chine et constitue la principale forme de soja commercialisée à destination de l'alimentation humaine au Japon et en Chine. Il peut être mangé sous forme hydratée ou après une étape de friture par exemple, seul ou associé dans un plat (Godon, 1996).
- Le seitan, un aliment solide à base de gluten de blé, dont les premières traces remontent au VI<sup>ème</sup> siècle en Chine et aurait été consommé principalement comme substitut à la viande par les Bouddhistes (Shurtleff, Huang and Aoyagi, 2014). Son nom japonais signifie « à base de » (« sei ») + « protéine » (« tanpaku »). Il est préparé à partir de farine de blé mélangée à de l'eau,

pétrée et lavée à l'eau pour retirer le maximum d'amidon, pour aboutir à des teneurs en protéines d'environ 22 g pour 100 g de produits (USDA, 2018).

Les diagrammes généraux de fabrication de ces quatre aliments sont présentés en Figure 14.



**Figure 14 :** Diagramme de fabrication des aliments étudiés et des prétraitements qu'ils ont subis (UHT : traitement Ultra-Haute Température).

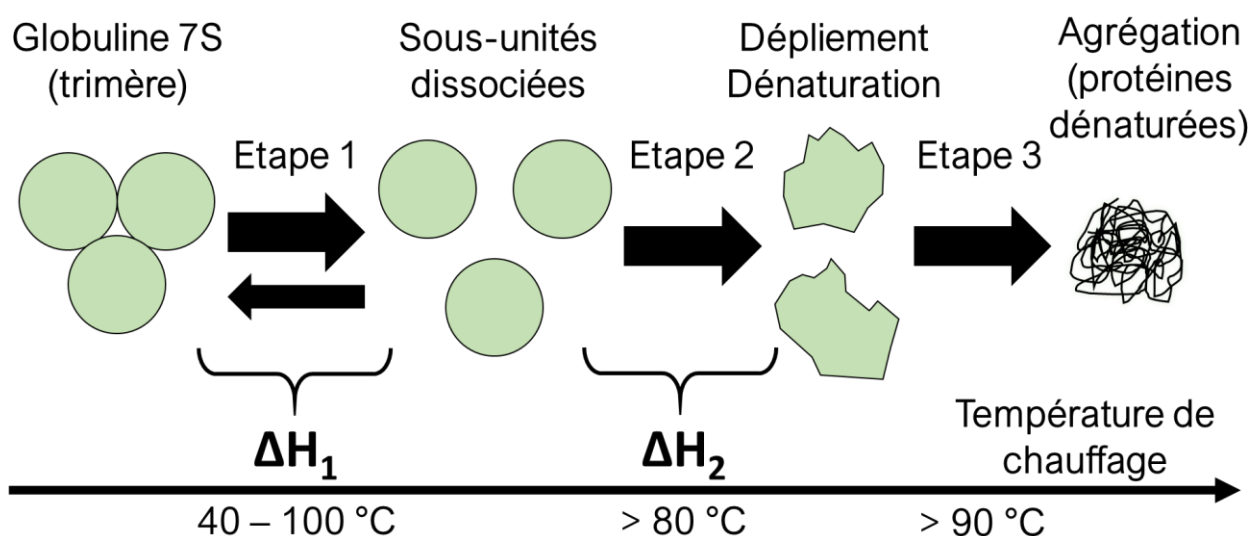
Les protéines ne restent pas natives dans ces aliments. En effet, les protéines sont dénaturées à cause des traitements qu'elles subissent au cours de la transformation.

#### 1.2.4 Impact des procédés technologiques sur la structure des protéines

##### 1.2.4.1 La température

L'élévation de température induit une dénaturation et/ou une agrégation des globulines qui s'effectue en trois étapes (Figure 15). La première étape est réversible et consiste en une déstabilisation de la structure quaternaire qui mène à une séparation des sous-unités. La seconde étape est quant à elle irréversible et résulte en un dépliement et une dénaturation des sous-unités. Enfin, le dernier stade est une agrégation irréversible des sous-unités dénaturées via la formation notamment de ponts disulfures intercaténaux (Tableau 6). L'analyse des variations d'enthalpie ( $\Delta H$ ) au cours du chauffage, suivies par calorimétrie différentielle à balayage (Differential Scanning Calorimetry ou DSC), permettent de déduire les températures auxquelles se produisent la dissociation de la structure

quaternaire ( $\Delta H_1$ ) puis de la dénaturation des sous-unités ( $\Delta H_2$ ). Ces enthalpies varient d'une protéine à une autre et sont listées dans le Tableau 7 pour les protéines étudiées.



**Figure 15 :** Etapes classiques de déstructuration des globulines sous l'influence de la chaleur (adapté de Tang, 2017). Les fourchettes de température sont globales.

Ces changements macrostructuraux sont dus à l'influence de la température sur les liaisons intra- et intermoléculaires entre les AA. Globalement, plus la température subie est élevée, plus les liaisons se rompent et des réarrangements s'opèrent. Le Tableau 6 récapitule l'effet des différentes températures sur les liaisons impliquées dans la structure des protéines. Les liaisons natives sont rompues à des températures jusqu'à 90°C, avant de former de nouvelles liaisons si la température s'élève. Les conditions d'expérimentations jouent plus ou moins suivant les protéines étudiées. Par exemple, plus le niveau d'hydratation des prolamines augmente (de 4 à 52,1 % d'eau), plus la température de dénaturation baisse (de 84,2 à 40,9°C) (León, Rosell and De Barber, 2003). Il en est de même avec une force ionique croissante (de 0,03 à 0,5) induisant une température de dénaturation des vicilines croissantes (de 69,4 – 71,8 °C à 82,1 à 84,1 °C) (Ruppen and Oekel, 2004). Il est à noter que les protéines 7S (viciline et  $\beta$ -conglycinine) présentent des températures de dénaturation inférieures aux 11S (légumine et glycinine), ce qui serait dû au fait que les trimères que sont les 7S ont besoin de moins d'énergie pour se déployer que les 11S, qui sont des hexamères (Kimura *et al.*, 2008). Les protéines globulaires possèdent en général une structure tertiaire stable du point de vue thermodynamique, où les résidus hydrophobes sont protégés de l'environnement aqueux grâce à leur regroupement sous forme de poche au cœur de la protéine. De hautes températures peuvent parfois créer des conditions thermodynamiques où la protéine se retrouve plus stable sous une forme plus déployée, menant parfois à des regroupements entre ces différentes formes ouvertes de protéines via



des liaisons intercaténares. Ces liaisons se forment pour protéger un minimum de résidus hydrophobes qui autrement seraient exposés dans la phase hydratée. Cette néoformation de liaisons peut conduire à de l'agrégation et de la précipitation des protéines, c'est-à-dire à une diminution de leur solubilité dans l'eau.

Ce phénomène couplé à l'oxydation (Gatellier, Kondjoyan and Portanguen, 2010) et à la destruction des AA aromatiques (Phe, Trp, Tyr) et basiques (Arg, Lys, His) (Gatellier *et al.*, 2009) mène aussi à l'agrégation protéique.

Les proportions des différentes structures secondaires peuvent ainsi changer d'un traitement thermique à un autre, comme le montre une étude récente sur l'impact de la température lors de la formation du gel de gluten de blé sur les arrangements protéines (Wang *et al.*, 2017).

La température n'est pas le seul paramètre influençant la structure des protéines, les conditions chimiques telles que le pH ou la force ionique induisent aussi des déformations. C'est en modifiant ces trois paramètres que nous arrivons à former de nouvelles structures protéiques.

**Tableau 6 :** Effet des traitements thermiques sur la dénaturation et la dégradation des protéines (Yu *et al.*, 2002).

<i>Température (°C)</i>	<i>Effets</i>
50 °C	Perte partielle de la structure cristalline, augmentation de l'hydratation
70–80 °C	Perte de la structure tertiaire Clivage des ponts disulfures
80–90 °C	Perte de la structure secondaire Clivage des ponts disulfures
90–100 °C	Formation de ponts disulfures intercaténares (entre deux chaînes protéiques différentes). Agrégations
100–150 °C	Réaction des lysines avec d'autres molécules (Maillard), pertes de lysine et sérine, formation d'isopeptides
150–200 °C	Pyrolyse de certains acides aminés Formation de peptides (peptidisation)
200–250 °C	Pyrolyse de tous les acides aminés

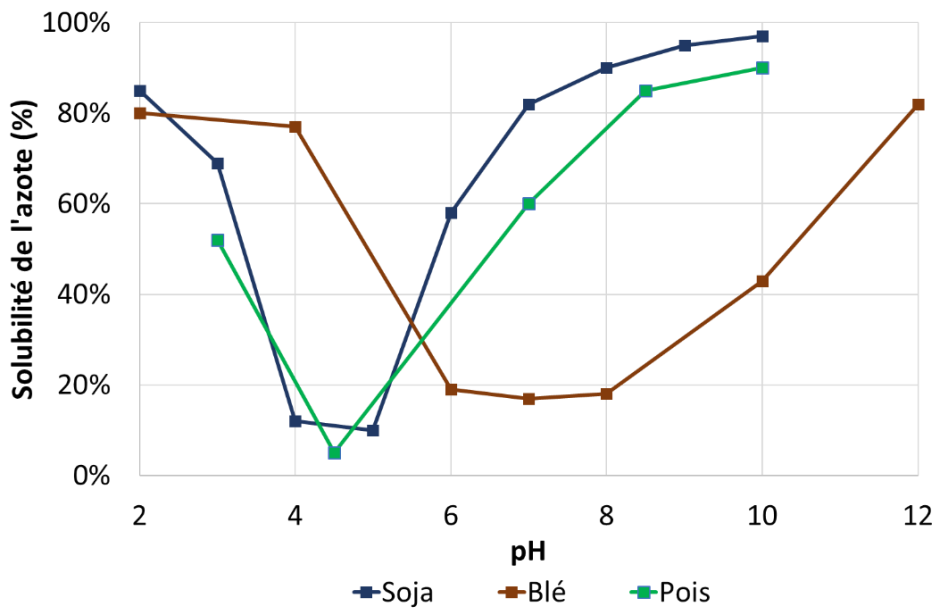
**Tableau 7 :** Températures de dissociation des sous-unités et de dénaturation des globulines étudiées dans l'eau.

<i>Globuline</i>	Température de dissociation des sous-unités	Température de dénaturation	Références
<i>Glycinine</i>	90 – 100°C	≈ 220°C	(Marshall and Zarins, 1989; Renkema <i>et al.</i> , 2000; Tang, Choi and Ma, 2007)(Kimura <i>et al.</i> , 2008)
<i>β-conglycinine</i>	72,9 – 79,8 °C		(Marshall and Zarins, 1989; Renkema <i>et al.</i> , 2000; H. J. Hou and Chang, 2004) (Kimura <i>et al.</i> , 2008)
<i>Légumine</i>	83 – 104 °C		(Kozhevnikov <i>et al.</i> , 2001) (Kimura <i>et al.</i> , 2008)
<i>Viciline</i>	69.4 – 84.1 °C		(Ruppen and Oekel, 2004) (Kimura <i>et al.</i> , 2008)
<i>Gliadines</i>	≈ 80°C		(León, Rosell and De Barber, 2003)
<i>Gluténines</i>	40,9 – 64,3 °C	84,2 °C	(León, Rosell and De Barber, 2003)

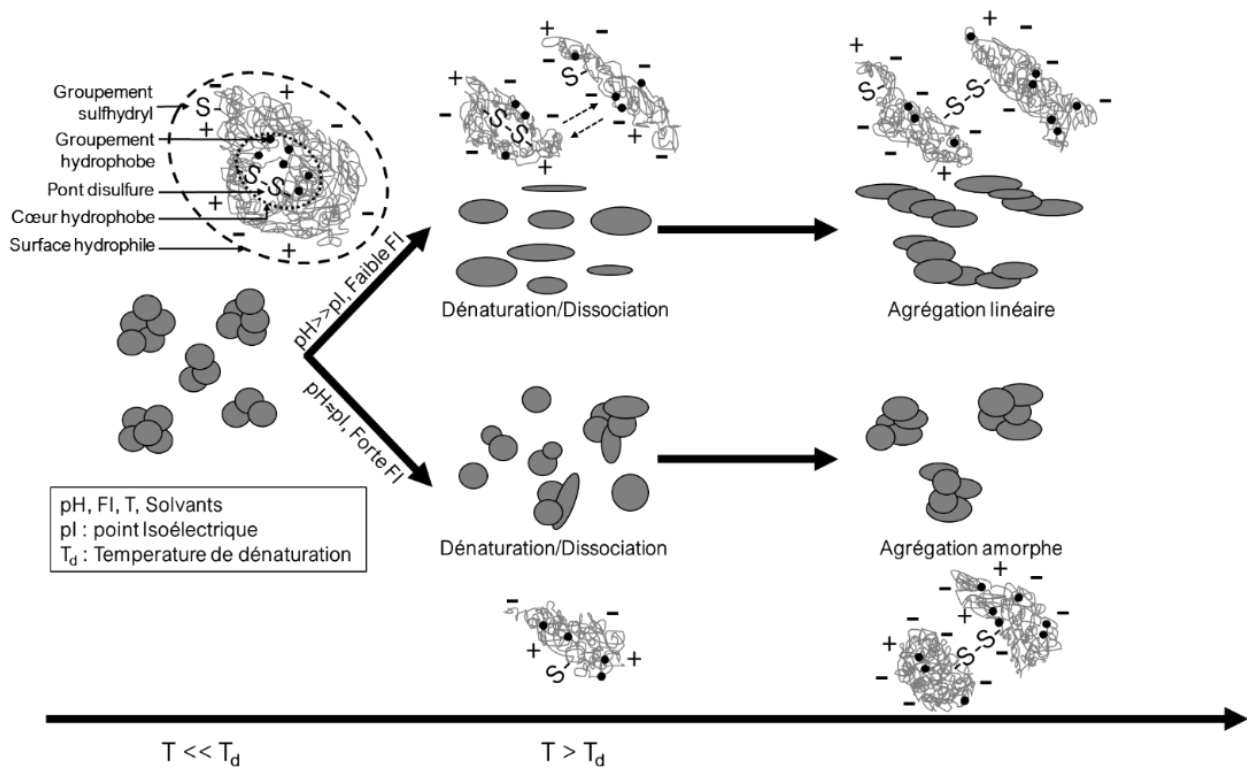
**Tableau 8 :** Caractéristiques biochimiques des protéines majoritaires étudiées (adapté de Salazar-Villanea, 2017).

Source	Protéine	Type	Teneur (% du total protéique)	pI* (pH)	% d'hélice $\alpha$	% de feuillet $\beta$	Ratio $\alpha : \beta$	Pelotes aléatoires (%)	Références
Soja	Glycinine	Globuline	31	4,6 – 5,0	15	37	0,41	23	(Hartman and Cheng, 1936; Delisle and Canada, 1984; Sikorski, 2001; D. H. J. Hou and Chang, 2004; Salas <i>et al.</i> , 2012)
	$\beta$ - conglycinine	Globuline	30 – 50	4,9 – 6,0	13	38	0,34	23	(Thanh and Shibasaki, 1977; Delisle and Canada, 1984; Sikorski, 2001; H. J. Hou and Chang, 2004)
Pois	Légumine	Globuline	6 – 24,5	4,5 – 8,8	9	46	0,20		(Baniel <i>et al.</i> , 1992; Ruppen and Oekel, 2004; Rubio <i>et al.</i> , 2014)
	Viciline	Globuline	21 – 55	5,0 – 6,0	35 – 36	40 – 49	0,80	7 – 15	(Rangel <i>et al.</i> , 2003; Ruppen and Oekel, 2004; Rubio <i>et al.</i> , 2014)
		Albumine	20 – 35		3	49	0,06	31	(Gruen, Guthrie and Blagrove, 1987; Rubio <i>et al.</i> , 2014)
Blé	Gliadine	Prolamine	34	6,5 – 7,8	22 – 36	25 – 31	1,04	11 – 16	(Delisle and Canada, 1984; Gruen, Guthrie and Blagrove, 1987)
	Gluténine	Prolamine	47	7,0			1,29 – 3,63		(Delisle and Canada, 1984; Gruen, Guthrie and Blagrove, 1987)

\*pI : point isoélectrique.



**Figure 16 :** Courbe de solubilité classiques des protéines natives étudiées en solution aqueuse en fonction du pH (adapté de Godon, 1996; Shand *et al.*, 2007).



**Figure 17 :** Mécanisme global de dénaturation des globulines sous l'effet des variations de condition de température et de l'environnement chimique (pH, FI : Force Ioniques) (adapté de Messin, 2012 et fondé sur Bryant and McClements, 1998; Clark, Kavanagh and Ross-Murphy, 2001).

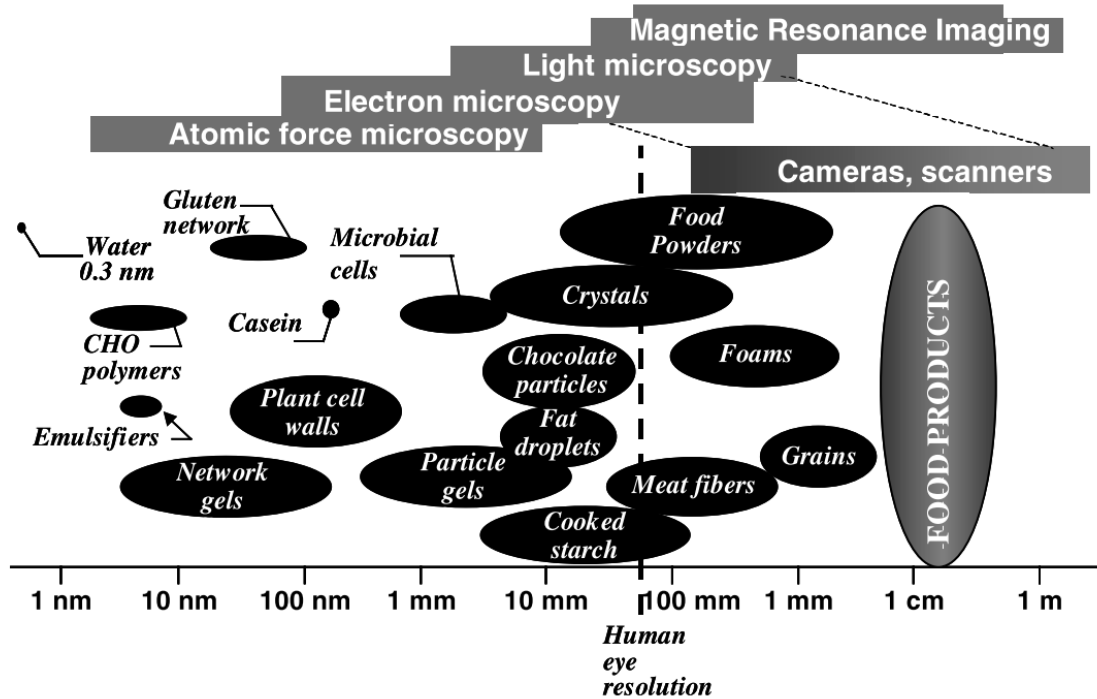
#### 1.2.4.2 L'environnement chimique

Une méthode simple pour estimer l'état des protéines dans une solution donnée est de mesurer l'index de solubilité de l'azote, qui est la quantité de protéines solubilisées par rapport à la quantité de protéines introduites totale. Cette solubilité dépend du nombre de charges de surface entre les groupements  $\text{-NH}_3^+/\text{-NH}_2$  ( $\text{pKa} \approx 9,8$ ) et  $\text{-COOH}/\text{COO}^-$  ( $\text{pKa} \approx 4,2$ ) portés par les protéines, qui varie notamment en fonction du pH, de la nature et concentration des sels présents en solution et de la force ionique qui favorisera plus ou moins l'exposition des AA hydrophiles à l'interface avec le solvant, processus appelés « salting in » et « salting out » (Kimura *et al.*, 2008). En conditions physiologiques, la force ionique est modérée (les solutions simulant la salive, les fluides gastriques et intestinaux (M. Minekus *et al.*, 2014) ont des forces ioniques comprises entre 0,04 et 0,14 mol.l<sup>-1</sup>), ce qui favoriserait la solubilisation des protéines via l'effet de « salting in ». Le facteur majeur variant entre les compartiments digestifs est le pH, qui est le principal facteur jouant sur les courbes de solubilités de l'azote des protéines étudiées, comme le montre la Figure 16. Les courbes des légumineuses sont similaires : les globulines précipitent à un pH compris entre 4 et 5,5 et la solubilité est maximale pour des pH au-delà de 7 et inférieurs à 3. Une dissociation des sous-unités s'opère à ces pH acides : en dessous de pH 2,8 pour les légumineuses (Subirade, Gueguen and Schwenke, 1992), entre pH 3 et 3,8 pour la glycine (Lakemond *et al.*, 2000). Globalement, le schéma en Figure 17 résume les déformations des protéines induites par des changements de conditions de température et d'environnement chimique, qui conduisent à une dénaturation et/ou une agrégation, c'est-à-dire une insolubilisation des protéines.

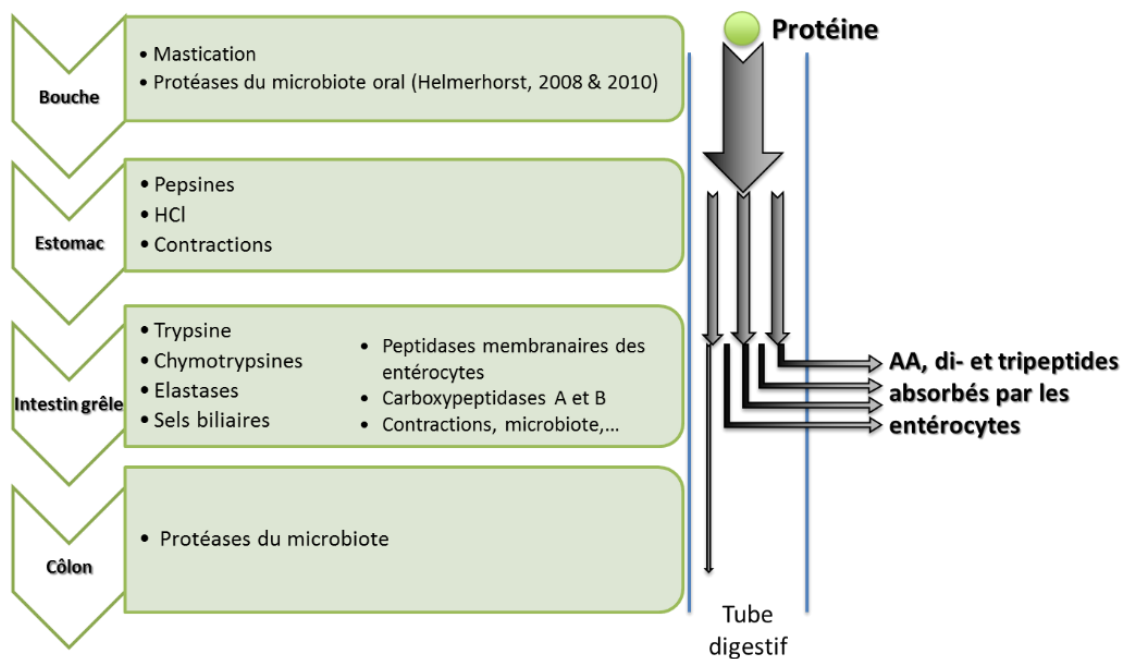
Afin d'évaluer l'impact des traitements et des processus chimiques et/ou physiques associés sur la structure des protéines et plus globalement de l'aliment, il existe un large éventail de méthodes physiques et/ou chimiques qui sont présentés ci-dessous.

#### 1.2.5 Caractérisation multi-échelle des aliments et des protéines

La caractérisation multi-échelle d'un composé consiste à combiner plusieurs techniques physico-chimiques pour estimer l'état de la structure à différents niveaux : nanométrique, micrométrique et millimétrique. Ce type de caractérisation de la matière est particulièrement adapté aux aliments, car ceux-ci sont des systèmes complexes d'une diversité de nutriments en interaction, qui peuvent former autant des structures macroscopiques (grains, mousse), que microscopiques (réseaux protéiques, globules gras avec des protéines à son interface, polymères). La Figure 18 proposée par Aguilera *et al.* (2006) résume les techniques optiques utilisées pour observer les différentes architectures possibles dans un aliment.



**Figure 18 :** Echelles approximatives de la structure des éléments et composés contenus dans les aliments. Les méthodes d’observations associées à l’échelle sont données par les étiquettes grise en haut de la figure (tiré de Aguilera, 2006).



**Figure 19 :** Schéma général de la dégradation des protéines chez un Monogastrique.

Après avoir vu que les protéines alimentaires, et notamment celles d'origine végétale, offrent un large polymorphisme (malgré des points communs ou des redondances), expliqué par leur origine (espèces, variétés, géographie, climat, itinéraire technique), et les transformations et environnements qu'elles ont subis (association à d'autres ingrédients, traitements technologiques), il s'agit maintenant de présenter la manière dont l'organisme et en particulier celui de l'Homme (monogastrique), arrive à dégrader et assimiler cette source d'AA nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme.

### **1.3 Mécanismes de la digestion protéique chez les Monogastriques**

#### **1.3.1 Protéolyse digestive globale**

Dans le système digestif monogastrique, les protéines sont digérées principalement par le fait d'actions enzymatiques. Toutefois, les dégradations qu'elles subissent sont également d'ordres mécaniques, chimiques et biologiques et sont résumées dans la Figure 19. Même si les micro-organismes sont présents tout au long du tractus digestif, comme le montre le Tableau 10, ce n'est qu'au niveau colique que certains présentent une activité protéolytique non négligeable. De plus, l'absorption des produits issus de la digestion des protéines (AA, peptides) s'effectuant exclusivement dans l'intestin grêle, l'impact des micro-organismes sur la biodisponibilité des AA des protéines alimentaires peut être considéré comme faible. Ce sont les enzymes digestives qui jouent le premier rôle dans la digestion protéique, notamment trois d'entre elles : la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine. Leurs activités sont très sensibles aux variations de pH et de température, et elles coupent les protéines en des endroits différents, avec plus ou moins de spécificité. La majorité de la protéolyse s'effectue dans l'estomac avec les pepsines qui génèrent des gros fragments et dans l'intestin grêle avec les chymotrypsine et trypsine, qui produisent des petits peptides, ensuite métabolisés par les enzymes de la bordure en brosse avant d'être absorbés par les entérocytes. Les caractéristiques des trois enzymes citées sont présentées dans le Tableau 9.

Dans les sous-parties suivantes, nous allons nous attacher à décrire les phénomènes de déstructuration et de digestion des macronutriments (protéines, mais aussi lipides et amidon) dans la bouche, l'estomac, l'intestin grêle et le colon.

**Tableau 9:** Caractéristique des protéases digestives majoritaires.

Nom	pH optimal	Type (toutes endopeptidases)	Poids moléculaire	Site de clivage
<i>Pepsines</i>	1,5 – 2,5 (Piper and Fenton, 1965) (coagulation à 5,3)	Type aspartique (avec deux résidus aspartiques sur le site catalytique) (Fersht, 1985)	34,6 kDa (A1 Porcine, Sigma)	Résidus Phe, Tyr, Trp, Leu (Inouye and Fruton, 1969) His, Lys, Arg, Pro (Hamuro <i>et al.</i> , 2008)
<i>Chymotrypsines</i>	8	Type serine	25 kDa	Résidus Phe, Tyr, Trp, Leu (Floc'h and Seve, 2000)
<i>Trypsine</i>	7,6 (Koutsopoulos <i>et al.</i> , 2007)	Type serine	23,3 kDa	Résidus Arg, Lys (Floc'h and Seve, 2000)

**Tableau 10 :** Les compartiments digestifs de l'Homme, leurs pH, teneurs et compositions en micro-organismes (adapté de Walter and Ley, 2011).

Compartiment	pH	Biomasse microbienne	Principales populations bactériennes
Bouche	7	$10^{8-9}$ cellules.ml <sup>-1</sup>	<i>Gemella</i> , <i>Granulicatella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Rothia</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>
Estomac	1,5 – 5	$10^{2-3}$ cellules.ml <sup>-1</sup>	<i>Helicobacter (H. pylori)</i> , <i>Gemella</i> , <i>Granulicatella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Rothia</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Lactobacillus</i>
Duodénum	5 – 7	$10^{3-4}$ cellules.ml <sup>-1</sup>	<i>Escherichia (E. coli)</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Ruminococcus</i> , <i>Dorea</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Coprococcus</i> , <i>Weissella</i> , <i>Lactobacillus (quelques espèces)</i> .
Jéjunum	7 – 9	$10^{4-5}$ cellules.ml <sup>-1</sup>	<i>Lactobacillus (quelques espèces)</i> .
Iléon	7 – 8	$10^8$ cellules.ml <sup>-1</sup>	<i>Granulicatella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Veillonella</i>
Côlon	5 – 7	$10^{11}$ cellules.ml <sup>-1</sup>	5 phyla majeurs : <i>Firmicutes</i> , <i>Bacteroidetes</i> , <i>Actionobacteria</i> , <i>Verrucomicrobia</i> , <i>Proteobacteria</i> . + de 100 espèces



### 1.3.1.1 Phase orale

Lors de la consommation, la bouche est le lieu des premières transformations de l'aliment. La mastication, conduisant à la dégradation du produit en particules de petites tailles et à son hydratation par la salive, favorise l'étape de déglutition et prépare la phase gastrique de la digestion. Le taux d'hydratation de l'aliment par la salive est très variable selon les aliments. Il dépend à la fois des propriétés mécaniques de l'aliment et de son temps de séjour en bouche, mais également de sa composition et de sa capacité à former un bol cohésif. La quantité de salive incorporée dans l'aliment est par exemple de l'ordre de 0,9 g de salive/g d'aliment pour des céréales de petit-déjeuner, de 0,3 g de salive / g d'aliment dans le cas du pain et peu descendre à environ 0,1 g de salive/g d'aliment pour des fromages mous (Brodkorb *et al.*, 2019).

Une activité protéasique de  $0,8 \pm 1,3 \text{ U.mg}_{\text{Protéines}}^{-1}$  a été détectée dans la salive d'une cohorte de 210 individus (Méjean *et al.*, 2015). Il se pourrait que les micro-organismes buccaux possèdent une activité protéasique, mais restant à la marge et impactant peu ou pas les propriétés de structure et rhéologiques des bols (Drago *et al.*, 2011). Le Tableau 11 présente la composition moyenne d'une salive humaine et des activités enzymatiques. L'action principale de la phase orale sur les protéines est donc une action mécanique par la mastication. La mastication a un rôle important dans la déstructuration de l'aliment, d'autant plus si celui-ci est cohésif. Elle a un effet significatif sur la digestibilité d'une grande diversité d'aliments et ses effets se répercutent sur l'ensemble du tractus digestif (Fardet, Souchon and Dupont, 2013).

En effet, la taille des particules générée en bouche va influencer aussi bien la motilité et le transport du bol entre les différents segments du tube digestif (et notamment la vidange gastrique) que l'accessibilité enzymatique aux substrats. La taille des particules dans le bol est dépendante des aliments ingérés : tandis que les légumes, cuits ou crus ; forment des particules supérieures à 2 mm de diamètre, les noix conduisent en bouche à particules, dont 90 % ont un diamètre inférieur à 2 mm (Peyron, Mishellany and Woda, 2004). Ainsi, la taille théorique moyenne du tamis laissant passer 50 % du bol, appelé D50, varie d'un aliment à l'autre, entre 0,82 (cacahuètes) et 3,04 mm (concombre) (Jalabert-Malbos *et al.*, 2007). Par ailleurs, la phase orale est également le siège de réflexes céphalique ou préabsorbatifs, causé par le contact des aliments avec les éléments sensoriels buccaux, qui participent à la préparation du système digestif en aval, en stimulant par exemple la sécrétion d'acide gastrique, d'amylase pancréatique ou encore la motilité gastrique et duodénale (Katschinski, 2000).

**Tableau 11 :** Composition moyenne d'une salive humaine en terme de composés azotés et les activités enzymatiques détectées (adapté de Féron and Salles, 2013).

Paramètre	Valeurs
Débit (mg.min <sup>-1</sup> )	(au repos) 0.24 – 1.19 (repas) 1.08 – 2.54
Lypolyse (lipase)	0-874 mU.ml <sup>-1</sup>
Protéolyse	29-290 mU.ml <sup>-1</sup> 2.22 – 2.87 µg.ml <sup>-1</sup> d'équivalent trypsine 0.073 – 0.232 U.ml <sup>-1</sup>
Amylase	11 – 1325 U.ml <sup>-1</sup>
Peptides	1 – 70 nM
Protéines	0,99 – 3,45 mg.ml <sup>-1</sup>
Lipocalines	1,02 ± 0,75 équivalent de lipocaline 1 par ml 134,4 ± 84,4 ng.ml <sup>-1</sup>
Glutathion	0,12 – 5,5 µg.ml <sup>-1</sup>
Acide urique	2,52-74,7 µg.ml <sup>-1</sup>
Nitrites	60-400 µM
Cystatine SN (antiprotéasique)	64 896-34 973 ± 45 %
Mucines, dont :	366 ± 166 µg.ml <sup>-1</sup>
- MG1	233 ± 146 µg.ml <sup>-1</sup>
- MG2	133 ± 116 µg.ml <sup>-1</sup>
Protéines riches en proline	0,7-2,45 mg.ml <sup>-1</sup>

### 1.3.1.2 Phase gastrique

#### 1.3.1.2.1 Contractions gastriques et aspects biomécaniques

Le bol alimentaire passe de la sphère orale à l'estomac via le pharynx puis l'œsophage, grâce au péristaltisme des cellules musculaires lisses qui les tapissent. Une fois arrivé dans l'estomac, le bol induit une distension de celui-ci au niveau du fundus et de l'antrum : le volume gastrique s'adapte au volume du bol alimentaire. Au niveau gastrique, le péristaltisme est initié à la frontière fundus-antrum (2-3 cycles par minutes chez l'Homme) par les cellules interstitielles de Cajal qui constituent un pacemaker. Il assure donc au niveau de l'antrum une homogénéisation du bol et un mélange des lipides (les globules lipidiques deviennent plus petits, les particules inférieures à 1 mm étant vidangées avec la phase aqueuse) (Figure 20). Un délitement en particules fines se produit, par exemple la dissolution partielle des enveloppes végétales, dissociation du ciment fibrillaire des fibres musculaires, précipitation de certaines protéines.

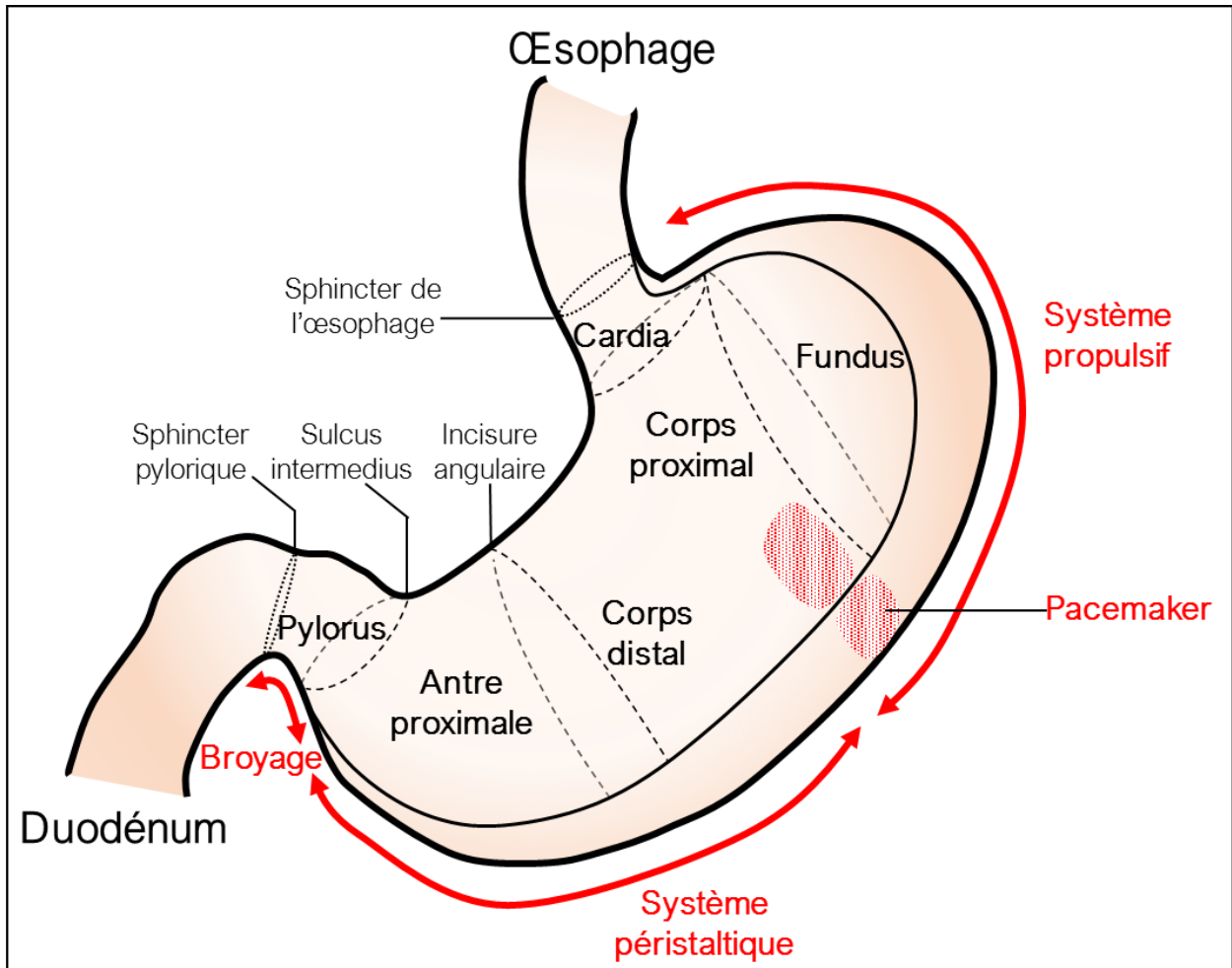
#### 1.3.1.2.2 Sécrétions et absorption des nutriments

Différentes substances sont sécrétées dans l'estomac suivant le statut physiologique :

- du mucus par les cellules caliciformes,
- de l'HCl par les cellules pariétales à raison de un à deux litres par jour d'HCl 150 mM avec un débit de 1 ml.min<sup>-1</sup> au repos, de 6-8 ml.min<sup>-1</sup> après stimulation. Pendant la phase céphalique préingestive, *i.e.* juste avant l'ingestion du repas, les sécrétions acides font baisser le pH gastrique à 3 – 4. En début de phase postprandiale, celui-ci remonte à pH 5- 7 à cause de l'arrivée du bol alimentaire dans l'estomac. Ensuite, les cinétiques d'acidification sont modulées par l'effet tampon de l'aliment et son temps de séjour en phase gastrique (liquide vs solide),
- des pepsines par les cellules principales ou pepsinogènes,
- de la gastrine et de l'histamine par les cellules entéroendocrines,
- de l'eau et du HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> issus des sécrétions non pariétales qui permettent de protéger l'épithélium de l'acidité du HCl et qui sont stimulées par la prostaglandine, mais inhibée par les anti-inflammatoires tels que l'Ibuprofène.

Les cinétiques des sécrétions gastriques dépendent de nombreux facteurs relatifs au bol alimentaires, au statut physiologique de l'individu (sexe, âge, activité physique, grossesse, stress), ou encore à ses habitudes de consommations (café, cigarette) (Bornhorst, 2017).

Ces sécrétions induisent l'hydratation du bol par les composés hydroélectrolytiques et l'hydrolyse enzymatique (enzymes salivaires et pepsines). Les pepsines sont des endopeptidases de type aspartyl, c'est-à-dire qu'elles hydrolysent d'après leur définition, les protéines spécifiquement après les AA aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane) (Tableau 9).



**Figure 20 :** Division anatomique et fonctionnelle de l'estomac. Le bol alimentaire est mixé et déstructuré par pression, péristaltisme et broyage (adapté de Adler, 2010).

Il a été montré qu'en réalité d'autres AA peuvent être ciblés comme la leucine, l'histidine, l'arginine et la proline, et que cela dépend de leur position vis-vis des autres AA voisins (Hamuro *et al.*, 2008). Elles agissent principalement sur les protéines qui précipitent à pH gastriques, c'est-à-dire les albumines, les caséines et l'hémoglobine. On considère que seulement 3 à 5 % de l'hydrolyse protéique totale se produit dans l'estomac montrant un rôle limité de la pepsine.

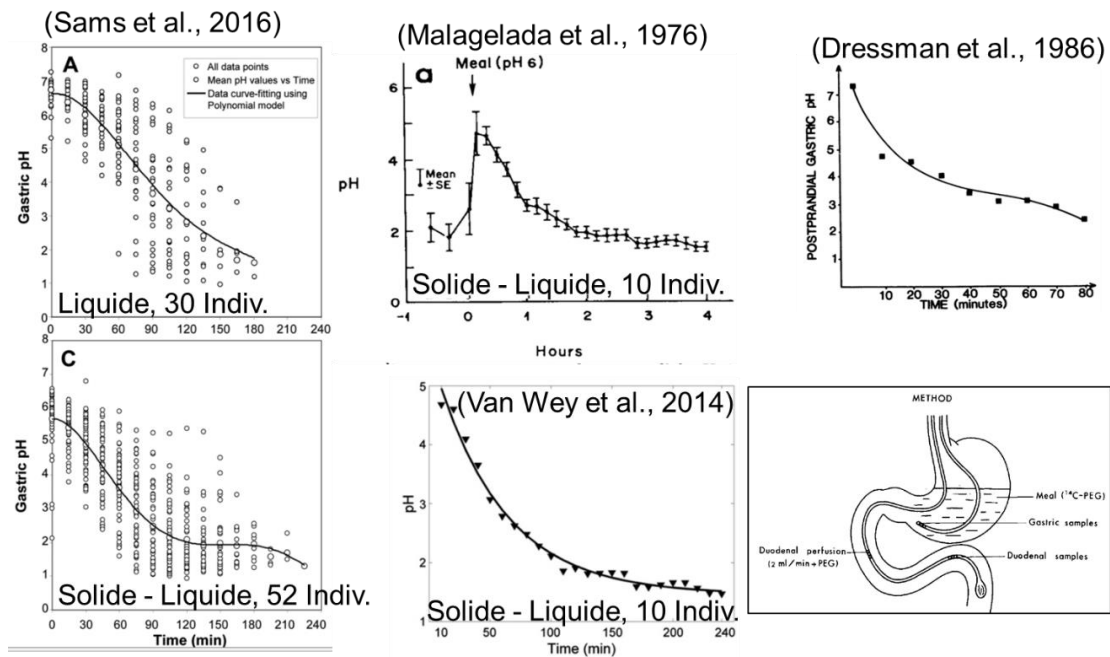
Concernant les autres macronutriments, l'amylase salivaire n'est plus active en dessous du pH 4, ce qui limite l'hydrolyse de l'amidon dans l'estomac lorsque le pH est acide. Lorsque la redescente du pH gastrique suite à une prise alimentaire est progressive, l'amylase salivaire peut rester active pendant toute la descente en pH et jusqu'à pH4 et l'hydrolyse partielle de l'amidon dans l'estomac peut représenter jusqu'à 80 % de l'hydrolyse totale de l'amidon du pain (Freitas *et al.*, 2018). Pour les lipides, la lipase gastrique (parfois appelée linguale) modifie la structure des lipides indépendamment des sels biliaires.

Concernant les micronutriments, la sécrétion de facteurs intrinsèques fixe par exemple la vitamine B12 qui sera ensuite absorbée au niveau du duodénum. Il n'y a pas d'absorption des nutriments au niveau de la phase gastrique. Toutefois, l'estomac jouerait un rôle dans l'absorption de certains composés comme le cuivre et l'alcool.

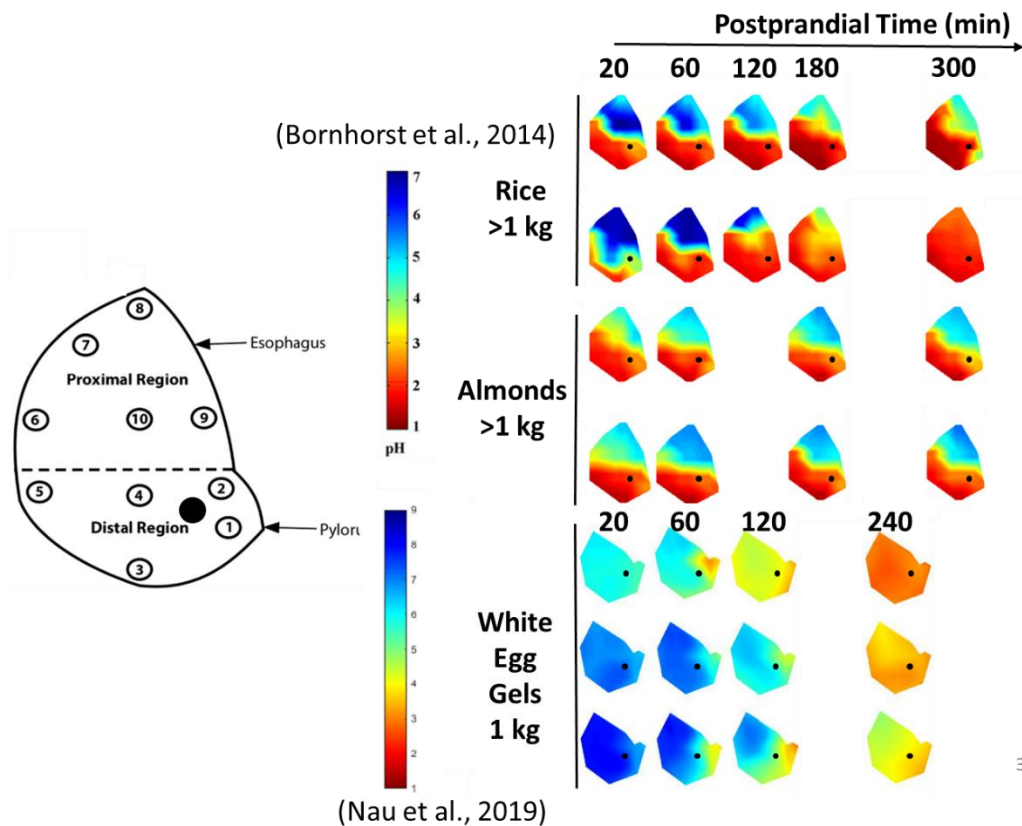
#### 1.3.1.2.3 pH gastrique

Comme expliqué dans le paragraphe précédent, le pH gastrique augmente lors de l'arrivée du bol alimentaire dans l'estomac, puis baisse. Cependant cette acidification n'est pas instantanée : l'atteinte de pH 2 – 3 peut prendre une dizaine de minutes comme plusieurs heures comme le montre la Figure 21, où le pH a été suivi en un point de l'estomac chez l'Homme grâce à une sonde naso-gastrique.

Le pH intragastrique varie dans le temps, mais aussi dans l'espace, c'est-à-dire la région de l'estomac considérée, comme le montre une étude utilisant un cathéter muni de quatre sondes pHmétriques localisés à différents niveaux de l'estomac sur dix individus. Le pH de l'estomac distal, *i.e.* dans l'antrum diminuait plus vite que celui enregistré dans les régions du fundus et du corps proximal (Simonian *et al.*, 2005). Le même constat peut être effectué en regardant les cartographies du pH gastrique obtenus après euthanasie de cochons à différents temps postprandiaux (Figure 22). Nous pouvons observer qu'elles sont différentes suivant l'aliment ingéré. En reprenant les exemples présentés en Figure 22, nous pouvons observer qu'au bout d'une heure de digestion et au niveau du point noir, le pH du chyme gastrique après un repas composé d'amandes ou de riz est à pH 2, tandis que celui des différents gels de protéines de blanc d'œufs est aux alentours de 6.



**Figure 21 :** Différentes cinétiques d'acidification gastrique enregistrées chez l'Homme grâce à une sonde naso-gastrique (Malagelada *et al.*, 1976; Dressman, 1986; Van Wey *et al.*, 2014; Sams *et al.*, 2016). Un repas solide - liquide comporte des aliments solides, *e.g.* de la viande ou du pain, et de l'eau (représentant au moins 50 % du poids du repas).



**Figure 22 :** Carte de distribution des pH au cours de la digestion de riz, d'amandes ou de gels de protéines de blanc d'œuf dans des estomacs de Porcs (adaptés de Bornhorst *et al.*, 2014; Nau *et al.*, 2019).

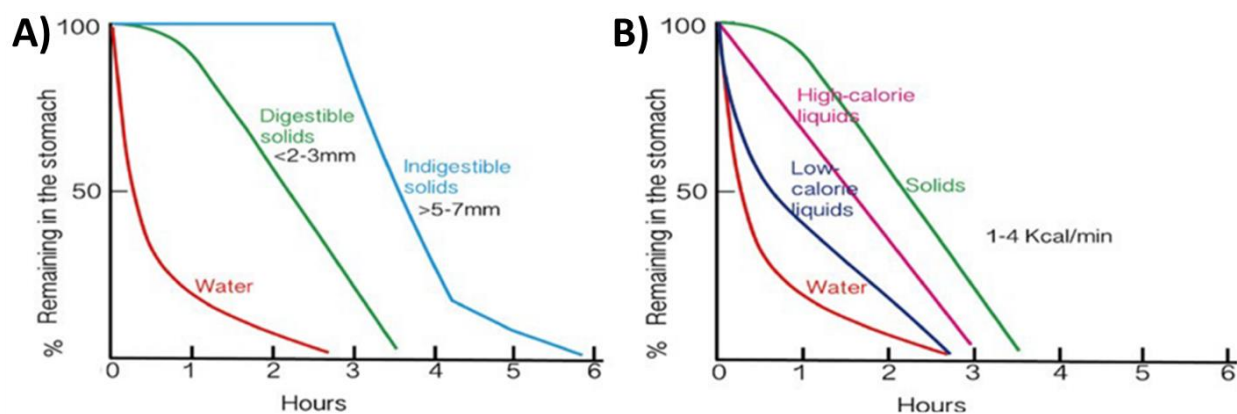
L'évolution du pH gastrique dépend ainsi, des volumes des sécrétions acides et du pouvoir tampon de l'aliment, dont une augmentation provoque un retardement de la chute du pH gastrique (Weinstein *et al.*, 2013), mais aussi du temps de séjour des aliments dans l'estomac.

#### 1.3.1.2.4 Vidange gastrique

L'évacuation du chyme gastrique est régulée au niveau du pylore par un sphincter constitué de cellules musculaires, ne laissant passer que les petites particules de moins de 2 mm de diamètre. La vitesse de comminution des particules et le péristaltisme de vidange conditionnent ainsi le temps de séjour des aliments dans l'estomac, et par répercussions la vitesse d'apparition dans le plasma des nutriments issus de la digestion dans l'intestin grêle.

La vidange gastrique dépend du ratio entre phase liquide et phase solide du bol alimentaire et donc de la structure de la matrice alimentaire (Santangelo *et al.*, 1998). En effet, comme le montre la Figure 23, la phase liquide se vidange plus vite que la solide (Figure 23A) (Siegel *et al.*, 1988), d'autant plus qu'elle est peu calorifique (Figure 23B). De plus, les grosses particules, supérieures à 5 – 7 mm de diamètre, observent une phase initiale de rétention dans l'estomac pouvant durer plusieurs heures (jusqu'à 3 heures).

La vidange gastrique varie également en fonction de la répartition des calories dans le chyme gastrique. Par exemple, l'ajout d'huile ne ralentit pas forcément la vidange gastrique, car celle-ci reste en surface dans l'estomac et n'impacte pas la vidange gastrique de la phase inférieure (Meyer *et al.*, 1996). La structure de l'aliment et des protéines jouent aussi sur la vidange de certaines AA, comme par exemple les AA hydrophobes (Tyr, Phe, Ile, Leu, Val, Pro) davantage retenus par l'estomac après l'ingestion de lait par rapport à un yaourt (Scanff *et al.*, 1991).



**Figure 23 :** Les cinétiques de vidange gastrique du bol alimentaire qui varient suivant : A) ses propriétés physiques, B) sa densité calorifique (pourcentage de fraction de chyme restante dans l'estomac en fonction du temps) (tiré de Goyal, Guo and Mashimo, 2019).

L'ouverture du sphincter pylorique est ainsi soumise à de nombreux rétrocontrôles neurohormonaux. Elle dépend également de nombreux autres facteurs tels que le sexe, la glycémie (le glucose dans le plasma influe plus que le glucose dans l'estomac ou lumière intestinale), la physiologie (activité physique, grossesse). L'influence de la viscosité du bol alimentaire est importante lorsque la charge calorique est faible (Marciani *et al.*, 2001; Mariotti *et al.*, 2001). Les caractéristiques physico-chimiques intrinsèques du repas stimulent par ailleurs la sécrétion de composés qui vont jouer sur le système nerveux central pour réguler certains paramètres de digestion. Ces éléments seront discutés plus en profondeur dans la partie 1.3.2.

Pour conclure ce paragraphe sur la vidange gastrique, il faut savoir que sa cinétique a fait l'objet de nombreuses modélisations mathématiques depuis les années 80 (Kong and Singh, 2008b). Le modèle le plus utilisé est l'équation exponentielle d'Elashoff (Eq1) (Elashoff, Reedy and Meyer, 1982) :

$$y(t) = 2^{-\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\beta} \quad (\text{Eq1})$$

Où  $y(t)$  est la fraction restante du repas dans l'estomac en fonction du temps (en min),  $t_{1/2}$  est le temps nécessaire pour que 50 % du repas soit vidangée et  $\beta$  conditionne la forme de la courbe.  $\beta > 1$  lorsqu'une phase de latence initiale est observée, pour les solides ;  $\beta < 1$  décrit les cinétiques de vidange des liquides, qui est rapide au début puis lente dans un second temps. Plus tard, Siegel *et al.* ont pris en compte cette phase de latence avec la formule suivante (Eq2) (Siegel *et al.*, 1988) :

$$y(t) = 1 - (1 - e^{-kt})^\beta \quad (\text{Eq2})$$

Où  $k$  est la vitesse de vidange gastrique par minute et  $\beta$  est l'interception théorique de la droite passant par la portion finale de la courbe. Le temps de demi-vidange se déduit à partir de ces paramètres de la manière suivante :  $t_{1/2} = \left(-\frac{1}{k}\right) \times \ln(1 - 0,5^{1/\beta})$ , tout comme  $t_{lag}$ , le temps de latence :  $t_{lag} = \frac{\ln(\beta)}{k}$ . L'avantage de l'équation de Siegel est qu'elle permet d'extraire la période de rétention initiale du bol dans l'estomac. Cependant, il a été rapporté que la formule surestimait la durée de cette phase de latence (Ziessman *et al.*, 1996; Hellström, Grybäck and Jacobsson, 2006).

### 1.3.1.3 Phase intestinale : Intestin grêle

Le chyme stomacal se vidange dans l'intestin grêle, un tube, tapissé de muqueuse qui forment de villosités, et qui se divise en trois grandes zones : le duodénum (du pylore au ligament de Treitz), le jéjunum (les deux tiers proximaux) et l'iléon (la partie terminale). Cette organisation est identique chez tous les Mammifères, à l'exception de sa longueur qui peut varier.



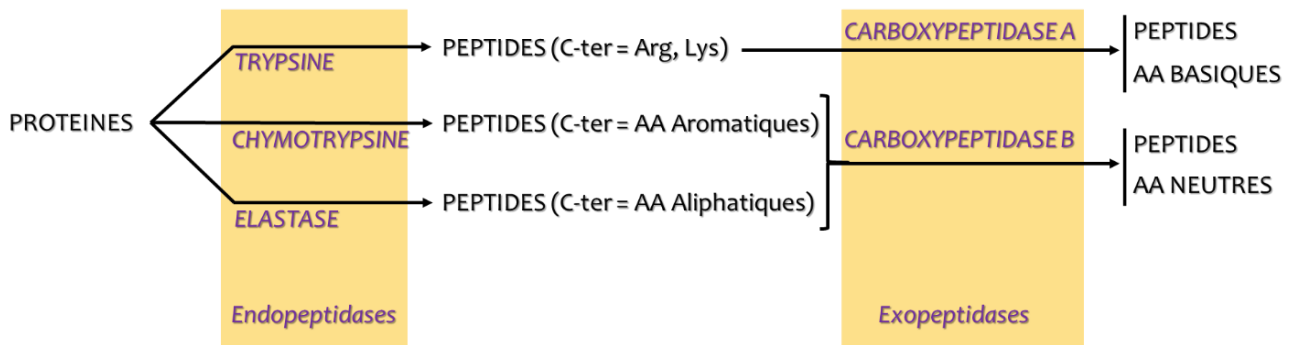
#### 1.3.1.3.1 La motilité intestinale

Dans la partie proximale de l'intestin grêle, le chyme est mis en mouvement principalement par des forces péristaltiques (propulsives par nature), segmentaires (non-propulsives et de courte durée, qui consistent en une alternance de phases de contraction et de relaxation des muscles lisses de la paroi intestinale) et pendulaires (contractions ne se propageant pas de manière longitudinale) (Lentle *et al.*, 2012). Ces contractions sont initiées par une salve de potentiel déclenchée par le système nerveux entérique et par la dépolarisation cycliques, appelées ondes lentes, des muscles lisses de la paroi intestinale, qui se diffusent de proche en proche aux cellules musculaires lisses. Ces ondes lentes sont provoquées par les signaux électriques provenant des cellules de Cajal (comme pour l'estomac). La concordance des salves de potentiel et des ondes lentes dans le temps provoquent la contraction des cellules musculaires tapissant la lumière de l'intestin grêle, ce qui permet de moduler la fréquence des contractions suivant le statut digestif (à jeun, début ou fin de digestion). Le rythme est de 12 cycles.min<sup>-1</sup> chez l'Homme « éveillé » au niveau duodénal et décroît le long de l'intestin grêle (Clench, Pineiro-Carrero and Mathias, 1989). Cette activité musculaire devient quasi nulle lors des phases de sommeil.

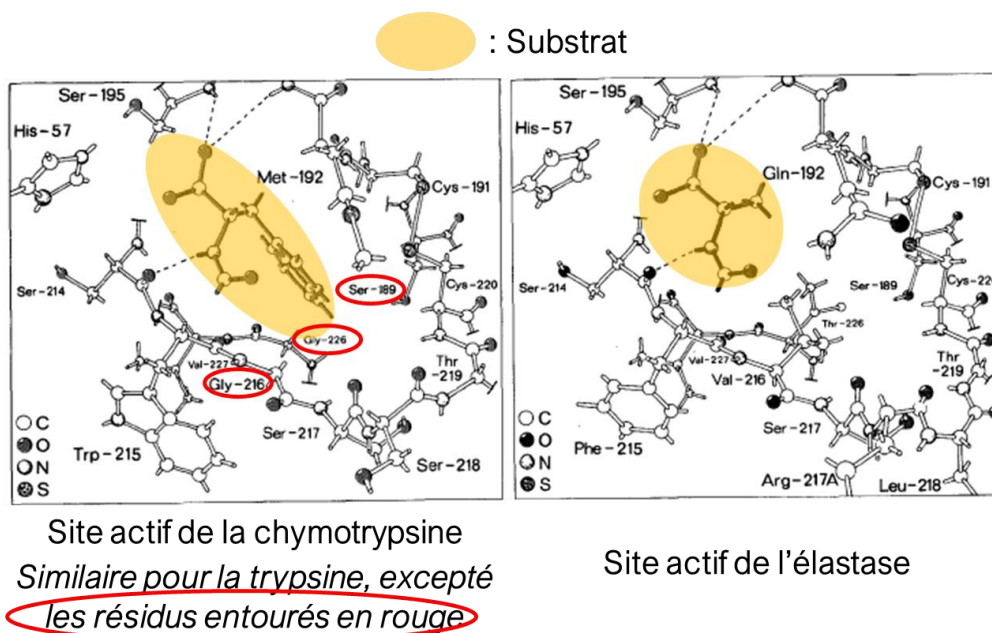
#### 1.3.1.3.2 Les protéases à sérine

Il existe plusieurs protéases à sérines chez les mammifères. Elles ont une structure tertiaire et des fonctions communes. Elles s'appellent ainsi parce que leur site actif est composé d'un résidu de sérine essentiel à l'activité catalytique. La plupart des enzymes pancréatiques sont des protéases à sérine (trypsine, chymotrypsines et élastases) et suivent une cinétique similaire, catalysant l'hydrolyse des peptides et des substrats estérifiés synthétiques. Leur pic d'activité maximum se situe aux alentours d'un pH de 7,8 et chute à pH acide. Pour ces trois enzymes, la réaction forme une acyl-enzyme par estérification de l'hydroxyl du résidu de sérine avec le groupe carboxyl du substrat. La différence majeure entre les trois enzymes est leur spécificité (Figure 24) : i) la trypsine est spécifique pour les peptides et les esters de la lysine et l'arginine, ii) la chymotrypsine est spécifique pour les radicaux hydrophobes larges tels que ceux possédés par la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane et enfin iii) l'élastase pour les radicaux hydrophobes plus petits, comme celui de l'alanine.

Les squelettes de ces trois enzymes sont pratiquement superposables, à l'exception de quelques délétions ou additions observées sur les chaînes. La différence de spécificité provient principalement du site de fixation des radicaux des AA du peptide. La poche de la trypsine est identique à celle de la chymotrypsine, excepté trois AA qui changent : un Asp-189 à la place de la Ser-189, dont le radical carboxylate, chargé négativement, forme une liaison ionique/H (Salt linkage) avec l'ammonium/guanidinium chargé positivement sur les radicaux des lysines ou arginines terminaux.



**Figure 24 :** Les protéases libres dans la lumière intestinale (Floc'h and Seve, 2000).



**Figure 25 :** Sites actifs de la chymotrypsine et de l'élastase (Fersht, 1999).

**Tableau 12 :** Les protéases membranaires dans le petit intestin (Floc'h and Seve, 2000).

Protéase	AA ciblé	Position (AA N <sub>ter</sub> étant le dernier)
Aminopeptidase N	AA neutres	Terminal, Après
Aminopeptidase A	AA anioniques	Terminal, Après
Aminopeptidase P	Pro	Avant-dernier, Avant
Dipeptidylpeptidase IV	Pro, Ala	Avant-dernier, Après
Angiotensinase	Non spécifique	Donne 1 Tri- et 1 Di-
Nepylisine	AA hydrophobes	Avant-dernier, Après
G-Glutamyltransférase	G-Glu	Dernier, Après
Carboxylase P	Pro	4 <sup>ème</sup> à partir de N <sub>ter</sub> , Après

Les deux glycines (Gly-216 et Gly-226) dans la bouche de la poche (mouth of the pocket) de la chymotrypsine sont remplacées par la valine (Val- 216) et la thréonine (Thr – 226) ; qui empêchent l'entrée de larges radicaux dans le site, privilégiant les radicaux courts, comme ceux de l'alanine (Figure 25).

Malgré la similitude de la structure primaire, seulement 50 % des séquences de l'élastase et de la chymotrypsine sont composés d'AA qui sont identiques ou semblables à la trypsine. Soixante pourcents à l'intérieur du site actif sont identiques, contre 10 % seulement à la surface de l'enzyme. La principale différence réside dans la surface extérieure et la quantité de boucles exposées. La spécificité résulte du changement dans trois boucles qui forment l'axe du site de liaison (binding pocket). Le site actif de la chymotrypsine a une triade catalytique composée des acides aminés Asp-102, His- 57 et Ser- 195, retrouvée chez toutes les protéases à sérine.

Les peptidases sont sécrétées par le pancréas et au niveau des entérocytes. Cependant, il a été observé au niveau du jéjunum une grande quantité et diversité d'enzymes sur les membranes des entérocytes et dans leur cytosol (Tableau 12). Ces dernières ont un impact non négligeable sur l'hydrolyse des protéines (Picariello *et al.*, 2015). Par ailleurs, la présence de proline dans une protéine rend difficile l'action des enzymes, car la présence de cet AA induit la formation d'un coude qui verrouille l'accès des enzymes à leur zone d'action.

#### 1.3.1.3.3 Sécrétions pancréatiques

Les cellules ductales du pancréas sécrètent 98 % de la sécrétion hydroélectrolytique du pancréas chez l'homme. Ces sécrétions représentent quotidiennement environ 1 litre par jour de  $\text{Na}^+$  150 mM et de  $\text{HCO}_3^-$  100 mM pour neutraliser le mélange qui sort de l'estomac et dont le pH est aux alentours de 3-4. Les cellules acineuses sécrètent beaucoup moins de liquide, qui se compose de 2 % du total de NaCl et d'enzymes (lipase, amylase et protéases) dont le rôle est primordial dans la digestion par rapport aux enzymes des phases précédentes (phases orale et gastrique).

La sécrétion basale représente 2-3 % de l'eau et des électrolytes et 10-15 % des enzymes, par rapport aux niveaux de sécrétion atteints lors de la digestion. La composition enzymatique des sécrétions pancréatiques est résumée dans le Tableau 13.

La sécrétion pancréatique est stimulée à différents niveaux :

- Lors de la phase céphalique ou orale. L'odeur, le goût, la mastication, l'hypoglycémie induisent une sécrétion d'acétyl-choline (ACh) via le nerf Vague qui stimule 20 % de la sécrétion pancréatique (par rapport à la réponse à un repas) par les cellules acineuses et ductales.

**Tableau 13 :** Enzymes pancréatiques (Floc'h and Seve, 2000).

Enzyme	Proenzyme	Activateur	Substrat digestif	Produit de la digestion
Amylase			Amidon	Maltose + Glucose + Dextrine (4, 5 ou 6 molécules de glucose)
Lipase		Trypsine	Triglycérides	Glycérol + AG + MG
Colipase	Procolipase	Trypsine	Protège la lipase	
Lécithinase A ou B (Phospholipase)	Prolecithinase A ou B (Prophospholipase)		Lécithine	Lysolécithine
Trypsine	Trypsinogène	Entérokinase intestinale	Protéines	Polypeptides
Chymotrypsine	Chymotrypsinogène	Trypsine	Protéines	Polypeptides
Collagénase			Collagène	Polypeptides
Carboxylase A ou B	Procarboxylase A et B	Trypsine		Di- ou Tripeptides + AA
Elastase	Proélastase	Trypsine	Protéines	Polypeptides
Ribonucléase			ARN	Nucléotides
Désoxyribonucléase			ADN	Nucléotides

**Tableau 14 :** Composition des acides biliaires.

<i>Acides biliaires</i>	Type	Teneur relative
<i>Acide cholique</i>	Acide biliaire primaire	50 %
<i>Acide chénodéoxycholique</i>		
<i>Acide déoxycholique</i>	Acide biliaire secondaire (Transformé par la flore intestinale)	
<i>Acide lithocholique</i>		
<i>Glycine (pKa = 3,7)</i>	Sels biliaires (se complexent aux Acides biliaires II <sup>aire</sup> )	4 %
<i>Taurine (pKa = 1,5)</i>		
<i>Cholestérol</i>		4 %
<i>Lécithine</i>		30 – 40 %

- Lors de la phase gastrique. La distension gastrique entraîne un réflexe vago-vagal (via l'ACh) qui provoque 5 à 10 % de la réponse à un repas en termes de sécrétion pancréatique.
- Lors de la phase intestinale. La cholécystokinine (CCK) (cellules I stimulées par AA et AG) stimule les cellules acineuses. La sécrétine (cellules S stimulées par pH acide) stimule les cellules ductales potentialisées par la CCK.

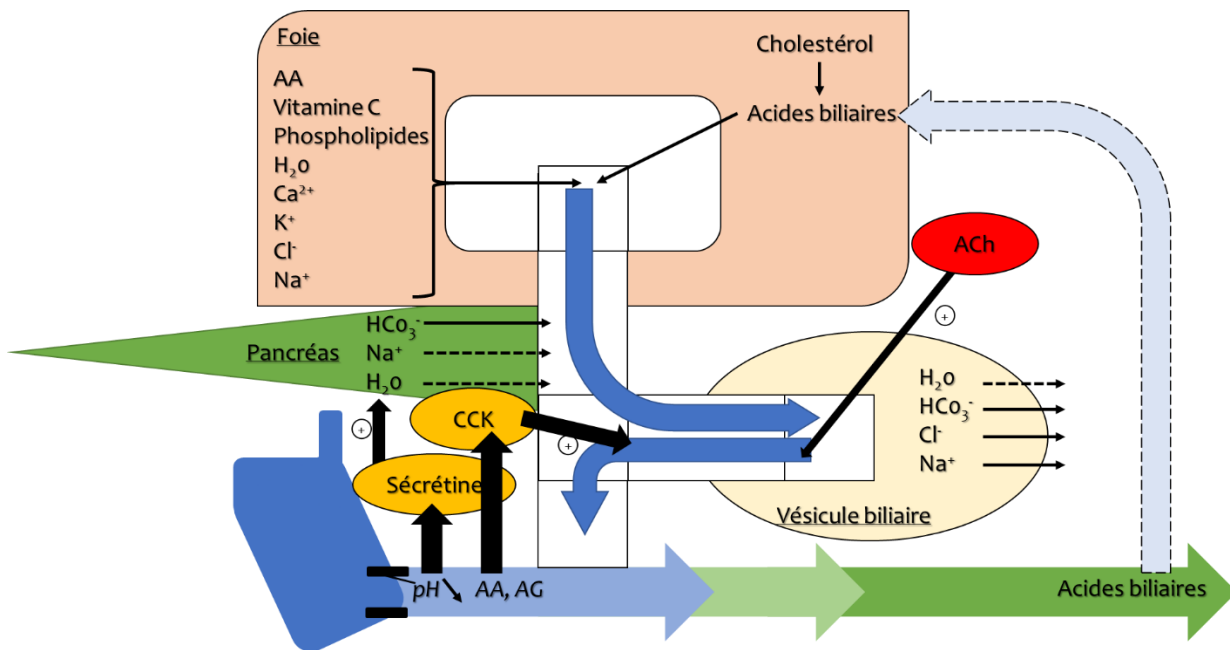
L'action des différentes hormones sera détaillée dans la partie 1.3.2 et les effets sur les sécrétions endogènes gastro-intestinales sont résumés dans le Tableau 15.

#### 1.3.1.3.4 Sécrétions biliaires

Les sécrétions biliaires quant à elles sont formées au niveau du foie pour atteindre un volume entre 20 et 60 ml chez l'Homme par jour. Cette solution est ensuite stockée dans la vésicule biliaire (qui n'existe pas chez le rat mais bien chez la souris et le porc) où elle se concentre en phase interprandiale (Figure 26). La vésicule se vide environ en 30 min après l'ingestion du repas, suite à l'action de la CCK, puis la bile continue à être sécrétée directement du foie à de plus faibles concentrations. La majorité de la bile sécrétée est réabsorbée au niveau de l'iléon. Chez l'Homme, 15 à 30 grammes d'acides biliaires sont sécrétés par jour, pour un pool corporel de 2,5 grammes. La composition des acides biliaires est donnée dans le Tableau 14. Les pertes fécales (équivalentes à la synthèse *de novo*) sont de 600 mg par jour.

Le calcium ionique est un cofacteur important des enzymes digestives et il a été montré qu'il influence la digestion des protéines. En effet, Pedersen & Eggum ont montré que l'addition de 5 – 8 mg de  $Ca^{2+}$  à un digestat *in vitro* (10 mg<sub>N</sub> de protéines alimentaires, 1,61 mg trypsine, 3,96 mg chymotrypsine et 2,36 mg peptidase), provoquait une augmentation de la digestibilité réelle *in vitro* de 3 – 6 %. Les auteurs ont montré que cette augmentation variait suivant la quantité de calcium ionique ajouté et la protéine alimentaire considérée (Pedersen and Eggum, 1983). Le calcium stimule l'activité de la pancréatine par sa capacité à faire précipiter les acides gras libres surfaciques en formant des savons calciques avec des acides gras à longue chaîne (Zangenberg *et al.*, 2001). La concentration en calcium à un instant t de la digestion dépend principalement de la teneur en calcium du bol alimentaire (Fordtran *et al.*, 1966; Miansbach, Cohen and Leff, 1975; Sheikh *et al.*, 1988) car les sécrétions basales sont considérées comme négligeables (Sheikh *et al.*, 1988). Cependant les acides biliaires, le mucus, les protéines complexées par le calcium, l'oxalate ou phytine (phytates) influencent également la teneur en calcium (Hofmann and Mysels, 1992). Le calcium ionique stabilise la trypsine et la chymotrypsine, retarde l'autolyse et augmente l'activité.

Le schéma en Figure 26 récapitule la dynamique des sécrétions bilio-pancréatiques.



**Figure 26 :** La nature des sécrétions bilio-pancréatiques postprandiales et les mécanismes généraux de régulation.

#### 1.3.1.4 Phase colique

Les fragments protéiques résistants à la digestion en amont, ainsi que les AA libres et peptides modifiés qui ne peuvent pas être absorbés, entrent dans le côlon, où ils sont utilisés par le microbiote résidant. Bien que la plus grosse partie de ces composés azotés est transformée en biomasse microbienne, leur dégradation peut également mener à la formation de produits de dégradation toxiques tels que les amines biogènes, l'ammoniac, le crésol et l'indole (Russell *et al.*, 2013) ou encore les composés issus de la dégradation des produits de la réaction de Maillard (Tuohy *et al.*, 2006). Cependant, les AA libres modifiés issus de cette dégradation par le microbiote colique ne seraient pas forcément tous néfastes pour l'organisme, et pourrait s'apparenter à une adaptation évolutive aux aliments cuits depuis plusieurs milliers d'années (Hellwig and Henle, 2014). Un autre exemple est celui de l'oxydation des protéines qui induit un accroissement du nombre d'espèce sulfurées réactives, qui *in fine* permettrait une production plus grande de H<sub>2</sub>S, une molécule « signal » qui serait bénéfique pour les fonctions neuronales et cardiovasculaires (Kabil, Vitvitsky and Banerjee, 2014).

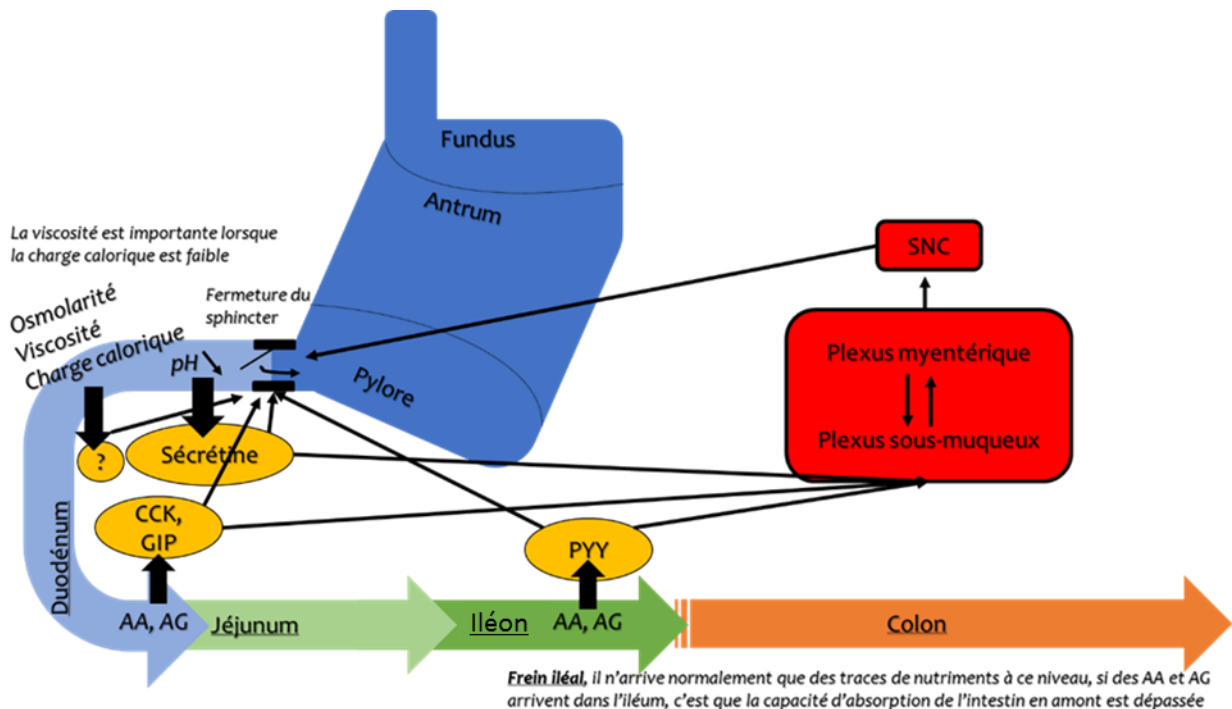
#### 1.3.2 Régulations neuro-hormonales et biomécanique du processus digestif

L'hydrolyse et le transit au sein de la lumière intestinale ne sont pas seulement expliqués par des phénomènes physiques et enzymatiques. Des systèmes de régulations via le système central existent et gouvernent le processus de digestion (vitesses de transit, temps de résidences, quantités de

sécrétions endogènes) modifiant ainsi les cinétiques d'absorption et/ou in fine la digestibilité. Ces mécanismes sont présentés ci-dessous.

Une grande diversité d'hormones sont sécrétées au niveau du système digestif sous l'action de stimuli relatifs au repas. Ces hormones jouent le rôle de médiateur entre le bol alimentaire et le système nerveux central (via le nerf Vague). Le processus digestif s'adapte aux caractéristiques du repas selon des variables d'ajustement, notamment la prise alimentaire et la vidange gastrique (Tableau 15). Globalement, les hormones sécrétées en amont du tractus gastro-intestinal et au début de la digestion stimulent l'appétit et la mobilité du bol alimentaire. Au contraire, une fois que la digestion est en cours, des systèmes de rétrocontrôle se mettent en place via des hormones sécrétées au niveau de la partie distale de l'intestin grêle et qui vont avoir comme action de ralentir le mouvement du chyme. Le frein iléal, médié principalement par GLP-1 et PYY dans le cas de la digestion des protéines est une régulation puissante qui impacte grandement les cinétiques de transit et de digestion des protéines alimentaires. Elle est mise en place suite à l'afflux de nutriments non digérés au niveau de l'iléon, indiquant que la digestion « s'est laissée dépasser » (Citters and Lin, 2011). La Figure 27 résume la dynamique qui s'opère entre le système neuro-hormonal et digestif.

**Figure 27 :** Synthèse des effets de rétrocontrôle biomécanique sur la digestion des protéines alimentaires.



**Tableau 15 :** Caractéristiques des hormones gastro-intestinales et leur action sur les fonctions digestives, notamment la vidange gastrique (adapté de Coate, Kliewer and Mangelsdorf, 2014; Yau, 2014 ; Janssen and Depoortere, 2013).

	Hormone	Site de production	Stimulus positif	Effets		
				Appétit / Prise alimentaire	Vidange gastrique	Sécrétions / autres
Estomac	Gastrine	Antrum (cellules G)	Ingestion (via les protéines) (AAA → CaR ; AA basiques → GPRC6A ; peptides → GPR92)	Pas d'effet connu	Inhibe	Stimule les sécrétions gastriques et la prolifération des cellules épithéliales, participe à l'homéostasie du fer
	Ghréline (acylée)	Fundus et petit intestin (cellules X/A-like)	Jeûne, avant la prise alimentaire	(Oréxigénique) Initie la prise alimentaire. Stimule l'appétit.	Stimule	Stimule les sécrétions gastriques et les complexes moteur, protège contre le stress gastrique et stimule la libération d'hormones de croissance
	Leptine		Ingestion, nerf Vague, CCK, sécrétine	(Anoréxigénique)		Stimule la sécrétion de CCK et GLP-1, module l'absorption intestinale des nutriments
Intestin grêle proximal	Sécrétine	Duodénum (cellules S)	Acidité de l'estomac, lipides et protéines dégradés	Pas d'effet connu	Inhibe	Stimule les sécrétions bilio-pancréatiques, inhibe les contractions et les sécrétions acides gastriques ; participe à la régulation osmotique
	Somatostatine	Pancréas et petit intestin (cellules D)	Nutriments, acide, CCK, gastrine, stimulation adrénergique (AAA → CaR ; AA basiques → GPRC6A ; peptides → GPR92)	Pas d'effet connu	Inhibe	Inhibe les sécrétions gastriques acides et endo/exocrines pancréatiques
	Gastric Inhibitory Peptide (GIP)	Duodénum et jéjunum proximal (cellules K)	Ingestion (via les glucides et lipides)	Pas d'effet connu	Equivoque (stimule ou sans effet)	Incrétine, <i>i.e.</i> potentialise la sécrétion d'insuline glucose-dépendante
	Cholecystokinine (CCK)	Duodénum et jéjunum proximal (cellules I)	Ingestion (via les protéines et lipides) (AAA → CaR)	Réduit la prise énergétique et stimule la satiété	Inhibe	Inhibe les sécrétions gastriques, stimule la contraction de la vésicule biliaire et les sécrétions pancréatiques enzymatiques



	Hormone	Site de production	Stimulus positif	Effets		
				Appétit / Prise alimentaire	Vidange gastrique	Sécrétions / autres
	Motiline	Duodénum et jéjunum (cellules M)	Phase interprandiale		Stimule	Induit les contractions de phase III du complexe migratoire moteur
	Amyline	Ilots de Langerhans (cellules $\beta$ )		Stimule la satiété	Inhibe	
<i>Intestin grêle distal</i>	Peptide YY (PYY)	Petit intestin distal (cellules L)	Ingestion (via les lipides)	Réduit la prise énergétique et stimule la satiété	Inhibe fortement (frein iléal)	Inhibe les sécrétions gastriques, arrête le péristaltisme intestinal et les sécrétions d'électrolytes, inhibe les sécrétions pancréatiques
	Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1)	Petit intestin distal (cellules L)	Ingestion (via les glucides et lipides), action des acides biliaires sur TGR5 (GPCR)	Réduit la prise énergétique et stimule la satiété	Inhibe fortement (frein iléal)	Incrétine Inhibe les sécrétions gastro-intestinales, inhibe la sécrétion de glucagon
	Glucagon Like Peptide-2 (GLP-2)	Petit intestin distal (cellules L)	Cosécritée avec GLP-1			Inhibe les sécrétions gastriques acides, promeut l'absorption des nutriments et la circulation sanguine, stimule la croissance cellulaire de la muqueuse intestinale et protège contre l'apoptose
	Oxyntomoduline (OXM)	Petit intestin distal (cellules L)	Ingestion (via les lipides)	Réduit la prise énergétique et stimule la satiété	Inhibe	Inhibe les sécrétions gastriques acide et pancréatique exocrine. Potentialise la sécrétion d'insuline glucose-dépendante
	Facteurs de croissance FGF19 (Homme) / FGF15 (Rongeurs)	Entérocytes iléaux	Acides biliaires sur FXR (récepteur nucléaire)			Arrête la synthèse d'acides biliaires et la gluconéogénèse, stimule la synthèse protéique et la glycogénèse.

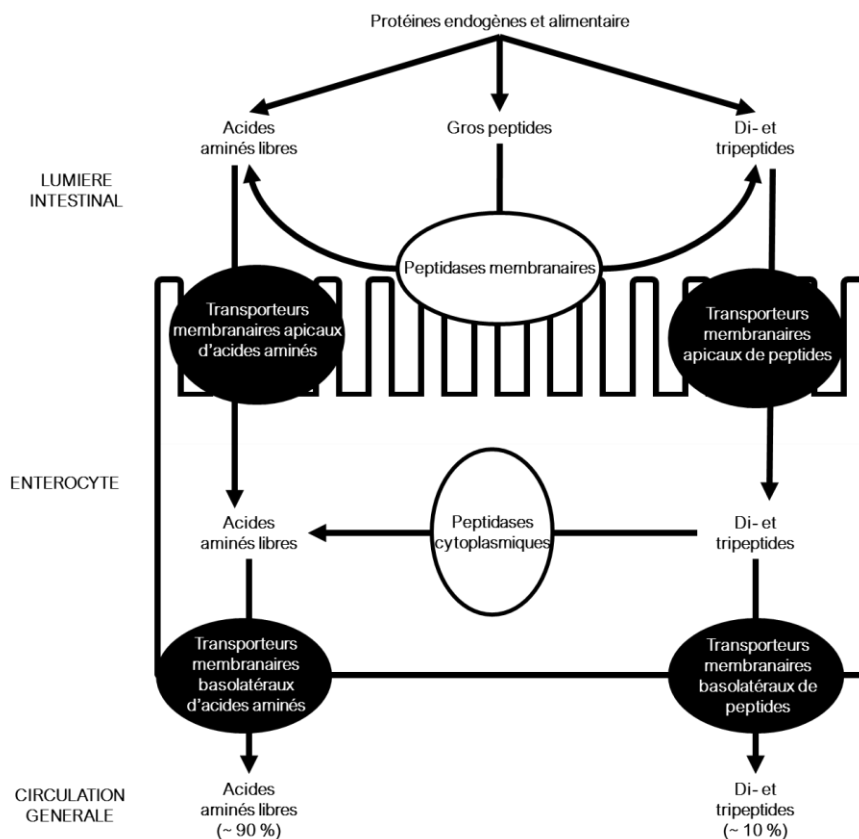
AAA : acides aminés aromatiques

### 1.3.3 Devenir des produits de dégradation protéique : l'absorption

Après avoir vu les facteurs de variation de la digestion dans la lumière gastro-intestinale, nous pouvons nous intéresser au devenir des AA alimentaires une fois qu'ils se retrouvent dans la circulation générale et qu'ils sont amenés aux tissus cibles. L'utilisation de ces AA alimentaires est dépendante de l'équilibre en AA essentiels du repas. Cet équilibre est alors une source de variation de la biodisponibilité de ces protéines.

De manière générale, l'absorption se définit comme le transport du composé d'intérêt de la lumière digestive vers le milieu lymphatique ou sanguin, via la paroi digestive. Il existe quatre voies d'absorption des nutriments du tractus digestif : la diffusion paracellulaire, la diffusion transcellulaire passive, la transcytose et la diffusion active via des transporteurs. Pour les protéines, seuls les AA libres, di- et tripeptides, issus de la dégradation des protéines dans la lumière digestive, sont transférés de manière active dans les entérocytes via des transporteurs (Figure 28).

Les transporteurs, autant du côté apical que du côté basolatéral des entérocytes présentent une grande diversité au niveau mécanistique aussi bien qu'au niveau de leur spécificité. En effet, la plupart ne peuvent transporter qu'une classe d'AA, sélectionnés suivant leurs propriétés physico-chimiques, comme le montre le Tableau 16.



**Figure 28** : Schéma de l'absorption des protéines par les entérocytes (adapté de Ganapathy, 2012).

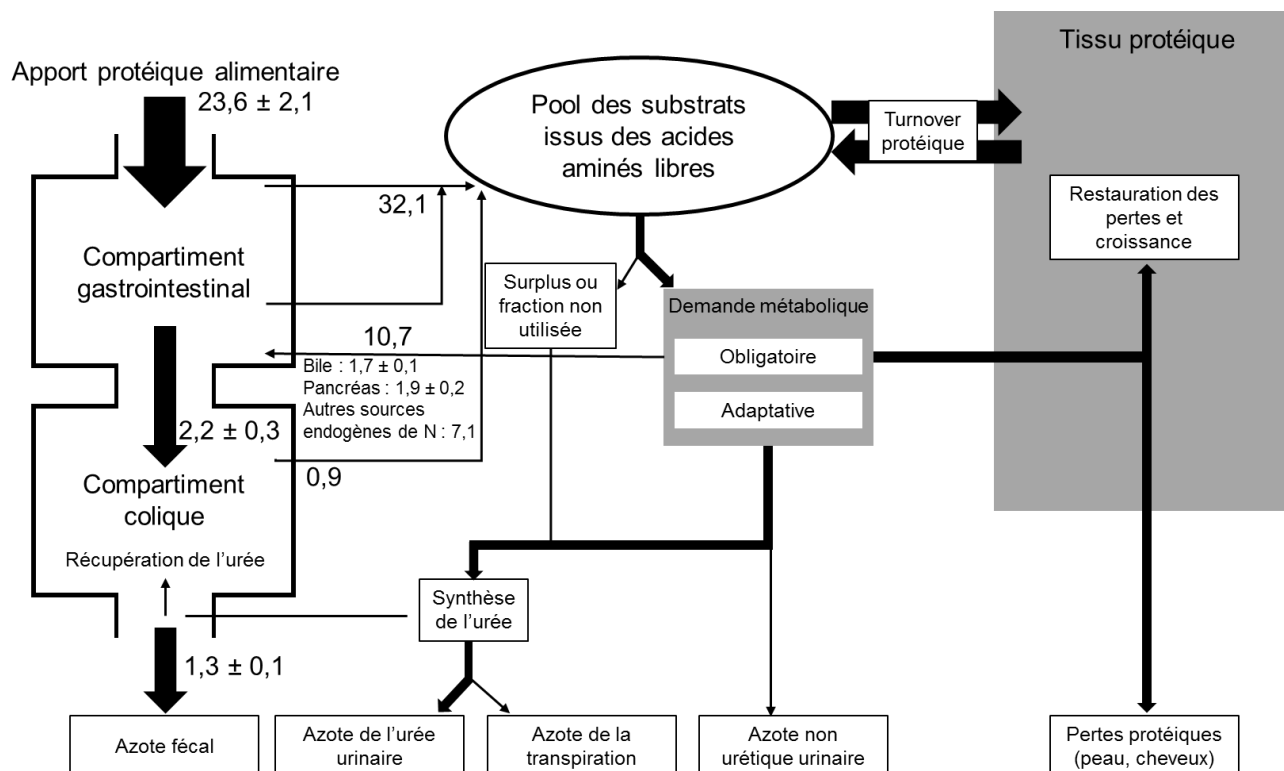
**Tableau 16 :** Diversité et spécificités des transporteurs d'acides aminés libres, di- et tripeptides sur les membranes des entérocytes chez l'Homme (tiré de Jochems *et al.*, 2018).

Côté de la membrane de l'entérocyte	Nom du transporteur	Système de transport	Mécanisme	Dépendance aux ions	Formation de dimère	Substrat
<b>Transporteurs des di- and tripeptide</b>						
Apical	PEPT1		Symport	H <sup>+</sup>		Di- and tripeptide
	PHT2		Symport	H <sup>+</sup>		Histidine, di- and tripeptide
	PHT1		Symport	H <sup>+</sup>		Histidine, di- and tripeptide
	HPT-1		Symport	H <sup>+</sup>		Di- and tripeptide
Basolatéral	Transporteur basolatéral inconnu de peptides		Uniport			Di- and tripeptide
<b>Transporteurs des acides aminés libres</b>						
Apical	EAAT3 / EAAC1	X <sub>AG</sub> <sup>-</sup>	Antiport	AA + 3Na <sup>+</sup> + H <sup>+</sup> ↔ K <sup>+</sup>		Asp et Glu
	ASCT2 / AAAT	ASC	Antiport	AA + Na <sup>+</sup> ↔ AA + Na <sup>+</sup>		Ala, Asn, Cys, Gln, Ser et Thr
	b <sup>0,+</sup> AT	b <sup>0,+</sup>	Antiport	CAA/Cys ↔ NAA	rBAT	CAA et Cys
	TauT	β	Symport	Cl <sup>-</sup> et 2Na <sup>+</sup>		β-alanine et taurine
	ATB <sup>0,+</sup>	B <sup>0,+</sup>	Symport	2Cl <sup>-</sup> et Na <sup>+</sup>		CAA et NAA
	B <sup>0</sup> AT1 / HND	B <sup>0</sup>	Symport	Na <sup>+</sup>		NAA
	SIT1	IMINO	Symport	Cl <sup>-</sup> et 2Na <sup>+</sup>		Pro
	PAT1 / LYAAT1	PAT	Symport	H <sup>+</sup>		β-alanine, Gly et Pro
	SN1/SNAT3	N	Antiport	AA + Na <sup>+</sup> ↔ H <sup>+</sup>		Ala, Asn, Gln et His
	SN2/SNAT5	N	Antiport	AA + Na <sup>+</sup> ↔ H <sup>+</sup>		Asn, Gln, His et Ser
Basolatéral	GlyT1	Gly	Symport	Cl <sup>-</sup> et 2Na <sup>+</sup>		Gly
	CAT1	γ <sup>+</sup>	Uniport			Arg, His et Lys
	γ <sup>+</sup> LAT2	γ <sup>+</sup> L	Antiport	CAA ↔ NAA + Na <sup>+</sup>	4F2hc	CAA
	γ <sup>+</sup> LAT1	γ <sup>+</sup> L	Antiport	CAA ↔ NAA + Na <sup>+</sup>	4F2hc	CAA
	LAT2	L	Antiport	NAA ↔ NAA	4F2hc	NAA
	asc-1	Acs	Antiport	NAA ↔ NAA	4F2hc	Petits NAA
	xCT	X <sub>C</sub>	Antiport	Cys ↔ Glu	4F2hc	Cys
	SNAT2	A	Symport	Na <sup>+</sup>		NAA et imino

NAA : acides aminés primaires neutres (Ala, Asn, Cys, Gln, Ser et Thr) et CAA : acides aminés cationiques

Toutefois, comme expliqué plus haut, il se peut que des composés issus des protéines alimentaires ne soient pas suffisamment hydrolysés et passent l'iléon sans avoir été absorbés par ces transporteurs. Cette fraction protéique non assimilée est alors considérée comme perdue, nous verrons plus amplement les facteurs influençant ces pertes dans la partie 1.7.

Au final, il est possible de représenter les flux d'azote globaux au sein de l'organisme de l'Homme ou du Porc par un processus d'échanges entre différents compartiments (Figure 29).



**Figure 29 :** Principaux flux azotés (FAO, WHO and UNU, 2007). Les valeurs en grammes d'azote par jour sont obtenues chez le porc en croissance ; celles présentées en moyennes  $\pm$  écart-type sont mesurées et les valeurs seules sont estimées (Souffrant, 1991).

### 1.3.4 Notions de biodisponibilité et bioaccessibilité

La définition globale de la biodisponibilité d'un composé est la fraction de ce composé disponible pour une utilisation et le stockage pour l'organisme, dans des conditions physiologiques normales (Parada and Aguilera, 2007). Un autre concept associé à la biodisponibilité est la bioaccessibilité, qui est la fraction libérée de la matrice alimentaire, qui devient donc disponible pour l'absorption intestinale, mais aussi pour l'absorption colique (Parada and Aguilera, 2007).

En se focalisant plus spécifiquement sur les AA, leur bioaccessibilité est conditionnée par l'hydrolyse des composés protéiques présents dans la lumière intestinale. En effet, la fraction considérée comme bioaccessible est le pool des AA libres, di- et tripeptides, qui sont les seules formes de l'azote protéique pouvant être absorbées par l'organisme via les entérocytes. En théorie, la quantité des AA biodisponibles est inférieure ou égale à la quantité d'AA bioaccessibles car une fraction résiduelle de AA bioaccessible peut ne pas être absorbée. Il l'a été montré que 35,1 % des protéines de l'œuf ne sont pas digestibles si l'œuf est cru, ces protéines et AA ne sont donc pas considérés comme bioaccessibles (Evenepoel *et al.*, 1999). Cela pourrait être le cas notamment pour un repas avec une charge protéique importante.

Il est possible de discerner la biodisponibilité globale et la biodisponibilité périphérique. En effet, les AA peuvent également être séquestrés par l'intestin grêle lors de l'absorption, soit pour des besoins énergétiques, soit pour assurer le métabolisme protéinogène ou non protéinogène (Wu, 1980). Le métabolisme hépatique est aussi à prendre en compte pour comptabiliser la quantité d'AA réellement biodisponible pour les organes périphériques (Reeds and Burrin, 2000). Enfin, les AA absorbés peuvent également être oxydés car en surplus par rapport à la teneur en l'AA limitant, concept sur lequel nous reviendrons dans la partie suivante.

#### **1.4 Détermination de la qualité nutritionnelle d'une protéine**

##### **1.4.1 La teneur en acides aminés indispensables et les recommandations nutritionnelles**

Les vingt AA sont essentiels au bon fonctionnement du métabolisme, mais seuls certains ne peuvent pas être synthétisés *de novo* et doivent obligatoirement être apportés par l'alimentation pour les animaux, ces AA sont qualifiés d'indispensables (AAI, Acides Aminés Indispensables) (Wu, 2009). Leur nature varie d'une espèce à l'autre, par exemple chez la Poule, 12 AA sont indispensables, mais chez l'Homme, seulement neuf sont indispensables : l'histidine, l'isoleucine, la leucine, la lysine, la méthionine, la phénylalanine, la thréonine, le tryptophane et la valine. L'arginine est considérée comme indispensable pour le nourrisson et qualifiée de semi-indispensable. Tous les autres AA essentiels peuvent être synthétisés dans l'organisme à partir de ces huit AA (AFSSA, 2007).

Un phénomène se produit lors de l'assimilation des AA par les cellules : les AA en surplus par rapport à ce qui est nécessaire à la synthèse protéique sont oxydés et donc perdus, ils ne peuvent pas être stockés. A partir de ce constat, des besoins en chacun de ces AA ont été mesurés. Cela a permis d'établir un profil protéique de référence qui couvre les besoins en chacun de ces AA. Cet aminogramme de référence constitue la « protéine idéale ».

L'apport recommandé en AA d'un groupe d'âge en particulier (en mg par g de protéine) est calculé en divisant les besoins en AA recommandés des enfants âgés de 2 à 5 ans (exprimés en mg par kg de masse par jour) par le besoin protéique recommandé du groupe d'âge considéré (exprimé en g de protéine par kg de masse par jour) (FAO and WHO, 1991). Les profils de référence en fonction du stade physiologique sont présentés dans le Tableau 17. Comme la cystéine peut être métabolisée en méthionine, la recommandation concerne la teneur globale en méthionine et cystéine (SAA dans le tableau). Le même phénomène se produit entre les AA aromatiques (AAA) : la tyrosine et la phénylalanine.

**Tableau 17** : Profils d'AAI recommandés des protéines pour le bébé, l'enfant de 6 mois à 3 ans, l'enfant âgé, l'adolescent et l'adulte (FAO, 2013), pour l'enfant d'âge préscolaire (de 2 à 5 ans) (FAO, WHO and UNU, 2007) (SAA : acides aminés soufrés, AAA : acides aminés aromatiques).

Groupes d'âge	Profils en AAI recommandés (mg.g <sup>protéines</sup> <sup>-1</sup> )								
	His	Ile	Leu	Lys	SAA	AAA	Thr	Trp	Val
Bébé (0 - 6 mois)	21	55	96	69	33	94	44	17	55
Enfant (6 mois - 3 ans)	20	32	66	57	27	52	31	8,5	43
Enfant âgé, adolescent, adulte	16	30	61	48	23	41	25	6,6	40
Enfant d'âge préscolaire (2 - 5 ans)	19	28	66	58	25	63	34	11	35

Le profil des apports en AAI est une notion importante en nutrition mais elle doit être associée à celle de la digestibilité des protéines.

#### 1.4.2 Définition de la digestibilité

La notion de digestibilité d'un composé alimentaire se définit comme étant la part de ce composé prélevé de la lumière digestive par l'organisme. Une méthode pour estimer la digestibilité est de quantifier la fraction non absorbée à la fin de l'intestin grêle (digestibilité iléale), ou présente dans les fécès (digestibilité totale). La Figure 30 résume les différentes digestibilités calculables (Digestibilité Apparente DA, Digestibilité Standard (ou vraie) DS et Digestibilité Réelle DR), selon l'endroit du tractus digestif (indiqué k sur la Figure 30) où est réalisé le bilan sur le composé considéré (protéines totales ou AA spécifique – indiqué x sur la Figure 30), et selon si les pertes endogènes basales ou bien totales sont prises en compte. La différenciation de la partie protéique endogène par rapport à celle alimentaire joue grandement sur les bilans. En effet, les sécrétions endogènes protéiques, qui ne sont pas forcément réabsorbées et donc appelées pertes endogènes protéiques ou azotées, sont importantes dans le tractus digestif, comme nous l'avons vu en Figure 29. Nous reviendrons sur les

différents types de pertes endogènes, leurs causes et leurs conséquences sur les paramètres de digestibilité mesurés plus loin dans la partie 1.7.

Ces pertes azotées endogènes peuvent être mesurées par différentes méthodes dont les principes sont identiques d'un modèle à l'autre. L'estimation des pertes basales est effectuée en donnant un repas protéoprivé (sans protéine) à l'individu, habituellement composé d'un cocktail d'AA libres, considérés comme absorbés en totalité par les entérocytes intestinaux. La matière azotée alors recueillie au niveau iléal ou fécal, uniquement d'origine endogène, peut être quantifiée et constitue les pertes endogènes basales. Concernant les pertes endogènes spécifiques liées au repas ingéré, pour pouvoir les différencier des protéines alimentaires résiduelles, il est alors nécessaire de marquer les protéines de l'individu ou du repas (marquage uniforme de l'azote des AA, ou marquage d'un AA en particulier). Nous nous attarderons sur les techniques d'estimation de ces pertes, qui sont spécifiques aux modèles utilisés, dans la sous-partie 1.5.1.5 dédiée aux modèles animaux.

En pratique, la différence entre les digestibilités iléale et fécale réside dans le fait que le bilan azoté au niveau fécal implique d'estimer en plus la prise en compte des protéines microbiennes qui deviennent majoritaires dans le côlon, ce qui est une source de variabilité supplémentaire. Des comparatifs ont été réalisés chez le Porc entre les digestibilités iléales apparentes et fécales des AAI, dont certaines données sont reportées dans le Tableau 18.

Concernant la différence entre digestibilités iléales apparentes et réelles, elle provient de la non prise en compte de l'azote endogène résiduel dans le cas de la digestibilité apparente. Il a notamment été observé chez le Rat que l'augmentation de la teneur protéique du repas induisait une augmentation de la digestibilité iléale apparente, qui tend à égaler la digestibilité iléale réelle, cette dernière restant constante quelle que soit la quantité de protéines ingérées (Donkoh and Moughan, 1994).

Afin de définir la qualité nutritionnelle des protéines, il est donc nécessaire de prendre en compte les deux notions définies précédemment, à savoir l'équilibre en acides aminés indispensables (AAI) d'une part et de la digestibilité d'autre part. Comme nous le verrons dans la partie 1.7, la bonne assimilation d'une protéine alimentaire dépend de nombreux facteurs. Il est possible de faire la synthèse de tous les effets qui s'opèrent le long du système oro-gastro-intestinal grâce à des bilans de matière azotée et/ou des AA entre ce qui est absorbé et ce qu'il reste dans la lumière intestinale. Ces relevés sont effectués à l'endroit où l'on suppose que l'absorption des produits issus de la dégradation protéique ne peut plus s'effectuer, c'est-à-dire au niveau de l'iléon terminal. La valeur déduite de ce bilan se nomme digestibilité. Pour une utilisation efficace des protéines alimentaires, leur composition en AAI au sein d'un repas, est à prendre en compte. En effet, au niveau des tissus, l'intégration des AA au métabolisme se réalise à hauteur de l'AAI présent en plus faible quantité dans

le repas. Les AA alimentaires en surplus sont alors oxydés. En intégrant ces deux notions, nous pouvons alors parler de qualité nutritionnelle d'une protéine ou des protéines d'un repas.

Type de digestibilité	Abb.	Formule
Digestibilité apparente	$D_kA$	$(X_{\text{ingéré}} - X_k) / X_{\text{ingéré}}$
Digestibilité vraie ou standard	$D_kS$	$(X_{\text{ingéré}} - (X_k - X_{\text{endogène basal}})) / X_{\text{ingéré}}$
Digestibilité réelle	$D_kR$	$(X_{\text{ingéré}} - (X_k - X_{\text{endogène total}})) / X_{\text{ingéré}}$

Avec,  $X_{\text{endogène total}} = X_{\text{endogène basal}} + X_{\text{endogène spécifique}}$

$X$  : N ou AA

$k$  : iléal ou fécal

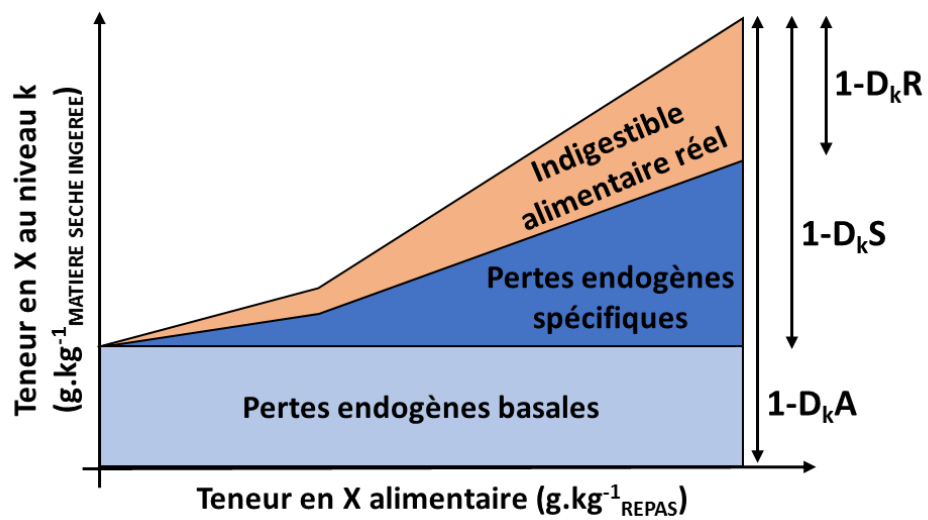


Figure 30: Schéma résumant les différentes digestibilités calculables.



**Tableau 18 :** Digestibilités iléales apparentes et fécales d’AA après prise de différents repas par des porcs en croissance (tiré de Moughan *et al.*, 2012) (I : digestibilité iléale apparente ; F : digestibilité fécale ; Δ : différence entre les digestibilités fécale et iléale).

Repas	Repas de céréales			Farine de blé			Coproducts de blé			Farine de soja			Farine de soja autoclavée		
Référence	(Sauer and Just, 1979)			(Sauer, Stothers and Parker, 1977)						(Li, Sauer and Caine, 1998)					
	I	F	Δ	I	F	Δ	I	F	Δ	I	F	Δ	I	F	Δ
Arginine	88	92	+4	-	-	-	-	-	-	45	85	+40	90	96	+6
Histidine	85	92	+7	91	94	+3	79	88	+9	44	85	+41	83	95	+12
Isoleucine	81	87	+6	94	95	+1	73	75	+2	40	74	+34	86	91	+5
Leucine	83	89	+6	95	96	+1	75	79	+4	37	75	+38	86	92	+6
Lysine	85	87	+2	84	86	+2	66	76	+10	41	80	+39	80	90	+10
Méthionine	85	85	0	94	94	0	78	82	+4	59	72	+13	86	89	+3
Cystéine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	77	+42	68	86	+18
Phénylalanine	82	89	+7	-	-	-	-	-	-	39	77	+38	88	93	+5
Thréonine	73	85	+12	-	-	-	-	-	-	34	73	+39	85	91	+6
Tryptophane	79	89	+10	-	-	-	-	-	-	36	72	+36	73	89	+16
Valine	79	87	+8	-	-	-	-	-	-	38	74	+36	84	91	+7

#### 1.4.3 Les indices définissant la qualité nutritionnelle des protéines : PDCAAS et DIAAS

En 1989, l’Organisation des Nations unies pour l’alimentation et l’agriculture (en anglais, Food and Agriculture Organisation ou FAO) et l’Organisation mondiale de la santé (en anglais, World Health Organisation ou WHO) ont déterminé que l’indicateur le plus approprié pour estimer la qualité nutritionnelle d’une protéine était le score chimique corrigé de la digestibilité (en anglais, Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score ou PDCAAS) (FAO and WHO, 1991). Le PDCAAS s’appuie sur la teneur en protéines, la composition en AA et la digestibilité protéique globale de l’aliment considéré et se calcule comme suit :

$$PDCAAS = \frac{\text{AA limitant dans la protéine étudiée (mg.g}^{-1}\text{)}}{\text{Même AA dans la protéine de référence (mg.g}^{-1}\text{)}} \times \text{Digestibilité fécale vraie de la protéine (\%)} \times 100$$

Les limites relatives au PDCAAS ont fait l’objet de nombreuses revues (FAO, WHO and UNU, 2007; Boye, Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2012; Gilani, Xiao and Cockell, 2012; Schaafsma, 2012) pour différentes raisons :

- Quel que soit le groupe d’âge étudié, la composition en AA de la protéine idéale est toujours fondée sur les besoins en AA des enfants âgés de 2 à 5 ans. Cependant, les besoins en AA varient d’un groupe d’âge à un autre, et il existe des besoins spécifiques en certains AA selon le statut physiologique et l’état de santé de l’individu, comme chez les femmes enceintes, allaitantes, les personnes âgées, les sportifs de haut niveau ou encore les personnes sous-alimentées, ce qui peut mener à sous-estimer les besoins en protéines et en ces AA spécifiques.

La qualité nutritionnelle de la protéine pour ces populations pourrait alors se retrouver surestimée (FAO, WHO and UNU, 2007).

- Le PDCAAS prend en compte le bilan azoté sur la totalité du tractus digestif en utilisant la digestibilité fécale vraie, or une quantité d'azote endogène, spécifique au repas ingéré, est générée au niveau colique par les micro-organismes. De ce fait, un bilan réalisé au niveau iléal est plus précis (Rowan *et al.*, 1994; Gaudichon *et al.*, 2002; Gilani, Xiao and Cockell, 2012).
- L'hypothèse du PDCAAS est que les digestibilités (ou biodisponibilités) des AA sont identiques et égales à la digestibilité protéique globale, ce qui n'est pas toujours le cas. (Darragh and Hodgkinson, 2000; Moughan, 2003; Gilani, 2012).
- La valeur maximale du PDCAAS est 1 ou 100 %. Un PDCAAS calculé supérieur à 1 ou 100 % est ramené à 1 ou 100 %, ce qui peut amener à sous-estimer la valeur des protéines de haute qualité nutritionnelle qui pourraient compléter des protéines présentant un déficit en certains AA. Par exemple, les protéines de lait et de soja ont un PDCAAS de 100 % (Boye, Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2012), cependant les protéines laitières possèdent des ratios (quantité de AA digestibles sur la quantité d'AA de la protéines de référence) plus élevés que ceux du soja (Rutherford *et al.*, 2015). De ce fait, les protéines laitières ont une meilleure capacité à compléter des protéines de faible qualité nutritionnelle que les protéines de soja, pourvu que les déficits en AA de la protéine à compléter soient comblés par les AA « en surplus » des protéines laitières.

Compte tenu des limites du PDCAAS, vingt ans après l'édition du rapport d'expertise sur cet indicateur, une nouvelle consultation d'experts de la FAO a eu lieu (FAO, 2013). Le rapport a pointé du doigt les limites de cette méthode : celles décrites dans le paragraphe précédent et notamment celle au niveau de l'indépendance du devenir des différents AA dans le tractus digestif. Considérer l'azote dans sa globalité n'était plus pertinent, et il était préférable de considérer chaque AA comme un nutriment à part entière. Le Score de la Digestibilité des Acides Aminés Indispensables (en anglais, Digestible Indispensable Amino Acid Score ou DIAAS) a vu le jour et est le nouvel indicateur recommandé pour juger de la qualité nutritionnelle d'une protéine. Il est calculé de la manière suivante :

$$DIAAS = \frac{\text{AAI digestible limitant dans la protéine étudiée (mg.g}^{-1}\text{)}}{\text{Même AAI dans la protéine de référence (mg.g}^{-1}\text{)}} \times \text{digestibilité iléale réelle} \times 100$$

Les différences entre le PDCAAS et le DIAAS, défini dans le rapport de la FAO de 2013 (FAO, 2013), sont :

- La reconnaissance du modèle du Porc en croissance comme le modèle physiologique de la digestion de l'Homme, et permettant de réaliser les mesures de digestibilité, non faisables chez l'Homme.
- Le fait que non plus un, mais trois profils en AA idéaux sont utilisables pour le calcul du DIAAS, suivant la population considérée : bébés de moins de 6 mois, jeunes enfants de 6 mois à 3 ans, et le reste de la population (enfants de plus de 3 ans, adolescents et adultes). Ces profils types ont été déterminés comme précédemment expliqué : en divisant les besoins en AA des enfants de 2 à 5 ans par les besoins en protéines de la tranche d'âge considérée, excepté pour les bébés, dont la composition du lait maternel est le gold standard (FAO, WHO and UNU, 2007).

La troncature de l'indice à 1 ou 100 % du PDCAAS n'a plus lieu d'être pour le DIAAS, et celui-ci peut dépasser 1 ou 100 %. En effet, cela ne permet de ne plus seulement se placer au niveau d'un aliment unique, mais au niveau d'un repas qui peut se composer d'une combinaison de protéines, chacune avec leurs atouts et déficits, qui peuvent *in fine* se compléter. C'est le cas par exemple des protéines laitières (DIAAS > 100 %) qui complètent les protéines de blé (DIAAS = 50 %) (Mathai, Liu and Stein, 2017). S'intéresser aux AAI digestibles en détail permet aussi de déterminer des mélanges de protéines, qui seules sont carencées en certains AAI digestibles, pour aboutir à un repas qui apporte tous les AAI requis. L'exemple des Légumineuses (soja, pois), pauvres en AA soufrés et riches en lysine, complétées par des Céréales (riz, blé) à haute teneur en AA soufrés est connu depuis longtemps, mais des études récentes viennent confirmer que ces atouts au niveau de certains AA en terme de teneur dans l'aliment se retrouvent en terme de teneur en AA digestibles (Cervantes-Pahm, Liu and Stein, 2014; Mathai, Liu and Stein, 2017).

- Le choix d'effectuer les bilans des composés absorbés/indigestibles sur chaque AA indispensable (AAI), plutôt que sur la protéine globale.
- L'endroit du système digestif au niveau duquel sont entrepris ces bilans est l'iléon terminal et non plus au niveau fécal.
- Enfin les bilans doivent être corrigés des pertes endogènes basales mesurées au niveau de l'iléon.

Nous donc avons vu comment se déroulait la digestion des protéines chez l'Homme et comment il était possible d'estimer en théorie la qualité nutritionnelle d'une protéine via le calcul du DIAAS ou du PDCAAS.

## 1.5 Modèles de digestion humaine pour l'étude de la digestion

Pour calculer ces indices, des données expérimentales sont nécessaires. Les méthodes pour obtenir ces données sont présentées dans la section ci-dessous.

Si la FAO préconise la réalisation d'essais cliniques chez l'Homme pour étudier la digestion humaine et déterminer le DIASS, les nombreuses contraintes associées à ces méthodes nous ont conduits à explorer plus en détail dans cette partie, les autres modèles expérimentaux que sont le porc, le rat, et les systèmes *in vitro*. Le porc est considéré comme un bon modèle du système digestif de l'Homme et la détermination du DIAAS avec ce modèle est acceptée.

### 1.5.1 Modèles animaux

#### 1.5.1.1 L'Homme

Il est possible d'étudier la digestibilité directement chez l'Homme. Le principal frein est l'accès aux contenus digestifs. Une première solution est d'utiliser des patients ayant subi une iléostomie, permettant de collecter les effluents directement en sortie de l'iléon. La limite est que souvent les sujets ne sont pas sains. Une seconde solution est le recours à des dispositifs invasifs, des sondes naso-gastriques ou intestinales par exemple, qui rendent possible l'accès aux contenus gastriques ou intestinaux par aspiration. L'utilisation de techniques d'imagerie (scintigraphie, IRM ou échographie) ne permet pas de mesurer la digestibilité en tant que telle, mais par exemple des phénomènes comme la vidange gastrique. Enfin, il est possible de suivre l'assimilation par l'organisme d'un composé alimentaire marqué indirectement en suivant l'excrétion du traceur dans l'air expiré ou la circulation générale. Une nouvelle technique de double marquage avec des isotopes stables est aussi envisageable (Devi *et al.*, 2018). Au final, peu d'études cliniques existent aux vues des difficultés et limites qu'elles représentent. C'est pour cela que les études sur des modèles animaux, plus ou moins proches de l'Homme, sont souvent préférées pour l'étude des paramètres de digestion.

#### 1.5.1.2 le Porc

##### 1.5.1.2.1 Comparaison de la digestion du Porc par rapport à celle de l'Homme

Au niveau comportemental, le Porc est un animal omnivore, dont la prise alimentaire en repas, 2 à 3 fois par jour, est similaire à celle de l'Homme. Aux niveaux physiologique et anatomique, les parties en amont de leurs systèmes gastro-intestinaux (jusqu'au caecum) sont aussi similaires : que cela soit lors du développement structurel et fonctionnel (Kararli, 1995; Guilloteau *et al.*, 2010), concernant l'innervation et le système des neurotransmetteurs, qui sont bien conservés au sein des Vertébrés (Furness, Cottrell and Bravo, 2015). Un paramètre intéressant est le pH qui, quel que soit le compartiment digestif, est proche entre les deux modèles (Henze *et al.*, 2018).

Cependant malgré la grande similarité entre le système gastro-intestinal de l'Homme et du Porc, quelques différences existent :

- le Porc possède un estomac deux à trois fois plus large que l'Homme, contrairement au Mini-porc qui possède un volume stomacal similaire à l'Homme (1 – 1,6 l). L'estomac du Porc possède une muqueuse cardiaque composée de cellules sécrétant principalement le mucus, qui occupe une plus grande proportion de la muqueuse stomacale comparé à l'Homme (Kararli, 1995) ;
- l'estomac du Porc ne contient pas de motiline (Bueno *et al.*, 1982). Il s'agit d'une hormone sécrétée au niveau du duodénum qui initie le complexe migrant moteur (motilité digestive interprandiale) chez l'Homme (Vantrappen *et al.*, 1979) ;
- le temps de demi-vidange gastrique est considéré comme plus lent chez le Porc (2 h – 24 h) que chez l'Homme (10 min – 2 h) (Henze *et al.*, 2018), contrairement aux temps de résidence du bol alimentaire dans l'intestin grêle qui sont similaires, de l'ordre de 2 h à 4 h (Suenderhauf and Parrott, 2012). Comme le petit intestin du Porc est plus long (15 – 20 m ou 24 cm.kg<sup>-1</sup>) que celui de l'Homme (6 – 8 m ou 14 cm.kg<sup>-1</sup>) (Kararli, 1995; Desesso and Williams, 2008), nous pouvons supposer que le débit du transit intestinal est plus important chez l'Homme que chez le Porc ;
- la présence d'un cæcum chez le Porc, bien plus développé que chez l'Homme (Guilloteau *et al.*, 2010).
- la longueur de l'intestin grêle, associée à l'absence de *Plicae Circulares*, des replis spécifiques aux Primates, qui augmentent l'absorption de 1 à 3 fois (Desesso and Williams, 2008), peuvent laisser penser que l'absorption des nutriments est plus poussée chez le Porc que chez l'Homme. Cependant, les niveaux d'absorption sont considérés comme similaires en comparant la surface totale de l'intestin grêle, en tenant compte des différents types de replis (*Plicae*, villosités et microvillosités), qui est de 168 – 210 m<sup>2</sup> pour le Porc, de 252 m<sup>2</sup> pour l'Homme (Desesso and Williams, 2008).
- les sécrétions dans la lumière gastrointestinale, dont les quantités sont globalement supérieures chez le Porc (~1545 g, 20 g.kg<sup>-1</sup>, ou 0.65 g.cm<sup>-1</sup>) (Merchant *et al.*, 2011) par rapport à l'Homme (~517 g, 8.2 g g.kg<sup>-1</sup>, or 0.58 g.cm<sup>-1</sup>) (Hatton *et al.*, 2015), ce qui peut impliquer une plus grande dilution du bol alimentaire, associé à une augmentation du ratio enzyme : substrat, et donc une meilleure hydrolyse de la matière.

Au final, le Porc est considéré comme un modèle translationnel de la digestion humaine, dont les limites énumérées ci-dessus sont bien connues. Il reste néanmoins des données comparatives manquantes, notamment par rapport aux concentrations en acides biliaires en périodes inter- et

postprandiales (Henze *et al.*, 2018), même si les débits et compositions sont quantifiés (Juste, Corring and Breant, 1969; Juste, Demarne and Corring, 1983). Les comparaisons inter-espèces aux niveaux de la perméabilité intestinale, des métabolismes enzymatiques intestinal et hépatique, et des transporteurs le long de la muqueuse gastrointestinale sont aussi des éléments manquants (Vaessen *et al.*, 2017).

En pratique, le Porc est fréquemment utilisé en nutrition, plus particulièrement les mini-porcs Göttingen et Yucatan (20 – 30 kg au stade adulte), car ils requièrent moins d'espace et de nourriture que les Porcs normaux. Il est à noter que peu d'études relatent les éventuelles différences entre ces deux races de mini-porcs. Le Porc est donc un modèle intéressant, car il est possible par chirurgie de poser des cathéters vasculaires, permettant le recueil de sang, et/ou d'avoir un regard sur le tube digestif, permettant une collecte de contenus digestifs à différents niveaux spatio-temporels au cours de la digestion. Différents systèmes pour avoir accès à la lumière digestive de l'extérieur existent et sont présentés ci-dessous.

#### 1.5.1.2.2 Les différentes chirurgies possibles pour étudier la digestion chez le Porc

Il existe trois types de méthodes offrant un accès direct à la lumière digestive, permettant l'étude de la digestibilité des nutriments et du transit digestif :

- L'euthanasie ;
- Les techniques d'anastomose, qui consistent en une suture entre deux parties du tube digestif. Pour l'étude de la digestion, l'anastomose iléo-rectale (isolement de la partie médiane et terminale du côlon) ou termino-terminale (isolement complet du côlon) permettent de récolter la totalité des flux iléaux par voie fécale et de s'abstenir de marqueurs de transit ;
- Les techniques de fistulation, autrement appelées de canulation, qui consistent à aboucher par chirurgie la cavité intestinale à la peau et insérer un dispositif de prélèvement, ce qui permet d'avoir un accès au contenu digestif. Différents systèmes de prélèvement existent et sont répertoriés dans le Tableau 19.

**Tableau 19** : Les différentes techniques de fistulation du Porc pour l'étude de la digestion : leurs avantages et inconvénients (tiré de Wilfart, 2007).

Technique	Avantages	Inconvénients
<b>Canule en T</b>	Récolte en continu du digestat Pas de section de l'intestin permettant un fonctionnement normal et un maintien du complexe moteur migrant Relativement peu traumatisant et récupération post-opératoire rapide Toléré pendant des périodes longues	Récolte incomplète Utilisation de marqueurs Risque de stases en amont de la canule avec des régimes à haute teneur en fibres
<b>Canule iléo-caecale réentrante</b>	Récolte totale du digestat	Chirurgie longue, complexe et traumatisante Récolte contraignante Section complète de l'intestin impliquant des troubles de la motricité Contamination par le microbiote caeco-colique Stase du digestat en amont Exclusion fonctionnelle de la valvule iléo-caecale
<b>Canule iléo-colique post-valvulaire</b>	Récolte totale du digestat Maintien de la valvule iléo-caecale	Récolte contraignante Chirurgie lourde Continuité par toujours respectée
<b>Canule T-caecale post-valvulaire</b>	Chirurgie simple Pas de section de l'intestin Restitue le trajet normal du digestat hors période de récolte	Récolte incomplète Utilisation de marqueurs Contamination par des reflux caeco-colique

### 1.5.1.3 Autres modèles animaux

D'autres modèles animaux monogastriques comme le Chien, le Singe, le Rat, la Souris ou le Cochon d'Inde peuvent être utilisés, chacun possédant des particularités anatomiques et mécanistiques, issues d'un long processus d'adaptation à leur environnement spécifique (Furness, Cottrell and Bravo, 2015). Dans ce paragraphe, nous nous attarderons sur le Rat, car de nombreuses études sur la digestion utilisent ce modèle. En effet, l'utilisation du porc nécessite un savoir-faire pointu, implique des installations lourdes et les expérimentations sont longues et coûteuses. Il est donc courant que les laboratoires possèdent des animaleries avec des rongeurs plutôt que des porcheries, d'où l'intérêt de travailler sur l'obtention de DIAAS à partir du modèle rat.

Le Rat est un Monogastrique, qui possède un système digestif au niveau anatomique et fonctionnel similaire à celui de l'Homme, à l'exception de son caecum très développé. Il est très employé en nutrition, en particulier pour les études mécanistiques et d'impact alimentaire sur le métabolisme. Cependant, le comportement alimentaire du Rat ne correspond pas à celui de l'Homme. Le Rat a tendance à grignoter, plutôt que d'ingérer des repas ponctuels avec entre ces derniers de larges périodes postprandiales, comme c'est le cas chez l'Homme ou le Porc. De plus, sa petite taille

empêche d'observer des phénomènes macroscopiques (comme la vidange gastrique) qui pourraient avoir lieu dans le tractus gastrointestinal des Mammifères de plus grande taille et ne permet qu'un prélèvement limité de contenu digestif. Enfin, certains paramètres digestifs physiologiques sont très éloignés de ceux observés chez l'Homme, comme par exemple les niveaux de sécrétion de bile et du pH gastrique (Davies and Morris, 1993).

#### 1.5.1.4 Les marqueurs alimentaires indigestibles pour suivre le transit digestif

Un marqueur est nécessaire à l'expérimentation lorsque la totalité du digestat ne peut pas être récupérée. Par définition, il se doit d'être indigestible, non absorbable par les cellules de la paroi digestive, inerte et d'avoir les mêmes propriétés de dissolution que son tracé dans son environnement. De plus, il doit être réparti de façon homogène dans le bol alimentaire ou repas et les techniques pour le détecter dans les échantillons de digestat se doivent d'être sensibles (car les quantités prélevées sont souvent faibles) et spécifiques (Modigliani, Rambaud and Bernier, 1973). Les marqueurs les plus utilisés pour estimer le transit intestinal (nécessaire aux études de digestibilité) sont les molécules contenant des métaux (chrome, titane, baryum) ou des terres rares (ytterbium, samarium, lanthanum) car ils sont quantifiables par colorimétrie. Les trois marqueurs qui ont été utilisés dans la thèse sont détaillés ci-dessous.

##### 1.5.1.4.1 Le chrome-EDTA

C'est un marqueur hydrosoluble qui se positionne donc préférentiellement dans la phase liquide aqueuse du bol alimentaire. Son absorption a été toutefois observée chez le mouton, où une dose de 0,23 g<sub>Cr</sub> lui a été donnée, mais toujours moins de 5 % ont été retrouvés dans les urines (Binnerts, Van't Klooster and Frens, 1968). Un des autres inconvénients du marqueur est l'effet chélateur de l'EDTA qui peut fixer le calcium notamment.

##### 1.5.1.4.2 L'acétate d'ytterbium

Les terres rares à faible concentration se fixent aux particules par adsorption. L'ytterbium (Yb) du complexe ytterbium-acétate fixe n'importe quels éléments solides (protéines, fibres, tissus végétaux) ayant plus d'affinité pour lui que l'acétate. Siddons *et al.* (1985) ont étudié la distribution de l'Yb dans les contenus digestifs (rumen, duodénum & iléon) du mouton (Siddons *et al.*, 1985). Ils ont montré que la distribution de la matière sèche est équitablement distribuée entre les deux phases (insoluble et soluble), mais que l'Yb était lui associé à plus de 90 % en masse à l'insoluble montrant sa forte affinité pour les éléments insolubles. La répartition n'est cependant pas uniforme : plus la particule est petite, plus la concentration en Yb dans cette particule augmente ; ce qui est très visible dans le contenu iléal. L'hypothèse des auteurs est, qu'à forte concentration ( $> 4\text{mg}_{\text{ytterbium}}\cdot\text{gMS}^{-1}$ ), une partie de l'ytterbium forme des sels, des petites particules insolubles, qui suivent la phase liquide.



De manière générale, les terres rares fixées aux particules (mordançage notamment, fixation de terre rare à la paroi végétale par exemple) donnent des temps de rétention moyens plus faibles que les autres marqueurs à cause d'échanges rapides des atomes entre les sites de fixation (Faichney and Griffiths, 1978; Faichney, Poncet and Boston, 1989). De plus, la fixation n'est pas exclusivement particulière : d'après Ellis et al. (2002), cela est dû au fait que l'excès de terre rare faiblement ou non fixée initialement passe dans la phase liquide et/ou que la réduction des particules au cours de la digestion, où les terres rares initialement fixées, passent dans la phase liquide à cause de leur petite taille (Ellis, Wylie and Matis, 2002). Enfin, l'Yb, lié initialement à l'acétate, est dissocié de son nouveau ligand (fibres dans l'expérience) sous l'effet du pH (de l'abondance des protons H<sup>+</sup>), lorsque celui-ci passe en dessous de 4 (Worley, Clearfield and Ellis, 2002). Une étude rapporte une dissociation en conditions acides pour le samarium et le lanthane (Crooker, Clark and Shanks, 1982), alors qu'une autre ne détecte qu'une solubilisation limitée pour l'Yb (Ledoux and Martz, 1991).

Même si quelques migrations sont possibles, les particules adsorbées ayant une affinité forte avec les terres rares semblent intrinsèquement résistantes à la digestion ou bien leur site de fixation semble résistant à la digestion (Worley, Clearfield and Ellis, 2002). De fortes affinités sont observées avec les composés phénoliques et les entités moins digestibles des fibres insolubles dans les détergents neutres (Reed *et al.*, 1985). Il existe donc des sites de fortes et faibles affinités, où ceux de faibles affinités permettent à l'Yb d'être plus mobile (Richter and Schlecht, 2006), et pourquoi pas de passer dans la phase liquide.

#### 1.5.1.4.3 L'oxyde de chrome Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

L'oxyde de chrome est un composé inorganique de couleur verte. Il est quasiment insoluble dans l'eau, l'alcool ou l'acétone, mais devient soluble dans l'acide et les bases (Udy and Lewin, 1956). La revue de Kotb & Luckey (1972) conclue que l'oxyde de chrome n'est pas toxique (Kotb and Luckey, 1972). Il a été récupéré à hauteur de 82,3 % à 93,6 % chez des porcs munis de canule iléo-caecale réentrante (Köhler *et al.*, 1990), entre 95,2 % et 101,1 % chez des cochons anastomosés (iléo-rectal) (Yin *et al.*, 2000) montrant ainsi son efficacité pour marquer le bol alimentaire dans le tractus digestif. L'oxyde de titane est un autre marqueur équivalent à l'oxyde de chrome. Une étude récente a montré que l'utilisation de l'un ou l'autre de ces marqueurs n'avait pas d'incidence significatif sur le calcul des digestibilités iléales standardisées de l'azote et des AA chez le Porc après avoir mangé différents repas (T. Wang, Osho, & Adeola, 2018b). Une autre étude a montré une très faible variation de la digestibilité iléale apparente de l'azote (repas à base de maïs et soja ou d'orge, de blé et soja) calculée avec du dioxyde de titane comme marqueur comparé à de l'oxyde de chrome (72,7 % versus 71,7 %). Même faible, la différence était significative et les auteurs l'expliquait par une quantité de dioxyde de titane récupéré plus élevé (T. Wang & Adeola, 2018a).

### 1.5.1.5 Méthodes pour estimer les pertes endogènes dans la lumière intestinale

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 1.4.2, les pertes endogènes totales dans la lumière intestinale sont d'ordre basal, liées à la matière sèche ingérée, et d'ordre spécifique, *i.e.* spécifique aux caractéristiques physico-chimiques du repas ingéré. Nous expliquons dans cette partie comment il est possible d'estimer ces différents types de pertes endogènes azotées.

#### 1.5.1.5.1 Repas protéoprivé

Cette méthode facile à mettre en œuvre consiste à donner au sujet un repas dépourvu de protéines, ce qui permet de ne recueillir au niveau iléal ou fécal uniquement les protéines d'origine endogène (Adeola *et al.*, 1986). Cette technique permet d'estimer seulement les pertes endogènes basales. Le caractère peu physiologique de cette approche la rend critiquable, d'autant plus qu'il a été montré qu'un tel apport d'AA libre seul pouvait modifier le métabolisme protéique, notamment en induisant dans certaines études, un défaut de sécrétion des AA endogènes (Low, 1980), excepté pour la proline et la glycine (Stein *et al.*, 1999). D'autres travaux, n'observent cependant pas de différence, excepté pour la proline (Butts *et al.*, 1993; Leterme *et al.*, 1996). Une alternative est de recourir à des repas protéiques très digestibles (hydrolysat de caséines de poids moléculaires inférieurs à 5 kDa), plus physiologiques, mais qui induisent la présence d'une partie non digérée qui se retrouve au niveau iléale, de l'ordre de 10 % de l'azote récupéré (Moughan and Schuttart, 1991). Cette méthode ne permet que d'estimer les pertes endogènes basales, qui ne prennent pas en compte les pertes endogènes qui pourraient être induites par le repas.

#### 1.5.1.5.2 Augmentation progressive de la quantité de protéines du repas à teneur en matière sèche constante

Cette technique est physiologiquement plus correcte que le repas protéoprivé, mais est plus compliquée à réaliser, car elle nécessite au moins quatre repas différents. Par ailleurs, elle s'appuie sur une hypothèse non réaliste, à savoir que les pertes endogènes augmenteraient linéairement avec les quantités d'AA ingérées. Ainsi les pertes protéiques endogènes peuvent être calculées à partir d'une simple régression linéaire. En effet, il existe des mécanismes d'adaptation importants du processus de digestion, qui dépendent des caractéristiques de l'aliment (point qui sera abordé dans la partie 1.7), et les sécrétions digestives endogènes qui s'opèrent tout au long du tractus gastro-intestinal ne sont pas proportionnelles aux quantités de nutriments ingérés (Souffrant, 1991; Butts *et al.*, 1993).

#### 1.5.1.5.3 Marquage intrinsèque de l'aliment

Les pertes endogènes totales peuvent être également mesurées en utilisant un traceur des protéines ou AA, soit de la fraction alimentaire, soit de la fraction endogène. Le principe de la méthode consiste à utiliser des isotopes stables, habituellement le  $^{15}\text{N}$  ou le  $^{13}\text{C}$ ) et de quantifier leur

dilution par la fraction non marquée dans les digestats. Connaissant les enrichissements initiaux des deux fractions, il est alors possible en théorie de connaître les proportions de la fraction endogène par rapport à celle alimentaire (Arentson and Zimmerman, 1995), ce qui permet de calculer les flux endogènes de protéine et d'AA dans la lumière digestive.

Le marquage du composé alimentaire d'intérêt s'appelle le marquage intrinsèque. Pour les protéines, il peut s'effectuer à l'aide d'un isotope stable, incorporé dans l'aliment suivant différentes techniques dépendantes de l'aliment en question. Par exemple, en donnant à manger à des poules des AA marqués pour en récupérer les œufs marqués (Van Vliet *et al.*, 2016), en perfusant la mamelle de la vache pour produire du lait marqué (Boirie *et al.*, 1995), en faisant pousser des plantes avec de l'eau deutérée ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) (FAO, 2014) ou en y ajoutant de l'engrais marqué (Mariotti *et al.*, 1999). L'aliment peut aussi subir une guanidation, *i.e.* les résidus de lysine sont transformés en homoarginines, qui seront absorbés de la même manière que sous forme de lysine, mais pas métabolisés (Schmitz, Hagemeister and Erbersdobler, 1991).

Cependant, une limite de l'intérêt du marquage de l'aliment est le recyclage très rapide des acides aminés alimentaires dans les protéines endogènes, ce qui a tendance à provoquer une surestimation de la fraction endogène (Hagemeister and Erbersdobler, 1985). Pour illustrer ce phénomène, une étude a montré que l'azote alimentaire marqué se retrouvait au bout de 10 minutes dans la circulation générale, au bout de 50 minutes dans les enzymes pancréatiques, au bout de 90 minutes dans la bile et au bout de 4 h dans les mucines (Leterme *et al.*, 1996).

#### 1.5.1.5.4 Le marquage de l'animal

La deuxième solution est de marquer les composés d'intérêt d'origine endogène en marquant le sujet par perfusion intraveineuse continue et prolongée (De Lange *et al.*, 1979). Pour tracer les protéines, un AA marqué à l'azote 15 ou au carbone 13 est perfusé par voie intraveineuse, c'est généralement la leucine qui est utilisée (De Lange *et al.*, 1979). Cette méthode ne trace que la leucine et pour extrapoler l'enrichissement mesuré aux autres AA, il est nécessaire d'avoir un aminogramme des pertes basales, avec un repas protéoprive par exemple. Il est intéressant de noter, qu'au bout de quelques jours, les protéines endogènes qui se renouvellent rapidement et dont la synthèse est assurée par le captage des AA artériels (par exemple les enzymes digestives sécrétées par le pancréas) se retrouvent marquées de la même manière que le pool d'AA libres sanguins, alors qu'au niveau de l'intestin grêle qui peut utiliser directement les AA alimentaires (non marqués) les taux d'enrichissement des protéines endogènes (par exemple le mucus) est généralement plus faible. Aussi l'enrichissement de l'ensemble des pertes endogènes au niveau iléal n'est pas exactement le même que celui AA circulant dans le plasma périphérique (Messad, 2016).

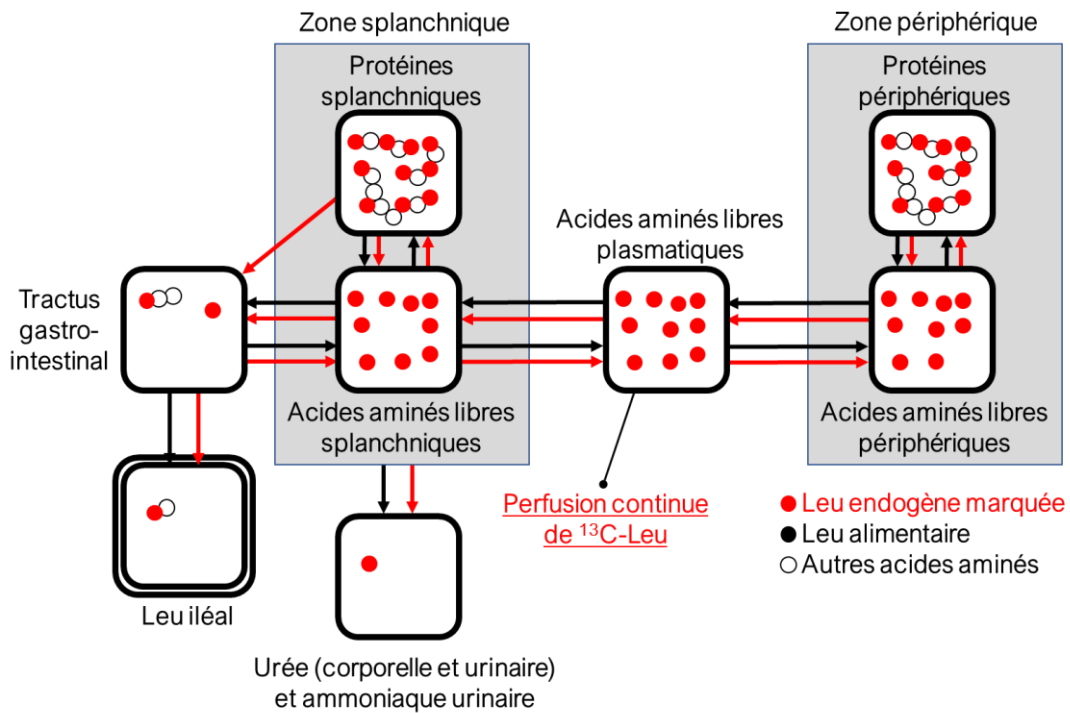
Le principe du marquage avec un traceur isotopique et les mécanismes de dilutions qui interviennent aux niveaux splanchnique et sanguin sont résumés dans la Figure 31, avec comme exemple, une perfusion continue de leucine marquée dans la circulation générale. Sur cette figure, nous pouvons voir que différencier l'azote alimentaire et l'azote endogène au niveau sanguin est complexe. En effet, l'apparition du traceur des AA dans le sang ne reflète pas exactement l'apparition des AA non marqués car des phénomènes de dilution s'opèrent dans le tractus digestif et le captage du traceur par le tissu splanchnique n'est pas forcément équivalent à l'absorption net des AA. Ce qui peut mener à sous-estimer la vitesse d'apparition des AA exogènes dans le sang et une surestimation du catabolisme protéique, i.e. de la vitesse d'apparition des AA endogènes dans le sang (Wolfe *et al.*, 2019). En absence de traceur, il est possible, sur la base du concept de biodisponibilité, d'obtenir une vitesse d'apparition de l'AA dans le sang à partir de la quantité de protéine ingérée, de la teneur du AA tracé dans la protéine et de la digestibilité réelle de l'azote.

Le recyclage rapide de l'azote induit *in fine* au calcul d'une digestibilité réelle et des pertes endogènes de la leucine, qu'il est possible d'extrapoler à tous les AA, supérieures lorsque l'animal est marqué plutôt que lorsque le repas l'est (Hess *et al.*, 2000).

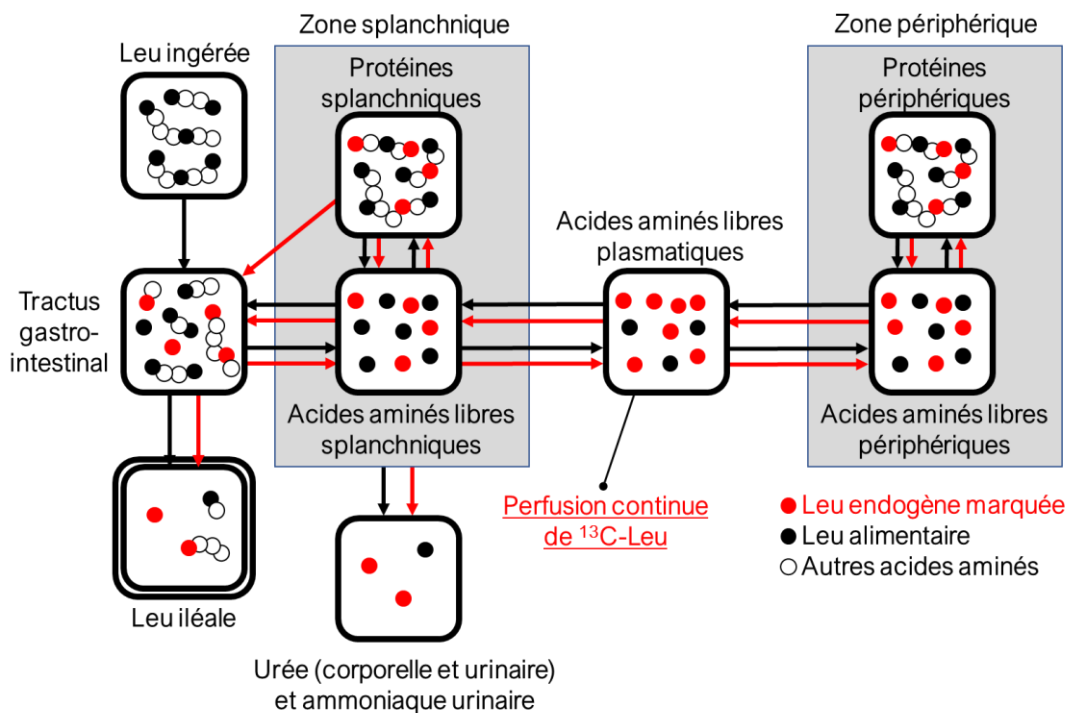
#### 1.5.2 Protocoles *in vitro* de digestion

Pour des raisons éthiques, économiques, d'infrastructures, de temps nécessaire aux expérimentations, et de variabilité interindividuelle élevée, les expérimentations *in vitro* ont tendance à être de plus en plus préférées aux essais impliquant des animaux. Les modèles de digestion *in vitro* présentent l'avantage d'être plus faciles à mettre en œuvre et plutôt reproductibles en fonction de la complexité du bol alimentaire étudié. Ils peuvent mimer un seul ou plusieurs compartiments digestifs en même temps. Deux catégories de digestion *in vitro* existent : i) les systèmes statiques, où l'aliment est mis en présence des différents environnements digestifs de manière successive ; ii) les systèmes dynamiques, où les aspects cinétiques de transit du bol alimentaire et de sécrétions endogènes sont pris en compte.

Période interprandiale avec perfusion continue de  $^{13}\text{C}$ -Leu dans le pool plasmatique (équilibre stationnaire non équilibré supposé atteint)



Période postprandiale



**Figure 31** : Schémas illustrant la répartition de la leucine marquée (marquage de l'organisme via une perfusion continue de leucine marquée (ici de  $^{13}\text{C}$ -leucine) dans le plasma), représentée par des cercles pleins rouges dans les différents pools protéiques de l'organisme en phases inter- et postprandiales (adapté de Wolfe *et al.*, 2019 ; Fouillet *et al.*, 2001).

### 1.5.2.1 Les modèles *in vitro* statiques

Les modèles de digestion statiques, ou appelés « en batch », sont les modèles *in vitro* les plus simplifiés qui existent. Le principe commun à tous les protocoles statiques est la mise en présence de l'aliment avec un environnement simulant le compartiment digestif voulu, *i.e.* une solution électrolytique contenant les enzymes digestives d'intérêt, avec éventuellement des cofacteurs, sans considérations cinétiques. Après un temps déterminé, il est possible de transvaser le bol alimentaire d'un environnement à un autre pour simuler le passage du chyme d'un compartiment digestif à un autre. Malgré ce principe simple et identique à tous les protocoles statiques, il existe une multitude de conditions utilisées et publiées, dont une partie est listée dans le Tableau 21. Une revue de 2011 répertoriait plus de quatre-vingt études aux paramétrages différents (Hur *et al.*, 2011). La raison de cette diversité de conditions *in vitro* de digestion est la diversité des questions de recherche posées par l'étude de la digestion de composés aussi divers que variés (digestibilité, bioaccessibilité, persistance d'activité d'intérêt ou délétère de médicaments, mycotoxines, macronutriments, micronutriments, éléments traces, métabolites secondaires végétales).

La publication en 2014 du premier article présentant un protocole harmonisé sur les points critiques, comme les volumes, les ratios enzyme : substrat, les durées des phases, issu d'un consensus international réalisé dans le cadre de l'action COST INFOGEST (Coopération Scientifique et Technologique Européenne, Amélioration des effets santé de l'aliment par le partage des connaissances sur le processus digestif ou European Cooperation in Science and Technology, Improving health properties of food by sharing our knowledge on the digestive process) (M Minekus *et al.*, 2014) a permis de générer de nombreuses données sur la digestion d'aliments ou de nutriments selon un protocole standardisé, permettant des comparaisons inter-études. Cette action a également mené à des essais inter-laboratoire pour tester la cohérence des données produites par différentes équipes (Egger *et al.*, 2015) ou encore à un protocole révisé récemment et donnant des précisions spécifiques suivant les nutriments étudiés (Brodkorb *et al.*, 2019).

Dans les protocoles *in vitro* se focalisant sur la protéolyse, la phase orale est parfois omise, parce que les protéines ne sont dégradées que de manière limitée en bouche, à cause de l'absence de protéase. Toutefois, le consortium international INFOGEST recommande de ne pas omettre la dilution par la phase orale (Brodkorb *et al.*, 2019). Les conditions de digestion orales et notamment l'efficacité masticatoire, le niveau d'activité amylasique sont fortement variables d'un individu à l'autre, ce qui rend difficile l'utilisation pour des protocoles *in vitro* de repas prémâchés par des volontaires (Hoebler *et al.*, 2000). Cependant le temps et la force de la mastication, les niveaux de dilutions par la salive et la taille des particules du bol alimentaire sont des paramètres importants à

relever, ou en tout cas à fixer, car ils conditionnent toute la suite de la digestion, notamment via l'accessibilité des enzymes digestives au substrat alimentaire. Même si les protéines sont peu dégradées pendant la phase buccale, leurs éventuelles interactions avec l'amidon présent peuvent diminuer leur dégradation via des phénomènes d'encapsulation (Petitot *et al.*, 2009).

Les phases suivantes, *i.e.* gastriques et intestinales sont celles les plus utilisées en systèmes *in vitro* pour estimer la dégradation protéique, la phase colonique étant laissée de côté, puisque le niveau de dégradation maximal des protéines s'observe en fin de l'intestin grêle. Les paramètres clés généraux à déterminer pour réaliser dans les meilleures conditions ces deux étapes digestives, *i.e.* de manière à représenter au mieux les conditions physiologiques, sont :

- L'usage séquentielle des enzymes digestives (natures, quantités en activité enzymatique) ;
- Les paramètres chimiques des environnements de digestion (pH, cofacteurs, coenzymes, sels biliaires, phospholipides, électrolytes) ;
- La technique de mélange appropriée à chaque étape digestive ;
- Le respect des temps de résidence du bol alimentaire dans chacun des compartiments digestifs.

L'avantage de ce protocole est qu'il est relativement facile et rapide à mettre en œuvre, surtout qu'il est maintenant standardisé. Les limites sont cependant nombreuses et concernent principalement la cohérence physiologique : le pH et les quantités d'éléments endogènes sont constants dans les différents compartiments, dans lesquels le mélange se limite souvent à une agitation avec un barreau aimanté, et entre lesquels les flux ne sont pas simulés. Néanmoins, l'étude de la digestion selon ce protocole est une première approche du comportement des nutriments ou aliments étudiés face aux challenges digestifs. Dans une stratégie plus globale d'étude de facteurs de variations de la digestion, c'est donc une première étape qui permet un criblage rapide et une sélection des produits pour lesquels il est intéressant d'aller plus loin en utilisant des protocoles de digestion plus élaborés comme les modèles semi-dynamiques, dynamiques ou bien encore *in vivo* (Guerra *et al.*, 2012; Bohn *et al.*, 2018).

Il est possible d'améliorer la pertinence physiologique des systèmes *in vitro* en prenant en considération les dimensions cinétiques (vidanges gastrique et intestinale, variations de pH et de sécrétions endogènes) et mécaniques (mastication, contraction stomacale, péristaltisme intestinal) de la digestion. Ces types de simulateurs sont qualifiés de dynamiques. Ils peuvent être paramétrés de différentes manières ce qui permet de moduler les caractéristiques de la digestion suivant l'aliment ou la population étudiée.

### 1.5.2.2 *Les modèles in vitro dynamiques*

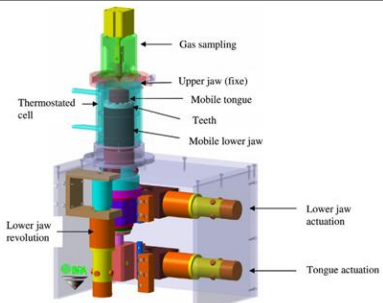
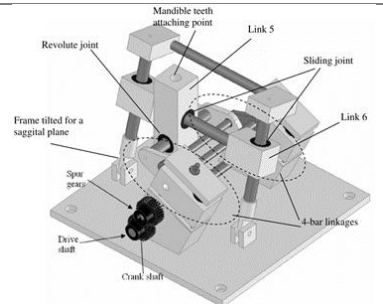
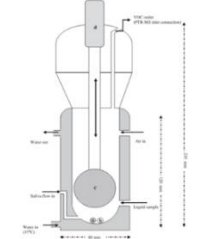
#### 1.5.2.2.1 Systèmes mono et multi-compartimentaux

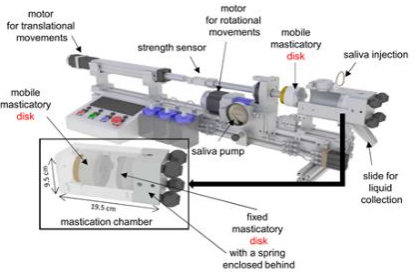
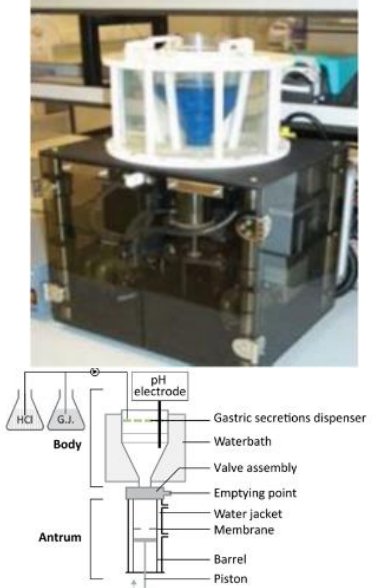
Il existe des simulateurs d'un seul des compartiments digestifs, comme les masticateurs (Poinot *et al.*, 2009; Peyron and Woda, 2016) ou bien les estomacs artificiels (Bornhorst and Singh, 2014; Wang *et al.*, 2015) ou encore certaines sections de l'intestin grêle (Fonseca, Fryer and Bakalis, 2016) ou du colon (Blanquet-Diot *et al.* 2012). Des systèmes présentent certains de ces compartiments en série, pour constituer un modèle plus complet de digestion (Barroso *et al.*, 2015; de Wiele *et al.*, 2015; Ménard, Picque and Dupont, 2015; Minekus, 2015). L'ensemble des modèles dynamiques existants avec leurs caractéristiques sont présentés dans le Tableau 20. La multiplicité de ces systèmes, s'explique par les spécificités des questions de recherches pour lesquels ils ont été construits. Il n'existe pour l'instant pas de consensus concernant l'utilisation des systèmes dynamiques, autant au niveau de l'équipement, qu'au niveau du paramétrage des conditions de digestion.

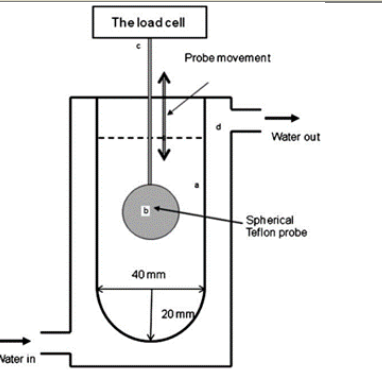
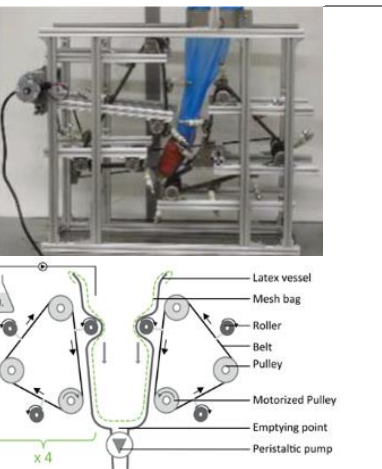
Quel que soit le système, et même le caractère statique ou dynamique, il faut déterminer via des expérimentations *in vivo* ou fixer grâce à la littérature des paramètres clés qui influenceront de manière plus ou moins forte les valeurs de sortie suivies. Il s'agit donc de choisir au préalable les facteurs de digestion critiques au regard de la question de recherche, parmi les éléments listés dans le Tableau 21.

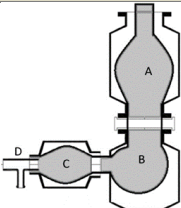
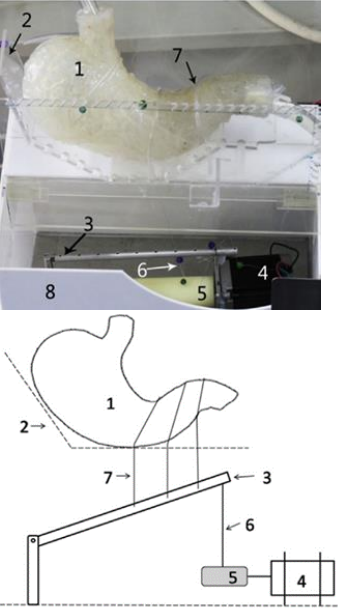


**Tableau 20 :** Principaux systèmes de digestion in vitro dynamiques et leurs caractéristiques (adapté de Guerra *et al.*, 2012; Verhoeckx *et al.*, 2015; Dupont *et al.*, 2019; Gouseti *et al.*, 2019).

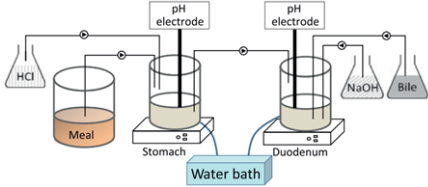

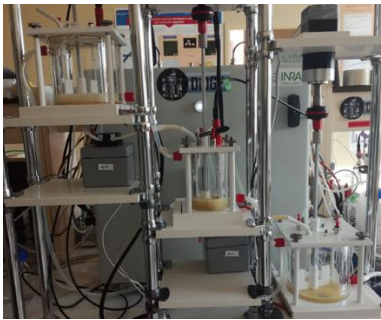
Compartiment mimé	Nom du modèle	Caractéristiques	Photo / Schéma	Avantages	Limites	Température	Contrôle du pH gastrique	Méthode	Vidange gastrique	Sécrétions digestives	Contrôle du pH intestinal	Transit intestinal	Absorption intestinale	Microbiote intestinal	Références
BOUCHE	Bouche artificielle	Simule la mastication en contrôlant le mouvement des dents, de la mâchoire et de la langue. Mesure de la déstructuration de l'aliment et de la libération des composés volatils.													(Salles <i>et al.</i> , 2007)
	Masticateur	Reproduit la trajectoire des molaires à une échelle 1 :1.													(Xu <i>et al.</i> , 2008)
	Modèle buccal avec langue artificielle	Reproduit les forces exercées par la langue sur le bol alimentaire. Mesure en ligne de la libération des composés volatils.													

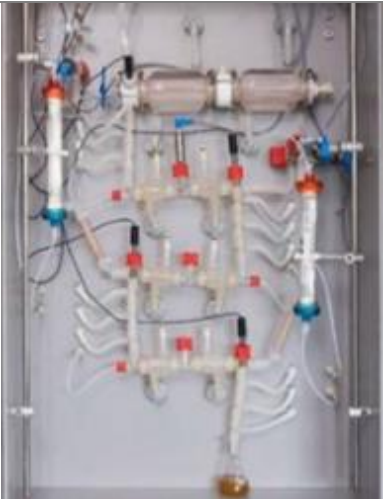
Compartment mimé	Nom du modèle	Caractéristiques	Photo / Schéma	Avantages	Limites							Références	
						Température	Contrôle du pH gastrique	Méthode	Vidange gastrique	Sécrétions digestives	Contrôle du pH intestinal		Transit intestinal
	Artificial Masticatory Advanced Machine AM <sup>2</sup>												(Woda <i>et al.</i> , 2010; Peyron <i>et al.</i> , 2019)
ESTOMAC	Dynamic Gastric Model (DGM)	Utilise une poche dans laquelle se trouve le chyme avec les fluides gastriques pour représenter ce qui se produit dans le fundus, tandis que l'environnement mécanique de l'antrum est stimulé par une aspiration réalisée avec un système valve-piston.		Repas complets jusqu'à 800 ml N'importe quel masticat peut être incorporé Suivi en temps réelle du pH et de la température	Opaque Alignement verticale du corps et de l'antré gastrique Le fundus est à l'air libre Les retrocontrôles hormonaux de la satiété ne sont pas mimés				HCl SGF				(Mercuri <i>et al.</i> , 2008; Lo Curto <i>et al.</i> , 2011; Chessa <i>et al.</i> , 2014)


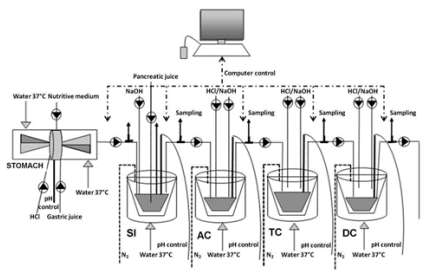
Compartiment mimé	Nom du modèle	Caractéristiques	Photo / Schéma	Avantages	Limites	Références
					Température Contrôle du pH gastrique Méthode Vidange gastrique Sécrétions digestives Contrôle du pH intestinal Transit intestinal Absorption intestinale Microbiote intestinal	
	Modèle stomacal <i>in vitro</i>	Mime l'écoulement des fluides entre une sphère en mouvement vertical dans une cellule cylindrique.				(Chen <i>et al.</i> , 2011)
	Human Gastric Simulator (HGS)	Simule les contractions de l'estomac en animant une poche de latex dans laquelle se trouve le bol alimentaire à l'aide d'une série de rouleaux.		Simulation adéquate de l'activité contractile de l'antré.	Aliment SSF HCl SGF	(Kong and Singh, 2008a)

Compartiment mimé	Nom du modèle	Caractéristiques	Photo / Schéma	Avantages	Limites							Références	
						Température	Contrôle du pH gastrique	Méthode	Vidange gastrique	Sécrétions digestives	Contrôle du pH intestinal		Transit intestinal
	Advanced Gastric Compartment (TIMagc)	Contrôle les paramètres de mélange/pression du chyme, de vidange et de sécrétions gastriques.											(Bellmann <i>et al.</i> , 2016)
	Rope-Driven <i>In Vitro</i> Human Stomach Model (RD-IV-HSM)	Morphologie réaliste, mime les contractions de la paroi gastrique.											(Chen <i>et al.</i> , 2016)


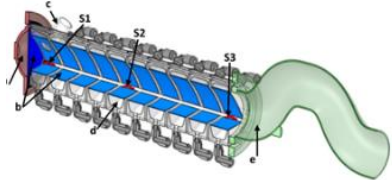
Compartiment mimé	Nom du modèle	Caractéristiques	Photo / Schéma	Avantages	Limites							Références	
						Température	Contrôle du pH gastrique	Méthode	Vidange gastrique	Sécrétions digestives	Contrôle du pH intestinal		Transit intestinal
INTESTIN GRÊLE	Dynamic Duodenal Model (DDuo)	Mime le péristaltisme intestinal et les flux du bol alimentaire et des sécrétions endogènes											(Tharakan <i>et al.</i> , 2010; Gouseti <i>et al.</i> , 2014)
	Human Duodenum Model (HDM)	Reproduit la forme sigmoïdale de l'estomac et la motilité intestinale											(Wright <i>et al.</i> , 2016)
MULTICOMPARTIMENTS (GASTRO-INTESTINAL)	Modèle Vatrier gastro-intestinal <i>in vitro</i> dynamique	Agitation avec un barreau aimanté.						HCl NaHCO <sub>3</sub>					(Nunez, Bichot and Paris, 1998)


Compartiment mimé	Nom du modèle	Caractéristiques	Photo / Schéma	Avantages	Limites								Références	
						Température	Contrôle du pH gastrique	Méthode	Vidange gastrique	Sécrétions digestives	Contrôle du pH intestinal	Transit intestinal		Absorption intestinale
	Modèle <i>in vitro</i> dynamique gastro-intestinal supérieur (Mainville)	Agitation avec un barreau aimanté.												(Mainville, Arcand and Farnworth, 2005)
	Engineered Stomach and small Intestine (ESIN)	Mélange avec 2 pistons dans un cylindres faisant des va-et-vient (3 min <sup>-1</sup> ). Double vidange gastrique solide-liquide. Absorption intestinale via une fibre de dialyse au niveau du jéjunum et de l'iléon.												(Guerra <i>et al.</i> , 2016)
	Digesteur Dynamique Gastro-Intestinale (DiDGI®)	Cf partie 1.5.2.2.2 Agitation avec des pâles		Repas complets jusqu'à 200 ml N'importe quel masticat peut être incorporé Suivi en temps réelle du pH et de	Pas de simulation biomécanique, ni d'absorption intestinale ; géométrie de l'estomac non respectée ; la physiologie est peu représentée									(Ménard <i>et al.</i> , 2014)

Compartiment mimé	Nom du modèle	Caractéristiques	Photo / Schéma	Avantages	Limites	Température	Contrôle du pH gastrique	Méthode	Vidange gastrique	Sécrétions digestives	Contrôle du pH intestinal	Transit intestinal	Absorption intestinale	Microbiote intestinal	Références
				la température Transparent Corrélations in vivo / in vitro existantes	par les bioréacteurs										
	TIM-1 (modèle gastro-intestinal)	Contractions de membranes flexibles par injection d'eau sous pression pour l'estomac et le petit intestin. Dynamique du sphincter pylorique mimé. Absorption simulée via une dialyse des composés hydrosolubles et une filtration pour les liposolubles.								SSF Aliment SGF SIF HCl NaHCO <sub>3</sub> Bile					(Minekus <i>et al.</i> , 1995, 1999; Marteau, Minekus and Havenaar, 1997; Krul <i>et al.</i> , 2000; Blanquet <i>et al.</i> , 2001; Minekus, 2015)

Compartiment mimé	Nom du modèle	Caractéristiques	Photo / Schéma	Avantages	Limites	Références
					Température Contrôle du pH gastrique Méthode Vidange gastrique Sécrétions digestives Contrôle du pH intestinal Transit intestinal Absorption intestinale Microbiote intestinal	
	tiny-TIM					
MULTICOMPARTIMENT (GASTRO-INTESTINO-CÔLIQUE)	TIM-1/tiny-TIM + TIM-2 (modèle du gros intestin)	TIM-2 en série du TIM-1	Haute complexité et densité de micro-organismes d'origine humaine ou animale ( $> 10^{11}$ cfu.g <sup>-1</sup> )			
	Simulateur gastro-intestinal (SIMGI)	Compartiments gastrique, intestinal et colique fermentaire, divisé en trois compartiments. Contractions simulées avec de injection d'eau pressurisée.				(Barroso <i>et al.</i> , 2015)



Compartiment mimé	Nom du modèle	Caractéristiques	Photo / Schéma	Avantages	Limites	Température	Contrôle du pH gastrique	Méthode	Vidange gastrique	Sécrétions digestives	Contrôle du pH intestinal	Transit intestinal	Absorption intestinale	Microbiote intestinal	Références
	Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME)	Compartiments gastrique, intestinal et colique fermentaire, divisé en trois compartiments. Agitation avec barreaux aimantés. Etude des bioconversions microbiennes (luminale et mucosale) du côlon.													(de Wiele <i>et al.</i> , 2015)
CÔLON	Dynamic Colon Model (DCM)	Modèle cœlique non-microbien simulant le péristaltisme et l'absorption dans le gros intestin.													(Stamatopoulos, Batchelor and Simmons, 2016)

Compartiment mimé	Nom du modèle	Caractéristiques	Photo / Schéma	Avantages	Limites	Température	Contrôle du pH gastrique	Méthode	Vidange gastrique	Sécrétions digestives	Contrôle du pH intestinal	Transit intestinal	Absorption intestinale	Microbiote intestinal	Références
	ARTificial COLon (ARCOL)	Temps de rétention contrôlés par les flux d'entrée des composés alimentaires et de sortie des composés fermentaires, et le volume total. Une absorption passive de l'eau et des métabolites microbiennes est simulé par dialyse avec un système de fibre creuse.													(Gérard-Champod <i>et al.</i> , 2010; Blanquet-Diot <i>et al.</i> , 2012)

#### 1.5.2.2.2 Le Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal DiDGI®

Nous allons nous attarder sur le Digesteur Dynamique Gastro-Intestinal (DiDGI®) qui a été utilisé au cours de la thèse. Il s'agit du système dynamique développé par l'INRA et validé pour la digestion de formules infantiles (Ménard *et al.*, 2014). Il est constitué d'une série de réacteurs en verre entourés d'une double enveloppe et reliés entre eux par des tuyaux. Des pompes animent les transferts de matières d'un compartiment à l'autre. De plus, des systèmes de régulation du pH et d'injections arrivant dans les différents compartiments permettent de sécréter les composés endogènes selon un paramétrage déterminé (sous-entendus endogènes à l'organisme que l'on veut modéliser, *i.e.* les sécrétions gastriques et bilio-pancréatiques) (Figure 32). Les pompes sont pilotées par le logiciel Storm®, une interface qui permet d'implémenter le système et en même temps de suivre l'évolution des variables d'intérêt comme par exemple, le volume, la température ou encore le pH des compartiments. Ces paramétrages varient suivant la physiologie à modéliser et l'aliment étudié, comme le montre Figure 32. L'objectif du DiDGI® n'était pas de reproduire les aspects biomécaniques, mais plutôt d'étudier le volet enzymatique de la digestion en considérant les caractéristiques de dilution et de transfert entre les compartiments (volumes des compartiments, sécrétions endogènes et transfert du chyme d'un compartiment à l'autre).

Les limites communes à ces systèmes dynamiques sont que la plupart ne simulent pas l'absorption des nutriments le long de la barrière intestinale (sauf pour le TIM et les nouvelles versions du DiDGI®), n'intègrent ni les microbiotes gastrointestinaux, ni les rétrocontrôles neurohormonaux (Bohn *et al.*, 2018).

**Tableau 21** : Paramètres clés dans l'élaboration d'une digestion *in vitro*.

Types de paramètres clés	Description
Phases de digestion considérées	Nature, succession, durée
Paramètres de mélange / agitation	Géométrie des dispositifs de mélange, intensité de mélange, mimétisme des phénomènes mécaniques
Paramètres de transfert	Types de pompes, débits, tailles des canaux, éventuellement sélection particulière
Paramètres physiques	Température, géométrie des compartiments ou tubes
Paramètres chimiques	pH, concentration en électrolytes, coenzymes, acides biliaires
Paramètres enzymatiques	Nature, temps et débit des sécrétions endogènes (enzymes)
Conditions initiales	Paramètres ci-dessus au niveau basal, caractéristiques de l'aliment (incorporé dans un repas complet, granulométrie, teneurs en nutriments, matrice alimentaire)

### 1.5.3 Simulations mathématiques : modèles *in silico*

Les modèles *in silico* de la digestion se développent aussi pour les mêmes raisons que les modèles *in vitro*. Au-delà de la validation nécessaire du modèle mathématique par des données expérimentales, ils peuvent venir compléter ces jeux de données pour comprendre des mécanismes sous-jacents du processus digestif ou encore permettre de tirer des données non accessibles par l'expérience. Le modèle compartimental (Jacquez and Simon, 1993) est souvent utilisé pour étudier la digestion (Juillet *et al.*, 2008; Strathe, Danfær and Chwalibog, 2008; Le Feunteun *et al.*, 2014) Une seconde approche est la simulation informatique pure, en utilisant par exemple des principes de la dynamique des fluides (Trusov, Zaitseva and Kamaltdinov, 2016) pour comprendre les transferts de matières s'opérant dans la zone antroduodénale, ou encore de la méthode SPH (Smoothed Particle Hydrodynamics) (Cleary *et al.*, 2013) pour étudier le péristaltisme intestinal (Sinnott, Cleary and Harrison, 2017).

Les différents modèles pour étudier la digestion ont été présentés dans cette sous-partie, nous allons maintenant nous attarder sur les méthodes analytiques employées pour réaliser les bilans azotés, d'AA en point final ou encore pour suivre la protéolyse au cours de la digestion.

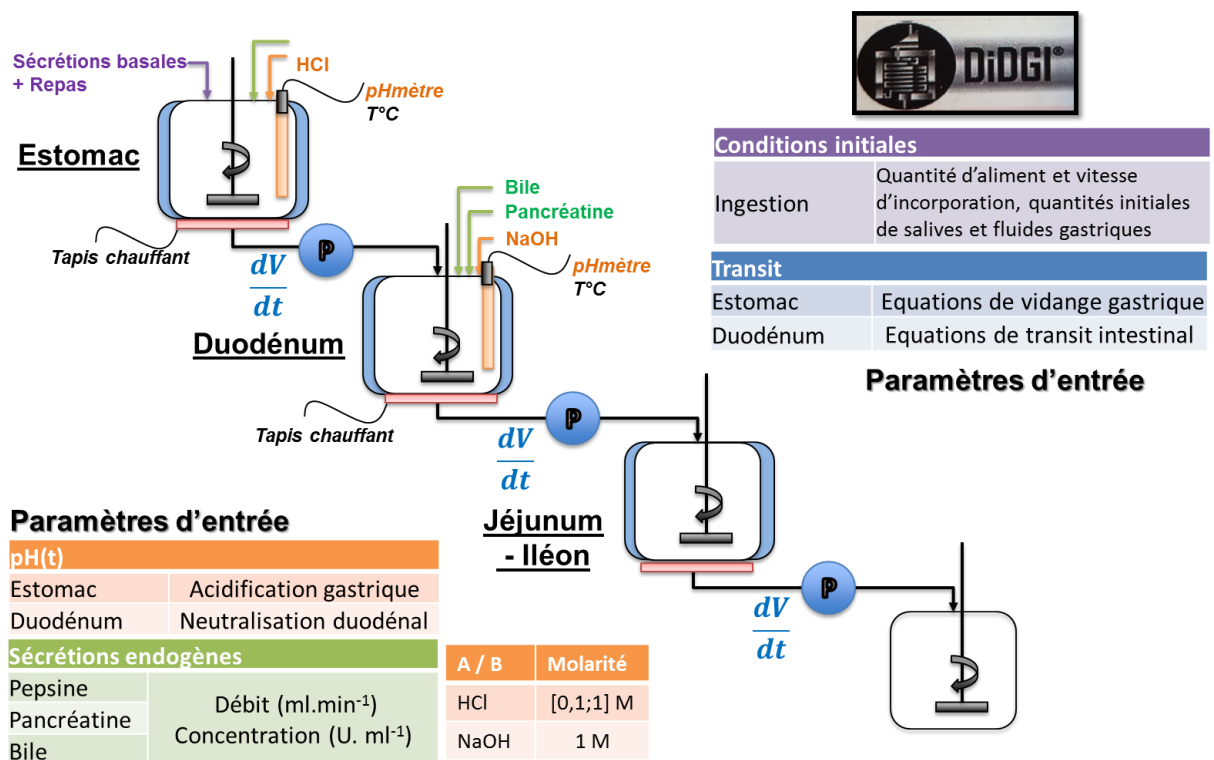


Figure 32 : Schéma du DiDIGI® et des données nécessaires au paramétrage.

## 1.6 Les méthodes analytiques pour le suivi de la digestion des protéines

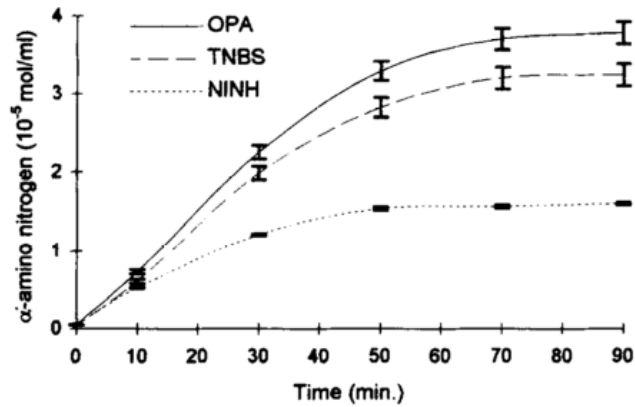
### 1.6.1 Une combinaison de techniques pour une analyse en cinétique

#### 1.6.1.1 Mesures quantitatives et directement liées à la protéolyse

Un premier moyen de suivre la protéolyse digestive est d'estimer le nombre de rupture de liaisons peptidiques, qui peut être suivi en mesurant la teneur en amines libres. Trois méthodes colorimétriques existent, fondées sur la réaction entre l'amine libre et l'ophthaldialdéhyde (OPA), l'acide trinitrobenzenesulfonique (TNBS) ou la ninhydrine. La Figure 33 compare le relarguage des amines libres suivant les trois méthodes : le constat est que le plateau d'hydrolyse est atteint plus rapidement avec le dosage à la ninhydrine que les deux autres. L'OPA est la molécule la plus utilisée pour suivre la protéolyse digestive. Le Tableau 22 récapitule les différences entre les dosages à l'OPA et à la ninhydrine.

**Tableau 22 :** Comparaison des protocoles de dosage d'amines libres utilisant l'OPA ou la ninhydrine, tiré de (Turgeon, Bard and Gauthier, 1991).

	Avantages	Inconvénients
<i>OPA</i>	Sensibilité > 7 $\mu\text{M}$ de $-\text{NH}_2$ en solution aqueuse (Lemieux, Puchades and Simard, 1990)	Faible réponse de la Cys, Lys et hydroxylysine et non sensible à la Pro et l'hydroxyproline (Turgeon, Bard and Gauthier, 1991) $\epsilon$ amines et $\alpha$ amines répondent de la même manière pouvant mener à un faux positif (notamment si riche en Lys, Arg et Glu) (Church <i>et al.</i> , 1983)
<i>Ninhydrine</i>	Pas de faux positif (Panasiuk <i>et al.</i> , 1998) dû à la réaction avec les $\epsilon$ amines qui a lieu, car absorbe à 440 nm alors que la lecture a lieu à 570 nm. Sensibilité > 2 $\mu\text{M}$ de $-\text{NH}_2$ (Turgeon, Bard and Gauthier, 1991)	Protocole inclut phases de chauffage et refroidissement. Inférence avec l'ammoniaque qui donne la même absorbance molaire que les acides aminés. Réactif sensible à l'oxygène (Turgeon, Bard and Gauthier, 1991)



**Figure 33 :** Trypsinolyse de protéines de pois suivie par les trois méthodes de dosages des amines libres (d'après Panasiuk *et al.*, 1998).

Un autre moyen de suivre la dégradation des protéines est de se dire qu'au fur et à mesure de l'hydrolyse, le matériel protéique se solubilise. On peut quantifier l'azote (voir Tableau 24 pour les différentes méthodes disponibles) après avoir effectué une séparation de la fraction soluble de l'insoluble, qui peut se faire par une centrifugation ou une précipitation à l'acide trichloroacétique (TCA). Ce suivi permet d'avoir une première caractérisation de la protéolyse digestive et de faire des études comparatives de différents aliments. Cependant, cette méthode reste grossière, car la protéolyse n'implique pas forcément une solubilisation du matériel azoté, et peut être biaisé par des phénomènes de précipitation des protéines induites par le pH par exemple. De plus les mécanismes sous-jacents de la précipitation des protéines par le TCA sont mal connus et la séparation du culot du surnageant après une centrifugation peut s'avérer délicate en pratique, surtout lorsque les échantillons, comme les digestats, sont complexes.

Des méthodes séparatives plus rigoureuses, comme des filtres ou des membranes avec des seuils de coupures à un poids moléculaire donné peuvent être utilisées. La chromatographie d'exclusion stérique peut aussi être utilisée pour déterminer la proportion relative de différentes fractions de protéines et peptides suivant leurs poids moléculaires.

#### 1.6.1.2 Mesures semi-quantitatives ou qualitatives et directement liées à la protéolyse

Des méthodes séparatives semi-quantitatives existent. Les électrophorèses, dont le principe est la séparation des sous-unités des protéines suivant leur poids moléculaire sur un gel de polyacrylamide en condition dénaturante ou pas, sous l'impulsion d'un courant électrique. Elle permet d'avoir un panorama des unités protéiques présentes dans l'échantillon, dans une gamme de 10 à 300 kDa environ. Elle rend possible les études comparatives, et les interprétations cinétiques, comme par

exemple l'apparition ou la disparition de telle ou telle unité de poids moléculaire donné. La quantification par densitométrie, *i.e.* par mesure de l'intensité de la couleur des bandes, est complexe. En effet, elle nécessite notamment de bons témoins et étalons, une bonne idée de la quantité d'azote incorporée dans les puits dont les volumes déposés sont de l'ordre du  $\mu\text{l}$ , ce qui implique d'avoir un échantillon homogène.

Une autre méthode semi-quantitative est l'utilisation du couplage HPLC – MS/MS, non seulement informe des séquences des peptides observés entre 5 et 40 AA, mais aussi fournit leurs poids moléculaires. Il est alors possible d'avoir une distribution des peptides suivant leur poids moléculaire dans l'échantillon considéré, qui est un bon indicateur de l'avancée de la protéolyse. Cependant la limite principale de cette technique est la non prise en compte des peptides de moins de quatre AA et de plus de 40 AA, l'information obtenue est donc partielle.

### 1.6.1.3 Mesures indirectement liées à la protéolyse

Les méthodes indirectement liées à la protéolyse font appel à des techniques physiques et notamment optiques. Elles nécessitent d'avoir des échantillons limpides pour la plupart et donc impliquent de travailler sur des aliments liquides, des émulsions ou des concentrats ou isolats protéiques solubilisés dans de l'eau par exemple. Classiquement, l'agrégation protéique, la taille des particules lipidiques ou encore la structure des protéines sont suivies au cours de la digestion par microscopie (à balayage électronique, électronique en transmission normal ou environnemental, confocale à fluorescence) (O'Loughlin *et al.*, 2012), par diffraction laser (De Oliveira *et al.*, 2016), dichroïsme circulaire, possible sur les liquides en utilisant les UV (Floury *et al.*, 2018) ou par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Carbonaro, Maselli and Nucara, 2012). Le Tableau 23 regroupe les différentes techniques qui ont été présentées, leurs points forts et faibles.

Un système de digestion intéressant est le pH-stat. Il permet de suivre la protéolyse en phase gastrique à partir des variations de pH induites en partie par l'hydrolyse des protéines. Aucun prélèvement n'est nécessaire pour réaliser le suivi, ce qui limite les perturbations du système.

**Tableau 23** : Récapitulatif des méthodes pour suivre la protéolyse.

Technique	Points forts/faibles
Amines Libres	Associé à la protéolyse mais peu interprétable. Sauf si aliment référence à digérer avec la même quantité d'azote alimentaire.
N tot ou Ntot surnageant	Associé à la protéolyse mais surtout aux paramètres de transfert de matière. L'azote soluble peut être un indicateur.
Taux d'hydrolyse	Associé à la protéolyse, mais nécessite un aliment référence à digérer.
Matière sèche	Grossier et global
Electrophorèse	Qualitatif
FT-IR	N'aime pas l'eau. Permet peu de comparaison d'un aliment à l'autre. S'intéresse à la structure des protéines, mais très dépendant de l'algorithme de déconvolution utilisé.
Peptidomique	Cher et semi-quantitatif
Acides aminés libres	Associé à la protéolyse. Peut-être un bon indicateur dans les compartiments aval.
HPSEC	Fractions azotées suivant leur poids moléculaire. Peut-être un bon indicateur.
Potentiel Zêta	Valable sur les émulsions ou les surnageants.
DLS	
Diffraction laser (granulo)	

### 1.6.2 Suivi d'hydrolyse avec un pH-stat

La titration en mode pH-stat consiste à maintenir le pH à une valeur donnée dans un milieu réactionnel grâce à l'ajout contrôlé de solution titrante (acide ou basique). Généralement, le pH varie à cause d'une réaction enzymatique. Il est alors possible de suivre la cinétique de cette réaction en étudiant les volumes versés de solution titrante au cours du temps. La protéolyse qui s'opère au cours de la digestion induit une variation de pH, qui en condition *in vitro* peuvent être suivis au pH-stat (Mat *et al.*, 2018). En effet, l'hydrolyse d'une liaison peptidique libère un groupement carboxylique (-COOH) et une amine libre (-NH<sub>2</sub>), respectivement des côtés C-ter et N-ter des peptides créés. Le pKa de l'acide carboxylique avec un radical carboné plus ou moins long étant en deçà de 2,5, à pH neutre, ou en condition intestinale, il est raisonnable d'estimer que la majorité des acides carboxyliques créés relarguent leur proton H<sup>+</sup> afin de former le carboxylate (-COO<sup>-</sup>), forme la plus stable qui peut être titrée avec une solution basique, typiquement la soude (NaOH). Cependant les amines libres, dont le pKa est au-delà de 9, et dont une fraction non négligeable de ces radicaux se trouve sous forme protonée (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), peuvent capter ces protons. Il est donc nécessaire de prendre en



compte le coefficient de dissociation des amines en fonction du pH. En conditions acides, l'équilibre est inversé, la majorité des amines sont protonées ( $-\text{NH}_3^+$ ) et la basification du milieu induite par la protéolyse peut être suivie avec un titrant acide, habituellement l'acide chlorhydrique (HCl). Ici encore, la proximité de l'équilibre acido-basique des fonctions carboxyliques fait qu'il est nécessaire d'estimer la quantité de protons relarguée par ces groupements, en prenant en compte leur degré d'association. Les coefficients de dissociation ou d'association sont théoriques et en réalité dépendants des peptides créés et donc de la protéine digérée. Pour déduire des volumes versés de titrant une évolution de taux d'hydrolyse non polluée par les jeux d'équilibres acido-basiques, il est préférable de se placer dans des conditions de pH éloignées des pKa des acides carboxyliques et des amines secondaires. Le faible nombre d'étude pH-stat sur la protéolyse intestinale par rapport à celles en milieu gastrique peut alors s'expliquer par la difficulté d'obtenir une estimation correcte du coefficient de dissociation des amines à pH neutre. En effet, en milieu acide, les peptides sont globalement receveur de protons (Damodaran and Parkin, 2017).

Comme évoqué précédemment, analyser le digestat à l'endroit du tube digestif où potentiellement les protéines ont été hydrolysées et absorbées au maximum permet d'avoir un point de vue global de la digestion sans s'attarder sur les effets locaux qui ont pu se produire en amont. Plusieurs méthodes sont employées suivant le modèle utilisé. Après avoir réalisé l'absorption intestinale (en continu ou point final), le bilan absorbé/indigestible peut être réalisé en quantifiant la matière azotée (azote total ou AA) de l'une des deux fractions (en différenciant ou pas l'alimentaire de l'endogène). Si on s'intéresse à la fraction non absorbée qui est quantifiée, il est alors nécessaire de réaliser une hydrolyse de la matière au préalable.

### 1.6.3 La quantification de la matière protéique pour réaliser des bilans de digestions

Connaissant la quantité de protéines ou d'AA ingérés, pour connaître la proportion absorbée, il suffit de quantifier les flux d'azote protéique absorbé ou bien ceux rémanents dans la lumière intestinale. La quantification de l'azote peut se faire via différentes méthodes qui possèdent chacune leurs avantages et leurs inconvénients (Tableau 24). Globalement, plus la méthode est robuste, plus elle est coûteuse en termes de réactifs, d'équipements et de temps, et inversement.

**Tableau 24 :** Comment quantifier les protéines et/ou l'azote.

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients	Référence
Absorbance à 280 nm	Colorimétrie	Rapide, peu coûteux	Peu robuste Pas interprétable directement	
Bradford	Colorimétrie	Rapide, peu coûteux	Peu robuste	(Bradford, 1976)
Dumas	Combustion puis quantification de N <sub>2</sub> par conductivité thermique	Robuste Rapide	Nécessite un analyseur	(J. AOAC Int. 77, 829 (1994))
Kjeldahl	Minéralisation puis titration du NH <sub>3</sub>	Robuste Seuil de détection faible (3 mgN), qui peut être réduit avec un µ-Kjeldhal	Long / Coût Nécessite un minéralisateur et un titrateur	(JAOAC 51, 446 (1968))

L'inconvénient de mesurer l'azote pour déterminer la quantité de protéines est qu'il existe une fraction azotée non protéique, dont la proportion varie d'un composé à l'autre. Il est alors plus pertinent de quantifier les AA séparément, puis d'additionner les valeurs obtenues pour obtenir une quantité protéique plus juste. Si ces AA sont incorporés dans des protéines ou des peptides, l'échantillon doit subir une hydrolyse permettant de relarguer les AA d'intérêt sous forme libre, qui sont ensuite séparés et quantifiés par des méthodes chromatographiques à échange d'ions (IEC), en phase liquide-gazeuse (GLC) ou en phase liquide haute performance (HPLC). Une dérivation, c'est-à-dire l'addition d'une molécule, qui se complexe aux AA, avant ou après séparation dans la colonne, permettent de détecter les AA par absorbance à des longueurs d'ondes données. Classiquement, l'OPA ou la ninhydrine sont utilisés (Engelhardt and Aitzetmuller, 1986).

L'hydrolyse acide à chaud pendant 24 heures permet de quantifier la plupart des AA, sauf le tryptophane et les AA soufrés qui sont détruits, la sérine et la thréonine qui sont partiellement détruits, et les AA ramifiés qui ne sont pas libérés totalement (FAO and WHO, 1991). Pour réaliser un aminogramme complet, il est en théorie nécessaire de réaliser quatre hydrolyses différentes présentées en Tableau 25 et décrites dans la section 982 30 E du journal officiel de l'AOAC (2007).

**Tableau 25 :** Hydrolyses préalables de l'échantillon pour quantifier les acides aminés incorporés dans les protéines.

Traitement	AA quantifiables
Hydrolyse acide 24 h 110°C	Tous
Hydrolyse acide 48 h 110°C	Val, Leu, Ile
Hydrolyse acide 24 h 110°C avec oxydation préalable	Cys, Met
Hydrolyse alcaline	Trp

Dans le cas où l'échantillon ne contient que des AA libres, ou que l'on ne s'intéresse qu'aux AA libres, par exemple dans le plasma ou dans la fraction absorbée, les hydrolyses ne sont pas nécessaires et la quantification est effectuée directement.

Après avoir vu comment estimer la qualité nutritionnelle d'une protéine et par quels moyens la mesurer, il est possible d'étudier les facteurs impactant la digestion des protéines et *in fine* leur qualité nutritionnelle. En effet, la fraction protéique potentiellement absorbable ne passe pas forcément la barrière intestinale et les raisons de cela est présenté ci-dessous.

### 1.7 Facteurs de variation de la digestion et de la biodisponibilité protéique

Dans cette partie, nous allons aborder les facteurs impactant la digestion des protéines en faisant appelle autant aux études *in vitro* et *in vivo* sur l'impact de ces variants sur certains processus digestifs, que sur les études de digestibilité protéique.

#### 1.7.1 Les protéines alimentaires

##### 1.7.1.1 Nature des protéines alimentaires

Chez l'Homme intubé et en utilisant un marquage de l'aliment au  $^{15}\text{N}$ , le flux endogène d'azote a été observé comme significativement plus élevé après prise d'un isolat protéique de soja par rapport à des protéines de lait (5245 versus 3995  $\text{mgN.kg}_{\text{matière sèche ingérée}}^{-1}$ ) (Gaudichon *et al.*, 2002). Une différence similaire a été observée chez le Porc entre une poudre d'haricot et une poudre de lait (675 versus 81,3  $\text{gPertes protéiques endogènes.kg}_{\text{matière sèche ingérée}}^{-1}$ ) (Souffrant, 1991). Cependant, les pertes endogènes d'AA ont été reportées comme similaires entre le blé et le pois chez le Porc, de l'ordre de 9 – 10  $\text{g.kg}_{\text{matière sèche ingérée}}^{-1}$ , alors que leurs digestibilités iléales réelles moyennes des AA sont différentes : 83,2 % pour le blé, 77,0 % pour le pois (Leterme, Thewis and Beckersa, 1990). Cela suggère que la variation de digestibilité n'est pas exclusivement due à une variation des pertes endogènes.

### 1.7.1.2 Quantité des protéines alimentaires

L'incorporation de protéine par rapport à un régime protéoprivé, et plus globalement l'augmentation de la teneur en protéines dans le repas, entraîne une augmentation des pertes endogènes. Par exemple, l'augmentation graduelle de 0 à 250 gProtéines.kgmatière sèche ingérée<sup>-1</sup> dans la ration des porcs a conduit à une augmentation des pertes endogènes de lysine de 370 à 750 mgLysine.kgmatière sèche ingérée<sup>-1</sup>, sous la forme d'une sigmoïde centrée sur une teneur de 90 gProtéines.kgmatière sèche ingérée<sup>-1</sup> et où le plateau est atteint vers 125 gProtéines.kgmatière sèche ingérée<sup>-1</sup> (Zhang *et al.*, 2005). Deux autres études rapportent une corrélation positive linéaire entre pertes endogènes azotées et teneurs en protéine du repas, où le passage d'une ration de 60 à 250 gcaséine kgmatière ingérée<sup>-1</sup> induit des pertes endogènes azotées augmentant de 2000 à 2800 mgN.kgmatière sèche ingérée<sup>-1</sup> (Hodgkinson *et al.*, 2000; Pedersen, Boisen and Ferna, 2002). Cette hausse de sécrétions endogènes azotées est classiquement attribuée à une augmentation des sécrétion pancréatiques, en réponse à une quantité de protéines à digérer plus importantes (Zhang *et al.*, 2005).

### 1.7.1.3 Structure des protéines alimentaires

Pour étudier la digestibilité des protéines via les différences de sensibilité aux enzymes, associées à l'impact de la structure des protéines, la plupart des études mettent en place des stratégies qui s'appuient sur des traitements thermiques sur une même protéine qui entraînent des modifications de structure, et rapprochent des données de caractérisation des structures protéiques observées aux différences d'hydrolyse et/ou de biodisponibilité des protéines.

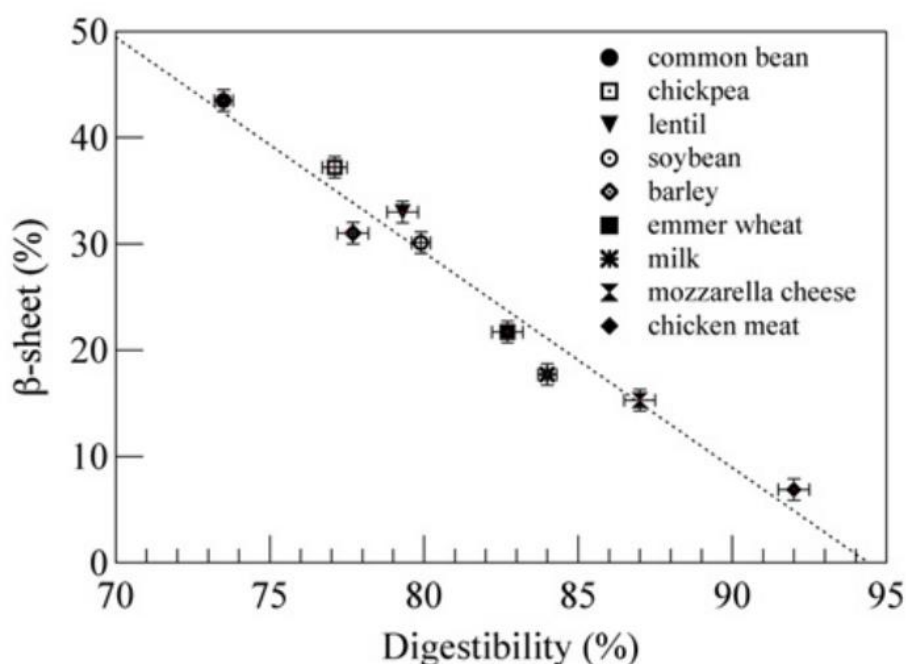
La structure primaire des protéines alimentaires est le premier facteur impactant leur capacité à être hydrolysée par des enzymes spécifiques. En effet, l'enchaînement des AA, définit les lieux possibles d'action des enzymes qui présentent des spécificités de coupures, ce qui est le cas de la majorité des protéases digestives. La proline est ainsi connue pour rendre difficile l'accès des enzymes aux sites de coupures grâce à sa structure coudée. Les protéines et peptides riches en proline, comme par exemple les prolamines, sont donc supposées plus résistantes à l'hydrolyse enzymatique (Vanhoof *et al.*, 1995).

Les structures secondaires joueraient sur l'encombrement stérique et donc sur l'accessibilité de l'enzyme au site de clivage. La proportion d'hélices  $\alpha$  par rapport aux feuillets  $\beta$  impacterait la digestibilité protéique, comme le suggère une étude *in vitro* associée à de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (Carbonaro, Maselli and Nucara, 2012). Dans cette étude, les feuillets  $\beta$  apparaissaient plus résistants à l'hydrolyse que les hélices  $\alpha$ , qui présentaient des structures plus ou moins compacte sans motif récurrent (Carbonaro, Maselli and Nucara, 2015). La corrélation observée

entre la proportion relative en feuillet  $\beta$  et la digestibilité *in vitro* de diverses protéines animale ou végétale, illustre ce résultat qui est présenté sur la Figure 34.

Une étude portant sur les protéines végétales a comparé la pepsinolyse *in vitro* de protéines de cinq variétés de soja aux proportions de feuillets  $\beta$  différentes. Au-delà d'avoir montré que les sous-unités de la  $\beta$ -conglycinine étaient peu sensibles à la pepsinolyse, une corrélation linéaire négative entre digestibilité à la pepsine et teneur en feuillets  $\beta$  a été montrée (Yang *et al.*, 2016). Les phénomènes d'agrégation des feuillets  $\beta$  sous l'effet de traitements thermiques expliqueraient cette réduction de l'action des protéases digestives pour les protéines de soja qui présentent des proportions de feuillets  $\beta$  élevées (Prudêncio-Ferreira and Arêas, 1993) ou pour celles du sarrasin (Choi and Ma, 2005).

Des facteurs peuvent limiter l'hydrolyse des protéines dans le tractus digestif : c'est le cas des inhibiteurs tryptiques par exemple, qui font partie des facteurs antinutritionnels, sur lesquels nous allons maintenant nous attarder.



**Figure 34 :** Pourcentage relatif de la bande des feuillets  $\beta$  sur un spectre FTIR ( $1630 - 1638 \text{ cm}^{-1}$ ) en fonction de la digestibilité *in vitro* de différentes protéines (tiré de Carbonaro, Maselli and Nucara, 2015).

#### 1.7.1.4 Présence d'inhibiteurs enzymatiques

Les inhibiteurs enzymatiques ou de protéases ou encore facteurs anti-trypsiques sont largement présents chez les Légumineuses et se répartissent en deux familles présentées dans le Tableau 26. Ils permettent le maintien de la dormance de la graine en prévenant l'autolyse, régulent la synthèse et le métabolisme protéiques et ont un rôle de défense contre les micro-organismes et insectes comme évoqué précédemment (Smith, 1984). Ils forment des complexes avec les enzymes cibles, ce qui réduit ou inhibe l'activité de ces enzymes. Un chauffage modéré permet de les désactiver (100°C pendant 20 min) (Smith, 1984). Les céréales contiennent peu de ces facteurs anti-trypsiques (Huisman and Jansman, 1991).

**Tableau 26** : Les inhibiteurs enzymatiques.

Famille	Poids moléculaire	Enzymes digestives inhibées	Espèces	Référence
Bowman-Birk (BBI)	7 - 9 kDa	Trypsine, Chymotrypsine, Elastase	Soja, Pois	(Lajolo and Genovese, 2002)
Kunitz	21 - 23 kDa	Trypsine, Chymotrypsine, Amylase	Soja	(Yen, Jensen and Simon, 1977)

L'effet sur les digestibilités de l'azote et des AA a souvent été étudié. Par exemple, chez le Porc, une variété de soja contenant peu d'inhibiteurs trypsiques ( $9,9 \text{ mg}_{\text{inhibiteurs trypsiques}} \cdot \text{g}_{\text{repas}}^{-1}$ ) a entraîné une digestibilité apparente des AAI plus importante (62,6 % versus 55,0 %) qu'une variété avec une activité anti-trypsique supérieure ( $20,9 \text{ mg}_{\text{inhibiteurs trypsiques}} \cdot \text{g}_{\text{repas}}^{-1}$ ) (Herkelman *et al.*, 1991). En effet, il a été reporté que les inhibiteurs trypsiques provoquent une augmentation significative des pertes iléales azotées endogènes (Grala *et al.*, 1998) qui proviendraient d'une hausse des sécrétions pancréatiques médiées par l'intermédiaire de la CCK (Liener, 1994).

De nombreux traitements technologiques sont susceptibles de modifier la structure des protéines et ainsi leur digestion. Ils sont présentés ci-dessous.

#### 1.7.2 Matrice alimentaire

##### 1.7.2.1 Définition

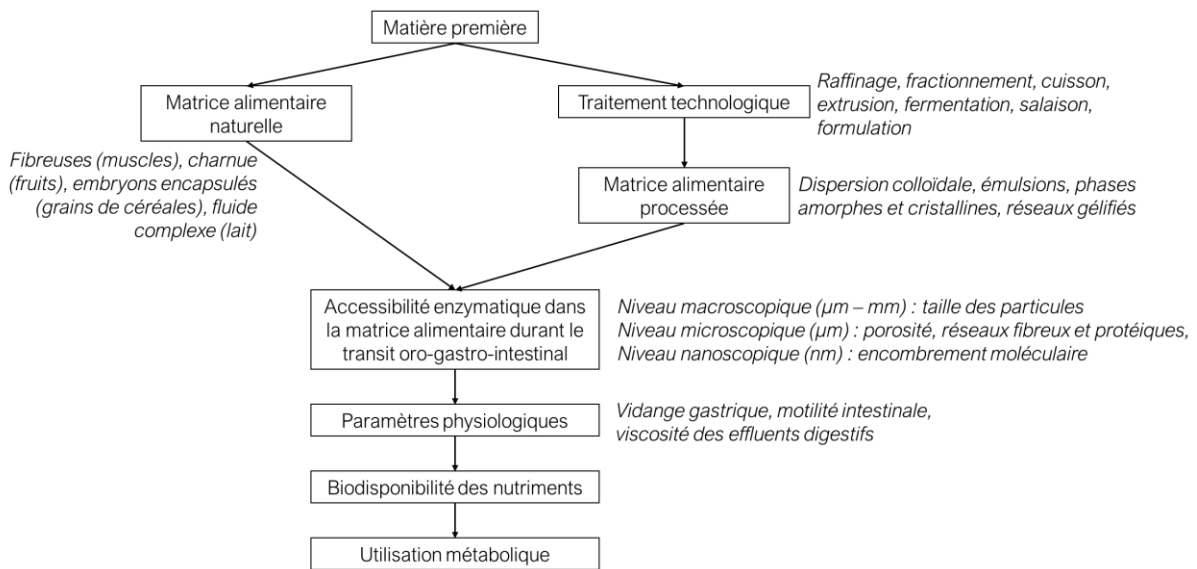
La matrice alimentaire se définit comme l'ensemble des constituants de l'aliments et leurs interactions entre eux au sein de ce dernier (Donald, 2004; Aguilera, 2006). L'association des matières premières agricoles et leur transformation au cours des procédés tels que les opérations mécaniques ou thermiques par exemple vont induire des modifications de l'organisation des

nutriments aux différentes échelles et peut impacter à différents niveaux la biodisponibilité de ces derniers, comme l'illustre la Figure 35.

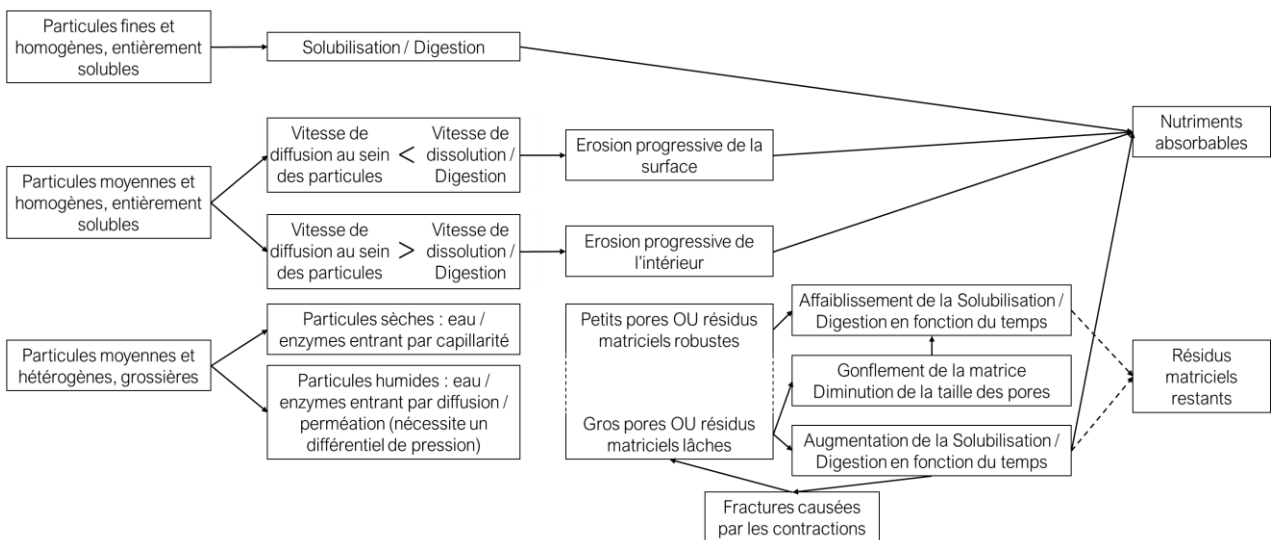
#### 1.7.2.2 Taille des particules et des agrégats protéiques

Différentes tailles de particules sont générées par la mastication à partir de la matrice alimentaire. Selon leur taille différents mécanismes peuvent entrer en jeu au cours de la digestion (Figure 33). La majorité des phénomènes impliqués sont à relier à la diffusion des éléments endogènes (acide, enzymes), plus ou moins difficile, jusqu'à l'aliment ou au nutriment (mécanismes de diffusion (seconde loi de Fick) et/ou d'érosion) (Somaratne, Reis, *et al.*, 2019). Il est à noter que la solubilité du composé d'intérêt de la matrice vers la phase liquide provenant des sécrétions endogènes est aussi un facteur important à prendre en compte lorsque l'on s'intéresse à la protéolyse notamment. En effet, si les mécanismes régissant l'hydrolyse enzymatique en phase liquide sont bien connus, l'hydrolyse en phase hétérogène est plus complexe et dépendante de nombreuses variables. Elle se déroule en quatre temps : la diffusion, l'accessibilité, l'adsorption (reconnaissance du substrat par l'enzyme) et l'hydrolyse au sens strict (Fardet, Souchon and Dupont, 2013), où l'enzyme, à chaque étape, peut être ralentie ou mise en difficulté par de l'encombrement stérique et/ou les conditions physico-chimiques de l'environnement.

Il est connu en nutrition animale que la finesse du broyage de l'aliment augmente les digestibilités iléale et fécale des AA (Fernández and Jørgensen, 1986), comme le montre la meilleure digestibilité standardisée iléale des AA (sans différence significative, à part pour l'histidine) d'un repas de soja broyé en particules de diamètre inférieur à 1 mm par rapport à un même repas avec une granulométrie supérieure à 1 mm (Messerschmidt *et al.*, 2012). Ce phénomène est souvent expliqué par une meilleure accessibilité des protéases au substrat protéique grâce à une rupture plus importante des parois végétales, ce qui libérerait plus de granules d'aleurone et augmenterait les surfaces de contact des protéines dans le fluide digestif. En se plaçant au niveau microscopique, la taille des agrégats protéiques joue aussi un rôle sur les cinétiques enzymatiques de digestion protéique.



**Figure 35 :** Diagramme de l’élaboration d’un aliment, l’impact sur la nature de sa matrice et in fine sur les processus digestifs et son utilisation métabolique (adapté de Fardet, Souchon and Dupont, 2013).



**Figure 36 :** Evènements physiques que subit la fraction particulaire du digestat pendant et après la digestion enzymatique (d’après Lentle, 2018).



### 1.7.2.3 Interactions protéines – protéines

Nous pouvons prendre l'exemple des protéines de blanc d'œufs, dont la diffusion de la pepsine dans cette matrice a été largement étudiée avec des techniques optiques. Le gel de blanc d'œufs induit par le chauffage à pH 9 est plus compact et homogène ( $D_{50} = 0,32 \mu\text{m}$  avec une distance interparticulaire moyenne de  $0,76 \mu\text{m}$ ) que celui à pH 5 ( $D_{50} = 0,76 \mu\text{m}$  avec une distance interparticulaire moyenne de  $1,79 \mu\text{m}$ ). Le coefficient de diffusion de la FITC-pepsine est donc plus faible dans ce gel compact à pH 9 que dans celui plus lâche à pH 5 ( $D = 44,2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  versus  $52,5 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). Pour les auteurs, les interactions électrostatiques entre la pepsine et les protéines alimentaires pourraient jouer un rôle dans la différence de diffusion de la pepsine observée (Somaratne, Nau, *et al.*, 2019). La libération de peptides par la pepsine a de plus été étudiée en incorporant un composé (un traceur) mimant le comportement des peptides à ces gels. Le relargage de ce traceur au cours de la pepsinolyse a été suivi en cinétique par microscopie confocale. Le gel compact et homogène (pH 9) a montré une libération plus lente de ce traceur par rapport au gel plus lâche et hétérogène (pH 5). Deux phénomènes sont pointés du doigt par les auteurs, la diffusion plus grande dans le gel à pH 5 et le pH et pouvoir tampon localement élevé dans le gel à pH 9 qui causent une activité moindre de la pepsine présente dans ces environnements. Dans les deux conditions, la majorité de la dégradation du gel a été observé à la surface des gels, montrant un mécanisme de digestion des particules sur la base de l'érosion (Somaratne *et al.*, 2020). Ainsi, le rôle de la matrice et de sa structure est donc clé dans les cinétiques de digestion.

### 1.7.2.4 Interactions d'autres constituants alimentaires avec les protéines : les facteurs antinutritionnels

#### 1.7.2.4.1 Les fibres alimentaires

Les fibres sont des polysaccharides retrouvés dans les parois cellulaires des plantes qui jouent un rôle structural. Elles comprennent la cellulose, les hémicelluloses, la lignine et les polysaccharides pectiques. Elles sont non digestibles par les Monogastriques, car ces derniers ne possèdent pas les enzymes nécessaires à leur dégradation. Ainsi les fibres se retrouvent au niveau du côlon, où elles sont la plupart du temps fermentées.

D'une part, la présence de fibres influe sur la digestibilité iléale apparente et standardisée des protéines et AA via la modulation des pertes azotées endogènes spécifiques. En effet, elles auraient un effet abrasif sur la muqueuse intestinale, ce qui augmenterait les pertes de mucus (Montagne, Piel and Lalle, 2004) et la desquamation cellulaire (Souffrant, 1991). En pratique, en augmentant graduellement la proportion de fibres dans la ration de 0 à  $180 \text{ g Fibres insolubles dans le détergents neutres} \cdot \text{kg matière ingérée}^{-1}$ , il a été observé une augmentation, linéaire (Mariscal-Landín *et al.*, 1995) ou avec un plateau

à 102 g Fibres.kgmatière ingérée<sup>-1</sup> (Schulze *et al.*, 1995), des pertes endogènes azotées iléales chez le Porc. D'autre part, le pouvoir viscosant des fibres, notamment des pectines, hydrophiles du fait de leur capacité de rétention d'eau élevée, limiterait l'accès des enzymes digestives au substrat alimentaire (Sauer and Ozimek, 1986). Ces effets sont plus ou moins constatés suivant la nature et la quantité des fibres dans la ration et restent encore peu quantifiés de manière systématique.

#### 1.7.2.4.2 Les phytates

Les phytates sont des sels mixtes d'acide phytique localisés en particulier dans la couche à aleurone du blé et du riz, dans le germe pour le maïs. Ces composés peuvent former des complexes stables avec les protéines en fonction du pH inférieur au point isoélectrique (pI) via des liaisons ioniques avec les AA basiques (Arg, His, Lys) (Selle *et al.*, 2012), qui seraient résistants aux protéases digestives. En particulier, le chauffage de protéines de soja et de phytates à plus de 75 °C induit la complexation de ces deux composés (Wang, Liu and Guo, 2018). Quinze travaux étudiant l'influence de l'ajout de phytase (une enzyme qui hydrolyse ces complexes) à des repas contenant ces phytates sur la digestibilité iléale apparentes des AA chez le Porc ont été répertoriés. Une amélioration moyenne de 2,4 % de cette digestibilité est constatée suite à l'ajout de phytase, cependant les mécanismes sous-jacents restent encore peu étudiés (Messad, 2016).

#### 1.7.2.4.3 Les tanins

Les tanins sont des polyphénols hydrosolubles stables à la température. Surtout présents dans les graines de colza et les céréales, on les retrouve en faible quantité dans les téguments des Légumineuses. C'est leur capacité à former des complexes avec les protéines dans le tractus digestif qui est mise en cause dans leur capacité à impacter la digestion protéique. En effet, ils réduiraient la digestibilité des AA en formant des complexes plus résistants aux enzymes digestives (Crépon *et al.*, 2010), par un empilement des tanins sur les cycles pyrrolidone des résidus de proline (Baxter *et al.*, 1997; Charlton *et al.*, 2002). La précipitation des globulines de haricot noir a été observée en présence de tanins, associé à une diminution de la pepsinolyse (Aw and Swanson, 1985). De manière anecdotique, les tannins, par leur caractère astringent, provoqueraient une hausse de la sécrétion des protéines salivaires riches en proline, ce qui a été observé chez le Rat (Jansman, Frohlich and Marquardt, 1994).

#### 1.7.2.4.4 Les lectines

Les lectines sont des glycoprotéines, stables à la température, présentes dans la plupart des légumes comestibles et capables de se fixer de manière réversible à des mono- ou oligosaccharides et d'agglutiner les érythrocytes. Elles interféreraient avec le processus digestif par leur capacité à résister aux enzymes digestives (Le Gall *et al.*, 2005), ce qui serait dû à leurs sucres qui masquent les sites de coupure de leur partie protéique. Elles sont aussi capables de se fixer à des récepteurs des

entérocytes, ce qui provoquerait un renouvellement de la bordure en brosse plus rapide, ou encore de stimuler les sécrétions pancréatiques via la CCK (Vasconcelos and Oliveira, 2004). Elles moduleraient aussi l'absorption intestinale. Cette augmentation des pertes azotées endogènes attendue au niveau iléal a été confirmée par des études menées chez le Porc en faisant varier la teneur et la nature des lectines dans le repas (Huisman *et al.*, 1992; Schulze *et al.*, 1995).

#### 1.7.2.5 Effet d'autres constituants sans interaction avec les protéines clairement établie

##### 1.7.2.5.1 Matière sèche ingérée

L'azote endogène peut représenter une part importante de l'azote retrouvé au niveau iléal et venir biaiser les valeurs de digestibilité. Il est alors nécessaire d'estimer la proportion de l'azote et/ou des AA alimentaires par rapport aux endogènes pour connaître la fraction des protéines alimentaires réellement absorbées. Ce travail est d'autant plus complexe que ces pertes sont repas dépendants.

Nous avons présenté précédemment sur la Figure 30 les différents types de pertes endogènes azotées : les pertes basales et les pertes spécifiques. Dans la suite de ce paragraphe, nous allons donner quelques exemples de paramètres affectant les caractéristiques de ces pertes.

Les pertes endogènes d'azote et d'AA cumulées le long de la lumière oro-gastro-intestinale augmentent de manière linéaire avec la quantité de matière sèche ingérée, à raison de 1,0 à 1,9 g<sub>N</sub> par jour chez le Porc lorsque sa ration passe de 50 à 90 g<sub>MSI.kg<sub>poids vif</sub><sup>0,75</sup></sub> (Hess and Sève, 1999).

##### 1.7.2.5.2 Autres macronutriments

La nature de l'amidon a été montrée comme jouant un rôle dans les quantités de protéines endogènes retrouvées dans les contenus iléaux. Ainsi un repas protéoprivé contenant 90 % d'amidon de maïs induisait moins de pertes (0,71 g.kg<sub>matière sèche ingérée</sub><sup>-1</sup>) qu'un même repas avec de l'amidon de blé (1,28 g.kg<sub>matière sèche ingérée</sub><sup>-1</sup>) (Darcy and Laplace, 1981). Cependant, aucun effet significatif de la digestibilité iléale apparente des protéines n'a été constaté lors de l'incorporation de 5 % d'amidon à des repas protéiques (Koehler *et al.*, 1992).

Concernant les lipides, une augmentation des digestibilités iléales apparentes des AA a été constatée en augmentant la proportion d'huile de colza dans la ration 3,2 et 12,2 % chez le Porc (Li and Sauer, 1994). Plus récemment, l'addition d'huile de soja à des repas ou concentrats de soja a montré améliorer la digestibilité iléale standardisée de la plupart des AAI (Cervantes-Pahm and Stein, 2008). Ces améliorations pourraient être expliquées par des retards de vidange gastrique induits par l'augmentation relative de la charge calorique et/ou l'allongement du temps de transit intestinal.

##### 1.7.2.5.3 Electrolytes alimentaires

L'équilibre en électrolytes alimentaires est caractérisé par les teneurs en ions sodium, potassium et chlorure du repas et est exprimé en milliéquivalent (mEq). Une augmentation de cette valeur induit

une augmentation de la digestibilité iléale apparente de l'azote : de 10 % en passant de -50 à 400 mEq.kg<sub>matière ingérée</sub><sup>-1</sup> avec un repas soja-blé (Haydon and West, 1990), de 4 % en passant de -100 à 200 mEq.kg<sub>matière ingérée</sub><sup>-1</sup> avec un repas similaire (Dersjant-Li *et al.*, 2001), de 2 – 3 % en passant de 0 à 250 mEq.kg<sub>matière ingérée</sub><sup>-1</sup> avec un mélange céréales-soja (Lei *et al.*, 2017). Ici encore, l'impact dépend de la ration, car par exemple, jouer sur cette balance électrolytique n'a pas eu d'effet sur la digestibilité iléale de l'azote d'un repas à base de caséines (Officer, Batterham and Farrell, 1997).

### 1.7.3 Effets des traitements technologiques : exemple de l'augmentation de la température

En 2012, une revue très complète regroupait différentes données sur les indicateurs de digestibilité protéique au regard des protéines testées et des traitements technologiques qu'elles ont subi au préalable (Boye, Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2012). Des exemples d'impacts de processus technologiques, tels que la fermentation, l'irradiation, l'extrusion, le séchage par atomisation ou par courant d'air, le fumage, le grillage, les traitements thermiques en voie sèche ou humide, ont été étudiés et répertoriés dans cette revue (Boye, Wijesinha-Bettoni and Burlingame, 2012). Globalement, comme l'explique une revue récente sur la digestion protéique des Légumineuses (Drulyte and Orlien, 2019), l'effet des procédés domestiques (comme le trempage, la cuisson au four, au micro-onde ou sous pression ou le pétrissage) ou industriels (l'autoclavage, le pétrissage, ou l'extrusion) sur la digestion des protéines dépend des procédés et sources de protéines utilisés. Comme nous l'avons vu en partie 1.2.4.1, la température impacte fortement la structure protéique et induit la formation de nouvelles structures avec les éléments environnants. Etant donné que la plupart des traitements agroalimentaires font appel à une élévation de température, nous nous focaliserons, dans le paragraphe suivant, à l'impact de la température globalement sur la digestion des protéines.

Selon le traitement thermique appliqué et la protéine considérée, la biodisponibilité des AA augmente ou diminue. Les protéines natives du blé sont plus digestibles que celles traitées thermiquement (Zorzi *et al.*, 2007 ; Pasini *et al.*, 2001). Le traitement thermique des protéines sériques du lait au contraire entraîne un anabolisme azoté plus important, indiquant que la digestibilité des protéines est accrue lorsqu'elles ont subi un traitement thermique (Kim *et al.*, 2007 ; Mullally, Mehra and Fitzgerald, 1998 ; Lacroix, 2008). De mêmes observations ont été réalisées avec des protéines de blancs d'œuf, où la cuisson du repas a permis de passer à une proportion de protéines quittant l'iléon chez des patients iléostomisés de 35,1 à 5,7 % (Evenepoel *et al.*, 1999). La digestion *in vitro* de viande de porc est aussi influencée par la cuisson subie. Une cuisson à 70 °C semble sensibiliser la viande par rapport à la viande crue, tandis que la tendance s'inverse lorsque les cuissons sont plus importantes (100 et 140 °C) (Bax *et al.*, 2013). Les auteurs mettent en cause la structure protéique : la protéine native regroupe ses radicaux hydrophobes au sein d'une poche dite

hydrophobe, ce qui limite l'accès des enzymes digestives à ces sites de coupures. Un traitement thermique modéré (70 °C) conduit au dépliement de la structure protéique rendant accessible un plus grand nombre de clivage. Un chauffage plus poussé mène à l'agrégation des sous-unités dénaturées, ce qui masque de nouveaux sites et réduit l'accessibilité des enzymes par encombrement stérique notamment.

Une étude comparant l'impact de traitements sur la digestion des protéines de farine de lentilles a montré que l'extrusion (63 – 57 %) induisait un meilleur DIAAS obtenu chez le Rat que le fait de la bouillir (57 – 53 %) ou de la pétrir (54 – 47 %) (Nosworthy *et al.*, 2018). La même équipe a tiré les mêmes conclusions avec des travaux impliquant différents types de farines d'haricots, où l'extrusion et la cuisson donnaient un DIAAS de 61% en moyenne alors que le pétrissage induisant un DIAAS entre 48 – 52 % (Nosworthy *et al.*, 2018).

#### 1.7.3.1 Impact sur les teneurs en facteurs antinutritionnels

De nombreuses études montrent l'impact positif des traitements thermiques de matériel végétal sur leur digestibilité protéique, que celui-ci soit une simple cuisson, une ébullition, un rôtissage ou une extrusion. Les deux explications majeures sont l'élimination et/ou l'inactivation des composés antinutritionnels thermolabiles, comme les facteurs anti-trypsiques (Liu *et al.*, 2014) et les lectines (Van Der Poel *et al.*, 1990), et la dénaturation des protéines par la chaleur qui induit un dépliement de leur structure, ce qui augmenterait leur susceptibilité à la protéolyse digestive. Ainsi, le couple temps-température est important à prendre en compte, mais les conditions d'hydratation et de broyage de la matière le sont tout autant.

Les facteurs antinutritionnels sont naturellement présents dans les aliments ou formés au cours de traitements technologiques, par exemple lors de la cuisson ou les traitements alcalins, et peuvent affecter la digestion des protéines. Une attention particulière leur est prêtée en alimentation animale car ils sont très présents dans la matière protéique végétale (Tableau 27). En alimentation humaine, la plupart des aliments qui en contiennent, notamment les Légumineuses, subissent un traitement préalable, comme un chauffage ou un trempage, qui élimine la plupart de ces composés. Ils sont d'une grande diversité, autant du point de vue biochimique que de leur potentielle action sur le processus digestif. Ils sont notamment présents dans les végétaux pour assurer la défense de la plante contre ses agresseurs.

**Tableau 27** : Substances indésirables associées aux matières végétales étudiées (d'après Godon, 1996).

Substance indésirable	Détoxification	Soja	Pois	Blé
Inhibiteurs trypsiques	Traitement thermique	++	+	+
Lectines	Traitement thermique	+	+	+
Polyphénols	Solubilisation (eau, eau/alcool)	+		
Glucosinolates	Solubilisation (eau, eau/alcool)	+		
Alcaloïdes	Solubilisation (eau, solvant apolaire)			
Saponines	Solubilisation (eau)	+	+	
$\alpha$ -galactosides	Solubilisation (eau, eau/alcool)	++	+	+
Phytates	Solubilisation (eau)	+	+	+

Un grand nombre sont thermolabiles, comme exposé dans le Tableau 27. Les traitements présentés précédemment peuvent donc réduire leur teneur dans l'aliment et donc réduire leur action négative sur la digestion. La réduction des teneurs en phytates par séchage du pois chiche, des lentilles et du pois a conduit à observer une augmentation de la digestibilité *in vitro* de 12 à 15 % (Martín-Cabrejas *et al.*, 2009). L'autoclavage à 121 °C pendant 20 – 30 min ou la cuisson à 100 °C pendant 30 – 60 min dans de l'eau bouillante d'haricots (*Vigna aconitifolia* et *Vigna sinensis*) augmente la digestibilité *in vitro* de 9,4 à 14,8 % tout en réduisant la quantité de phytates de 13 à 44 % et de tanins de 36 % à 79 % (Vijayakumari *et al.*, 1998). La présence de tels facteurs antinutritionnels n'est pas forcément un facteur prépondérant de la digestibilité des protéines. En effet, une étude a montré que l'autoclavage à 121 °C pendant 15 min de protéines de pois chiche (farine ou albumines) a réduit l'activité antitrypsique de 83 à 97 % (suivant la fraction protéique considérée) sans pour autant impacter sur les données de digestibilité obtenues chez le Rat (Tavano *et al.*, 2008).

### 1.7.3.2 Impact sur l'oxydation des protéines

Les cinétiques de pepsinolyse *in vitro* ont été ralenties suite à l'oxydation des protéines (Santé-Lhoutellier, Aubry and Gatellier, 2007). L'oxydation d'isolat protéique de soja a aussi conduit à une diminution de l'hydrolyse pepsique, ce qui est expliquée par une agrégation des protéines (Chen, Zhao and Sun, 2013).

### 1.7.3.3 La réaction de Maillard

La réaction de Maillard est une réaction non enzymatique qui se produit entre les protéines et les sucres réducteurs pendant la cuisson, et qui est dépendante du couple temps – température (Ledl and Schleicher, 1990). Il s'agit d'une condensation entre une fonction amine d'un AA et le groupement carbonyle du sucre, *e.g.* entre le groupement amine en position  $\epsilon$  de la lysine et le glucose. Alors que

le chauffage peut entraîner un dépliement des protéines, améliorant l'hydrolyse, ou bien une agrégation, réduisant l'accès au substrat protéique aux enzymes, la réaction de Maillard réduit la bioaccessibilité de la lysine (Öste and Sjödin, 1984 ; Öste, 1991). Les produits avancés de la glycation (AGEs) peuvent être créés au cours de la réaction de Maillard et sont délétères : se retrouvant dans le côlon, ils peuvent subir la protéolyse bactérienne et former des composés carcinogènes (Tuohy *et al.*, 2006).

#### 1.7.4 Facteurs liés à l'expérimentation

Il a été montré que la quantité des pertes endogènes pouvait varier suivant l'âge et le poids vif du Porc. Exprimées par kilogramme de poids vif, elles sont plus importantes chez le jeune Porc plutôt que chez le Porc âgé, hypothétiquement à cause d'une desquamation plus importante et de capacité de digestion et de surface d'absorption plus faibles (Leterme and Théwis, 2004; Mariscal-Landín and Reis de Souza, 2006). Il existerait une valeur maximale de pertes endogènes qui dépendrait du poids de l'animal plus que de la matière sèche ingérée (Sève, 1994). Il se pourrait aussi que l'augmentation de ces sécrétions endogènes soit compensée par une réabsorption plus importante.

Outre le statut physiologique du modèle animal, les conditions d'expérimentations jouent sur les paramètres d'intérêts : la méthode de chirurgie utilisée pour poser la canule iléale a montré avoir un impact sur les pertes endogènes azotées et la digestibilité iléale apparente mesurée (Pedersen and Boisen, 2002). Concernant la fréquence des repas test donnés par jour (un, deux ou *ad libitum*), pas d'impact significatif n'a été observé sur la digestibilité iléale apparente de la matière azotée (Chastanet *et al.*, 2007).

Pour conclure sur les aspects de variations de la digestion protéique, nous avons vu qu'un nombre important de facteurs intrinsèques et extrinsèques à l'aliment et au repas joue sur certains paramètres de digestion, ce qui se retrouve plus ou moins lorsque l'on fait les bilans azotés au niveau iléal et qui impacte donc les indicateurs de qualité nutritionnelle des protéines.

## 1.8 La digestion des protéines végétales et aliments à base de protéines végétales

### 1.8.1 Données *in vitro* sur la digestion de protéines végétales et les aliments étudiés

La digestion *in vitro* du gluten de blé a surtout été étudiée au regard de son allergénicité. Contrairement au pain (Wu *et al.*, 2017) et aux pâtes (Petitot *et al.*, 2009), le seitan n'a jamais été étudié du point de vue du comportement des protéines lors de la digestion

La digestion d'isolat protéique de pois a été réalisée suivant le protocole INFOGEST pour détecter des effets de procédés et les conditions de pH sur les cinétiques de protéolyse (Laguna *et al.*, 2017).

Le soja est la matière végétale qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études en termes de digestion de ses protéines. En se concentrant sur les travaux *in vitro*, cinq publications de la même équipe présentent des données de digestion des protéines de tofus et de jus de soja (Tableau 28). Cependant les protocoles utilisés sont différents de celui utilisé dans la thèse (INFOGEST) et les techniques de suivi de la protéolyse ne permettent pas de comparaisons directes avec d'autres études.

Récemment, la digestion des protéines du tofu et du soja ont été comparées (Zhu *et al.*, 2019). Les protéines ont été moins attaquées dans le cas du tofu. Pour les deux aliments, en phase gastrique, les sous-unités  $\alpha$  (57 – 68 kDa) et  $\alpha'$  (57 – 72 kDa) de la  $\beta$ -conglycinine ont été dégradées majoritairement alors que la sous-unité  $\beta$  (45 – 52 kDa) a persisté.

Une étude essayant de corrélérer des valeurs de digestibilité de pois chiche obtenue *in vitro* avec les indicateurs classiques de la qualité nutritionnelle des protéines obtenue chez le Rat, a montré que les systèmes multienzymatiques, où la digestibilité *in vitro* est obtenu avec une équation dépendante du pH, donnent les meilleurs résultats de corrélation (Tavano, Neves and da Silva Júnior, 2016).

**Tableau 28** : Liste des publications relative à la digestion *in vitro* d'aliments à base de soja.

Reference	Title	Interest	Methods to assess protein digestion
(Rui <i>et al.</i> , 2018)	Does lactic fermentation influence soy yogurt protein digestibility- A comparative study between soymilk and soy yogurt at different pH	In vitro digestion of soymilk as control and yoghurt	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Soluble protein content (Bradford, absolute)</li> <li>▪ Granulometry</li> <li>▪ Electrophoresis</li> </ul>
(Xing <i>et al.</i> , 2017)	Effect of Fermentation pH on Protein Bioaccessibility of Soymilk Curd with Added Tea Polyphenols As Assessed by in Vitro Gastrointestinal Digestion	In vitro digestion of soymilk as control and tofu like products (called soymilk curd)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Soluble protein content (Bradford, en absolu)</li> <li>▪ Granulometry</li> <li>▪ Free amino groups</li> <li>▪ Electrophoresis</li> </ul>
(Rui, Fu, <i>et al.</i> , 2016)	A comparison study of bioaccessibility of soy protein gel induced by magnesium chloride, glucono- $\delta$ -lactone and microbial transglutaminase	In vitro digestion of tofu like products	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Soluble protein content (Bradford, relative)</li> <li>▪ Granulometry</li> <li>▪ Free amino groups</li> <li>▪ Electrophoresis</li> </ul>
(Rui, Xing, <i>et al.</i> , 2016)	Protein bioaccessibility of soymilk and soymilk curd prepared with two <i>Lactobacillus plantarum</i> strains as assessed by in vitro gastrointestinal digestion	In vitro digestion of soymilk as control and tofu like products (called soymilk curd)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Soluble protein content (Bradford, absolute)</li> <li>▪ Free amino groups (but no calculus shown)</li> <li>▪ Electrophoresis</li> </ul>
(Xing <i>et al.</i> , 2016)	In vitro gastrointestinal digestion study of a novel bio-tofu with special emphasis on the impact of microbial transglutaminase	In vitro digestion of soymilk as control and tofu like products (called soymilk curd)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Soluble protein content (Bradford, absolute)</li> <li>▪ Granulometry</li> <li>▪ Electrophoresis</li> <li>▪ Free Amino Acid</li> </ul>



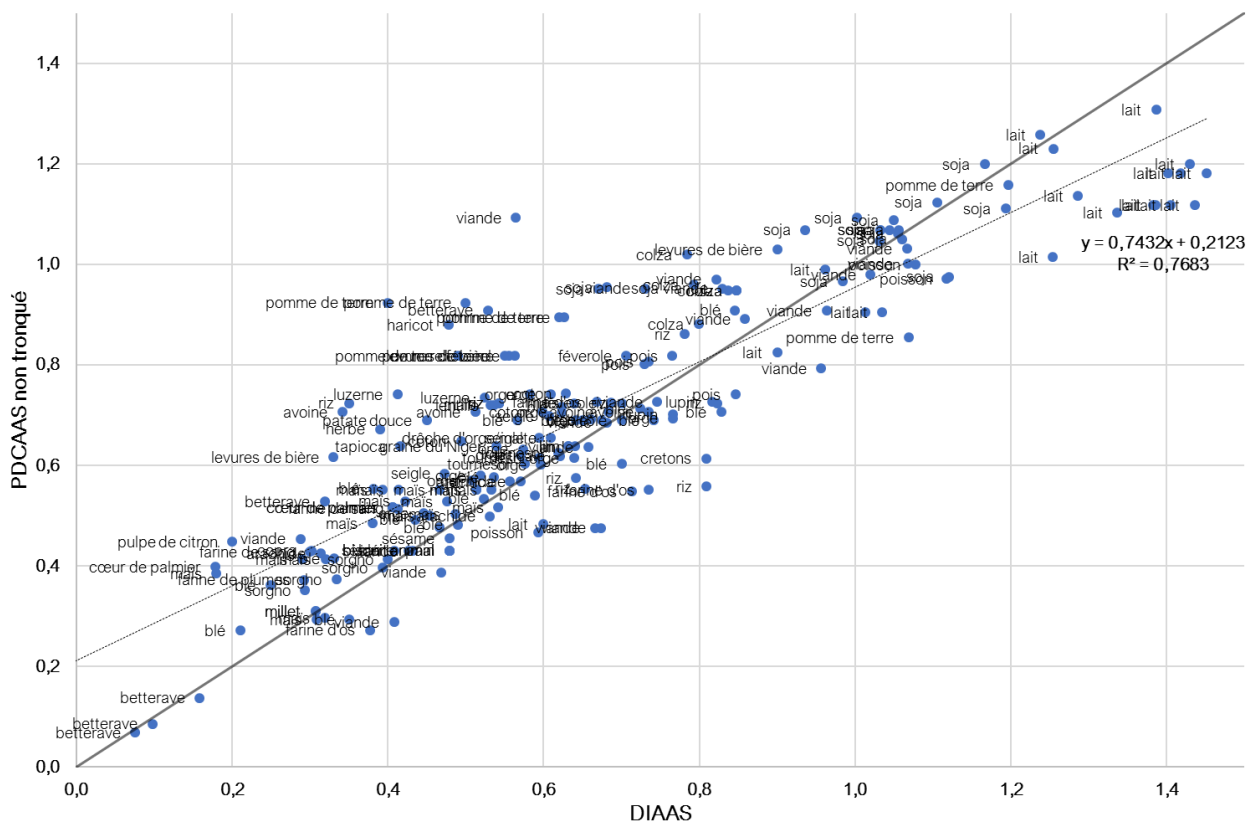
### 1.8.2 Indicateurs de la qualité nutritionnelle des protéines végétales parmi la diversité des protéines alimentaires : comparaison du PDCAAS et du DIAAS

Généralement, les revues sur la qualité nutritionnelle des protéines alimentaires humaines ou animales présentent des digestibilités iléales standardisées ou réelles, voir fécales obtenues chez le Rat, le Porc ou l'Homme, qui associées à l'indice chimique de l'AA limitant, permettent d'estimer un indicateur de qualité protéique similaire au PDCAAS ou DIAAS. Ici, à partir des bases de données CVB, 2016 et AMiPig, 2000, complétées par quelques publications scientifiques, nous avons calculé les DIAAS et PDCAAS fondés sur les quatre aminogrammes de références (Tableau 17) grâce aux profils en AA des aliments et de la digestibilité iléale standardisées de ces AA obtenues chez le Porc ou l'Homme. Les résultats sont présentés dans Tableau 35 en annexe. La Figure 37 met en relation le PDCAAS non tronqué, calculé suivant les recommandations de la FAO en 1991 (FAO and WHO, 1991), en utilisant la digestibilité iléale standardisée plutôt que la digestibilité fécale, avec le DIAAS calculé suivant celles de 2013, en prenant comme référence les enfants âgés, adolescents et adultes (FAO, 2013). Ces deux indices étant considérés comme reflétant la qualité d'une protéine pour la population humaine adulte, ce graphique met en évidence la surestimation globale de la qualité nutritionnelle des protéines de qualité moyenne (DIAAS < 0,8) lorsque le PDCAAS est utilisé.

Le Tableau 35 regroupe les PDCAAS et DIAAS calculées pour les produits de la base de données avec les quatre profils de référence utilisés pour les différentes tranches d'âge. Les matières protéiques à base de blé sont déficientes principalement en lysine et en leucine (pour le germe de blé), avec un DIAAS adulte compris entre 0,21 et 0,74 (hors germe). Pour le pois, les AA soufrés sont limitants pour une valeur de DIAAS adulte comprise entre 0,73 et 0,85. C'est le soja (hors huile) qui possède les protéines de meilleure qualité nutritionnelle parmi les trois sources étudiées, avec des DIAAS adulte allant de 0,94 à 1,19, où les AA limitants sont la valine, la lysine et les AA soufrés. Ces fourchettes donnent des ordres de grandeur et sont à prendre avec précaution, car au sein des catégories créées artificiellement dans le tableau, il existe une variabilité importante due aux différentes conditions de préparations présentées dans les parties 1.2.4 et 1.7.

On peut constater un manque de données concernant la digestion des protéines végétales dans des aliments, ainsi que la standardisation des protocoles *in vitro* qui ne rendent peut-être pas assez compte de la réalité physiologique dépendante des caractéristiques de l'aliment, voire du repas ingéré. Cependant, la complexification du modèle n'impactera peut-être pas ou peu la digestion des protéines, ou en tout cas des constantes que l'on surveille pour étudier cette digestion. Cette thèse vise à répondre à ces interrogations en étudiant la digestion protéique de quatre aliments d'origine végétale selon trois modèles : le modèle animal du mini-porc, le modèle *in vitro* statique standardisé INFOGEST et le

modèle *in vitro* dynamique DiDGI® dont les paramètres aliment-spécifiques ont été déduits des expérimentations réalisées chez le mini-porc. Les objectifs de la thèse sont doubles. D'une part, il s'agira de comprendre la digestion des protéines, en étudiant l'impact de la matrice alimentaire et de la nature protéique, sur la digestion et *in fine* la digestibilité des protéines. D'autre part, il sera question de simuler au mieux la digestion protéique (des Monogastriques, en particulier du Porc) avec des méthodes *in vitro*. Ces deux objectifs sont reliés étroitement, l'achèvement de l'un d'entre eux permettant d'obtenir des éléments de réponse pour l'autre.



**Figure 37 :** PDCAAS non tronqué (calculé avec la digestibilité standard iléale suivant (FAO and WHO, 1991) avec les besoins en AAI des enfants de 2 à 5 ans comme référence) en fonction du DIAAS (calculé suivant (FAO, 2013) avec les besoins en AAI des enfants âgés, adolescents et adultes comme référence) de 210 produits dont les aminogrammes et les digestibilités iléales standardisées obtenues chez l'Homme ou le Porc sont disponibles dans la littérature (AFZ *et al.*, 2000; Gaudichon *et al.*, 2002; Petersen and Stein, 2005; Deglaire *et al.*, 2009; Hackl *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010; Rojas and Stein, 2013; Cervantes-Pahm, Liu and Stein, 2014; CVB Feed Table 2016, 2016; Abelilla, Liu and Stein, 2017; Mathai, Liu and Stein, 2017; Bindari, Lærke and Nørgaard, 2018; Hodgkinson *et al.*, 2018). La droite en trait plein noir est la première bissectrice et la droite en pointillés noirs est la régression linéaire de  $f(\text{DIAAS}) = \text{PDCAAS}$ .

Le schéma présenté en Figure 38 résume la stratégie globale de la thèse et montre les chapitres associés à chaque partie. Ces objectifs impliquent la réponse à des problématiques secondaire et de lever les verrous scientifiques et technologiques suivants :

- Traduire des valeurs cinétiques mesurées dans les trois compartiments gastrique, duodéal et jéjuno-iléal, en mesure de la digestibilité des matrices pour des scientifiques et des industriels ;
- Corréler les résultats de la digestibilité iléale réelle des matrices alimentaires végétales chez le porc avec les résultats mesurés sur le DiDGI®. Faire évoluer les paramètres du digesteur dynamique en fonction des données physiologiques recueillies chez l'animal ;
- Vérifier que la variabilité des expérimentations conduites avec le DiDGI® est inférieure à la variabilité intrinsèque des lots « homogènes » d'animaux ;
- Créer une matrice reliant la nature des protéines végétales et les caractéristiques rhéologiques de l'aliment (liquide, solide...) avec des protocoles spécifiques de paramétrage du DiDGI® ; mesurer les cinétiques de digestion des protéines végétales seules ou dans leur matrice et suivre *in situ* dans le DiDGI® et le porc la libération de peptides.

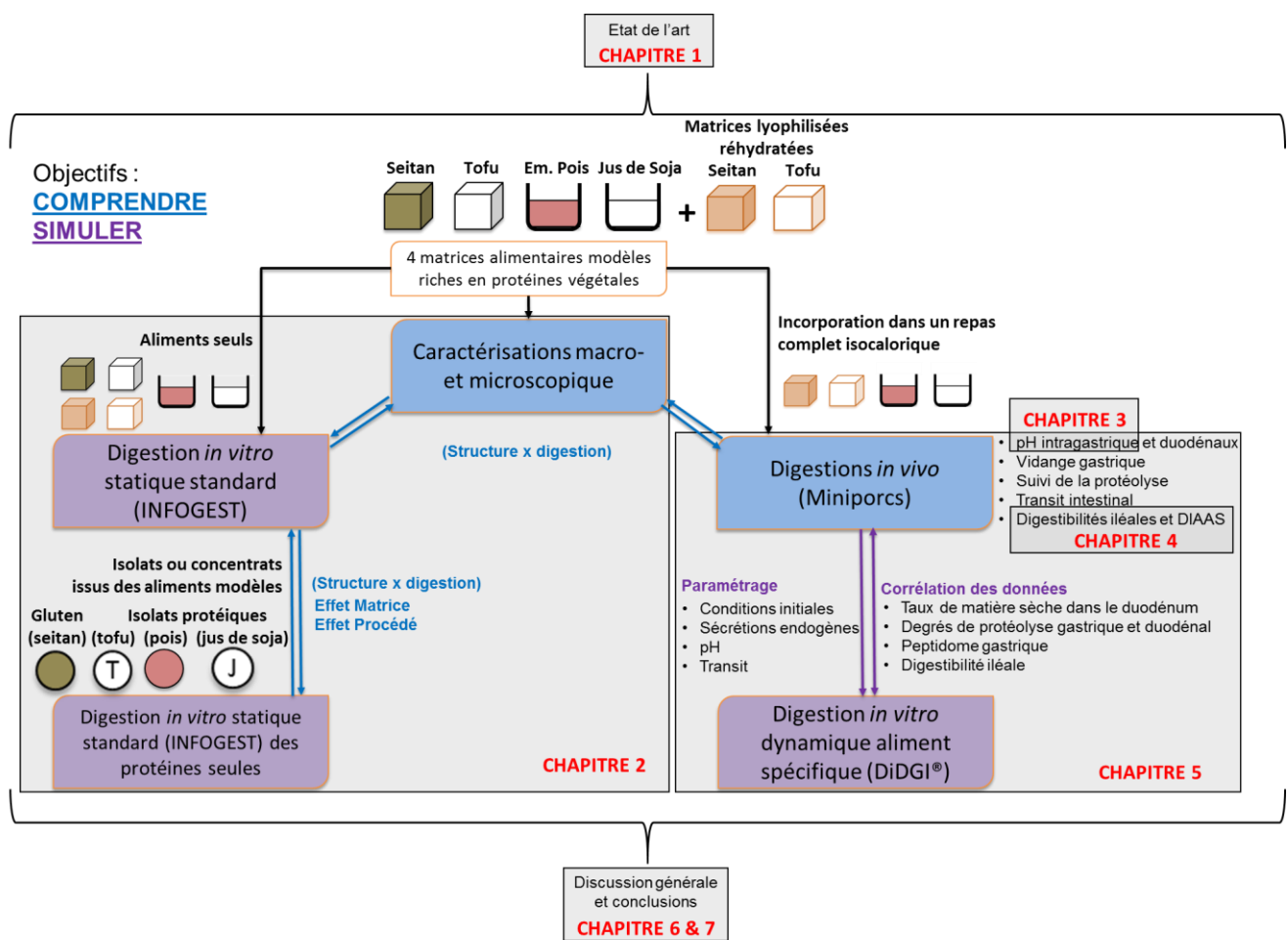


Figure 38 : Schéma de la stratégie globale de thèse.

Les protéines étant majoritairement dégradées dans l'estomac et l'intestin grêle en AA absorbés jusqu'au niveau de l'iléon, il a été décidé d'exclure les sphères buccale et colique de l'étude. Le modèle choisi pour mimer la digestion est le DiDGI<sup>®</sup>, le digesteur *in vitro* dynamique développé par l'INRA et validé pour les formules infantiles (Ménard *et al.*, 2014). Certains paramètres de ce modèle, comme la cinétique de vidange gastrique, de descente en pH gastrique ou le débit du bol dans l'intestin grêle dépendent directement de la nature de l'aliment et doivent donc être déterminés *in vivo*. Le modèle mini-porc a été retenu en raison de la proximité de sa physiologie digestive avec celle de l'homme, et de sa taille, qui permet l'implantation des dispositifs de prélèvement chez des animaux pondéralement stables (Kararli, 1995). Quatre matrices alimentaires végétales liquides et solides, à base de blé, soja et pois ont été choisies pour l'étude. Après avoir caractérisé micro- et macroscopiquement les protéines dans ces aliments et étudié leur comportement vis-à-vis des enzymes digestives en utilisant un protocole statique issu du consensus scientifique INFOGEST (M Minekus *et al.*, 2014; Egger *et al.*, 2015; Brodkorb *et al.*, 2019) (Chapitre 2), les données nécessaires au paramétrage du DiDGI<sup>®</sup> ont été déterminées *in vivo* sur mini-porc (Chapitres 3, 4 et 5) dans le but d'obtenir un modèle *in vitro* de digestion des protéines végétales qui soit plus robuste et représentatif de la réalité physiologique que les protocoles statiques standardisés (Chapitre 6). L'ultime finalité du projet est d'acquérir des valeurs de digestibilités à partir du modèle *in vitro* dynamique DiDGI<sup>®</sup> qui soient cohérentes avec celles obtenues chez le mini-porc. L'obtention *in vitro* de telles données permettrait de calculer des valeurs de DIAAS en s'affranchissant d'expérimentations animales. Les conclusions générales de ce projet de thèse et les perspectives qui en découlent seront exposées dans le chapitre 7.

## Références

- Abelilla, J. J., Liu, Y. and Stein, H. H. (2017) 'Digestible indispensable amino acid score (DIAAS) and protein digestibility corrected amino acid score (PDCAAS) in oat protein concentrate measured in 20- to 30-kilogram pigs', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(1), pp. 410–414. doi: 10.1002/jsfa.8457.
- Adeola, O. *et al.* (1986) 'Comparative availability of amino acids in OAC Wintri triticale and corn for pigs', *Journal of Animal Science*, 63(6), pp. 1862–1869.
- Adler, J. T. (2010) 'Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice', *Journal of Surgical Research*. Elsevier Inc., 158(1), pp. 28–29. doi: 10.1016/j.jss.2009.01.035.
- AFSSA (2007) « *Apport en protéines : consommation, qualité, besoins et recommandations* ».
- AFZ *et al.* (2000) *AMiPig, Ileal Standardised digestibility of amino acids in feedstuffs for pigs*.
- Aguilera, M. (2006) 'Seligman Lecture 2005 Food product engineering : building the right structures', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, pp. 1147–1155. doi: 10.1002/jsfa.
- Arentson, R. A. and Zimmerman, D. R. (1995) 'True digestibility of amino acids and protein in pigs with <sup>13</sup>C as a label to determine endogenous amino acid excretion.', *Journal of animal science*, 73(4), pp. 1077–1085. doi: 10.2527/1995.7341077x.
- Aw, T.-L. and Swanson, B. G. (1985) 'Influence of Tannin on Phaseolus vulgaris Protein Digestibility and Quality', *Journal of Food Science*, 50(1), pp. 67–71.
- Baniel, A. *et al.* (1992) 'Functional Properties of Glycosylated Derivatives of the US Storage Protein from Pea ( Pisum sativum L .)', *J. Agric. Food Chem.*, 40, pp. 200–205. doi: 10.1021/jf00014a007.
- Barroso, E. *et al.* (2015) 'Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract SIMGI', *LWT - Food Science and Technology*, 61, pp. 283–289. doi: 10.1016/j.lwt.2014.12.014.
- Bax, M. L. *et al.* (2013) 'Effects of Meat Cooking, and of Ingested Amount, on Protein Digestion Speed and Entry of Residual Proteins into the Colon: A Study in Minipigs', *PLoS ONE*, 8(4). doi: 10.1371/journal.pone.0061252.
- Baxter, N. J. *et al.* (1997) 'Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation †', *Biochemistry*, 36, pp. 5566–5577.
- Bellmann, S. *et al.* (2016) 'Development of an advanced in vitro model of the stomach and its

evaluation versus human gastric physiology', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 88, pp. 191–198. doi: 10.1016/j.foodres.2016.01.030.

Benjamin, O. *et al.* (2012) 'Development of a model mouth containing an artificial tongue to measure the release of volatile compounds', *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. Elsevier Ltd, 15, pp. 96–103. doi: 10.1016/j.ifset.2012.03.004.

Bindari, Y. R., Lærke, H. N. and Nørgaard, J. V. (2018) 'Standardized ileal digestibility and digestible indispensable amino acid score of porcine and bovine hydrolyzates in pigs', *J Sci Food Agric*, 98(6), pp. 2131–2137. doi: 10.1002/jsfa.8697.

Binnerts, W. T., Van't Klooster, A. T. and Frens, A. M. (1968) 'Soluble Chromium Indicator Measured by Atomic Absorption in Digestion Experiments', *Veterinary Records*, 82, p. 470.

Blanquet-Diot, S. *et al.* (2012) 'Use of Artificial Digestive Systems to Investigate the Biopharmaceutical Factors Influencing the Survival of Probiotic Yeast During Gastrointestinal Transit in Humans', *Pharm*, pp. 1444–1453. doi: 10.1007/s11095-011-0620-5.

Blanquet, S. *et al.* (2001) 'The "biodrug" concept: an innovative approach to therapy', *Trends in Biotechnology*, 19(10), pp. 393–400.

Bohn, T. *et al.* (2018) 'Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models?', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), pp. 2239–2261. doi: 10.1080/10408398.2017.1315362.

Boirie, Y. *et al.* (1995) 'Production of large amounts of [<sup>13</sup>C] leucine-enriched milk proteins by lactating cows', *The Journal of Nutrition*, 125(1), pp. 92–98.

Bornhorst, G. M. *et al.* (2014) 'Gastric pH Distribution and Mixing of Soft and Rigid Food Particles in the Stomach using a Dual-Marker Technique', *Food Biophysics*, 9(3), pp. 292–300. doi: 10.1007/s11483-014-9354-3.

Bornhorst, G. M. (2017) 'Gastric Mixing During Food Digestion: Mechanisms and Applications', *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 8, pp. 523–542. doi: 10.1146/annurev-food-030216-025802.

Bornhorst, G. M. and Singh, R. P. (2014) 'Gastric Digestion In Vivo and In Vitro: How the Structural Aspects of Food Influence the Digestion Process', *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 5, pp. 111–132. doi: 10.1146/annurev-food-030713-092346.

Boye, J., Wijesinha-Bettoni, R. and Burlingame, B. (2012) 'Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method', *British*

*Journal of Nutrition*, 108(S2), pp. S183–S211. doi: 10.1017/S0007114512002309.

Bradford, M. M. (1976) ‘A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding’, *Analytical Biochemistry*, 72, pp. 248–254.

Brodkorb, A. *et al.* (2019) ‘INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion’, *Nature Protocol*, 14(4), p. 991. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1.

Bryant, C. M. and McClements, D. J. (1998) ‘Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat- denatured whey’, *Trends in Food Science & Technology*, 9, pp. 143–151.

Bueno, L. *et al.* (1982) ‘Effects of Motilin , Somatostatin , and Pancreatic Polypeptide on the Migrating Myoelectric Complex in Pig and Dog’, *Gastroenterology*. Elsevier Masson SAS, 82(6), pp. 1395–1402. doi: 10.1016/0016-5085(82)90075-0.

Butts, C. A. *et al.* (1993) ‘Endogenous Lysine and Other Amino Acid Flows at the Terminal Ileum of the Growing Pig (20 kg Bodyweight): The Effect of Protein- Free , Synthetic Amino Acid , Peptide and Protein Alimentation’, *J Sci Food Agric*, 61(1), pp. 31–40.

Carbonaro, M., Maselli, P. and Nucara, A. (2012) ‘Relationship between digestibility and secondary structure of raw and thermally treated legume proteins: A Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic study’, *Amino Acids*, 43(2), pp. 911–921. doi: 10.1007/s00726-011-1151-4.

Carbonaro, M., Maselli, P. and Nucara, A. (2015) ‘Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties’, *Food Research International*. Elsevier Ltd, 76, pp. 19–30. doi: 10.1016/j.foodres.2014.11.007.

Cervantes-Pahm, S. K., Liu, Y. and Stein, H. H. (2014) ‘Digestible indispensable amino acid score and digestible amino acids in eight cereal grains’, *Brit. J. Nutr.*, 111, pp. 1663–1672. doi: 10.1017/S0007114513004273.

Cervantes-Pahm, S. K. and Stein, H. H. (2008) ‘Effect of dietary soybean oil and soybean protein concentration on the concentration of digestible amino acids in soybean products fed to growing pigs’, *Journal of Animal Science*, 86(8), pp. 1841–1849. doi: 10.2527/jas.2007-0721.

Charlton, A. J. *et al.* (2002) ‘Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation’, *J Agric Food Chem*, 50, pp. 1593–1601. doi: 10.1021/jf010897z.

Chastanet, F. *et al.* (2007) ‘Effect of feeding schedule on apparent energy and amino acid digestibility by growing pigs’, *Animal Feed Science and Technology*, 132(3519), pp. 94–102. doi:

10.1016/j.anifeedsci.2006.03.012.

Chen, J. *et al.* (2011) 'Development of a simple model device for in vitro gastric digestion investigation', *Food & Function*, 2, pp. 174–182. doi: 10.1039/c0fo00159g.

Chen, L. *et al.* (2016) 'Gastric emptying and morphology of a “near real” in vitro human stomach model (RD-IV-HSM)', *Journal of Food Engineering*. Elsevier Ltd, 183, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2016.02.025.

Chen, N., Zhao, M. and Sun, W. (2013) 'Effect of protein oxidation on the in vitro digestibility of soy protein isolate', *Food Chemistry*, 141, pp. 3224–3229. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.113.

Chen, S. (1989) 'Preparation of fluid soymilk', in *Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs*, pp. 2–7.

Chessa, S. *et al.* (2014) 'Application of the Dynamic Gastric Model to evaluate the effect of food on the drug release characteristics of a hydrophilic matrix formulation', *International Journal of Pharmaceutics*. Elsevier B.V., 466, pp. 359–367. doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.03.031.

Choi, S. M. and Ma, C. Y. (2005) 'Conformational study of globulin from common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by Fourier transform infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry', *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), pp. 8046–8053.

Church, F. C. *et al.* (1983) 'Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins', *Journal of Dairy Science*, 66(6), pp. 1219–1227. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2.

Citters, G. W. Van and Lin, H. C. (2011) 'Ileal brake: Neuropeptidergic control of intestinal transit', *Current Gastroenterology Reports*, 8(5), pp. 367–373.

Clark, A. H., Kavanagh, G. M. and Ross-Murphy, S. B. (2001) 'Globular protein gelation-theory and experiment', *Food Hydrocolloids*, 15, pp. 383–400.

Cleary, P. W. *et al.* (2013) 'Prediction of industrial, biophysical and extreme geophysical flows using particle methods', *Engineering Computations: International Journal for Computer-Aided Engineering and Software*, 30(2), pp. 157–196. doi: 10.1108/02644401311304845.

Clench, M. H., Pineiro-Carrero, V. M. and Mathias, J. R. (1989) 'Migrating myoelectric complex demonstrated in four avian species', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 256(3), pp. G598–G603.

Coate, K. C., Kliever, S. A. and Mangelsdorf, D. J. (2014) 'SnapShot: Hormones of the Gastrointestinal Tract Hormone Site(s) of Production Stimulus for Secretion Receptor / Site of Action



Major Function(s)', *Cell*, 159, p. 1478. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.026.

Crépon, K. *et al.* (2010) 'Field Crops Research Nutritional value of faba bean ( *Vicia faba* L .) seeds for feed and food', *Field Crops Research*, 115(3), pp. 329–339. doi: 10.1016/j.fcr.2009.09.016.

Crooker, B. A., Clark, J. H. and Shanks, R. D. (1982) 'Rare earth elements as markers for rate of passage measurements of individual feedstuffs through the digestive tract of ruminants', *Journal of Nutrition*, 112(7), pp. 1353–1361. doi: 10.1093/jn/112.7.1353.

Lo Curto, A. *et al.* (2011) 'Survival of probiotic lactobacilli in the upper gastrointestinal tract using an in vitro gastric model of digestion', *Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 28(7), pp. 1359–1366. doi: 10.1016/j.fm.2011.06.007.

*CVB Feed Table 2016* (2016).

Damodaran, S. and Parkin, K. L. (2017) *Fennema's food chemistry Fifth Edition*. CRC press.

Danielsson, C. E. (1949) 'Seed Globulins of the Gramineae and Leguminosae', *Biochem J*, 44(4), pp. 387–400.

Darcy, B. and Laplace, J. P. (1981) 'Nutritional balances in pigs according to starch nature (wheat or maize) and protein source (fish-meal or gluten)[apparent digestibility, metabolic utilization]', in *Annales de Zootechnie (France)*.

Darragh, A. J. and Hodgkinson, S. M. (2000) 'Criteria and Significance of Dietary Protein Quantifying the Digestibility of Dietary Protein 1', *The Journal of Nutrition*, pp. 1850–1856.

Davies, B. and Morris, T. (1993) 'Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans', *Pharmaceutical Research*, 10(7), pp. 1093–1095.

Deglaire, A. *et al.* (2009) 'Ileal digestibility of dietary protein in the growing pig and adult human', *The British journal of nutrition*, 102(12), pp. 1752–9. doi: 10.1017/S0007114509991267.

Delisle, J. and Canada, A. (1984) 'Nutritive value of protein fractions extracted from soybean, rapeseed and wheat flours in the rat', *Plant Foods for Human Nutrition*, 34(4), pp. 243–251.

Dersjant-Li, Y. *et al.* (2001) 'Feed intake, growth, digestibility of dry matter and nitrogen in young pigs as affected by dietary cation–anion difference and supplementation of xylanase.', *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85(3–4), pp. 101–109.

Desesso, J. M. and Williams, A. L. (2008) 'Contrasting the Gastrointestinal Tracts of Mammals: Factors that Influence Absorption', *Annual Reports in Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS, 43, pp. 353–371. doi: 10.1016/S0065-7743(08)00021-3.

Devi, S. *et al.* (2018) ‘Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method’, *Am J Clin Nutr*, 107, pp. 984–991. doi: 10.1093/ajcn/nqy062.

Donald, A. (2004) ‘Food for thought’, *Nature Materials*, 3, pp. 579–581.

Donkoh, A. and Moughan, P. J. (1994) ‘The effect of dietary crude protein content on apparent and true ileal nitrogen and amino acid digestibilities’, *Brit. J. Nutr.*, 72(1), pp. 59–68.

Drago, S. R. *et al.* (2011) ‘Relationships between saliva and food bolus properties from model dairy products’, *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 25(4), pp. 659–667. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.07.024.

Dressman, J. B. (1986) ‘Comparison of Canine and Human Gastrointestinal Physiology’, *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, pp. 123–131. doi: 10.1023/A:1016353705970.

Drulyte, D. and Orlie, V. (2019) ‘The Effect of Processing on Digestion of Legume Proteins’, *Foods*, 8(6), p. 224.

Dupont, D. *et al.* (2019) ‘Can dynamic in vitro digestion systems mimic the physiological reality?’, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor & Francis, 59(10), pp. 1546–1562. doi: 10.1080/10408398.2017.1421900.

Egger, L. *et al.* (2015) ‘The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action’, *Food Research International*. The Authors, 88, pp. 217–225. doi: 10.1016/j.foodres.2015.12.006.

Elashoff, J., Reedy, T. and Meyer, J. (1982) ‘Analysis of gastric emptying data’, *Gastroenterology*. American Gastroenterological Association, 83(6), pp. 1306–12. doi: 10.1016/S0016-5085(82)80145-5.

Ellis, W. C., Wylie, M. J. and Matis, J. H. (2002) ‘Validity of specifically applied rare earth elements and compartmental models for estimating flux of undigested plant tissue residues through the gastrointestinal tract of ruminants’, *Journal of Animal Science*, 80(10), pp. 2753–2758.

Engelhardt, H. and Aitzetmuller, K. (1986) *Practice of high performance liquid chromatography: applications, equipment and quantitative analysis*. Springer.

Evenepoel, P. *et al.* (1999) ‘Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans’, *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 277(5), pp. G935–G943.

Faichney, G. J. and Griffiths, D. A. (1978) ‘Behaviour of solute and particle markers in the

stomach of sheep given a concentrate diet', *Br. J. Nutr.*, 40(1), pp. 71–82.

Faichney, G. J., Poncet, C. and Boston, R. C. (1989) 'Passage of Internal and External Markers of Particulate Matter Through the Rumen of Sheep', *Reproduction Nutrition Development*, 29(3), pp. 325–337. doi: 10.1051/rnd:19890311.

FAO (2013) *Report of an FAO Expert Consultation: Dietary protein quality evaluation in human nutrition*.

FAO (2014) *Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods. FAO Food and Nutrition. In: Report of a FAO Expert Working Group. Bangalore, India*.

FAO (2015) *Développer des alimentaires durables. Principes directeurs*.

FAO and WHO (1991) *Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation (1989: Bethesda, Maryland)*.

FAO, WHO and UNU (2007) *Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition: Protein and amino acid requirements in human nutrition*.

Fardet, A., Souchon, I. and Dupont, D. (2013) 'Structure des aliments et effets nutritionnels', p. 470.

Fernández, J. and Jørgensen, J. N. (1986) 'Digestibility and absorption of nutrients as affected by fibre content in the diet of the pig. Quantitative aspects', *Livestock Production Science*, 15(1), pp. 53–71.

Féron, G. and Salles, C. (2013) 'Rôle de la sphère orale', in *Structure des aliments et effets nutritionnels*, pp. 35–55.

Fersht, A. (1999) *Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding*. Macmillan.

Le Feunteun, S. *et al.* (2014) 'Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig In Vivo Data', *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), pp. 1099–1113. doi: 10.1007/s11947-013-1116-6.

Floc'h, L. and Seve, B. (2000) 'Le devenir des protéines et des acides aminés dans l'intestin du porc: de la digestion à l'apparition dans la veine porte', *Productions Animales*, 5(13), pp. 303–314.

Floury, J. *et al.* (2018) 'Exploring the breakdown of dairy protein gels during in vitro gastric digestion using time-lapse synchrotron deep-UV fluorescence microscopy', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 239, pp. 898–910. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.07.023.

Fonseca, M. R. J., Fryer, O. G. P. J. and Bakalis, M. S. J. W. S. (2016) 'Digestion of starch in a dynamic small intestinal model', *European Journal of Nutrition*. Springer Berlin Heidelberg, 55(8), pp. 2377–2388. doi: 10.1007/s00394-015-1044-5.

Fordtran, J. S. *et al.* (1966) 'Ionic Constituents and Osmolality of Gastric and Small-Intestinal Fluids after Eating', *American journal of digestive diseases*, 11(7), pp. 503–521. Available at: <http://download.springer.com/static/pdf/124/art%253A10.1007%252F02233563.pdf?originUrl=http%253A%252F%252Flink.springer.com%252Farticle%252F10.1007%252F02233563&token2=exp=1491719792~acl=%252Fstatic%252Fpdf%252F124%252Fart%25253A10.1007%2525252F02233563> (Accessed: 9 April 2017).

Fouillet, H. *et al.* (2001) 'Energy nutrients modulate the splanchnic sequestration of dietary nitrogen in humans: a compartmental analysis', *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 281(2), pp. E248–E260.

Freitas, D. *et al.* (2018) 'The important role of salivary  $\alpha$ -amylase in the gastric digestion of wheat bread starch', *Food and Function*. Royal Society of Chemistry, 9(1), pp. 200–208. doi: 10.1039/c7fo01484h.

Furness, J. B., Cottrell, J. J. and Bravo, D. M. (2015) 'Comparative physiology of digestion', *Journal of Animal Science*, pp. 485–491. doi: 10.2527/jas2014-8481.

Le Gall, M. *et al.* (2005) 'Identification of Dietary and Endogenous Ileal Protein Losses in Pigs by Immunoblotting and Mass Spectrometry', *J. Nutr.*, 135(5), pp. 1215–1222. Available at: <http://jn.nutrition.org/content/135/5/1215.full>.

Ganapathy, V. (2012) 'Protein Digestion and Absorption', in *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. First Edit. Elsevier Inc., pp. 1595–1624. doi: 10.1016/B978-0-12-382026-6.00059-2.

Gatellier, P. *et al.* (2009) 'Determination of aromatic amino acid content in cooked meat by derivative spectrophotometry : Implications for nutritional quality of meat', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 114(3), pp. 1074–1078. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.009.

Gatellier, P., Kondjoyan, A. and Portanguen, S. (2010) 'Effect of cooking on protein oxidation in n -3 polyunsaturated fatty acids enriched beef . Implication on nutritional quality', *Meat Science*. Elsevier Ltd, 85(4), pp. 645–650. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.03.018.

Gaudichon, C. *et al.* (2002) 'Ileal Losses of Nitrogen and Amino Acids in Humans and Their Importance to the Assessment of Amino Acid Requirements', *Gastroenterology*, 123, pp. 50–59. doi: 10.1053/gast.2002.34233.

GEPV (2019) *Les protéines végétales en plein essor !*

Gérard-Champod, M. *et al.* (2010) 'Development and Validation of a Continuous In Vitro System Reproducing Some Biotic and Abiotic Factors of the Veal Calf Intestine ', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(16), pp. 5592–5600. doi: 10.1128/AEM.00524-10.

Gerbens-leenes, P. W., Nonhebel, S. and Krol, M. S. (2010) 'Food consumption patterns and economic growth . Increasing affluence and the use of natural resources', *Appetite*, 55, pp. 597–608. doi: 10.1016/j.appet.2010.09.013.

Gilani, G. S. (2012) 'Background on international activities on protein quality assessment of foods', *British Journal of Nutrition*, 108(S2), pp. S168–S182. doi: 10.1017/S0007114512002383.

Gilani, G. S., Xiao, C. X. and Cockell, K. A. (2012) 'Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality', *British Journal of Nutrition*, 108(S2), pp. S315–S332. doi: 10.1017/S0007114512002371.

Godon, B. (1996) *Protéines Végétales. 2ème édition, Lavoisier Tec&Doc.*

González, A. D., Frostell, B. and Carlsson-Kanyama, A. (2011) 'Protein efficiency per unit energy and per unit greenhouse gas emissions : Potential contribution of diet choices to climate change mitigation', *Food Policy*, 36, pp. 562–570. doi: 10.1016/j.foodpol.2011.07.003.

Gouseti, O. *et al.* (2014) 'Hydrocolloids in human digestion : Dynamic in-vitro assessment of the effect of food formulation on mass transfer', *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 42, pp. 378–385. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.06.004.

Gouseti, O. *et al.* (2019) *Interdisciplinary Approaches to Food Digestion.*

Goyal, R. K., Guo, Y. and Mashimo, H. (2019) 'Advances in the physiology of gastric emptying', *Neurogastroenterology and Motility*, pp. 1–14. doi: 10.1111/nmo.13546.

Grala, W. *et al.* (1998) 'Ileal apparent protein and amino acid digestibilities and endogenous nitrogen losses in pigs fed soybean and rapeseed products', *Journal of animal science*, 76(2), pp. 557–568.

Gruen, L. C., Guthrie, R. E. and Blagrove, R. J. (1987) 'Structure of a major pea seed albumin: Implication of a free sulphhydryl group', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 41(2), pp. 167–178. doi: 10.1002/jsfa.2740410210.

Guerra, A. *et al.* (2012) 'Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion', *Trends in Biotechnology*, 30(11), pp. 591–600. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.08.001.

Guerra, A. *et al.* (2016) 'Development and Validation of a New Dynamic Computer-Controlled Model of the Human Stomach and Small Intestine', *Biotechnology and Bioengineering*, 113(6), pp. 1325–1335. doi: 10.1002/bit.25890.

Guilloteau, P. *et al.* (2010) 'Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man?', *Nutrition research reviews*, 23(1), pp. 4–22. doi: 10.1017/S0954422410000077.

Hackl, W. *et al.* (2010) 'Effects of ensiling cereal grains (barley, wheat, triticale and rye) on total and pre-caecal digestibility of proximate nutrients and amino acids in pigs', *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94, pp. 729–735. doi: 10.1111/j.1439-0396.2010.01032.x.

Hagemeister, H. and Erbersdobler, H. (1985) 'Chemical labeling of dietary-protein by transformation of lysine to homoarginine - a new technique to follow intestinal digestion and absorption', in *Proceedings of the Nutrition Society*, pp. A133–A133.

Hamuro, Y. *et al.* (2008) 'Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions', *Rapid communications in mass spectrometry*, 22, pp. 1041–1046. doi: 10.1002/rcm.

Hartman, R. J. and Cheng, L. T. (1936) 'Isoelectric point of glycinin', *The Journal of Physical Chemistry*, 40(4), pp. 453–459. doi: 10.1021/j150373a004.

Hatton, G. B. *et al.* (2015) 'Animal Farm : Considerations in Animal Gastrointestinal Physiology and Relevance to Drug Delivery in Humans', *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Elsevier Masson SAS, 104(9), pp. 2747–2776. doi: 10.1002/jps.24365.

Haydon, K. D. and West, J. W. (1990) 'Effect of dietary electrolyte balance on nutrient digestibility determined at the end of the small intestine and over the total digestive tract in growing pigs', *Journal of Animal Science*, 68(11), pp. 3687–3693.

Hellström, P. M., Grybäck, P. and Jacobsson, H. (2006) 'The physiology of gastric emptying', *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, 20(3), pp. 397–407. doi: 10.1016/j.bpa.2006.02.002.

Hellwig, M. and Henle, T. (2014) 'Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction', *Angewandte Chemie International Edition*, 53(39), pp. 10316–10329. doi: 10.1002/anie.201308808.

Henze, L. J. *et al.* (2018) 'The pig as a preclinical model for predicting oral bioavailability and in vivo performance of pharmaceutical oral dosage forms : a PEARRL review', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71, pp. 581–602. doi: 10.1111/jphp.12912.

Herkelman, K. L. *et al.* (1991) 'Apparent Digestibility of Amino Acids in Raw and Heated Conventional and Low-Trypsin-Inhibitor Soybeans for Pigs ' f2', *Journal of Animal Science*, 70(3), pp. 818–826.

Hess, V. *et al.* (2000) 'Comparison of the isotope dilution method for determination of the ileal endogenous amino acid losses with labelled diet and labelled pigs', *British Journal of Nutrition*, 83(2), pp. 123–130.

Hess, V. and Sève, B. (1999) 'Effects of Body Weight and Feed Intake Level on Basal Ileal Endogenous Losses in Growing Pigs', *J. Anim. Sci*, 77, pp. 3281–3288.

Hodgkinson, S. M. *et al.* (2000) 'The effect of dietary peptide concentration on endogenous ileal amino acid loss in the growing pig', *Brit. J. Nutr.*, 83, pp. 421–430.

Hodgkinson, S. M. *et al.* (2018) 'Cooking Conditions Affect the True Ileal Digestible Amino Acid Content and Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) of Bovine Meat as Determined in Pigs', *The Journal of Nutrition*, 148, pp. 1564–1569. doi: 10.1093/jn/nxy153.

Hoebler, C. *et al.* (2000) 'Particle size of solid food after human mastication and in vitro simulation of oral breakdown', *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 51, pp. 353–366.

Hofmann, A. F. and Mysels, K. J. (1992) 'Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo : the role of conjugation , pH , and Ca \* + ions', *Journal of lipid research*, 33, pp. 627–626. Available at: [https://www.researchgate.net/profile/Alan\\_Hofmann/publication/21537090\\_Bile\\_acid\\_solubility\\_and\\_precipitation\\_in\\_vitro\\_and\\_in\\_vivo\\_The\\_role\\_of\\_conjugation\\_pH\\_and\\_Ca2\\_ions/links/0046351717e3652636000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Alan_Hofmann/publication/21537090_Bile_acid_solubility_and_precipitation_in_vitro_and_in_vivo_The_role_of_conjugation_pH_and_Ca2_ions/links/0046351717e3652636000000.pdf) (Accessed: 9 April 2017).

Hou, D. H. J. and Chang, S. K. C. (2004) 'Structural Characteristics of Purified Glycinin from Soybeans Stored under Various Conditions', *J. Agric. Food Chem*, 52(12), pp. 3792–3800. doi: 10.1021/jf035072z.

Hou, H. J. and Chang, K. C. (2004) 'Structural Characteristics of Purified -Conglycinin from Soybeans Stored under Four Conditions', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 7931–7937. doi: 10.1021/jf049430p.

Hu, Y. *et al.* (2010) 'Nutritional evaluation of genetically modified rice expressing human lactoferrin gene', *Journal of Cereal Science*. Elsevier Ltd, 52(3), pp. 350–355. doi: 10.1016/j.jcs.2010.05.008.

Huisman, J. *et al.* (1992) 'True protein digestibility and amounts of endogenous protein measured with the 15 N-dilution technique in piglets fed on peas (*Pisum sativum*) and common beans (*Phaseolus vulgaris*)', *Brit. J. Nutr.*, 68(1), pp. 101–110.

Huisman, J. and Jansman, A. J. M. (1991) 'Dietary effects and some analytical aspects of antinutritional factors in peas (*Pisum sativum*), common beans (*Phaseolus vulgaris*) and soybeans (*Glycine max*) in monogastric farm animal', in *Antinutritional effects of legume seeds in piglets, rats and chickens*, p. 5.

Hur, S. J. *et al.* (2011) 'In vitro human digestion models for food applications', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 125(1), pp. 1–12. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.08.036.

Inouye, K. and Fruton, J. S. (1969) 'The Side-Chain Specificity of Pepsin', *Biochemistry*, 8(10), pp. 4183–4190. doi: 10.1021/bi00838a041.

Jacquez, J. A. and Simon, C. P. (1993) 'Qualitative Theory of Compartmental Systems Author ( s ): John A . Jacquez and Carl P . Simon Published by : Society for Industrial and Applied Mathematics Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2132525> JSTOR is a not-for-profit service that helps schol', *SIAM Review*, 1, pp. 43–79.

Jalabert-Malbos, M. *et al.* (2007) 'Particle size distribution in the food bolus after mastication of natural foods', *Food Quality and Preference*, 18, pp. 803–812. doi: 10.1016/j.foodqual.2007.01.010.

Jansman, A. J., Frohlich, A. A. and Marquardt, R. R. (1994) 'Production of proline-rich proteins by the parotid glands of rats is enhanced by feeding diets containing tannins from faba beans (*Vicia faba* L.)', *The Journal of Nutrition*, 124(2), pp. 249–258.

Janssen, S. and Depoortere, I. (2013) 'Nutrient sensing in the gut : new roads to therapeutics ?', *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Elsevier Ltd, 24(2), pp. 92–100. doi: 10.1016/j.tem.2012.11.006.

Jarrige, R. (1995) *Nutrition des ruminants domestiques : ingestion et digestion*.

Jochems, P. *et al.* (2018) 'Evaluating Human Intestinal Cell Lines for Studying Dietary Protein Absorption', *Nutrients*, 10(3), p. 322. doi: 10.3390/nu10030322.

Juillet, B. *et al.* (2008) 'Increasing habitual protein intake results in reduced postprandial efficiency of peripheral , anabolic wheat protein nitrogen use in humans', *Am J Clin Nutr*, 87(3), pp. 666–678.

Juste, C., Corring, T. and Breant, P. (1969) 'Excrétion biliaire chez le porc : niveau et réponse au repas', *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19(1A), pp. 79–90.



Juste, C., Demarne, Y. and Corring, T. (1983) 'Response of bile flow, biliary lipids and bile acid pool in the pig to quantitative variations in dietary fat', *Journal of Nutrition*, 113(9), pp. 1691–1701. doi: 10.1093/jn/113.9.1691.

Kabil, O., Vitvitsky, V. and Banerjee, R. (2014) 'Sulfur as a Signaling Nutrient Through Hydrogen Sulfide', *Annual review of nutrition*, 34, pp. 171–205. doi: 10.1146/annurev-nutr-071813-105654.

Kararli, T. T. (1995) 'Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals.', *Biopharm Drug Dispos.*, 16, pp. 351–380.

Kim, S. B. *et al.* (2007) 'Enzymatic Hydrolysis of Heated Whey: Iron-Binding Ability of Peptides and Antigenic Protein Fractions', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 90(9), pp. 4033–4042. doi: 10.3168/jds.2007-0228.

Kimura, A. *et al.* (2008) 'Comparison of Physicochemical Properties of 7S and 11S Globulins from Pea, Fava Bean, Cowpea, and French Bean with Those of Soybean-French Bean 7S Globulin Exhibits Excellent Properties', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 10273–10279.

Koehler, T. *et al.* (1992) 'A note on the effect of a saccharose/corn starch supplementation on the apparent ileal amino acid digestibility in pigs', *Agribiological research (Germany, FR)*.

Köhler, T. *et al.* (1990) 'Comparison of Different Digesta Collection Methods to Determine the Apparent Digestibilities of the Nutrients at the Terminal Ileum in Pigs', *J Sci Food Agric*, 53(4), pp. 465–475.

Kong, F. and Singh, R. P. (2008a) 'A model stomach system to investigate disintegration kinetics of solid foods during gastric digestion', *Journal of Food Science*, 73(5), pp. 202–210. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00745.x.

Kong, F. and Singh, R. P. (2008b) 'Disintegration of solid foods in human stomach', *Journal of Food Science*, 73(5), pp. 67–80. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x.

Kotb, A. R. and Luckey, T. D. (1972) 'Markers in Nutrition', *Nutrition Abstracts & Reviews*, 42(3), pp. 813–845.

Koutsopoulos, S. *et al.* (2007) 'Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces', *Langmuir*, 23(4), pp. 2000–2006. doi: 10.1021/la062238s.

Kozhevnikov, G. O. *et al.* (2001) 'Comparative studies on thermodynamic characteristics of pea legumin and legumin-T thermal denaturation', *International Journal of Biological Macromolecules*, 29, pp. 225–236.

Krul, C. *et al.* (2000) 'Application of a dynamic in vitro gastrointestinal tract model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds', *Food and Chemical Toxicology*, 38, pp. 783–792.

Kuwata, K. *et al.* (2001) 'Structural and kinetic characterization of early folding events in  $\beta$ -lactoglobulin', *Nature Structural & Molecular Biology*, 8(2), p. 151.

Lacroix, M. (2008) *Variations qualitatives & quantitatives de l'apport en protéines laitières chez l'animal & l'homme : implications métaboliques*.

Laguna, L. *et al.* (2017) 'In vitro gastrointestinal digestion of pea protein isolate as a function of pH, food matrices, autoclaving, high-pressure and re-heat treatments', *LWT - Food Science and Technology*, 84, pp. 511–519. doi: 10.1016/j.lwt.2017.06.021.

Lajolo, F. M. and Genovese, M. I. (2002) 'Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), pp. 6592–6598. doi: 10.1021/jf020191k.

Lakemond, C. M. M. *et al.* (2000) 'Soy glycinin: Influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), pp. 1985–1990. doi: 10.1021/jf9908695.

Lamine, C. (2008) *Les intermittents du bio: pour une sociologie pragmatique des choix alimentaires émergents*. Quae.

De Lange, C. F. M. *et al.* (1979) 'Isotope Dilution Techniques Versus the  $^{15}\text{N}$ -Isotope Dilution Technique for Determining the Recovery of Endogenous Protein and Amino Acids in Digesta Collected from the Distal Ileum in Pigs', *Journal of animal science*, 70(6), pp. 1848–1856.

Ledl, F. and Schleicher, E. (1990) 'New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body', *Angewandte Chemie International Edition in English*, 9(6), pp. 565–594.

Ledoux, D. R. and Martz, F. A. (1991) 'Ruminal Solubilization of selected Macrominerals from Forages and Diets', *Journal of dairy science*, 74(5), pp. 1654–1661. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78328-8.

Lefranc-Millot, C. and Teichman-Dubois, V. (2019) 'Protein from Vegetable Sources: A Focus on Pea Protein', in *Novel Proteins for Food, Pharmaceuticals and Agriculture Sources, Applications and Advances*, pp. 197–216.

Lei, X. J. *et al.* (2017) 'Evaluation of different dietary electrolyte balance in weanling pigs diets', *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier B.V., 226, pp. 98–102. doi:

10.1016/j.anifeedsci.2017.02.014.

Lemieux, L., Puchades, R. and Simard, R. E. (1990) 'Free Amino Acids in Cheddar Cheese : Comparison Quantitation Methods', *Journal of Food Science*, 55(6), pp. 1552–1554.

Lentle, R. G. *et al.* (2012) 'A comparison of the organization of longitudinal and circular contractions during pendular and segmental activity in the duodenum of the rat and guinea pig', *Neurogastroenterology and Motility*, 24(7), pp. 698–e298. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01923.x.

Lentle, R. G. (2018) 'Deconstructing the physical processes of digestion: reductionist approaches may provide greater understanding', *Food & function*, 9(8), pp. 4069–4084. doi: 10.1039/C8FO00722E.

León, A., Rosell, C. M. and De Barber, C. B. (2003) 'A differential scanning calorimetry study of wheat proteins', *European Food Research and Technology*, 217(1), pp. 13–16. doi: 10.1007/s00217-003-0699-y.

Leterme, P. *et al.* (1996) 'The use of 15N-Labeled Dietary Proteins for Determining True ileal Amino Acid Digestibilities Is Limited by Their Rapid Recycling in the Endogenous Secretions of Pigs', *The journal of nutrition*, 126(9), pp. 2188–2198.

Leterme, P. and Théwis, A. (2004) 'Effect of pig bodyweight on ileal amino acid endogenous losses after ingestion of a protein-free diet enriched in pea inner fibre isolates', *Reproduction Nutrition Development*, 44(5), pp. 407–417. doi: 10.1051/rnd.

Leterme, P., Thewis, A. and Beckersa, Y. (1990) 'Apparent and True Ileal Digestibility of Amino Acids and Nitrogen Balance Measured in Pigs with Ileo-rectal Anastomosis or T-cannulas , Given a Diet Containing Peas', *J Sci Food Agric*, 52, pp. 485–497.

Levitt, M. and Chothia, C. (1976) 'Structural patterns in globular proteins', *Nature*, 261(17), pp. 552–558.

Li, S. and Sauer, W. C. (1994) 'The Effect of Dietary Fat Content on Amino Acid Digestibility in Young Pigs', *Journal of Animal Science*, 72(7), pp. 1737–1743.

Li, S., Sauer, W. C. and Caine, W. R. (1998) 'Response of Nutrient Digestibilities to Feeding Diets with Low and High Levels of Soybean Trypsin Inhibitors in Growing Pigs', *J Sci Food Agric*, 76, pp. 357–363.

Liener, I. E. (1994) 'Implications of antinutritional components in soybean foods', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(1), pp. 37–67.

Lindner, A. B. J. (1989) 'Modern industrial soymilk processing', in *Proceedings of the 7th world*

*congress of food science and technology, 28/9 - 2/10/1987, Singapore. Trends in Food Processing II, Singapore, 28 - 32.*

Liu *et al.* (2014) 'Effects of protein concentration and heat treatment on concentration of digestible and metabolizable energy and on amino acid digestibility in four sources of canola meal fed to growing pigs', *Journal of Animal Science*, 92(10), pp. 4466–4477. doi: 10.2527/jas2013-7433.

Liu, K. and Hsieh, F. H. (2008) 'Protein-protein interactions during high-moisture extrusion for fibrous meat analogues and comparison of protein solubility methods using different solvent systems', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), pp. 2681–2687. doi: 10.1021/jf073343q.

Low, A. G. (1980) 'Nutrient Absorption in Pigs', *J Sci Food Agric*, 31(11), pp. 1087–1130.

Mainville, I., Arcand, Y. and Farnworth, E. R. (2005) 'A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics', *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), pp. 287–296. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020.

Malagelada, J. R. *et al.* (1976) 'Measurement of gastric functions during digestion of ordinary solid meals in man.', *Gastroenterology*, 70(2), pp. 203–210. doi: 10.1016/S0016-5085(76)80010-8.

Marciani, L. *et al.* (2001) 'Effect of meal viscosity and nutrients on satiety, intragastric dilution, and emptying assessed by MRI', *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(6). Available at: <http://ajpgi.physiology.org/content/280/6/G1227> (Accessed: 9 April 2017).

Mariotti, F. *et al.* (1999) 'Human Nutrition and Metabolism Nutritional Value of [15 N]-Soy Protein Isolate Assessed from Ileal Digestibility and Postprandial Protein Utilization in Humans', *The journal of nutrition*, 129(11), pp. 1992–1997.

Mariotti, F. *et al.* (2001) 'Guar gum does not impair the absorption and utilization of dietary nitrogen but affects early endogenous urea kinetics in humans', *American Journal of Clinical Nutrition*, 74(4), pp. 487–493.

Mariscal-Landín, G. *et al.* (1995) 'Nutrient Requirements and Interactions Endogenous Amino Nitrogen Collected from Pigs with End-to-End Ileorectal Anastomosis Is Affected by the Method of Estimation and Altered by Dietary Fiber', *The journal of nutrition*, 125(1), pp. 136–146.

Mariscal-Landín, G. and Reis de Souza, T. C. (2006) 'Endogenous ileal losses of nitrogen and amino acids in pigs and piglets fed graded levels of casein', *Archives of animal nutrition*, 60(6), pp. 454–466. doi: 10.1080/17450390600973642.

Market Research.com (2019) *Ready to Drink Market Research Reports & Industry Analysis*. Available at: <https://www.marketresearch.com/Food-Beverage-c84/Beverages-c165/Ready-to-Drink-c1751/>.

Marshall, W. E. and Zarins, Z. M. (1989) 'Exothermic Transitions of Glycinin Determined by Differential Scanning Calorimetry', *J. Agric. Food Chem*, 37, pp. 869–873.

Marteau, P., Minekus, M. and Havenaar, R. (1997) 'Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and the Effects of Bile', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 80(6), pp. 1031–1037. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76027-2.

Martín-Cabrejas, M. A. *et al.* (2009) 'The impact of dehydration process on antinutrients and protein digestibility of some legume flours', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 114(3), pp. 1063–1068. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.10.070.

Mat, D. J. L. *et al.* (2018) 'Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 239, pp. 268–275. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.115.

Mathai, J. K., Liu, Y. and Stein, H. H. (2017) 'Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS)', *Brit. J. Nutr.*, 117, pp. 490–499. doi: 10.1017/S0007114517000125.

Méjean, C. *et al.* (2015) 'Salivary Composition Is Associated with Liking and Usual Nutrient Intake', *PLoS ONE*, 10(9), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0137473.

Ménard, O. *et al.* (2014) 'Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion', *Food Chemistry*, 145, pp. 1039–1045. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.036.

Ménard, O., Picque, D. and Dupont, D. (2015) 'The DIDGI® system', in *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer, Cham, pp. 73–81.

Merchant, H. A. *et al.* (2011) 'Assessment of gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue in the guinea pig, rabbit and pig, and implications for their use in drug development', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, pp. 3–10. doi: 10.1016/j.ejps.2010.09.019.

Mercuri, A. *et al.* (2008) 'Dynamic gastric model (DGM): a novel in vitro apparatus to assess the impact of gastric digestion on the droplet size of self-emulsifying drug-delivery systems', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, p. 4.

Messad, F. (2016) *Prédiction de la digestibilité des acides aminés des ingrédients utilisés en*

*alimentation porcine : approche par méta-analyse Prédiction de la digestibilité des acides aminés des ingrédients utilisés en alimentation porcine : approche par méta-analyse.*

Messerschmidt, U. *et al.* (2012) 'Effect of particle size and heat treatment of soybean meal on standardized ileal digestibility of amino acids in growing pigs 1', *Journal of animal science*, 90, pp. 119–121. doi: 10.2527/jas53767.

Mession, J.-L. (2012) *Influence de l'état protéique sur la dynamique de séparation de phase et de gélification dans un système ternaire aqueux à base de protéines de pois et d'alginate.*

Meyer, J. H. *et al.* (1996) 'Gastric Emptying of Oil from Solid and Liquid Meals Effect of Human Pancreatic Insufficiency', *Digestive Diseases and Sciences*, 4(9), pp. 1691–1699.

Miansbach, C. I., Cohen, R. S. and Leff, P. B. (1975) 'Isolation and Properties of the Mixed Lipid Micelles Present in Intestinal Content during Fat Digestion in Man', *Journal of Clinical Investigation*, 56, pp. 781–791. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC301932/pdf/jcinvest00172-0023.pdf> (Accessed: 9 April 2017).

Minekus, M. *et al.* (1995) 'A Multicompartmental Dynamic Computer-controlled Model Simulating the Stomach and Small Intestine', *Atla-Alternatives to Laboratory Animals*, 23, pp. 197–209.

Minekus, M. *et al.* (1999) 'A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products.', *Applied microbiology and biotechnology*, 53(1), pp. 108–114. doi: 10.1007/s002530051622.

Minekus, M. *et al.* (2014) 'A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus', *Food & Function*, 5(6), pp. 1113–1124. doi: 10.1039/c3fo60702j.

Minekus, M *et al.* (2014) 'A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus', *Food Funct. Food Funct*, 5(5), pp. 1113–1124. doi: 10.1039/c3fo60702j.

Minekus, M. (2015) 'The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM)', in Verhoeckx, K. *et al.* (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham: Springer International Publishing, pp. 37–46. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4\_5.

Modigliani, R., Rambaud, J. C. and Bernier, J. J. (1973) 'The method of intraluminal perfusion of the human small intestine', *Digestion*, 9(2), pp. 176–192.

Montagne, L., Piel, C. and Lalle, J. P. (2004) 'Effect of Diet on Mucin Kinetics and Composition: Nutrition and Health Implications', *Nutrition Reviews*, 62(3), pp. 105–114. doi:

10.1301/nr.2004.mar.105.

Montanari, M. (1983) ‘Valeurs , symboles , messages alimentaires durant le Haut Moyen Age’, *Médiévales*, 5, pp. 57–66.

Moughan, P. J. (2003) ‘Amino acid availability : aspects of chemical analysis and bioassay methodology’, *Nutrition Research Reviews*, 16, pp. 127–141. doi: 10.1079/NRR200365.

Moughan, P. J. *et al.* (2012) ‘True ileal amino acid digestibility coefficients for application in the calculation of Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) in human nutrition. In Report of a Sub-Committee of the 2011 FAO Consultation on “Protein Quality Evaluation in Human”, pp. 1–58.

Moughan, P. J. and Schuttert, G. (1991) ‘Proteins and Amino Acids Composition of Nitrogen-Containing Fractions in Digesta From the Distal Ileum of Pigs Fed a Protein-Free Diet’, *The Journal of nutrition*, 121(10), pp. 1570–1574.

Mullally, A. M. M., Mehra, R. and Fitzgerald, R. J. (1998) ‘Thermal Effects on the Conformation and Susceptibility of  $\beta$ -Lactoglobulin to Hydrolysis by Gastric and Pancreatic Endoproteinases’, *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 37(1), pp. 51–60.

Nakai, S. and Modler, H. W. (1996) *Food proteins: properties and characterization*. John Wiley & Sons.

Nau, F. *et al.* (2019) ‘Spatial-temporal changes in pH, structure and rheology of the gastric chyme in pigs as influenced by egg white gel properties’, *Food Chemistry*. Elsevier, 280(December 2018), pp. 210–220. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.042.

Nesterenko, A. (2012) *Etude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation*.

Nosworthy, M. *et al.* (2018) ‘Effect of Processing on the In Vitro and In Vivo Protein Quality of Beans (*Phaseolus vulgaris* and *Vicia Faba*)’, *Nutrients*, 10(6), p. 671. doi: 10.3390/nu10060671.

Nunez, P., Bichot, C. H. U. X. and Paris, H. (1998) ‘Interests of the “artificial stomach” techniques to study antacid formulations: Comparison with in vivo evaluation’, *Fundam Cli Pharmacol*, 12, pp. 573–583.

O’Loughlin, I. B. *et al.* (2012) ‘Enzymatic hydrolysis of heat-induced aggregates of whey protein isolate’, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(19), pp. 4895–4904. doi: 10.1021/jf205213n.

Officer, D. I., Batterham, E. S. and Farrell, D. J. (1997) ‘Comparison of growth performance and nutrient retention of weaner pigs given diets based on casein, free amino acids or conventional

proteins', *British Journal of Nutrition*, 77(5), pp. 731–744.

De Oliveira, S. C. *et al.* (2016) 'Holder pasteurization impacts the proteolysis, lipolysis and disintegration of human milk under in vitro dynamic term newborn digestion', *Food Research International*, 88, pp. 263–275. doi: 10.1016/j.foodres.2015.11.022.

Osborne, T. B. (1924) 'The vegetable proteins Longmans Green', in *Journal of the Society of Chemical Industry*, p. 154.

Osborne, T. B. and Campbell, G. F. (1898a) 'Proteids of the pea', *Journal of the American Chemical Society*, 20(5), pp. 348–362. doi: 10.1021/ja02067a006.

Osborne, T. B. and Campbell, G. F. (1898b) 'Proteids of the soy bean', *Journal of the American Chemical Society*, 20(6), pp. 419–428. doi: 10.1021/ja02068a004.

Öste, R. E. (1991) 'Digestibility of processed food protein', *Nutritional and toxicological consequences of food processing*, pp. 371–388.

Öste, R. and Sjödin, P. (1984) 'Effect of Maillard reaction products on protein digestion. In vivo studies on rats', *The Journal of nutrition*, 114(2), pp. 2228–2234.

Panasiuk, R. *et al.* (1998) 'Determination of  $\alpha$ -amino nitrogen in pea protein hydrolysates: A comparison of three analytical methods', *Food Chemistry*, 62(3), pp. 363–367. doi: 10.1016/S0308-8146(97)00164-7.

Parada, J. and Aguilera, J. M. (2007) 'Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients', *Journal of Food Science*, 72(2), pp. 21–32. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x.

Pasini, G. *et al.* (2001) 'Modifications of wheat flour proteins during in vitro digestion of bread dough, crumb, and crust: An electrophoretic and immunological study', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), pp. 2254–2261. doi: 10.1021/jf0014260.

Pedersen, B. and Eggum, B. O. (1983) 'Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure', *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde*, 49(1–5), pp. 265–277. doi: 10.1111/j.1439-0396.1983.tb00808.x.

Pedersen, C. and Boisen, S. (2002) 'Establishment of Tabulated Values for Standardized Ileal Digestibility of Crude Protein and Essential Amino Acids in Common Feedstuffs for Pigs', *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science*, 52(3), pp. 121–140.

Pedersen, C., Boisen, S. and Ferna, J. A. (2002) 'Studies on the Effect of Dietary Crude Protein Supply on the Composition of Ileal Endogenous Crude Protein Loss in Growing Pigs', *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science*, 52, pp. 141–149.



Petersen, G. I. and Stein, H. H. (2005) 'Apparent and standardized ileal digestibility of amino acids in gelatin-based diets by growing pigs', *Animal Feed Science and Technology*, 119(3427), pp. 107–115. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2004.11.006.

Petitot, M. *et al.* (2009) 'Modification of pasta structure induced by high drying temperatures. Effects on the in vitro digestibility of protein and starch fractions and the potential allergenicity of protein hydrolysates', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 116(2), pp. 401–412. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.01.001.

Peyron, M. *et al.* (2019) 'Addressing various challenges related to food bolus and nutrition with the AM<sup>2</sup> mastication simulator', *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, p. 105229. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105229.

Peyron, M. A., Mishellany, A. and Woda, A. (2004) 'Particle size distribution of food boluses after mastication of six natural foods', *Journal of Dental Research*, 83(7), pp. 578–582. doi: 10.1177/154405910408300713.

Peyron, M. and Woda, A. (2016) 'An update about artificial mastication', *Current Opinion in Food Science*. Elsevier Ltd, 9, pp. 21–28. doi: 10.1016/j.cofs.2016.03.006.

Picariello, G. *et al.* (2015) 'Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins', *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(5), pp. 948–956. doi: 10.1002/mnfr.201400856.

Piper, D. W. and Fenton, B. H. (1965) 'pH stability and activity curves of pepsin with special reference to their clinical importance.', *Gut*, 6(5), pp. 506–8. doi: 10.1136/gut.6.5.506.

Van Der Poel, T. F. *et al.* (1990) 'Thermal inactivation of lectins and trypsin inhibitor activity during steam processing of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) and effects on protein quality', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53(2), pp. 215–228.

Poinot, P. *et al.* (2009) 'Use of an artificial mouth to study bread aroma', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 42(5–6), pp. 717–726. doi: 10.1016/j.foodres.2009.02.020.

Prudêncio-Ferreira, S. H. and Arêas, J. A. G. (1993) 'Protein-Protein Interactions in the Extrusion of Soya at Various Temperatures and Moisture Contents', *Journal of Food Science*, 58(2), pp. 378–381.

Rangel, A. *et al.* (2003) 'Functional Properties of Purified Vicilins from Cowpea (*Vigna unguiculata*) and Pea (*Pisum sativum*) and Cowpea Protein Isolate', *J. Agric. Food Chem.*, 51, pp. 5792–5797. doi: 10.1021/jf0340052.

Reed, J. D. *et al.* (1985) 'Gravimetric Determination of Soluble Phenolics Including Tannins from Leaves by Precipitation with Trivalent Ytterbium', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(4), pp. 255–261.

Reeds, P. J. and Burrin, D. G. (2000) 'The Gut and Amino Acid Homeostasis', *Nutrition*, 16(7/8), pp. 666–668.

Renkema, J. M. S. *et al.* (2000) 'The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins', *Journal of Biotechnology*, 79, pp. 223–230.

Richter, H. and Schlecht, E. (2006) 'Accounting for marker disassociation when modelling time-dependent ruminal escape of particles based on the faecal excretion of Ytterbium', *Animal Feed Science and Technology*, 128(1–2), pp. 135–154. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.10.006.

Rojas, O. J. and Stein, H. H. (2013) 'Concentration of digestible and metabolizable energy and digestibility of amino acids in chicken meal, poultry byproduct meal, hydrolyzed porcine intestines, a spent hen – soybean meal mixture, and conventional soybean meal fed to weanling pigs', *Journal of Animal Science*, 91(7), pp. 3220–3230. doi: 10.2527/jas2013-6269.

Rowan, A. M. *et al.* (1994) 'Comparison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man', *Br. J. Nutr.*, 71, pp. 29–42.

Rubio, L. A. *et al.* (2014) 'Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions', *J Sci Food Agric*, 94, pp. 280–287. doi: 10.1002/jsfa.6250.

Rui, X., Fu, Y., *et al.* (2016) 'A comparison study of bioaccessibility of soy protein gel induced by magnesiumchloride, glucono- $\delta$ -lactone and microbial transglutaminase', *LWT - Food Science and Technology*, 71, pp. 234–242. doi: 10.1016/j.lwt.2016.03.032.

Rui, X., Xing, G., *et al.* (2016) 'Protein bioaccessibility of soymilk and soymilk curd prepared with two *Lactobacillus plantarum* strains as assessed by in vitro gastrointestinal digestion', *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, pp. 155–159. doi: 10.1016/j.ifset.2016.09.029.

Rui, X. *et al.* (2018) *Does lactic fermentation influence soy yogurt protein digestibility- A comparative study between soymilk and soy yogurt at different pH*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi: 10.1002/jsfa.9256.

Ruppen, H. A. G. and Oekel, M. A. A. J. S. V. A. N. B. (2004) 'Characterization of Pea Vicilin . 1 . Denoting Convicilin as the  $\alpha$  -Subunit of the *Pisum* Vicilin Family', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 3141–3148. doi: 10.1021/jf035104i.

Russell, W. R. *et al.* (2013) ‘Colonic bacterial metabolites and human health’, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 16(3), pp. 246–254. doi: 10.1016/j.mib.2013.07.002.

Rutherford, S. M. *et al.* (2015) ‘Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats’, *The Journal of Nutrition*, 145(2), pp. 372–379. doi: 10.3945/jn.114.195438.fecal.

Salas, C. *et al.* (2012) ‘Adsorption of Glycinin and  $\beta$ -Conglycinin on Silica and Cellulose: Surface Interactions as a Function of Denaturation, pH, and Electrolytes’, *Biomacromolecules*, 13, pp. 387–396. doi: 10.1021/bm2014153.

Salazar-Villanea, S. (2017) *Of proteins and processing*.

Salles, C. *et al.* (2007) ‘Development of a chewing simulator for food breakdown and the analysis of in vitro flavor compound release in a mouth environment’, *Journal of Food Engineering*, 82(2), pp. 189–198. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.02.008.

Sams, L. *et al.* (2016) ‘Relevant pH and lipase for in vitro models of gastric digestion’, *Food Funct.* Royal Society of Chemistry, 7(1), pp. 30–45. doi: 10.1039/C5FO00930H.

Santangelo, A. *et al.* (1998) ‘Physical state of meal affects gastric emptying, cholecystokinin release and satiety’, *British Journal of Nutrition*, 80(6), pp. 521–527.

Santé-Lhoutellier, V., Aubry, L. and Gatellier, P. (2007) ‘Effect of Oxidation on In Vitro Digestibility of Skeletal Muscle Myofibrillar Proteins’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), pp. 5343–5348.

Sauer, W. C. and Just, A. (1979) ‘Amino acid digestibilities in rations for growing pigs’, *Annual Feeders’ Day Report*, pp. 22–25.

Sauer, W. C. and Ozimek, L. (1986) ‘Digestibility of amino acids in swine: results and their practical applications. a review’, *Livestock Production Science*, 15, pp. 367–388.

Sauer, W. C., Stothers, S. C. and Parker, R. J. (1977) ‘Apparent and true availabilities of amino acids in wheat and milling by-products for growing pigs’, *Can. J. Anim.*, 57, pp. 775–784.

Scanff, P. *et al.* (1991) ‘Effect of Some Technological Treatments of Milk on Amino Acid Composition of in Vivo Effluents During Gastric Digestion’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(8), pp. 1482–1487. doi: 10.1021/jf00008a023.

Schaafsma, G. (2012) ‘Advantages and limitations of the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) as a method for evaluating protein quality in human diets’, *Br. J. Nutr.*, (2012), pp. S333–S336. doi: 10.1017/S0007114512002541.

Schmitz, M., Hagemeister, H. and Erbersdobler, H. F. (1991) 'Homoarginine labeling is suitable for determination of protein absorption in miniature pigs', *The Journal of nutrition*, 121(10), pp. 1575–1580.

Schulze, H. *et al.* (1995) 'Dietary level and source of neutral detergent fiber and ileal endogenous nitrogen flow in pigs', *Journal of Animal Science*, 73(2), pp. 441–448.

Selle, P. H. *et al.* (2012) 'Protein–phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal', *Nutrition research reviews*, 25(1), pp. 1–17. doi: 10.1017/S0954422411000151.

Sève, B. (1994) 'Alimentation du porc en croissance : intégration des concepts de protéine idéale, de disponibilité digestive des acides aminés', *INRA Prod. Anim.*, 7(1), pp. 275–291.

Shand, P. J. *et al.* (2007) 'Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels', *Food Chemistry*, 102(4), pp. 1119–1130. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.060.

Sheikh, M. S. *et al.* (1988) 'Role of Vitamin D-dependent and Vitamin D-independent Mechanisms in Absorption of Food Calcium', *Journal of Clinical Investigation*, 81, pp. 126–132. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC442483/pdf/jcinvest00097-0132.pdf> (Accessed: 9 April 2017).

Shewry, P. R., Napier, J. a and Tatham, a S. (1995) 'Seed storage proteins: structures and biosynthesis.', *The Plant cell*, 7(July), pp. 945–956. doi: 10.1105/tpc.7.7.945 [doi]\n7/7/945 [pii].

Shurtleff, W., Huang, H. T. and Aoyagi, A. (2014) *History of soybeans and soyfoods in China and Taiwan, and in Chinese cookbooks, restaurants, and Chinese work with soyfoods outside China (1024 BCE to 2014): Extensively annotated bibliography and sourcebook, including Manchuria, Hong Kong and Tibet. Soyi.*

Siddons, R. C. *et al.* (1985) 'Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta-flow marker.', *The British journal of nutrition*, 54(2), pp. 509–519. doi: 10.1079/BJN19850136.

Siegel, J. A. *et al.* (1988) 'Biphasic nature of gastric emptying.', *Gut*, 29(1), pp. 85–89. doi: 10.1136/gut.29.1.85.

Sikorski, Z. E. (2001) *Chemical & functional properties of food proteins, Chemical and functional properties of food components series, Lancaster, Pa. Technomic Publ. C. Inc.*

Simonian, H. P. *et al.* (2005) 'Regional Postprandial Differences in pH Within the Stomach and Gastroesophageal Junction', *Digestive Diseases and Sciences*, 50(12), pp. 2276–2285. doi: 10.1007/s10620-005-3048-0.

Sinnott, M. D., Cleary, P. W. and Harrison, S. M. (2017) 'Peristaltic transport of a particulate

suspension in the small intestine R', *Applied Mathematical Modelling*. Elsevier Inc., 44, pp. 143–159. doi: 10.1016/j.apm.2017.01.034.

Smith, L. H. (1984) 'Seed Development, Metabolism, and Composition', in *Physiological Basis of Crop Growth and Development*.

Somaratne, G., Nau, F., *et al.* (2019) 'Characterization of egg white gel microstructure and its relationship with pepsin diffusivity', *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, p. 105258. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105258.

Somaratne, G., Reis, M. M., *et al.* (2019) 'Mapping the spatiotemporal distribution of acid and moisture in food structures during gastric juice diffusion using hyperspectral imaging', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. doi: 10.1021/acs.jafc.9b02430.

Somaratne, G. *et al.* (2020) 'In-situ disintegration of egg white gels by pepsin and kinetics of nutrient release followed by time-lapse confocal microscopy', *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 98, p. 105228. doi: 10.1016/j.foodhyd.2019.105228.

Souffrant, W. B. (1991) 'Endogenous nitrogen losses during digestion in pigs.', *Digestive physiology in pigs*, pp. 147–166.

Stamatopoulos, K., Batchelor, H. K. and Simmons, M. J. H. (2016) 'European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Dissolution profile of theophylline modified release tablets , using a biorelevant Dynamic Colon Model ( DCM )', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. The Authors, 108, pp. 9–17. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.08.004.

Stein, H. H. *et al.* (1999) 'The effect of feeding level and physiological status on total flow and amino acid composition of endogenous protein at the distal ileum in swine', *Journal of Animal Science*, 77, pp. 1180–1187.

Strathe, A. B., Danfær, A. and Chwalibog, A. (2008) 'A dynamic model of digestion and absorption in pigs', *Animal Feed Science and Technology*, 143(1–4), pp. 328–371. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.05.018.

Subirade, M., Gueguen, J. and Schwenke, K. D. (1992) 'Effect of dissociation and conformational changes on the surface behavior of pea legumin', *Journal of Colloid And Interface Science*, 152(2), pp. 442–454. doi: 10.1016/0021-9797(92)90045-N.

Suenderhauf, C. and Parrott, N. (2012) 'A Physiologically Based Pharmacokinetic Model of the Minipig: Data Compilation and Model Implementation', *Pharmaceutical Research*. doi: 10.1007/s11095-012-0911-5.

Tang, C.-H. (2017) 'Emulsifying properties of soy proteins: A critical review with emphasis on the role of conformational flexibility', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(12), pp. 2636–2679. doi: 10.1080/10408398.2015.1067594.

Tang, C., Choi, S. and Ma, C. (2007) 'Study of thermal properties and heat-induced denaturation and aggregation of soy proteins by modulated differential scanning calorimetry', *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, pp. 96–104. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2006.06.013.

Tavano, O. L. *et al.* (2008) 'Nutritional Responses of Rats to Diets Based on Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Seed Meal or Its Protein Fractions', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 11006–11010.

Tavano, O. L., Neves, V. A. and da Silva Júnior, S. I. (2016) 'In vitro versus in vivo protein digestibility techniques for calculating PDCAAS (protein digestibility-corrected amino acid score) applied to chickpea fractions', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 89, pp. 756–763. doi: 10.1016/j.foodres.2016.10.005.

Thanh, V. H. and Shibasaki, K. (1977) 'Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 490(2), pp. 370–384.

Tharakan, A. *et al.* (2010) 'Mass Transfer and Nutrient Absorption in a Simulated Model of Small Intestine', *Journal of Food Science*, 75(6), pp. E339–E346. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01659.x.

Trusov, P. V., Zaitseva, N. V and Kamaltdinov, M. R. (2016) 'A Multiphase Flow in the Antroduodenal Portion of the Gastrointestinal Tract: A Mathematical Model', *Computational and Mathematical Methods in Medicine*.

Tuohy, K. M. *et al.* (2006) 'Metabolism of Maillard reaction products by the human gut microbiota – implications for health', *Mol Nutr Food Res*, 50, pp. 847–857. doi: 10.1002/mnfr.200500126.

Turgeon, S. L., Bard, C. and Gauthier, S. F. (1991) 'Comparaison de trois méthodes pour la mesure du degré d'hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement', *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24(1–2), pp. 14–18. doi: 10.1016/S0315-5463(91)70013-8.

Tzitzikas, E. N. *et al.* (2006) 'Genetic Variation in Pea Seed Globulin Composition', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 425–433. doi: 10.1021/jf0519008.

Udy, M. J. and Lewin, S. Z. (1956) 'Chromium, Vol. I. Chemistry of Chromium and its

Compounds', *Journal of The Electrochemical Society*. The Electrochemical Society, 103(10), pp. 232C-232C.

USDA (2018) *Full Report (All Nutrients): 45356836, ORIGINAL SEITAN, UPC: 753182099224, USDA Branded Food Products Database*. Available at: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/45356836>.

Vaessen, S. F. C. *et al.* (2017) 'Regional Expression Levels of Drug Transporters and Metabolizing Enzymes along the Pig and Human Intestinal Tract and Comparison with Caco-2 Cells', *Drug Metabolism and Disposition*, 45, pp. 353–360.

Vanhoof, G. *et al.* (1995) 'Proline motifs in peptides and their biological processing', *The FASEB Journal*, 9(9), pp. 736–744.

Vantrappen, G. *et al.* (1979) 'Motilin and the Interdigestive Migrating Motor Complex in Man', *Digestive Diseases and Sciences*, 24(7), pp. 497–500.

Vasconcelos, I. M. and Oliveira, T. A. (2004) 'Antinutritional properties of plant lectins', *Toxicon*, 44, pp. 385–403. doi: 10.1016/j.toxicon.2004.05.005.

Verhoeckx, K. *et al.* (2015) *The impact of food bioactives on health: in vitro and ex vivo models*. Springer.

Vijayakumari, K. *et al.* (1998) 'Effect of soaking and heat processing on the levels of antinutrients and digestible proteins in seeds of *Vigna aconitifolia* and *Vigna sinensis*', *Food Chemistry*, 63(2), pp. 259–264.

Van Vliet, S. *et al.* (2016) 'Development of Intrinsically Labeled Eggs and Poultry Meat for Use in Human Metabolic', *The Journal of nutrition*, 146(7), pp. 1428–1433. doi: 10.3945/jn.115.228338.The.

Walter, J. and Ley, R. (2011) 'MI65CH21-Ley The Human Gut Microbiome: Ecology and Recent Evolutionary Changes', *Annu. Rev. Microbiol*, 65, pp. 411–29. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102830.

Wang, K. *et al.* (2017) 'Changes in chemical interactions and protein conformation during heat-induced wheat gluten gel formation', *Food Chemistry*, 214, pp. 393–399. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.037.

Wang, R., Liu, J. and Guo, S. (2018) 'Binding of phytate to soybean protein during the heat treatment of soymilk and its effect on protein aggregation', *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 84(17), pp. 368–378. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.06.031.

Wang, T. and Adeola, O. (2018) ‘Digestibility index marker type, but not inclusion level affects apparent digestibility of energy and nitrogen and marker recovery in growing pigs regardless of added oat bran’, *Journal of animal science*, 96(7), pp. 2817–2825. doi: 10.1093/jas/sky153/4983322.

Wang, T., Osho, S. O. and Adeola, O. (2018) ‘Additivity of apparent and standardized ileal digestibility of amino acid determined by chromic oxide and titanium dioxide in mixed diets containing wheat and multiple protein sources fed to growing pigs’, *Journal of animal science*, 96(11), pp. 4731–4742. doi: 10.1093/jas/sky326/5069332.

Wang, Z. *et al.* (2015) ‘Direct observation and evaluation of cooked white and brown rice digestion by gastric digestion simulator provided with peristaltic function’, *Food Research International*. Elsevier Ltd, 71, pp. 16–22. doi: 10.1016/j.foodres.2015.03.002.

Weinstein, D. H. *et al.* (2013) ‘A new method for determining gastric acid output using a wireless pH-sensing capsule’, *Alimentary Pharmacology & Therapeutic*, 37, pp. 1198–1209. doi: 10.1111/apt.12325.

Van Wey, A. S. *et al.* (2014) ‘A mathematical model of the effect of pH and food matrix composition on fluid transport into foods: An application in gastric digestion and cheese brining’, *Food Research International*. Elsevier Ltd, 57, pp. 34–43. doi: 10.1016/j.foodres.2014.01.002.

de Wiele, T. *et al.* (2015) ‘The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®)’, in Verhoeckx, K. *et al.* (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham: Springer International Publishing, pp. 305–317. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4\_27.

Wieser, H. (2007) ‘Chemistry of gluten proteins’, *Food microbiology*, 24(2), pp. 115–119.

Wieser, H., Seilmeier, W. and Belitz, H. D. (1994) ‘Quantitative Determination of Gliadin Subgroups from Different Wheat Cultivars’, *Journal of Cereal Science*, 19(2), pp. 149–155.

Wilfart, A. (2007) *Digestion et transit digestif chez le porc en croissance: influence de la composition de l'aliment*. Rennes, Agrocampus.

Woda, A. *et al.* (2010) ‘Development and validation of a mastication simulator’, *Journal of Biomechanics*, 43, pp. 1667–1673. doi: 10.1016/j.jbiomech.2010.03.002.

Wolf, W. J. (1970) ‘Soybean proteins. Their functional, chemical, and physical properties.’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(6), pp. 969–976. doi: 10.1021/jf60172a025.

Wolfe, R. R. *et al.* (2019) ‘Quantifying the contribution of dietary protein to whole body protein kinetics : examination of the intrinsically labeled proteins method’, *Am J Physiol Endocrinol Metab*,



317, pp. E74–E84. doi: 10.1152/ajpendo.00294.2018.

Worley, R., Clearfield, A. and Ellis, W. (2002) ‘Binding affinity and capacities for ytterbium (3+) and hafnium (4+) by chemical entities of plant tissue fragments’, *Journal of animal science*, 80(12), pp. 3307–3314. Available at: <http://www.animal-science.org/content/80/12/3307.short>.

Wright, N. D. *et al.* (2016) ‘A human duodenum model (HDM) to study transport and digestion of intestinal contents’, *Journal of Food Engineering*. Elsevier Ltd, 171, pp. 129–136. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.10.013.

Wu, G. (1980) ‘Intestinal Mucosal Amino Acid’, *The Journal of Nutrition*, 128(8), pp. 1249–1252.

Wu, G. (2009) ‘Amino acids: metabolism, functions, and nutrition’, *Amino Acids*, 37, pp. 1–17. doi: 10.1007/s00726-009-0269-0.

Wu, T. *et al.* (2017) ‘Effects of chemical composition and baking on in vitro digestibility of proteins in breads made from selected gluten-containing and gluten-free flours’, *Food Chemistry*, 233, pp. 514–524. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.158.

Xing, G. *et al.* (2016) ‘In vitro gastrointestinal digestion study of a novel bio-tofu with special emphasis on the impact of microbial transglutaminase’, *PeerJ*, 4, p. e2754. doi: 10.7717/peerj.2754.

Xing, G. *et al.* (2017) ‘Effect of Fermentation pH on Protein Bioaccessibility of Soymilk Curd with Added Tea Polyphenols As Assessed by in Vitro Gastrointestinal Digestion’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(50), pp. 11125–11132. doi: 10.1021/acs.jafc.7b04456.

Xu, W. L. *et al.* (2008) ‘Mechanism, design and motion control of a linkage chewing device for food evaluation’, *Mechanism and Machine Theory*, 43(3), pp. 376–389. doi: 10.1016/j.mechmachtheory.2007.03.004.

Yang, Y. *et al.* (2016) ‘Secondary Structure and Subunit Composition of Soy Protein in Vitro Digested by Pepsin and Its Relation with Digestibility’, *BioMed Research International*, 2016. doi: 10.1155/2016/5498639.

Yau, M. Y. A. (2014) *Gastric emptying in Humans; carbohydrate ingestion, gastrointestinal hormones and genetic variation*. Available at: [https://e-space.mmu.ac.uk/578914/1/THESIS\\_AdoraYau\\_FINAL.pdf](https://e-space.mmu.ac.uk/578914/1/THESIS_AdoraYau_FINAL.pdf) (Accessed: 13 April 2017).

Yen, J. T., Jensen, A. H. and Simon, J. (1977) ‘Effect of dietary raw soybean and soybean trypsin inhibitor on trypsin and chymotrypsin activities in the pancreas and in small intestinal juice of growing swine’, *The journal of nutrition*, 107(1), pp. 156–165.

Yin, Y. *et al.* (2000) 'Apparent digestibility (ileal and overall) of nutrients as evaluated with PVTC-cannulated or ileo-rectal anastomised pigs fed diets containing two indigestible markers', *Livestock Production Science*, 62(2), pp. 133–141.

Yu, P. *et al.* (2002) 'An analysis of the nutritive value of heat processed legume seeds for animal production using the DVE/OEB model: A review', *Animal Feed Science and Technology*, 99(1–4), pp. 141–176. doi: 10.1016/S0377-8401(02)00114-1.

Zangenberg, N. H. *et al.* (2001) 'A dynamic in vitro lipolysis model: II: Evaluation of the model', *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3), pp. 237–244. doi: 10.1016/S0928-0987(01)00182-8.

Zhang, H. L. *et al.* (2005) 'Effects of graded levels of soya-bean protein on endogenous ileal lysine loss and amino acid digestibility in growing pigs', *Anim. Sci.*, 81, pp. 257–264.

Zhu, J. *et al.* (2019) 'Effect of microbial transglutaminase cross-linking on the quality characteristics and potential allergenicity of tofu', *Food & function*. Royal Society of Chemistry. doi: 10.1039/c9fo01118h.

Ziessman, H. A. *et al.* (1996) 'Lag phase quantification for solid gastric emptying studies', *Journal of Nuclear Medicine*, 37(10), pp. 1639–1643. Available at: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L26337167%5Cn> <http://elvis.ubvu.vu.nl:9003/vulink?sid=EMBASE&issn=01615505&id=doi:&atitle=Lag+phase+quantification+for+solid+gastric+emptying+studies&stitle=J.+NUCL.+MED.&title=Journa>.

Zorzi, M. De *et al.* (2007) 'Food Chemistry Effect of pasta drying temperature on gastrointestinal digestibility and allergenicity of durum wheat proteins', *Food Chemistry*, 104, pp. 353–363. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.057.

## Chapitre 2. Comparaison de l'évolution du degré d'hydrolyse pendant la digestion *in vitro* de fractions de protéines végétales par rapport à celle de matrices alimentaires protéiques végétales

A comparison of the degree of plant protein hydrolysis during *in vitro* digestion of protein fractions versus food matrices

*Authors (\* corresponding author)*

Yohan Reynaud<sup>a,b\*</sup>, Michel Lopez<sup>a</sup>, Alain Riaublanc<sup>c</sup>, Isabelle Souchon<sup>d</sup>, Didier Dupont<sup>b</sup>

<sup>a</sup>IMPROVE SAS, F-80480, Dury, France

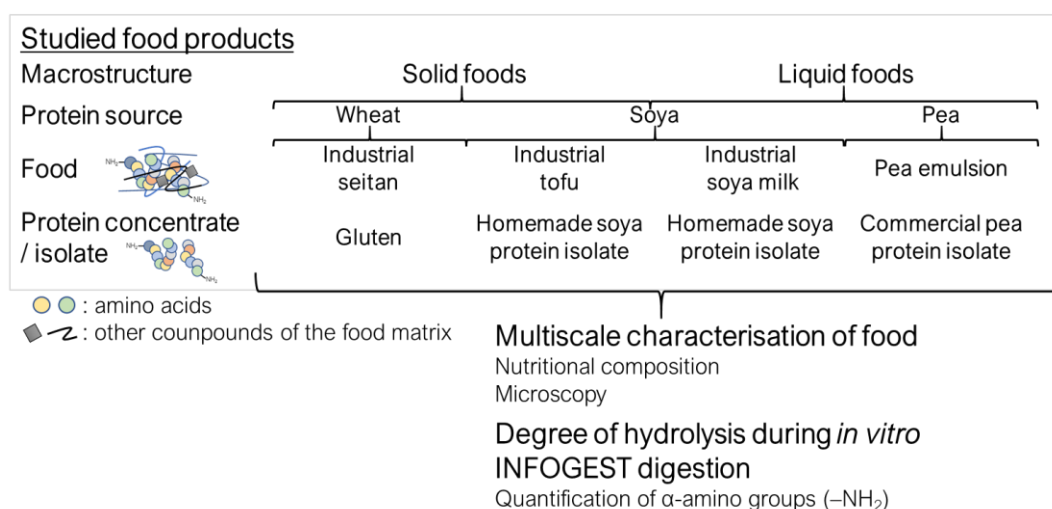
<sup>b</sup>STLO, INRA, AGROCAMPUS OUEST, F-35042, Rennes, France

<sup>c</sup>BIA, INRA, F-44000, Nantes, France

<sup>d</sup>GMFA, INRA, AgroParisTech, Université Paris Saclay, F-78850, Thiverval-Grignon, France

Accepté sous réserve de corrections majeures à Food Research International

### Graphical Abstract



## Abstract

The digestion of plant protein is highly dependent on multiple factors, with two of the most important being the protein source and the food matrix. The present study investigated the effects of these two factors on the digestion of seitan (a wheat-based food), tofu, soya milk, and a homemade emulsion of soy oil and water that was stabilised with pea protein. The four plant matrices and their respective protein isolates/concentrates (wheat gluten, soya protein, pea protein) were subjected to *in vitro* static digestion following the INFOGEST consensus protocol. We monitored the release of  $\alpha$ -amino groups during digestion to get the evolution of the degree of hydrolysis for each product. We found that food matrix had a strong influence on protein digestion: soya milk was more hydrolysed than fresh tofu (51.1% versus 33.1%;  $P = 0.0087$ ), but fresh tofu was more hydrolysed than soya protein isolate (33.1% versus 17.9%;  $P < 0.0001$ ). Likewise, the pea-protein emulsion was better hydrolysed than the pea-protein isolate ( $P = 0.0033$ ). Differences were also detected between the two solid foods investigated here: a higher degree of hydrolysis was found for tofu compared to seitan (33.1% versus 11.8%), which was perhaps due to dense protein aggregates observed in the latter but not the former. Furthermore, freeze-drying more than doubled the final degree of hydrolysis of seitan ( $P < 0.0001$ ), but had no effect on tofu ( $P = 1.0000$ ). Confocal microscopy revealed that protein networks in freeze-dried seitan were strongly altered with respect to the fresh product. Finally, we found that the protease:protein ratio had a strong effect on the kinetics of proteolysis: a 3.7-fold increase in the concentration of the soya protein isolate with respect to that of the soya milk decreased the final degree of hydrolysis from 50.3 to 17.9% ( $P = 0.0988$ ).

**Keywords:** INFOGEST protocol; Gluten; Soybean; Tofu; Seitan; Soya milk; Pea; Emulsion

## Highlights

- Food matrix strongly affected the proteolysis of soya protein
- Pea-protein emulsion was better hydrolysed than pea-protein isolate
- Freeze-drying seitan increased the final degree of proteolysis

## 2.1 Introduction

Compared to animal protein, proteins derived from plants are known for their reduced environmental and economic impacts (González, Frostell, & Carlsson-Kanyama, 2011). However, their two principal drawbacks are the lack of certain essential amino acids to fulfil human nutritional needs and the presence of anti-nutritional factors, i.e. proteins or associated compounds (enzyme inhibitors, fibre, saponins, and tannins) that hinder the digestive process. Moreover, plant albumins are generally thought to be resistant to proteolysis due to their compact structure, a high number of disulfide bonds, and their capacity for self-association (Carbonaro, Maselli, & Nucara, 2015). To improve the nutritional properties of plant-based protein sources, proteins from legumes and cereals are often mixed to create an amino-acid profile that is more nutritionally complete.

To estimate protein quality, the most commonly used reference indicators are the Protein Digestibility-Corrected AA Score (PDCAAS) and the more recently proposed Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS), which takes into account the digestibility of the limiting amino acid. These values are typically determined through *in vivo* experiments, which are not always desirable due to the ethical and economic considerations involved. As an alternative, efforts have been made to develop *in vitro* systems that could help to investigate questions associated with digestion. For example, one recent study investigated the relationship between *in vitro*-based measures of digestibility and PDCAAS values of chickpea flour and its protein fractions. The authors found that measurements of peptide-bond hydrolysis gave the highest correlation with *in vivo*-generated results (Tavano, Neves, & da Silva Júnior, 2016). Admittedly, *in vitro* protocols do not perfectly reproduce all aspects of digestive physiology—for instance, endopeptidases, neurohormonal control, and intestinal absorption are lacking, and the geometry of the gastrointestinal tract and gastric mixing are poorly mimicked. They do, however, have the advantage of being rapid and economical ways to estimate protein degradation under digestive conditions, particularly compared to *in vivo* experiments on animals or clinical studies, which require more resources and are accompanied by ethical concerns (Bohn et al., 2018). Moreover, in a well-controlled *in vitro* system, the volume of bolus and the quantity of endogenous secretions are known, which enables the precise determination of their contributions to the monitored parameters. Sampling can be performed frequently without extensive disruptions to the system, and inter-trial variability is usually lower than the inter-individual variation of *in vivo* trials. Finally, potential structural changes during digestion can be easily detected.

One of the most important factors in determining the digestibility, bioaccessibility, and ultimate bioavailability of food components for an organism is the food matrix. For example, protein

digestion varies considerably among cheese matrices (Lorieau et al., 2018), but to a lesser extent among plant-based food matrices (Rozan et al., 1997). Food processing, such as heat treatment, has also been shown to improve plant protein digestibility, as a consequence of heat-induced protein dissociation or unfolding and/or the elimination or deactivation of thermolabile antinutritional factors, such as trypsin inhibitors (Liu, Song, Maison, & Stein, 2014). In the present study, we aimed to further investigate the matrix effect on protein digestion of plant-based foods. Specifically, we used the *in vitro* INFOGEST digestion protocol (Minekus et al., 2014) to perform comparisons of food products that differed in many key aspects: structure (liquid versus solid), protein source (wheat, soya, pea), and the presence/absence of a food matrix (whole food preparation versus protein isolate/concentrate). We analysed four manufactured foods—seitan, tofu, soya milk, and pea emulsion—that represented three of the most widely produced crops worldwide (among legumes, cereals, and pulses, in tonnes): wheat (8–12%<sub>Prot</sub> (w/w); 2<sup>rd</sup>), soybean (40–45%<sub>Prot</sub> (w/w); 4<sup>th</sup>), and green pea (22–24%<sub>Prot</sub> (w/w); 30<sup>th</sup>) (FAOSTAT, 2017). Seitan is an east Asian wheat-based food, mostly constituted of gluten and starch that has undergone mild thermal treatment. Soya milk and tofu share the same base ingredient, but we included both here to investigate the effects of their highly different macrostructures: soya milk is obtained simply from soaking soya beans in water, while tofu, also called soya bean curd, undergoes one more step of chemical and thermal coagulation (induced by the addition of glucono- $\delta$ -lactone, magnesium chloride, or calcium sulfate; (Fukushima, 1981). The green pea emulsion was created via ultra-pressure homogenisation of a commercial pea protein isolate (also included in the study) and soya oil in water, and was designed to mimic as closely as possible the nutrient composition and structure of soya milk. With these four foods our study was able to examine differences in the digestion of solids (seitan, tofu) and liquids (soya milk, pea emulsion). All of these results were then compared to those obtained from digestion of the corresponding protein isolate/concentrate for each food—wheat gluten, soya protein (two concentrations, representing soya milk and tofu), and commercial pea protein isolate.

## **2.2 Materials and methods**

### **2.2.1 Preparation of products**

#### **2.2.1.1 Protein isolates & concentrates**

As sources of isolated/concentrated protein, we used readymade commercial pea isolate (Pisane M9, Lot: N16231O04, Cosucra, Belgium) and wheat gluten; concentrated soya proteins were prepared in our laboratory. Wheat gluten and two batches of husked soya beans were graciously provided by Nutrition & Santé (Revel, France). Proteins were extracted from soya beans using a pH precipitation protocol that combined steps from two previous studies (Li et al., 2007; Sorgentini & Wagner, 2002). Briefly, husked soya beans were milled with an ultra-centrifugal mill (ZM2000,

Retsch GmbH, Germany) using a 0.5-mm sieve and an airstream to avoid heating. Then, the remaining flour was dehulled with hexane (52750, Sigma-Aldrich, USA; 1:4 hexane:flour ratio (w/w)) three times using an overhead shaker at 48 tr.min<sup>-1</sup> (Reax 2, Heidolph, Germany) and vacuum filtration (WhatMan Phase Separator 70 mm, GE Healthcare, USA). Finally, residual hexane was allowed to evaporate under a fume hood overnight. The defatted soya flour was extracted for 2 h at room temperature with distilled water (10:1 water:flour ratio) that had been adjusted to pH 8.0 with 2 N (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (T122523, Brenntag AG, Germany). The suspension was then centrifuged at 10400 g for 15 min at 20°C (Sorvall, Lynx-4000 superspeed centrifuge, Thermo Fisher Scientific, USA); the supernatant was adjusted to pH 4.5 with 1 N HCl before being stored at 4°C for 2 h. The mixture was again centrifuged at 10400 g for 20 min at 4°C and the pellet was washed with distilled water, resolubilised by neutralisation to pH 8.0 with 2 N (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and freeze-dried. Final tofu-related and soya milk-related protein isolates contained, respectively, 83.3% and 80.2% protein (conversion factor: 5.50).

#### 2.2.1.2 *Food Matrices*

In addition to the protein isolates described above, this study was conducted using two solid food matrices and two liquid food matrices that we prepared ourselves. The wheat gluten was used to make seitan; the two soya bean batches were used to prepare tofu and soya milk. Soya milk was UHT (Ultra-High Temperature) packed. A portion of the tofu and seitan was minced, freeze-dried (Eurolyo, France), and then rehydrated (with the same quantity of distilled water previously lost) under agitation for 30 minutes. These were labelled freeze-dried tofu and freeze-dried seitan, respectively. The pea emulsion was prepared using the commercial pea isolate and commercial soya oil (Emile Noël, France). After assessing the protein and fat content of the pea isolate, both ingredients were added to water in proportions designed to replicate the protein and fat content of soya milk. The pre-emulsion was created using a disperser (T-50 Homogeniser, Ultra-Turrax, IKA, Germany) and a 15 G Dispersing Element (IKA, Germany) for 1 minute at 10000 rpm. The solution was then homogenised two times using a table-top homogeniser (PandaPLUS 2000, GEA, USA) at 1000 bar. Temperature was checked at the end of processing and never exceeded 46°C.

### 2.2.2 Food Characterisation

#### 2.2.2.1 *Nutrient Content*

Dry matter (DM) content was determined by oven-drying at 105°C overnight. Similarly, ash content was measured according to AOAC 923.03 (AOAC, 1990). Crude fat content was determined by the Randall method after 12 h incubation in 1 M HCl (ISO, 2008). Total nitrogen content was measured using the Kjeldahl method according to Thiex, Manson, Anderson, & Persson (2002). To

calculate crude protein content, conversion factors of 5.36 for pea proteins, 5.50 for soya, and 5.50 for wheat proteins were used according to (Mariotti, Tomé, & Mirand, 2008). Starch content was measured using a polarimeter (European Commission, 2009). Non-starch polysaccharide content was checked (Englyst & Cummings, 1984), but as seed coats were removed from food during processing, only traces were found.

#### 2.2.2.2 Structure of solid foods

##### 2.2.2.2.1 Confocal laser scanning microscopy of solid food before and after freeze-drying

Sections of 0.1-mm thickness were cut with a sharp razor blade and placed on microscopy slides between two gene frames with 10  $\mu$ L of fluorescent probes for protein (Alexa Fluor 546, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) and fat (Nil Red, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Slides were examined using a confocal microscope (green laser) (Eclipse A1+, Nikon, Japan) in spectral mode. Pictures taken (presented here) were representative of the whole slide.

##### 2.2.2.2.2 Scanning electron microscopy (SEM) of freeze-dried food

Freeze-dried products were ground into small particles 0.1–1 mm in diameter. Observation was made with an Environmental Quanta 200 FEG (FEI Company, USA) accelerated at 5 kV and under vacuum pressure of 40 Pa. Pictures shown here were considered representative of the sample.

#### 2.2.3 *In vitro* digestion protocol

##### 2.2.3.1 Set-up

This study used the INFOGEST *in vitro* digestion protocol (Minekus et al., 2014), with a specific focus on proteolysis (Lotti Egger et al., 2015). The enzymes used were protease, *i.e.* pepsin (P6887, Sigma-Aldrich, USA) during the gastric phase and porcine pancreatin (P7545, Sigma-Aldrich, USA) during the intestinal phase. Enzyme activity was determined according to EC 3.4.23.1 for pepsin and EC 3.4.21.4 for trypsin of porcine pancreatin, following the protocol described in the supplementary data of (Minekus et al., 2014). Biliary acid content in porcine bile (B8631, Sigma-Aldrich, USA) was checked using a colorimetric reaction-based kit (ref. 1 2212 99 90 313, DiaSys Diagnostic System GmbH). Digestions were conducted in an orbital shaking water bath (1092, GFL, Germany) at 37°C and 150 rpm. Five mL of a commercial skim milk powder (Régilait, France) (1/10 dissolution in H<sub>2</sub>O, w/v) was also digested two times as a control.



### 2.2.3.2 Oral Phase

Solid foods were ground using a manual mincer until they passed through a 2-mm sieve (Edington Mincer Pro, Product Code 86002, Berkshire, UK), and were then incubated for digestion. In order to simulate the oral phase, **5 g** (of solids) or **5 mL** (of liquids) were mixed with 4 mL of 1.25x concentrated simulated saliva fluid (1.25x SSF), 975  $\mu\text{L}$  of distilled water, and 25  $\mu\text{L}$  of 0.3 M  $\text{CaCl}_2$  in a 50-mL Schott bottle for two minutes. Each digestion was performed with the same initial amount of food. **Incubations of isolates or concentrates contained the same amount of protein as found in those of the related food.** Digestions were performed at least in triplicate, in addition to a digestion without enzyme for each group.

### 2.2.3.3 Gastric Phase

Then, 8 mL of 1.25x concentrated simulated gastric fluid (1.25x SGF) and 5  $\mu\text{L}$  of 0.3 M  $\text{CaCl}_2$  were added to the oral bolus, and the pH of the mixture was gently adjusted to 3 using 1 M HCl. Distilled water was added to create a final volume of 19 mL. After allowing the mixture to reach 37°C, 1 mL of pepsin solution (40 000  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) was rehydrated and added to the digestion reactor to obtain a final concentration of 2 000  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 2.2.3.4 Intestinal Phase

After 2 h of the gastric phase, 11 mL of 1.25x concentrated simulated intestinal fluid (1.25x SIF), 40  $\mu\text{L}$  of 0.3 M  $\text{CaCl}_2$ , and 2.5 mL of bile solution (160  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were added to the chyme. The pH of the mixture was adjusted to 7 using 1 M NaOH and the reactor was filled with distilled water to reach a final volume of 35 mL, without considering the volume of the food. When the temperature reached 37°C, 5 mL of pancreatin solution (800  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  diluted in SIF) were added. The incubation lasted 2 h.

### 2.2.3.5 Sampling and pH regulation

pH was adjusted between each step and checked every 30 min using a glass electrode (N61, SI Analytics GmbH, Germany). We considered the mixture to be homogenous, and took 500- $\mu\text{L}$  samples before incubation with enzymes and 10, 30, 60, and 120 min after the gastric and intestinal phases started. Two initial samplings were performed during the oral phase. At each step, less than 3 mL of content were collected, representing 15% and 7.5% of the chyme volume during the gastric and intestinal period, respectively. Immediately after each sample was taken, enzymatic reactions were blocked with enzymatic inhibitors. For gastric samples, we used 10  $\mu\text{L}$  of 0.5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Pepstatin A (P5318, Sigma-Aldrich, USA), diluted in 9:1 methanol:acetic acid; for intestinal samples, we added 30  $\mu\text{L}$  of 0.1 M Pefabloc SC (76307, Sigma-Aldrich, USA), diluted in distilled water. Samples were then vortexed for 5 s, put on ice, and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until further analysis was carried out.

#### 2.2.4 Release of $\alpha$ -amino groups and determination of degree of hydrolysis (DH)

The concentration of  $\alpha$ -amino groups was determined using the ninhydrin reaction described in (Moore & Stein, 1954; Sarin, Kent, Tam, & Merrifield, 1981). Ninhydrin reagent (250 mL) was prepared by mixing 0.75 g of D (-) fructose (F0127, Sigma-Aldrich), 1.5 g of ninhydrin (151173, Sigma-Aldrich), 15 g of monopotassium phosphate (PHR1330, Sigma-Aldrich), and 9.914 g of sodium phosphate, dibasic anhydrous (71639, Sigma-Aldrich). The mixture was adjusted to pH 6.7, completed with milliQ water, and stored in the dark until use. For each digest, the sample was centrifuged (5000 g for 10 min at 20°C), and the supernatant was diluted with milliQ water and mixed with the prepared ninhydrin reagent at a ratio of 1:2 (v/v ninhydrin reagent:diluted solution). After heat treatment at 95°C for 16 min, the solution was cooled on ice for 20 min. Dilution solvent (3:2 milliQ water:96% ethanol with 0.2% w/v of potassium iodate (215929, Sigma-Aldrich)) was added at a 5:1 ratio (v/v diluent:solution diluted). Absorbance at 570 nm was quantified with a Spark 20M microplate reader (TECAN, Switzerland). A calibration curve was constructed using data generated with known concentrations of glycine in distilled water (ranging from 0.04 to 0.21 mM; G8898, Sigma-Aldrich). The analysis was performed in duplicate for each sample.

To determine the total amount of  $\alpha$ -amino groups released from food, we used the ninhydrin protocol described above on food samples that had first undergone total acid hydrolysis (2 mg of total protein incubated with 1.5 mL of 6 M HCl solution at 110°C for 24 h, then cooled and diluted with water). Two measures of degree of hydrolysis (DH) were calculated from these data, using the following formulas:

- DH using the total amount of food nitrogen in the mix,  $N_{\text{tot food}}$ :  $DH(t) = (N(t) - N(0)) / (N_{\text{tot food}} - N(0)) \times 100$ , where  $N(t)$  was the concentration of  $\alpha$ -amino groups in the mixture at time  $t$ , corrected for endogenous input, and  $N(0)$  was the concentration of  $\alpha$ -amino groups at time 0 (before the addition of pepsin).
- DH using the total amount of nitrogen from  $\alpha$ -amino groups released after total acid hydrolysis,  $N_{100\%}$ , according to (Petitot et al., 2009):  $DH_{N100\%}(t) = (N(t) - N(0)) / (N_{100\%} - N(0)) \times 100$ , where  $N(t)$  and  $N(0)$  are the same as described above.

#### 2.2.5 Data & Statistical Analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SD (standard deviation). Gastric and intestinal steps were analysed independently. DH kinetics were compared using the repeated option of the SAS PROC MIXED procedure (SAS University Edition, v. 3.71; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), with time of digestion, food, and their interactions (written as time x food on figures) as fixed effects. If the effect of the interaction was significant, the LSMEANS procedure was used, followed by Tukey adjustment,

to test differences between foods of interest at specific time points. The alpha level for our statistical tests was 0.05.

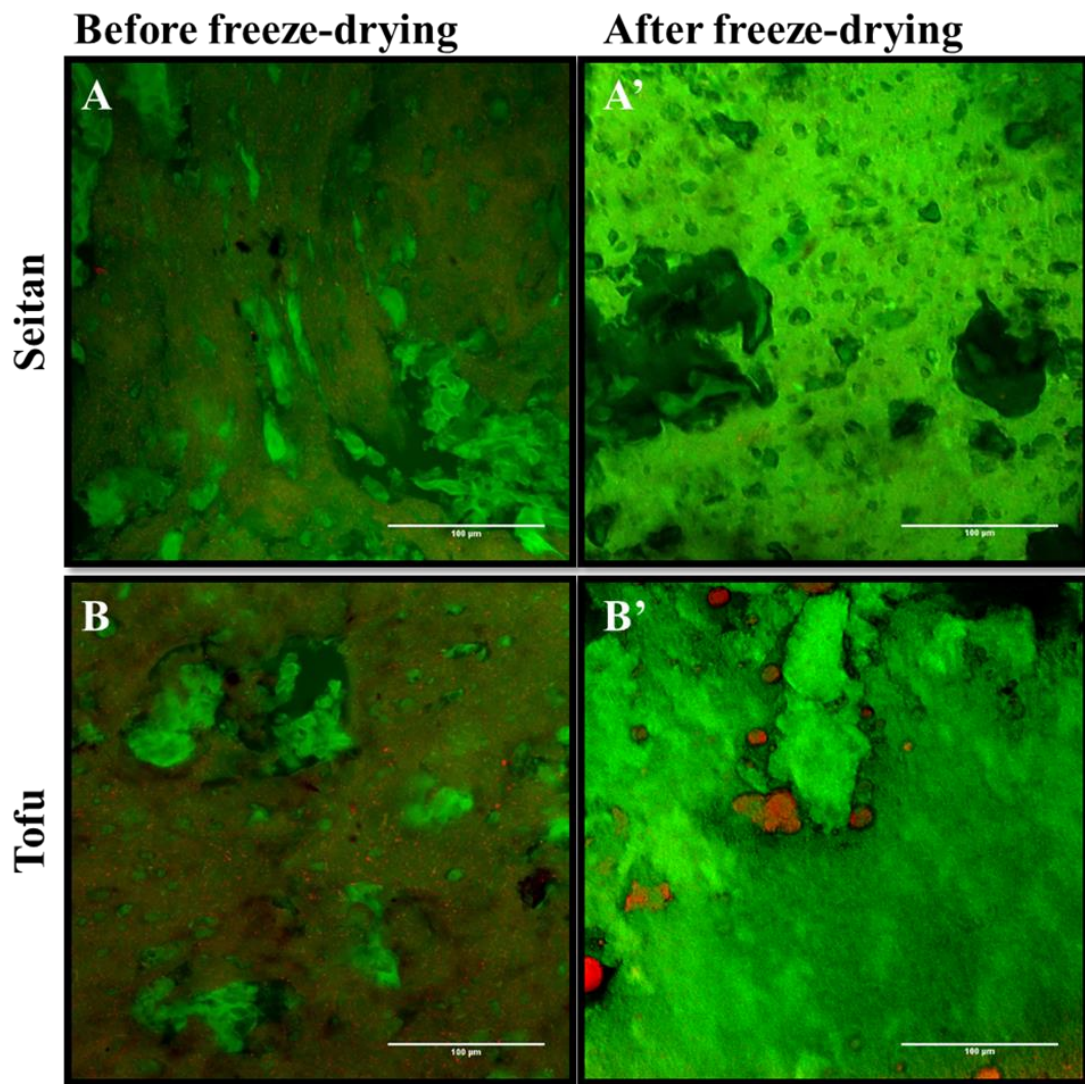
## **2.3 Results and Discussion**

### **2.3.1 Nutritional and structural characterisation**

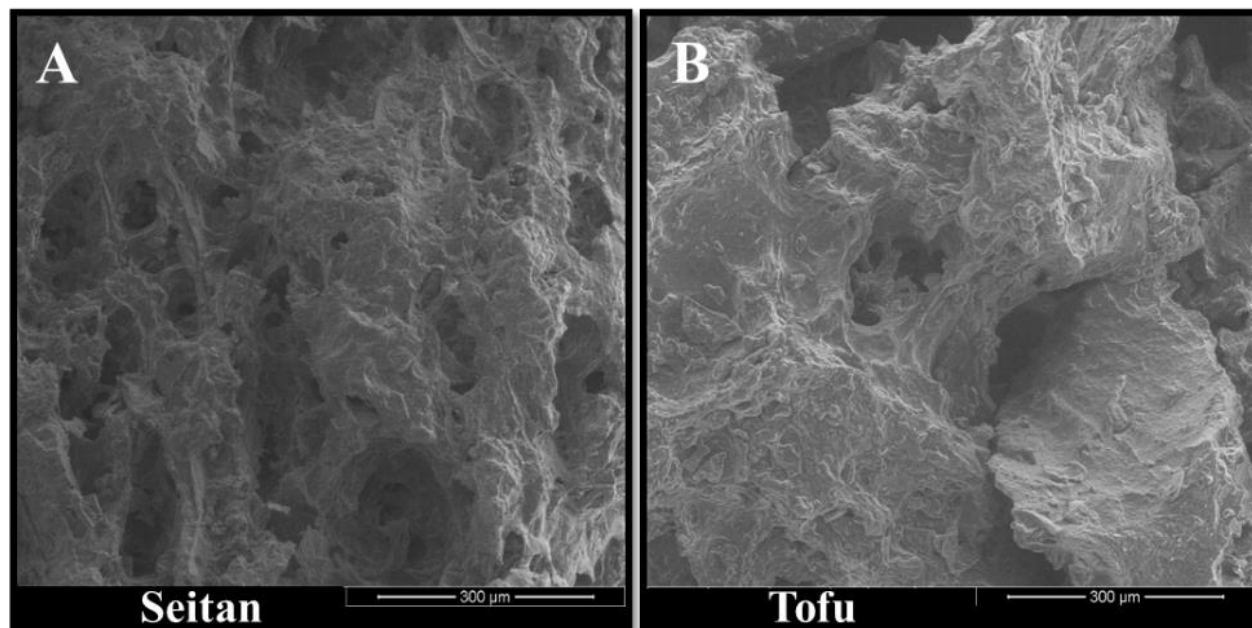
Table 1 shows the composition of the different foods investigated here. Liquids were intentionally prepared to have a fat and protein content that was comparable to their solid counterparts. Seitan was characterised by a high starch content ( $3.0 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), whereas tofu contained more fat ( $8.5 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  versus  $2.1 \text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  for seitan).

Qualitatively, three distinct structures were identified in seitan and tofu (Figure 39): (i) a hydrated gel with proteins that were more or less homogeneous, with droplets in the micrometer range, (ii) highly dense nuclei of proteins (diameter  $\sim 10 \text{ nm}$ ), (iii) and shadow areas containing water, perhaps created by shearing. Globally, seitan was more heterogeneous in composition than tofu.

After the material had been freeze-dried, both matrices appeared more homogeneous. This might have been due to the fact that the freezing process degraded cell walls and ducts, thus facilitating the diffusion of fluorescent markers through the cell networks (Harnkarnsujarit, Kawai, Watanabe, & Suzuki, 2016). Likewise, the cell damage caused by freeze-drying also gave other components, such as enzymes, easier access to macronutrients. Since tofu had appeared more homogeneous than seitan prior to freeze-drying, we considered the resulting structural changes in seitan to be more consequential than those in tofu. Instead, in freeze-dried tofu, the lipids seemed to have coalesced. These qualitative observations were consistent with images taken with SEM (Figure 40), in which porosity seemed to be higher in the freeze-dried seitan than in freeze-dried tofu.



**Figure 39:** Representative images from confocal laser scanning microscopy of seitan and tofu, before and after freeze-drying. Proteins were labelled in green and lipids in red (scale bar is 100  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 40:** Representative images from scanning electron microscopy of seitan and tofu (scale bar is 100 μm).

**Table 1:** Nutritional composition of studied products (g per 100 g (wet base))

Protein source (N factor)	Food	DM	Ash	Protein	Fat	Starch	Name and protein content of the related protein isolate/concentrate
Wheat (5.50)	Seitan	38.4	1.3	27.4	2.1	3.0	49.8 (Gluten)
Soya (5.50)	Tofu	25.0	1.3	11.0	8.5	0	83.3 (Tofu-related protein isolate)
	Soya milk	8.0	0.5	3.0	2.1	0	80.2 (Soya milk-related protein isolate)
Pea (5.36)	Pea emulsion	5.22	0.25	3.0	2.1	0	73.6 (Pea protein isolate)

### 2.3.2 Degree of Hydrolysis (DH)

The degree of hydrolysis was calculated two different ways: using the total amount of food nitrogen ( $N_{\text{tot food}}$ ) or the total amount of nitrogen in  $\alpha$ -amino groups released after the total acid hydrolysis of food ( $N_{100\%}$ ). These two evaluations of the degree of hydrolysis were referred to as DH and  $DH_{N100\%}$ , respectively.

All  $DH_{N100\%}$  values were higher than DH values, which could be explained by the difference between the total amount of food nitrogen put in the reactor ( $N_{\text{tot food}}$ ) and the total amount of  $\alpha$ -amino-group nitrogen released after the total acid hydrolysis of food ( $N_{100\%}$ ).  $N_{100\%}$  was always lower than  $N_{\text{tot food}}$ , with the magnitude of the difference ranging from 22 to 50% depending on the food in question (Figure 41).

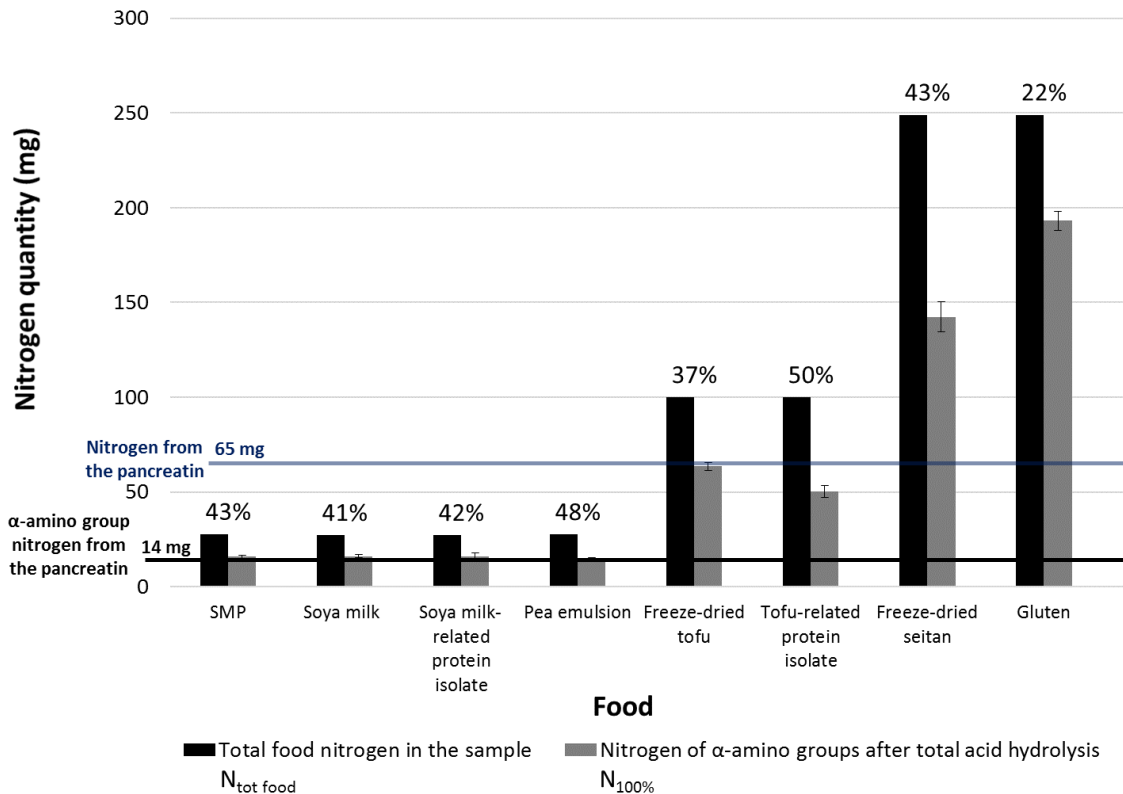
The lowest amount of nitrogen incorporated in the digestive mixture occurred for the liquid foods assays (the soya milk, the pea emulsion and their relative isolates). In fact, around 27–28 mg of  $N_{\text{tot food}}$  were initially incubated, corresponding to 14–16 mg of  $\alpha$ -amino-group nitrogen of totally hydrolysed food (Figure 41). During the intestinal step, around 65 mg of nitrogen and 14 mg of  $\alpha$ -amino group nitrogen were contributed by the addition of pancreatin. In terms of  $\alpha$ -amino-group nitrogen, pancreatin therefore represented 31–33% of the total nitrogen in the intestinal mixture and 46–50% of the theoretical maximum amount of  $\alpha$ -amino-group nitrogen that could be observed, excluding the contributions of pepsin and bile.

One contributing factor could have been that the total acid hydrolysis led to the destruction of some amino acids (Trp, Cys, Thr, Ser), which were therefore not taken into account in the determination of  $N_{100\%}$  (FAO & WHO, 1991). Moreover, some nitrogen atoms that are not involved in  $\alpha$ -amino groups in some amino acids (Gln, Asn, Lys, His) may have been included in the measurement of  $N_{\text{tot food}}$  and thus increased this value compared to the real amount of complete hydrolysis. Finally, some differences likely arose from the fact that we used different foods, with differences in amino acid profiles and food matrices that could affect the kinetics of acid hydrolysis.

Non-negligible differences were observed between different foodstuffs regarding the amounts of  $\alpha$ -amino groups released after total hydrolysis. For this reason, hydrolysis kinetics were presented and analysed using the total amount of food nitrogen ( $N_{\text{tot food}}$ ).

Overall, the amounts of  $\alpha$ -amino-group nitrogen detected here were lower than those previously reported from other studies. Most of those studies used the O-Phthalaldehyde (OPA) method, which has become popular in recent years for the evaluation of digestive proteolysis. However, this method has some limits: the risk of false positives caused by  $\epsilon$ -amino groups is higher than for the ninhydrin

method (Turgeon, Bard, & Gauthier, 1991) and OPA is more dangerous to handle than ninhydrin. Our use of ninhydrin could explain the lower content of  $\alpha$ -amino groups measured here compared to other studies that used OPA or 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), as was previously shown in the digestion of pea protein (Panasiuk, Amarowicz, Kostyra, & Sijtsma, 1998).



**Figure 41:** Amount of total food nitrogen in the reactor ( $N_{\text{tot food}}$ ) compared to the total amount of nitrogen in  $\alpha$ -amino groups released after total acid hydrolysis ( $N_{100\%}$ ) (bars are shown with standard deviations,  $n = 2$  total hydrolyses). The black line indicates the amount of  $\alpha$ -amino nitrogen contributed by pancreatin in the intestinal phase. Percentages above bars are relative differences between  $N_{\text{tot food}}$  and  $N_{100\%}$ :  $(N_{\text{tot food}} - N_{100\%}) / (N_{\text{tot food}})$ . SMP: Skim milk powder.

### 2.3.3 Effect of the food structure on proteolysis

#### 2.3.3.1 Degree of Hydrolysis (DH) of food matrices

This section describes only the degree of hydrolysis (DH) of food items; protein isolates/concentrates are analysed in section 2.3.3.4 in the context of their corresponding foods.

The gastric proteolysis of fresh seitan (Figure 42A) began late, after 30 min ( $\text{DH} = 0.3 \pm 0.0\%$ ) of incubation, and reached a final DH of  $0.4 \pm 0.1\%$  in this stage. Just after the addition of pancreatin, DH increased directly and progressively until it reached  $11.8 \pm 1.2\%$  at 60 min, at which point it remained stable (120 min:  $11.8 \pm 2.6\%$ ) (Figure 43A). The DH kinetics of freeze-dried seitan were largely similar to those of fresh seitan; the main exception was found in the intestinal step, when after

30 minutes the DH of freeze-dried seitan surpassed that of fresh seitan (see section 2.3.3.3 for more details).

With fresh tofu, gastric hydrolysis began just after the addition of pepsin (Figure 42B); the DH was  $0.5 \pm 0.3\%$  after 1 min. At 120 min, the DH arrived at  $1.9 \pm 0.4\%$ . During the intestinal step (Figure 43B), the addition of pancreatin induced a direct increase in DH (1 min: DH =  $13.4 \pm 5.9\%$ ), but with a large degree of variation among replicates. DH remained stable around this value for the next 10 min (DH =  $12.0 \pm 3.5\%$ ). Finally, from 30 min to 120 min after the addition of pancreatin, DH continued to rise linearly to a final value of  $33.1 \pm 4.0\%$ . DH kinetics of freeze-dried tofu were similar to those of fresh tofu (see section 2.3.3.3 for more details).

Gastric hydrolysis of the pea emulsion (Figure 42C) increased linearly, from  $0.5 \pm 1.0\%$  at 1 min to a maximum of  $4.9 \pm 0.6\%$ . One minute after the addition of pancreatin, the DH increased by more than a factor of seven ( $35.7 \pm 19.4\%$ ), but again with extensive variation between tests. As we observed for tofu, during the 10 first minutes of the intestinal phase (Figure 43C), the DH of the pea emulsion remained relatively stable around 35%. From that point until the end of the phase, the DH doubled linearly, increasing from  $35.0 \pm 20.6\%$  to  $73.6 \pm 12.1\%$ .

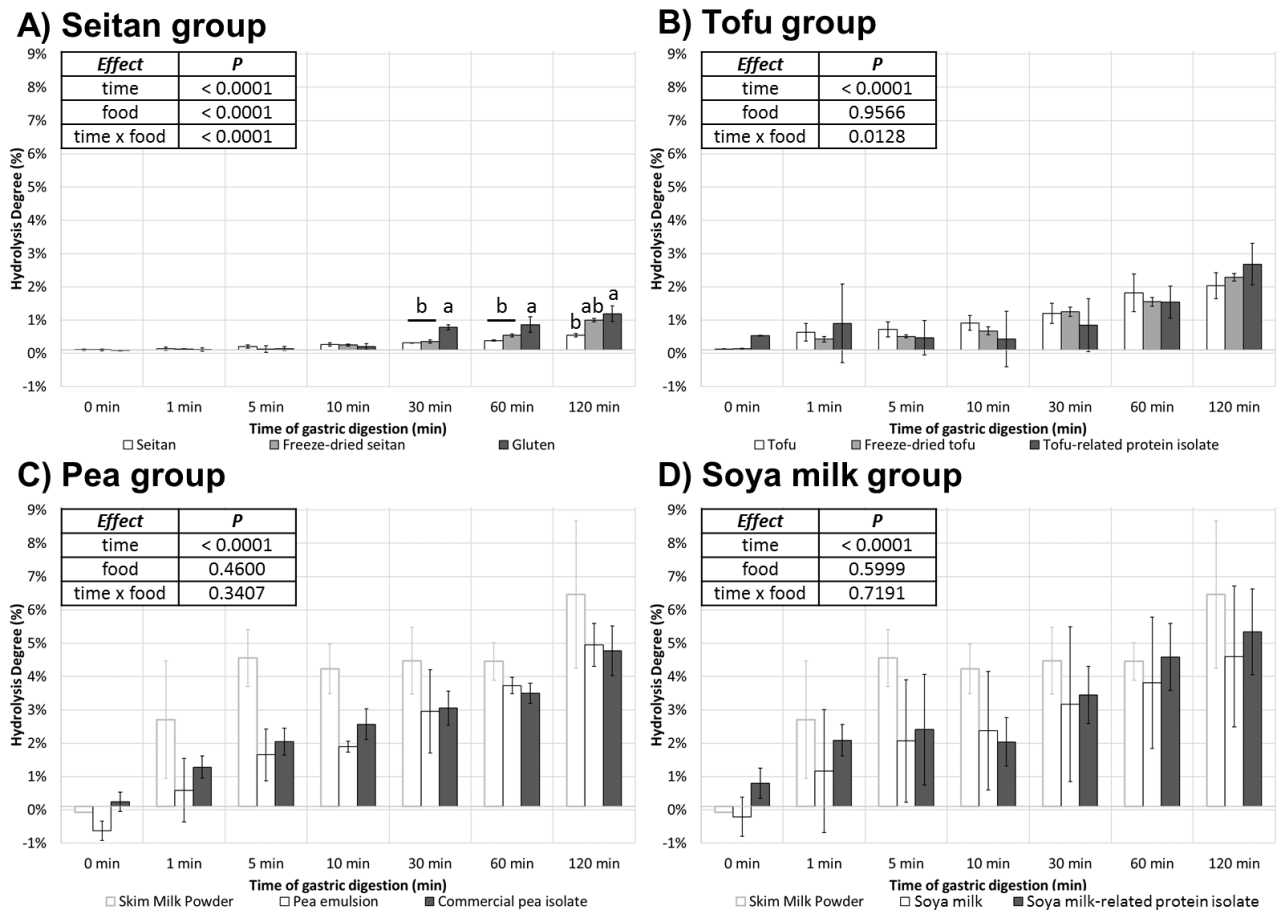
The DH of soya milk evolved similarly to that of the pea emulsion. In the simulated stomach (Figure 42D), hydrolysis began immediately, and after 120 min of incubation, arrived at a maximum value of  $4.5 \pm 2.1\%$ . In the intestinal environment (Figure 43D), in the first minute following the addition of pancreatin the DH increased to  $34.7 \pm 14.0\%$  and remained constant (about 30%) for 30 min, at which point the DH increased to reach a final value of  $51.1 \pm 15.5\%$ .

Overall, the two solid matrices, seitan and tofu, exhibited a lower degree of proteolysis than the two liquid matrices, pea emulsion and soya milk. This might be due to the relative inhibition of pepsin diffusion within a solid matrix compared to a liquid one, as previously demonstrated between water and whey protein isolate gels (Luo, Borst, Westphal, Boom, & Janssen, 2017). Indeed, slower proteolysis occurs in heterogeneous phases (solid-liquid) rather than in solution. Among the four foods, seitan demonstrated the least amount of hydrolysis during the gastric phase.

Values of DH in the gastric phase were low compared to final values in the intestinal phase. The differences we observed here between the DH in gastric and intestinal phases of *in vitro* digestion, which were based on similar quantities of protein, were consistent with those obtained from the gastric digestion of pasta (DH 8% after 180 min of pepsin incubation; (Petitot et al., 2009) or whey protein (DH around 3–4%; (Mat, Cattenoz, Souchon, Michon, & Le Feunteun, 2018). Following standard practice, we also digested a skim milk powder (diluted 1:10 in water) in order to compare our results to previous studies. As was reported by (Mat, Le Feunteun, Michon, & Souchon, 2016),

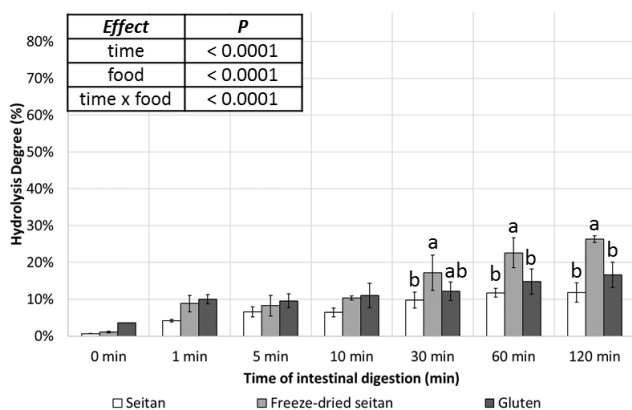


we found that about 50% of dairy proteins were digested using the *in vitro* INFOGEST protocol (L. Egger et al., 2017; Picariello et al., 2015).

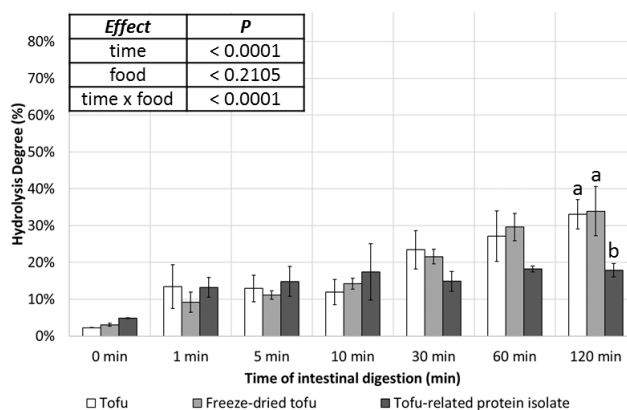


**Figure 42:** Profiles of degree of hydrolysis, calculated with  $N_{\text{tot food}}$  (DH), of protein during *in vitro* gastric digestion. Bars represent mean  $\pm$  SD; n = 3-7 digestions. Panels show the DH of foods before and 1, 5, 10, 30, 60, and 120 min after incubation with pepsin. A) Seitan group; B) Tofu group; C) Pea group; D) Soya milk group. Letters (a – b) above bars indicate results of statistical comparison with post-hoc Tukey tests.

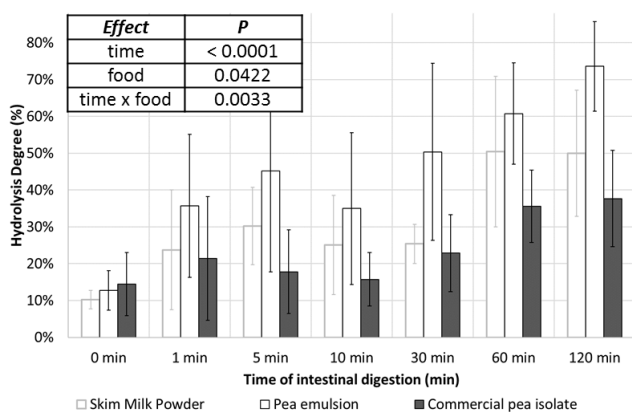
### A) Seitan group



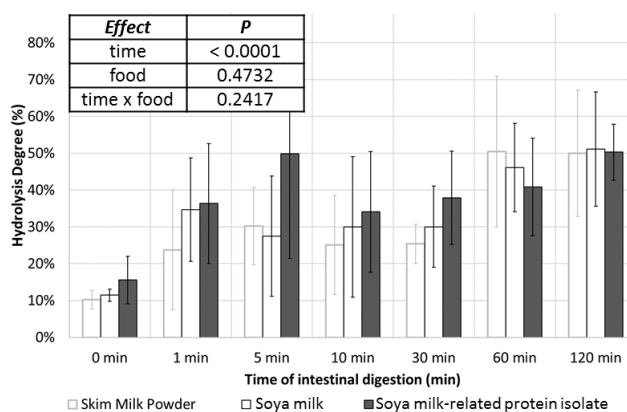
### B) Tofu group



### C) Pea group



### D) Soya milk group



**Figure 43:** Profiles of the degree of hydrolysis, calculated with  $N_{\text{tot food}}$  (DH), of protein during *in vitro* intestinal digestion. Bars represent mean  $\pm$  SD;  $n = 3-6$  digestions. Panels show the DH of foods before and 1, 5, 10, 30, 60, and 120 min after incubation with pancreatin. A) Seitan group; B) Tofu group; C) Pea group; D) Soya milk group. Letters (a – b) above bars indicate results of statistical comparison with post-hoc Tukey tests.

#### 2.3.3.2 Solid and liquid soya-based foods

The effect of the food x time interaction was significant during gastric digestion ( $P = 0.0429$ ), with the DH of soya milk increasing more quickly ( $-0.3 \pm 0.0\%$  to  $4.5 \pm 2.1\%$ ) (Figure 42D) than that of tofu ( $0.0 \pm 0.0\%$  to  $1.9 \pm 0.4\%$ ) (Figure 42B). This result is consistent with the observation that  $\beta$ -conglycinin persists in tofu but not in soya milk after pepsin digestion (Adachi et al., 2009). One possible explanation could be linked to the lower proportion of soluble nitrogen, which is accessible to enzymes, in tofu compared to in soya milk (Rui et al., 2016). Gastric conditions have also been reported to cause more significant structural alterations to soya milk than to tofu (Liu et al., 2019); this could also facilitate further intestinal digestion and lead to higher rates of hydrolysis.

During intestinal digestion, the effect of food was significant ( $P = 0.0087$ ), but the food x time interaction was not ( $P = 0.6894$ ); this meant that even if DH values were significantly different

between tofu and soya milk, the kinetics of hydrolysis were similar. The final DH values highlighted the cumulative effect of the differences between the two products: soya milk was  $51.1 \pm 15.5\%$  hydrolysed (Figure 43D), whereas tofu was only  $33.1 \pm 4.0\%$  hydrolysed (Figure 43B).

### 2.3.3.3 *Effect of freeze-drying*

Significant differences were found between fresh and freeze-dried seitan at the end of the intestinal step, with fresh seitan demonstrating a lower DH ( $11.8 \pm 2.6\%$ ) than freeze-dried ( $26.3 \pm 0.9\%$ ) ( $P < 0.0001$ ). Instead, this was not the case for tofu (fresh:  $33.1 \pm 4.0\%$  versus freeze-dried:  $33.9 \pm 6.7\%$ ;  $P = 1.0000$ ).

Freeze-drying seemed to increase the substrates' accessibility to enzymes by modifying the food structure, but not necessarily altering pepsin proteolysis sites. Although a previous study highlighted pore deformation and wall-thickness changes in tofu during freeze-drying, and leaching during rehydration, no effect was reported on the protein digestion of tofu (Harnkarnsujarit et al., 2016). Freeze-drying could also affect the bioaccessibility of other compounds, as was reported for polyphenol in apples, by altering the microstructure (Dalmaua, Bornhorst, Eima, Rosselló, & Simal, 2017).

### 2.3.3.4 *Comparison between protein concentrates/isolates and food matrices*

With soya-based foods and protein isolates, we found that the food matrix had a significant effect on protein digestion: the gel matrix of tofu seemed to protect peptide bonds from hydrolysis by trypsin (and, to a lesser extent, chymotrypsin), whereas emulsification during the process of making soya milk appeared to expose them.

The effect of the food x time interaction was significant for tofu and its related preparations during both the gastric and intestinal steps, with the final DH of the tofu-associated protein isolate ( $17.9 \pm 1.8\%$ ) markedly lower than that of fresh or freeze-dried tofu ( $33.1 \pm 4.0\%$  and  $33.9 \pm 6.7\%$ , respectively;  $P < 0.0001$  for both) (Figure 43B). The likely explanation for this is that, compared to the unprocessed protein of the isolate, denaturation occurring during processing probably made the protein in the food matrix more sensitive to digestive proteases by opening protein structures (Desphande & Damodaran, 1989). However, for soya milk and its related isolate, there was no significant food x time interaction (gastric phase:  $P = 0.7191$ ; intestinal phase:  $P = 0.2417$ ) (Figure 42D and Figure 43D), which suggests that the protein in soya milk and in the soya milk-related isolate was digested in the same way. This is consistent with previous work performed on humans in which researchers found that, although the gastro-jejunal absorption of nitrogen appeared to be lower for soya milk (49%) than for soya protein isolate (63%), the difference was not statistically significant (Baglieri et al., 1994).

For pea protein, the only differences between the protein isolate and the emulsion were found during the intestinal step: when analysed over the entire stage, the DH of the emulsion was significantly higher than the DH of the protein isolate ( $P = 0.0033$ ) (Figure 43C). However, no significant differences were detected at any of the individual sampling times. It should be noted that the coefficients of variation (ratio of the mean to the standard deviation) were particularly high for the pea emulsion, likely influenced by the high relative proportion of pancreatin in the intestinal phase, as discussed in section 2.3.2. A 1-liter batch of emulsion was prepared before each assay. We considered each batch to be homogenous, but since only small quantities were used in each assay (5 mL), it is possible that there were variations among the samples used, which then introduced variation into our results. Regardless, for pea protein, a simple solubilisation of the isolate appeared to be less conducive to protein hydrolysis than an emulsification. The high-pressure processing used for emulsification could explain the higher rate of protein digestion in this preparation, as previously described for pea isolates (Laguna, Picouet, Guàrdia, Renard, & Sarkar, 2017). This type of processing may cause an increase in protein solubilisation and in the number of lipid droplets, thus increasing the exposure of protein to enzymes.

With respect to wheat protein, isolated gluten was more accessible to enzymes than gluten in a food matrix, as indicated by the higher DH in the simulated stomach for wheat gluten compared to fresh seitan starting from 30 min after the addition of pepsin (0.7–1.1% versus 0.2–0.4%;  $P < 0.0086$ ) (Figure 42A). A similar difference was observed between gluten and freeze-dried seitan at 30 and 60 min, but not at 120 min. Then, during the intestinal step, the DH kinetics of gluten were similar to those of fresh seitan, but freeze-dried seitan was significantly more hydrolysed. The reduction in gastric DH observed for seitan compared to gluten could be due to the heat treatment used in the seitan-making process, which has been previously reported to lead to lower protein hydrolysis during *in vitro* digestion of gluten products (Rahaman, Vasiljevic, & Ramchandran, 2016; Wu, Taylor, Nebl, Ng, & Bennett, 2017).

#### 2.3.4 Protein source and effect on proteolysis

##### 2.3.4.1 Effect of protein source on the proteolysis of solids

When we compared fresh tofu and seitan, the food x time interaction was significant ( $P < 0.0001$ ) in both the simulated stomach and small intestine. From 10 min after gastric output until the end of intestinal digestion, fresh tofu was more hydrolysed than fresh seitan ( $P < 0.0276$ ), with the exception of just after the addition of bile, just before the addition of pancreatin, and 10 min into the intestinal digestion. The final values for DH in the intestinal phase illustrate the difference between these two solid foods:  $33.1 \pm 4.0\%$  for fresh tofu,  $11.8 \pm 2.6\%$  for seitan.

These observations may be explained by the higher solubility of soya protein compared to gluten. The supposed higher porosity (Figure 40) of seitan compared to tofu does not seem to have resulted in higher hydrolysis. The protein aggregates that we observed in confocal images of seitan appeared to be denser than those of tofu (Figure 39), which could explain this limited proteolysis. Other factors, such as the presence of starch in seitan and its absence in tofu, could also contribute to a higher degree of resistance to hydrolysis (Nawrocka, Szymańska-Chargot, Miš, Kowalski, & Gruszecki, 2016).

#### 2.3.4.2 *Effect of protein source on the proteolysis of liquids*

The proteolysis of pea and soya emulsions proceeded similarly: there was no significant interaction observed between protein source and time either during the gastric ( $P = 0.9509$ ) or the intestinal step ( $P = 0.1850$ ). Furthermore, during the gastric phase, no differences were detected between pea and soya isolates ( $P = 0.1200$ ). However, the two isolates did exhibit significant differences during the intestinal phase ( $P = 0.0419$ ): soya isolate appeared to be hydrolysed more quickly than pea isolate, even if none of the differences at individual sampling times were considered significant. This result was surprising given that a recent study, using the same conditions of *in vitro* digestion, found that around 25% fewer  $\alpha$ -amino groups were released from a soya isolate compared to a pea isolate (Corgneau, Gaiani, Thanh, & Le, 2019).

#### 2.3.4.3 *Importance of the protease:protein ratio*

When we compared the two types of soya protein isolates (representative of tofu and soya milk, respectively), we found a significant effect of the food x time interaction on the kinetics of gastric DH ( $P = 0.0186$ ). Starting from 30 min after the addition of pepsin ( $P < 0.0684$ ), the protein isolate that was representative of tofu seemed to be less hydrolysed (0.7–2.6%) than the one that represented soya milk (3.3–5.2%).

The DH of the soya protein isolates also differed during the intestinal phase ( $P = 0.0039$ ), but not globally (overall interaction effect was not significant:  $P = 0.2523$ ). At the end of the intestinal step, the DH of the tofu-related isolate appeared to be lower ( $17.9 \pm 1.8\%$ ) than the soya milk-related isolate ( $50.3 \pm 7.6\%$ ), but this difference did not reach the level of statistical significance ( $P = 0.0988$ ).

The slower and more limited hydrolysis that we observed for the tofu-associated isolate could be explained by the fact that it was 3.7-times more concentrated with respect to food protein content than the isolate that represented soya milk. It is also possible that some of these differences arose from inconsistencies between the batches of soya beans used to make the tofu and soya milk.

## 2.4 Conclusions

The present study on *in vitro* protein digestion of different food products enabled us to examine multiple factors that affect the digestion of proteins, and, through various comparisons, to untangle their relative effects. Here, the food matrix played an important role in the digestion of proteins, as demonstrated for both pea emulsion and tofu. By comparing the digestion of the proteins alone, only solubilised in water, to the same proteins inside a food matrix, we were able to observe clear differences in the progression of the degree of hydrolysis. In both cases, fresh tofu and pea emulsion were better hydrolysed than their respective protein isolates. However, this effect was dependent on the food matrix and protein of origin, because it was not found for seitan and soya milk. The food matrix also affected how proteases digested food proteins. Globally, we observed that solid foods had a lower degree of hydrolysis than liquid ones. More specifically, after gastric and intestinal digestion, soya milk was better hydrolysed (51%) than tofu (33%). We were also able to document how a treatment that affects the food matrix—freeze-drying, which in seitan appeared to increase the flexibility of the protein network—also increased the final degree of hydrolysis. With respect to protein source, it was not possible to make generalisations; protein digestion of the soya milk-related isolate was significantly different from that of the pea isolate, but emulsions of both isolates were digested similarly. Another of our comparisons enabled us to evaluate the effect of different concentrations of the same protein: when incubated with the same amount of digestive enzyme, a larger quantity of soya protein substrate (representative of tofu) was hydrolysed more slowly than a smaller amount of the same protein (representative of soya milk). To conclude, efforts to characterise proteolysis-related data during *in vitro* digestion represent a useful starting point in screening and comparing the responses of different kinds of plant-based food protein to digestive processes.

## **Acknowledgements**

We thank Dominique Chevalier from Nutrition & Santé for kindly providing food products and advice. We are grateful to Lindsay Higgins for correcting the English of the manuscript. We also gratefully acknowledge Sophie Legall for quantifying non-starch polysaccharide dosages and Thomas Auxenfans for taking pictures on the scanning electron microscope.

## **Funding information**

The present article is part of a CIFRE thesis (CIFRE n°2016/0719) funded by IMPROVE SAS and INRA.

## **Disclosure**

The authors have no competing interests.

## **Author Contributions**

DD, IS, ML, AR, and YR defined the food types. YR performed the digestion experiments. AR took confocal microscopy pictures. YR analysed the data. YR drafted the manuscript, and DR, ML, AR, and IS helped revise it.

## References

- Adachi, A., Horikawa, T., Shimizu, H., Sarayama, Y., Ogawa, T., Sjolander, S., ... Moriyama, T. (2009). Soybean Beta-conglycinin as the main allergen in a patient with food-dependent exercise-induced anaphylaxis by tofu: Food processing alters pepsin resistance. *Clinical and Experimental Allergy*, 39(1), 167–173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2008.03148.x>
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis, 15th edn.* Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Baglieri, A., Mahe, S., Zidi, S., Huneau, J. F., Thuillier, F., Marteau, P., & Tome, D. (1994). Gastro-jejunal digestion of soya-bean-milk protein in humans. *The British Journal of Nutrition*, 72(4), 519–532. <https://doi.org/10.1079/BJN19940056>
- Bohn, T., Carriere, F., Day, L., Deglaire, A., Egger, L., Freitas, D., ... Dupont, D. (2018). Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), 2239–2261. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1315362>
- Carbonaro, M., Maselli, P., & Nucara, A. (2015). Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Research International*, 76, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007>
- Corgneau, M., Gaiani, C., Thanh, D., & Le, L. (2019). Nutritional quality evaluation of commercial protein supplements. *International Journal of Food Science and Technology*, 1–9. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14170>
- Dalmaua, M. E., Bornhorst, G. M., Eima, V., Rosselló, C., & Simal, S. (2017). Effects of freezing, freeze drying and convective drying on in vitro gastric digestion of apples. *Food Chemistry*, 215, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.134>
- Desphande, S. S., & Damodaran, S. (1989). Structure Digestibility Relationship of Legume 7S Proteins. *Journal of Food Science*, 54(1), 108–113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb08579.x>
- Egger, L., Ménard, O., Baumann, C., Duerr, D., Stoffers, H., Schlegel, P., ... Portmann, R. (2017). Digestion of Proteins in Milk: Comparing different in vitro systems with in vivo data. *Food Research International*, np. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.049>
- Egger, Lotti, Ménard, O., Delgado-Andrade, C., Alvito, P., Assunção, R., Balance, S., ... Portmann, R. (2015). The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action. *Food Research International*, 88, 217–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.006>
- Englyst, H. N., & Cummings, J. H. (1984). Simplified method for the measurement of total non-starch polysaccharides by gas-liquid chromatography of constituent sugars as alditol acetates.



- The Analyst*, 109(7), 937. <https://doi.org/10.1039/an9840900937>
- European Commission. (2009). *Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Annexe III.*
- FAO, & WHO. (1991). *Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation (1989: Bethesda, Maryland).*
- FAOSTAT. (2017). Production database from the Food and Agriculture Organization of the United Nations. Data available at <http://www.fao.org/faostat/>. Last accessed August 2019.
- Fukushima, D. (1981). Soy proteins for foods centering around soy sauce and tofu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(3), 346–354. <https://doi.org/10.1007/BF02582376>
- González, A. D., Frostell, B., & Carlsson-Kanyama, A. (2011). Protein efficiency per unit energy and per unit greenhouse gas emissions : Potential contribution of diet choices to climate change mitigation. *Food Policy*, 36, 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2011.07.003>
- Harnkarnsujarit, N., Kawai, K., Watanabe, M., & Suzuki, T. (2016). Effects of freezing on microstructure and rehydration properties of freeze-dried soybean curd. *Journal of Food Engineering*, 184, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.03.014>
- ISO. (2008). *Céréales, produits céréaliers et aliments des animaux - Détermination de la teneur en matières grasses brutes et en matières grasses totales par la méthode d'extraction de Randall Méthode NF ISO 11085.* [www.iso.org](http://www.iso.org) Geneva, Switzerland.
- Laguna, L., Picouet, P., Guàrdia, M. D., Renard, C. M. G. C., & Sarkar, A. (2017). In vitro gastrointestinal digestion of pea protein isolate as a function of pH, food matrices, autoclaving, high-pressure and re-heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 511–519. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.021>
- Li, X., Li, Y., Hua, Y., Qiu, A., Yang, C., & Cui, S. (2007). Effect of concentration, ionic strength and freeze-drying on the heat-induced aggregation of soy proteins. *Food Chemistry*, 104(4), 1410–1417. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.02.003>
- Liu, Song, M., Maison, T., & Stein, H. H. (2014). Effects of protein concentration and heat treatment on concentration of digestible and metabolizable energy and on amino acid digestibility in four sources of canola meal fed to growing pigs. *Journal of Animal Science*, 92(10), 4466–4477. <https://doi.org/10.2527/jas2013-7433>
- Liu, W., Lou, H., Ritzoulis, C., Chen, X., Shen, P., Lu, Y., ... Han, J. (2019). Structural characterization of soybean milk particles during in vitro digestive / non-digestive simulation. *LWT - Food Science and Technology*, 108, 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.086>
- Lorieau, L., Halabi, A., Ligneul, A., Hazart, E., Dupont, D., & Floury, J. (2018). Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino acid bioaccessibility during in

- vitro digestion. *Food Hydrocolloids*, 82, 399–411.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.019>
- Luo, Q., Borst, J. W., Westphal, A. H., Boom, R. M., & Janssen, A. E. M. (2017). Pepsin diffusivity in whey protein gels and its effect on gastric digestion. *Food Hydrocolloids*, 66, 318–325.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.046>
- Mariotti, F., Tomé, D., & Mirand, P. P. (2008). Converting nitrogen into protein - Beyond 6.25 and Jones' factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2), 177–184.  
<https://doi.org/10.1080/10408390701279749>
- Mat, D. J. L., Cattenoz, T., Souchon, I., Michon, C., & Le Feunteun, S. (2018). Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions. *Food Chemistry*, 239, 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.115>
- Mat, D. J. L., Le Feunteun, S., Michon, C., & Souchon, I. (2016). In vitro digestion of foods using pH-stat and the INFOGEST protocol: Impact of matrix structure on digestion kinetics of macronutrients, proteins and lipids. *Food Research International*, 88, 226–233.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.002>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct. Food Funct*, 5(5), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Moore, S., & Stein, W. H. (1954). A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211(2), 907–913.
- Nawrocka, A., Szymańska-Chargot, M., Miš, A., Kowalski, R., & Gruszecki, W. I. (2016). Raman studies of gluten proteins aggregation induced by dietary fibres. *Food Chemistry*, 194, 86–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.132>
- Panasiuk, R., Amarowicz, R., Kostyra, H., & Sijtsma, L. (1998). Determination of  $\alpha$ -amino nitrogen in pea protein hydrolysates: A comparison of three analytical methods. *Food Chemistry*, 62(3), 363–367. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00164-7)
- Petitot, M., Brossard, C., Barron, C., Larré, C., Morel, M. H., & Micard, V. (2009). Modification of pasta structure induced by high drying temperatures. Effects on the in vitro digestibility of protein and starch fractions and the potential allergenicity of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 116(2), 401–412. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.001>
- Picariello, G., Miralles, B., Mamone, G., Sánchez-Rivera, L., Recio, I., Addeo, F., & Ferranti, P. (2015). Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(5), 948–956.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201400856>

- Rahaman, T., Vasiljevic, T., & Ramchandran, L. (2016). Effect of heat, pH and shear on digestibility and antigenic characteristics of wheat gluten. *European Food Research and Technology*, 242(11), 1829–1836. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2682-4>
- Rozan, P., Lamghari, R., Linder, M., Villaume, C., Fanni, J., Parmentier, M., & Méjean, L. (1997). In Vivo and in Vitro Digestibility of Soybean, Lupine, and Rapeseed Meal Proteins after Various Technological Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1762–1769. <https://doi.org/10.1021/jf960723v>
- Rui, X., Xing, G., Zhang, Q., Zare, F., Li, W., & Dong, M. (2016). Protein bioaccessibility of soymilk and soymilk curd prepared with two *Lactobacillus plantarum* strains as assessed by in vitro gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 38, 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.029>
- Sarin, V. K., Kent, S. B. H., Tam, J. P., & Merrifield, R. B. (1981). Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Analytical Biochemistry*, 117(1), 147–157. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90704-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90704-1)
- Sorgentini, D. A., & Wagner, J. R. (2002). Comparative study of foaming properties of whey and isolate soybean proteins. *Food Research International*, 35(8), 721–729. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00067-4)
- Tavano, O. L., Neves, V. A., & da Silva Júnior, S. I. (2016). In vitro versus in vivo protein digestibility techniques for calculating PDCAAS (protein digestibility-corrected amino acid score) applied to chickpea fractions. *Food Research International*, 89, 756–763. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.005>
- Thiex, N. J., Manson, H., Anderson, S., & Persson, J. Å. (2002). Determination of crude protein in animal feed, forage, grain, and oilseeds by using block digestion with a copper catalyst and steam distillation into boric acid: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 85(2), 309–317.
- Turgeon, S. L., Bard, C., & Gauthier, S. F. (1991). Comparaison de trois méthodes pour la mesure du degré d'hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24(1–2), 14–18. [https://doi.org/10.1016/S0315-5463\(91\)70013-8](https://doi.org/10.1016/S0315-5463(91)70013-8)
- Wu, T., Taylor, C., Nebl, T., Ng, K., & Bennett, L. E. (2017). Effects of chemical composition and baking on in vitro digestibility of proteins in breads made from selected gluten-containing and gluten-free flours. *Food Chemistry*, 233, 514–524. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.158>

### Chapitre 3. Evolution postprandiale du pH intragastrique : comparaison des techniques de mesures, effets de la structure de l'aliment et modélisation des cinétiques

Temporal changes in postprandial intragastric pH: comparing measurement methods, food structure effects, and kinetic modelling

*Authors (\* corresponding author)*

Yohan Reynaud<sup>a,b\*</sup>, Caroline Buffière<sup>c</sup>, Jérémie David<sup>c</sup>, Benoît Cohade<sup>c</sup>, Mélissa Vauris<sup>c</sup>, Michel Lopez<sup>a</sup>, Isabelle Souchon<sup>d</sup>, Didier Dupont<sup>b</sup>, Didier Rémond<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*IMPROVE SAS, F-80480, Dury, France*

<sup>b</sup>*STLO, INRA, AGROCAMPUS OUEST, F-35042, Rennes, France*

<sup>c</sup>*Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, F-63000, Clermont-Ferrand, France*

<sup>d</sup>*GMFA, INRA, AgroParisTech, Université Paris Saclay, F-78850, Thiverval-Grignon, France*

Publié dans Food Research International (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108784>)

#### Graphical abstract

Foods tested:

Two Solids

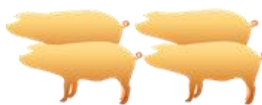
- Tofu (soy based)
- Seitan (wheat gluten based)

Two Liquids

- Soymilk
- Pea Emulsion

Methods to follow the postprandial intragastric pH:

4 adult Yucatan minipigs with a gastric cannula



- Wireless pH capsule
- pH catheters
- Sampling through the cannula

## Abstract

Intragastric pH greatly affects food disintegration and the release of nutrients in the gut. Here, the behaviour of two liquid meals (soymilk, pea emulsion) and two solid meals (tofu, seitan) was tested in miniature pigs fitted with gastric cannula. For 5 h, intragastric pH was recorded using one of three methods: *ex vivo* measurements of chyme samples, *in situ* measurements using pH catheters, or *in situ* measurements using wireless pH capsules, both inserted through a pig's cannula. The pH values obtained with the two *in situ* methods were highly correlated. The liquid and solid foods yielded distinct pH kinetics. For the solids, pH simply decreased exponentially. For the liquids, pH increased rapidly and then plateaued for 2 h before dropping. Food macrostructure and, to a lesser extent, food buffering capacity clearly had an impact on intragastric pH. We modeled changes in intragastric pH over time with food-dependent nonlinear equations.

**Keywords:** pH; stomach; pH catheter; wireless pH capsule; food matrix

## Highlights

- The catheter method and the capsule method yielded very similar pH kinetics
- Between 30 min and ~4.5 h after ingestion, gastric pH was macrostructure dependent
- For solid foods, there was a rapid exponential decrease in pH
- For liquid foods, pH remained constant for 2 h before dropping rapidly
- A model of postprandial pH kinetics in the stomach was developed

### 3.1 Introduction

Luminal pH plays a key role in the disintegration of food and tablets/capsules in the stomach because it impacts both the biochemical structure of ingested items and the activity of digestive enzymes. Changes in protein macrostructure occur in the gastric system. For example, casein clotting has been well described and is a consequence of acidification, which slows the gastric emptying of the resulting particles (compared to that of globulins that remain soluble) (Boirie *et al.*, 1997). Thermodynamic laws act on protein structure (Dill, 1990); indeed, protein structure and protein behaviour in fluids are both affected by temperature, pH, and ionic forces (Carbonaro *et al.*, 2015). It seems likely that plant proteins also undergo aggregation, coagulation, denaturation, solubilisation, or precipitation as a result of decreased pH in the gastric system, and all these processes have an impact on digestibility (Carbonaro *et al.*, 1997). These phenomena can additionally affect gastric dynamics like antral grinding, which plays a major role in bolus deconstruction, notably that of solid foods (Marciani, Gowland, Fillery-travis, *et al.*, 2001).

The acidification that occurs in the stomach results from the secretion of hydrochloric (HCl) acid, which is known to induce protein denaturation independently of pH (Goto, Calciano and Fink, 1990). In addition to its impact on protein structure, pH greatly affects pepsin activity (Kazir *et al.*, 2018) and, hence, the appearance of peptides (Kratzer and Porter, 1962). The effect of gastric pH on protein digestion has been well described for  $\beta$ -lactoglobulin gels (Dekkers *et al.*, 2016) and egg-white lysozyme (Jiménez-Saiz *et al.*, 2014), but few data are available concerning the effect of gastric pH on plant protein digestion. It is also clear that the food matrix influences the release of nutritional components of interest (Le Feunteun *et al.*, 2014). It may likewise affect acid diffusion in food particles (Marcotte *et al.*, 2012) and broad temporal changes in intragastric pH. Indeed, postprandial intragastric pH kinetics appeared to be different between solid (Malagelada *et al.*, 1976) and liquid foods (Kalantzi *et al.*, 2006). However, data are relatively scarce and to our knowledge no direct comparison on postprandial intragastric pH from fully characterized liquid and solid foods exists. Some studies deal with gastric emptying but the kinetics of intragastric pH are still not well explored. Alterations in protein structure induced by pH conditions in the stomach could also affect pepsin-protein interactions and thus the degree of proteolysis. For dairy gels, it has been shown that pepsin mainly hydrolyses proteins that are in contact with gastric juices (Nau *et al.*, 2019); this result suggests that the structural changes in protein networks that occur during digestion may impact the overall degree of proteolysis and the generation of peptides.

In humans, dogs, and monkeys, pH has generally been measured via three techniques: 1) by chyme aspiration via a simple gastric tube (Malagelada *et al.*, 1976); 2) by using single (Gardner,

Ciociola and Robinson, 2002) or multichannel (Simonian *et al.*, 2005) transnasal catheters; or 3) by employing wireless capsules that were either allowed to move freely in the chyme (Cassilly *et al.*, 2008) or that were fixed to gastric mucosa (Pandolfino *et al.*, 2003). Solubilisation and absorption are pH dependent (Charman *et al.*, 1997), and in most studies in which postprandial intragastric pH was recorded, the objective was to analyse drug performance. More recently, food scientists have become interested in the spatial and temporal changes in intragastric pH during digestion and their relationship with intrinsic food characteristics, such as pH or buffering capacity (Bornhorst *et al.*, 2014; Nau *et al.*, 2019). However, we still lack detailed knowledge on how changes in pH are affected by the food matrix, and this information is crucial if we wish to establish *in vitro* digestion protocol as accurately as possible (Kong and Singh, 2008). The study described here used a miniature pig model to characterise postprandial changes in intragastric pH following the ingestion of food-containing meals. Foods differed in macrostructure (liquid vs. solid) and plant protein type. We measured pH using the three techniques described above: the chyme sampling method, the pH catheter method, and the wireless pH capsule method.

## 3.2 Materials and methods

### 3.2.1 Animal Handling & Surgery

All procedures were carried out in accordance with European Union regulations (Directive 2010/63/EU) and were approved by the Auvergne Animal Experimentation Ethics Committee (CEMEAA) and the French government (APAFIS#11001-2017082312525562v2). We used four adult Yucatan miniature pigs (8 months old; bodyweight =  $24.9 \pm 1.2$  kg). Three weeks before the experiment, each pig was surgically fitted with a cannula made of silicone rubber (internal diameter: 12 mm, external diameter: 17 mm). It was placed lateroventrally at the stomach's point of greatest curvature (Figure 44). The animals were housed in separate pens in a ventilated room kept at a constant temperature (21°C). Between experimental trials, the pigs received 500 g/d of a concentrate feed containing 16% protein, 1% fat, 4% cellulose, and 5% ash (Porcyprima; Sanders Centre Auvergne, France). This food ration was distributed in two equal portions, given at 08:00 and 16:00 hours, and the pigs had *ad libitum* access to water.

### 3.2.2 Experimental foods and meals

In this study, we focused on food types that differed in macrostructure (solid vs. liquid) and plant protein type. The two solid foods were tofu (soy-based protein) and seitan (wheat-based protein), and the two liquid foods were soymilk (soy-based protein) and a pea emulsion (legume-based protein). The soymilk, tofu, and seitan were of commercial origin. The soymilk had been ultra-pasteurised (UHT). The pea emulsion was made using a commercial pea protein isolate (Pisane M9, Lot: N16231004, Cosucra, Belgium) and commercial soy oil (Emile Noël, France). Pre-emulsion was

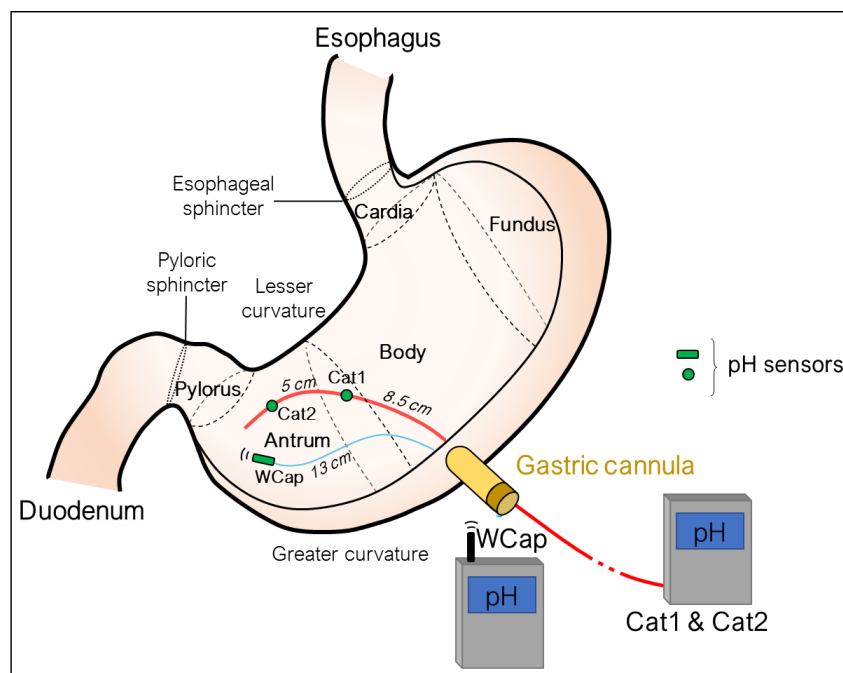
carried out using a disperser (T-50 Homogeniser, Ultra-Turrax, IKA, Germany) and a 15 G dispersing element (IKA, Germany); the process lasted 1 min and was run at 10,000 rpm. The solution was then homogenised twice using a benchtop homogeniser (PandaPLUS 2000, GEA, USA) operated at 1,000 bar. We added maltodextrine, sugar, and soy oil to the foods to equilibrate protein levels (30.0 g), fat levels (23.1 g), and calorie contents (980 kcal). The portions of soymilk, pea emulsion, tofu, and seitan weighed 1,162 g, 1,175 g, 435 g, and 290 g, respectively.

### 3.2.3 Measuring intragastric pH

Each pig was given each of the meal in a randomly determined order. Postprandial gastric pH kinetics were characterised using the three different methods. Each meal was administered on three different days, and a different measurement method was used each time. Pigs were allowed to recover for at least one day between tests. All the meals were ingested in less than 15 min.

#### 3.2.3.1 *Ex vivo method*

Samples of chyme were collected at the following time points: 5 min before food intake and 20, 40, 60, 90, 120, 180, and 270 min after food intake. Each time, 10–20 ml of chyme was obtained through the cannula via gravitational forces. The pH of the sample was then measured *ex vivo* using an ISFET probe (1001-004 ISFET, Sentron, Holland) following manual agitation.



**Figure 44:** Approximate position of the pH monitoring equipment within the stomach. The dark red line represents the pH catheter, and the two sensors are depicted using circles (Cat1 & Cat2). The thin blue line is the silk thread that was attached to the wireless pH capsule, which is represented by a rectangle (WCap). Cat1 and Cat2 were connected to a pH meter via the catheter. In contrast, the pH capsule wirelessly transmitted data to a pH meter.



### 3.2.3.2 *In situ method 1: pH catheter system*

A disposable dual-sensor catheter (Chongqing Jinshan Science & Technology Co. Ltd., China) was placed inside the stomach antrum via the cannula; the distance between the cannula and the two sensors were 8.5 cm (**Cat1**) and 13.5 cm (**Cat2**), respectively (Figure 44). The catheter was linked to an external pH meter (Ohmega Medical Measurement Systems, Holland) placed on the animal's back, and pH was measured every 10 s. The pH meter was calibrated before the experiment, and its continued functioning was verified after the experiment. The measurements began at least 5 min before a meal was ingested and continued for 5 h of the postprandial period.

### 3.2.3.3 *In situ method 2: wireless pH capsule*

The wireless pH capsule (length: 2.8 cm; model JSPC-1, Chongqing Jinshan Science & Technology Co. Ltd., China) was attached to the cannula by a silk thread. The pH sensor was located at the top of the capsule and was thus positioned 13.0 cm downstream from the cannula, in the antrum (Figure 44). The calibration procedure was the same as for the pH catheter. Measurements of pH were obtained every 3 s.

### 3.2.4 Physicochemical analysis

Just before the foods were given to the pigs, their pH was measured using the ISFET probe (2.3.1) following manual agitation.

For the tofu and seitan, median particle sizes (i.e., the theoretical sieve through which 50% of the mass of particles could pass) were assessed as described by Peyron et al. (Peyron, Mishellany and Woda, 2004).

The buffering capacity (BC) of the meals was estimated under *in vitro* gastric conditions for three pH ranges ([2.00–4.00]; [4.00–6.00]; [6.00–initial pH]). Foods were added to 50 ml of simulated gastric fluid (SGF), which was made based on the method developed by INFOGEST (Minekus *et al.*, 2014); the objective was a final protein concentration of 50 mg.ml<sub>SGF</sub><sup>-1</sup>. The mixtures were kept at 37°C using jacketed beakers equipped with magnetic stirring bars, and then, using a 1 M HCl solution (Lot: 00718, Grosseron SAS, France), pH was adjusted drop by drop to reach 2.00, 4.00, or 6.00. Glass electrodes (N61, SI Analytics GmbH, Germany) with thermometers (W2180-KOAX, SI Analytics GmbH, Germany) and pH meters (Titroline 7000, SI Analytics GmbH, Germany) were used. BC was calculated using the equation described by Gaucheron (Van Slyke, 1922; Gaucheron, Mollé and Pannetier, 2001):

$$\text{BC}(\text{pH}) = \frac{(\text{volume of acid added}) \times (\text{normality of the acid})}{(\text{volume of sample}) \times (\text{pH change produced})}$$

### 3.2.5 Data and statistical analysis

For the two *in situ* methods, pH measurements were averaged across 6-min intervals (pH catheter method: 36 measurements; wireless pH capsule method: 129 measurements). The kinetics of intragastric pH were analysed using the repeated option of the SAS PROC MIXED procedure (SAS University Edition, v. 3.71; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA); pig identity was treated as a random effect, whereas time, measurement method, food-type, and their interactions were independent factors. Significant interactions between time and method and between time and meal were found, so the LSMEANS procedure was used to test differences between methods and food types at specific time points. A similar procedure was used to analyse the BC data. The alpha level for our statistical tests was 0.05. The data presented in the results are the means  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

### 3.2.6 Regression equations

The regression analysis of the pH data obtained using the two *in vivo* methods was performed using XLSTAT (XLSTAT Quality v. 18.07, Addinsoft, France). The values employed were the means for the 6-min intervals. In the case of the pH catheter method, it was also necessary to average across the two sensors.

An eight-parameter modified logistic regression was utilised:

$$pH(t) = pH_{MIN} + \left( \frac{pH_{MAX} - pH_{Infl}}{1 + e^{(k_1(t-t_1))} + e^{(k_2(t-t_2))}} \right) + \left( \frac{(pH_{Infl} - pH_{MIN}) \times \ln(1 + e^{-t/t_3})}{\ln(2)} \right) \quad (1)$$

where  $t$  was time since ingestion;  $pH_{MIN}$  was the basal pH;  $pH_{MAX}$  was the maximum pH;  $pH_{Infl}$  was the inflection pH (the pH where a slow change of trend was observed, see the Figure 45 for graphical explanation);  $t_1$ ,  $t_2$ , and  $t_3$  were the times to, respectively, the initial rise in pH, global acidification, and acidification after inflection; and  $k_1$  and  $k_2$  were the constants associated with the neutralisation and acidification rates, respectively. The Figure 45 illustrates the contribution of parameters to the shape of some modelled curves.

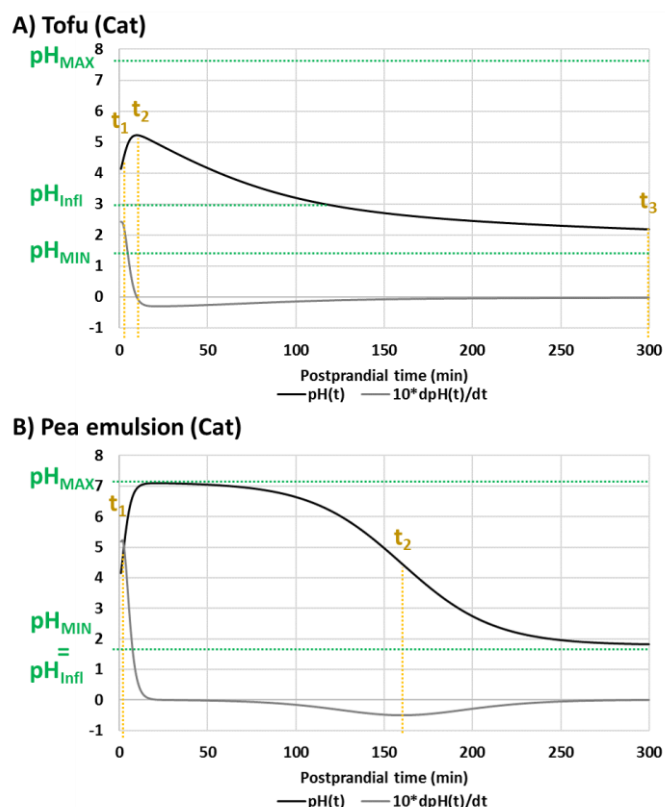
## 3.3 Results

### 3.3.1 Meal characteristics and basal pH

The pH values of the soymilk, pea emulsion, tofu, and seitan were  $6.9 \pm 0.2$ ,  $7.9 \pm 0.1$ ,  $5.8 \pm 0.1$ , and  $5.6 \pm 0.0$ , respectively. The final median particle sizes were  $5.1 \pm 0.1$  mm for the tofu and  $3.5 \pm 0.1$  mm for the seitan ( $n = 4$  trials).

The BCs of the different food types are presented in Table 2. The soymilk, pea emulsion, and tofu exhibited the same profile: BC increased while pH decreased. Only the seitan displayed a higher BC at a pH of 6 than at a pH of 4. Differences between meals were observed for the three pH ranges.

In generally, the BCs of food types with soy-based protein were higher. When the foods were ordered based on BC, the result was as follows: tofu > soymilk > pea emulsion ~ seitan.



**Figure 45:** Graphical explanation of parameters from the modelled gastric pH kinetics after ingestion of A) the tofu and B) the pea emulsion. Modelled curves of the gastric pH recorded with the catheter (average of values measured with both probes of the catheter Cat1 and Cat2) are black full curves. First time derivatives multiplied per a factor 10 are grey full curves. Some parameters of regression ( $t_1$ ,  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $pH_{MAX}$ ,  $pH_{INF}$ ,  $pH_{MIN}$ ) are set on graphics to give some clues for interpreting them.

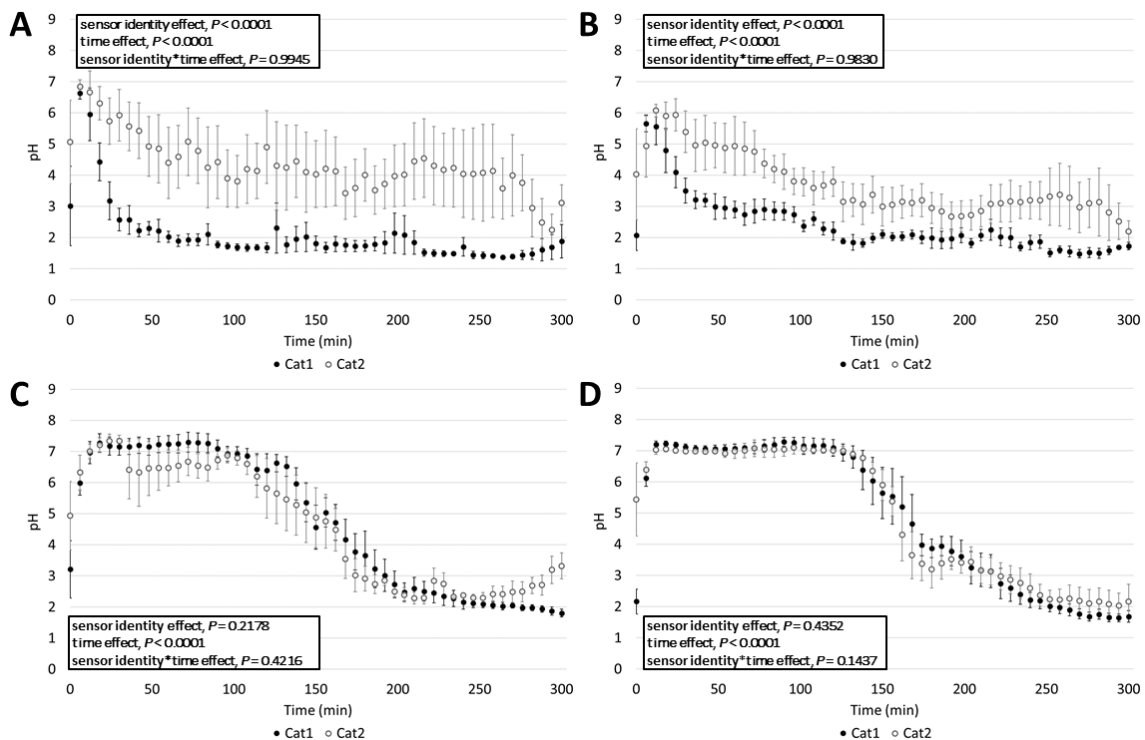
**Table 2:** Buffering capacity (BC) of the different food types for different pH ranges ( $n = 3$ , expressed in terms of  $10^3$ ; mean  $\pm$  SEM). The results were analysed using a repeated-measures ANOVA where food type and pH\*food type were fixed effects, and pH was a repeated effect. As all the effects were significant ( $P < 0.0001$ ), a post-hoc LSMEANS test was performed. The letters (a through e) indicate when significant differences were present ( $P < 0.05$ ).

	pH 2 $\leftarrow$ pH 4	pH 4 $\leftarrow$ pH 6	pH 6 $\leftarrow$ initial pH
Seitan	16.0 $\pm$ 0.8 <sup>e</sup>	4.4 $\pm$ 0.4 <sup>d</sup>	10.3 $\pm$ 0.2 <sup>c</sup>
Tofu	34.9 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>	21.3 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	14.4 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>
Pea Emulsion	16.0 $\pm$ 0.5 <sup>e</sup>	7.0 $\pm$ 0.6 <sup>d</sup>	6.7 $\pm$ 0.3 <sup>d</sup>
Soymilk	21.8 $\pm$ 3.2 <sup>b</sup>	13.5 $\pm$ 0.2 <sup>e,c</sup>	12.0 $\pm$ 0.4 <sup>e,c</sup>

### 3.3.2 Postprandial kinetics of intragastric pH

#### 3.3.2.1 Comparison of the results for the two pH catheter sensors

The intragastric pH levels recorded with the two sensors (**Cat1** and **Cat2**) during the postprandial period are illustrated in Figure 46. The overall statistical analysis (the final model included time, meal, sensor identity, meal\*sensor identity) found that there was a significant difference between the pH levels recorded by **Cat1** versus **Cat2** ( $P < 0.001$ ); there was also an interaction between sensor identity and the nature of the meal ( $P < 0.001$ ). The basal (pre-meal) pH recorded by **Cat2** was consistently higher than that recorded by **Cat1** ( $P < 0.05$ ). When all the measurement data (across experimental days) were grouped, basal pH was  $2.6 \pm 0.4$  with **Cat1** and  $4.9 \pm 0.6$  with **Cat2**. When food-type-specific analyses were performed, there was a difference between the pH levels recorded by **Cat1** and **Cat2** for the solid meals (tofu and seitan) ( $P < 0.0001$ ) but not for the liquid meals (soymilk and pea emulsion). For the solid meals, the pH from **Cat2** was higher than the pH from **Cat1** for the entire postprandial period. No significant interaction between time and sensor identity was observed, which showed that the two sensors both picked up on the general patterns of temporal changes in postprandial pH.



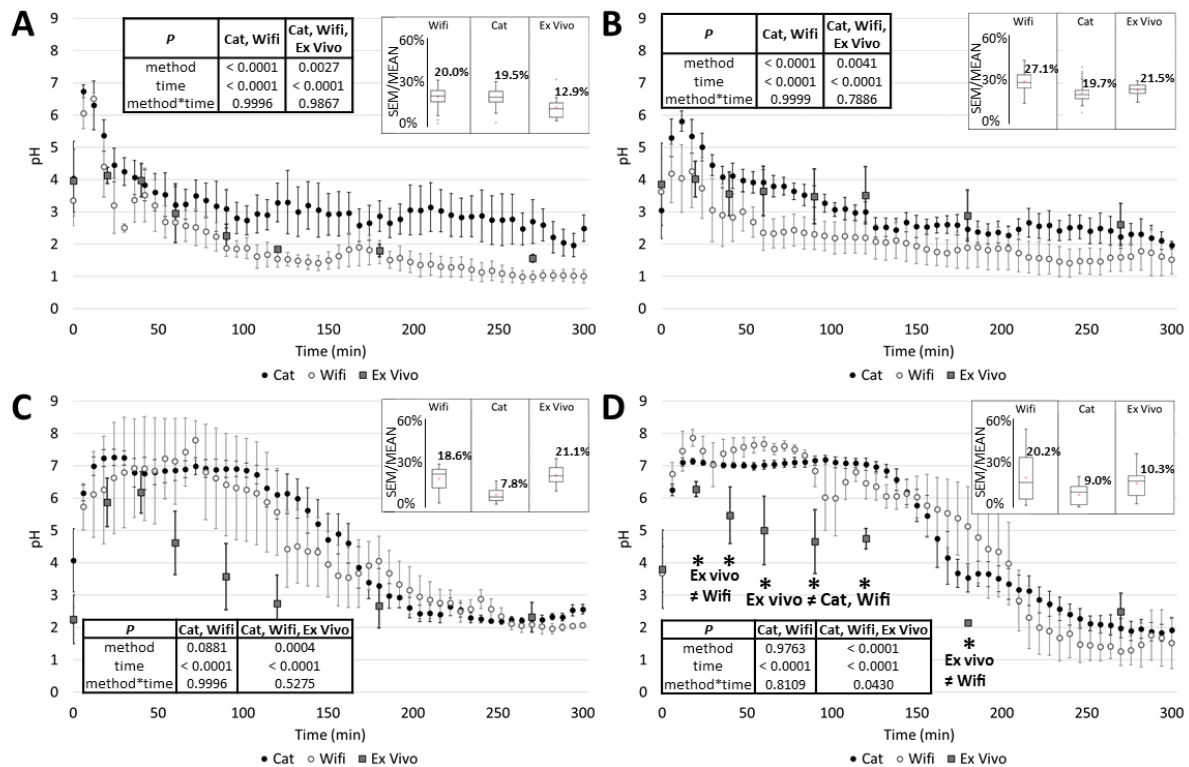
**Figure 46:** Temporal changes in postprandial intragastric pH ( $n = 4$  animals) characterised with each of the catheter sensors over a 300-min period after (A) seitan, (B) tofu, (C) pea emulsion, and (D) soymilk ingestion. The measurements were averaged over 6-min intervals. The circles are the means for each interval, and the bars represent the SEM. The filled dark circles represent the data from the first pH catheter sensor (Cat1). The empty grey circles represent the data from the second pH catheter sensor (Cat2).

### 3.3.2.2 Comparison of the results obtained with the pH catheter method and the wireless pH capsule method

First, the results from the pH catheter's two sensors were averaged. The postprandial intragastric pH levels associated with the four meals, as measured via pH catheter or wireless pH capsule, are shown in Figure 47. The overall statistical analysis (the final model included time, food type, measurement method, and food type\*measurement method) found that there was a significant difference between the two measurement methods ( $P < 0.001$ ) as well as a significant interaction between food type and measurement method ( $P < 0.001$ ). The methods differed in their estimates of pH only in the case of the solid meals. Once again, no significant interaction between time and measurement method was observed across the different food types. Also, after solid meal intake, the gastric pH observed an inflection point, i.e. a given pH reached at a considered time, after which the pH variation was slower than if the pH kinetics was conventional sigmoid. Whereas pH kinetics of liquids had a sigmoid shape, pH kinetics of solids decreased more rapidly.

### 3.3.2.3 Comparison of the results from the *ex vivo* and *in situ* measurement methods

To compare the pH levels obtained using the different methods, measurements made at the time points corresponding to chyme sampling ( $n = 8$ ) were employed (Figure 47). For the pH catheter data, the mean of the two sensors was used. When measuring basal pH, the *ex vivo* method yielded similar results to the *in situ* methods ( $P = 0.6289$ ). The only interaction between time and measurement method was observed for the soymilk ( $P = 0.0430$ ): there was a quicker drop in pH seen with the *ex vivo* method. For the other food types, changes in intragastric pH were similar over time for the *ex vivo* and *in situ* methods. That said, the *ex vivo* method yielded consistently lower pH values during the plateau associated with the liquid meals (Figure 47). For the soymilk, pea emulsion, and tofu, the mean relative standard error ( $SEM * 100 / \text{mean}$ ; which expressed the degree of variability among the pigs) associated with the pH catheter values was lower than that associated with other methods (Figure 47).

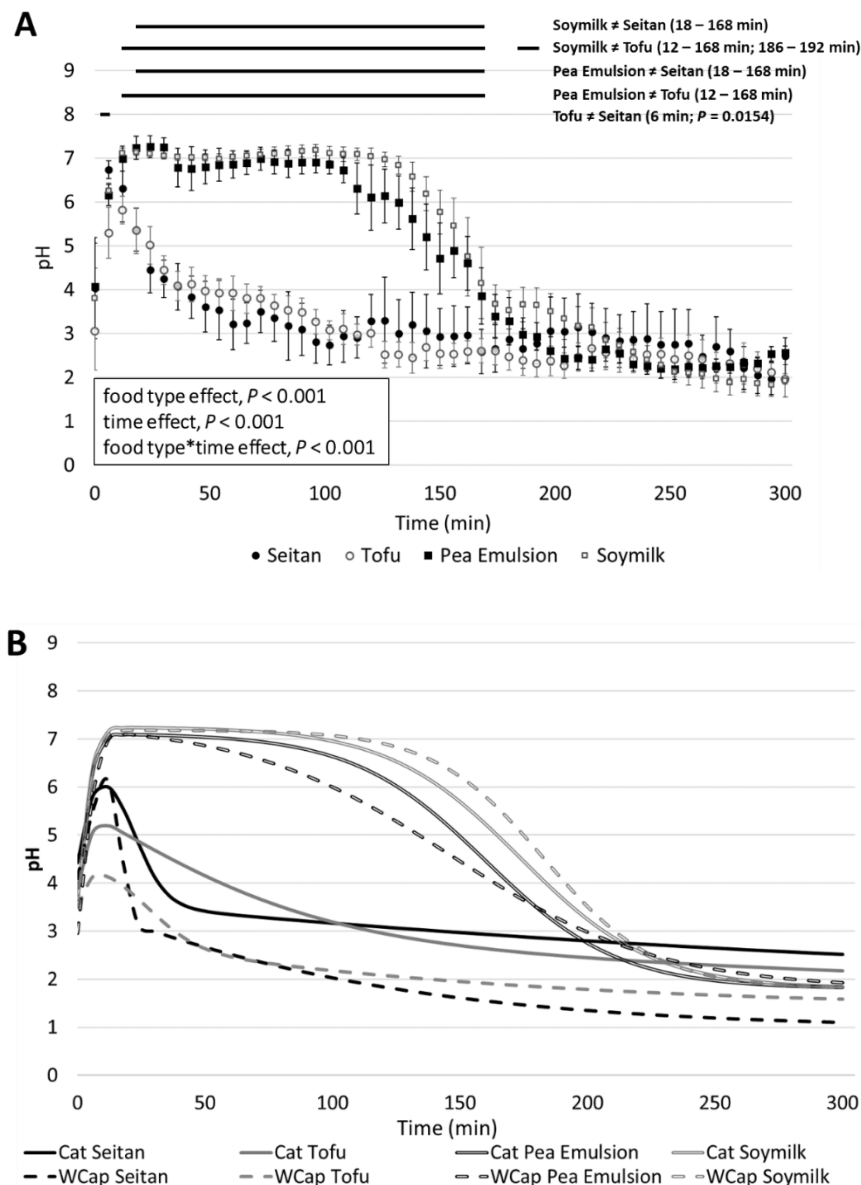


**Figure 47:** Temporal changes in postprandial intragastric pH ( $n = 4$  animals) characterised with the three measurement methods over a 300-min period following meal ingestion. The effects of different food types were tested: (A) seitan, (B) tofu, (C) pea emulsion, and (D) soymilk. For the *in situ* methods, measurements were averaged over 6-min intervals. The circles are the means for each interval, and the bars represent the SEM. The filled dark circles represent the data from the pH catheter method (averaged across the two sensors; Cat). The empty grey circles represent the data from the wireless pH capsule method (WCap). The filled grey squares represent the data from the *ex vivo* chyme sampling method (ExV). The stars indicate time points where there were significant differences. For each food type, relative standard error ( $SEM \cdot 100 / MEAN$ ) was calculated for each 6-min interval for the Cat and WCap methods and for the chyme sampling points for the ExV method. The results are represented in the boxplots below. The values near the boxplots are the mean relative standard errors.

### 3.3.2.4 Effects of food type

The Meal comparisons depicted in Figure 48A are based on the pH catheter data (averaged across **Cat1** and **Cat2**), but similar conclusions were reached when data from the wireless pH capsules were employed (not shown). Time, food type, and the time\*meal interaction were all significant ( $P < 0.001$ ). When comparisons were made at each time point, there were no significant differences in intragastric pH between the soymilk and the pea emulsion. Tofu and seitan exhibited a single significant difference, which occurred at 6 min ( $P = 0.0154$ ). The analysis revealed that, from 18 to 168 min after food ingestion, pH was significantly higher for liquid meals (soymilk and pea emulsion) than for solid meals (tofu and seitan) ( $P < 0.05$ ). While pH rapidly decreased exponentially in the

case of the solid meals, the liquid meals reached a plateau where pH was 7. This plateau lasted about 2 h before pH levels declined. After 192 min, pH was approximately 2 for all four food types.



**Figure 48:** (A) Temporal patterns in postprandial intragastric pH ( $n = 4$  animals) characterised with the pH catheter method (Cat; pH values averaged across the two sensors) over a 300-min period following meal ingestion. Measurements were averaged over 6-min intervals. The circles are the means for each interval, and the bars represent the SEM. The filled dark circles represent the seitan data, the empty grey circles represent the tofu data, the filled dark squares represent the pea emulsion data, and the empty grey squares represent the soymilk data. Significant differences at a given time point are indicated by the presence of black lines above the plot. (B) Results of the regression analysis of temporal patterns in postprandial intragastric pH as characterised by the pH catheter method (Cat; pH values averaged across the two sensors; solid lines) and by the wireless pH capsule method (WCap; dashed lines) over a 300-min period following food ingestion. The different food types are indicated by different shades of grey.

### 3.3.3 Modelling the kinetics of postprandial intragastric pH

Table 3 summarises the parameter values obtained using the pH catheter method and the wireless pH capsule method. The curves obtained by modelling the pH catheter measurements are presented in Figure 4B. It was assumed that there was no inflection period when the regression analysis of the intragastric pH kinetics associated with the liquid meals was performed. Because the basal pH,  $\text{pH}_{\text{MIN}}$ , was set to equal  $\text{pH}_{\text{Infl}}$ , no  $t_3$  was required. After the initial rounds of regression,  $k_1$  was no longer sensitive to changes in conditions. To allow comparisons of  $t_1$  across models,  $k_1$  was fixed at 0.40.

The value of  $\text{pH}_{\text{MIN}}$  was estimated from the regression analysis and was situated between 1.0 and 1.8, which is slightly lower than the basal pH as measured via *in situ* methods (about 3.5). Regardless of nature of the food type,  $\text{pH}_{\text{MAX}}$  was quickly reached ( $t_1$  was always  $< 5$  min). Estimates of  $\text{pH}_{\text{MAX}}$  were similar for the different measurement methods (7.1–7.3 for the soymilk and pea emulsion and 6.5–6.8 for the seitan), except in the case of the tofu, for which the wireless pH capsule method yielded lower values than pH catheter method (4.5 vs 7.7), matching what was seen in the experimental data.

Based on the first derivative (data not shown),  $t_2$  seemed to be the time point at which the decrease in pH was at its fastest. This parameter was good at discriminating between liquid and solid meals. Indeed, for the tofu and seitan,  $t_2$  was less than 28 min. In contrast, for the soymilk and pea emulsion,  $t_2$  lay between 147 and 183 min.



**Table 3:** Parameter values and coefficients of determination obtained from the logistic regression analysis of intragastric pH kinetics for the different food types as assessed via the two *in vivo* measurement methods (pH catheter = Cat, wireless pH capsule = WCap).

Food type	Method	R <sup>2</sup>	pH <sub>MIN</sub>	pH <sub>infl</sub>	pH <sub>MAX</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>	k <sub>1</sub>	k <sub>2</sub>
Seitan	Cat	0.906	1.8	3.6	6.5	2	23	256	0.40	0.17
	WCap	0.946	1.0	3.6	6.5	4	18	89	0.40	1.00
Tofu	Cat	0.955	1.5	3.0	7.7	3	9	300	0.40	0.02
	WCap	0.960	1.4	2.8	4.5	1	28	125	0.40	0.10
Pea emulsion	Cat	0.987	1.8	1.8	7.1	2	160	-	0.40	0.04
	WCap	0.956	1.8	1.8	7.3	3	147	-	0.40	0.02
Soymilk	Cat	0.983	1.8	1.8	7.3	2	174	-	0.40	0.04
	WCap	0.965	1.8	1.8	7.2	2	183	-	0.40	0.05

### 3.4 Discussion

The translation to human of these results obtained in a pig model must be done cautiously. Indeed, although the size and the geometry of the minipig stomach is similar to those of the human stomach (1 – 1,6 l), some physiological differences remain: proportion of the cardiac mucosa in the stomach is higher in pigs than in humans (Kararli, 1995) and the gastric emptying time is considered as slower in pig (2 h – 24 h) than in humans (10 min – 2 h) (Henze *et al.*, 2018). Moreover, the position and the orientation of the pig stomach is different from those of the human stomach, because of the difference of the whole-body position during the digestion. In fact, the lengthwise axis (fundus – antrum axis) of the human stomach is vertical, whereas the lengthwise axis of the pig stomach is horizontal.

#### 3.4.1 Comparison of the pH measurement methods

In this study, three methods for measuring postprandial intragastric pH were compared: the *ex vivo* sampling of chyme, the *in vivo* use of pH catheters, and the *in vivo* use of wireless pH capsules. Compared to the *ex vivo* method, the *in vivo* pH catheter and wireless pH capsule methods both allowed pH to be recorded continuously. For the solid meals (tofu and seitan), no significant differences were seen between the *ex vivo* and *in vivo* measurements. However, for the liquid meals, differences were observed during the pH plateau. After the pigs consumed liquid foods, their stomachs were pretty much filled and contained heterogenous contents. As a result, when the cannula was opened, the gastric contents leaked out in large quantities. This fact may have led to the lower buffering capacities that were observed and could explain the lower pH values obtained with the *ex vivo* method. Because the *in situ* methods did not disturb the pigs or their stomach contents and

because they also allowed the continuous measurement of pH, they appear to be better suited to monitoring postprandial intragastric pH. Moreover, because they displayed less variability, the pH catheter data were more useful for evaluating the effect of meal on temporal changes in postprandial intragastric pH. With the seitan, the *ex vivo* method provided more repeatable results than did the *in situ* methods, probably because the chyme is more heterogeneous in the core of the antrum than near the mucosa. Lastly, in the wireless pH capsule method, no coupled external devices are needed, which is less constraining for the animal.

Overall, the pH catheter method and the wireless pH capsule method revealed similar temporal patterns in postprandial intragastric pH. However, in the case of the solid meals, the capsule consistently found lower pH values than did the catheter. This result is consistent with the results of a previous study that also compared the two methods (Caparello *et al.*, 2012). In that study, the capsules were attached to the stomach wall, and the authors interpreted the differences as resulting from the proximity of the pH sensor to the stomach parietal cells, where HCl is secreted (Schubert and Peura, 2008). The lower pH values recorded with the capsule were thus probably due to the lower BC of food occurring near the mucosa, in comparison to food found in the middle of the gastric compartment. This same result could arise for very heterogeneous chyme (Bornhorst *et al.*, 2014). Thus, we could hypothesise that, in this study, the wireless pH capsule remained close to the stomach wall while the pH catheter, because of its rigidity, occupied a more central position within the stomach.

#### 3.4.2 pH spatial distribution and chyme heterogeneity

It is noteworthy that the pH catheter's two sensors obtained significantly different measurements. Both before and after food ingestion, the sensor at the tip of the catheter yielded higher pH values. These differences between the two sensors, and the differences between the catheter and the capsule, clarify the spatial distribution of pH values both in the empty stomach and the stomach after it is filled with a solid meal; similar findings were seen in a previous study for soft and rigid foods (Bornhorst *et al.*, 2014; Nau *et al.*, 2019). Unfortunately, in this study, we were unable to precisely determine the positions of either the catheter sensors or the capsule. Thus, although we tried to direct the catheter towards the pylorus, we do not know if it was propelled backwards towards the fundus, which might explain the higher pH values found by the sensor at the catheter's tip in the case of the solid foods. Indeed, when a similar catheter (albeit equipped with four sensors) was used in humans, a gradient in intragastric pH was observed following complete food ingestion: the pH in the proximal part of the stomach was higher than the pH in the antrum (mid/distal region) (Simonian *et al.*, 2005). In our study, no such difference was seen for liquid meals because of the large amount of liquid ingested, which rendered the gastric contents more homogeneous. Because the ultimate goal of the study was

to characterise mean changes in intragastric pH over the postprandial period, it seemed important to use the mean of the values recorded by the two sensors when analysing the effects of food type on gastric pH kinetics.

### 3.4.3 Effects of food type on gastric pH kinetics

This study found clear differences in the postprandial pH kinetics elicited by liquid versus solid meals. While pH rapidly decreased exponentially in the case of the solid meals, there was an S-shaped drop in pH associated with the liquid meals, where pH plateaued for more than 2 hours. These results were similar to those obtained in previous studies in humans (Malagelada *et al.*, 1976; Dressman, 1986; Gardner, Ciociola and Robinson, 2002). An initial plateau has also been observed for liquid meals (Kalantzi *et al.*, 2006). This plateau is probably caused by three phenomena: i) Meal volume and viscosity affect stomach distention and, as a consequence, the acid secretion rate (Marciani, Gowland, Spiller, *et al.*, 2001); ii) proteins have higher buffering capacities when they occur in solutions than when they occur as solids, even if this pattern was not seen in our study; iii) pH results from the relative activity of  $\text{H}_3\text{O}^+$  and  $\text{OH}^-$  ions in solution (aqueous phase) and, thus, ions inside the food network are not measured.

#### 3.4.3.1 Meal volume

The volumes of the solid and liquid meals were different. The volume of the liquid meals was 1.1 L, and their stomach filling rate was therefore 80% (total stomach volume =  $1.31 \pm 0.09$  L; measured in six Yucatan miniature pigs weighing  $25.4 \pm 0.6$  kg). In contrast, the filling rate for the solid foods was less than 40%. Meal volume has been shown to affect gastric emptying for liquid, but not solid meals.

#### 3.4.3.2 Buffering capacity of meals

Buffering capacity is linked to the ability of acidic amino acids (*i.e.*, those with side chains containing carboxylic groups) to trap the hydronium ion (Mat *et al.*, 2018). Thus, for similar levels of protein, BC could be higher if quantities of glutamic acid and aspartic acid are greater. However, in this study, although wheat proteins contain more acidic amino acids (about 40%) than do soy proteins (about 30%), the seitan had a lower BC than did tofu. This finding underscores that, in addition to primary structure, protein conformation matters; it is important to consider whether or not acidic side chains are exposed when in the liquid phase. Furthermore, common methods for identifying amino acids cannot distinguish between glutamine and glutamic acid or between asparagine and aspartic acid.

The amount and output of acid secretions have been shown to directly correlate with a food's initial BC (regardless of protein amount or source) (Williams, Forrest and Campbell, 1968) and with

postprandial gastric acidity during the first five hours of digestion (Gardner, Ciociola and Robinson, 2002). BC may thus help to shed light on changes in gastric pH over time. The longer plateau observed for the soymilk compared to the pea emulsion could be explained by the greater BC associated with the initial pH and the pH of 4 for soymilk compared to the values for the pea emulsion. The same explanation could hold when interpreting the differences seen between the seitan and the tofu at the beginning of digestion. While both food types had a similar initial pH (~ 5.7), the tofu and the seitan reached maximal pH levels of 5.8 and 6.7, respectively (pH catheter data). Tofu's higher BC could explain its resistance to neutralisation in mouth and its subsequent acidification in the stomach. Furthermore, tofu had a higher BC than did soymilk, although both food types are soy protein based; this dissimilarity could have resulted from differences in macrostructure.

Lastly, BC could change during gastric digestion because of proteolysis and the addition of endogenous components. Previous research found that gastric BC increased after meal intake (Fordtran and Walsh, 1973), and, two hours later, its value was inversely correlated with the peak acid secretion rate. The authors of the study attributed this relationship to quicker gastric emptying, given that high acidity generally slows down the rate of gastric emptying (Fordtran and Walsh, 1973). Moreover, phase separation might have occurred, and thus buffer emptying would not have followed total gastric emptying.

#### 3.4.3.3 Food particle size

Food particle size also plays a role in determining BC and thus gastric pH. Previous research explored the influence of particle size on pH distribution patterns in the pig stomach during digestion and showed that fine particles (D50: ~ 0.5 mm versus ~1.0 mm) promoted the diffusion of gastric acid within the stomach, which led to a more homogeneous pH (Hunt and Forrest, 1975; Regina *et al.*, 1999; Mößeler *et al.*, 2010, 2014). Another study examined acid diffusion patterns in an artificial stomach after the ingestion of solid meal and found similar results, with variation stemming mostly from particle size and meal temperature (Marcotte *et al.*, 2012). In this study, the solid meals contained larger particles. Consequently, a more pronounced and persistent pH gradient within the stomach could be expected.

#### 3.4.4 Regression analysis of gastric pH kinetics

Even if temporal changes in gastric pH were significantly different for liquid versus solid meals, we found that system kinetics could be described using the same equation, which made it possible to extract specific parameters. A recent modelling study (Sams *et al.*, 2016) that employed data from previous research showed that the kinetics of postprandial pH could be described with an exponential function or a polynomial equation. When we tested the fit between our pH data and a variety of

functions, the coefficient of determination was higher for degree-four and degree-five polynomials and four-parameter logistic regressions ( $R^2 \sim 0.96\text{--}0.99$ ) than for exponential functions ( $R^2 \sim 0.91\text{--}0.92$ ). The most relevant regressions appeared to be those that included food type and/or physiological parameters, which is what Weinstein and colleagues found (Weinstein *et al.*, 2013). They modelled postprandial gastric pH in healthy humans following the ingestion of liquid meal: like us, they observed a plateau in pH and determined that its duration depended on buffer concentration, gastric acid secretion rate, and gastric emptying time.

### 3.5 Conclusions

We compared the results yielded by three different methods for monitoring intragastric pH during the postprandial period in miniature pigs that had ingested liquid and solid meals. Across food types, *in situ* pH measurements obtained with pH catheters or wireless pH capsules were robust and consistent with each other. In contrast, the *ex vivo* method, in which chyme was sampled via the cannula, seemed to be poorly suited for following intragastric pH levels during the digestion of liquid meals. Both *in situ* methods captured the food-type-mediated differences in postprandial intragastric pH over time: for liquid meals, pH plateaued for approximately 2 h, but for solid meals, pH decreased quickly and immediately. Food macrostructure was thus clearly a determinant factor, as was food buffering capacity, which was assessed *in vitro*. Modelling temporal patterns of intragastric pH for liquid and solid meals will help clarify changes in pepsin activity in the stomach and the consequences for protein digestion. In addition, the equations that we defined could be used to differentially program an *in vitro* digester based on the food matrix to be studied.

## **Acknowledgements**

We thank Julien Hermet for managing the animal facilities as well as Philippe Lhoste and Yohan Delorme for caring for the experimental animals. We are grateful to Coline Simon for helping to develop our pH monitoring methods and to Cristian Trelea and Alain Riaublanc for assisting us in our modelling efforts, and to Jessica Pearce for correcting the English of the manuscript. Finally, we would like to acknowledge Denys Durand, for doing the animal surgeries.

## **Funding information**

The present article is part of a CIFRE thesis (CIFRE n°2016/0719) funded by IMPROVE SAS and INRA.

## **Disclosure**

The authors have no competing interests.

## **Author Contributions**

YR and DR designed the animal experiments. DD, IS, ML, YR, and DR defined the food types. YR, CB, JD, BC, MV, and DR performed the experiments. YR and DR analysed the data. YR drafted the manuscript, and DR, DD, and IS helped revise it.

## References

- Boirie, Y. *et al.* (1997) 'Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), pp. 14930–14935. doi: 10.1073/pnas.94.26.14930.
- Bornhorst, G. M. *et al.* (2014) 'Gastric pH Distribution and Mixing of Soft and Rigid Food Particles in the Stomach using a Dual-Marker Technique', *Food Biophysics*, 9(3), pp. 292–300. doi: 10.1007/s11483-014-9354-3.
- Caparello, C. *et al.* (2012) 'Traditional vs wireless intragastric pH monitoring: Are the two techniques comparable?', *Neurogastroenterology and Motility*, 24(10), pp. 951–464. doi: 10.1111/j.1365-2982.2012.01957.x.
- Carbonaro, M. *et al.* (1997) 'Solubility-Digestibility Relationship of Legume Proteins', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), pp. 3387–3394. doi: 10.1021/jf970070y.
- Carbonaro, M. *et al.* (2015) 'Chemico-physical and nutritional properties of traditional legumes (lentil, *Lens culinaris* L., and grass pea, *Lathyrus sativus* L.) from organic agriculture: an explorative study', *Organic Agriculture*, 5(3), pp. 179–187. doi: 10.1007/s13165-014-0086-y.
- Cassilly, D. *et al.* (2008) 'Gastric emptying of a non-digestible solid: Assessment with simultaneous SmartPill pH and pressure capsule, antroduodenal manometry, gastric emptying scintigraphy', *Neurogastroenterology and Motility*, 20(4), pp. 311–319. doi: 10.1111/j.1365-2982.2007.01061.x.
- Charman, W. N. . *et al.* (1997) 'Physicochemical and Physiological Mechanisms for the Effects of Food on Drug Absorption: The Role of Lipids and pH', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(3), pp. 269–282.
- Dekkers, B. L. *et al.* (2016) 'Impact of gastric pH profiles on the proteolytic digestion of mixed  $\beta$ lg-Xanthan biopolymer gels', *Food Funct.* Royal Society of Chemistry, 7(1), pp. 58–68. doi: 10.1039/C5FO01085C.
- Dill, K. A. (1990) 'Dominant Forces in Protein Folding', *Biochemistry*, 29(31), pp. 7133–7155. doi: 10.1021/bi00483a001.
- Dressman, J. B. (1986) 'Comparison of Canine and Human Gastrointestinal Physiology', *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, pp. 123–131. doi: 10.1023/A:1016353705970.
- Le Feunteun, S. *et al.* (2014) 'Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig In Vivo Data', *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), pp. 1099–1113. doi: 10.1007/s11947-013-1116-6.
- Fordtran, J. S. and Walsh, J. H. (1973) 'Gastric Acid Secretion Rate and Buffer Content of the

Stomach after Eating', *The Journal of Clinical Investigation*, 52(March), pp. 645–657.

Gardner, J. D., Ciociola, A. A. and Robinson, M. (2002) 'Measurement of meal-stimulated gastric acid secretion by in vivo gastric autotitration', *J Appl Physiol*, pp. 11–21. doi: 10.1152/ajprenal.00119.2002.

Gaucheron, F., Mollé, D. and Pannetier, R. (2001) 'Influence of pH on the heat-induced proteolysis of casein molecules', *Journal of Dairy Research*, 68(1), pp. 71–80. doi: 10.1017/S0022029900004623.

Goto, Y., Calciano, L. J. and Fink, A. L. (1990) 'Acid-induced folding of proteins', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(January), pp. 573–577.

Henze, L. J. *et al.* (2018) 'The pig as a preclinical model for predicting oral bioavailability and in vivo performance of pharmaceutical oral dosage forms : a PEARRL review', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71, pp. 581–602. doi: 10.1111/jphp.12912.

Hunt, D. R. and Forrest, A. P. M. (1975) 'The role of the antrum in determining the acid secretory response to meals of different consistency', *Gut*, 16, pp. 774–776.

Jiménez-Saiz, R. *et al.* (2014) 'Immunological behavior of in vitro digested egg-white lysozyme', *Molecular Nutrition and Food Research*, 58(3), pp. 614–624. doi: 10.1002/mnfr.201300442.

Kalantzi, L. *et al.* (2006) 'Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies', *Pharmaceutical Research*, 23(1), pp. 165–176. doi: 10.1007/s11095-005-8476-1.

Kararli, T. T. (1995) 'Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals.', *Biopharm Drug Dispos.*, 16, pp. 351–380.

Kazir, M. *et al.* (2018) 'Extraction of proteins from two marine macroalgae, *Ulva* sp. and *Gracilaria* sp., for food application, and evaluating digestibility, amino acid composition and antioxidant properties of the protein concentrates', *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 87(February 2018), pp. 194–203. doi: 10.1016/J.FOODHYD.2018.07.047.

Kong, F. and Singh, R. P. (2008) 'Disintegration of solid foods in human stomach', *Journal of Food Science*, 73(5), pp. 67–80. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x.

Kratzer, F. H. . and Porter, J. W. G. (1962) 'The effect of pH on the digestion of proteins in vitro by pepsin', *Brit. J. Nutr.*, 16, pp. 579–584.

Malagelada, J. R. *et al.* (1976) 'Measurement of gastric functions during digestion of ordinary solid meals in man.', *Gastroenterology*, 70(2), pp. 203–210. doi: 10.1016/S0016-5085(76)80010-8.

Marciani, L., Gowland, P. A., Fillery-travis, A., *et al.* (2001) 'Assessment of antral grinding of a model solid meal with echo-planar imaging', *American journal of physiology, Gastrointestinal liver phsiol*, 280, pp. 844–849.



Marciani, L., Gowland, P. A., Spiller, R. C., *et al.* (2001) 'Effect of meal viscosity and nutrients on satiety, intragastric dilution, and emptying assessed by MRI', *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280, pp. G1227–G1233.

Marcotte, M. *et al.* (2012) 'Acid diffusion in solid foods', *International Journal of Food Engineering*, 8(4). doi: 10.1515/1556-3758.1300.

Mat, D. J. L. *et al.* (2018) 'Monitoring protein hydrolysis by pepsin using pH-stat: In vitro gastric digestions in static and dynamic pH conditions', *Food Chemistry*. Elsevier Ltd, 239, pp. 268–275. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.115.

Minekus, M. *et al.* (2014) 'A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus', *Food Funct. Food Funct*, 5(5), pp. 1113–1124. doi: 10.1039/c3fo60702j.

Möbeler, A. *et al.* (2010) 'Impact of diets' physical form (particle size; meal/pelleted) on the stomach content (dry matter content, pH, chloride concentration) of pigs', *Livestock Science*. Elsevier B.V., 134(1–3), pp. 146–148. doi: 10.1016/j.livsci.2010.06.121.

Möbeler, A. K. *et al.* (2014) 'Effects of grinding intensity and pelleting of the diet - fed either dry or liquid - on intragastric milieu, gastric lesions and performance of swine', *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier B.V., 194, pp. 113–120. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2014.05.005.

Nau, F. *et al.* (2019) 'Spatial-temporal changes in pH, structure and rheology of the gastric chyme in pigs as influenced by egg white gel properties', *Food Chemistry*. Elsevier, 280(December 2018), pp. 210–220. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.12.042.

Pandolfino, J. E. *et al.* (2003) 'Ambulatory Esophageal pH Monitoring Using a Wireless System', *The American Journal of Gastroenterology*, 98(4), pp. 740–749. doi: 10.1016/S0002-9270(03)00062-5.

Peyron, M. A., Mishellany, A. and Woda, A. (2004) 'Particle size distribution of food boluses after mastication of six natural foods', *Journal of Dental Research*, 83(7), pp. 578–582. doi: 10.1177/154405910408300713.

Regina, D. C. *et al.* (1999) 'Changes in gastric contents in pigs fed a finely ground and pelleted or coarsely ground meal diet', *Journal of Animal Science*, 77(10), pp. 2721–2729. doi: 10.2527/1999.77102721x.

Sams, L. *et al.* (2016) 'Relevant pH and lipase for in vitro models of gastric digestion', *Food Funct.* Royal Society of Chemistry, 7(1), pp. 30–45. doi: 10.1039/C5FO00930H.

Schubert, M. L. and Peura, D. A. (2008) 'Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease', *Gastroenterology*, 134(7), pp. 1842–1860. doi: 10.1053/j.gastro.2008.05.021.

Simonian, H. P. *et al.* (2005) 'Regional Postprandial Differences in pH Within the Stomach and Gastroesophageal Junction', *Digestive Diseases and Sciences*, 50(12), pp. 2276–2285. doi:

10.1007/s10620-005-3048-0.

Van Slyke, D. D. (1922) 'On the measurement of buffer values and on the relationship of buffer value to the dissociation constant of the buffer and the concentration and reaction of the buffer solution.', *Journal of Biological Chemistry*, 52(2), pp. 525–570.

Weinstein, D. H. *et al.* (2013) 'A new method for determining gastric acid output using a wireless pH-sensing capsule', *Alimentary Pharmacology & Therapeutic*, 37, pp. 1198–1209. doi: 10.1111/apt.12325.

Williams, C. B., Forrest, A. P. M. and Campbell, H. (1968) 'Buffering Capacity of Food in relation to Simulation of Gastric Secretion', *Gastroenterology*. Elsevier Masson SAS, 55(5), pp. 567–574. doi: 10.1016/S0016-5085(19)34005-3.

## **Chapitre 4. Digestibilité vraie des acides aminés et score des acides aminés indispensables digestibles d'aliments à base de protéines végétales**

True ileal amino acid digestibility and digestible indispensable amino acid scores (DIAASs) of plant-protein-based foods

*Authors (\* corresponding author)*

Yohan Reynaud<sup>a,b</sup>, Caroline Buffière<sup>c</sup>, Benoît Cohade<sup>c</sup>, Mélissa Vauris<sup>c</sup>, Kevin Liebermann<sup>c</sup>, Nouredine Hafnaoui<sup>c</sup>, Michel Lopez<sup>a</sup>, Isabelle Souchon<sup>d</sup>, Didier Dupont<sup>b</sup>, Didier Rémond<sup>c\*</sup>

*<sup>a</sup>IMPROVE SAS, F-80480, Dury, France*

*<sup>b</sup>STLO, INRA, AGROCAMPUS OUEST, F-35042, Rennes, France*

*<sup>c</sup>Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

*<sup>d</sup>GMFA, INRA, AgroParisTech, Université Paris Saclay, F-78850, Thiverval-Grignon, France*

En préparation

## Abstract

In France, commercial plant-protein-based foods are increasingly common, but data on their nutritional protein quality are scarce. This study aimed to assess the protein quality of four classical plant-protein-based foods (seitan, pea emulsion, soya milk, and tofu) by measuring the true ileal digestibility (TID) of their crude protein and amino acids and by characterising the foods' digestible indispensable amino acid scores (DIAASs). Complete and isocaloric portions (i.e., containing 30 g of protein) of each of the foods were given to miniature pigs ( $n = 6$ ; mean  $\pm$  SEM body mass:  $20.2 \pm 1.5$  kg), a study model for adult humans. We used a repeated measures design in which the pigs received all the food types in a randomised order. Each pig was fitted with an ileal cannula and three blood catheters; samples of terminal ileal digesta were collected for 9 h. To label the pigs' endogenous proteins (and thus distinguish them from dietary proteins), the animals were given a continuous perfusion of a  $^{13}\text{C}$ -leucine solution. There were only minor differences in protein and amino acid TIDs among food types (range: 84–105%). There were more striking differences in the apparent ileal digestibility of amino acids, notably that of lysine (i.e., lower for the seitan) and that of methionine (i.e., lower for the pea emulsion). Interestingly, postprandial levels of amino acids in the plasma peaked after the ingestion of liquid, but not solid, foods. Overall, for the soya-based foods, nutritional protein quality was largely influenced by digestibility because the foods had well-balanced amino acid profiles (DIAAS: 97.4% for tofu, 117.5% for soya milk). For the seitan and the pea emulsion, nutritional protein quality was largely determined by amino acid balance and limiting amino acids (DIAAS: 60.2% for pea emulsion, 29.3% for seitan) because the foods' digestibility was high.

**Keywords:** plant protein, digestibility, amino acids, food matrix, DIAAS, miniature pig

## Highlights

- TIDs and DIAASs were determined for seitan, a pea emulsion, soya milk, and tofu
- The plant-protein-based foods studied here were highly digestible
- The classical peak in postprandial plasma amino acid levels was not observed for solid foods

## 4.1 Introduction

Gross domestic product (GDP) per capita is positively correlated with dietary energy intake. Because per-capita GDP does not influence the contribution of protein to dietary energy (i.e., protein provides 5–15% of total energy) (Gerbens-Leenes, Nonhebel, and Krol 2010), demand for protein may increase worldwide as global per-capita GDP climbs. Indeed, research has found that, as standards of living improve, so does the percentage of energy provided by animal-based products. However, in general, the production of animal protein has a greater environmental impact than does the production of plant protein, as measured via the quantity of greenhouse gases emitted per gram of protein (González, Frostell and Carlsson-Kanyama, 2011). Since 2004, the availability of commercial plant-protein-based foods has increased dramatically in France; the source of protein in these foods is most often soya, wheat, or pea (GEPV, 2019). However, there are two major concerns regarding protein quality in these products: 1) the products may contain antinutritional factors, such as trypsin inhibitors or tannins, that limit protein absorption (Gilani, Xiao and Cockell, 2012) and 2) the products may lack certain essential amino acids. It remains a significant challenge to assess the nutritional quality of the protein in plant-based products, complicating efforts to design innovative foods that will respond to the growing demand for protein. The Food and Agriculture Organisation (FAO) has defined indices for assessing nutritional protein quality, namely the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) (FAO and WHO, 1991) and the digestible indispensable amino acid score (DIAAS) (FAO, 2013). The PDCAAS compares the amino acid profile of a specific food protein with a standard amino acid profile. While the PDCAAS takes into account protein digestibility, whole-tract digestibility is often used, which overestimates amino acid bioavailability, and there is no way to differentiate among the digestibility of individual amino acids. The DIAAS compares the digestibility of individual amino acids in the ileum (i.e., true ileal digestibility, which is a better proxy for bioavailability than whole-tract digestibility) to a standard of reference. In both cases, digestibility is an integral part of protein nutritional quality. Protein digestibility has largely been studied using protein isolates: the true ileal digestibility of soya, wheat, and pea proteins has been reported to be 91.5% (Gaudichon *et al.*, 2002; Bos *et al.*, 2003), 93.4% (De Vrese *et al.*, 2000), and 89.4–91.5% (Gausserès *et al.*, 1996, 1997; Mariotti *et al.*, 2001), respectively. However, little is known about the digestibility of the soya and pea proteins found in food products actually consumed by humans. Some estimates are available for wheat gluten, which is usually studied in the form of a solid food matrix because of its low solubility. For example, the true ileal digestibility of the gluten in wheat toast was found to range from 85.0 to 90.3% (Bos *et al.*, 2005; Juillet *et al.*, 2008). Processing foods can affect protein digestibility, as can be seen in the differences *in vivo* between raw and cooked eggs (Evenepol *et al.*, 1998), autoclaved and non-autoclaved soybean flour (Li, Sauer and Caine,

1998), and whole wheat gluten and wheat gluten (Tomé, 2013). Heat treatments may inactivate antitrypsin factors in foods, thus increasing protein digestibility. Such treatments may also impact protein structure (German, Damodaran and Kinsella, 1982) and food structure (Le Feunteun *et al.*, 2014), which influence such factors as enzyme diffusion and substrate accessibility and, subsequently, protein digestibility. It is thus crucial to estimate the digestibility of proteins in foods as they are actually consumed. Consequently, this study used the miniature pig, a model for adult humans, to assess the nutritional quality of protein in four common plant-based foods (seitan, a pea emulsion, soya milk, and tofu) that differed in their structure (solid vs. liquid) and protein source (soya, wheat, and pea).

## 4.2 Materials and methods

### 4.2.1 Animal handling and surgery

All procedures were carried out in accordance with European guidelines (Directive 2010/63/EU) and were approved by the Auvergne Animal Experimentation Ethics Committee (CEMEAA) and the French government (APAFIS#11001-2017082312525562v2). For the experiment, we used six adult Yucatan miniature pigs (mean mass at 8 months =  $20.2 \pm 1.5$  kg). Three weeks before the experiment began, the pigs were surgically fitted with three catheters (made of polyvinyl chloride; inner diameter (ID): 1.1 mm, outer diameter (OD): 1.9 mm), which were placed in the aorta, the hepatic portal vein, and the upper hepatic vein. They were also fitted with a T-cannula (made of silicone rubber; ID: 12 mm, OD: 17 mm), which was placed 10 cm upstream from the ileocaecal valve.

To differentiate endogenous and dietary proteins, the pigs were given a continuous perfusion of  $^{13}\text{C}$ -leucine solution through the upper hepatic vein catheter (Hess *et al.*, 2000) for five days before the experiment. They received a loading dose of  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  and then a continuous dose of  $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$  at a rate of  $1.5 \text{ ml}\cdot\text{h}^{-1}$ . Prior to initiating the perfusion, a blood sample was taken to determine the basal level of  $^{13}\text{C}$ -leucine enrichment.

The pigs were housed in individual pens in a ventilated room kept at a constant temperature ( $21^\circ\text{C}$ ). Between experimental trials, the pigs were given 500 g/d of a concentrate containing 16% protein, 1% fat, 4% cellulose, and 5% ash (Porcyprima; Sanders Centre Auvergne, France), which was distributed in equal portions at 8.00 and 16.00. The pigs had *ad libitum* access to water.

### 4.2.2 Food types

We tested two solid and two liquid food types: seitan (wheat-based protein), tofu (soya-based protein), soya milk (soya-based protein), and a pea emulsion (pea-based protein; a soybean oil-in-water emulsion containing a pea isolate). The seitan, tofu, and soya milk were of commercial origin. The seitan and tofu were very finely ground (the final median particle sizes were  $5.1 \pm 0.1$  mm for

the tofu and  $3.5 \pm 0.1$  mm for the seitan ( $n = 4$  trials)) and then freeze dried. The soya milk had undergone ultra-high temperature (UHT) processing. We created the emulsion using a commercial pea isolate (Pisane M9, Lot: N16231004, Cosucra, Belgium) and commercial soybean oil (Emile Noël, France). A pre-emulsion was generated using a homogeniser (T-50 Ultra-Turrax, IKA, Germany) equipped with a 15 G dispersing tool (IKA, Germany) run at 10,000 rpm for 1 min. This pre-emulsion was then homogenised twice using a bench-top homogeniser (PandaPLUS 2000, GEA, USA) run at 1,000 bar. We added maltodextrine, sugar, and soybean oil to all the foods to ensure they had equal levels of protein (30.0 g), fat (23.1 g), and calories (980 kcal). The portions of seitan, tofu, soya milk, and pea emulsion weighed 290 g, 435 g, 1,175 g, and 1,162 g, respectively. To estimate basal flows of endogenous amino acids in the ileum, pigs were also given a protein-free food, in which the protein was replaced by 30 g of a mixture of free amino acids (in proportions resembling those found in meat). An indigestible transit marker, chromium oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), was added (0.3% of the food's dry matter content). The characteristics of the different food types are described in the Table 4.

#### 4.2.3 Sampling and chemical analysis

Each pig was given each of the food types in a randomly determined order. Experimental trials were separated by at least two days. During each trial, the pigs had *ad libitum* access to water. All food types were ingested in less than 15 min.

##### 4.2.3.1 Arterial blood samples

Arterial blood samples (4 ml) were taken before food ingestion and 20, 40, 60, 90, 120, 180, 270, 360, 450, and 540 min after ingestion using a cold syringe coated with heparin and lithium (S-monovette, Starstedt). The samples were immediately centrifuged (1,500 G, 10 min, 4°C). The plasma was removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

The levels of various free  $\alpha$ -amino groups in the plasma were measured using a 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) colorimetric assay (Habeeb, 1966).

##### 4.2.3.2 Portal-vein blood samples

Blood samples (3 ml) were taken from the portal vein before food ingestion and 60, 210, and 360 min after ingestion. The samples were immediately centrifuged (1,500 G, 10 min, 4°C). The plasma was removed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. Deproteinisation was carried out using trichloroacetic acid precipitation. The supernatant was purified using cation exchange chromatography and free amino acids were then converted into their N-acetyl-propyl derivatives. It was then possible to measure the  $^{13}\text{C}$ -enrichment of free leucine in the plasma ( $^{13}\text{C}\text{-Leu}_{\text{plasma pv}}$ ) using

gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS; IsoPrime, GV Instruments).

#### 4.2.3.3 Ileal effluent samples

Between 60 min and 540 min post ingestion, ileal effluent was collected continuously in plastic bags (Sachet Whirl-Pak bags; volume: 120 ml, size: 7.5 x 18.5 cm) attached to the ileal cannula. The bags were regularly renewed based on bursts of digestion. The effluent samples were immediately transferred to pre-weighed aluminium dishes kept at -20°C. We created pools corresponding to 1 h of sampling, which were stored at -20°C.

The resulting samples were freeze dried (Cryotec AQ 1460). Dry matter (DM) content was determined after the samples were dried for an additional 24 h in a 60°C oven. The digesta were finely ground.

To estimate levels of chromium oxide (the indigestible transit marker), the samples were first subjected to a step of mineralisation (550°C, 6 h), which were followed by nitric acid dissolution (3 min of boiling in 5%  $\text{HNO}_3$  [w/w]) and filtration (Whatman filter paper: 4–7  $\mu\text{m}$ ). They were then analysed using microwave plasma-atomic emission spectrometry (4210 MP-AES, Agilent).

Next, we created a sample that was representative of the entire postprandial period for each animal for each food type. These samples contained a fixed percentage (based on DM) of each of the hourly effluent pools, starting from the first-time chromium oxide appeared.

Total nitrogen content ( $N_{\text{content}}$ ) was determined using an elemental analyser (vario ISOTOPE cube, Elementar). To estimate amino acid levels, we first performed four separate standardised hydrolysis procedures (AOAC, 2000): sample placement in 6N HCl for 24 h at 110°C, sample placement in 6N HCl for 48 h at 110°C (for branched-chain amino acids), sample placement in 6N HCl for 24 h at 110°C after peroxidation with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (for sulphur-containing amino acids); and sample placement in 4N  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  for 16 h at 110°C (for tryptophan). A fraction of each hydrolysate was dried and then resuspended in a dilution buffer to which D-glucosaminic acid had been added as the injection standard. The levels of the various amino acids ( $\text{AA}_{\text{content}}$ ) were determined using ion exchange chromatography and ninhydrin post-column detection (L-8900 high-speed amino acid analyser, Hitachi).

The level of  $^{13}\text{C}$ -leucine enrichment was measured for the hydrolysed samples using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS; IsoPrime, GV Instruments), after the molecules had been separated using cation exchange chromatography and converted to their N-acetyl-propyl derivatives.



#### 4.2.4 Calculations

##### 4.2.4.1 Total flows of crude protein and amino acids in the ileum

The flows of nitrogen ( $N_i$ ), hereafter a proxy for crude protein ( $N \times 6.25$ ), and amino acids ( $AA_i$ ) were determined using the chromium oxide data and the following equation:  $X_i = X_{\text{content}} \times DM \times Cr_{\text{intake}}/Cr_{\text{content}}$ , where  $X$  is  $N$  or an  $AA$ ,  $DM$  is the total dry matter in the ileal sample,  $X_{\text{content}}$  is the amount of nitrogen or a specific amino acid in the ileal sample, and  $Cr_{\text{intake}}$  and  $Cr_{\text{content}}$  are the quantity of chromium oxide in the food type and ileal sample, respectively.

##### 4.2.4.2 Flows of endogenous crude protein and amino acids in the ileum

The flow of endogenous leucine in the ileum ( $Leu_{\text{endo}}$ ) was calculated using the following equation:  $Leu_{\text{endo}} = Leu_i \times ({}^{13}\text{C}\text{-Leu}_{\text{content}} - {}^{13}\text{C}\text{-Leu}_{\text{intake}})/({}^{13}\text{C}\text{-Leu}_{\text{plasma pv}} - {}^{13}\text{C}\text{-Leu}_{\text{intake}})$ , where  $Leu_i$  is the quantity of leucine in the ileal sample and  ${}^{13}\text{C}\text{-Leu}_{\text{content}}$ ,  ${}^{13}\text{C}\text{-Leu}_{\text{intake}}$ , and  ${}^{13}\text{C}\text{-Leu}_{\text{plasma pv}}$  are the levels of  ${}^{13}\text{C}$ -leucine enrichment in the ileal sample, food type, and portal vein plasma, respectively.

The flow of endogenous nitrogen in the ileum ( $N_{\text{endo}}$ ) was calculated using the following equation:  $N_{\text{endo}} = N_i \times (Leu_{\text{endo}}/Leu_i)$ .

The flows of other endogenous amino acids in the ileum ( $AA_{\text{endo}}$ ) were determined using the following equation:  $AA_{\text{endo}} = Leu_{\text{endo}} \times ([AA]/[Leu])_{\text{PFcontent}}$ , where  $([AA]/[Leu])_{\text{PFcontent}}$  is the ratio between the levels of a given  $AA$  and leucine in the ileal samples from the trial in which the pigs were fed the protein-free food (PF).

Basal flows of endogenous nitrogen and amino acids ( $X_{\text{basal endo}}$ ) were defined as the flows of  $N$  and  $AAs$  in the ileum following the ingestion of the protein-free food. Specific endogenous flows in the ileum ( $X_{\text{specific endo}}$ ) were obtained using the following equation:  $X_{\text{specific endo}} = X_{\text{endo}} - X_{\text{basal endo}}$ , where  $X$  is  $N$  or an  $AA$ .

##### 4.2.4.3 Ileal digestibilities of crude protein and amino acids

###### 4.2.4.3.1 Apparent ileal digestibility of crude protein and amino acids

The apparent ileal digestibilities (AIDs) of nitrogen and the amino acids were expressed as percentages and were determined with the equation  $AID(X) = 100 \times ([X_{\text{intake}} - X_i]/X_{\text{intake}})$ , where  $X$  is  $N$  or an  $AA$ .

###### 4.2.4.3.2 Standardised ileal digestibility of crude protein and amino acids

The standardised ileal digestibilities (SID) of nitrogen and the amino acids were expressed as percentages and were determined with the equation:  $SID(X) = 100 \times (X_{\text{intake}} - [X_i - X_{\text{endo basal}}]/X_{\text{intake}})$ , where  $X$  is  $N$  or an  $AA$ .

#### 4.2.4.3.3 True ileal digestibility of crude protein and amino acids

The true ileal digestibilities (TID) of nitrogen and the amino acids were expressed as percentages and were determined with the equation  $TID(X) = 100 \times (X_{\text{intake}} - [X_i - X_{\text{endo}}]/X_{\text{intake}})$ , where X is N or an AA.

#### 4.2.5 Data and statistical analysis

All statistical analyses were performed in SAS (SAS University Edition, Release 3.71; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The data from the ileal samples were analysed using mixed model ANOVAs in which pig identity was a random effect and food type was a fixed effect. The data from the blood samples were analysed using mixed model repeated measures ANOVAs in which pig identity was a random effect and food type, sampling time, and their interaction (food type x sampling time) were fixed effects. When food type was significant, we performed post-hoc comparisons based on the least-square means (LSMEANS). Our alpha level was set to  $< 0.05$ . In the results, we indicate the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) (n = 6 animals).

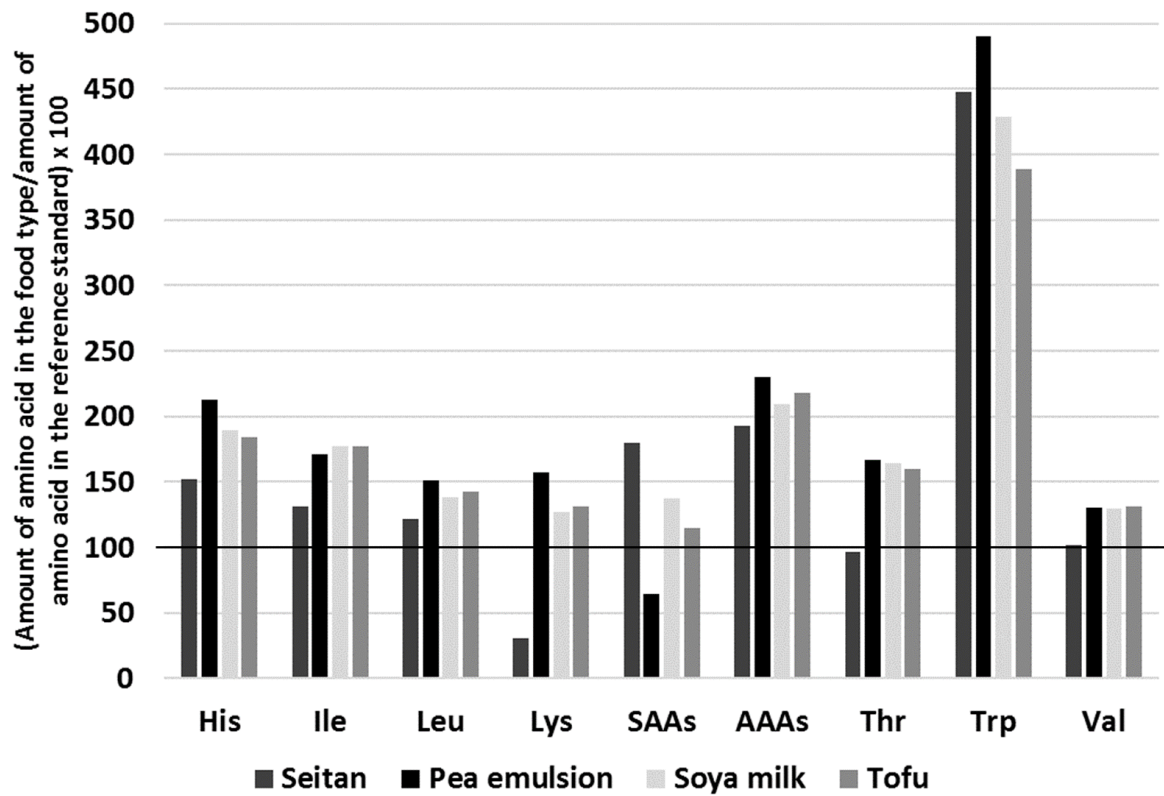
### 4.3 Results

#### 4.3.1 Amino acid profiles of the foods

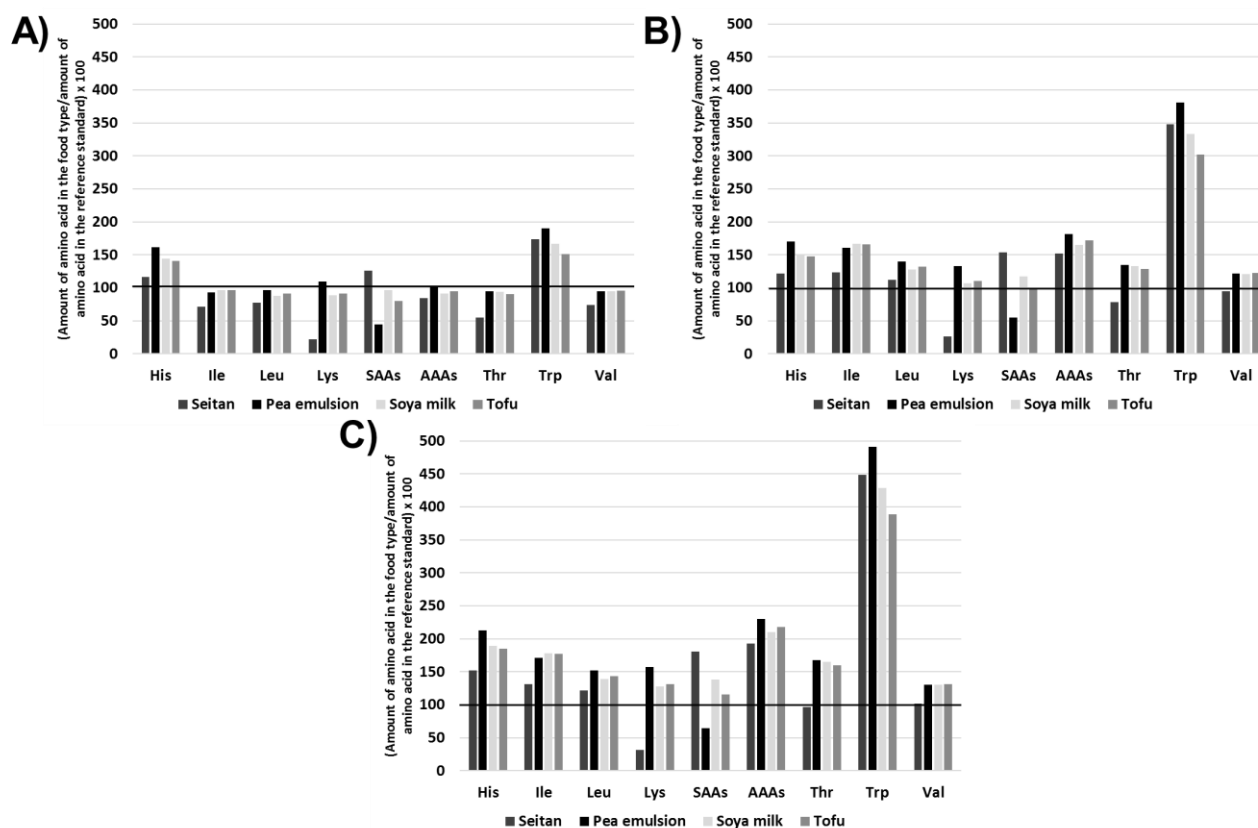
The amino acid profiles of the different food types are presented in Table 4. As expected, the legume-based foods—the tofu, pea emulsion, and soya milk—were relatively rich in lysine. Their ratios of lysine to total amino acids ranged from 5.6 to 7.0. In contrast, for the seitan, the grain-based food, this ratio was 1.4. However, the seitan contained higher levels of sulphur-containing amino acids (SAAs) than did the other foods (SAAs/total AAs: seitan = 3.8 and other foods = 1.4–2.9). If we compare the aminograms for our food types with the standard amino acid profile for adults (FAO, 2013) (Figure 49), we can see that the seitan had lower than recommended levels of lysine and threonine and that the pea emulsion had lower than recommended levels of SAAs. The soya-based foods—the tofu and the soya milk—had similar, well-balanced amino acid profiles; they met or exceeded recommendations.

**Table 4:** Dry matter content (%; as-fed basis), crude protein (CP) levels (N x 6.25, in g.100g<sup>-1</sup> of dry matter intake [DMI]), and amino acid (AA) levels (in g.100g<sup>-1</sup> of DMI) in the different food types.

Food types	Seitan	Pea emulsion	Soya milk	Tofu	Protein-free food
Dry matter (%; as-fed basis)	76.72	15.99	17.49	46.03	
Crude protein (N x 6.25) (% DMI)	20.93	16.79	21.83	23.71	
Indispensable amino acids (% DMI)					
Histidine	0.47	0.53	0.61	0.63	0.58
Isoleucine	0.76	0.80	1.07	1.13	0.82
Leucine	1.42	1.44	1.69	1.85	1.44
Lysine	0.29	1.18	1.22	1.34	1.29
Methionine	0.39	0.08	0.29	0.27	0.56
Phenylalanine	1.03	0.94	1.12	1.24	0.72
Threonine	0.46	0.65	0.82	0.85	0.79
Tryptophan	0.57	0.51	0.57	0.55	0.16
Valine	0.78	0.81	1.04	1.12	0.83
Total indispensable AAs (% DMI)	6.16	6.95	8.42	8.97	7.17
Dispensable amino acids (% DMI)					
Arginine	0.26	0.45	0.55	0.51	0.99
Alanine	0.54	0.71	0.83	0.93	0.95
Aspartic acid/Asparagine	0.61	1.91	2.36	2.52	1.47
Cysteine	0.40	0.15	0.35	0.30	0.29
Glutamic acid/Glutamine	6.76	2.55	3.81	4.09	2.64
Glycine	0.63	0.66	0.85	0.92	0.77
Proline	2.48	0.90	1.28	1.31	0.62
Serine	0.83	0.79	0.97	1.06	0.63
Tyrosine	0.49	0.53	0.60	0.66	0.56
Total dispensable AAs (% DMI)	13.00	8.65	11.60	12.29	8.93
Total AAs (% DMI)	19.16	15.60	20.02	21.26	16.11
Percent representation (%) of lysine within CP (or total AAs for the protein-free food)	1.37	7.02	5.60	5.65	8.02
Percent representation (%) of Met+Cys within CP (or total AAs for the protein-free meal)	3.79	1.37	2.90	2.37	5.33



**Figure 49:** Profiles of indispensable AAs for the different food types compared to the standard amino acid profile for the oldest age group (older child, adolescent, and adult; in  $\text{g}_{\text{AA}} \cdot 100\text{g}_{\text{Protein}}^{-1}$ , His: 1.6; Ile: 3; Leu: 6.1; Lys: 4.8; sulphur-containing amino acids [SAAs]: 2.3; aromatic amino acids [AAAs]: 4.1; Thr: 2.5; Trp: 0.66; Val: 4).



Standard amino acid profiles for the three age groups ( $\text{mg} \cdot \text{g}_{\text{protein}}^{-1}$ )

	His	Ile	Leu	Lys	SAAs	AAAs	Thr	Trp	Val
Infant (birth to 6 months)	21	55	96	69	33	94	44	17	55
Child (6 months to 3 years)	20	32	66	57	27	52	31	8.5	43
Older child, adolescent, adult	16	30	61	48	23	41	25	6.6	40

**Figure 50:** Profiles of indispensable AAs for the different food types compared to the standard amino acid profiles for the three age groups: A) infant (birth to 6 months) (FAO, 2013); B) child (6 months to 3 years) (FAO, 2013); and C) older child, adolescent, and adult (FAO, 2013)

#### 4.3.2 Flow of crude protein and amino acids in the ileum

Food type affected the flow of crude protein in the ileum (Table 5) ( $P = 0.0160$ ). The crude protein flow for the tofu ( $20.71 \pm 3.71 \text{ g}$ ) was significantly higher than that for the pea emulsion ( $10.10 \pm 1.34 \text{ g}$ ,  $P = 0.0153$ ). Although the differences were marginally insignificant, the crude protein flow for the tofu also tended to be higher than the crude protein flows for the seitan ( $12.07 \pm 2.15 \text{ g}$ ,  $P = 0.0531$ ) and the soya milk ( $12.74 \pm 1.09 \text{ g}$ ,  $P = 0.0796$ ). No such differences were seen for total amino acid (TAA) flow ( $P = 0.2786$ ). We suggest that this discrepancy between the crude protein and TAA flows may be due to the tofu's greater contribution of non-protein nitrogen, such as in the form of urea.

For the individual amino acids, we only observed a significant difference in the flow of SAAs, which was about twice as high for the tofu than for the soya milk ( $P < 0.05$ ). Figure 51 illustrates how food type affected postprandial ileal flows of dietary versus endogenous amino acids. Endogenous amino acids clearly made the largest contribution. It is worth noting that the flow of endogenous TAAs was 60% greater for solid foods than for liquid foods (7.1 g vs 4.5 g, respectively), mainly because the solid foods resulted in greater specific endogenous flows (3.7 g and 1.3 g for the solid and liquid foods, respectively) (Table 7).

#### 4.3.3 Ileal digestibilities of crude protein and amino acids for the different food types

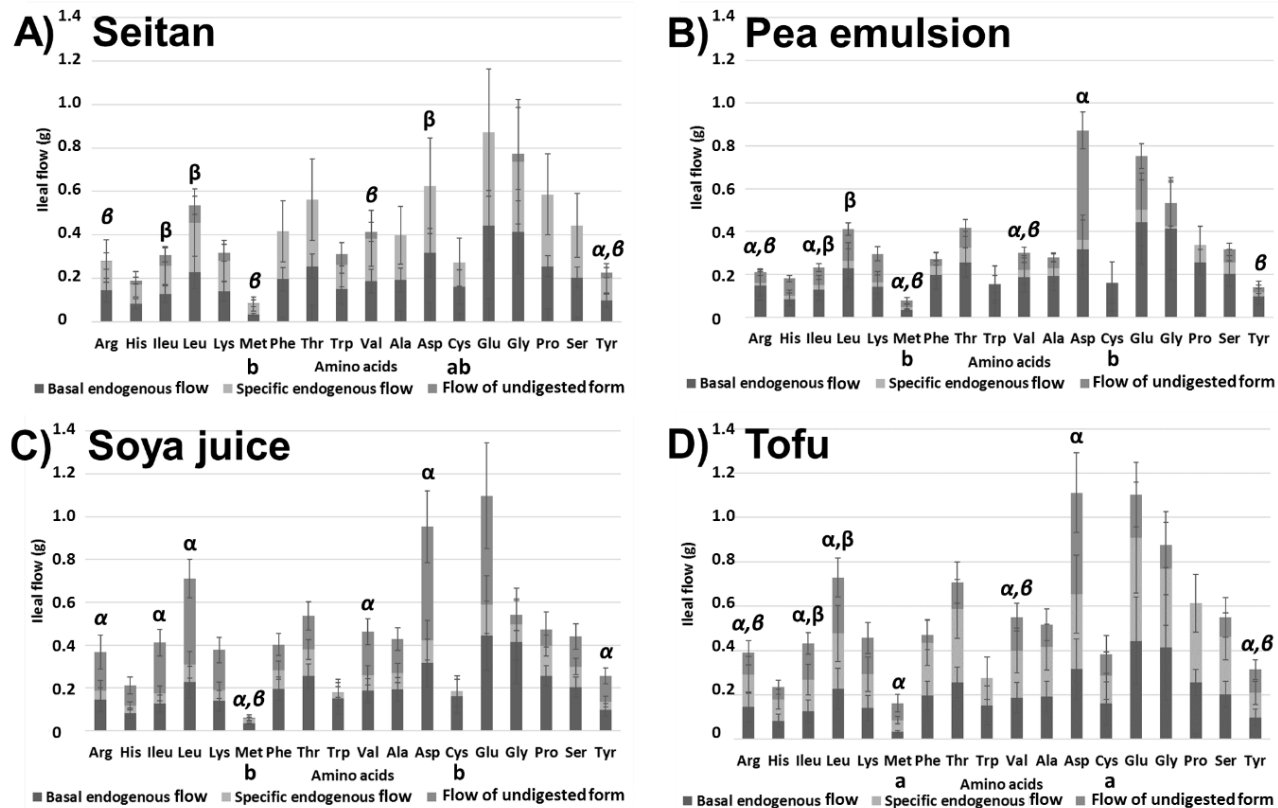
Although we saw significant differences among food types for the AIDs of some of the amino acids (Leu, Met, Asp/Asn, Cys, Glu/Gln) (Table 10), the AIDs for the TAAs were very similar (77–83%). The AID of lysine was lower for the seitan (50%) than for the other food types (range: 83–87%). The AID of methionine (49%) was lower for the pea emulsion than for the soya milk and the seitan (90%), while the tofu had an intermediate value (69%). The AID of cysteine was lower for the tofu and the pea emulsion (36 and 44%, respectively) than for the seitan and the soya milk (74 and 79%, respectively).

Standard ileal digestibility (SID; Table 9) is the value of ileal digestibility most often reported in the literature. The SIDs of the total AAs were 91, 92, 89, and 87% for the seitan, pea emulsion, soya milk, and tofu, respectively.

True ileal digestibility (TID) takes into account total endogenous flows (basal + specific) (Table 11). Across all food types, the TID of crude protein was very high (above 97%). The TID of the TAAs, which is better than the TID of crude protein at reflecting protein digestibility, also showed that digestibility values were very high for the protein in the different food types (92–99%; soya juice < pea emulsion = tofu < seitan). The TIDs for all the individual amino acids were also very high (range: 84–103%). Although the soya milk and the tofu had the same protein source, they displayed small differences in the TIDs of their amino acids: the TID of methionine was lower for tofu, and, conversely, the TID of leucine was lower for soya milk.

**Table 5:** Postprandial ileal flows of crude protein (CP; N x 6.25, in g) and of amino acids (AAs; in g) for the different food types in miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. Food types differed significantly in ileal flow of methionine ( $P = 0.0026$ ), cysteine ( $P = 0.0021$ ) and crude protein ( $P = 0.0160$ ). Differences in letters (a–b) indicate there were significant differences between food types in amino acid digestibility ( $P < 0.05$ , letters are in italics if  $0.10 < P < 0.05$ ).

	Seitan	Pea emulsion	Soya milk	Tofu	<i>P</i>	Protein-free food
Indispensable amino acids (g)						
Histidine	0.19 ± 0.05	0.18 ± 0.03	0.21 ± 0.05	0.24 ± 0.05	NS	0.08 ± 0.02
Isoleucine	0.31 ± 0.09	0.23 ± 0.04	0.41 ± 0.07	0.43 ± 0.07	NS	0.13 ± 0.04
Leucine	0.54 ± 0.15	0.41 ± 0.06	0.71 ± 0.11	0.73 ± 0.13	NS	0.23 ± 0.07
Lysine	0.32 ± 0.08	0.30 ± 0.05	0.38 ± 0.07	0.46 ± 0.10	NS	0.14 ± 0.05
Methionine	0.09 <sup>b</sup> ± 0.02	0.08 <sup>b</sup> ± 0.02	0.06 <sup>b</sup> ± 0.02	0.16 <sup>a</sup> ± 0.04	0.0026	0.03 ± 0.00
Phenylalanine	0.38 ± 0.10	0.27 ± 0.04	0.40 ± 0.07	0.47 ± 0.09	NS	0.20 ± 0.05
Threonine	0.54 ± 0.13	0.42 ± 0.06	0.54 ± 0.08	0.71 ± 0.13	NS	0.26 ± 0.06
Tryptophan	0.31 ± 0.11	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.25 ± 0.03	NS	0.15 ± 0.07
Valine	0.41 ± 0.12	0.30 ± 0.05	0.46 ± 0.07	0.55 ± 0.09	NS	0.19 ± 0.06
Total indispensable AAs (g)	3.08 ± 0.83	2.34 ± 0.29	3.36 ± 0.55	3.99 ± 0.56	NS	1.40 ± 0.43
Dispensable amino acids (g)						
Arginine	0.28 ± 0.07	0.21 ± 0.03	0.37 ± 0.09	0.39 ± 0.08	NS	0.15 ± 0.06
Alanine	0.38 ± 0.10	0.28 ± 0.04	0.43 ± 0.06	0.52 ± 0.11	NS	0.19 ± 0.06
Aspartic acid/Asparagine	0.60 ± 0.12	0.87 ± 0.14	0.95 ± 0.19	1.11 ± 0.24	NS	0.32 ± 0.11
Cysteine	0.23 <sup>a,b</sup> ± 0.04	0.16 <sup>b</sup> ± 0.04	0.15 <sup>b</sup> ± 0.03	0.38 <sup>a</sup> ± 0.07	0.0021	0.16 ± 0.08
Glutamic acid/Glutamine	0.84 ± 0.22	0.75 ± 0.15	1.10 ± 0.28	1.10 ± 0.20	NS	0.44 ± 0.16
Glycine	0.77 ± 0.14	0.53 ± 0.10	0.54 ± 0.09	0.88 ± 0.12	NS	0.41 ± 0.19
Proline	0.57 ± 0.17	0.29 ± 0.06	0.47 ± 0.10	0.53 ± 0.14	NS	0.26 ± 0.05
Serine	0.39 ± 0.09	0.32 ± 0.04	0.44 ± 0.07	0.55 ± 0.11	NS	0.20 ± 0.05
Tyrosine	0.23 <sup>a,b</sup> ± 0.06	0.14 <sup>b</sup> ± 0.04	0.26 <sup>a,b</sup> ± 0.04	0.31 <sup>a</sup> ± 0.06	0.0823	0.10 ± 0.03
Total dispensable AAs (g)	4.29 ± 0.97	3.55 ± 0.44	4.71 ± 0.94	5.78 ± 0.86	NS	2.23 ± 0.78
Total AAs (g)	7.36 ± 1.80	5.89 ± 0.90	8.07 ± 1.48	9.77 ± 1.74	NS	3.64 ± 1.21
Total CP (N x 6.25) (g)	12.07 <sup>a,b</sup> ± 2.15	10.10 <sup>b</sup> ± 1.34	12.74 <sup>a,b</sup> ± 1.09	20.71 <sup>a</sup> ± 3.71	0.0160	9.27 ± 3.12



**Figure 51:** Basal and specific flows of endogenous amino acids (g) and the flow of undigested amino acids (g) in the ileum after the consumption by miniature pigs of A) the seitan, B) the pea emulsion, C) the soya milk, and D) the tofu (the bars represent the SEMs for the six pigs). The data were analysed using mixed model ANOVAs, where pig identity was a random effect and food type was a fixed effect. Food type had a significant effect on total flows of cysteine ( $P = 0.0021$ ) and methionine ( $P = 0.0026$ ) and on some of the undigested amino acids. Post-hoc comparisons were carried out using the least-square means. Differences in the letters (a–b) below the bars indicate there were significant differences between food types for the total flow of that amino acid; differences in the Greek letters ( $\alpha$ – $\beta$ ) above the bars indicate that there were significant differences between food types for the flow of the undigested form of that amino acid. For marginally insignificant effects ( $0.05 < P < 0.10$ ), the letters are in italics (e.g., tyrosine).



**Table 6:** Postprandial total ileal endogenous flows (g) of crude protein (CP; N x 6.25) and amino acids (AAs) for the different food types in miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM.

	Seitan	Pea emulsion	Soya milk	Tofu
Indispensable amino acids				
Histidine	0.16 ± 0.06	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.03
Isoleucine	0.24 ± 0.09	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.27 ± 0.05
Leucine	0.42 ± 0.16	0.26 ± 0.06	0.31 ± 0.03	0.48 ± 0.09
Lysine	0.26 ± 0.10	0.16 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.29 ± 0.06
Methionine	0.08 ± 0.03	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.02
Phenylalanine	0.38 ± 0.14	0.24 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.44 ± 0.08
Threonine	0.51 ± 0.19	0.32 ± 0.07	0.38 ± 0.03	0.59 ± 0.11
Tryptophan	0.24 ± 0.09	0.15 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.28 ± 0.05
Valine	0.35 ± 0.13	0.22 ± 0.05	0.26 ± 0.02	0.40 ± 0.08
Total indispensable AAs	2.64 ± 0.99	1.66 ± 0.30	1.95 ± 0.18	3.01 ± 0.46
Dispensable amino acids				
Arginine	0.26 ± 0.10	0.16 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.29 ± 0.05
Alanine	0.37 ± 0.14	0.23 ± 0.05	0.27 ± 0.02	0.42 ± 0.08
Aspartic acid/Asparagine	0.57 ± 0.22	0.36 ± 0.08	0.42 ± 0.04	0.65 ± 0.12
Cysteine	0.25 ± 0.09	0.16 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.29 ± 0.05
Glutamic acid/Glutamine	0.80 ± 0.30	0.50 ± 0.11	0.59 ± 0.05	0.91 ± 0.17
Glycine	0.68 ± 0.25	0.42 ± 0.09	0.50 ± 0.05	0.77 ± 0.14
Proline	0.54 ± 0.20	0.34 ± 0.07	0.40 ± 0.04	0.61 ± 0.12
Serine	0.41 ± 0.15	0.26 ± 0.06	0.30 ± 0.03	0.46 ± 0.09
Tyrosine	0.18 ± 0.07	0.12 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.21 ± 0.04
Total dispensable AAs	4.05 ± 1.53	2.54 ± 0.46	2.99 ± 0.27	4.62 ± 0.71
Total AAs	6.68 ± 2.52	4.20 ± 0.93	4.93 ± 0.45	7.63 ± 1.43
Total CP (N x 6.25)	16.92 ± 6.38	10.63 ± 2.35	12.49 ± 1.13	19.31 ± 3.63

**Table 7:** Postprandial ileal specific endogenous flows of crude protein (CP; N x 6.25) and amino acids (AAs) for the different food types in miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM.

	Seitan	Pea emulsion	Soya milk	Tofu	<i>P</i>
Indispensable amino acids					
Histidine	0.08 ± 0.06	0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.10 ± 0.04	NS
Isoleucine	0.11 ± 0.09	0.02 ± 0.05	0.05 ± 0.03	0.14 ± 0.07	NS
Leucine	0.19 ± 0.17	0.03 ± 0.08	0.08 ± 0.06	0.25 ± 0.13	NS
Lysine	0.12 ± 0.10	0.02 ± 0.05	0.05 ± 0.04	0.15 ± 0.08	NS
Methionine	0.04 ± 0.03	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02	NS
Phenylalanine	0.19 ± 0.15	0.04 ± 0.06	0.09 ± 0.04	0.24 ± 0.10	NS
Threonine	0.26 ± 0.19	0.07 ± 0.08	0.12 ± 0.05	0.33 ± 0.13	NS
Tryptophan	0.09 ± 0.11	0.00 ± 0.08	0.03 ± 0.06	0.12 ± 0.10	NS
Valine	0.16 ± 0.14	0.03 ± 0.07	0.07 ± 0.05	0.21 ± 0.10	NS
Total indispensable AAs	1.23 ± 1.03	0.25 ± 0.40	0.54 ± 0.35	1.60 ± 0.61	NS
Dispensable amino acids					
Arginine	0.11 ± 0.11	0.01 ± 0.06	0.04 ± 0.05	0.15 ± 0.08	NS
Alanine	0.17 ± 0.14	0.04 ± 0.07	0.08 ± 0.05	0.22 ± 0.10	NS
Aspartic acid/Asparagine	0.26 ± 0.24	0.04 ± 0.12	0.11 ± 0.09	0.34 ± 0.18	NS
Cysteine	0.09 ± 0.12	0.00 ± 0.09	0.02 ± 0.07	0.13 ± 0.11	NS
Glutamic acid/Glutamine	0.35 ± 0.32	0.06 ± 0.17	0.15 ± 0.13	0.47 ± 0.25	NS
Glycine	0.26 ± 0.32	0.01 ± 0.21	0.08 ± 0.17	0.36 ± 0.26	NS
Proline	0.28 ± 0.19	0.08 ± 0.09	0.14 ± 0.05	0.36 ± 0.13	NS
Serine	0.20 ± 0.15	0.05 ± 0.06	0.10 ± 0.04	0.26 ± 0.11	NS
Tyrosine	0.09 ± 0.07	0.02 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.11 ± 0.05	NS
Total dispensable AAs	1.81 ± 1.63	0.31 ± 0.68	0.76 ± 0.65	2.39 ± 1.01	NS
Total AAs	3.05 ± 2.66	0.56 ± 1.32	1.30 ± 0.99	3.99 ± 1.98	NS
Total CP (N x 6.25)	7.65 ± 6.96	1.37 ± 3.44	3.22 ± 2.59	10.04 ± 4.98	NS

**Table 8:** Postprandial ileal flow of undigested protein (N x 6.25) and amino acids (AAs) for the different food types in miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. Food types differed significantly in ileal flow of undigested isoleucine ( $P = 0.0105$ ), leucine ( $P = 0.0051$ ), valine ( $P = 0.0444$ ), aspartic acid/asparagine ( $P = 0.0110$ ), and tyrosine ( $P = 0.0305$ ). Differences in letters (a–b) indicate there were significant differences between food types in amino acid digestibility ( $P < 0.05$ , letters are in italics if  $0.10 < P < 0.05$ ).

	Seitan	Pea emulsion	Soya milk	Tofu	<i>P</i>
Indispensable amino acids (g)					
Histidine	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.04	0.05 ± 0.03	NS
Isoleucine	0.07 <sup>b</sup> ± 0.02	0.08 <sup>b</sup> ± 0.02	0.24 <sup>a</sup> ± 0.06	0.16 <sup>a,b</sup> ± 0.05	0.0105
Leucine	0.12 <sup>b</sup> ± 0.03	0.15 <sup>a,b</sup> ± 0.03	0.40 <sup>a</sup> ± 0.09	0.25 <sup>a,b</sup> ± 0.09	0.0051
Lysine	0.06 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.19 ± 0.06	0.16 ± 0.07	NS
Methionine	0.01 <sup>a,b</sup> ± 0.02	0.03 <sup>a,b</sup> ± 0.01	0.00 <sup>b</sup> ± 0.01	0.08 <sup>a</sup> ± 0.04	0.0805
Phenylalanine	-0.01 ± 0.05	0.03 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.03 ± 0.07	NS
Threonine	0.02 ± 0.08	0.09 ± 0.04	0.16 ± 0.07	0.12 ± 0.09	NS
Tryptophan	0.07 ± 0.04	0.00 ± 0.04	0.00 ± 0.02	-0.03 ± 0.03	NS
Valine	0.06 <sup>b</sup> ± 0.03	0.08 <sup>a,b</sup> ± 0.03	0.20 <sup>a</sup> ± 0.06	0.15 <sup>a,b</sup> ± 0.06	0.0444
Total indispensable AAs (g)	0.44 ± 0.28	0.68 ± 0.17	1.41 ± 0.45	0.98 ± 0.37	NS
Dispensable amino acids (g)					
Arginine	0.02 <sup>b</sup> ± 0.03	0.05 <sup>a,b</sup> ± 0.02	0.18 <sup>a</sup> ± 0.08	0.10 <sup>a,b</sup> ± 0.05	0.0973
Alanine	0.02 ± 0.05	0.05 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.10 ± 0.07	NS
Aspartic acid/Asparagine	0.03 <sup>b</sup> ± 0.10	0.51 <sup>a</sup> ± 0.09	0.53 <sup>a</sup> ± 0.17	0.46 <sup>a</sup> ± 0.18	0.0110
Cysteine	-0.02 ± 0.08	0.00 ± 0.03	-0.03 ± 0.03	0.10 ± 0.09	NS
Glutamic acid/Glutamine	0.04 ± 0.11	0.25 ± 0.06	0.51 ± 0.25	0.19 ± 0.15	NS
Glycine	0.10 ± 0.18	0.11 ± 0.11	0.04 ± 0.07	0.11 ± 0.10	NS
Proline	0.03 ± 0.06	-0.05 ± 0.06	0.08 ± 0.08	-0.08 ± 0.11	NS
Serine	-0.02 ± 0.07	0.06 ± 0.03	0.14 ± 0.06	0.09 ± 0.09	NS
Tyrosine	0.04 <sup>a,b</sup> ± 0.02	0.02 <sup>b</sup> ± 0.03	0.12 <sup>a</sup> ± 0.04	0.11 <sup>a,b</sup> ± 0.04	0.0305
Total dispensable AAs (g)	0.24 ± 0.66	1.01 ± 0.23	1.73 ± 0.79	1.16 ± 0.62	NS
Total AAs (g)	0.68 ± 0.91	1.69 ± 0.48	3.14 ± 1.24	2.14 ± 1.21	NS
Total CP (N x 6.25) (g)	-4.85 ± 4.54	-0.53 ± 1.67	0.24 ± 0.97	1.40 ± 2.28	NS

**Table 9:** Standardised ileal digestibility (%) of the crude protein (CP) and amino acids (AAs) in the food types given to miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. Food types differed significantly in the standardised ileal digestibility of methionine ( $P = 0.0085$ ) and crude protein ( $P = 0.0460$ ). Differences in letters (a–b) indicate there were significant differences between food types in amino acid digestibility ( $P < 0.05$ , letters are in italics if  $0.10 < P < 0.05$ ).

	Seitan	Pea emulsion	Soya milk	Tofu	<i>P</i>
Indispensable amino acids (%)					
Histidine	89.8 ± 5.0	90.2 ± 3.3	89.5 ± 2.0	87.9 ± 3.2	NS
Isoleucine	89.3 ± 5.5	93.1 ± 2.7	86.9 ± 2.0	86.6 ± 2.2	NS
Leucine	90.3 ± 4.9	93.2 ± 3.1	86.0 ± 1.7	86.6 ± 3.1	NS
Lysine	72.1 ± 13.2	93.0 ± 2.3	90.5 ± 1.3	88.2 ± 3.5	NS
Methionine	94.0 <sup>a</sup> ± 2.0	71.3 <sup>b</sup> ± 11.4	95.5 <sup>a</sup> ± 2.7	75.7 <sup>b</sup> ± 6.9	0.0085
Phenylalanine	92.2 ± 4.6	95.8 ± 3.1	91.0 ± 1.3	89.0 ± 3.1	NS
Threonine	72.4 ± 13.1	86.9 ± 6.8	83.1 ± 2.8	73.5 ± 6.8	NS
Tryptophan	87.3 ± 10.9	99.7 ± 9.8	97.5 ± 5.4	91.3 ± 8.1	NS
Valine	87.0 ± 7.1	92.5 ± 4.0	87.0 ± 1.9	83.7 ± 3.5	NS
Dispensable amino acids (%)					
Arginine	76.9 ± 14.6	92.4 ± 6.8	80.2 ± 3.7	76.1 ± 6.5	NS
Alanine	84.0 ± 9.5	93.5 ± 4.9	86.0 ± 1.9	82.7 ± 4.6	NS
Aspartic acid/Asparagine	79.3 ± 11.1	84.5 ± 3.9	86.7 ± 2.2	84.3 ± 3.8	NS
Cysteine	92.1 <sup>a,b</sup> ± 8.2	101.9 <sup>a</sup> ± 28.6	101.2 <sup>a</sup> ± 9.6	62.8 <sup>b</sup> ± 14.3	0.0512
Glutamic acid/Glutamine	97.4 ± 1.7	93.5 ± 4.4	91.6 ± 1.7	92.0 ± 2.3	NS
Glycine	74.4 ± 20.9	90.5 ± 22.0	92.6 ± 6.8	75.0 ± 11.7	NS
Proline	94.4 ± 2.8	97.8 ± 4.9	91.7 ± 2.9	89.5 ± 4.1	NS
Serine	90.1 ± 5.2	92.5 ± 3.2	88.0 ± 2.1	83.7 ± 4.2	NS
Tyrosine	88.1 ± 5.4	95.9 ± 4.0	87.0 ± 1.6	83.6 ± 4.0	NS
Total AAs (%)	91.3 ± 4.9	92.3 ± 4.7	89.1 ± 1.5	85.6 ± 3.4	
Total CP (N x 6.25) (%)	94.0 <sup>a,b</sup> ± 8.7	97.4 <sup>a</sup> ± 11.6	92.2 <sup>a,b</sup> ± 5.5	76.0 <sup>b</sup> ± 6.8	0.0460

**Table 10:** Apparent ileal digestibility (%) of the amino acids (AAs) and crude protein (CP) in the different food types in the miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. The data were analysed using mixed model ANOVAs, where pig identity was a random effect and food type was a fixed effect. Food types differed significantly in the digestibility of lysine ( $P = 0.0039$ ), methionine ( $P = 0.0003$ ), aspartic acid/asparagine ( $P = 0.0193$ ), cysteine ( $P = 0.0035$ ), and glutamic acid/glutamine ( $P = 0.0315$ ). Post-hoc comparisons were carried out using the least-square means. Differences in letters (a–b) indicate there were significant differences between food types in amino acid digestibility ( $P < 0.05$ , letters are in italics if  $0.10 < P < 0.05$ ).

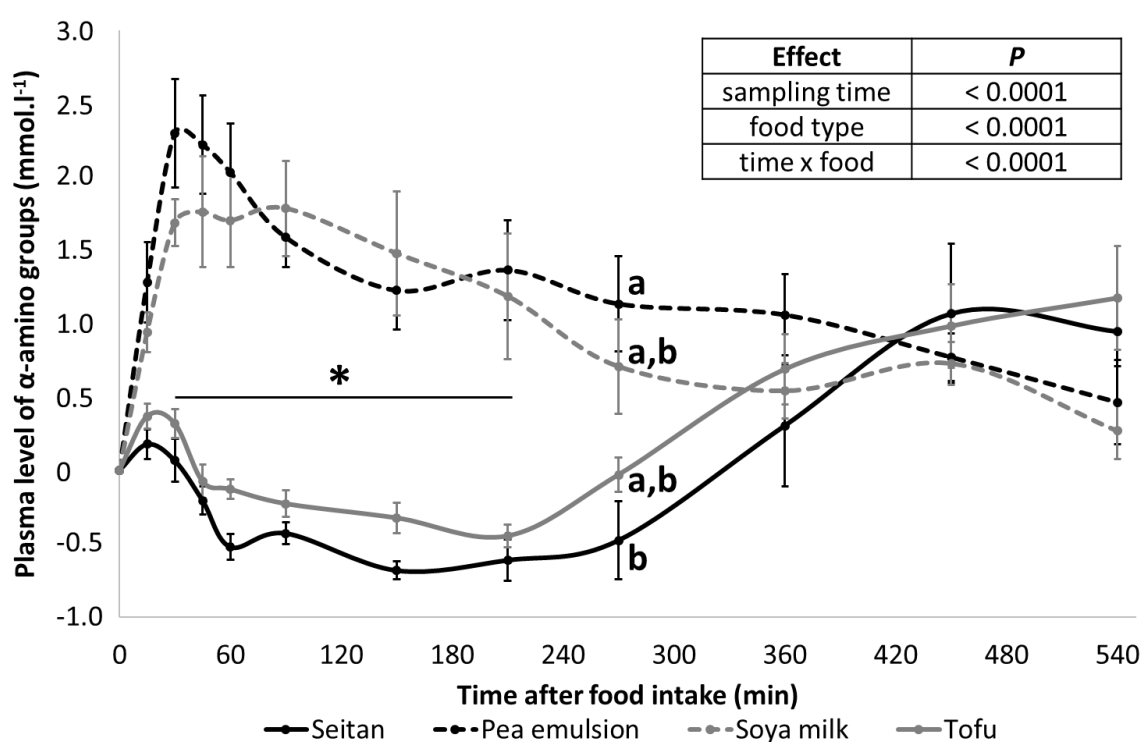
	Seitan	Pea emulsion	Soya milk	Tofu	<i>P</i>
Indispensable amino acids					
Histidine	81.8 ± 4.9	81.8 ± 3.0	82.7 ± 3.7	81.3 ± 3.6	NS
Isoleucine	81.7 ± 5.2	84.7 ± 2.5	81.0 ± 3.4	81.0 ± 2.9	NS
Leucine	83.1 ± 4.7	84.8 ± 2.4	79.3 ± 3.1	80.4 ± 3.6	NS
Lysine	50.0 <sup>b</sup> ± 12.5	86.6 <sup>a</sup> ± 2.4	84.8 <sup>a</sup> ± 2.9	83.0 <sup>a</sup> ± 3.8	0.0039
Methionine	90.1 <sup>a</sup> ± 1.9	49.3 <sup>b</sup> ± 12.5	89.7 <sup>a</sup> ± 2.8	69.4 <sup>b</sup> ± 6.7	0.0003
Phenylalanine	83.6 ± 4.4	84.7 ± 2.0	82.3 ± 2.9	81.1 ± 3.7	NS
Threonine	47.5 ± 12.7	66.0 ± 4.6	67.9 ± 4.8	58.5 ± 7.8	NS
Tryptophan	75.3 ± 8.5	83.6 ± 3.5	84.3 ± 2.4	77.4 ± 3.0	NS
Valine	76.3 ± 6.8	80.3 ± 3.2	78.1 ± 3.5	75.4 ± 4.1	NS
Mean of indispensable AAs (%)	74.3 ± 5.9	82.1 ± 2.2	80.4 ± 3.2	77.8 ± 3.1	NS
Dispensable amino acids					
Arginine	51.7 ± 12.9	75.4 ± 3.7	67.1 ± 8.2	61.9 ± 7.4	NS
Alanine	67.9 ± 8.5	79.1 ± 3.2	74.6 ± 3.8	72.4 ± 5.6	NS
Aspartic acid/Asparagine	56.0 <sup>b</sup> ± 9.1	75.7 <sup>a</sup> ± 3.9	80.1 <sup>a</sup> ± 3.9	78.0 <sup>a</sup> ± 4.7	0.0193
Cysteine	74.1 <sup>a</sup> ± 3.9	44.4 <sup>b</sup> ± 13.8	78.5 <sup>a</sup> ± 3.8	35.8 <sup>b</sup> ± 12.5	0.0035
Glutamic acid/Glutamine	94.4 <sup>a</sup> ± 1.5	84.3 <sup>b</sup> ± 3.0	85.8 <sup>b</sup> ± 3.6	86.6 <sup>a,b</sup> ± 2.4	0.0315
Glycine	44.6 ± 10.0	56.9 ± 8.0	68.5 ± 5.2	52.6 ± 6.7	NS
Proline	89.7 ± 3.1	82.7 ± 3.4	81.9 ± 4.0	79.7 ± 5.4	NS
Serine	79.1 ± 5.0	78.8 ± 2.9	77.6 ± 3.6	74.1 ± 5.4	NS
Tyrosine	79.1 ± 5.3	86.0 ± 3.8	79.0 ± 3.6	76.1 ± 4.7	NS
Mean of dispensable AAs (%)	77.7 ± 3.3	78.2 ± 2.7	80.0 ± 4.0	76.6 ± 3.5	NS
Mean of total AAs (%)	82.7 ± 4.2	79.9 ± 3.1	80.2 ± 3.6	77.1 ± 4.1	NS
Total CP (N x 6.25) (%)	74.1 <sup>a</sup> ± 4.6	68.0 <sup>a,b</sup> ± 4.3	71.3 <sup>a,b</sup> ± 2.5	56.5 <sup>b</sup> ± 7.8	0.0908

**Table 11:** True ileal digestibility (%) of the amino acids (AAs) and crude protein (CP) in the different food types in the miniature pigs (n = 6). The values are the mean±SEM. The data were analysed using mixed model ANOVAs, where pig identity was a random effect and food type was a fixed effect. Food types differed significantly in the true ileal digestibility of isoleucine (P = 0.0438), leucine (P = 0.0092) and methionine (P = 0.0300). Post-hoc comparisons were carried out using the least-square means. Differences in letters (a–b) indicate there were significant differences between food types in amino acid digestibility (P < 0.05, letters are in italics if 0.10 < P < 0.05).

	Seitan	Pea emulsion	Soya milk	Tofu	<i>P</i>
Leu endo: total leucine in the ileum (%)   Portal vein	71.8 ± 22.4	65.1 ± 12.5	48.9 ± 10.8	67.0 ± 19.2	
Leu endo: total leucine in the ileum (%)   Protein-free food method	84.7 ± 22.5	45.1 ± 11.0	38.9 ± 12.3	79.3 ± 18.3	
Indispensable amino acids (%)					
Histidine	97.0 ± 1.4	91.8 ± 1.4	92.2 ± 3.2	95.7 ± 2.6	NS
Isoleucine	95.8 <sup>a</sup> ± 1.2	94.6 <sup>a,b</sup> ± 1.2	89.1 <sup>b</sup> ± 2.9	92.9 <sup>a,b</sup> ± 2.1	0.0438
Leucine	96.3 <sup>a</sup> ± 0.9	94.5 <sup>a</sup> ± 1.1	88.3 <sup>b</sup> ± 2.6	93.3 <sup>a,b</sup> ± 2.4	0.0092
Lysine	90.5 ± 5.5	93.9 ± 1.5	92.5 ± 2.4	93.9 ± 2.6	NS
Methionine	98.8 <sup>a</sup> ± 1.9	80.3 <sup>b</sup> ± 9.4	99.3 <sup>a</sup> ± 2.5	85.6 <sup>a,b</sup> ± 7.3	0.0300
Phenylalanine	100.3 ± 2.3	98.3 ± 1.6	94.7 ± 2.3	98.6 ± 2.6	NS
Threonine	97.6 ± 7.7	92.4 ± 3.3	90.6 ± 3.9	93.0 ± 5.5	NS
Tryptophan	94.4 ± 3.2	99.6 ± 4.2	99.8 ± 2.1	102.6 ± 2.9	NS
Valine	96.4 ± 1.7	94.8 ± 1.6	90.4 ± 2.9	93.3 ± 2.7	NS
Mean of indispensable AAs (%)	96.8 ± 2.0	94.8 ± 1.3	91.8 ± 2.6	94.5 ± 2.1	NS
Dispensable amino acids (%)					
Arginine	95.9 ± 5.5	94.2 ± 1.8	84.0 ± 7.1	90.4 ± 5.3	NS
Alanine	98.5 ± 4.1	96.3 ± 1.6	90.6 ± 3.1	94.7 ± 3.9	NS
Aspartic acid/Asparagine	98.1 ± 7.7	85.7 ± 2.4	88.9 ± 3.5	91.0 ± 3.5	NS
Cysteine	102.2 ± 8.7	100.8 ± 12.1	104.6 ± 4.2	83.8 ± 14.3	NS
Glutamic acid/Glutamine	99.7 ± 0.7	94.8 ± 1.2	93.4 ± 3.2	97.7 ± 1.8	NS
Glycine	93.1 ± 13.0	91.3 ± 8.7	97.4 ± 4.3	94.3 ± 5.6	NS
Proline	99.5 ± 1.0	102.7 ± 3.7	97.1 ± 3.2	103.2 ± 4.1	NS
Serine	101.0 ± 3.6	96.0 ± 1.9	92.8 ± 3.0	95.9 ± 4.2	NS
Tyrosine	96.0 <sup>a,b</sup> ± 2.0	97.7 <sup>a</sup> ± 3.0	90.1 <sup>b</sup> ± 3.0	92.0 <sup>a,b</sup> ± 3.4	0.0621
Mean of dispensable AAs (%)	99.2 ± 2.3	93.8 ± 1.4	92.7 ± 3.3	95.3 ± 2.5	NS
Mean of total AAs (%)	98.4 ± 2.1	94.2 ± 1.6	92.3 ± 3.0	95.0 ± 2.8	NS
Total CP (N x 6.25) (%)	110.4 ± 9.7	101.7 ± 5.3	99.5 ± 2.2	97.1 ± 4.8	NS

#### 4.3.4 Levels of $\alpha$ -amino groups in the plasma

The plasma levels of the various free  $\alpha$ -amino groups across the postprandial period are shown in Figure 52. There was a significant interaction between sampling time  $\times$  food type ( $P < 0.0001$ ). More specifically, there were consistent differences between liquid foods (soya milk and pea emulsion) and solid foods (seitan and tofu) 30–210 min after food intake. For the liquid foods, there was a rapid dramatic increase in the levels of the free  $\alpha$ -amino groups; for the solid foods, these levels largely remained unchanged for the entire postprandial period. Then, starting at 360 min, the results for the liquid and solid foods became similar again.



**Figure 52:** Levels of  $\alpha$ -amino groups in the plasma after the consumption of the seitan, tofu, pea emulsion, and soya milk ( $n = 6$  pigs). These patterns were analysed using mixed model repeated measures ANOVAs, where pig identity was a random effect and food type, sampling time, and their interaction were fixed effects. There were significant differences between liquid meals (pea emulsion and soya milk) and solid meals (seitan and tofu) 30–210 min after food intake, as indicated by the horizontal line and asterisk. At 270 min, only the seitan and pea emulsion still differed ( $P = 0.0018$ ), as shown by the differing letters (a–b).

#### 4.3.5 Nutritional protein quality of the foods

We calculated the protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAASs) and the digestible indispensable amino acid scores (DIAASs) using the true ileal digestibility values, as

recommended by the FAO (FAO and WHO, 1991; FAO, 2013). We determined the PDCAASs and DIAASs for our four food types based on the standard amino acid profiles for three age groups (infant; child; and pre-schooler, adolescent, and adult) (Table 12). The digestible amino acids that were limiting did not differ between score types or age groups. There was one exception: for the soya milk, leucine was the limiting amino acid for infants, whereas lysine was the limiting amino acid for the other two age groups. The PDCAASs were always higher than their corresponding DIAASs (by 1.5–10.3%), and the difference between the scores seemed to increase with the absolute values of the DIAASs and the PDCAASs.

**Table 12:** Untruncated PDCAASs (%), DIAASs (%), and limiting amino acids for the different food types in the miniature pigs (SAAs: methionine+cysteine). To calculate the scores, we used the standard amino acid profiles for three age groups.

Age group		Seitan	Pea emulsion	Soya milk	Tofu
Infant (birth to 6 months)	PDCAAS (%)	21.6 (Lys)	44.8 (SAAs)	88.0 (Leu)	80.2 (SAAs)
	DIAAS (%)	19.6 (Lys)	41.9 (SAAs)	77.7 (Leu)	67.9 (SAAs)
Child (6 months to 3 years)	PDCAAS (%)	26.2 (Lys)	54.8 (SAAs)	107.2 (Lys)	98.0 (SAAs)
	DIAAS (%)	23.7 (Lys)	51.3 (SAAs)	99.1 (Lys)	83.0 (SAAs)
Older child, adolescent, adult	PDCAAS (%)	31.1 (Lys)	64.3 (SAAs)	127.3 (Lys)	115.1 (SAAs)
	DIAAS (%)	30.9 (Lys)	60.2 (SAAs)	116.3 (Val)	97.4 (SAAs)

#### 4.4 Discussion

This study is the first to characterise the true ileal digestibility (TID) of the protein found in seitan, tofu, and soya milk—foods commonly consumed by humans. We found that their TIDs were high: 98, 95, and 92%, respectively. These values are similar to those seen for wheat protein isolates (93%) (De Vrese *et al.*, 2000) and soybean protein isolates (91.5–96%) (Bos *et al.*, 2003; Rutherford *et al.*, 2015). The TID of the protein in the pea emulsion (94%) resembled the TIDs previously observed for pea isolates (90–98%) (Mariotti *et al.*, 2001; Rutherford *et al.*, 2015). Furthermore, these TIDs are comparable to those of animal proteins: 91–98% for meat (Oberli *et al.*, 2015; Hodgkinson *et al.*, 2018; Kashyap *et al.*, 2018) and 94–95% for milk (Bos *et al.*, 1999; Rutherford *et al.*, 2015).

The food types tested in this study were specifically chosen to allow us to compare protein digestion for liquid versus solid foods. It is worth noting that solid foods resulted in greater endogenous flows in the ileum, regardless of protein source. We used the same food types in a previous study and discovered that liquid and solid foods differentially affected gastric pH over time



(Reynaud *et al.*, 2020). In a complementary study, we examined the gastric emptying rate associated with these foods. We found no significant differences in the transit time of the gastric liquid phase, but we could not exclude the possibility that larger particles (5–7 mm) of the solid foods remained in the stomach for hours. The median particle sizes of the solid foods were 3–5 mm. Consequently, particles that were larger than the median might have also been retained for longer in the stomach, and the slowdown in gastric emptying could partly explain why the postprandial peak in the plasma levels of the  $\alpha$ -amino groups was limited for the solid foods. The plasma levels of amino acids reflect the balance between amino acid input (mainly absorption) and amino acid output (utilisation by tissues). A peak may thus be observed when absorption is rapid, and metabolic use does not keep up, as clearly occurred for the liquid foods. However, the solid foods were digested more slowly, and they therefore did not produce such a postprandial peak. Additionally, this slowdown in digestion may favour protein synthesis in the gut and the subsequent release of endogenous proteins in the gut lumen, increasing specific endogenous flows in the ileum.

Because tofu and soya milk have the same source of protein, comparing them can provide greater insight into the differences between solid and liquid foods. Specific endogenous flows in the ileum were higher for tofu than for soya milk. There was no difference in overall amino acid digestibility, but the TID of the SAAs (methionine and cysteine) was lower for tofu, a result that may stem from the increased formation of disulphide bonds during tofu fabrication.

The seitan had the lowest nutritional protein quality (DIAAS range: 20–31%) because of its low amount of lysine. This result concurs with what has been seen for wheat protein in bread (DIAAS: 20%) (Han *et al.*, 2018). Lysine has also been found to be a limiting amino acid in whole-grain wheat, but the PDCAASs and DIAASs calculated for whole-grain wheat are generally higher (30–60%) (Cervantes-Pahm, Liu and Stein, 2014; Mathai, Liu and Stein, 2017). This difference may be attributable to seitan's lower lysine levels—they were twice as low as the lysine levels of whole-grain wheat. The DIAASs of the pea emulsion were intermediate (42–64%), and SAAs were limiting across all age groups. These values are consistent with those observed for a pea isolate (45–84%) (Mathai, Liu and Stein, 2017).

Because the seitan and the pea emulsion were almost completely digested, the nutritional protein quality of these two food types is essentially defined by their amino acid profiles, which were unbalanced. In contrast, the tofu and soya milk had similar, well-balanced profiles. Thus, their nutritional protein quality was determined by crude protein and amino acid digestibility, and the digestibility values revealed the identity of the limiting amino acids. Indeed, the tofu had DIAASs between 68% and 97% because it had a limiting amount of SAAs. The soya milk had DIAASs ranging

from 78% to 116%; lysine was a limiting amino acid for child, and leucine was a limiting amino acid for the other two age groups. For the soya flour, the limiting amino acids were SAAs, leucine, and lysine when the most restrictive reference standards, *i.e.* of the infant, were applied (Mathai, Liu and Stein, 2017). As mentioned previously, such differences could arise from disparities in food processing or food structure (*i.e.*, tofu is a protein gel, while soya milk is protein emulsion).

#### **4.5 Conclusions**

The four food types studied here—seitan, pea emulsion, soya milk, and tofu—displayed similar, high values of true ileal digestibility for crude protein and amino acids. The only differences among them were related to leucine and methionine. For the tofu and soya milk (both soya-based foods), nutritional protein quality was determined by digestibility because the foods' amino acid profiles were well balanced. For the seitan and the pea emulsion, nutritional protein quality was determined by the degree of amino acid imbalance and the amounts of limiting amino acids relative to standard profiles.

## **Acknowledgements**

We thank Julien Hermet, who is head of animal care services, and we are grateful to Philippe Lhoste and Yohan Delorme, who are animal care workers. We also wish to acknowledge Jessica Pearce for correcting the English of the manuscript and the help provided by Denys Durand, who performed the surgeries with Didier Rémond.

## **Funding information**

The research described in this article is part of a CIFRE thesis (CIFRE n°2016/0719) funded by IMPROVE SAS and INRA.

## **Disclosure**

The authors have no competing interests.

## **Author Contributions**

DR designed the study. CB, BC, MV, YR, and DR performed the experiments, and NH conducted amino acids dosages. DR, CB, and YR analysed the data. DR and YR drafted the manuscript, and all the authors helped revise it.

## References

AOAC (2000) *Official Methods of Analysis, 17th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.*

Bos, C. *et al.* (1999) 'Assessment of net postprandial protein utilization of <sup>15</sup>N-labelled milk nitrogen in human subjects', *British Journal of Nutrition*, 81(3), pp. 221–226.

Bos, C. *et al.* (2003) 'Human Nutrition and Metabolism Postprandial Kinetics of Dietary Amino Acids Are the Main Determinant of Their Metabolism after Soy or Milk Protein Ingestion in Humans', *Journal of nutrition*, 133(5), pp. 1308–1315.

Bos, C. *et al.* (2005) 'Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans', *Am J Clin Nutr*, 81(1), pp. 87–94.

Cervantes-Pahm, S. K., Liu, Y. and Stein, H. H. (2014) 'Digestible indispensable amino acid score and digestible amino acids in eight cereal grains', *Brit. J. Nutr.*, 111, pp. 1663–1672. doi: 10.1017/S0007114513004273.

FAO (2013) *Report of an FAO Expert Consultation: Dietary protein quality evaluation in human nutrition.*

FAO and WHO (1991) *Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation (1989: Bethesda, Maryland).*

Le Feunteun, S. *et al.* (2014) 'Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig In Vivo Data', *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), pp. 1099–1113. doi: 10.1007/s11947-013-1116-6.

Gaudichon, C. *et al.* (2002) 'Ileal Losses of Nitrogen and Amino Acids in Humans and Their Importance to the Assessment of Amino Acid Requirements', *Gastroenterology*, 123, pp. 50–59. doi: 10.1053/gast.2002.34233.

Gausserès, N. *et al.* (1996) 'The gastro-ileal digestion of <sup>15</sup>N-labelled pea nitrogen in adult humans', *British Journal of Nutrition*, 76, pp. 75–85. doi: 10.1079/BJN19960010.

Gausserès, N. *et al.* (1997) '[<sup>15</sup>N]-Labeled Pea Flour Protein Nitrogen Exhibits Good Ileal Digestibility and Postprandial Retention in Humans', *Nutrient Metabolism*, 127(6), pp. 1160–1165.

GEPV (2019) *Les protéines végétales en plein essor !*

Gerbens-leenes, P. W., Nonhebel, S. and Krol, M. S. (2010) 'Food consumption patterns and economic growth . Increasing affluence and the use of natural resources', *Appetite*, 55, pp. 597–608. doi: 10.1016/j.appet.2010.09.013.

German, B., Damodaran, S. and Kinsella, J. E. (1982) 'Thermal Dissociation and Association Behavior of Soy Proteins', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(5), pp. 807–811. doi: 10.1021/jf00113a002.

Gilani, G. S., Xiao, C. X. and Cockell, K. A. (2012) 'Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality', *British Journal of Nutrition*, 108(S2), pp. S315–S332. doi: 10.1017/S0007114512002371.

González, A. D., Frostell, B. and Carlsson-Kanyama, A. (2011) 'Protein efficiency per unit energy and per unit greenhouse gas emissions: Potential contribution of diet choices to climate change mitigation', *Food Policy*, 36, pp. 562–570. doi: 10.1016/j.foodpol.2011.07.003.

Habeeb, A. F. S. A. (1966) 'Determination of Free Amino Groups in Proteins by Trinitrobenzenesulfonic Acid', *Analytical biochemistry*, 14(3), pp. 328–336.

Han, Fei *et al.* (2018) 'Digestible indispensable amino acid scores of nine cooked cereal grains', *Brit. J. Nutr.* doi: 10.1017/S0007114518003033.

Hess, V. *et al.* (2000) 'Comparison of the isotope dilution method for determination of the ileal endogenous amino acid losses with labelled diet and labelled pigs', *British Journal of Nutrition*, 83(2), pp. 123–130.

Hodgkinson, S. M. *et al.* (2018) 'Cooking Conditions Affect the True Ileal Digestible Amino Acid Content and Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS) of Bovine Meat as Determined in Pigs', *The Journal of Nutrition*, 148, pp. 1564–1569. doi: 10.1093/jn/nxy153.

Juillet, B. *et al.* (2008) 'Increasing habitual protein intake results in reduced postprandial efficiency of peripheral, anabolic wheat protein nitrogen use in humans', *Am J Clin Nutr*, 87(3), pp. 666–678.

Kashyap, S. *et al.* (2018) 'Ileal digestibility of intrinsically labeled hen's egg and meat protein determined with the dual stable isotope tracer method in Indian adults', *The American Journal of Clinical Nutrition*. Oxford University Press, 108(5), pp. 980–987.

Li, S., Sauer, W. C. and Caine, W. R. (1998) 'Response of Nutrient Digestibilities to Feeding Diets with Low and High Levels of Soybean Trypsin Inhibitors in Growing Pigs', *J Sci Food Agric*, 76, pp. 357–363.

Mariotti, F. *et al.* (2001) 'The Influence of the Albumin Fraction on the Bioavailability and Postprandial Utilization of Pea Protein Given Selectively to Humans', *The journal of nutrition*, 131(6), pp. 1706–1713.

Mathai, J. K., Liu, Y. and Stein, H. H. (2017) 'Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS)', *Brit. J. Nutr.*, 117, pp. 490–499. doi: 10.1017/S0007114517000125.

Oberli, M. *et al.* (2015) 'High true ileal digestibility but not postprandial utilization of nitrogen from bovine meat protein in humans is moderately decreased by high-temperature, long-duration

cooking', *The Journal of nutrition*, 145(10), pp. 2221–2228. doi: 10.3945/jn.115.216838.contrast.

Reynaud, Y. *et al.* (2020) 'Temporal changes in postprandial intragastric pH: comparing measurement methods, food structure effects, and kinetic modelling', *Food Research International*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108784.

Rutherford, S. M. *et al.* (2015) 'Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats', *The Journal of Nutrition*, 145(2), pp. 372–379. doi: 10.3945/jn.114.195438.fecal.

Tomé, D. (2013) 'Digestibility issues of vegetable versus animal proteins : Protein and amino acid requirements — functional aspects', *Food and Nutrition Bulletin*, 34(2), pp. 272–274. doi: 10.1177/156482651303400225.

De Vrese, M. *et al.* (2000) 'Protein-Bound D -Amino Acids , and to a Lesser Extent Lysinoalanine, Decrease True Ileal Protein Digestibility in Minipigs as Determined with 15N-labeling', *The journal of nutrition*, 130(8), pp. 2026–2031.

## 4.6 Résultats complémentaires

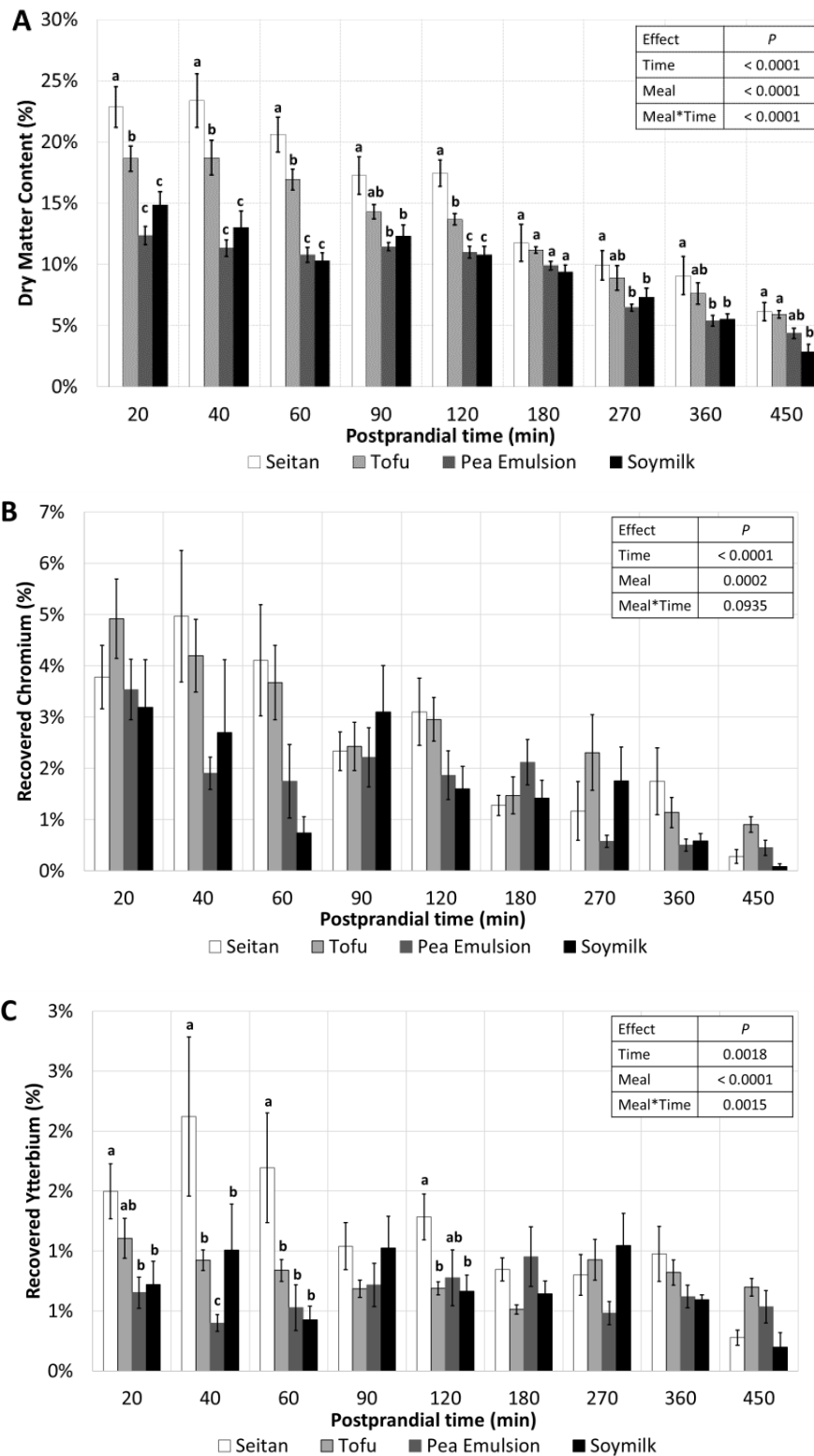
### 4.6.1 Caractéristiques des effluents duodénaux : la teneur en matières sèche et les concentrations en marqueurs indigestibles

Dry Matter (DM) content before eating meals was  $3.8 \pm 0.6\%$  ( $n = 24$ ). Further postprandial DM content are presented on Figure 53A: significant effects of meal, time and interaction were noticed ( $P < 0.0001$ ). Until 120 min, DM content was significantly distributed as follow: seitan > tofu > soymilk ~ pea emulsion. From 180 min, while DM content was decreasing with time, this order was respected with lower differences.

Concerning recovered chromium (Figure 53B), meal\*time interaction effect was not significant ( $P = 0.0935$ ). Therefore, a significant meal effect was detected, where larger amount of chromium was recovered with solids-containing meals than liquid ones until 60 min. Then percentages appeared similar. Remarkably, chromium recovered at 60 min after both liquid meals were lower than at 40 min, but also at 90 min.

Contrarily to chromium data, meal\*time interaction effect was significant regarding recovered ytterbium ( $P = 0.0015$ ) (Figure 53C). Until 120 min, except at 90 min, seitan allowed higher recovery of ytterbium compared to most of other meals. At 40 min, ytterbium collected after pea emulsion intake was lowest than all other meals. After 180 min, no meal effect was noted.

Globally, for all meals, these three parameters decreased with time. At 450 min, indigestible markers, especially chromium, were found in low quantity, indicating that most of the chyme has passed through the pylorus sphincter. It allowed us to estimate gastric emptying parameters by a Elashoff's equation-derived regression



**Figure 53:** Dry Matter content (A), Chromium (B) and Ytterbium (C) recovered fractions in samples taken through the duodenal cannula at different time after ingestion (MEAN ± SEM; n = 6). Mixed models of repeated measures ANOVA with animal as random effect, and, meal, time and meal\*time as fixed effects were performed on data. Significant interactions were found for Dry Matter content ( $P < 0.0001$ ) and percentage of recovered Ytterbium ( $P = 0.0015$ ), thus post hoc LSMEANS test was performed. Letters (a – c) shows significant difference at each time ( $P < 0.05$ ).



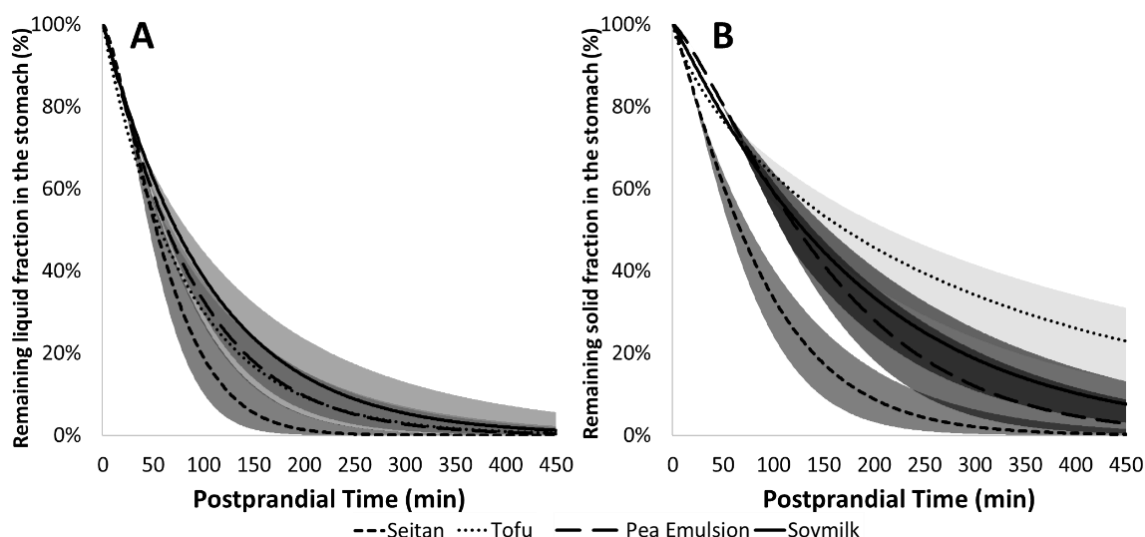
#### 4.6.2 Les paramètres de vidange gastrique des quatre aliments déduits des marqueurs indigestibles quantifiés dans les effluents duodénaux des mini-porcs.

Obtained parameters are presented on Table 13 and curves on Figure 54. No significant differences on gastric emptying parameters were found ( $P > 0.05$ ), except for the parameter A relative to solid phase ( $P = 0.0468$ ). Maximum amount of ytterbium recovered through the cannula after pea emulsion intake ( $7 \pm 1\%$ ) was lower than after seitan intake ( $10 \pm 1\%$ ) ( $P = 0.0478$ ).

However, looking at curves, seitan seemed to be globally emptied quicker than other meals. On the contrary, solid phase of tofu chyme looked to empty slower than others. Finally, pea emulsion and soymilk profiles of gastric emptying were similar, according to statistical results regarding regression parameters.

**Table 13:** Parameters of gastric emptying (MEAN  $\pm$  SEM; n = 5 – 6). Mixed model of ANOVA was operated with animal as random effect and meal as fixed effects was performed on regression parameters ( $\beta$ ,  $t_{1/2}$ , A). Significance level was only reached for the parameter A relative to solid phase ( $P = 0.0468$ ). Post hoc LSMEANS test distinguished pea emulsion and seitan on this parameter ( $P = 0.0478$ ).

Meal	Liquid Phase			Solid Phase		
	$t_{1/2}$ (min)	$\beta$	A (%)	$t_{1/2}$ (min)	$\beta$	A (%)
p-value	$P = 0.3758$	$P = 0.1776$	$P = 0.2572$	$P = 0.1249$	$P = 0.0887$	$P = 0.0468$
Seitan	$53 \pm 7$	$1.38 \pm 0.16$	$21 \pm 2$	$67 \pm 10$	$1.15 \pm 0.13$	$10 \pm 1^a$
Tofu	$57 \pm 8$	$0.98 \pm 0.10$	$24 \pm 3$	$171 \pm 44$	$0.78 \pm 0.07$	$9 \pm 1^{ab}$
Pea Emulsion	$64 \pm 5$	$1.07 \pm 0.14$	$17 \pm 2$	$124 \pm 16$	$1.27 \pm 0.19$	$7 \pm 1^b$
Soymilk	$73 \pm 11$	$1.02 \pm 0.17$	$19 \pm 3$	$130 \pm 25$	$1.06 \pm 0.05$	$7 \pm 1^{ab}$



**Figure 54:** Curves of modelled gastric emptying of liquid phase (A) or solid phase (B) (MEAN  $\pm$  SEM; n = 5 – 6).

4.6.3 La protéolyse in vivo dans l'estomac et le duodénum estimée en réalisant le ratio de la teneur en amines libres sur l'azote total de l'échantillon

#### 4.6.3.1 Basal state

In the duodenum, total nitrogen was  $12.1 \pm 0.8$  %,  $\alpha$ -amino groups content was  $206 \pm 20$  mg<sub>N</sub>.l<sup>-1</sup>, thus local apparent degree of proteolysis (LADP) was  $17.5 \pm 1.7$  %.

#### 4.6.3.2 Total Nitrogen content

Meal, time and interaction effects were significant on the total nitrogen content in the stomach and the duodenum ( $P < 0.002$ ). In the stomach (Figure 55A), total nitrogen content was higher after seitan output than other meals output at 20 min and from 90 to 270 min, but not between 40 and 90 min. However, the duodenum (Figure 55A') observed significant lower total nitrogen content with solid meals than liquid meals from 20 min to 180 min ( $P < 0.05$ ). From 360 min, it was the opposite, the total nitrogen content became higher after solid meals than liquid ones.

#### 4.6.3.3 $\alpha$ -amino group content

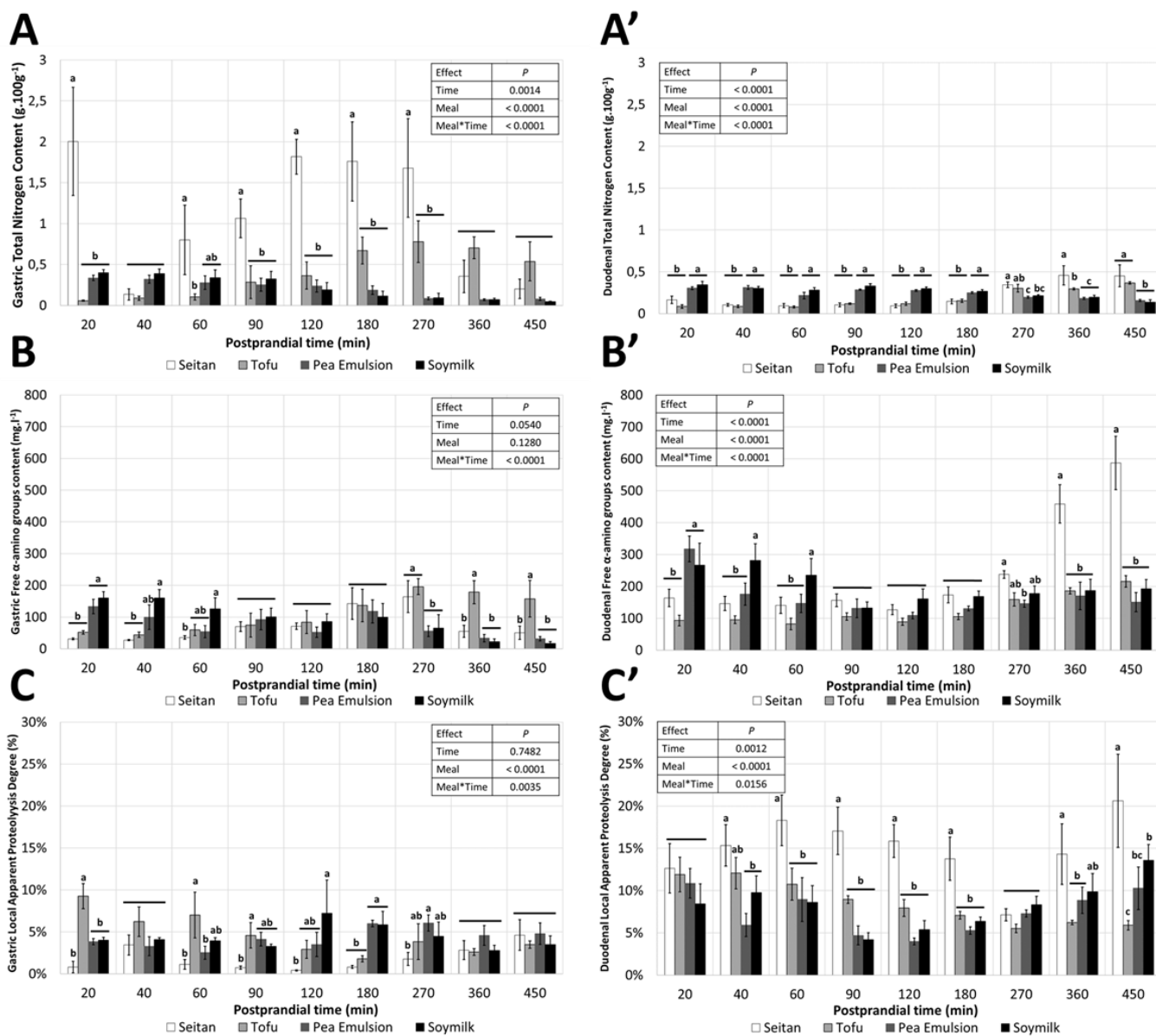
In the stomach (Figure 55B), only the interaction effect was significant ( $P < 0.0001$ ), whereas all effects were significant in the duodenum (Figure 55B'). Both localizations followed the same compartments. In fact, even if a significant difference of  $\alpha$ -amino group content occurred between liquid and solid meals at 20 min, the difference waned until to get similar content between meals from 90 min to 180 min (Figure 55B&B'). At 270 min, significant differences appeared and from 360 min,  $\alpha$ -amino group content was higher in the stomach after tofu intake than other meals (Figure 55B), whereas in the duodenum,  $\alpha$ -amino group content was higher after seitan intake than other meals (Figure 55B').

#### 4.6.3.4 Local Apparent Proteolysis Degree (LADP)

A local proteolysis degree can be deduced from the ratio of the  $\alpha$ -amino group content on the total nitrogen content. By assuming that endogenous nitrogen and  $\alpha$ -amino group input are similar from a condition to another, the value allow comparison of the proteolysis degree between meals.

In the stomach (Figure 55C), the seitan observed lowest local apparent degree of proteolysis (LADP) than tofu at 20 min and from 60 to 90 min, than the soymilk from 120 to 180 min, than the pea emulsion from 180 to 270 min. No significant difference occurred between meals from 360 min.

However, seitan observed highest LADP in the duodenum from 60 min to 180 min (Figure 55C'). The difference began earlier with liquids (at 40 min) and appeared again after 360 min. Tofu distinguish itself only in the duodenum at the end of the assay (450 min) with the lowest LADP (significantly lower than the LADP of the seitan and the soymilk effluents).



**Figure 55:** Evolution of the proteolysis in the stomach and the duodenum. Total Nitrogen content in gastric (A) and duodenal samples (A').  $\alpha$ -amino group content in gastric (B) and duodenal samples (B'). Local Apparent Degree of Proteolysis (LADP) in gastric (C) and duodenal samples (C'). Data are MEAN  $\pm$  SEM; n = 4 animals in gastric assays; n = 6 animals in duodenal assays. Mixed models of repeated measures ANOVA with animal as random effect, and, meal, time and meal\*time as fixed effects were performed on data. Significant interactions were found for data, thus post hoc LSMEANS test was performed. Letters (a – c) shows significant difference at each time ( $P < 0.05$ ).

#### 4.6.4 Solubilité de l'azote alimentaire en condition *in vitro* gastrique

Data are shown on Table 14. Meal, pH and interaction meal\*pH effects were significant ( $P < 0.0001$ ). Whatever the pH, Nitrogen Solubility Index (NSI) were similar for solids-containing meals around 2 %. However, liquids meals demonstrated U-shape NSI curves with a minimum reached at pH 4. Even if soymilk observed same NSI at pH 2 and 6 ( $P = 0.4167$ ), pea emulsion observed highest NSI at pH 2 ( $100.7 \pm 0.7\%$ ) than pH 4 ( $47.2 \pm 10.4\%$ ) ( $P < 0.0001$ ). Finally, nitrogen of pea emulsion was better solubilized than soymilk ( $81.8 \pm 7.3\%$ ) at pH 6 ( $P < 0.0001$ ).

**Table 14:** Nitrogen Solubility Index (NSI) of meals under *in vitro* gastric condition (n = 3, MEAN  $\pm$  SEM). Repeated measures ANOVA with meal and pH\*meal as fixed effects and pH as repeated effect was operated. As all effects were significant ( $P < 0.0001$ ), post hoc LSMEANS test was performed. Letters (a – e) shows significant difference ( $P < 0.05$ ).

Meal	pH 2	pH 4	pH 6
Seitan	$2.2 \pm 0.4\%$ <sup>d</sup>	$1.6 \pm 0.2\%$ <sup>d</sup>	$2.1 \pm 0.2\%$ <sup>d</sup>
Tofu	$2.2 \pm 0.2\%$ <sup>d</sup>	$2.0 \pm 0.3\%$ <sup>d</sup>	$1.8 \pm 0.2\%$ <sup>d</sup>
Pea Emulsion	$100.7 \pm 0.7\%$ <sup>a</sup>	$6.9 \pm 0.2\%$ <sup>d</sup>	$47.2 \pm 10.4\%$ <sup>c</sup>
Soymilk	$87.1 \pm 9.1\%$ <sup>b</sup>	$5.7 \pm 1.0\%$ <sup>d</sup>	$81.8 \pm 7.3\%$ <sup>b</sup>

**Chapitre 5. Programmation aliment-spécifique du système *in vitro* dynamique  
DiDGI® : corrélation avec la digestion protéique d'aliments à base de soja dans  
un modèle porcin**

Food-dependent set-up of the DiDGI® dynamic *in vitro* system: correlation with the  
porcine model for protein digestion of soya-based food

*Authors (\* corresponding author)*

Yohan Reynaud<sup>a,b\*</sup>, Angélique Couvent<sup>a</sup>, Aline Manach<sup>d</sup>, David Forest<sup>d</sup>, Michel Lopez<sup>a</sup>, Daniel  
Picque<sup>d</sup>, Isabelle Souchon<sup>d</sup>, Didier Rémond<sup>c</sup>, Didier Dupont<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*IMPROVE SAS, F-80480, Dury, France*

<sup>b</sup>*STLO, INRA, AGROCAMPUS OUEST, F-35042, Rennes, France*

<sup>c</sup>*Université Clermont Auvergne, INRA, UNH, Unité de Nutrition Humaine, F-63000 Clermont-  
Ferrand, France*

<sup>d</sup>*GMMA, INRA, AgroParisTech, Université Paris Saclay, F-78850, Thiverval-Grignon, France*

En préparation

## Abstract

The present study compared *in vivo* protein digestion in a miniature pig model with the dynamic *in vitro* system DiDGI<sup>®</sup>, using three digestive compartments (stomach, duodenum, and jejunum). Two soya-based meals—commercial soya milk and tofu—were studied, each with the same macronutrient content but different macrostructures. Pigs were surgically fitted with a gastric (n = 4), duodenal (n = 6), or an ileal cannula (n = 6), and were randomly chosen to receive one of the two meals. Our aim was to first deduce from the *in vivo* experiments in pigs key digestive parameters such as gastric pH, stomach emptying kinetics, and intestinal transit time, in order to design a relevant set-up for the dynamic *in vitro* system. Once this was accomplished, we compared digestive samples collected at fixed sampling times from both *in vivo* and *in vitro* models. We specifically assessed (i) the kinetics of digestion after meal ingestion, (ii) contents of dry matter,  $\alpha$ -amino nitrogen, and total nitrogen, and (iii) the molecular weight distributions of gastric peptides. Overall, apparent ileal digestibilities of nitrogen were similar *in vitro* and *in vivo* and the differences between the two meals were conserved between models ( $P = 0.5805$ ). The lowest degree of correlation was found in the gastric step, in which models differed with respect to certain parameters. However, at a later stage of digestion, when the stomach was almost emptied, proteolysis patterns were largely similar between models, especially for the tofu digestion. Individual duodenal parameters were occasionally different, but the global kinetics were consistent from one model to another. Although this study was not able to reveal a clear, widespread correlation between the two models, it makes an important contribution to our understanding of the protein digestion of soya-based foods in a dynamic *in vitro* system compared to the porcine model.

**Keywords:** tofu; soya milk; mini-pig; gastric emptying; intestinal transit

## Highlights

- Food-dependant programme was developed for an *in vitro* dynamic model of digestion
- Apparent digestibility of nitrogen was consistent *in vitro* and *in vivo*
- Both models yielded similar molecular weight distributions of gastric peptides
- Duodenal proteolysis was globally comparable between models
- The DiDGI<sup>®</sup> demonstrated less inter-trial variability for measured parameters

## 5.1 Introduction

Animal experiments are increasingly difficult to perform due to the economic resources they require and the ethical concerns that must be addressed. Despite this, it is still standard—indeed, recommended—for assessments of protein and amino acid digestibility to be conducted using human or pig models (FAO, 2013). *In vitro* systems could present suitable alternatives, but they first must be shown to mimic as much as possible real physiological conditions and must be validated using *in vivo* data. For example, Rozan and colleagues (1997) examined quantitative correlations between digestion end-points obtained *in vivo* and *in vitro*, specifically by comparing true digestibility assessed in rats with the final degree of hydrolysis measured using the pH-stat method. Other studies have gone further by comparing different *in vitro* protocols and methods; for example, the true digestibility of chickpea quantified in rats was found to correlate better ( $R^2 = 0.6785$ ,  $P = 0.0640$ ) with the degree of hydrolysis determined using O-phthalaldehyde after incubation with pepsin/pancreatin (Tavano, Neves and da Silva Júnior, 2016). Similarly, evaluations of *in vitro* static nitrogen or amino acid digestibility—in which samples were either filtered with a 1.2- $\mu\text{m}$  filter (Millipore) (Saunders, Connor and Booth, 1973) or a 1 kDa-cut off dialysis bag (Vachon *et al.*, 1987; Rozan *et al.*, 1997)—have found favourable correlations with different nutritional quality indicators of proteins measured in rats. Instead, correlations between the apparent ileal digestibilities of amino acids obtained from pigs and *in vitro* static amino acid digestibilities (after filtration of the samples on a glass filter, pore size 40–90  $\mu\text{m}$ ; Cho & Kim, 2011) were mixed, with the coefficient of correlation variable from one amino acid to another. Proteolysis has also been examined *in vitro* using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA; Ménard *et al.*, 2014) or by LC-MS/MS identification of released peptides (Egger *et al.*, 2015, 2018; Egger, Ménard, *et al.*, 2017; Egger, Schlegel, *et al.*, 2017; Sanchón *et al.*, 2018). In these studies, though, comparisons with *in vivo* results were globally affected by a high degree of inter-individual variability, which forced the authors to differentiate each animal in the presentation of the results. This complicated the analysis, because it was difficult to determine if a strong correlation was due to the quality of the simulation or an artefact of the high *in vivo* variability (Walther *et al.*, 2019). In general, the number of possible set-ups to replicate digestion *in vitro* is large, and a major remaining challenge is to identify those that are most physiologically relevant (Bohn *et al.*, 2018). To address this, the INFOGEST network recently published standardised approaches for static protocols, i.e. those that do not take into consideration the kinetics of digestion (Brodkorb *et al.*, 2019). However, no such consensus has yet emerged for dynamic systems of digestion. Indeed, these models are even more complex than their static counterparts, and require extensive knowledge of how digestive physiology changes over time (*e.g.*, gastric emptying kinetics or pH changes). To address this challenge, different teams have designed multiple systems that aim

to replicate these dynamic conditions *in vitro*. Of these, the Vatier (Nunez, Bichot and Paris, 1998) and the Mainville (Mainville, Arcand and Farnworth, 2005) models consist of a succession of reactors, each connected to the next, which mimic the stomach and other compartments of the small intestine. More recently, the DiDGI<sup>®</sup> (Digesteur Dynamique Gastro-Intestinale; Ménard *et al.*, 2014) or the ESIN (Engineered Stomach and small Intestine; Guerra *et al.*, 2016) systems were developed on the same basis. The most well-known system is the TIM-1 (Minekus *et al.*, 1995; Minekus, 2015), which also simulates contractile aspects of digestion. However, only limited data exist that assess the correlation of these *in vitro* systems with *in vivo* models, and most of these data focus on the digestion of milk proteins. To our knowledge, correlations between *in vivo* and *in vitro* digestion of plant protein have only been performed using static *in vitro* models and *in vivo* data from the rat model. However, the rat model has several drawbacks with respect to mimicking human digestion, as the eating behaviour of rats and their physiological parameters of digestion are not directly comparable to those of humans (Davies and Morris, 1993). Instead, the gastrointestinal conditions in pigs are much more similar to those of humans, both anatomically and physiologically (Henze *et al.*, 2018) and for this reason, the porcine model should be preferred for studies of protein digestion and digestibility (FAO, 2013).

The aim of this study was to examine the correlation between a porcine model of food-protein digestion and a dynamic *in vitro* gastrointestinal system, the DiDGI<sup>®</sup>. Specifically, we used data from three sets of experiments on cannulated mini-pigs (gastric, duodenal, and ileal) to (i) determine optimal parameters for the set-up of the *in vitro* system (pH, chyme transfer) and (ii) compare the evolution of digestion in both *in vivo* and *in vitro* models, specifically with respect to dry matter content, local apparent degree of proteolysis, and molecular weight distributions of peptides. This latter goal was accomplished by comparing the digestion of two soya-based foods (soya milk and tofu) in the DiDGI<sup>®</sup> and in mini-pigs. Ileal digestibilities were also obtained from both models and compared.

## **5.2 Materials and methods**

### **5.2.1 Test meals**

Two soya-based food matrices were tested: commercial tofu and commercial soya milk. Soya milk was UHT- (Ultra-High Temperature) packed. Food matrices were supplemented with maltodextrin, sugar, and soya oil (Emile Noël, France) in order to standardise the amounts of protein (30.0 g), fat (23.1 g), and calories (980 kcal) in each diet (Table 15). The meals used for the DiDGI<sup>®</sup> experiments had the same nutrient proportions but ingredient quantities were reduced by a factor of four.



Dry matter content (DM) was determined by oven-drying at 105°C overnight. Crude fat content was determined using the Randall method after 12 h incubation in 1 M HCl (ISO, 2008). Total nitrogen content was measured using the Kjeldahl method according to Thiex, Manson, Anderson, & Persson (2002). To calculate crude protein content, conversion factors of 5.36 for pea proteins, 5.50 for soya, and 5.50 for wheat proteins were used according to (Mariotti, Tomé and Mirand, 2008). Starch content was measured using a polarimeter (European Commission, 2009). Gross energy was calculated from macronutrient content using standard conversion factors.

**Table 15:** Meal composition for mini-pigs (in g, except for calories expressed in kcal). Meals used for DiDGI® digestion had the same proportion of each ingredient, but the quantities were divided by four.

	Tofu	Soymilk
Protein	30	30
Lipid	23.1	21
Carbohydrates	0.4	13
Soya Oil added	0	2.1
Maltodextrin added	132.6	120
Sugar added	30	30
Weight	435	1162
Calories	980 kcal	

### 5.2.2 *In vivo* digestion study on mini-pigs

All procedures were conducted in accordance with European guidelines (Directive 2010/63/EU) and were approved by the Auvergne Animal Experimentation Ethics Committee (CEMEAA) and the French Government. Yucatan mini-pigs were housed in subject pens in a ventilated room with controlled temperature (21°C). Between sampling days, they received 500 g/d of a standard diet for minipigs, distributed in two equal portions at 8:00 and 16:00, and had free access to water. They were divided into three groups.

#### 5.2.2.1 *Gastric group*

The gastric test included four mini-pigs (weight = 24.9 ± 1.2 kg, 8 months old). Three weeks before the trials began, mini-pigs were surgically fitted with a cannula (silicone rubber; 12-mm internal diameter, 17-mm outer diameter) at the greater curvature in the latero-ventral region of the corpus. Digesta were sampled a minimum of 5 min before ingestion, then 20, 40, 60, 90, 120, 180, 270, 360, and 450 min after ingestion of the meal. To each sample, we added 10 µl of pepstatin A solution (P5318, #027M4005V, Sigma-Aldrich, USA) per ml of digesta, at a concentration of 0.5 mg.ml<sup>-1</sup> in methanol/acetic acid (9:1). Samples were then placed in liquid nitrogen and stored at -20°C.

### 5.2.2.2 Duodenal group

The duodenal test involved six mini-pigs (weight =  $24.7 \pm 0.4$  kg, 8 months old). Three weeks before the experiment, a cannula (silicone rubber; 12-mm internal diameter, 17-mm outer diameter) was fitted on mini-pigs 5–10 cm under the pyloric sphincter, as described previously by Bauchart *et al.* (2007). Each meal contained a Cr-EDTA solution (30 ml,  $2.77 \text{ mg}_{\text{Cr}}.\text{ml}^{-1}$ ) as a liquid marker (Binnerts, 1968), and 450 mg Ytterbium-acetate as a solid-phase marker (Siddons *et al.*, 1985).

Duodenal sampling was performed a minimum of 5 min before ingestion and then 20, 40, 60, 90, 120, 180, 270, 360, and 450 min after ingestion of the meal. The pH of the collected duodenal content (15 ml maximum) was measured with an IFSET probe (1001-004 ISFET, Sentron, Holland), then the sample was divided into two parts. One part was freeze-dried (Pilot Freeze Dryer, Cryotec, France) for marker quantification; the other part was blocked with 1 mM final concentration of Pefabloc SC (AEBSF) (24305500, Roche, USA) diluted in distilled water. Then, the blocked mixture was vortexed for 5 s, placed in liquid nitrogen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

The freeze-dried portions of the collected duodenal contents were also used to determine the dry matter content (DM) of duodenal samples (based on the weight difference before and after freeze-drying).

Freeze-dried duodenal contents were then ground and prepared for microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES) with successive steps of mineralisation ( $550^{\circ}\text{C}$ , 6 h), nitric acid dissolution (3 min boiling in 5%  $\text{HNO}_3$  (w/w)), and filtration (Whatman filter 4-7  $\mu\text{m}$ ). The amount of chromium-labelled indigestible content was then determined with a 4210 MP-AES apparatus (Agilent). The percentage of markers recovered was calculated by multiplying the measured content of the marker by the fixed volume sampled from the cannula (12 ml) and dividing this by the initial amount of the marker that was present in the meal.

### 5.2.2.3 Ileal group

The ileal test involved six mini-pigs (weight =  $20.2 \pm 1.5$  kg, 8 months old). Three weeks before the experiment, mini-pigs was surgically fitted with a cannula (silicone rubber; 12-mm internal diameter, 17-mm outer diameter) at their distal ileum (10 cm before the ileocecal valve). Chromium oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) was used as an indigestible transit marker, and was added up to the amount of 0.3% of meal dry matter content.

Contents were collected between 1 and 9 h after the distribution of meals in pre-weighed plastic bags (Sachet Whirl-Pak, 120 ml, 7.5 x 18.5 cm) attached to the ileal cannula. Full bags were replaced

with new ones as necessary. Content was immediately transferred to aluminium dishes (previously weighed) and stored at -18°C. Samples were pooled in 1-h pools and stored at -20°C.

Ileal samples underwent the same treatments as the freeze-dried duodenal samples, i.e. freeze-drying, grinding, and mineralisation, to enable chromium quantification in samples using microwave plasma-atomic emission spectrometry (4210 MP-AES, Agilent). Then, a representative sample of the entire postprandial period (per animal-meal combination) was constituted using a fixed percentage (DM basis) from each batch of collected effluent (hourly), starting from the first detection of chromium.

### 5.2.3 Determination of operating parameters for the DiDGI<sup>®</sup> dynamic *in vitro* system

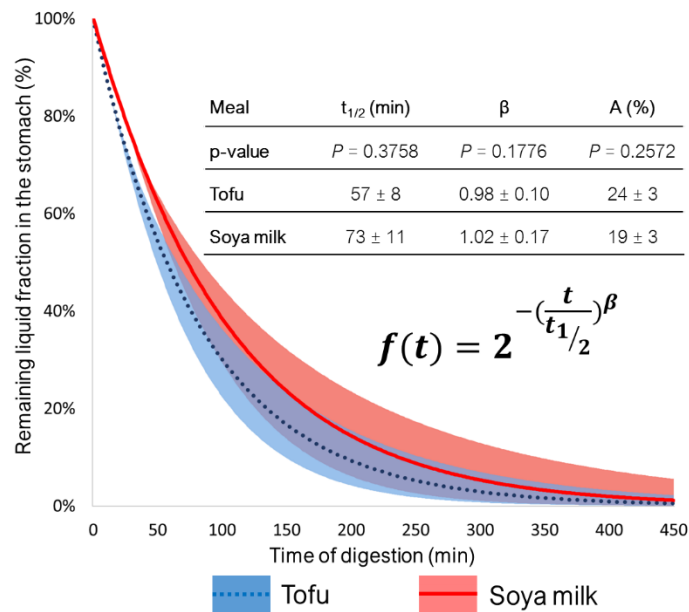
#### 5.2.3.1 Gastric emptying equation

Gastric emptying was modelled according to Elashoff's equation (Elashoff, Reedy and Meyer, 1982) and parameters were determined for each meal from mineral data collected through the duodenal cannula.

For each timepoint, the total amount of marker collected up to this time was summed. This function is thought to follow the equation (Decuyper, Dendooven and Henderickx, 1986):

$$f(t) = A \left( 1 - 2^{-\left(\frac{t}{t_{1/2}}\right)^\beta} \right) \quad (1)$$

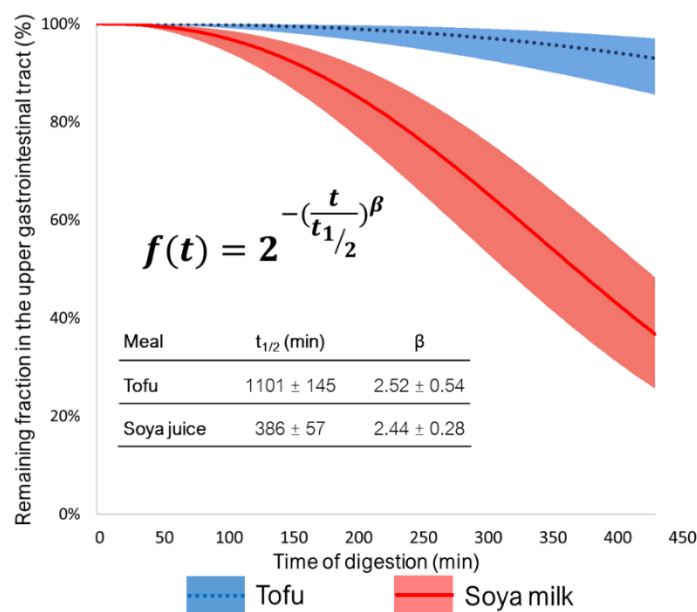
where  $A$  is the maximum percentage of marker collected compared to initial marker intake;  $\beta$  is the shape of the curve; and  $t_{1/2}$  is the time at which 50% of the meal has been emptied from the compartment (here the stomach). The parameters of interest are  $t_{1/2}$  and  $\beta$ , from Elashoff's equation. Our model assumed that the flux of chyme was continuous and homogeneous. To avoid aberrant regression, samples that did not demonstrate a plateau in their kinetics were removed from the analysis; after this filtering step, at least five animals per meal and per marker were retained for analysis. Regression parameters are presented in Figure 56.



**Figure 56:** Parameters of gastric emptying (MEAN  $\pm$  SEM; n = 5–6). Mixed model ANOVA was performed on regression parameters ( $\beta$ ,  $t_{1/2}$ , A), with animal as random effect and meal as fixed effect. No significant difference was observed between soya milk and tofu meals.

### 5.2.3.2 Intestinal transit flow

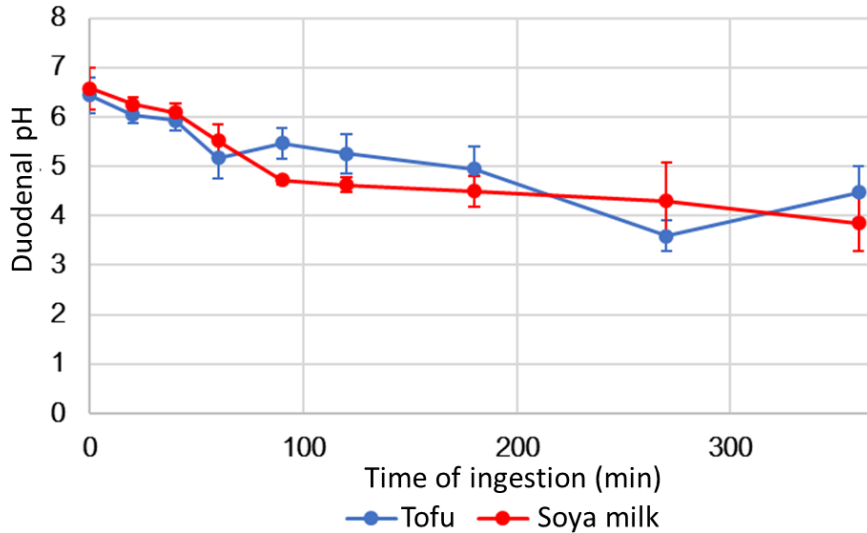
Transit of the bolus from the mouth to the ileal cannula was estimated with formula (1). In initial tests, the plateau of recovered chromium was not reached (Figure 57), so we set A (the maximum percentage of marker collected compared to initial marker intake) to 0.5. This can be interpreted as the hypothesis that the maximum content that could be recovered through the ileal cannula was 50%.



**Figure 57:** Parameters of the intestinal flow after tofu meal (broken blue curve) or soya milk meal (solid red line) ingestion (MEAN  $\pm$  SEM; n = 5–6).

### 5.2.3.3 pH in the stomach and duodenum

We used food-dependent gastric acidification equations from a previous study (Reynaud *et al.*, 2020), using the mean data of pH catheter probes. Duodenal kinetics of pH were deduced from a non-linear regression of the pH measured in duodenal samples (Figure 58).



**Figure 58:** pH of the duodenal content collected in vivo after tofu (solid blue curve) or soya milk meal (solid red line) ingestion (MEAN  $\pm$  SEM; n = 6).

### 5.2.3.4 Endogenous secretions

We simulated the saliva and basal gastric fluid present in the stomach when the chyme arrived by adding 12 ml of simulated saliva fluid (SSF) and 40 ml of simulated gastric fluid (SGF) to the initial meal; these were prepared according to (Minekus *et al.*, 2014).

These amounts of endogenous secretions came from the recommendations of INFOGEST (Minekus *et al.*, 2014). Therefore, in order to maintain the same global ratio of protein:protease from one meal to another, enzymes were injected as follows:

In the stomach, the total amount of pepsin units (P6887, #SLBV3035, Sigma-Aldrich, USA) was 80 000 per gram of food protein and the speed of injection was  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  (concentration of the stock solution:  $3333 \text{ U}_{\text{pepsin}}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). In the duodenum, the total amount of trypsin units from pancreatin (P7545, #SLBV6830, Sigma-Aldrich, USA) was 4 000 per gram of food protein and the speed of injection was  $0.25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  (concentration of the stock solution:  $333 \text{ U}_{\text{trypsin}}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Biliary acids solution (B8631, Sigma-Aldrich, USA) was secreted at  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . For the first 30 min, a  $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  solution of biliary acids was used, then the concentration was reduced to  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## 5.2.4 *In vitro* digestion study using DiDGI®

### 5.2.4.1 *The dynamic three-compartment model of the gastrointestinal tract*

This study used a three-compartment system instead of the original two-compartment system described in (Ménard *et al.*, 2014). In the original system, the two compartments represent the stomach and the duodenum, respectively; to this set-up, Adouard and colleagues (2016) added a third compartment to represent the jejunum-ileal section of the intestine (Adouard *et al.*, 2016). In our experiment, the third compartment emptied into a receptacle, the contents of which were analogous to those collected through the ileal cannula of mini-pigs.

### 5.2.4.2 *Digestion programme*

The digestion programme was designed following consultation with available *in vivo* data and existing literature. It was food-dependent and is summarised in Table 16. pH was regulated with 0.2 N HCl and 1 N NaOH solutions.

### 5.2.4.3 *Post-hoc treatment of ileal content for the simulation of intestinal absorption*

All effluents collected from the third DiDGI® compartment corresponded to the *in vivo* effluent arriving at the ileal cannula; in both cases, ileal contents were collected in aluminium plates on the same sampling schedule. At least once per hour of digestion, once the chyme reached the *in vitro* “ileum”, contents were manually stirred and a 2-ml sample was collected and blocked with 1 mM final concentration of Pefabloc SC (76307, #117M4033V, Sigma-Aldrich, USA) diluted in distilled water. Samples were vortexed for 5 s and put on ice before being stored at -20°C. The remainder of the ileal contents was frozen at -20°C before being freeze-dried.

All of the frozen samples from a given digestion were pooled, homogenised, and centrifuged (5 000 G, 10 min, 20°C). Pellets and supernatants were weighed, and total nitrogen content was determined (Kjeldahl method). Supernatants were then subjected to different methods for simulating intestinal absorption, described below. From those processes, we generated values for simulated-absorbed and simulated-non-absorbed fractions of ileal content.

**Table 16:** Parameters of the DiDGI® digestion

Parameters	Soya milk	Tofu
Time of digestion	360 min	
Temperature	37°C	
Gastric pH equation	$1.8 + (5.5/(1+\exp(0.40(2-t)+\exp(0.04(t-174))))$	$1.5 + (4.7/(1+\exp(0.40(3-t) + \exp(0.02(t-9)))) + (1.5*\ln(1+\exp(-t/300))/\ln(2))$
Duodenal pH equation	$2.86 + (3.41/(1 + 191.26)^{(0.89))}$	
Gastric emptying equation	$2^{(-t/73)^{(1.02)}$	$2^{(-t/57)^{(0.98)}$
Fixed volume of the duodenum	50 ml	
Intestinal flow equation	$2^{(-t/386)^{(2.44)}$	$2^{(-t/1101)^{(2.52)}$
Pepsin secretion	600 000 U <sub>pepsin</sub> over 360 min (0.5 ml.min <sup>-1</sup> ) (P6887)	
Pancreatin secretion	30 000 U <sub>trypsin</sub> over 360 min (0.25 ml.min <sup>-1</sup> ) (P7545)	
Bile secretion	40 mmol.l <sup>-1</sup> until 30 min, then 20 mmol.l <sup>-1</sup> (0.5 ml.min <sup>-1</sup> ) (B8631)	

### 5.2.5 Values to be correlated between *in vivo* and *in vitro* experiments

#### 5.2.5.1 Dry matter content (DM) in duodenal and ileal sections

Dry matter content was determined from the difference between sample weights before and after freeze-drying, with the exception of the duodenal contents sampled from the DiDGI®, for which the oven method (105°C, overnight) was used.

#### 5.2.5.2 Proteolysis in gastric and duodenal sections

Determination of the concentration of  $\alpha$ -amino groups, an indicator of proteolysis in the stomach and the duodenum, was carried out using the ninhydrin reaction described by (Moore and Stein, 1954) and (Sarin *et al.*, 1981). This technique was applied to gastric and duodenal samples that had been blocked immediately after they had been taken. The total nitrogen content of each sample was measured (Kjeldahl method) to calculate the “local apparent degree of proteolysis” (LADP) with the following equation, where the density of contents was considered to be 1:

$$LADP (\%) = \frac{AG \text{ in supernatant (mg(N).l}^{-1})}{N_{tot} \text{ in sample (gN.100g}^{-1})} \times 10^{-2} \quad (2)$$

#### 5.2.5.3 Molecular weight determination by size-exclusion HPLC (HPSEC) of gastric samples

Gastric samples taken from mini-pigs and from the DiDGI® prior to ingestion and at 20, 60, 90, and 180 min post-ingestion were analysed with respect to the molecular weight distribution of peptides. Samples were centrifuged (5 000 G, 10 min, 20°C), diluted 1:10 in an trifluoroacetic acid (TFA):acetonitrile:water buffer (0.01:2:10 v:v:v), and then filtered through a 0.40- $\mu$ m pore-size filter. Peptides were separated according to their molecular weight with a column (Shodex Asahipak GF-310HQ, Interchime, France) that was connected to a Waters e2695 separation module equipped with

a Waters 2998 UV/Visible detector with diode array (Waters Inc., USA). Elution was performed under an isocratic 0.2 ml.min<sup>-1</sup> flow of TFA:acetonitrile:water buffer at 37°C. Detection was performed at 214 nm. Sample injection volume was 30 µl. The column was calibrated by injecting 30 µl of five markers of known molecular weight, each at a concentration of 2 mg.ml<sup>-1</sup>: blue dextran (2000 kDa) and carbonic anhydrase (30 kDa), cytochrome C (12.384 kDa), vitamin B12 (1.855 kDa), and tripeptide GlyGlyGly (189 Da). The resulting calibration curve (log molecular weight vs retention time) enabled us to distinguish among 13 ranges of molecular weight: >35 kDa, 35–18 kDa, 18–10 kDa, 10–6 kDa, 6–3 kDa, 3–2.5 kDa, 2.5–2 kDa, 2–1.5 kDa, 1.5–1 kDa, 1–0.8 kDa, 800–500 Da, 500–204 Da, < 204 Da.

#### 5.2.5.4 Protein digestibility

Using the data obtained from the mini-pigs fitted with ileal cannulas, the apparent and true ileal digestibility of crude protein and amino acids were determined and published in (Reynaud, 2020, cf chapitre 4). These reported values were used here to study the correlation between *in vivo*- and DiDGI<sup>®</sup>-generated data.

Total nitrogen content (elemental analyser, vario ISOTOPE cube, Elementar) of both the simulated–absorbed and simulated–non-absorbed fractions of the DiDGI<sup>®</sup> ileal content were determined.

Estimates of digestibility obtained from the DiDGI<sup>®</sup> system are hence expressed as the ratio  $X_{\text{simulated absorbed fraction}} / (X_{\text{simulated absorbed fraction}} + X_{\text{simulated non-absorbed fraction}})$

#### 5.2.6 Data & statistical analysis

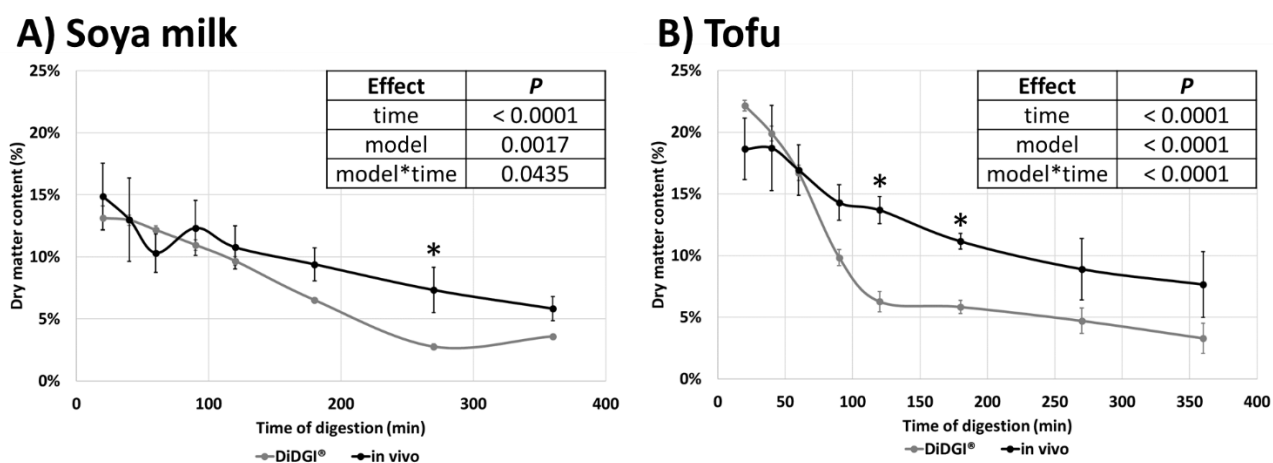
Data are disclosed as mean ± SEM (standard error of the mean) or as mean ± SD (standard deviation). Repeated measures ANOVA was performed on dry matter content (DM), local apparent degree of proteolysis (LADP), and molecular weight distributions to detect significant differences; the model included the fixed effects of method, food, time, method\*time, food\*time, and food\*method\*time. A post-hoc LSMEANS test was performed when interactions were significant. Differences were considered statistically significant if the p-values were less than 0.05. All statistical analyses were performed using SAS (SAS University Edition, Release 3.71; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Modelling of marker data was performed with XLSTAT (XLSTAT Quality 18.07, Addinsoft, France). Gastric data were analysed with a principal component analysis (PCA) carried out in XLSTAT.



## 5.3 Results

### 5.3.1 Effect of the model on dry matter content

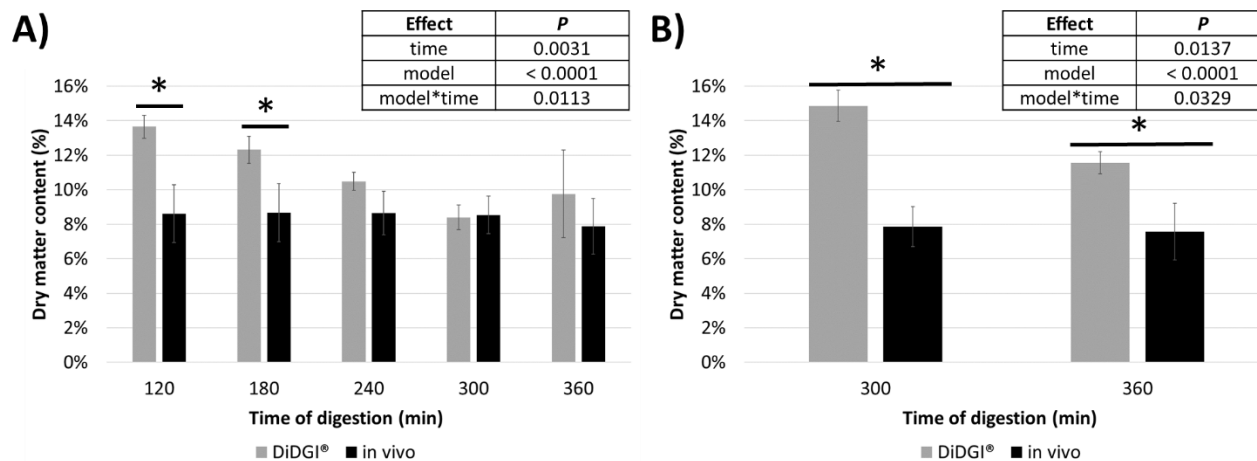
Dry matter content (DM) in the duodenum compartment of the DiDGI<sup>®</sup> was compared to the DM of samples taken from mini-pigs fitted with a duodenal cannula. Data are presented in Figure 59. In both the *in vivo* and *in vitro* models, DM values globally decreased after the intake of soya milk and tofu (from 13% to 5% and from 20% to 5%, respectively). For both soya milk and tofu, there was a significant model\*time interaction: for the digestion of soya milk, DM values were significantly different between *in vivo* and *in vitro* models at 270 min, and the same was true for the digestion of tofu at 120 and 180 min. Beside this, no significant differences were detected for DM values throughout the duodenal digestion. Generally speaking, observations made from the different models at a given timepoint were consistent with each other, with the exception of the instances noted above.



**Figure 59:** Comparison of duodenal dry matter content in the DiDGI<sup>®</sup> (MEAN  $\pm$  SD; n = 3) and in mini-pigs (MEAN  $\pm$  SEM; n = 6) after ingestion of (A) the soya milk meal and (B) the tofu meal (MEAN  $\pm$  SEM; n = 6). Repeated measures ANOVA was performed with model, time, and model\*time as fixed effects. Significant interactions were found for both the soya milk meal ( $P = 0.0435$ ) and the tofu meal ( $P < 0.0001$ ); a post-hoc LSMEANS test was therefore performed. Stars above curves indicate a significant difference between models at the given sampling time ( $P < 0.05$ ).

Next, we examined the kinetic evolution of DM values between samples taken from the ileal group of mini-pigs and those taken from the output of the DiDGI<sup>®</sup> (Figure 60). Because of the way the DiDGI<sup>®</sup> was set up, the tofu chyme arrived in the last compartment more slowly than the soya milk chyme, and the tofu-derived ileal content was collectable only starting from 300 min. A significant model\*time interaction was detected for both soya milk ( $P = 0.0113$ ) and tofu ( $P = 0.0329$ ). The DM values of *in vivo* ileal samples were always lower than their corresponding *in vitro* ileal samples from the DiDGI<sup>®</sup>, but for the soya milk meal, these differences were statistically

significant only for the samples taken at 120 min ( $P = 0.0006$ ) and 180 min ( $P = 0.0282$ ). For the tofu meal, instead, *in vitro* DM was significantly higher than *in vivo* DM for both sampling times available (300 min and 360 min,  $P < 0.0028$ ). This result was expected, as *in vivo* digestion also includes absorption by the small intestine, which was not simulated during the *in vitro* dynamic digestion.



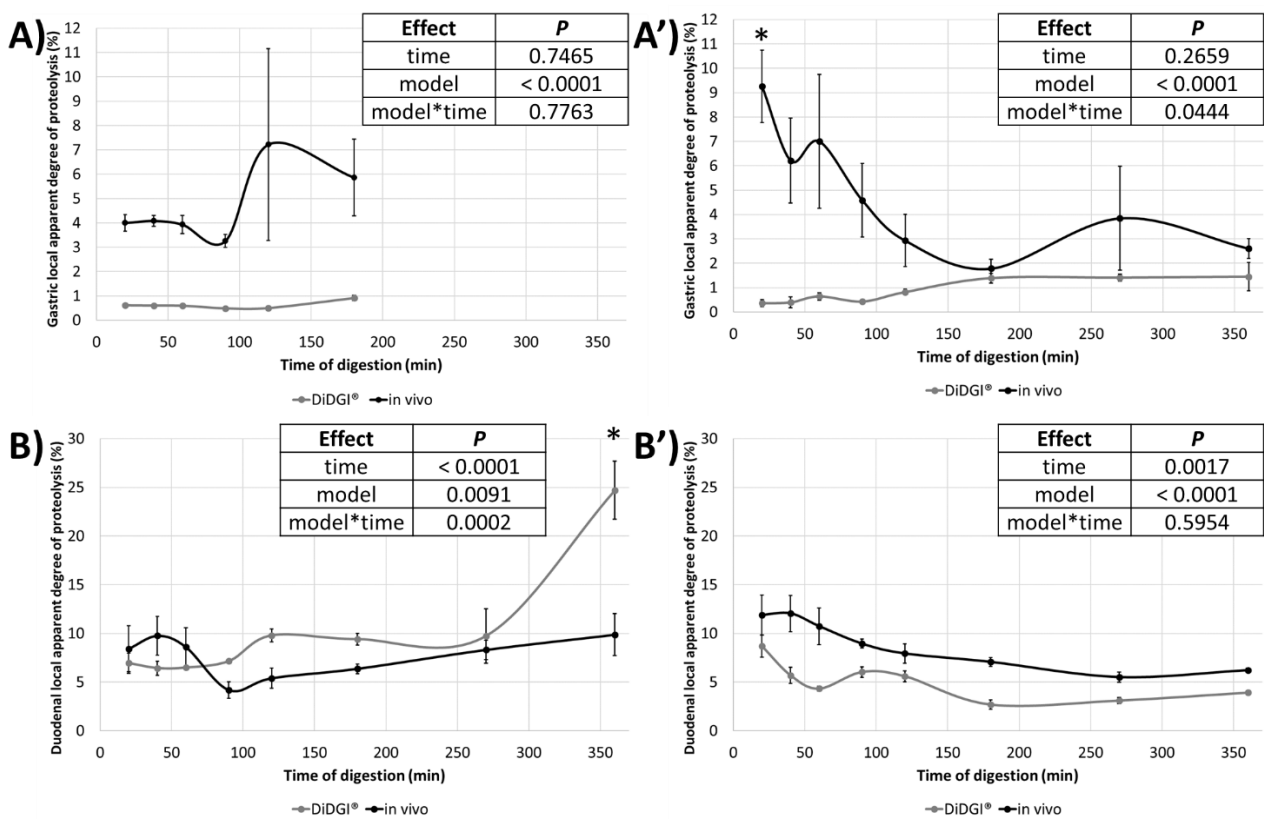
**Figure 60:** Comparison of ileal dry matter content in DiDGI® (MEAN  $\pm$  SD; n = 3) and in mini-pigs (MEAN  $\pm$  SD; n = 6) after ingestion of (A) the soya milk meal and (B) the tofu meal. Repeated measures ANOVA was performed, with model, time, and model\*time as fixed effects. Significant interactions were found for the soya milk meal ( $P = 0.0113$ ) and the tofu meal ( $P = 0.0329$ ); a post-hoc LSMEANS test was therefore performed. Stars above bars indicate significant differences between models at each sampling time ( $P < 0.05$ ).

### 5.3.2 Effect of the model on local apparent degree of proteolysis

In the gastric phase (Figure 61A & A'), the local apparent degree of proteolysis (LADP) was similar between *in vivo* and *in vitro* models for both meals; the only exception to this was found with the tofu meal sampled at 20 min, for which LADP differed *in vitro* and *in vivo* ( $P = 0.0031$ ). Moreover, the effect of time was not significant, meaning that the kinetics were constant and LADP did not vary significantly as a function of time.

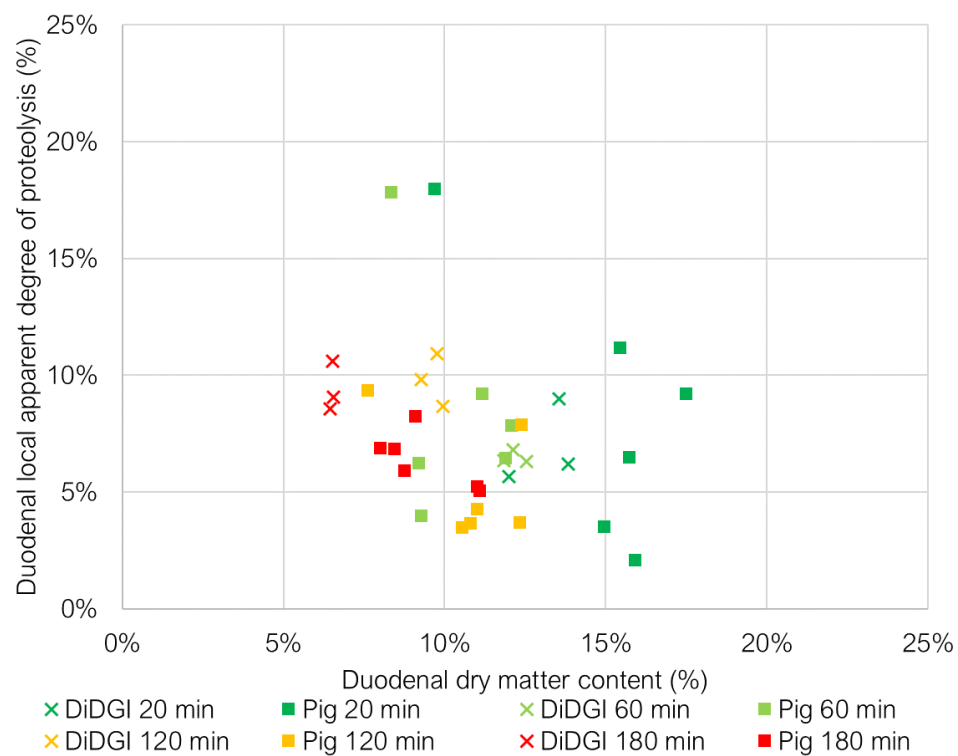
At the duodenal step of the soya milk digestion (Figure 61B), significantly different LADP values were obtained from the DiDGI® and from mini-pigs only at the end of the assay, at 360 min ( $P < 0.0001$ ). For the tofu meal (Figure 61B'), instead, the kinetics of the evolution of LADP were unchanged between *in vivo* and *in vitro* models (interaction effect:  $P = 0.5954$ ). The local apparent degree of proteolysis in the duodenum was determined for each *in vitro* replicate and animal/food combination between 20 and 180 min of digestion, and these values were plotted as a function of the dry matter content (DM) of the samples (Figure 63). There was significantly more variation in duodenal DM (interaction food\*time,  $P < 0.0001$ ) with the tofu meal (5–23%) than with the soya milk meal (6–18%). For this reason, plotted values associated with the tofu meal were highly dispersed on the graphic, with a particularly visible distinction between DiDGI® replicates and the

corresponding animal trials. Interestingly, at 20 and 60 min, tofu DM was similar between *in vivo* and *in vitro* assays, whereas LADP values obtained from the DiDGI® were lower than those from mini-pigs. At 120 and 180 min, the DiDGI® generated a tofu chyme that was less hydrolysed, and with a lower DM, than that found in mini-pig samples. For digestions of the soya milk meal, the largest differences between *in vivo* and *in vitro* tests were found at 20 and 180 min, at which time DM values were lower in the DiDGI® than in the mini-pig duodenum. At the end of digestion, the soya milk meal seemed to be more hydrolysed in the DiDGI® (8–11%) than *in vivo* (5–8%). Overall, the two meals followed two different patterns of digestion in the duodenum (interaction food\*time of LADP:  $P < 0.0001$ , and of DM:  $P < 0.0001$ ): for soya milk, LADP increased as digestion progressed and the DM decreased, while for tofu, LADP decreased with DM as digestion progressed.

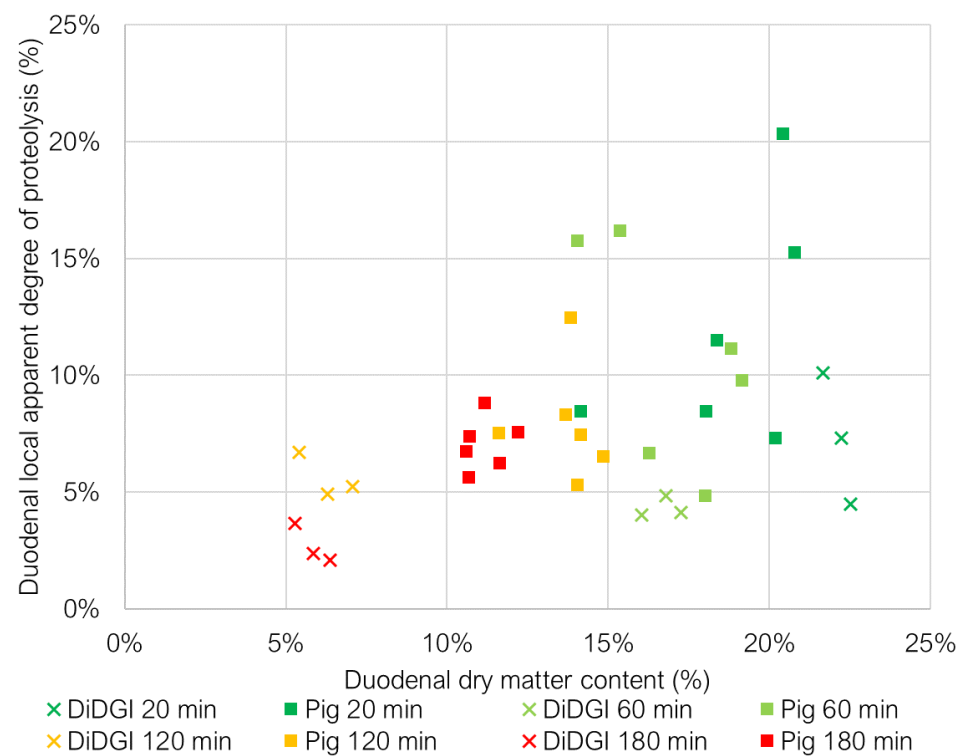


**Figure 61:** Kinetics of proteolysis in the stomach and the duodenum, as measured by the evolution of the local apparent degree of proteolysis (LADP) in gastric (A: soya milk meal and A': tofu meal) and duodenal samples (B: soya milk and B': tofu). Data are MEAN  $\pm$  SEM; n = 4 animals in gastric assays; n = 6 animals in duodenal assays. Repeated measures ANOVA was performed, with model, time, and model\*time as fixed effects. Significant interactions were found for gastric LADP following tofu input ( $P = 0.0444$ ) and duodenal LADP following soya milk input ( $P = 0.0002$ ); a post-hoc LSMEANS test was therefore performed. Stars above curves indicate a significant difference between models at the given sampling time ( $P < 0.05$ ).

### A) Soya milk



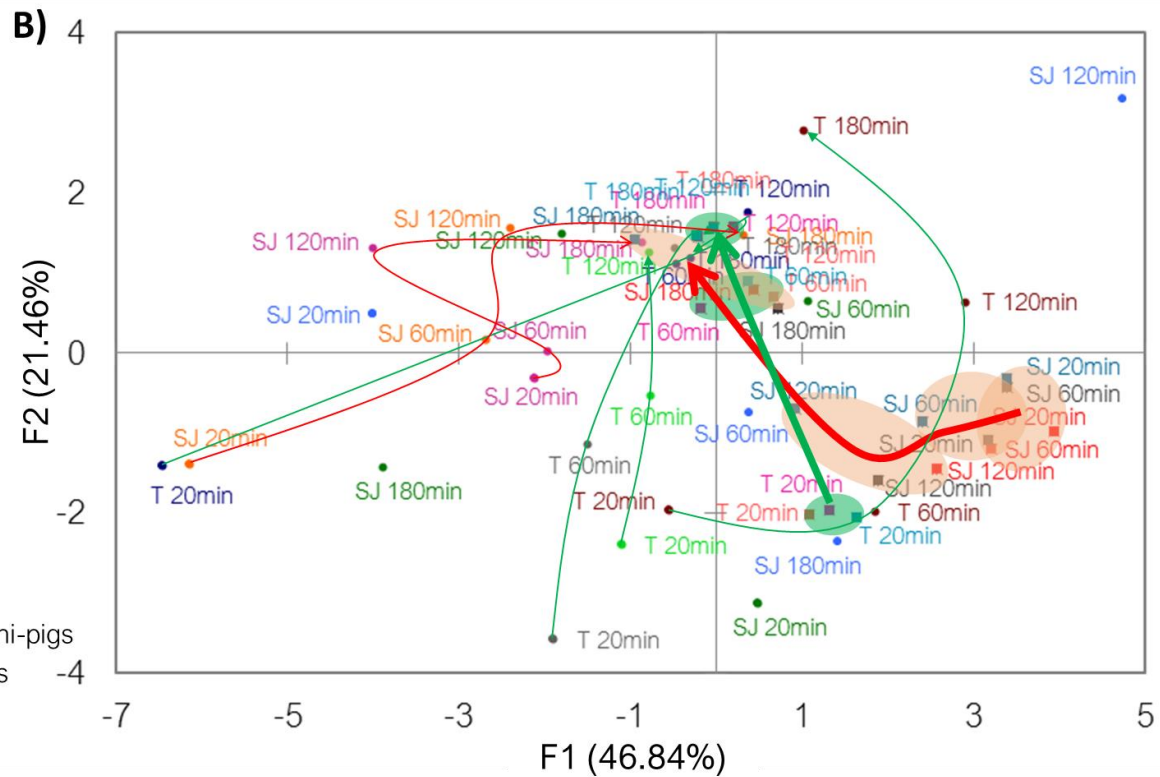
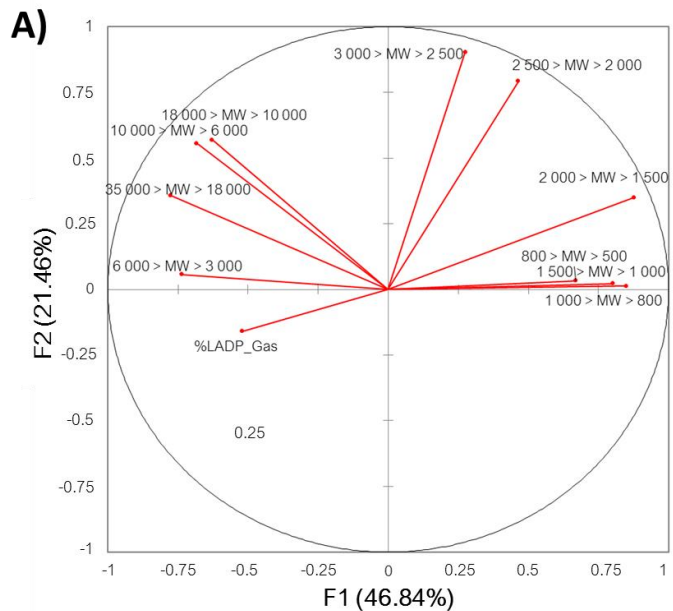
### B) Tofu



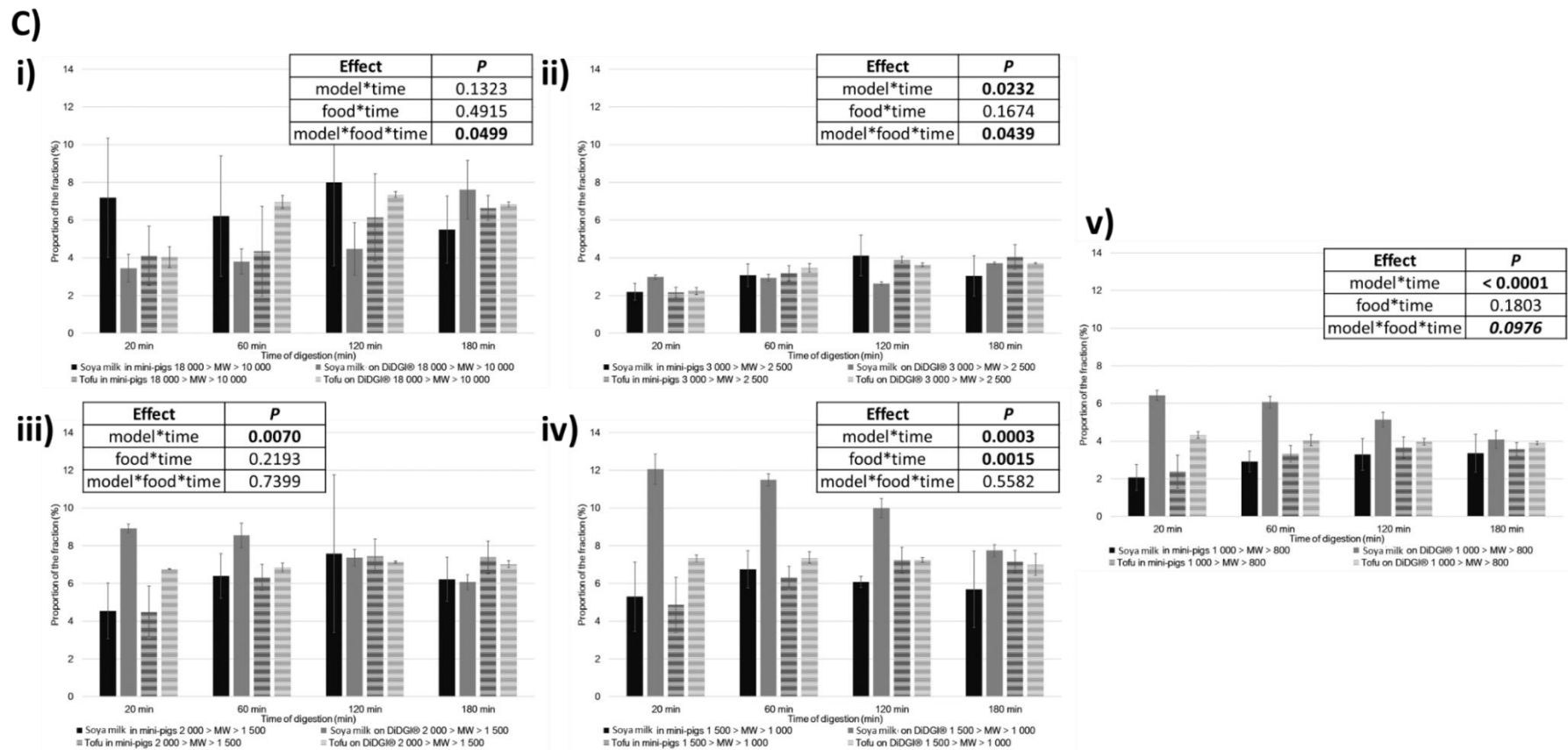
**Figure 62:** Values for local apparent degree of proteolysis in the duodenum were plotted against duodenal dry matter content following ingestion of A) the soya milk meal or B) the tofu meal. DiDGI® data (3 repetitions) are represented by crosses and mini-pig data (6 animals) are represented by solid squares. Colours indicate the time elapsed since ingestion (dark green: 20 min; light green: 60 min; orange: 120 min; red: 180 min).

**Table 17:** Statistical significance of results from repeated analysis of variance for proportions of gastric peptides (grouped by molecular weight range), duodenal and ileal dry matter content, and gastric and duodenal local apparent degree of proteolysis. The effects tested were time (20, 60, 120, 180 min), model (DiDGI<sup>®</sup>, mini-pig), and food (soya milk meal, tofu meal), as well as their interactions. P-values in bold indicate that the level of significance was reached ( $P < 0.05$ ). P-values in bold and italics indicate when a statistical trend was detected ( $0.10 > P > 0.05$ ).

Effect	time	model	model*time	food	food*time	model*food	model*food*time
> 35 kDa	0.8297	0.2090	0.2518	<b>0.0230</b>	0.3308	0.4112	0.3332
18 – 35 kDa	0.1674	<b>0.0354</b>	<i>0.0725</i>	0.3887	0.1511	<b>0.0251</b>	0.4927
10 – 18 kDa	<b>0.0194</b>	0.6028	0.1323	0.9710	0.4915	<b>0.0347</b>	<b>0.0499</b>
6 – 10 kDa	<b>0.0113</b>	0.7711	<i>0.0984</i>	<i>0.0540</i>	0.3943	<i>0.0634</i>	0.3251
3 – 6 kDa	0.6770	< <b>0.0001</b>	0.2696	0.1294	0.5941	0.4446	0.7978
2.5 – 3 kDa	< <b>0.0001</b>	0.5535	<b>0.0232</b>	0.1160	0.1674	0.9487	<b>0.0439</b>
2 – 2.5 kDa	< <b>0.0001</b>	0.6793	<i>0.0546</i>	0.3378	0.1096	0.6375	0.3944
1.5 – 2 kDa	0.1803	<b>0.0076</b>	<b>0.0070</b>	0.4643	0.2193	0.1887	0.7399
1 – 1.5 kDa	<i>0.0536</i>	< <b>0.0001</b>	<b>0.0003</b>	< <b>0.0001</b>	<b>0.0015</b>	< <b>0.0001</b>	0.5582
0.8 – 1 kDa	0.3391	< <b>0.0001</b>	< <b>0.0001</b>	<b>0.0012</b>	0.1803	< <b>0.0001</b>	<i>0.0976</i>
500 – 800 Da	0.3753	0.1819	0.1219	<i>0.0691</i>	0.3752	0.9469	0.8144
204 – 500 Da	<b>0.0161</b>	0.1195	0.4799	<b>0.0096</b>	0.7964	0.5312	0.3843
< 204 Da	<b>0.0002</b>	0.1188	0.2413	0.3664	<b>0.0263</b>	<i>0.0941</i>	0.2478
DM Duo	< <b>0.0001</b>	< <b>0.0001</b>	< <b>0.0001</b>	< <b>0.0001</b>	< <b>0.0001</b>	0.1254	<b>0.0006</b>
DM Ileum	0.1087	< <b>0.0001</b>	0.5748	<b>0.0022</b>	<b>0.0228</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0087</b>
LADP Gas	0.8450	< <b>0.0001</b>	0.6747	0.5951	0.1896	0.6986	<i>0.0945</i>
LADP Duo	<b>0.0007</b>	0.2730	< <b>0.0001</b>	<b>0.0015</b>	< <b>0.0001</b>	< <b>0.0001</b>	<i>0.0523</i>



- Gastric breakdown pathways of the soya milk meal in mini-pigs
- Gastric breakdown pathways of the tofu meal in mini-pigs
- Gastric breakdown pathways of the soya milk meal in the DiDGI®
- Gastric breakdown pathways of the tofu meal in the DiDGI®



**Figure 63:** Results from animal/in vitro trials visualised using a Principal Component Analysis (PCA) of the molecular weight distributions of peptide fractions and the local apparent degree of proteolysis in the stomach. A) depicts the circle of correlation and contribution of each variable to the x- and y-axes. B) is a graphical representation of digestion of the soya milk meal (dotted arrows) or the tofu meal (solid arrows) in the stomach of a mini-pig (blue arrows) or in the first compartment of the DiDGI® (green arrows). C) highlights the evolution of a selection of peptide fractions determined by molecular weight (range): i) 10–18 kDa; ii) 2.5–3 kDa; iii) 1.5–2 kDa; iv) 1–1.5 kDa; v) 0.8–1 kDa. Standard errors of the mean are shown for each bar. Statistical results are shown for the interactions model\*time, food\*time, and model\*food\*time. n = 4 animals and n = 3 in vitro assays.

### 5.3.3 Effect of the model on the molecular weight distribution of gastric peptides

Table 17 presents the results of statistical analyses that examined the relative proportions of gastric peptides, as determined by their molecular weight, in the outputs of the *in vivo* and *in vitro* systems. In particular, proportions of three fractions—1.5–2 kDa ( $P = 0.0070$ ), 1–1.5 kDa ( $P = 0.0003$ ), and 0.8–1 kDa ( $P < 0.0001$ )—evolved differently over time in the two models (Figure 63C iii, iv, and v). In each case, the DiDGI<sup>®</sup> yielded decreasing or more-stable values than mini-pigs. In analysing the fractions, we also noted the following interesting results:

- In the 10–18 kDa fraction (Figure 63Ci), there were significant effects of the interactions model\*food ( $P = 0.0347$ ) and model\*food\*time ( $P = 0.0499$ ), but not of the interactions food\*time ( $P = 0.4915$ ) and model\*time ( $P = 0.1323$ ). Indeed, the proportion of this fraction increased over time in the DiDGI<sup>®</sup> but remained constant in the mini-pig model.
- In the 2.5–3 kDa fraction (Figure 63C ii), there were significant effects of the interactions model\*time ( $P = 0.0232$ ) and model\*food\*time ( $P = 0.0439$ ), but not the interactions food\*time ( $P = 0.1674$ ) and model\*food ( $P = 0.9487$ ). Proportions of the 2.5–3 kDa fraction evolved differently between models, and the effect of the model differed between the tofu meal and the soya milk meal.
- In the 1–1.5 kDa fraction (Figure 63C iv), we detected the significant interactions model\*time ( $P = 0.0003$ ) and food\*time ( $P = 0.0015$ ), but the third-order interaction, model\*food\*time, was not significant ( $P = 0.5582$ ). A compensation phenomenon occurred, in which different kinetics were observed between the tofu and the soya milk meals in the DiDGI<sup>®</sup>, but not in mini-pigs. Furthermore, until 120 min, higher proportions of this fraction were detected in the soya milk meal in mini-pigs than in the DiDGI<sup>®</sup> or from the tofu meal in either model.

Figure 63 is a graphical representation of a principal component analysis (PCA) of the proportions of gastric peptides grouped by molecular weight. Only fractions for which at least one significant interaction was detected were included; thus, data for the  $> 35$  kDa, 500–800 Da, and 204–500 Da fractions were removed from the PCA. The x-axis, labelled F1, contributed 46.8% of the observed variability. It was positively correlated with the proportions of low-molecular-weight fractions ( $< 2.5$  kDa) and negatively correlated with the proportions of higher-molecular-weight fractions ( $> 3$  kDa) (Figure 63A). The y-axis, labelled F2, contributed 21.5% of the observed variability and was positively correlated with the proportion of the 2.5–3 kDa fraction (Figure 63A). In Figure 63B, each sample is plotted on this plane in order to observe the evolution of the *in vivo* or *in vitro* digestions between 20 and 180 min. The first observation to note is that the variability among animals was higher than the variability between *in vitro* assays. Indeed, for each food and at each time, the DiDGI<sup>®</sup> replicates (represented by the pale red circles (soya milk meal) or pale green circles (tofu meal) in



Figure 63B) group together, whereas the pathway of digestion in each pig was quite distinct (indicated by green arrows). As gastric digestion progressed, the proportion of 2–3 kDa peptides increased globally, so that most assays reached the same area on the factorial plane at 180 min. Exceptions were observed in two animals who ingested the soya milk meal, indicated by thin red arrows in Figure 63B. For the tofu meal, a high degree of divergence was observed at 20 min, but starting from 120 min, proteolysis patterns from most animals were similar to each other. In the *in vitro* digestion of the tofu and the soya milk meals, the relative proportion of the 2–3 kDa fraction appeared to increase more slowly for the soya milk meal than for the tofu meal.

#### 5.3.4 Effect of the model on ileal digestibility

Table 18 shows the *in vivo* and *in vitro* digestibility of the tofu and soya milk meals. For the *in vitro* calculations, the difference between endogenous and dietary nitrogen was not considered. Moreover, because no significant difference was observed between the two meals with respect to the true ileal digestibility *in vivo* (soya milk meal:  $99.4 \pm 2.4\%$ ; tofu meal:  $101.8 \pm 8.9\%$ ), only the *in vivo* apparent ileal digestibility was compared with the *in vitro* digestibility of nitrogen. Although a significant effect was detected for food ( $P = 0.0365$ ), there was no effect of model ( $P = 0.4207$ ) or of the model\*food interaction ( $P = 0.5805$ ).

**Table 18:** Comparison of digestibility values obtained *in vivo* and *in vitro* for meals based on tofu and on soya milk. Values indicate percentage of crude protein (%) (MEAN  $\pm$  SEM). A two-way ANOVA was performed on the *in vitro* and *in vivo* apparent digestibilities. P-values of effects were: model:  $P = 0.4207$ ; food:  $P = 0.0365$ ; model\*food:  $P = 0.5805$ . Different letters (a and b) indicate significant differences ( $P < 0.05$ ).

Model	Type of digestibility	Soya Milk	Tofu
<i>in vivo</i>	Apparent	$71.3 \pm 2.5\%a$	$56.5 \pm 7.8\%b$
	True	$99.4 \pm 2.4\%$	$101.8 \pm 8.9\%$
<i>in vitro</i>	Centrifugation	$72.7 \pm 1.4\%a$	$63.7 \pm 3.5\%b$

Indeed, when we performed a simple centrifugation of ileum content from the DiDGI<sup>®</sup>, and considered the supernatant as absorbed and the pellet as undigested, we obtained the same range of values for nitrogen digestibility as those obtained *in vivo*.

The difference in the apparent ileal digestibility of nitrogen measured *in vivo* between the soya milk meal ( $71.3 \pm 2.5\%$ ) and the tofu meal ( $56.5 \pm 7.8\%$ ) was also found using the DiDGI<sup>®</sup> system, with the *in vitro* digestibility of nitrogen from soya milk and tofu equal to  $72.7 \pm 1.4\%$  and  $63.7 \pm 3.5\%$ , respectively.

As the soya milk and the tofu meals were totally digestible when we examined the *in vivo* true ileal digestibility, we expect that the nitrogen measured in the pellet of *in vitro* ileal content likely came from endogenous secretions.

#### 5.4 Discussion

Other studies have compared *in vivo* data from pig experiments with the nitrogen balance resulting from *in vitro* digestions that included a filtration/dialysis step to simulate intestinal absorption (Babinszky *et al.*, 1990; Boisen and Eggum, 1991; Cone and Van Der Poel, 1993; Jaguelin *et al.*, 1994; Boisen and Fernández, 1995; Minekus, 1998; Świąch and Buraczewska, 2001; Pujol and Torrallardona, 2007; Jezierny *et al.*, 2010; Cho and Kim, 2011). There have also been investigations focused on individual amino acids, which have yielded contrasting results depending on the amino acid under consideration (Boisen and Fernández, 1995; Pettersson, Lindberg and Thor, 1996; Rozan *et al.*, 1997; Świąch and Buraczewska, 2001; Pujol and Torrallardona, 2007; Jezierny *et al.*, 2010; Cho and Kim, 2011). In the literature, most of the recent examinations of the correlation between *in vivo* and *in vitro* protein digestion have used milk proteins, which are almost completely digested at the ileum stage (Minekus, 1998). For this reason, efforts have been made to compare the evolution of proteolysis throughout digestion and not only the end results (Egger *et al.*, 2015, 2018; Egger, Ménard, *et al.*, 2017; Sanchón *et al.*, 2018) Here, we aimed to build on these previous works by investigating the condition of proteins throughout the digestive process.

In the ileum, proportions of *in vivo* digestible nitrogen and *in vitro* simulated-absorbed nitrogen were similar, and the difference between the soya milk and tofu meals was conserved from one model to another. Early studies correlating measures of pH drop *in vitro* with the apparent or true fecal digestibility of protein *in vivo* were performed on a large spectrum of foodstuffs, including plant-based foods (Hsu *et al.*, 1977; Pedersen and Eggum, 1981; Wolzak, Bressani and Gomez Brenes, 1981; Pedersen and Eggum, 1983; Eggum, Hansen and Larsen, 1989), but these results were shown to be highly dependent on the individual buffering capacity of a food created by its mineral and protein content (Moughan *et al.*, 1989). Later, Ihekoronye (1986) compared the final degree of hydrolysis *in vitro*, measured with TNBS, with measures of apparent fecal digestibility obtained from rats (Satterlee, Kendrick and Miller, 1977) and in doing so found similar values for textured soya protein (*in vivo*: 83.3%, *in vitro*: 83.7%) and solubilised soya flour (*in vivo*: 78.9%, *in vitro*: 80.0%). Here, instead, the apparent digestibilities of our two soya-based food products were markedly lower than those previously published values: 10 points lower for soya milk, 20 points lower for tofu. Such a difference could originate from numerous factors, such as differences between the models used or in the food items studied.

In the duodenum, differences in DM kinetics might have arisen from different sources, such as inappropriate patterns of gastric emptying and/or dilution of the chyme in endogenous secretions (basal and postprandial, gastric and duodenal). *In vivo*, we expected a higher amount of endogenous secretion because of the contributions of mucus and hormone secretions, as well as cell desquamation, that were not considered in *in vitro* assays. The differences observed in LADP may have been due in part to variations in the quantity of digestive enzymes secreted (pepsin and pancreatin) and the dynamic of bolus transfer from one compartment to another. The most important factor, though, may have been changes in the local ratio of protease to protein. We had expected that the concentration of endogenous nitrogen compounds would be higher in the mini-pig duodenum than in the second compartment of the DiDGI; however, no significant difference was observed between models with respect to the total nitrogen content of gastric samples (0.1–0.7 gN.100g<sup>-1</sup>) or duodenal samples (0.1–0.4 gN.100g<sup>-1</sup>). Moreover, in mini-pig experiments, the position of the duodenal cannula was set between the pylorus and the common bile/pancreatic ducts. This meant that, in *in vivo* duodenal samples, pancreatic enzymes were perhaps not even present at their maximal levels.

To our knowledge, only two studies have investigated correlations between an *in vivo* model and a dynamic *in vitro* system by comparing transfers and pH modification through the digestive process. Minekus (1998) examined the delivery and the absorption of dietary nitrogen in the different compartments of the system and compared this with marker data obtained from cannulated animals. In that study, though, protein hydrolysis was investigated only indirectly, by analysing the absorption of nitrogen (Minekus, 1998). Instead, Chiang and colleagues (2008) investigated the gastric digestibility of protein by TCA precipitation *in vivo* and in a dynamic *in vitro* system, and found a strong correlation between the two models ( $r = 0.97$ ;  $P = 0.0001$ ). TCA precipitation is a good first step to evaluate the state of proteins in a mixture, but here we went further by looking at the degree of hydrolysis of proteins and at the distribution of peptides by their molecular weights.

In the stomach, we were unable to precisely track the evolution of the local apparent degree of proteolysis of the tofu meal due to the high inter-individual variability in animals, the low number of mini-pigs involved, and the nature of the sampling scheme. Thus, the main comparisons that we were able to make between the tofu and soya milk meals with respect to gastric digestion were based on the molecular weight distributions of peptides. Here, the interaction food\*time had a significant effect on the proportions of the 1–1.5 kDa ( $P = 0.0015$ ) (Figure 63C iv) and free amino acid fractions (< 204 kDa) ( $P = 0.0263$ ). Moreover, a significant effect of food was detected on the 0.8–1 kDa ( $P = 0.0012$ ) (Figure 63C v) and 204–500 Da ( $P = 0.0096$ ) fractions; *in vivo*, these fractions were more abundant in the soya milk meal than in the tofu meal. As final point of discussion, the tofu left the stomach more rapidly than the soya milk. It is because of the difference regarding the gastric emptying

equations. However, after soya milk intake, gastric content was collectable from the DiDGI® for only 180 min, while *in vivo*, this content was collectable for 450 min. According to the recovered markers, at 180 min most of the soya milk chyme had emptied from the pig stomach, and content sampled after that time originated mostly from endogenous secretions.

## 5.5 Conclusion

In the present study, we elaborated a food-dependent digestion programme for the DiDGI® based on experimental data obtained from mini-pigs. We used this to then investigate the correlation between these two models with respect to the dry matter content in the duodenum and the ileum, the local apparent degree of proteolysis in the stomach and in the duodenum, and the molecular weight distribution of gastric peptides. Globally, no clear correlation was found at the gastric step because of the inter-individual variability of pigs and an inadequate release of pepsin in the DiDGI®. However, at a later stage of digestion, when the stomach was almost emptied, proteolysis patterns were largely consistent between models, especially for the tofu digestion. Differences were found in individual parameters in the duodenal phase, but the global kinetics were consistent from one model to another. Finally, from the ileal phase, we obtained similar values for nitrogen digestibility in both *in vivo* and *in vitro* models.

## **Acknowledgements**

We thank our animal housing manager, Julien Hermet, and our animal housing workers, Philippe Lhoste and Yohan Delorme. We are grateful to Caroline Buffière, Benoît Cohade, Méliissa Vauris and Kevin Liebermann who participate to *in vivo* experiments, to Hervé Guillemin and Thomas Cattenoz for helping to develop food-dependent set-up of the DiDGI<sup>®</sup> dynamic *in vitro* system, and to Lindsay Higgins for correcting the English of the manuscript. Finally, we would like to acknowledge the contribution of Denys Durand, who performed surgery with Didier Rémond.

## **Disclosure**

The authors have no competing interests.

## **Author Contributions**

YR and DR designed the animal experiments. DD, IS, ML, YR, and DR defined the food types. YR and DR performed the *in vivo* experiments. YR and DR analysed the *in vivo* data. YR, DD, IS, DP and ML designed the *in vitro* experiments. YR, DF and AM performed the *in vitro* experiments. AC created the HPSEC set up and performed the assays. YR analysed the *in vitro* data and did the correlation work. YR drafted the manuscript, and DD, and DP helped revise it.

## References

- Adouard, N. *et al.* (2016) 'Survival of cheese-ripening microorganisms in a dynamic simulator of the gastrointestinal tract', *Food Microbiology*, 53, pp. 30–40. doi: 10.1016/j.fm.2015.03.002.
- Babinszky, L. *et al.* (1990) 'An In-Vitro Method for Prediction of the Digestible Crude Protein Content in Pig Feeds', *J. Sci. Food Agric.*, 50, pp. 173–178.
- Bauchart, C. *et al.* (2007) 'Peptides reproducibly released by in vivo digestion of beef meat and trout flesh in pigs', *British Journal of Nutrition*, 98(6), pp. 1187–1195. doi: 10.1017/S0007114507761810.
- Bohn, T. *et al.* (2018) 'Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models?', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), pp. 2239–2261. doi: 10.1080/10408398.2017.1315362.
- Boisen, S. and Eggum, B. O. (1991) 'Critical evaluation of in vitro methods for estimating digestibility in simple-stomach animals', *Nutrition research reviews*, 4(1), pp. 141–162. doi: 10.1079/NRR19910012.
- Boisen, S. and Fernández, J. A. (1995) 'Prediction of the apparent ileal digestibility of protein and amino acids in feedstuffs and feed mixtures for pigs by in vitro analyses', *Animal Feed Science and Technology*, 51(1–2), pp. 29–43. doi: 10.1016/0377-8401(94)00686-4.
- Brodkorb, A. *et al.* (2019) 'INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion', *Nature Protocol*, 14(4), p. 991. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1.
- Cho, J. H. and Kim, I. H. (2011) 'Evaluation of the Apparent Ileal Digestibility (AID) of Protein and Amino Acids in Nursery Diets by In vitro and In vivo Methods', *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 24(7), pp. 1007–1010. doi: 10.5713/ajas.2011.10435.
- Cone, J. W. and Van Der Poel, A. T. F. (1993) 'Prediction of Apparent Ileal Protein Digestibility in Pigs with a Two-step In-vitro Method', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 62(4), pp. 393–400.
- Davies, B. and Morris, T. (1993) 'Physiological Parameters in Laboratory Animals and Humans', *Pharmaceutical Research*, 10(7), pp. 1093–1095.
- Decuypere, J. A., Dendooven, R. M. and Henderickx, H. K. (1986) 'Stomach Emptying of Milk Diets in Pigs. A Mathematical Model Allowing Description and Comparison of the Emptying Pattern', *Archives of Animal Nutrition*, 36(8), pp. 679–696. doi: 10.1080/17450398609425311.
- Egger, L. *et al.* (2015) 'The harmonized INFOGEST in vitro digestion method: From knowledge to action', *Food Research International*. The Authors, 88, pp. 217–225. doi: 10.1016/j.foodres.2015.12.006.
- Egger, L., Ménard, O., *et al.* (2017) 'Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic

in vitro digestion systems with in vivo data', *Food Research International*. Elsevier, 118, pp. 32–39. doi: 10.1016/j.foodres.2017.12.049.

Egger, L., Schlegel, P., *et al.* (2017) 'Physiological comparability of the harmonized INFOGEST in vitro digestion method to in vivo pig digestion', *Food Research International*, 102, pp. 567–574. doi: 10.1016/j.foodres.2017.09.047.

Egger, L. *et al.* (2018) 'Data in Brief Mass spectrometry data of in vitro and in vivo pig digestion of skim milk powder', *Data in Brief*. Elsevier Inc., 21, pp. 911–917. doi: 10.1016/j.dib.2018.09.089.

Eggum, B. O., Hansen, I. and Larsen, T. (1989) 'Protein quality and digestible energy of selected foods determined in balance trials with rats', *Plant Foods for Human Nutrition*, 39, pp. 13–21.

Elashoff, J., Reedy, T. and Meyer, J. (1982) 'Analysis of gastric emptying data', *Gastroenterology*. American Gastroenterological Association, 83(6), pp. 1306–12. doi: 10.1016/S0016-5085(82)80145-5.

European Commission (2009) *Commission Regulation (EC) No 152/2009 of 27 January 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. Annexe III.*

FAO (2013) *Report of an FAO Expert Consultation: Dietary protein quality evaluation in human nutrition.*

Guerra, A. *et al.* (2016) 'Development and Validation of a New Dynamic Computer-Controlled Model of the Human Stomach and Small Intestine', *Biotechnology and Bioengineering*, 113(6), pp. 1325–1335. doi: 10.1002/bit.25890.

Henze, L. J. *et al.* (2018) 'The pig as a preclinical model for predicting oral bioavailability and in vivo performance of pharmaceutical oral dosage forms : a PEARRL review', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71, pp. 581–602. doi: 10.1111/jphp.12912.

Hsu, H. W. *et al.* (1977) 'A Multienzyme Technique for Estimating Protein Digestibility', *Journal of Food Science*, 42(5), pp. 1269–1273. doi: 10.1111/j.1365-2621.1977.tb14476.x.

ISO (2008) *Céréales, produits céréaliers et aliments des animaux - Détermination de la teneur en matières grasses brutes et en matières grasses totales par la méthode d'extraction de Randall Méthode NF ISO 11085.* www.iso.org Geneva, Switzerland.

Jaguelin, Y. *et al.* (1994) 'Assessment of the apparent and true N digestibility in pig for several class of feedstuffs through an in vitro determination', *Publication-European Association for Animal Production*, 80, p. 114.

Jezierny, D. *et al.* (2010) 'In vitro prediction of standardised ileal crude protein and amino acid digestibilities in grain legumes for growing pigs', *Animal*, 4(12), pp. 1987–1996. doi: 10.1017/S1751731110001114.

Mainville, I., Arcand, Y. and Farnworth, E. R. (2005) 'A dynamic model that simulates the human

upper gastrointestinal tract for the study of probiotics', *International Journal of Food Microbiology*, 99(3), pp. 287–296. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020.

Mariotti, F., Tomé, D. and Mirand, P. P. (2008) 'Converting nitrogen into protein - Beyond 6.25 and Jones' factors', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2), pp. 177–184. doi: 10.1080/10408390701279749.

Ménard, O. *et al.* (2014) 'Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion', *Food Chemistry*, 145, pp. 1039–1045. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.036.

Minekus, M. *et al.* (1995) 'A Multicompartmental Dynamic Computer-controlled Model Simulating the Stomach and Small Intestine', *Atla-Alternatives to Laboratory Animals*, 23, pp. 197–209.

Minekus, M. (1998) *Development and Validation of a Dynamic Model of the Gastrointestinal Tract*.

Minekus, M. *et al.* (2014) 'A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus', *Food & Function*, 5(6), pp. 1113–1124. doi: 10.1039/c3fo60702j.

Minekus, M. (2015) 'The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM)', in Verhoeckx, K. *et al.* (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham: Springer International Publishing, pp. 37–46. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4\_5.

Moore, S. and Stein, W. H. (1954) 'A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds.', *J. Biol. Chem.*, 211(2), pp. 907–913.

Moughan, P. J. *et al.* (1989) 'In-vitro Determination of Nitrogen Digestibility and Lysine Availability in Meat and Bone Meals and Comparison with in-vivo Ileal Digestibility Estimates', *J Sci Food Agric*, 47(3), pp. 281–292.

Nunez, P., Bichot, C. H. U. X. and Paris, H. (1998) 'Interests of the "artificial stomach" techniques to study antacid formulations: Comparison with in vivo evaluation', *Fundam Clin Pharmacol*, 12, pp. 573–583.

Pedersen, B. and Eggum, B. O. (1983) 'Prediction of protein digestibility by an in vitro enzymatic pH-stat procedure', *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde*, 49(1–5), pp. 265–277. doi: 10.1111/j.1439-0396.1983.tb00808.x.

Perdersen, B. and Eggum, O. (1981) 'Prediction of protein digestibility by in vitro procedures based on two multi-enzyme systems', *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde*, 45(1–5), pp. 190–200.

Pettersson, A., Lindberg, J. E. and Thor, S. (1996) 'Nutrient digestibility and protein quality of oats differing in chemical composition evaluated in rats and by an in vitro technique', *Animal Feed Science Technology*, 62(2–4), pp. 203–213.



Pujol, S. and Torrallardona, D. (2007) 'Evaluation of in vitro methods to estimate the in vivo nutrient digestibility of barley in pigs', *Livestock science*, 109(1–3), pp. 186–188. doi: 10.1016/j.livsci.2007.01.143.

Reynaud, Y. *et al.* (2020) 'Temporal changes in postprandial intragastric pH: comparing measurement methods, food structure effects, and kinetic modelling', *Food Research International*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.foodres.2019.108784.

Rozan, P. *et al.* (1997) 'In Vivo and in Vitro Digestibility of Soybean, Lupine, and Rapeseed Meal Proteins after Various Technological Processes', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), pp. 1762–1769. doi: 10.1021/jf960723v.

Sanchón, J. *et al.* (2018) 'Protein degradation and peptide release from milk proteins in human jejunum. Comparison with in vitro gastrointestinal simulation', *Food Chemistry*, 239, pp. 486–494. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.134.

Sarin, V. K. *et al.* (1981) 'Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction', *Analytical Biochemistry*, 117(1), pp. 147–157. doi: 10.1016/0003-2697(81)90704-1.

Satterlee, L. D., Kendrick, J. G. and Miller, G. A. (1977) 'Rapid in vitro assays for estimating protein quality [of food]', *Nutrition Reports International*.

Saunders, R. M., Connor, M. A. and Booth, A. N. (1973) 'Measurement of Digestibility of Alfalfa Protein Concentrates by in vivo and in vitro Methods', *The Journal of nutrition*, 103(4), pp. 530–535.

Siddons, R. C. *et al.* (1985) 'Ytterbium acetate as a particulate-phase digesta-flow marker.', *The British journal of nutrition*, 54(2), pp. 509–519. doi: 10.1079/BJN19850136.

Świąch, E. and Buraczewska, L. (2001) 'In vivo and in vitro protein and amino acid digestibility of legume seeds in pig diets', *Journal of Animal and Feed Sciences*, 10(2), pp. 159–162.

Tavano, O. L., Neves, V. A. and da Silva Júnior, S. I. (2016) 'In vitro versus in vivo protein digestibility techniques for calculating PDCAAS (protein digestibility-corrected amino acid score) applied to chickpea fractions', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 89, pp. 756–763. doi: 10.1016/j.foodres.2016.10.005.

Thiex, N. J. *et al.* (2002) 'Determination of crude protein in animal feed, forage, grain, and oilseeds by using block digestion with a copper catalyst and steam distillation into boric acid: Collaborative study', *Journal of AOAC International*, 85(2), pp. 309–317.

Vachon, C. *et al.* (1987) 'Relationship between in vitro digestion of proteins and in vivo assessment of their nutritional quality', *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 27(3), pp. 659–672.

Walther, B. *et al.* (2019) 'GutSelf: Inter-Individual Variability in the Processing of Dietary Compounds by the Human Gastrointestinal Tract', *Molecular nutrition & food research*. doi:

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201900677>.

Wolzak, A., Bressani, R. and Gomez Brenes, R. (1981) 'A comparison of in vivo and in vitro estimates of protein digestibility of native and thermally processed vegetable proteins', *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 31(1), pp. 31–43. doi: 10.1007/BF01093886.

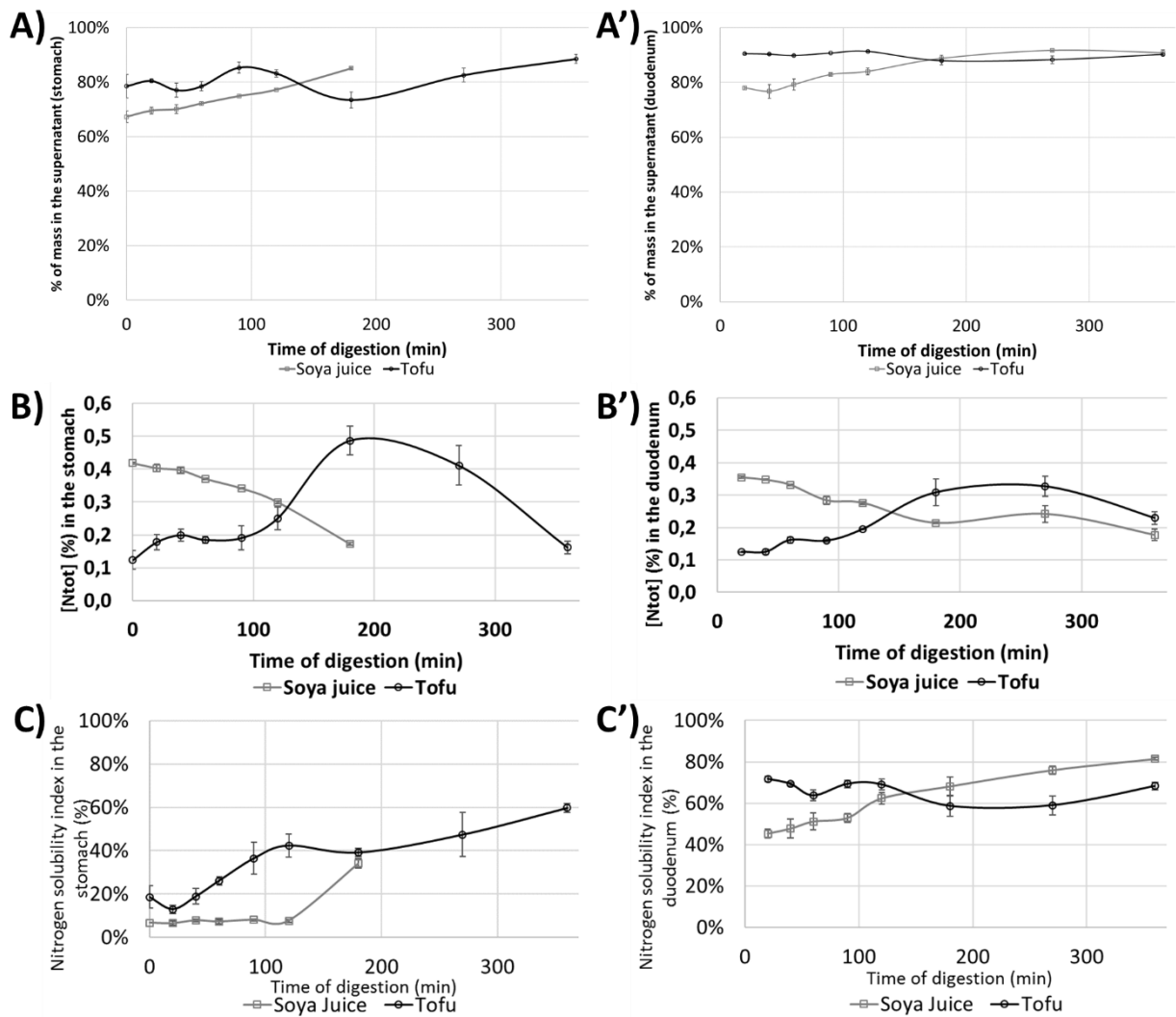
## 5.6 Résultats complémentaires : comparaison des digestions de tofu et de jus de soja sur le DiDGI®

La proportion massique de surnageant, après une centrifugation à 5 000G – 10 min – 20°C, dans l'estomac (Figure 64A), augmente globalement pendant la digestion : de  $67 \pm 2 \%$  à  $85 \pm 0 \%$  entre 0 et 180 min pour le jus de soja ; de  $79 \pm 4 \%$  à  $89 \pm 2 \%$  entre 0 et 360 min pour le tofu. De manière surprenante, pour le tofu, la proportion massique de surnageant baisse à 180 min à  $73 \pm 3 \%$  avant de remonter. Dans le deuxième compartiment du DiDGI® (le duodénum) (Figure 64A'), la proportion massique du surnageant, lors de la digestion du jus de soja, augmente de  $78 \pm 1 \%$  à  $91 \pm 1 \%$ . Pour le tofu, le surnageant représente 90 % de la masse totale quel que soit le temps de digestion. Relier les changements de proportion massique de surnageant à la protéolyse reste tout de même compliqué, le suivi de cette valeur permet de vérifier la répétabilité des essais, d'avoir un indicateur de transit du bol alimentaire et de détecter d'éventuels effets aliment. De manière générale, la dilution par les sécrétions endogènes et la protéolyse entraînent une augmentation plus ou moins importante de la proportion du surnageant au cours de la digestion.

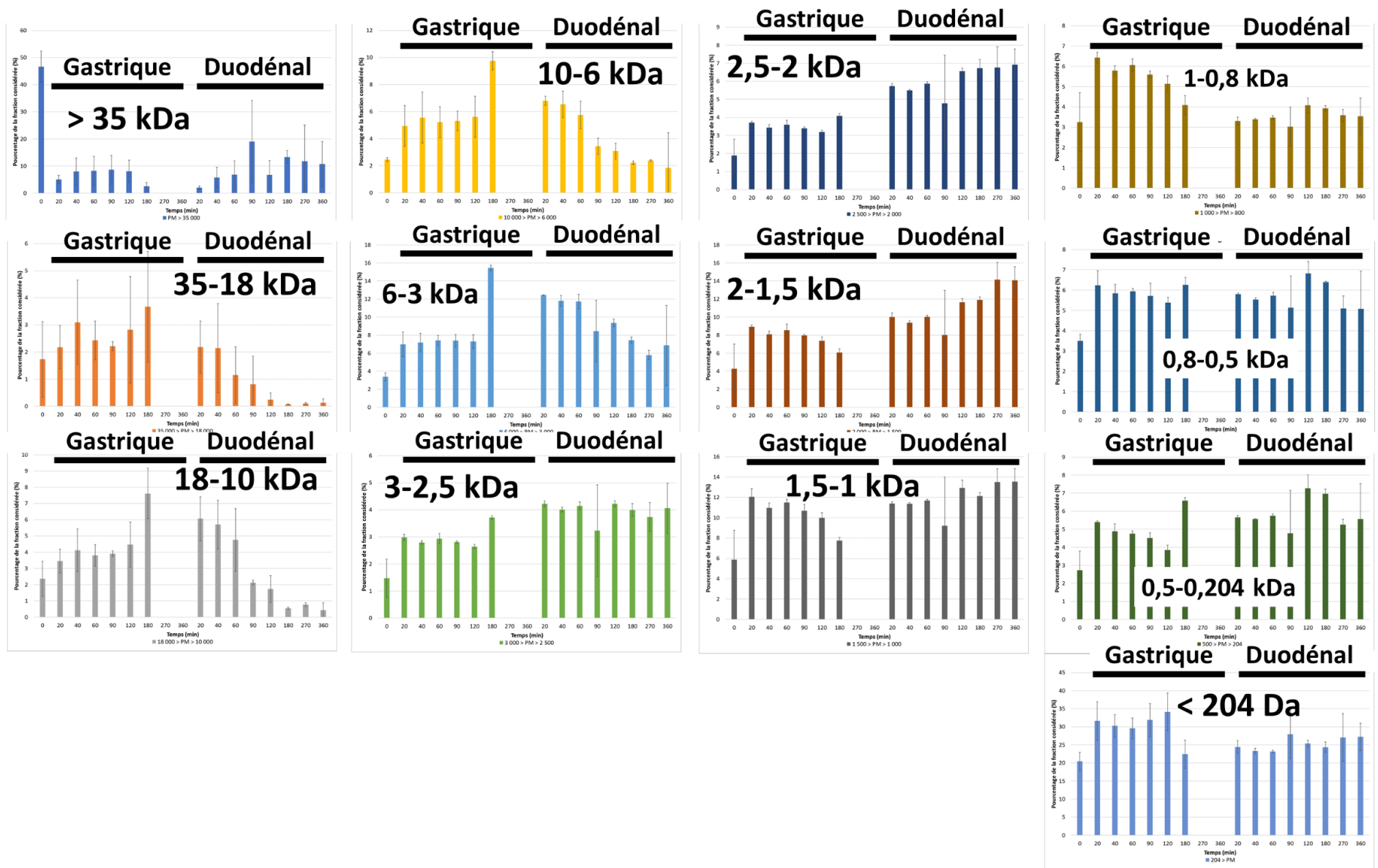
La concentration d'azote total dans les prélèvements est un bon indicateur de transit de l'azote d'un compartiment digestif à un autre. Dans l'estomac (Figure 64B) et avant 180 min, la concentration en azote diminue dans le cas de la digestion du jus de soja mais augmente pour le tofu. Concernant le jus de soja, ce phénomène peut s'expliquer par la vidange plus rapide de la phase azoté par rapport au chyme global. Ce phénomène est accentué par la dilution par les sécrétions endogènes, d'autant plus à partir de 90 min, où les sécrétions d'acides commencent. Pour le tofu, où une augmentation, puis une diminution à partir de 180 min est observée, l'explication est différente. Bien que le prélèvement soit réalisé comme le plus représentatif du contenu total, il reste difficile de prélever les grosses particules de tofu, plus présentes en début de digestion dans l'estomac. Au fur et à mesure de la digestion, la taille des particules se réduisent sous l'effet mécanique des pâles et enzymatique de la pepsine, ce qui rend accessible au prélèvement des quantités toujours plus importantes d'azote. Cela est confirmé en observant l'évolution de l'index de solubilité de l'azote dans l'estomac (Figure 64C), qui passe de  $19 \pm 5 \%$  à  $42 \pm 5 \%$  en 2 heures. Cependant, ce phénomène est à contrebalancer avec le fait que cet « azote plus prélevable » est aussi plus facilement vidangé. Cela pourrait expliquer la phase de stagnation observée entre 20 et 90 min. Ensuite le matériel alimentaire est suffisamment dégradé pour que le prélèvement soit bien représentatif du contenu stomacal. La diminution de la concentration en azote dans l'estomac à partir de 180 min justifie la vidange de l'azote alimentaire dans le duodénum. De manière intéressante, les écart types sont réduits par rapport aux moyennes, ce qui montre que l'hétérogénéité du prélèvement du bol de tofu est répétable. Ce problème de prélèvement non représentatif du chyme global n'a pas lieu dans le duodénum parce que la grille en

sortie de l'estomac ne laisse pas passer les particules de diamètre supérieur à 1,6 mm. Les tendances observées dans l'estomac se retrouvent dans le duodénum (Figure 64B').

Le suivi de l'index de solubilité de l'azote donne une bonne idée de la dégradation des protéines, notamment lorsqu'elles sont insolubles initialement. En effet, l'évolution est nette pour le tofu dans l'estomac, passant de  $19 \pm 5 \%$  à  $42 \pm 5 \%$  d'azote soluble en 2 heures, alors que la proportion d'azote soluble est stable à 7 % pour le jus de soja sur la même durée (Figure 64C). Cela est très surprenant d'avoir une proportion d'azote soluble inférieure pour le jus de soja par rapport au tofu. Les proportions massiques de surnageant et culots sont similaires quel que soit l'aliment (Figure 64A et A'), ce sont les culots de jus de soja qui sont plus chargés en azote que ceux du tofu. Une précipitation du jus de soja les deux premières heures de digestion est peu probable puisque le pH est encore entre 4 et 7 et aucun changement macroscopique n'a été remarqué. En fait, c'est la centrifugation qui culotte les protéines émulsionnées, comme nous pouvons déjà le constater avant toute digestion. A 180 min, dans le cas du jus de soja, la proportion d'azote soluble bondit à  $34 \pm 2 \%$ . Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : le pH qui devient acide depuis peu et qui rend plus active la grande quantité de pepsine qui s'est accumulée ; et/ou la faible quantité de protéines alimentaires restantes dans l'estomac à ce temps, où la majorité de l'azote provenant de la pepsine, qui est soluble. Dans le duodénum (Figure 64C'), l'azote soluble augmente lors de la digestion du jus de soja, de  $45 \pm 2 \%$  à  $81 \pm 1 \%$  ; et oscille dans le cas du tofu, entre  $59 \pm 5 \%$  à  $72 \pm 1 \%$ .



**Figure 64 :** A) et A') représentent l'évolution de la proportion massique du surnageant dans les prélèvements gastriques et duodénaux respectivement. B) et B') montrent l'évolution de la quantité d'azote total dans les prélèvements gastriques et duodénaux respectivement. C) et C') présentent l'évolution de la proportion d'azote soluble dans les prélèvements gastriques et duodénaux respectivement.



**Figure 65 :** Evolution des proportions des poids moléculaires des peptides lors de la digestion *in vitro* dynamique du jus de soja

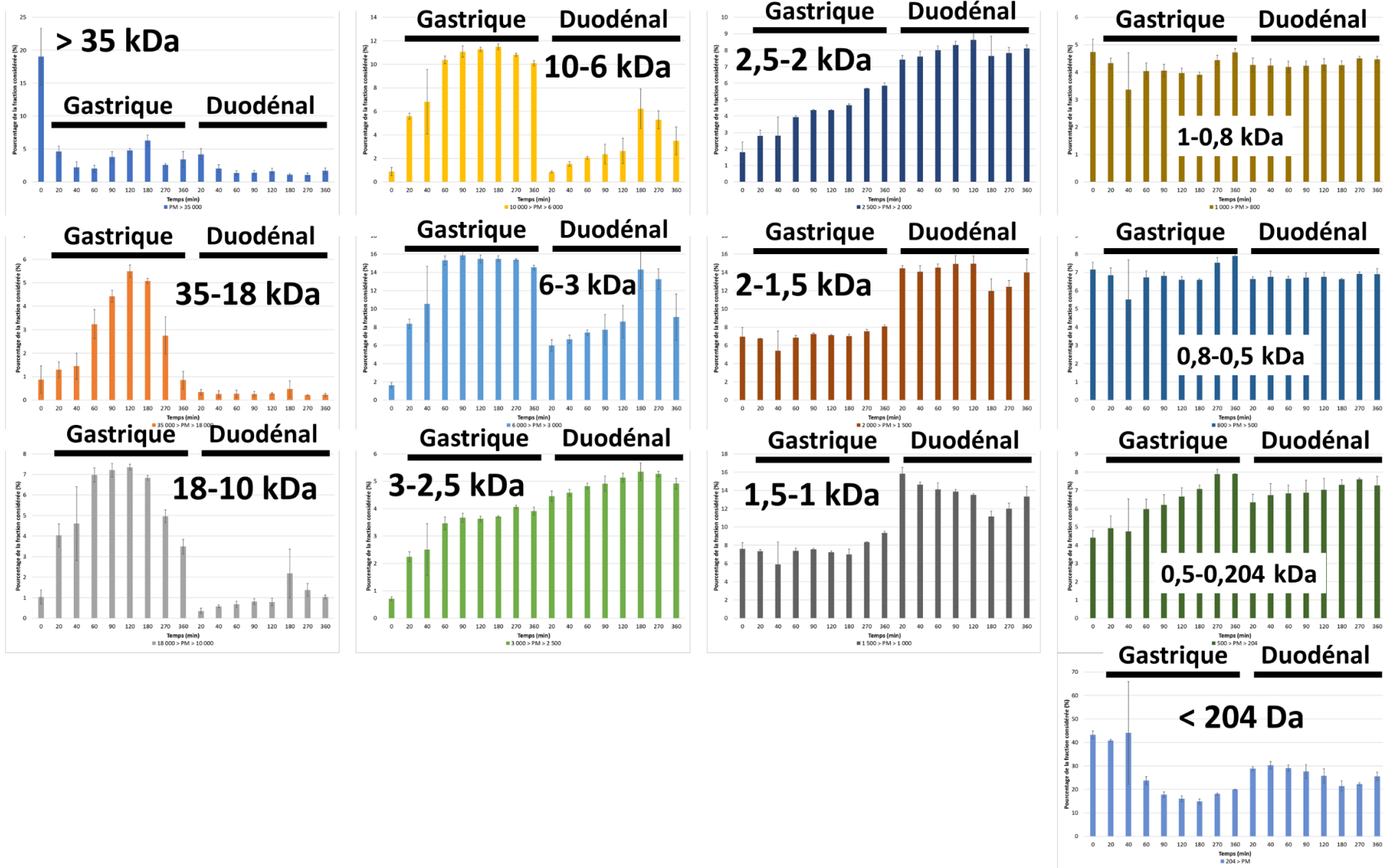


Figure 66 : Evolution des proportions des poids moléculaires des peptides lors de la digestion *in vitro* dynamique du tofu

## Chapitre 6. Discussion générale

Dans le chapitre précédent, nous avons comparé la digestion des aliments à base de soja dans les modèles porcine et *in vitro* dynamique (DiDGI®). Nous proposons d'incorporer à cette analyse les données obtenues avec le modèle *in vitro* statique.

### 6.1 Comparaison des différents modèles de digestion

Le modèle *in vivo* que représente le Porc est un très bon modèle représentatif de la digestion de l'Homme, grâce à la proximité anatomique et physiologique de leur système digestif. Concernant les modèles *in vitro*, leur objectif est de reproduire au mieux et le plus fidèlement possible les conditions de la digestion gastro-intestinale humaine de produits alimentaires. Cependant, les modèles *in vitro*, dits statiques, présentent trois limites principales :

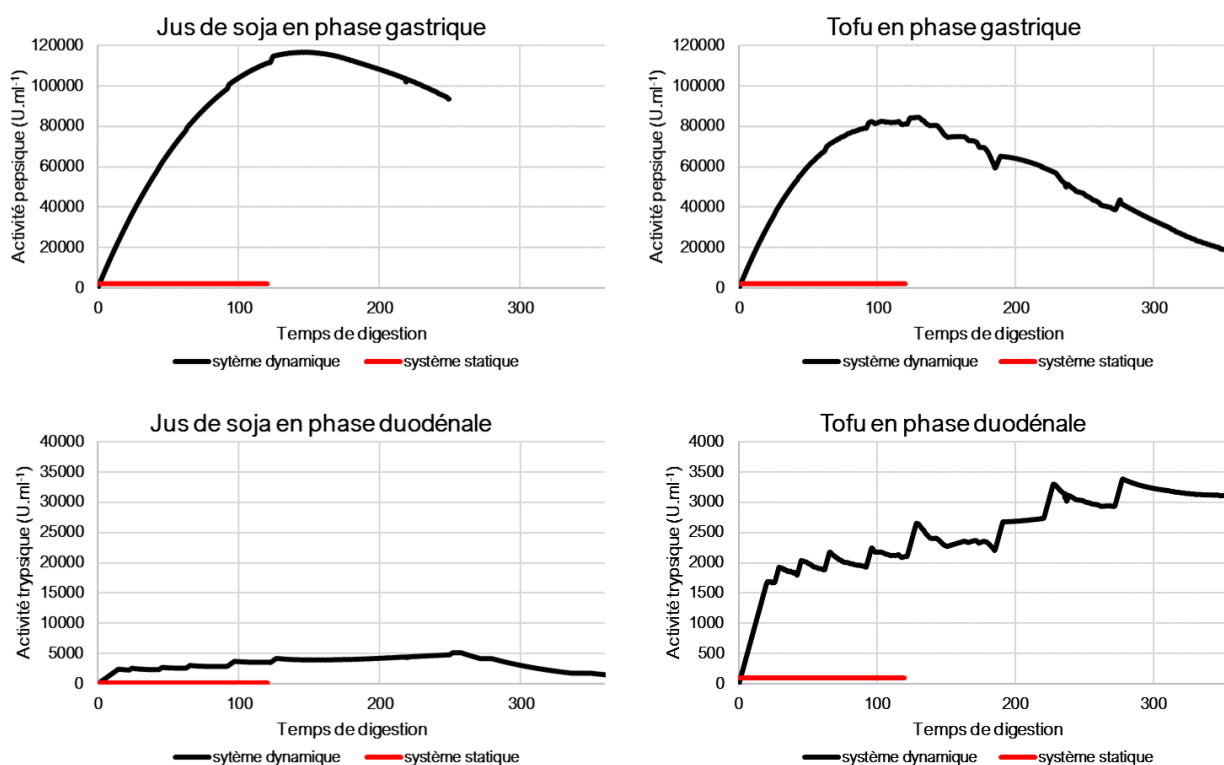
- L'absence des protéases de la bordure en brosse, qui sont d'une importance capitale dans l'hydrolyse ultime des peptides avant leur absorption par les entérocytes, *i.e.* l'hydrolyse des oligopeptides en acides aminés libres, di- ou tripeptides (Picariello *et al.*, 2015).
- La simulation de la digestion intestinale s'effectue dans un seul réacteur, alors que la digestion intestinale a lieu en réalité dans un système tubulaire avec un écoulement plus ou moins continu du bol alimentaire. De plus, l'intestin grêle se divise en trois segments principaux (duodénum, jéjunum et iléon), qui présentent chacun des conditions physico-chimiques particulières (pH, concentrations en protéases, absorption, débits). Enfin, ces conditions varient grandement d'un individu à l'autre (enfant, adulte, personne âgée, sportif de haut niveau, femme enceinte), d'un état physiologique à un autre (phase interprandiale, postprandiale, sommeil).
- Le caractère cinétique de la digestion n'est pas simulé dans les protocoles *in vitro* statiques.

Ce qui nous amène à parler des modèles *in vitro* dynamiques, qui permettent de résoudre les problèmes liés au caractère statique des modèles abordés précédemment. Cependant, suivant les modèles dynamiques, dont la diversité est présentée en Tableau 20, les deux premières limites listées ci-dessus restent plus ou moins valables. Par exemple, le TIM-1 possède 3 compartiments intestinaux (Minekus, 2015), la première version du DiDGI® possède un compartiment intestinal (Ménard *et al.*, 2014), la deuxième version en possède deux (Adouard *et al.*, 2016), voire trois, si le béccher de récupération final est compté.



**Tableau 29 :** Ratios des activités protéasiques totales par rapport à la quantité de protéines alimentaires en phases gastrique et duodénale dans les systèmes *in vitro* statique et dynamique

		Seitan	Emulsion de pois	Tofu	Jus de soja
Ratio $U_{\text{pepsique totale}} : g_{\text{Protéines}}$	Statique (120 min)	29.197	266.667	72.727	266.667
	Dynamique (360 min)	80.000	80.000	80.000	80.000
Ratio $U_{\text{trypsique totale}} : g_{\text{Prot}}$	Statique (120 min)	2.920	26.667	7.273	26.667
	Dynamique (360 min)	4.000	4.000	4.000	4.000



**Figure 67 :** Evolution des concentrations en activités enzymatiques (pepsine dans l'estomac, trypsine dans le duodénum) dans les systèmes *in vitro* statique et dynamique. Les calculs ont été réalisés à partir des quantités d'activité enzymatiques incorporées, où les effets du pH sur les activités enzymatiques ne sont pas pris en compte.

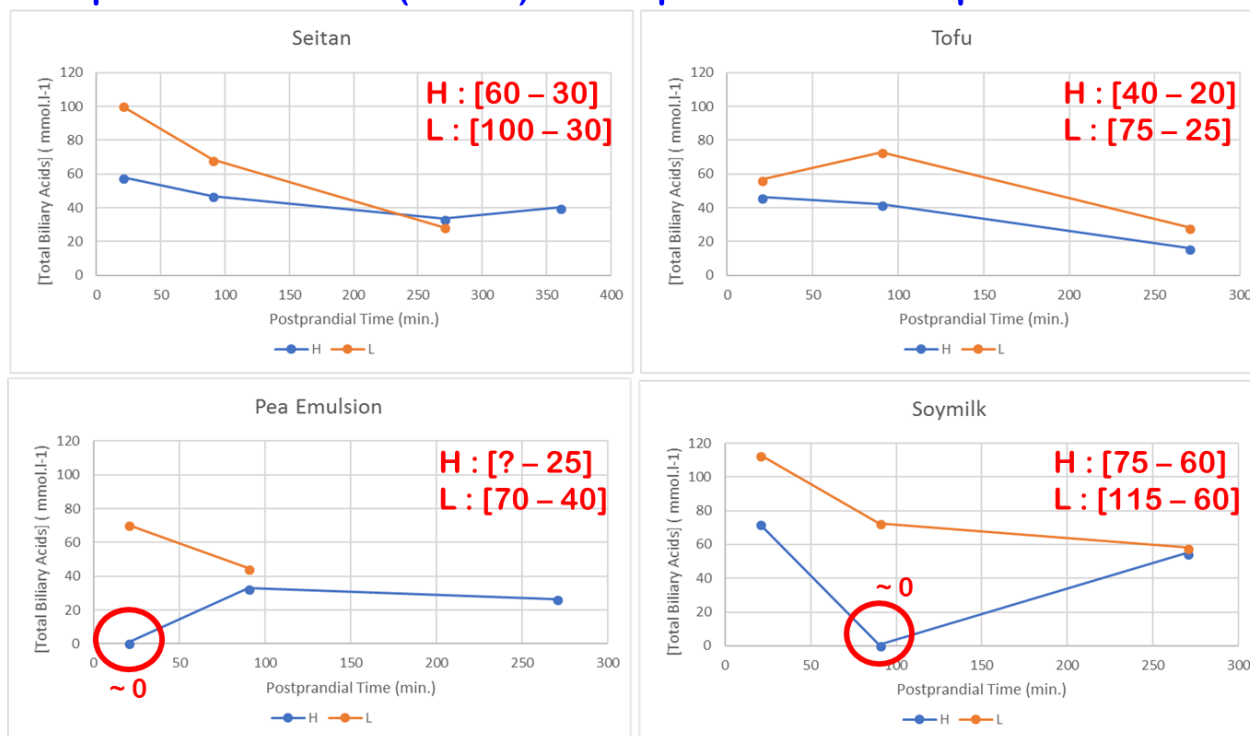
Aux différences près de paramétrage de la digestion exposées dans le Tableau 30, il est possible de comparer les cinétiques de taux d'hydrolyse gastrique et intestinal des aliments à base de soja obtenues suivant les trois modèles étudiés (Figure 69). A notre connaissance, une seule étude s'est appliquée à comparer des données de digestibilités protéique issues de modèles *in vitro* statique, *in vitro* dynamique et *in vivo* porcine, et cela au niveau gastrique uniquement (Chiang *et al.*, 2008). En comparant les cinétiques d'azote soluble à l'acide trichloroacétique (TCA) des digestats gastriques, les auteurs ont montré une meilleure correspondance au modèle *in vivo*, du modèle *in vitro* dynamique ( $R^2 = 0,97$  ;  $P < 0,0001$ ) que du modèle *in vitro* statique ( $R^2 = 0,89$  ;  $P < 0,0001$ ). A propos de nos données, la première observation est que les modèles dynamiques (*in vivo* et *in vitro*) observent des taux d'hydrolyses relativement stables pendant la digestion, contrairement aux digestions *in vitro* statiques, où l'hydrolyse décrit une cinétique michaelienne enzymatique classique. Alors que les taux d'hydrolyses gastriques sont du même ordre, sûrement à cause des faibles taux d'hydrolyse induits par la pepsine, le modèle *in vitro* statique semble provoquer une hydrolyse plus poussée des protéines, d'un facteur 3 à 5 par rapport aux modèles dynamiques. Enfin, en comparant les aliments entre eux, les modèles dynamiques fournissent des cinétiques d'hydrolyse similaires, ce qui n'est pas le cas du modèle *in vitro* statique. La raison la plus probable est le ratio protéine : protéases pancréatiques, qui ne change pas d'un aliment à l'autre dans le modèle *in vitro* dynamique – et probablement *in vivo* – alors qu'il est 3,7 fois plus élevé pour le jus de soja par rapport au tofu dans le modèle *in vitro* statique (induisant une protéolyse plus poussée dans le cas du jus de soja) (Tableau 29).

**Tableau 30** : Variation des paramètres de digestion des repas à base de protéines de soja suivant les modèles utilisés

	<i>in vitro</i> statique INFOGEST	<i>in vitro</i> dynamique DiDIGI®	<i>in vivo</i> mini-porcins
Temps de digestion	120 min	360 min	450 min
Aliment seul / Repas	Aliment seul	Aliment incorporé dans un repas	Aliment incorporé dans un repas
Granulométrie (tofu)	Hachoir à viande manuel (Eddington mincer Pro) ( $< 1 - 2$ mm)	D50 = $5,1 \pm 0,1$ mm	D50 = $5,1 \pm 0,1$ mm
Répétitions	3 (tofu) ; 6 (jus de soja)	3	Gastrique : 4 animaux Duodénum : 6 animaux
Quantité de pepsine	2 000 U <sub>pepsine</sub> par gramme d'aliment.	80 000 U <sub>pepsine</sub> totales par gramme de	Pas de données répétables et

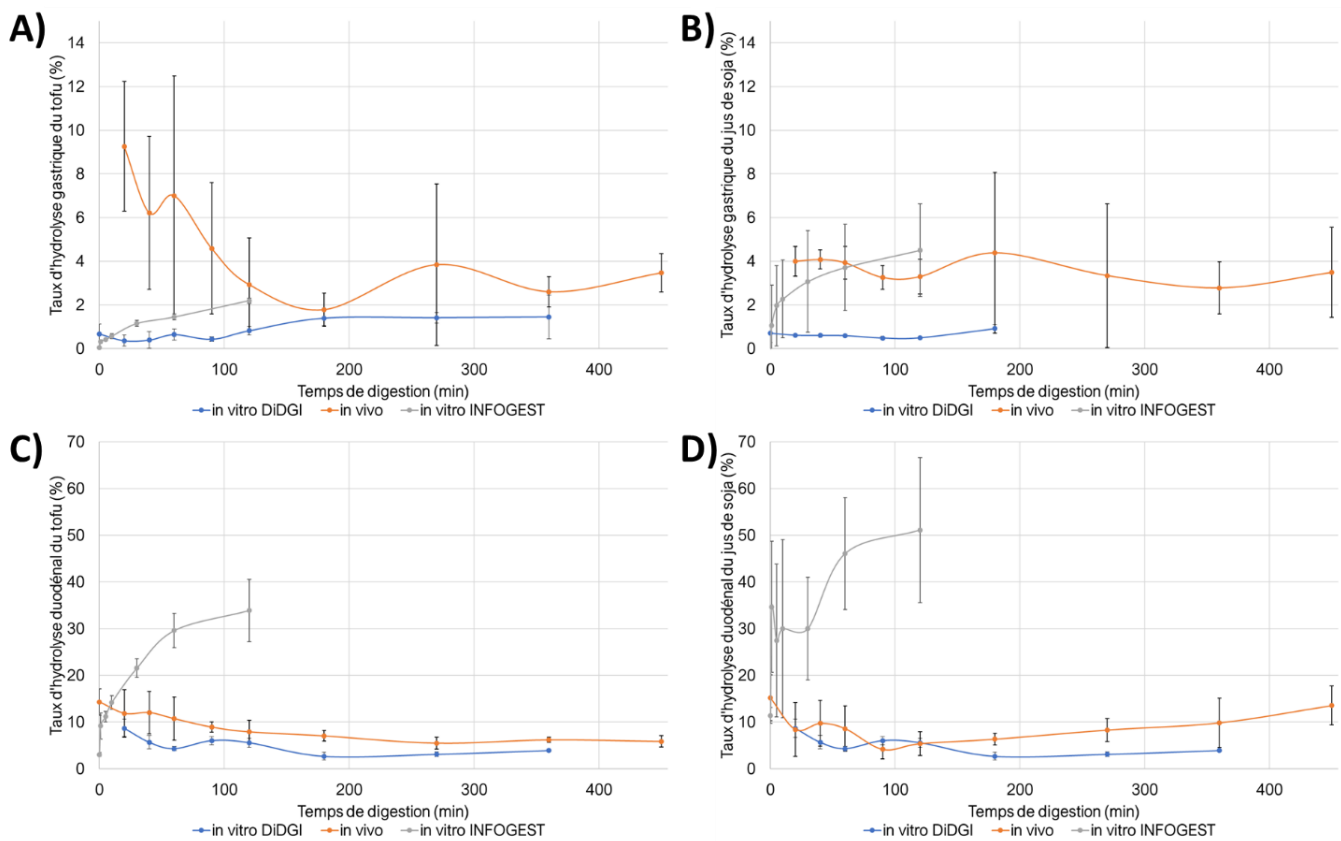
(pour les ratios pepsine : substrat protéique, voir le Tableau 29)		protéine alimentaire (débit : $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , concentration de la solution stock : $3333 \text{ U}_{\text{pepsine}}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). L'évolution des concentrations est présentée en Figure 67.	interprétables avec un effet des post-traitements important. Varie entre 25 et $256 \text{ U}_{\text{pepsine}}\cdot\text{ml}^{-1}$ au niveau duodéнал (cf Figure 77).
pH gastrique	3	$7 \rightarrow 2$	$7 \rightarrow 2$
Transfert gastrique - duodénum	Direct	Continu (vidange d'Elashoff)	Continu (vidange d'Elashoff)
Quantité de trypsine (pour les ratios trypsine: substrat protéique, voir le Tableau 29)	$100 \text{ U}_{\text{trypsine}}$ par gramme d'aliment.	$4\,000 \text{ U}_{\text{trypsine}}$ totale par gramme de protéine alimentaire (débit : $0,25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , concentration de la solution stock : $333 \text{ U}_{\text{trypsine}}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). L'évolution des concentrations est présentée en Figure 67.	?
pH intestinal	7	$7 \rightarrow 4$	$7 \rightarrow 4$
Quantité de bile	2,5 ml d'une solution à $160 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ mise dans 40 ml final, (concentration finale : $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . De 0 - 30 min d'une solution à $40 \text{ mmol}_{\text{acide biliaire}}\cdot\text{l}^{-1}$ puis à $20 \text{ mmol}_{\text{acide biliaire}}\cdot\text{l}^{-1}$	$25 - 115 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (cf Figure 68)
Transfert duodénum - iléum	-	Suivant les marqueurs recueillis <i>in vivo</i> dans l'iléon.	Suivant les marqueurs recueillis <i>in vivo</i> dans l'iléon.

## 4 repas – 2 animaux (H et L) – 3 - 4 points de cinétique



**Figure 68 :** Dosage de la teneur en acides biliaires dans les contenus duodénaux prélevés sur deux cochons (nommés H (courbes en bleu) et L (courbes en orange)) et congelés avant dosage. Dans le coin supérieur droit des graphiques, les valeurs minimales et maximales de teneurs en acides biliaires sont présentées pour chaque couple animal/aliment. Les points aberrants sont encadrés en rouge.

A propos de la variabilité entre les répétitions, les coefficients de variation des données *in vivo* sont les plus élevés, ce qui s'explique par la variation biologique interindividuelle (Walther *et al.*, 2019). Une exception existe pour l'évolution du taux d'hydrolyse du jus de soja lors de la digestion *in vitro* statique intestinale. Cette forte variabilité proviendrait de la faible teneur en azote alimentaire par rapport à l'azote endogène dans le mélange. En effet, le dosage d'amines libres est réalisé sur l'ensemble du contenu, sans distinction de l'endogène et de l'alimentaire. La soustraction de la quantité totale des amines libres mesurée par l'apport endogène augmente mécaniquement le coefficient de variation (*i.e.* l'importance de l'écart-type par rapport à la moyenne) du taux d'hydrolyse, d'autant plus que la part d'endogène est importante.



**Figure 69 :** Comparaison des évolutions des taux d’hydrolyse lors des digestions, gastrique (A et B) et duodénale (C et D), du jus de soja (B et D) et du tofu (A et C) dans les modèles *in vitro* statiques, dynamiques et *in vivo* porcine. Les barres d’erreur sont les écart-types.

Une autre source de différences entre les cinétiques obtenues sur les différents modèles est le calcul du taux d’hydrolyse des protéines, qui peut s’effectuer de plusieurs manières. Généralement, le taux d’hydrolyse est le ratio de la quantité d’azote impliqué dans les amines libres ( $N_{\alpha}$ ) sur l’azote total (N) de l’échantillon (Figure 70). Ces quantités sont déduites à partir du volume total, du réacteur ou bien de l’échantillon, et des concentrations, de  $N_{\alpha}$  ou de N, mesurées via différents types de dosages. Calculer le ratio des concentrations ( $[N_{\alpha}]/[N]$ ) est aussi valable pour calculer ce degré d’hydrolyse, en supposant que les volumes sont égaux. Le type de dosage utilisé est la première source de variation dans le calcul du taux d’hydrolyse, dont les avantages et inconvénients sont évoqués dans la partie 1.6.1.1. Ensuite, l’azote total considéré (au dénominateur) est le plus important dans le calcul du taux. Nous pouvons soit prendre l’azote alimentaire total incorporé (théorique), soit l’azote total mesuré dans le prélèvement ou son surnageant, soit l’azote impliqué dans les amines libres après hydrolyse totale du matériel alimentaire. Enfin, les valeurs peuvent être corrigées, suivant l’objectif de l’étude et si le protocole le permet, par les quantités basales et endogènes.

Lorsque le modèle est compartimental et statique, aux prélèvements près, les volumes sont constants et connus. Il est donc pertinent d’utiliser l’azote alimentaire total incorporé (théorique) pour

calculer le taux d'hydrolyse. Cela suppose que tout l'azote alimentaire soit initialement sous forme d'amine libre ou bien impliqué dans une liaison peptidique. Or, ce n'est pas le cas. En effet, certains acides aminés contiennent de l'azote sur leurs radicaux (lysine, glutamine, asparagine, histidine) qui ne se retrouvera jamais sous forme d'amines libres quelle que soit l'hydrolyse réalisée. De plus, l'aliment (glycoprotéines, chitine) ou les sécrétions endogènes (mucus, urée, ammoniac) peuvent contenir des composés azotés non protéiques au sens strict. C'est pour cela qu'un dosage des amines libres ( $N\alpha$ ) dans un hydrolysats total de l'aliment étudié, est réalisé pour connaître la quantité maximale d'amines libres qui peuvent être générées. Cependant, l'hydrolyse peut d'un côté ne pas être totale, car les cinétiques d'hydrolyse varient d'une matrice alimentaire à une autre, ce qui amène à sous-estimer le 100 % d'hydrolyse. D'un autre côté, l'hydrolyse acide détruit certains acides aminés (tryptophane notamment), ce qui entraîne aussi une sous-estimation du maximum d'amines libres potentiellement libérables.

C'est pour cela, qu'un taux d'hydrolyse local peut être calculé en mesurant, pour un échantillon, ses teneurs en amines libres et en azote. Le ratio de ces deux concentrations permet d'obtenir un taux d'hydrolyse de l'échantillon en s'affranchissant des données volumiques et des questionnements liés à l'hydrolyse totale. Cela est intéressant pour le système *in vitro* dynamique, car même si les volumes compartimentaux sont connus, le matériel azoté ne se vidange pas forcément de manière homogène d'un compartiment à l'autre. L'usage de cette méthode pour les échantillons *in vivo* est aussi recommandé, puisque le volume gastrique total n'est pas connu et que l'intestin grêle est difficilement assimilable à un compartiment. Les questions restantes par rapport au calcul de taux d'hydrolyse « local » d'un prélèvement sont les contributions de l'endogènes, qui sont difficilement déterminables, ce qui pourrait peut-être être résolu en utilisant des méthodes d'enrichissement isotopique ou des modèles mathématiques. Par ailleurs, une interrogation réside : savoir si l'azote total pris en compte est celui de l'échantillon dans sa totalité ou juste celui du surnageant, le dosage des amines libres s'effectuant dans le surnageant (car c'est une méthode colorimétrique).

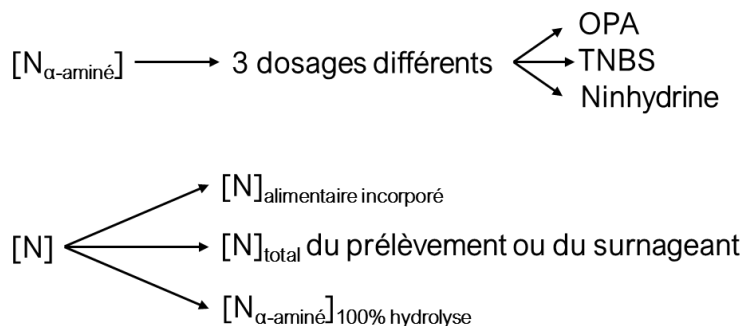
Des taux d'hydrolyse calculés suivant ces différentes méthodes sur des points finaux de digestions statiques sont présentés dans le Tableau 32. Pour les taux d'hydrolyses basés sur l'azote alimentaire incorporé et la quantité d'amines libres après hydrolyse totale, les taux augmentent en passant du volume de surnageant au volume total théorique. Concernant le taux d'hydrolyse local corrigé de l'endogène, comme le type de volume considéré intervient aussi au numérateur, le taux augmente en passant du volume total théorique au volume de surnageant. Finalement, le ratio  $[N\alpha]/[N]$  dans le surnageant du prélèvement est peut-être la manière la moins variable qui existe, utilisable pour une étude comparative sur la digestion de différentes protéines. L'hypothèse sous-

jacente est que les contributions aux valeurs de  $N\alpha$  et  $N$ , des sécrétions endogènes et alimentaires initiales, sont similaires d'un aliment à un autre.

Il faut aussi indiquer qu'une partie des protéines dans les matrices alimentaires sont insolubles. Leur solubilisation s'effectue au cours de la digestion. Par conséquent, le taux d'hydrolyse, avec au dénominateur  $[N]_{\text{alimentaire incorporé}}$ , donne une vision de l'hydrolyse de la fraction azoté sans tenir compte de la solubilisation des protéines. Il est alors préférable de mettre au dénominateur la valeur de  $[N]_{\text{total du surnageant}}$ , qui représente l'état instantané de la fraction protéique soluble, ce qui est plus proche de la réalité du phénomène.

#### Calcul du taux d'hydrolyse

$$\frac{N \text{ impliqué dans une fonction } \alpha\text{-aminée}}{N \text{ total}} = \frac{[N_{\alpha\text{-aminé}}] \times V}{[N] \times V} = \frac{[N_{\alpha\text{-aminé}}]}{[N]}$$



+ Correction de la contribution des sécrétions endogènes et basales

**Figure 70 :** Les différentes manières de calculer un taux d'hydrolyse des protéines.

Outre l'évolution des taux d'hydrolyse, les « digestibilités » de l'azote ou bilan azotés en point final de la digestion, sont comparables entre les trois modèles étudiés. Les mesures d'azote sur le point final des digestions *in vitro* statiques n'ayant été réalisées que sur quelques essais avec le tofu frais et le seitan, nous montrons dans le Tableau 31 seulement les « digestibilités » azotés obtenues avec le tofu. Les valeurs tirées des modèles *in vitro* dynamique et *in vivo* ne sont pas corrigées des apports azotés endogènes. Comme évoqué dans le Chapitre 5, les valeurs de digestibilité iléale apparente de l'azote obtenues *in vivo* et dans le système *in vitro* dynamique sont cohérentes. La question ici est de voir si un traitement sur le digestat final du modèle *in vitro* statique, similaire à celui qui a été réalisé sur le pool iléal du DiDGI<sup>®</sup>, permet d'obtenir une valeur de digestibilité apparente *in vitro* de l'azote.

Le souci est que l'azote du culot n'a pas été quantifié : la valeur au dénominateur est donc la quantité d'azote totale supposée dans le réacteur, l'azote alimentaire incorporé initialement et celle apportée par la pancréatine. On peut observer que la fraction azotée potentiellement absorbée dans le modèle *in vitro* statique est d'environ 20 points supérieure à celles absorbées dans les modèles *in vivo* et *in vitro* dynamique, ce qui corrobore les précédentes observations faites sur les taux d'hydrolyses intestinaux finaux, qui étaient supérieurs sur les modèles *in vitro* statiques. Nos valeurs de digestibilité protéique *in vitro* statique sont cohérentes avec celles trouvées sur trois types de tofu digérés *in vitro* (Rui *et al.*, 2016). La fourchette de digestibilité est élevée (76,5 – 90,5 %) car la méthode de coagulation a montré avoir un impact significatif sur cette digestibilité.

**Tableau 31 :** Comparaison des bilans azotés en points finaux après ingestion du tofu suivant les trois modèles étudiés, plus des données issues d'une étude *in vitro* (Rui *et al.*, 2016). n : nombre d'essais ou d'animaux et les résultats sont présentés comme moyenne ± écart à la moyenne.

Modèle	N absorbé	Calcul	n
<i>In vitro</i> statique (Shim <i>et al.</i> , 2010) (tofus seuls préparés avec différents coagulants) (Rui <i>et al.</i> , 2016)	76,5 – 90,5 %	Régression à partir de l'acidification mesurée (Digestibilité = $210,4 - 18,1\Delta\text{pH}$ ) (Hsu <i>et al.</i> , 1977)	10 x 3
<i>in vitro</i> statique INFOGEST (tofu seul)	81,4 ± 1,7 %	Centrifugation (5 kG, 10 min, 20 °C) de l'échantillon en fin de digestion. L'azote dans le surnageant est considéré comme la fraction absorbée. Le % est le ratio de l'azote du surnageant sur l'azote total alimentaire incorporé plus celui apporté par la pancréatine	2
<i>in vitro</i> dynamique DiDGI® (tofu repas)	63,7 ± 3,5 %	Centrifugation (5 kG, 10 min, 20 °C) de l'échantillon en fin de digestion. L'azote dans le surnageant est considéré comme la fraction absorbée. La fraction azotée du culot est considérée comme la fraction indigestible. Le % est le ratio de l'azote absorbé sur l'azote absorbé + indigestible.	3
<i>in vivo</i> cochons (tofu repas)	56,5 ± 7,8 %	Digestibilité iléale apparente	6

Cependant, un des principaux facteurs qui a varié de l'étude *in vitro* statique par rapport aux études *in vivo* et *in vitro* dynamique, est le fait d'incorporer l'aliment étudié dans un repas complet ou pas. Nous allons maintenant discuter de l'influence d'inclure l'aliment d'intérêt dans un repas ou pas.



**Tableau 32 :** Les taux d'hydrolyses calculés de différentes façons en prenant des exemples de digestion de seitan et tofu suivant le protocole *in vitro* statique INFOGEST : en prenant en compte les prélèvements ou pas et/ou les apports endogènes et/ou l'azote total du prélèvement ou du surnageant ou l'azote impliqué dans les aminés libres après hydrolyse totale. A) est le tableau avec les différentes données nécessaires aux calculs de taux d'hydrolyse. B) présente les quantités d'aminés libres avec différentes corrections appliquées. C) montrent les différents taux d'hydrolyse. N $\alpha$  signifie azote impliqué dans les fonctions amines libres.

A)

	A	B	C	D	E	D+E	F	G	H	I	J
Test	g <sub>N</sub> .100g <sup>-1</sup> du surna	Volume théorique (ml = g)	Qté surna (g)	Qté surna sans prélèvement (g)	surna total théorique (g <sub>N</sub> )	N théo dans le mix (g <sub>N</sub> )	N alim total (g <sub>N</sub> )	Endo total (pancr) (g <sub>N</sub> )	N $\alpha$ 100%Hydro ro (g <sub>N</sub> )	N $\alpha$ (g <sub>N</sub> .l <sup>-1</sup> )	Qté N $\alpha$ endo (g <sub>N</sub> )
Seitan frais	0,52	40	25,3	36,0	0,207	0,318	0,2490	0,06894	0,1425	1,2076	0,0144
	0,69	40	28,1	36,0	0,275	0,318	0,2490	0,06894	0,1425	1,2585	0,0144
Seitan lyophilisé	0,64	40	29,2	36,0	0,258	0,318	0,2490	0,06894	0,1425	2,0497	0,0144
	0,75	40	30,5	36,0	0,301	0,318	0,2490	0,06894	0,1425	2,0189	0,0144
Tofu frais	0,35	40	26,8	37,0	0,140	0,169	0,1000	0,06894	0,0635	1,0954	0,0144
	0,34	40	29,1	37,0	0,135	0,169	0,1000	0,06894	0,0635	1,2939	0,0144

N $\alpha$  N impliqué dans les groupes  $\alpha$ -aminés

- A [N]surnageant (g<sub>N</sub>.100g<sup>-1</sup>)
- B V théorique (ml)
- C V surnageant (ml)
- D V surnageant sans prélèvement (ml)
- F N alimentaire incorporé (g<sub>N</sub>)
- G N endogène (g<sub>N</sub>)
- H N $\alpha$  après hydrolyse totale (g<sub>N</sub>)
- I [N $\alpha$ ]surnageant (g<sub>N</sub>.ml<sup>-1</sup>)
- J N $\alpha$  endogène (g<sub>N</sub>)

B)

	B*I	C*I	D*I	B*I - J	C*I - J	D*I - J
Test	Na Volume théorique (g <sub>N</sub> )	Na Volume surnageant (g <sub>N</sub> )	Na Volume surnageant sans prélèvement (g <sub>N</sub> )	Na Volume théorique – endogène (g <sub>N</sub> )	Na Volume surnageant – endogène (g <sub>N</sub> )	Na Volume surnageant sans prélèvement – endogène (g <sub>N</sub> )
Seitan frais	0,0483	0,0305	0,0434	0,0340	0,0162	0,0291
	0,0503	0,0353	0,0453	0,0360	0,0210	0,0309
Seitan lyophilisé	0,0820	0,0598	0,0737	0,0676	0,0454	0,0594
	0,0808	0,0616	0,0726	0,0664	0,0473	0,0583
Tofu frais	0,0438	0,0293	0,0405	0,0295	0,0150	0,0262
	0,0518	0,0376	0,0479	0,0374	0,0233	0,0335

C)

	I / A	(B*I - J)/(F)	(C*I - J)/(F)	(D*I - J)/(F)	(B*I - J)/(H)	(C*I - J)/(H)	(D*I - J)/(H)	(B*I - J)/(A*B - G)	(C*I - J)/(A*C - G)	(D*I - J)/(A*D - G)
Test	TH [Na]/[N <sub>tot</sub> surna] sans correction endo	TH Na/N <sub>tot</sub> alim Vthéo	TH Na/N <sub>tot</sub> alim Vsuma sans plvt	TH Na/N <sub>tot</sub> alim Vsuma	TH Na/N <sub>100%H</sub> ydro Vthéo	TH Na/N <sub>100%H</sub> ydro Vsuma sans plvt	TH Na/N <sub>100%H</sub> ydro Vsuma	TH Na/N <sub>tot</sub> alim Vthéo	TH Na/N <sub>tot</sub> Vsuma sans plvt	TH Na/N <sub>tot</sub> Vsuma
Seitan frais	23%	14%	12%	6%	24%	20%	11%	25%	25%	26%
	18%	14%	12%	8%	25%	22%	15%	17%	17%	17%
Seitan lyophilisé	32%	27%	24%	18%	47%	42%	32%	36%	36%	38%
	27%	27%	23%	19%	47%	41%	33%	29%	29%	29%
Tofu frais	31%	29%	26%	15%	46%	41%	24%	42%	44%	61%
	38%	37%	34%	23%	59%	53%	37%	56%	59%	79%

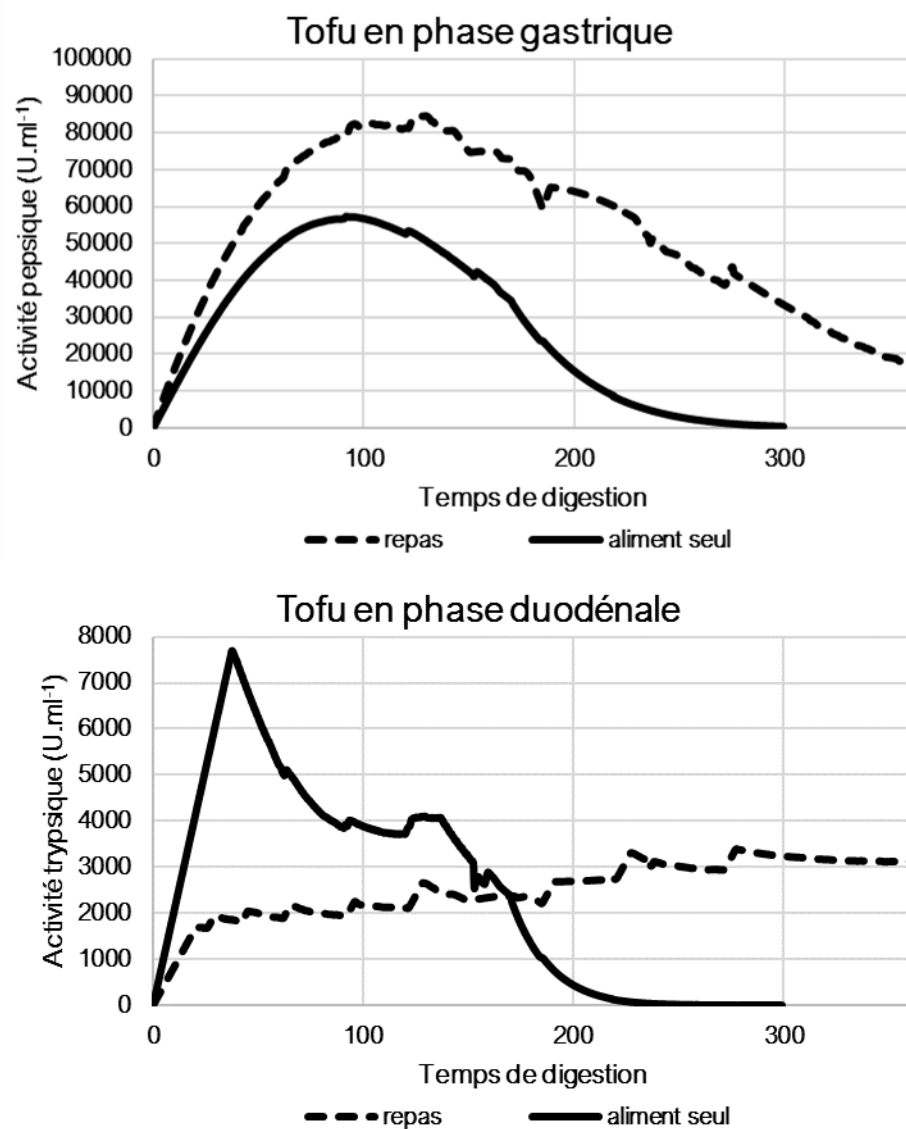
## 6.2 Impact des autres macronutriments sur la digestion des protéines : les protéines seules, l'aliment seul ou le repas

Au niveau sociologique, les aliments protéiques végétaux étudiés, et de manière générale, ne sont pas pris seuls, mais au sein d'un repas complet (complet en termes d'énergie apportée, respectant l'équilibre entre les macronutriments). Cela a un impact sur un bon nombre de constantes physiologiques, comme les cinétiques de vidange gastrique, la glycémie postprandiale et tous les processus neurohormonaux qui se produisent suite à l'ingestion du repas. Pour se placer dans un cadre le plus général possible et physiologiquement pertinent, les essais *in vivo* et donc *in vitro* dynamiques ont été effectués avec des repas complets. Les essais *in vitro* statiques, dont les objectifs étaient d'étudier plus les aspects enzymatiques, ont été réalisés sur les aliments seuls. Cependant, nous avons quelques éléments de comparaisons, aliment seul – aliment dans un repas, à montrer sur le modèle *in vitro* dynamique.

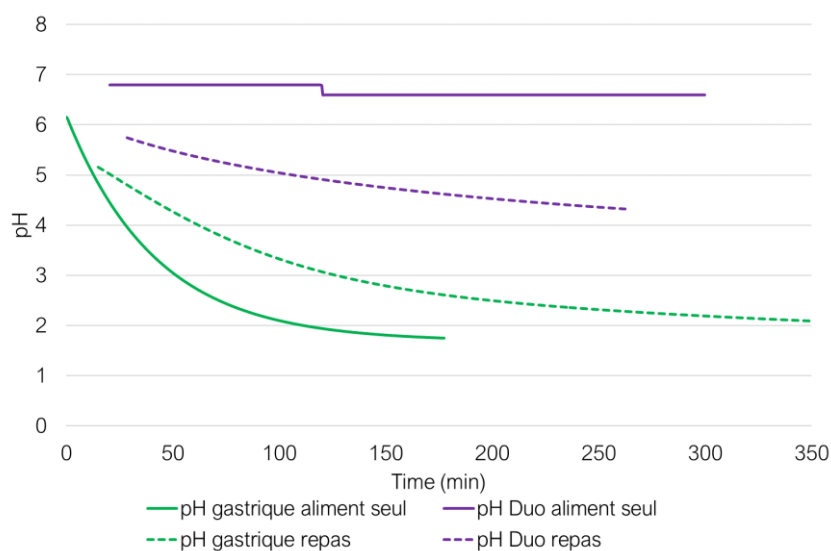
Des tests préliminaires ont été réalisés avec le tofu sur le DiDGI® paramétré de manière « standard » (essais Tf02 et Tf03). Les teneurs en amines libres ont été mesurées au cours de la digestion dans l'estomac et le duodénum, ce qui nous a permis de déduire une évolution des taux d'hydrolyse gastrique et duodénale (en multipliant  $[N\alpha]$  mesurée dans le compartiment par le volume de ce compartiment et en divisant par la quantité d'azote alimentaire ingérée). Nous pouvons confronter ces données à celles obtenues avec le tofu incorporé dans un repas complet (essais T3, T4 et T5) et présentées dans le Chapitre 5. Les différences entre les conditions initiales et le paramétrage sont présentés dans le Tableau 33. Les différences existantes entre les deux types d'essais au niveau des évolutions des concentrations en protéases et des pH sont représentées respectivement en Figure 71 et Figure 72. La dynamique de la concentration en pepsine dans l'estomac est similaire d'un essai à l'autre. Cependant, les essais « repas » observe des concentrations plus élevées que l'aliment seul. Dans le duodénum, le débit de pancréatine (à concentration de la solution stock similaire) était deux fois plus élevé dans les essais « aliment seul » que ceux « repas », ce qui explique, dans le cas de « l'aliment seul », la plus forte teneur en activité trypsique observée initialement. Ensuite, celle-ci décroît fortement à partir de 150 min car l'estomac étant vide, les sécrétions duodénales se sont interrompues et le duodénum s'est vidangé. Ce n'est pas le cas des essais « repas », où les sécrétions et le volume duodéal de 50 ml ont été maintenus jusqu'à la fin de la digestion. Concernant le pH, alors que les acidifications gastriques sont similaires, le pH duodéal des essais « aliments seuls » reste neutre, contrairement à celui des essais « repas » qui s'acidifie de pH 6 à pH 4.

**Tableau 33** : Paramètres variant sur le DiDGI® d'un essai avec l'aliment seul à un essai avec le repas.

	Aliment seul	Aliment dans un repas
Nature et quantité de protéines ingérées	50 g de tofu frais (5,5 g de protéines)	68,1 g de tofu lyophilisé réhydraté (7,5 g de protéines)
Granulométrie	Eddington mincer (< 1 – 2 mm)	D50 = 5,1 ± 0,1 mm



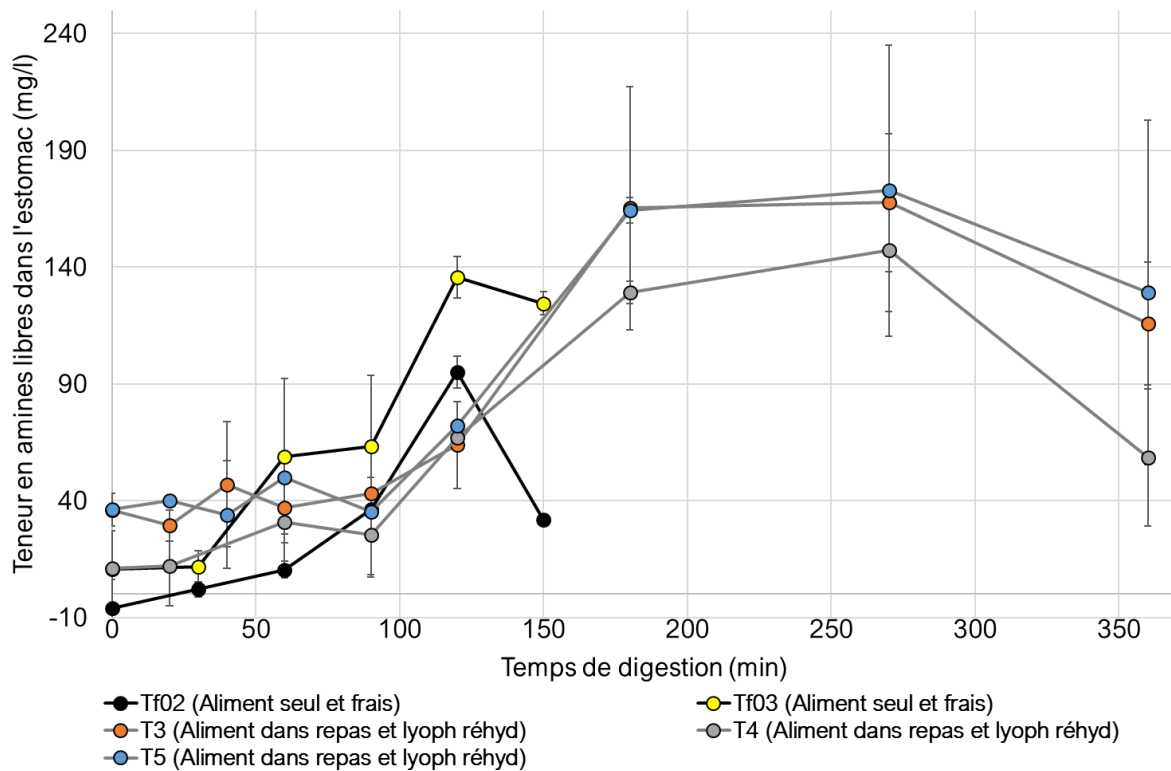
**Figure 71** : Evolutions des concentrations en activités enzymatiques dans les compartiments gastrique et duodénal du DiDGI® dans les essais sur le tofu seul ou dans un repas complet. Ces différences sont dues aux conditions initiales.



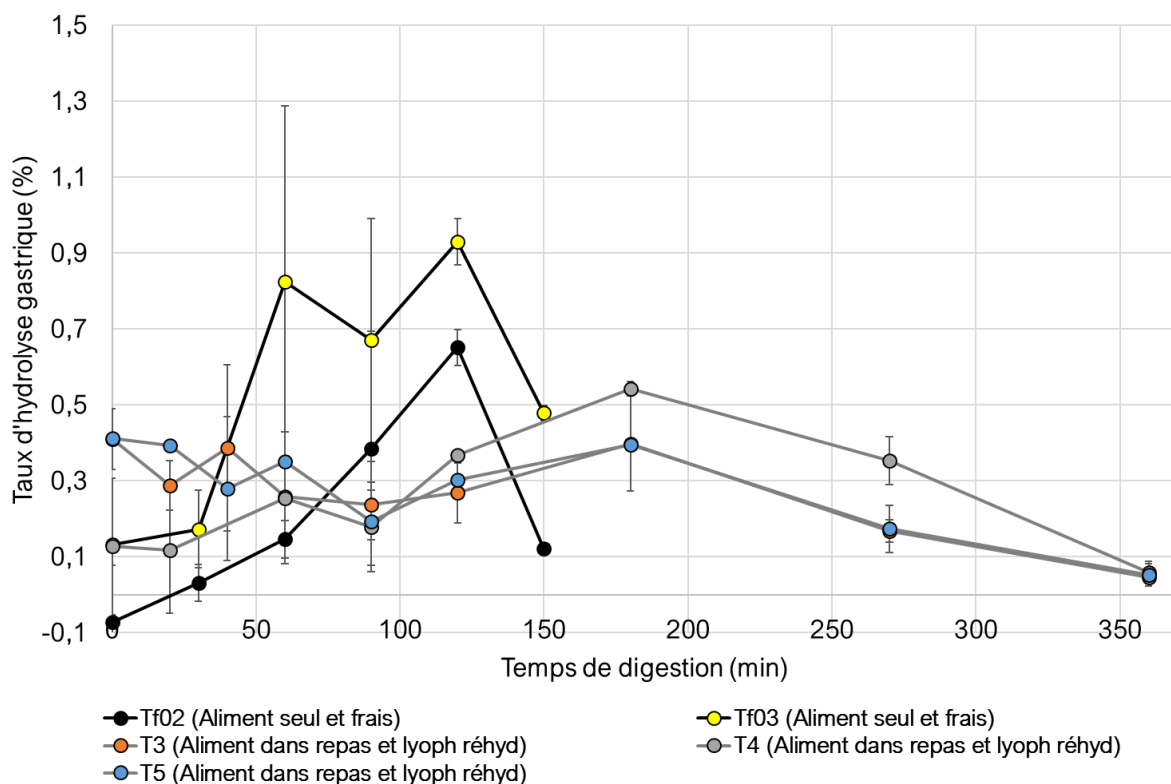
**Figure 72 :** Evolution des pH gastrique et duodénal dans le système *in vitro* dynamique DiDGI® pour le tofu seul ou incorporé dans un repas.

En phase gastrique, les teneurs en amines libres (Figure 73) sont similaires, que le tofu soit ingéré seul ou dans un repas. Cependant, comme la vidange gastrique du tofu seul est plus rapide que celle du tofu dans le repas complet, la chute du taux d'hydrolyse (Figure 74), après son augmentation initiale, s'opère à 120 min pour le tofu seul et, plus tard, à 270 min pour le tofu dans le repas complet. Autrement, les ordres de grandeurs de taux d'hydrolyse sont identiques.

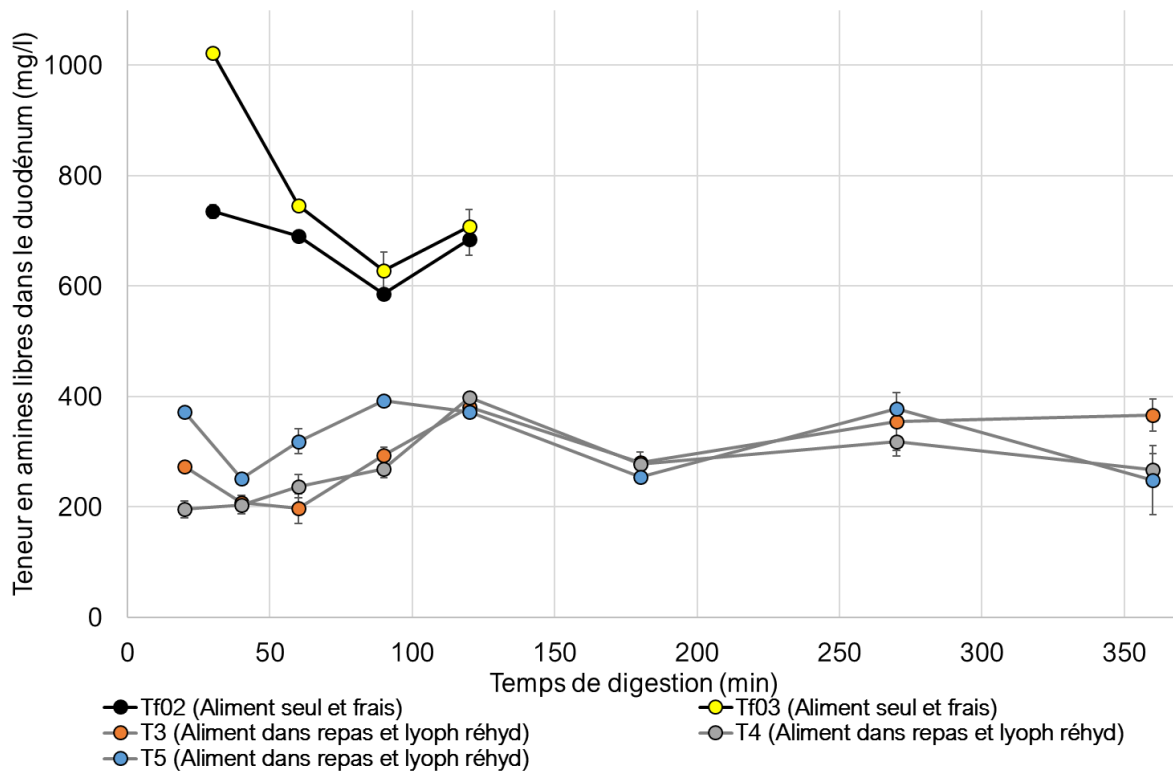
Dans le compartiment duodénal, la différence est plus nette entre le tofu seul et dans le repas complet : les teneurs en amines libres (Figure 75) et les taux d'hydrolyse (Figure 76) du tofu seul sont deux à trois fois plus élevés que celui du tofu dans le repas complet. Comme le volume duodénal est fixé à 50 ml et que les quantités de protéines ingérées sont semblables dans les deux conditions, les taux d'hydrolyse et les teneurs en amines suivent les mêmes tendances. La plus forte hydrolyse du tofu seul peut s'expliquer de différentes manières : un ratio enzyme : substrat plus élevé, l'absence d'autres constituants du repas, ou encore la granulométrie du tofu plus fine.



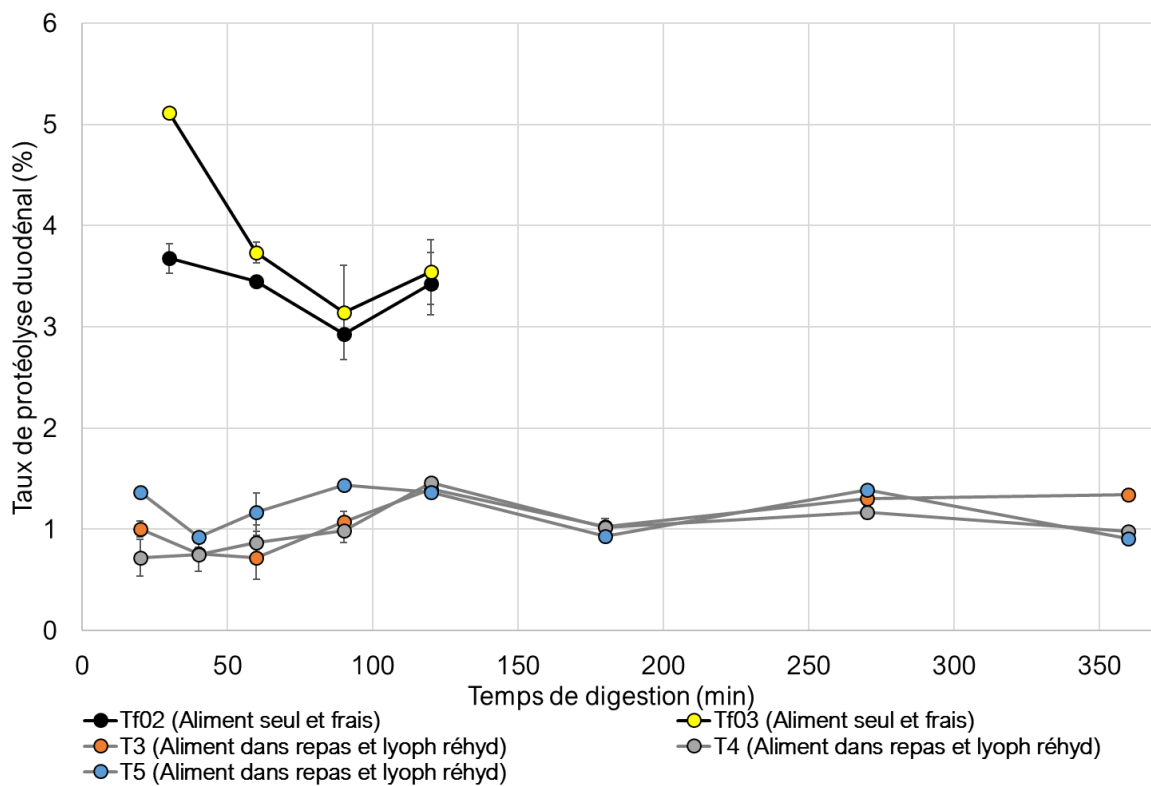
**Figure 73 :** Teneurs en amines libres dans le premier compartiment du DiDGI® (estomac) du tofu seul ou incorporé dans un repas.



**Figure 74 :** Taux d'hydrolyse dans le premier compartiment du DiDGI® (estomac) du tofu seul ou incorporé dans un repas.



**Figure 75 :** Teneurs en amines libres dans le second compartiment du DiDGI® (duodénum) du tofu seul ou incorporé dans un repas.



**Figure 76 :** Taux d'hydrolyse dans le second compartiment du DiDGI® (duodénum) du tofu seul ou incorporé dans un repas.

Tout paramètre global lié au bol alimentaire, tel que la viscosité, l'osmolalité, le volume, le pouvoir tampon, la densité calorique, est lié aux autres éléments constitutifs du repas. Suivant le paramètre considéré, il s'agit d'estimer la contribution de ces éléments constitutifs du repas par rapport à l'aliment étudié. Par exemple, l'effet tampon est principalement le fait des protéines, apportées seulement par les aliments étudiés. Cet effet tampon est donc variable d'un repas à l'autre à cause de l'aliment, et non à cause des éléments supplémentaires du repas. Au contraire, la vidange, régit principalement par la densité calorique, et les niveaux de sécrétions gastriques, induites entre autres par les distensions de la paroi stomacale (dépendante du volume du chyme), seraient dépendants plus des caractéristiques du repas que de l'aliment. En effet, la contribution de l'aliment à ces paramètres macroscopiques (volume, densité calorique) est diluée par l'apport des autres éléments constitutifs du repas complet.

Ces remarques sont valables pour un repas homogène. Des phénomènes de fractionnement ou de déphasage peuvent avoir lieu : dans le repas avant ingestion (par exemple pour le tofu ou le seitan, appelés couramment repas solide-liquide) ou au cours de la digestion, notamment dans l'estomac (couche d'huile surfacique, précipitation protéique). Cela peut engendrer une régionalisation stomacale de la réponse de l'organisme aux stimulus provoqués par le bol alimentaire. Une telle hétérogénéité peut aussi jouer sur la digestion aval, où le duodénum voit arriver, à un débit variable, un bol alimentaire à des pH, des granulométries et niveaux d'hydrolyse différents. Au niveau de l'intestin grêle, par le fractionnement du bol alimentaire induit par la vidange gastrique, les caractéristiques de l'aliment joueraient en majorité sur la capacité des macronutriments à être hydrolysés, plutôt que les caractéristiques du repas. Cela peut se résumer par la vision de l'estomac comme un système compartimental, où la dilution des nutriments d'intérêts, dans le repas, est élevée. L'intestin grêle, représenté par un système piston d'écoulement plus ou moins continu, voit ces nutriments d'intérêts se retrouver plus isolés, donc plus sensibles aux apports endogènes et exposés aux parois de la lumière intestinale contenant des protéases de la bordure en brosse notamment.

De plus, le bol alimentaire au niveau du duodénum a subi au préalable le traitement buccal et gastrique, donc il se peut que l'état structural de l'aliment soit dégradé et réagisse différemment à l'environnement duodénal que l'aliment intact. Sachant que le niveau de dégradation gastrique varie (pH, pepsine sécrétée), l'aliment passe le pylore à différents niveaux de dégradation, ce qui suppose que les produits de la dégradation bilio-pancréatique soient différents au cours du temps. De là, la question est de savoir si cette dégradation gastrique est importante, allant jusqu'à jouer sur le profil de ces produits finaux. Ou bien, si elle est négligeable par rapport à la dégradation dans l'intestin grêle, une hypothèse supportée par les données de taux d'hydrolyse gastriques et duodénaux. Dans



ce cas, seul les paramètres de transit seraient importants dans la cinétique de dégradation du macronutriment d'intérêt.

Toujours est-il que la différence la plus flagrante que nous avons constatée entre les aliments, était leur caractère solide ou liquide. La différence entre les aliments solides et liquides a largement été montrée dans la littérature (Lorieau *et al.*, 2018). Mais là où les aliments solides donnent des résultats surprenants, c'est au niveau de l'apparition des acides aminés dans le sang en période postprandiale. Avec des cinétiques de vidanges gastriques et une digestibilité iléale réelle classique, l'apparition des fonctions amines libres dans le sang est décalée dans le temps par rapport aux liquides. Cette latence observée est de 5 h et les niveaux mesurés sont même inférieurs aux niveaux basaux.

Ce phénomène pourrait être lié au rôle du tamis pylorique et du frein iléal. La faiblesse de la déstructuration (chimique et mécanique) du bol gastrique ne permet pas d'avoir rapidement et suffisamment de particules inférieures à 2 mm : seul du liquide basal, endogène et l'eau libre du repas sont vidangés, ce qui n'est pas suffisant en termes de macronutriments. A moyen terme (1 h peut être), le signal d'ingestion et de présence de contenu dans l'estomac est bien perçu, mais pas ou peu de nutriments (en tout cas de produits de la dégradation des protéines) sont détectés au niveau iléal, ce qui pousse la vidange gastrique à s'accélérer, ou en tout cas à ne pas ralentir. Devant cette poussée de l'iléon, l'estomac vidange tout de même de grosses particules très difficilement hydrolysables par les sécrétions bilio-pancréatiques. Ces particules se trouvent avoir dépassé le jéjunum après un temps long sans pour autant avoir donné des éléments issus des protéines absorbables (AA libres, di- et tri-peptides).

Le frein iléal n'agit pas car le temps de transit intestinal est long, à cause de la viscosité et aspects macroscopiques du repas (grosses particules). Les premières traces de bol alimentaire au niveau de l'iléon sont des composés très hydrolysés, à cause du fort ratio enzyme : substrat, et donc absorbés. La vidange continue alors.

Le frein iléal s'enclenche car il détecte ces éléments peu hydrolysés à ce niveau, ce qui a pour effet de ralentir la vidange gastrique et augmenter les niveaux de sécrétions bilio-pancréatiques. Au bout de 5 h, le bol gastrique a suffisamment été broyé, acidifié et hydrolysé pour se comporter plus comme un liquide visqueux, et l'hydrolyse intestinal s'effectue plus facilement tout comme la vidange gastrique.

Cependant, aucun ralentissement de la vidange gastrique n'a été observé, ce qui signifie que, soit le frein est inefficace, soit il n'a pas eu lieu car finalement l'hydrolyse intestinale est lente, mais suffisante pour ne pas actionner le frein iléal.

### 6.3 Comparaison de la digestion des protéines végétales et des protéines animales

Une manière intéressante d'aborder la digestion des protéines végétales est de comparer le comportement des protéines végétales dans le tractus gastro-intestinal à celui des protéines animales. En effet, l'aliment modèle par excellence dans le domaine de la digestion est la poudre de lait. C'est un aliment dont la composition varie peu, très bien caractérisé, abondant sur le marché et qui se conserve très bien. De plus, de nombreuses études relatent son devenir au cours de la digestion. Les autres protéines animales, comme celles de la viande, sont moins étudiées, sûrement à cause de leur caractère solide. En effet, la phase orale, de par la mastication, est alors primordiale dans la déstructuration de ce type d'aliment. L'étude de la digestion orale de matériel solide et sa simulation *in vitro* est alors tout un champ d'étude en soi. Les événements oraux sont une source de variabilité majeure, impactant toute la digestion en aval. Le lait étant un liquide, son étude *in vitro* est facilitée, car la phase orale peut se limiter à une dilution dans une solution simulant la salive. De plus, l'aliment est considéré comme homogène, tous ces constituants étant solubles. Ce qui n'est pas le cas des aliments solides, qui sont hétérogènes.

La même distinction peut être appliquée aux aliments végétaux protéiques. Les protéines végétales, dont les globulines représentent une grande proportion, précipitent à pH acide et donc *a priori* dans l'estomac. La caséine est connue pour, elle aussi, précipiter dans l'estomac, impactant ses cinétiques d'absorption par les entérocytes. Même si les mécanismes sous-jacents induisant cette agrégation sont différents entre les caséines micellaires et les globulines végétales natives ou peu dénaturées, leur précipitation dans l'estomac pourrait induire un temps de rétention stomacal plus élevé et *in fine* un ralentissement de leur assimilation.

Les autres freins pour l'étude de la digestion des protéines végétales sont le polymorphisme génétique et la sensibilité des protéines à leur environnement, plus importants chez les végétaux que chez les animaux, qui limitent la comparaison entre les études. En effet, même avec une source protéique identique, les différences au niveau des procédés technologiques et le polymorphisme génétique peuvent toujours expliquer les variations constatées au niveau de la digestion protéique. Le Tableau 34 compare les caractéristiques des protéines animales par rapport aux protéines végétales vis-à-vis du processus digestif. Globalement, les protéines végétales sont moins digestibles que les protéines animales, en raison de la présence de facteurs antinutritionnels. En plus, les protéines végétales observent des profils en acides aminés indispensables souvent déséquilibrés, contrairement aux protéines animales.

**Tableau 34 :** Comparaison des caractéristiques, identifiées comme importantes dans la digestion, des protéines végétales et animales

Caractéristiques	Protéines végétales	Protéines animales
Données connues sur la digestion monogastrique	Peu liées à l'alimentation humaine. Beaucoup de données concernant l'alimentation porcines, mais souvent les aliments étudiés sont des coproduits non convenable pour l'Homme.	Lait : littérature abondante Viande : peu de données
Polymorphisme génétique	Elevé	Faible
Solubilité en milieu aqueux, ce qui impacte sur le transit gastro-intestinal	Solubles : albumines Insolubles/solubles sous certaines conditions : globulines, prolamines, glutélines.	Solubles : lactoglobulines Insolubles/solubles sous certaines conditions : caséines, protéines musculaires
Composés réduisant la protéolyse digestive	Présence de facteurs antinutritionnels en quantités variables suivant le niveau de raffinage/transformation de la matière protéique végétale (fibres, inhibiteurs enzymatiques, lectines, tannins, phytates)	Pas de facteurs antinutritionnels
Equilibre en acides aminés indispensables	Déficit en certains acides aminés (sauf le soja)	Equilibrées

## Références

- Adouard, N. *et al.* (2016) 'Survival of cheese-ripening microorganisms in a dynamic simulator of the gastrointestinal tract', *Food Microbiology*, 53, pp. 30–40. doi: 10.1016/j.fm.2015.03.002.
- Chiang, C. *et al.* (2008) 'Development of a Dynamic System Simulating Pig Gastric Digestion', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(10), pp. 1522–1528.
- Le Feunteun, S. *et al.* (2014) 'Impact of the Dairy Matrix Structure on Milk Protein Digestion Kinetics: Mechanistic Modelling Based on Mini-pig In Vivo Data', *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), pp. 1099–1113. doi: 10.1007/s11947-013-1116-6.
- Hsu, H. W. *et al.* (1977) 'A Multienzyme Technique for Estimating Protein Digestibility', *Journal of Food Science*, 42(5), pp. 1269–1273. doi: 10.1111/j.1365-2621.1977.tb14476.x.
- Lorieau, L. *et al.* (2018) 'Impact of the dairy product structure and protein nature on the proteolysis and amino acid bioaccessibility during in vitro digestion', *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd, 82, pp. 399–411. doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.04.019.
- Ménard, O. *et al.* (2014) 'Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion', *Food Chemistry*, 145, pp. 1039–1045. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.036.
- Minekus, M. (2015) 'The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM)', in Verhoeckx, K. *et al.* (eds) *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham: Springer International Publishing, pp. 37–46. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4\_5.
- Picariello, G. *et al.* (2015) 'Role of intestinal brush border peptidases in the simulated digestion of milk proteins', *Molecular Nutrition and Food Research*, 59(5), pp. 948–956. doi: 10.1002/mnfr.201400856.
- Rui, X. *et al.* (2016) 'A comparison study of bioaccessibility of soy protein gel induced by magnesiumchloride, glucono- $\delta$ -lactone and microbial transglutaminase', *LWT - Food Science and Technology*, 71, pp. 234–242. doi: 10.1016/j.lwt.2016.03.032.
- Shim, S. M. *et al.* (2010) 'Assessing the digestibility of genetically modified soybean: Physiologically based in vitro digestion and fermentation model', *Food Research International*. Elsevier Ltd, 43(1), pp. 40–45. doi: 10.1016/j.foodres.2009.08.011.
- Walther, B. *et al.* (2019) 'GutSelf: Inter-Individual Variability in the Processing of Dietary Compounds by the Human Gastrointestinal Tract', *Molecular nutrition & food research*. doi: <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900677>.

## Chapitre 7. Conclusion générale et perspectives

Dans le contexte alimentaire actuel et notamment celui de la durabilité des systèmes alimentaires, une meilleure connaissance des protéines végétales, et notamment de leur digestibilité dans des aliments complexes, revêt un intérêt majeur. Dans ce contexte, l'objectif principal du travail était de vérifier que les différents modèles *in vitro* étudiés étaient adaptés pour simuler la digestion humaine de protéines végétales, la plupart de ces modèles ayant été développés et validés avec des produits laitiers. Pour cela la digestion protéique de quatre aliments d'origine végétale a été étudiée selon trois modèles : le modèle animal (mini-porc), le modèle *in vitro* statique standardisé (protocole INFOGEST) et le modèle *in vitro* dynamique DiDGI® dont les paramètres aliment-spécifiques ont été déduits des expérimentations réalisées chez le mini-porc. Un des principaux résultats de ce travail a permis de montrer, que le modèle *in vitro* dynamique, paramétré à partir de données *in vivo*, spécifiques à l'aliment considéré, permettait d'obtenir une digestibilité protéique proche de celle obtenue sur le modèle porcin (chapitre 5). La connaissance des cinétiques d'acidification de la phase gastrique pour chacun des aliments s'est révélée être un paramètre clé pour la conduite des digestions *in vitro*. La poursuite de cet objectif, *i.e.* la simulation *in vitro* de la digestion de protéines végétales, a permis d'étudier des processus digestifs plus en profondeur. Par exemple, l'acidification gastrique, les vitesses de transit dans l'intestin grêle ou encore le potentiel d'une protéine à être hydrolysée, ont été montrés comme variant suivant les caractéristiques structurelles macroscopique des aliments/repas. En effet, l'un des enjeux de la thèse était de travailler sur des aliments protéiques assez différents pour observer un différentiel au niveau des paramètres digestifs suivis, et ceci dans le but de retranscrire ce différentiel sur les modèles *in vitro*. Les aliments digérés selon le protocole *in vitro* statique ont montré des différences au niveaux des cinétiques des taux d'hydrolyse des protéines. Cette étude comparative a permis de mettre en évidence des effets de la structure de la matrice alimentaire ou bien de la nature des protéines sur la digestion des protéines (chapitre 2). Cependant, le fait d'inclure les aliments dans un repas « standardisé » a lissé certains des facteurs physiologiques comme les cinétiques de vidange gastrique ou encore le pH duodéal (chapitre 5). Ces paramètres sont peu ou pas influencés par la nature protéique ou les caractéristiques morphologiques de l'aliment considéré. Au contraire, le pH intragastrique (chapitre 3) et le transit du chyme jusqu'à l'iléon (chapitre 5) ont été mesurés comme différents d'un aliment à l'autre, notamment entre « solides » et « liquides ». En point final de la digestion des protéines, les différents repas ont démontré des digestibilités iléales réelles similaires et proche de 100 % (chapitre 4). C'est au niveau de la digestibilité iléale apparente, différente d'un repas à l'autre, que le travail de corrélation a pu être réalisé (chapitre 5). Ces résultats appellent à de nouvelles questions auxquelles des expérimentations et des tests supplémentaires permettraient d'y répondre, ou en tout cas

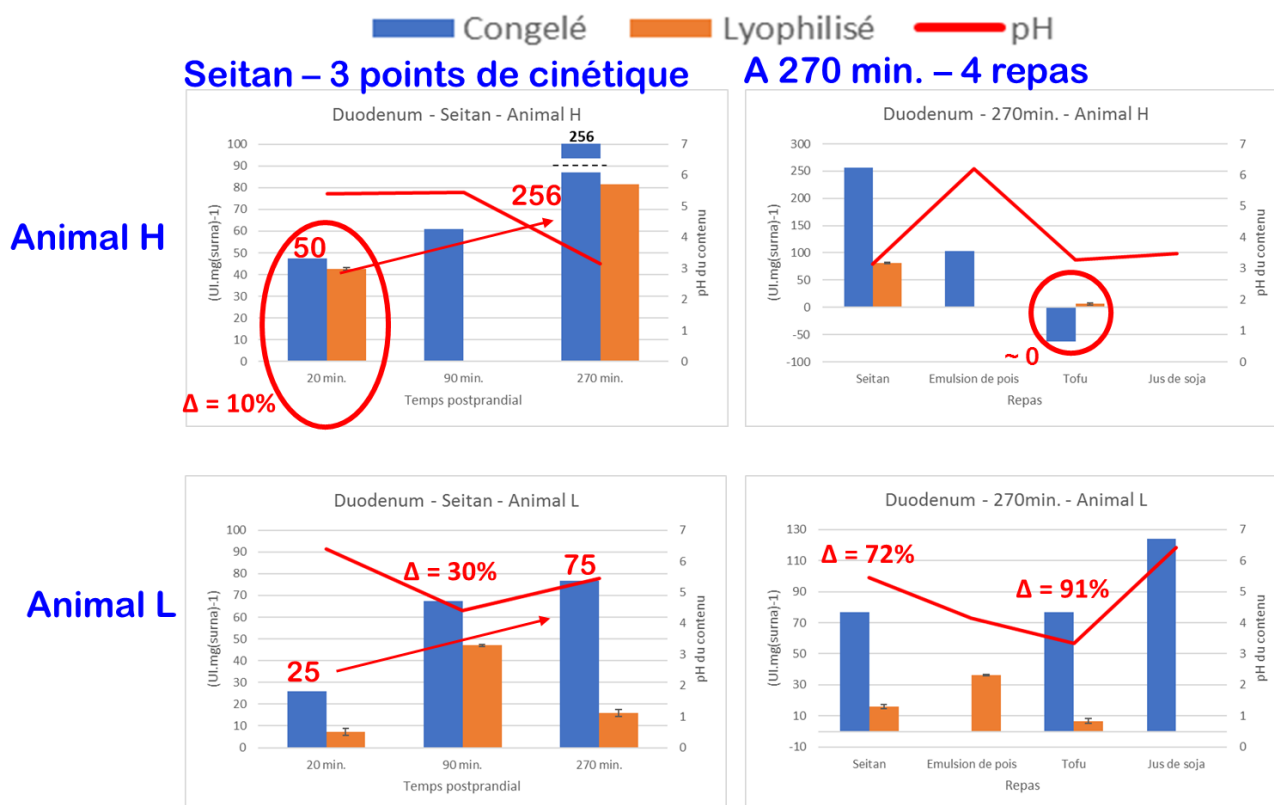
d'apporter des faisceaux de réponses. Quelques perspectives qu'ouvrent le présent projet sont listées ci-dessous.

### ***Perspectives à court terme***

A court terme, il serait intéressant d'interchanger les programmes aliment-dépendants d'un aliment à un autre pour estimer l'importance d'une telle spécificité. Si jamais la permutation des programmes de digestion n'induit pas de transformation majeure des cinétiques suivie, c'est que les aliments considérés ne sont pas tellement différents du point de vue digestif. Nous pourrions alors penser à construire des programmes de digestion consensus d'ensemble d'aliments, dont le point commun serait, par exemple, les propriétés rhéologiques, ou bien structurelles, au niveau macroscopique, ou encore l'origine des protéines. Dans cet optique, étudier d'autres aliments ou sources protéiques permettrait d'élargir la portée de ce travail.

Plus globalement, il peut s'avérer utile d'élaborer un plan d'expérience dans lequel les paramètres d'entrée de digestion *in vitro* (quantités d'enzymes, pH, transferts du chyme, diamètre des pores de la grille de vidange gastrique) varient un à un. Ce type d'étude permettrait d'évaluer l'impact de telles variations sur les constantes suivies (*i.e.* taux d'hydrolyse, nature des peptides relargués). Dans notre cas, seules les quantités d'enzymes apportées ont été fixées d'après des données non spécifiques aux aliments, issues de la littérature. Ils seraient les premiers paramètres d'entrée à faire varier. En effet, nous n'avons pas réussi à obtenir des données d'activité enzymatique *in vivo* qui soient répétables et interprétables, comme le montre la Figure 77. Les dosages d'activités enzymatiques sur des contenus digestifs sont difficiles à réaliser car l'activité enzymatique est très sensible aux conditions de stockage et aux traitements post-prélèvements. Pour estimer au mieux ces activités, il aurait fallu doser celles-ci juste après avoir prélever le digestat. A défaut d'un dosage direct, le meilleur moyen de préserver les activités biologiques des protéines est de les incorporer dans du glycérol. Nous aurions pu aussi doser les enzymes en elle-même, mais nous n'aurions pas eu accès à l'information clé, qui est l'activité enzymatique, et non la quantité d'enzyme. Si nous nous intéressons à l'activité enzymatique, une autre problématique surgit : celle de la présence de substrat dans les prélèvements. L'utilisation d'un substrat alimentaire marqué pour estimer sa vitesse de disparition peut être envisagé.

## Dosages sur surnageants (2500 G – 15 min. – 4°C) sans dilution



**Figure 77 :** Dosage de l'activité spécifique de la pepsine dans les contenus duodénaux prélevés sur deux animaux (l'animal L en haut et l'animal H en bas) pour le seitan à trois temps de digestion (graphiques de gauche) ou pour les quatre aliments à 270 min (graphiques de droite). Avant le dosage, les contenus ont été, soit congelés (barres bleues), soit lyophilisés (barres oranges). La courbe rouge donne le pH des différents prélèvements (échelle de pH à droite des graphiques). Les valeurs intéressantes et les écarts (notés  $\Delta$ , en %) entre échantillons au préalable congelés ou lyophilisés sont écrits en rouge au-dessus des barres.

Par ailleurs, la différenciation de l'azote et/ou des acides aminés alimentaires et endogènes est un challenge à relever pour connaître l'utilisation effective des protéines alimentaires par l'organisme. Cette distinction reste difficile à réaliser au niveau *in vivo* pour des raisons pratiques, où les protocoles utilisés supposent la validation d'hypothèses fortes (comme, dans ce travail, l'extrapolation de la proportion endogènes/alimentaire de la leucine à tous les autres acides aminés). Concernant les protocoles *in vitro*, tant que la ségrégation digestible/indigestible n'est pas effectuée, nous connaissons les quantités d'azote/acides aminés endogènes apportés à partir de la connaissance des quantités injectées et des concentrations en azote/acides aminés des solutions mère. Après simulation de l'absorption intestinale, nous nous retrouvons de nouveau avec le problème observé *in vivo*, où il est nécessaire d'avoir un marquage spécifique de l'aliment ou de l'endogène. Néanmoins, les bilans

azotés apparents sont quand même intéressants, car ils apportent une information sur l'azote et/ou l'acide aminé gagné et perdu par l'individu.

Enfin, nous travaillons sur des aliment/repas complexes qui sont homogènes globalement, *i.e.* lorsqu'une grande quantité d'aliment/repas est considérée, et hétérogènes lorsque nous prenons en compte de faibles quantités. Cela est particulièrement vrai pour les aliments solides. Comme nous l'avons observé au microscope, la matière alimentaire contient de gros agrégats protéiques répartis de manière hétérogènes. Donc, en considérant de faibles quantités, de l'ordre de quelques centaines de milligrammes, les quantités de protéines sont très variables au sein d'un même lot de produit alimentaire. En considérant un échantillon de l'ordre du gramme, ce n'est plus le cas. Cette réflexion sur la matière première est aussi valable pour les contenus digestifs. Cependant, nous nous sommes affranchis de cette variabilité intra-lot, en étudiant principalement le surnageant, dans lequel les constituants d'intérêts sont répartis de manière homogène. En conséquence, dans nos prélèvements de digestat, même si la composition du culot est variable d'une répétition à une autre, celle du surnageant est relativement stable. Pour se débarrasser de cette variabilité liée à l'hétérogénéité de la matière première, il est aussi possible de s'intéresser à l'ensemble du bol alimentaire, pourvu que les quantités d'aliment/repas incorporés soient assez élevées. En effet, *in vitro*, nous avons accès à l'ensemble du bol alimentaire. Soit en point final, soit en cinétique (en arrêtant la digestion à différents temps donnés), il est alors possible de faire différents prélèvements dans un même compartiment pour obtenir des valeurs qui soient représentatives de l'ensemble du contenu. La limite majeure de cette approche reste la multiplication des essais, donc des coûts et temps nécessaires à sa réalisation.

### ***Perspectives à moyen terme***

Toujours par rapport au modèle *in vitro* dynamique DiDGI<sup>®</sup>, sa complexification permettrait de suivre de nouvelles constantes au cours de la digestion. Cette complexification peut s'effectuer pas à pas, par l'ajout de modules complémentaire à la version existante, comme par exemple :

- Un système de double-vidange gastrique solide/liquide. Les deux équations d'Elashoff obtenues via les données *in vivo* de marqueurs indigestibles dans le contenu duodéal (chrome et ytterbium) pourrait être intégrées au programme de digestion. Dans notre étude, seule l'équation de la vidange gastrique de la phase liquide a été considérée.
- Un système qui simule l'absorption intestinale en ligne. Un tel module a récemment été mis en place par le laboratoire GMPA, INRA et consiste en une dérivation du contenu iléal, qui est soumis à une filtration membranaire. Les éléments censés être absorbés par les entérocytes (acides aminés libres, di- et tripeptides) passent dans le dialysat, qui représente la circulation



générale, tandis que les composés indigestibles restent dans le système, *i.e.* la lumière intestinale.

- L'ajout de sondes ou capteurs supplémentaires, qui, installés sur le DiDGI<sup>®</sup>, permettraient d'acquérir de nouvelles données au cours de la digestion, sans perturber celle-ci. Par exemple les conditions d'oxydation pourraient être suivies à l'aide d'une sonde de pression partielle en dioxygène. Le placement d'une sonde conductimétrique permettrait de suivre la force ionique ou bien la stabilité des émulsions. L'installation de sondes spectroscopiques, en se plaçant dans le domaine infrarouge, permettrait de suivre les variations des teneurs relatives des structures secondaires protéiques. Dans l'ultraviolet, elle rendrait possible un suivi facile des concentrations en protéines (à 214, 260 ou 280 nm). Une caméra pourrait être intéressante pour suivre les changements d'état du bol alimentaire au niveau macroscopique (précipitation, agrégation). Le suivi du volume réel (via la graduation des compartiments), ainsi que de la masse réelle (en installant des balances en dessous des compartiments) seraient de bons indicateurs de l'état macroscopique du bol. Leur suivi permettrait de tirer une évolution de la masse volumique réelle des différents compartiments digestifs. La comparaison avec les données théoriques de Storm<sup>®</sup> rendrait possible la détection de changement d'état de la matière ou de phénomènes de déphasage. Le suivi en ligne par microscopie confocale (*e.g.* tailles des agrégats protéiques) ou via des dosages physico-chimique (*e.g.* activité anti-oxydante) de caractéristiques peut aussi être possible. De manière général, un suivi de paramètre non intrusif ou qui n'implique pas de prélèvement, qualifié de suivi *in situ*, permet de s'affranchir de la variabilité liée au prélèvement et est, en ce sens, toujours intéressant.

Après cet éventail non exhaustif d'évolutions possibles du système *in vitro* dynamique, l'autre volet sur lequel nous pouvons réfléchir est celui des aliments modèles. Une modulation plus fine des aliments permettrait d'étudier l'impact de ces changements sur la digestion protéique. Sur un modèle *in vivo* si possible, ou sinon sur un modèle *in vitro* à paramétrage constant. Ce type de travail générerait des données intéressantes sur les effets structures et matrices alimentaires des aliments sur le processus digestif. En revenant sur nos aliments modèles, nous pourrions par exemple moduler la taille des gouttelettes lipidiques des émulsions. Ou encore modifier le processus de coagulation du tofu pour obtenir un gel protéique avec une structure différente, ou encore en faisant varier la quantité d'amidon dans le seitan. Comme nous nous intéressons aux protéines, l'effet de la variation thermique des différents traitements agroalimentaires, subis par les aliments, sur la digestion des protéines alimentaires, peut aussi être un champ de recherche prolifique.

Quoiqu'il en soit, la génération de données *in vivo* spécifiques à l'aliment ou au repas reste une limite à l'étude d'impact des facteurs intrinsèques à l'aliment/repas sur leur digestion. Une approche

utilisant la modélisation mathématique de la digestion permettrait de tirer, à partir des données expérimentales, des informations non accessibles en pratique, comme les flux endogènes au niveau duodéal ou les cinétiques de vidange gastrique spécifique de la fraction protéique (Le Feunteun *et al.*, 2014). De tels modèles complètent un jeu de données *in vivo* par la déduction de nouvelles données plus interprétables. Elles permettent une meilleure compréhension de la dynamique du bol alimentaire au sein du tractus gastro-intestinal, ce qui est très utile dans l'élaboration du paramétrage de systèmes *in vitro* dynamiques.

### ***Perspectives à long terme***

A long terme, il s'agirait d'établir une base de données issue de criblages et de plan d'expériences de digestion de différents aliments, dans des conditions suffisamment contrôlées. Cela permettrait de pouvoir tirer des conclusions globales des effets des caractéristiques d'une protéine sur la manière dont elle est assimilée et utilisée par l'organisme. C'est le concept de l'ingénierie reverse, dont l'objectif, appliqué aux protéines, est d'aboutir à des aliments protéiques qui soient formulés de telle sorte que leurs protéines aient un DIAAS optimal ou plus globalement, un effet escompté sur la santé. Ceci est possible en modulant la matrice alimentaire (par les process ou la formulation) qui joue sur l'accessibilité des enzymes aux substrats protéiques ; le sourcing des protéines, avec des structures plus ou moins résistantes à la digestion, qui sont plus ou moins équilibrées en acides aminés essentiels ; les traitements technologiques qui impactent sur les teneurs en certains facteurs antinutritionnels et les structures des protéines.

En parlant de qualité nutritionnelle d'une protéine, celle-ci est majoritairement estimée par son DIAAS (ou PDCAAS). Cependant, ce n'est pas le seul paramètre à prendre en compte au niveau nutritionnel. Le devenir des protéines dans le tractus digestif, notamment la nature et les cinétiques de génération de ses produits de dégradation sont aussi intéressantes. En effet, les cinétiques d'assimilation par l'organisme des protéines alimentaires, lentement ou rapidement, joue un rôle dans l'utilisation des acides aminés absorbés. Cet aspect cinétique est notamment important pour les populations avec un métabolisme protéique particulier, comme les personnes âgées ou les sportifs de haut niveau. De plus, certains des peptides générés au cours de la digestion possèdent la capacité d'influencer certaines constantes physiologiques et d'impacter sur des mécanismes biologiques via le système neuro-hormonal. Ainsi, certains peptides possèdent des propriétés antioxydantes, anti-diabétiques ou hypotensives par exemple. Un indice plus global de l'effet de la protéine alimentaire sur la santé prendrait en compte ce type d'information.

Les données mentionnées sont pour la plupart issues d'expérimentations animales, qui sont lourdes à mettre en place et non standardisées. En effet, les variables mesurées sont très dépendantes des conditions expérimentales et de la physiologie des individus. Pour obtenir des effets généraux et interprétables, l'usage de systèmes *in vitro* est intéressant. Suivant le domaine d'étude, il s'agit de savoir quels sont les paramètres digestifs importants à mimer et ceux qui le sont moins. C'est pour cela qu'une complexification des protocoles *in vitro* doit se faire pas à pas, car une complexification directe du protocole induit une augmentation des paramètres d'entrée à implémenter, qui sont dépendants de l'aliment ingéré et du modèle physiologique (adolescent, adulte, personne âgée). Il devient alors difficile d'obtenir la totalité des paramètres digestifs spécifiques au couple aliment/modèle considéré et surtout de connaître l'influence de tel ou tel paramètre d'entrée sur les éventuels effets observés sur les paramètres de sortie. Ce type de relation permettrait de tirer les quelques éléments de caractérisation de l'aliment important dans le processus digestif et de connaître la manière dont ils modulent les paramètres clés de la digestion.

## Annexes

**Tableau 35 :** PDCAAS et DIAAS de 210 produits calculés à partir d'aminogrammes et de digestibilités standardisées iléales des AA disponibles dans la littérature en prenant différents aminogrammes présentés dans le Tableau 17 comme référence.

Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 – 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Groundnut expeller-dehulled 2013.401	(CVB, 2016)	Porc	arachide	0,48	(Lys)	0,39	(Lys)	0,58	(Lys)	0,47	(Lys)	0,69	(Lys)	0,56	(Lys)	0,57	(Lys)	0,46	(Lys)
Groundnut meal, detoxified	(AMiPig, 2000)	Porc	arachide	0,36	(Lys)	0,22	(Lys)	0,43	(Lys)	0,26	(Lys)	0,51	(Lys)	0,31	(Lys)	0,43	(Lys)	0,26	(Lys)
Groundnut meal, not detoxified	(AMiPig, 2000)	Porc	arachide	0,42	(Lys)	0,37	(Lys)	0,51	(Lys)	0,45	(Lys)	0,60	(Lys)	0,53	(Lys)	0,50	(Lys)	0,44	(Lys)
Oats 1004.000.0/0	(CVB, 2016)	Porc	avoine	0,59	(Lys)	0,48	(Lys)	0,72	(Lys)	0,58	(Lys)	0,85	(Lys)	0,68	(Lys)	0,71	(Lys)	0,57	(Lys)
Oats husk meal 1004.111.0/0	(CVB, 2016)	Porc	avoine	0,59	(Lys)	0,24	(Lys)	0,72	(Lys)	0,29	(Lys)	0,85	(Lys)	0,34	(Lys)	0,71	(Lys)	0,28	(Lys)
Oats mill feed, high grade 1004.105/0/0	(CVB, 2016)	Porc	avoine	0,59	(Lys)	0,36	(Lys)	0,72	(Lys)	0,43	(Lys)	0,85	(Lys)	0,51	(Lys)	0,71	(Lys)	0,42	(Lys)
Oats, peeled 1004.116/0/0	(CVB, 2016)	Porc	avoine	0,59	(Lys)	0,51	(Lys)	0,72	(Lys)	0,62	(Lys)	0,85	(Lys)	0,73	(Lys)	0,71	(Lys)	0,61	(Lys)
Beet pulp, dehydrated	(AMiPig, 2000)	Porc	betterave	0,41	(Leu)	0,17	(Trp)	0,54	(Lys)	0,27	(Lys)	0,64	(Lys)	0,32	(Lys)	0,53	(Lys)	0,25	(Thr)
Molasses, sugarbeet 4004.210/0/0	(CVB, 2016)	Porc	betterave	0,07	(Lys)	0,07	(Lys)	0,09	(Lys)	0,08	(Lys)	0,10	(Lys)	0,10	(Lys)	0,09	(Lys)	0,08	(Lys)
Molasses, sugarcane 7002.210	(CVB, 2016)	Porc	betterave	0,06	(Lys)	0,05	(Lys)	0,07	(Lys)	0,06	(Lys)	0,08	(Lys)	0,08	(Lys)	0,07	(Lys)	0,06	(Lys)
Sugarbeet pulp, dried 4004.209/1/0	(CVB, 2016)	Porc	betterave	0,59	(Trp)	0,29	(Trp)	0,94	(Leu)	0,45	(Thr)	1,02	(Leu)	0,53	(Leu)	0,91	(Trp)	0,41	(Thr)
Vinasse, beet 4004.306	(CVB, 2016)	Porc	betterave	0,12	(Lys)	0,11	(Lys)	0,14	(Lys)	0,13	(Lys)	0,17	(Lys)	0,16	(Lys)	0,14	(Lys)	0,13	(Lys)
Biscuits, ground CFATH < 120 g/kg 9011.001/0/0	(CVB, 2016)	Porc	biscuit animal	0,36	(Lys)	0,33	(Lys)	0,44	(Lys)	0,40	(Lys)	0,52	(Lys)	0,48	(Lys)	0,43	(Lys)	0,40	(Lys)
Biscuits, ground CFATH > 120 g/kg 9011.002/0/0	(CVB, 2016)	Porc	biscuit animal	0,36	(Lys)	0,33	(Lys)	0,44	(Lys)	0,40	(Lys)	0,52	(Lys)	0,48	(Lys)	0,43	(Lys)	0,40	(Lys)
DDGS, Wheat 1010.310/0/0	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,30	(Lys)	0,17	(Lys)	0,37	(Lys)	0,21	(Lys)	0,44	(Lys)	0,25	(Lys)	0,36	(Lys)	0,21	(Lys)
Wheat feed meal 1010.105/0/0	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,58	(Lys)	0,45	(Lys)	0,70	(Lys)	0,54	(Lys)	0,83	(Lys)	0,64	(Lys)	0,69	(Lys)	0,53	(Lys)
Wheat	(AMiPig, 2000)	Porc	blé	0,40	(Lys)	0,32	(Lys)	0,48	(Lys)	0,39	(Lys)	0,58	(Lys)	0,47	(Lys)	0,48	(Lys)	0,39	(Lys)
Wheat	(Mathai, 2017)	Porc	blé	0,48	(Lys)	0,37	(Lys)	0,59	(Lys)	0,45	(Lys)	0,70	(Lys)	0,54	(Lys)	0,58	(Lys)	0,44	(Lys)
Wheat	(Bindari, 2018)	Porc	blé	0,41	(Lys)	0,30	(Lys)	0,50	(Lys)	0,37	(Lys)	0,60	(Lys)	0,43	(Lys)	0,49	(Lys)	0,36	(Lys)

Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 - 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Wheat 1010.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,41	(Lys)	0,34	(Lys)	0,49	(Lys)	0,41	(Lys)	0,58	(Lys)	0,49	(Lys)	0,48	(Lys)	0,41	(Lys)
Wheat bran	(AMiPig, 2000)	Porc	blé	0,58	(Ile)	0,43	(Lys)	0,73	(Lys)	0,52	(Lys)	0,87	(Lys)	0,62	(Lys)	0,72	(Lys)	0,52	(Lys)
Wheat bran 1010.108/0/0	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,58	(Lys)	0,39	(Ile)	0,70	(Lys)	0,48	(Lys)	0,83	(Lys)	0,57	(Lys)	0,69	(Lys)	0,47	(Lys)
Wheat distillers' grains, ethanol byproduct	(AMiPig, 2000)	Porc	blé	0,35	(Lys)	0,23	(Lys)	0,42	(Lys)	0,28	(Lys)	0,50	(Lys)	0,33	(Lys)	0,42	(Lys)	0,27	(Lys)
Wheat feed flour	(AMiPig, 2000)	Porc	blé	0,45	(Lys)	0,41	(Lys)	0,55	(Lys)	0,50	(Lys)	0,65	(Lys)	0,59	(Lys)	0,54	(Lys)	0,49	(Lys)
Wheat feed flour CF < 35 g/kg 1010.103/1/0	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,58	(Lys)	0,52	(Lys)	0,70	(Lys)	0,62	(Lys)	0,83	(Lys)	0,74	(Lys)	0,69	(Lys)	0,61	(Lys)
Wheat feed flour CF > 35 g/kg 1010.103/2/0	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,58	(Lys)	0,49	(Lys)	0,70	(Lys)	0,59	(Lys)	0,83	(Lys)	0,70	(Lys)	0,69	(Lys)	0,58	(Lys)
Wheat germ feed 1010.114/0/0	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,58	(Lys)	0,47	(Lys)	0,70	(Lys)	0,57	(Lys)	0,83	(Lys)	0,68	(Lys)	0,69	(Lys)	0,56	(Lys)
Wheat germs	(AMiPig, 2000)	Porc	blé	0,46	(Trp)	0,37	(Trp)	0,87	(Leu)	0,74	(Trp)	0,94	(Leu)	0,83	(Leu)	0,71	(Trp)	0,57	(Trp)
Wheat germs 1010.102/0/0	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,60	(Ile)	0,52	(Ile)	0,91	(Leu)	0,78	(Leu)	0,98	(Leu)	0,85	(Leu)	0,91	(Leu)	0,78	(Leu)
Wheat gluten	(AMiPig, 2000)	Porc	blé	0,23	(Lys)	0,15	(Lys)	0,28	(Lys)	0,18	(Lys)	0,33	(Lys)	0,21	(Lys)	0,27	(Lys)	0,17	(Lys)
Wheat gluten feed	(AMiPig, 2000)	Porc	blé	0,47	(Lys)	0,27	(Lys)	0,56	(Lys)	0,32	(Lys)	0,67	(Lys)	0,38	(Lys)	0,55	(Lys)	0,32	(Lys)
Wheat gluten feed, dried 1010.205	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,45	(Lys)	0,36	(Lys)	0,54	(Lys)	0,44	(Lys)	0,65	(Lys)	0,52	(Lys)	0,53	(Lys)	0,43	(Lys)
Wheat gluten meal, dried 1010.204/0/0	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,25	(Lys)	0,24	(Lys)	0,30	(Lys)	0,30	(Lys)	0,35	(Lys)	0,35	(Lys)	0,29	(Lys)	0,29	(Lys)
Wheat middlings	(AMiPig, 2000)	Porc	blé	0,58	(Ile)	0,50	(Ile)	0,73	(Lys)	0,61	(Lys)	0,86	(Lys)	0,72	(Lys)	0,71	(Lys)	0,60	(Lys)
Wheat middlings 1010.107/0/0	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,58	(Lys)	0,45	(Lys)	0,70	(Lys)	0,55	(Lys)	0,83	(Lys)	0,65	(Lys)	0,69	(Lys)	0,54	(Lys)
Wheat yeast concentrate 1010.689	(CVB, 2016)	Porc	blé	0,40	(AAA)	0,34	(AAA)	0,73	(AAA)	0,59	(Lys)	0,88	(Lys)	0,70	(Lys)	0,60	(AAA)	0,50	(AAA)
Wheat, dry (Hackl, 2010) (CP : Apparent) Trp nd	(Hackl, 2010)	Porc	blé	0,36	(Lys)	0,28	(Lys)	0,44	(Lys)	0,34	(Lys)	0,52	(Lys)	0,41	(Lys)	0,43	(Lys)	0,34	(Lys)
Palm kernel 3001.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	cœur de palmier	0,43	(Lys)	0,27	(Trp)	0,53	(Lys)	0,34	(Lys)	0,63	(Lys)	0,41	(Lys)	0,52	(Lys)	0,34	(Lys)
Palm kernel expeller 3001.401	(CVB, 2016)	Porc	cœur de palmier	0,43	(Lys)	0,28	(Trp)	0,53	(Lys)	0,34	(Lys)	0,63	(Lys)	0,41	(Lys)	0,52	(Lys)	0,34	(Lys)

Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 - 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Palm kernel meal, expeller	(AMiPig, 2000)	Porc	cœur de palmier	0,34	(Lys)	0,12	(Lys)	0,41	(Lys)	0,15	(Lys)	0,48	(Lys)	0,18	(Lys)	0,40	(Lys)	0,15	(Lys)
Rape seed 3009.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	colza	0,71	(Ile)	0,52	(Ile)	0,96	(Lys)	0,70	(Lys)	1,15	(Lys)	0,84	(Lys)	0,95	(Lys)	0,69	(Lys)
Rape seed expeller 3009.401/0/0	(CVB, 2016)	Porc	colza	0,71	(Ile)	0,53	(Ile)	0,96	(Lys)	0,71	(Lys)	1,15	(Lys)	0,85	(Lys)	0,95	(Lys)	0,70	(Lys)
Rape seed meal, solvent extracted 3009.407	(CVB, 2016)	Porc	colza	0,71	(Ile)	0,53	(Ile)	0,96	(Lys)	0,71	(Lys)	1,15	(Lys)	0,85	(Lys)	0,95	(Lys)	0,70	(Lys)
Rapeseed meal	(AMiPig, 2000)	Porc	colza	0,69	(AAA)	0,56	(Lys)	0,90	(Lys)	0,67	(Lys)	1,07	(Lys)	0,80	(Lys)	0,88	(Lys)	0,66	(Lys)
Rapeseed, full-fat	(AMiPig, 2000)	Porc	colza	0,70	(Leu)	0,50	(Leu)	1,02	(Leu)	0,72	(Leu)	1,10	(Leu)	0,78	(Leu)	1,02	(Leu)	0,72	(Leu)
Rapeseed, full-fat, treated	(AMiPig, 2000)	Porc	colza	0,64	(AAA)	0,48	(AAA)	0,98	(Leu)	0,73	(Leu)	1,06	(Leu)	0,79	(Leu)	0,96	(AAA)	0,71	(AAA)
Copra cake-CFAT 3015.401	(CVB, 2016)	Porc	copra	0,36	(Lys)	0,21	(Lys)	0,44	(Lys)	0,25	(Lys)	0,52	(Lys)	0,30	(Lys)	0,43	(Lys)	0,25	(Lys)
Cotton seed meal, expeller-dehulled 3018.401	(CVB, 2016)	Porc	coton	0,56	(Ile)	0,42	(Lys)	0,72	(Lys)	0,50	(Lys)	0,85	(Lys)	0,60	(Lys)	0,71	(Lys)	0,49	(Lys)
Cottonseed meal, decorticated	(AMiPig, 2000)	Porc	coton	0,55	(Lys)	0,34	(Lys)	0,66	(Lys)	0,42	(Lys)	0,78	(Lys)	0,49	(Lys)	0,65	(Lys)	0,41	(Lys)
Cottonseed meal, partially decorticated	(AMiPig, 2000)	Porc	coton	0,63	(Lys)	0,44	(Lys)	0,76	(Lys)	0,53	(Lys)	0,00	(Trp)	0,63	(Lys)	0,74	(Lys)	0,52	(Lys)
Greaves	(AMiPig, 2000)	Porc	cretons	0,40	(Trp)	0,31	(Trp)	0,79	(Trp)	0,63	(Trp)	1,00	(His)	0,81	(Trp)	0,61	(Trp)	0,49	(Trp)
Brewer's grains, dried 1005.301/0/0	(CVB, 2016)	Porc	drêche d'orge/malte	0,55	(Lys)	0,42	(Lys)	0,67	(Lys)	0,51	(Lys)	0,79	(Lys)	0,61	(Lys)	0,66	(Lys)	0,50	(Lys)
Feather meal	(AMiPig, 2000)	Porc	farine de plumes	0,31	(Lys)	0,20	(Lys)	0,37	(His)	0,25	(Lys)	0,45	(Lys)	0,29	(Lys)	0,37	(Lys)	0,24	(Lys)
Blood meal	(AMiPig, 2000)	Porc	farine de sang	0,26	(Ile)	0,23	(Ile)	0,45	(Ile)	0,39	(Ile)	0,48	(Ile)	0,41	(Ile)	0,51	(Ile)	0,44	(Ile)
Bloodmeal, spray dried 8002.657/0/0	(CVB, 2016)	Porc	farine de sang	0,22	(Ile)	0,16	(Ile)	0,38	(Ile)	0,28	(Ile)	0,40	(Ile)	0,30	(Ile)	0,43	(Ile)	0,32	(Ile)
Bone meal	(AMiPig, 2000)	Porc	farine d'os	0,46	(Ile)	0,39	(Ile)	0,69	(His)	0,57	(SAA)	0,82	(SAA)	0,67	(SAA)	0,73	(His)	0,61	(SAA)
Bone meal 8005.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	farine d'os	0,18	(Trp)	0,15	(Trp)	0,35	(Trp)	0,29	(Trp)	0,45	(Trp)	0,38	(Trp)	0,27	(Trp)	0,23	(Trp)
Meat and bone meal	(AMiPig, 2000)	Porc	farine d'os	0,36	(Trp)	0,29	(Trp)	0,71	(Trp)	0,57	(Trp)	0,92	(Trp)	0,74	(Trp)	0,55	(Trp)	0,44	(Trp)
Meat and bone meal, low digestibility	(AMiPig, 2000)	Porc	farine d'os	0,35	(Trp)	0,28	(Trp)	0,71	(Trp)	0,55	(Trp)	0,91	(Trp)	0,71	(Trp)	0,55	(Trp)	0,43	(Trp)

Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 – 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Faba bean	(AMiPig, 2000)	Porc	féverole	0,47	(Trp)	0,38	(Trp)	0,74	(SAA)	0,59	(SAA)	0,87	(SAA)	0,69	(SAA)	0,72	(Trp)	0,59	(Trp)
Horse beans 2002.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	féverole	0,53	(Trp)	0,36	(Trp)	0,78	(SAA)	0,48	(SAA)	0,91	(SAA)	0,56	(SAA)	0,82	(Trp)	0,52	(SAA)
Horsebeans, white 2017.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	féverole	0,53	(Trp)	0,40	(Trp)	0,78	(SAA)	0,60	(SAA)	0,91	(SAA)	0,71	(SAA)	0,82	(Trp)	0,62	(Trp)
Niger seed 3002.000.0/0	(CVB, 2016)	Porc	graine du Niger	0,54	(Lys)	0,38	(Lys)	0,65	(Lys)	0,45	(Lys)	0,77	(Lys)	0,54	(Lys)	0,64	(Lys)	0,45	(Lys)
Feed beans, heat treated 2001.616/0/0	(CVB, 2016)	Porc	haricot	0,59	(Trp)	0,32	(Trp)	0,81	(SAA)	0,41	(SAA)	0,96	(SAA)	0,48	(SAA)	0,88	(SAA)	0,44	(SAA)
Grass meal 5010.610	(CVB, 2016)	Porc	herbe	0,57	(Lys)	0,27	(Lys)	0,68	(Lys)	0,33	(Lys)	0,81	(Lys)	0,39	(Lys)	0,67	(Lys)	0,32	(Lys)
Casein (Human)	(Deglaire, 2009)	Homme	lait	0,84	(Ile)	0,79	(Ile)	1,23	(Thr)	1,14	(Thr)	1,46	(Leu)	1,41	(Val)	1,12	(Thr)	1,04	(Thr)
Casein (Pigs)	(Deglaire, 2009)	Porc	lait	0,84	(Ile)	0,81	(Ile)	1,23	(Thr)	1,16	(Thr)	1,46	(Leu)	1,44	(Thr)	1,12	(Thr)	1,06	(Thr)
Casein 8010.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	lait	0,76	(Trp)	0,75	(Trp)	1,26	(SAA)	1,24	(SAA)	1,48	(SAA)	1,45	(SAA)	1,18	(Trp)	1,16	(Trp)
Cheese whey, fresh 8023.000	(CVB, 2016)	Porc	lait	0,55	(AAA)	0,50	(AAA)	0,80	(His)	0,72	(His)	1,00	(His)	0,90	(His)	0,83	(AAA)	0,74	(AAA)
Hydrolized Casein (Human)	(Deglaire, 2009)	Homme	lait	0,84	(Ile)	0,78	(Ile)	1,23	(Thr)	1,13	(Thr)	1,46	(Leu)	1,39	(Val)	1,12	(Thr)	1,03	(Thr)
Hydrolized Casein (Pigs)	(Deglaire, 2009)	Porc	lait	0,84	(Ile)	0,77	(Ile)	1,23	(Thr)	1,13	(Thr)	1,46	(Leu)	1,38	(Val)	1,12	(Thr)	1,03	(Thr)
Milk (Gaudichon, 2002)	(Gaudichon, 2002)	Homme	lait	0,80	(AAA)	0,78	(AAA)	1,21	(His)	1,14	(His)	1,51	(His)	1,43	(His)	1,20	(AAA)	1,17	(AAA)
Milk powder, skimmed	(AMiPig, 2000)	Porc	lait	0,93	(SAA)	0,87	(SAA)	1,14	(SAA)	1,07	(SAA)	1,34	(SAA)	1,25	(SAA)	1,23	(SAA)	1,15	(Thr)
Milk powder, skimmed 8008.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	lait	0,76	(Trp)	0,70	(Trp)	1,30	(SAA)	1,24	(SAA)	1,52	(SAA)	1,42	(Val)	1,18	(Trp)	1,08	(Trp)
Milk powder, whole	(AMiPig, 2000)	Porc	lait	0,77	(Trp)	0,74	(Trp)	1,08	(His)	1,05	(His)	1,35	(His)	1,29	(Val)	1,14	(His)	1,08	(Lys)
Milk powder, whole 8012.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	lait	0,76	(Trp)	0,70	(Trp)	1,30	(SAA)	1,23	(SAA)	1,52	(SAA)	1,40	(Val)	1,18	(Trp)	1,08	(Trp)
Milk protein concentrate	(AMiPig, 2000)	Porc	lait	0,64	(Trp)	0,58	(Trp)	0,94	(SAA)	0,82	(SAA)	1,07	(Val)	0,96	(Val)	0,99	(Leu)	0,89	(SAA)
Milk protein concentrate	(Mathai, 2017)	Porc	lait	0,87	(Trp)	0,85	(Trp)	1,25	(SAA)	1,18	(SAA)	1,47	(SAA)	1,39	(SAA)	1,31	(Thr)	1,22	(Thr)
Skimmed milk powder	(Mathai, 2017)	Porc	lait	0,92	(Trp)	0,81	(Thr)	1,17	(SAA)	1,05	(SAA)	1,37	(SAA)	1,24	(SAA)	1,26	(SAA)	1,04	(Thr)
Whey powder 8009.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	lait	0,61	(AAA)	0,55	(AAA)	0,90	(His)	0,81	(His)	1,13	(His)	1,01	(His)	0,90	(AAA)	0,81	(AAA)
Whey powder, low lactose 8009.626	(CVB, 2016)	Porc	lait	0,61	(AAA)	0,56	(AAA)	0,90	(His)	0,83	(His)	1,13	(His)	1,04	(His)	0,90	(AAA)	0,83	(AAA)
Whey protein concentrate	(Mathai, 2017)	Porc	lait	0,74	(AAA)	0,71	(AAA)	1,10	(His)	1,07	(His)	1,38	(His)	1,34	(His)	1,10	(AAA)	1,06	(AAA)

Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 – 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Whey protein isolate	(Mathai, 2017)	Porc	lait	0,68	(AAA)	0,67	(AAA)	1,00	(His)	1,00	(His)	1,25	(His)	1,25	(His)	1,01	(AAA)	1,00	(AAA)
Whey, acid, dehydrated	(AMiPig, 2000)	Porc	lait	0,32	(AAA)	0,26	(AAA)	0,59	(AAA)	0,47	(AAA)	0,74	(AAA)	0,60	(AAA)	0,48	(AAA)	0,39	(AAA)
Lentils 2008.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	lentille	0,53	(Trp)	0,36	(Trp)	0,67	(SAA)	0,46	(SAA)	0,78	(SAA)	0,54	(SAA)	0,72	(SAA)	0,49	(SAA)
Brewer's yeast, dried 9001.315/0/0	(CVB, 2016)	Porc	levures de bière	0,71	(Trp)	0,60	(Trp)	1,00	(SAA)	0,77	(SAA)	1,11	(Leu)	0,90	(SAA)	1,03	(Leu)	0,83	(SAA)
Yeast, brewers	(AMiPig, 2000)	Porc	levures de bière	0,62	(SAA)	0,35	(Trp)	0,76	(SAA)	0,47	(SAA)	0,89	(SAA)	0,56	(SAA)	0,82	(SAA)	0,51	(SAA)
Yeast, brewers, high protein	(AMiPig, 2000)	Porc	levures de bière	0,47	(SAA)	0,19	(Trp)	0,58	(SAA)	0,28	(SAA)	0,68	(SAA)	0,33	(SAA)	0,62	(Lys)	0,30	(Trp)
Linseed 3006.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	lin	0,54	(Lys)	0,45	(Lys)	0,65	(Lys)	0,54	(Lys)	0,77	(Lys)	0,64	(Lys)	0,64	(Lys)	0,53	(Lys)
Linseed expeller 3006.401/0/0	(CVB, 2016)	Porc	lin	0,54	(Lys)	0,44	(Lys)	0,65	(Lys)	0,53	(Lys)	0,77	(Lys)	0,63	(Lys)	0,64	(Lys)	0,52	(Lys)
Linseed meal 3006.407/0/0	(CVB, 2016)	Porc	lin	0,54	(Lys)	0,44	(Lys)	0,65	(Lys)	0,53	(Lys)	0,77	(Lys)	0,63	(Lys)	0,64	(Lys)	0,52	(Lys)
Lupin	(AMiPig, 2000)	Porc	lupin	0,45	(Trp)	0,53	(SAA)	0,79	(SAA)	0,65	(SAA)	0,92	(SAA)	0,77	(SAA)	0,70	(Trp)	0,70	(SAA)
Lupins-CP < 335 g/kg 2004.000/1/0	(CVB, 2016)	Porc	lupin	0,47	(Trp)	0,41	(Trp)	0,81	(SAA)	0,70	(SAA)	0,96	(SAA)	0,82	(SAA)	0,73	(Trp)	0,63	(Trp)
Alfalfa, dehydrated	(AMiPig, 2000)	Porc	luzerne	0,62	(Lys)	0,35	(Trp)	0,75	(Lys)	0,44	(Lys)	0,89	(Lys)	0,52	(Lys)	0,73	(Lys)	0,43	(Lys)
Lucerne (alfalfa) meal 5004.610	(CVB, 2016)	Porc	luzerne	0,62	(Lys)	0,29	(Lys)	0,75	(Lys)	0,35	(Lys)	0,90	(Lys)	0,41	(Lys)	0,74	(Lys)	0,34	(Lys)
Corn distillers	(AMiPig, 2000)	Porc	maïs	0,25	(Trp)	0,07	(Trp)	0,50	(Lys)	0,14	(Trp)	0,59	(Lys)	0,18	(Trp)	0,39	(Trp)	0,11	(Trp)
Corn gluten feed	(AMiPig, 2000)	Porc	maïs	0,38	(Trp)	0,25	(Trp)	0,54	(Lys)	0,36	(Lys)	0,64	(Lys)	0,42	(Lys)	0,53	(Lys)	0,35	(Lys)
Corn gluten meal	(AMiPig, 2000)	Porc	maïs	0,25	(Lys)	0,22	(Lys)	0,30	(Lys)	0,27	(Lys)	0,36	(Lys)	0,32	(Lys)	0,30	(Lys)	0,26	(Lys)
DDGS, Maize 1002.310/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,35	(Lys)	0,20	(Lys)	0,42	(Lys)	0,24	(Lys)	0,50	(Lys)	0,29	(Lys)	0,41	(Lys)	0,24	(Lys)
Maize	(AMiPig, 2000)	Porc	maïs	0,40	(Trp)	0,32	(Trp)	0,51	(Lys)	0,41	(Lys)	0,61	(Lys)	0,49	(Lys)	0,50	(Lys)	0,40	(Lys)
Maize 1002.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,41	(Trp)	0,31	(Trp)	0,51	(Lys)	0,38	(Lys)	0,60	(Lys)	0,45	(Lys)	0,50	(Lys)	0,38	(Lys)
Maize bran 1002.108/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,41	(Trp)	0,30	(Trp)	0,56	(Lys)	0,39	(Lys)	0,67	(Lys)	0,47	(Lys)	0,55	(Lys)	0,39	(Lys)
Maize feed flour 1002.103/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,41	(Trp)	0,33	(Trp)	0,56	(Lys)	0,45	(Lys)	0,67	(Lys)	0,53	(Lys)	0,55	(Lys)	0,44	(Lys)
Maize feed meal 1002.105/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,41	(Trp)	0,30	(Trp)	0,56	(Lys)	0,43	(Lys)	0,67	(Lys)	0,51	(Lys)	0,55	(Lys)	0,42	(Lys)



Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 – 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Maize feed meal, solvent extracted 1002.416/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,41	(Trp)	0,30	(Trp)	0,56	(Lys)	0,43	(Lys)	0,67	(Lys)	0,51	(Lys)	0,55	(Lys)	0,42	(Lys)
Maize germ meal feed expeller 1002.419/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,41	(Trp)	0,24	(Trp)	0,56	(Lys)	0,35	(Lys)	0,67	(Lys)	0,41	(Lys)	0,55	(Lys)	0,34	(Lys)
Maize germ meal, solvent extracted 1002.418/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,41	(Trp)	0,26	(Trp)	0,56	(Lys)	0,33	(Lys)	0,67	(Lys)	0,39	(Lys)	0,55	(Lys)	0,33	(Lys)
Maize germ meal, starch byproduct	(AMiPig, 2000)	Porc	maïs	0,56	(Trp)	0,37	(Lys)	0,73	(Lys)	0,45	(Lys)	0,87	(Lys)	0,53	(Lys)	0,72	(Lys)	0,44	(Lys)
Maize gluten feed 1002.205	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,35	(Trp)	0,23	(Trp)	0,53	(Lys)	0,34	(Lys)	0,63	(Lys)	0,41	(Lys)	0,52	(Lys)	0,34	(Lys)
Maize gluten meal 1002.204/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,25	(Lys)	0,21	(Lys)	0,30	(Lys)	0,26	(Lys)	0,35	(Lys)	0,31	(Lys)	0,29	(Lys)	0,26	(Lys)
Maize hominy feed	(AMiPig, 2000)	Porc	maïs	0,38	(Trp)	0,23	(Trp)	0,49	(Lys)	0,32	(Lys)	0,59	(Lys)	0,38	(Lys)	0,48	(Lys)	0,31	(Lys)
Maize, chemical/heat treated 1002.629/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,41	(Trp)	0,31	(Trp)	0,51	(Lys)	0,38	(Lys)	0,60	(Lys)	0,45	(Lys)	0,50	(Lys)	0,38	(Lys)
Maize, distillers solubles, dried 1002.308/0/0	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,35	(Lys)	0,22	(Lys)	0,42	(Lys)	0,27	(Lys)	0,50	(Lys)	0,32	(Lys)	0,41	(Lys)	0,26	(Lys)
Malt culms 1005.310	(CVB, 2016)	Porc	maïs	0,55	(Ile)	0,43	(Ile)	0,74	(Lys)	0,54	(Lys)	0,88	(Lys)	0,64	(Lys)	0,72	(Lys)	0,53	(Lys)
Nutridense maize	(Cervantes-Pahm, 2014)	Porc	maïs	0,33	(Trp)	0,24	(Trp)	0,58	(Lys)	0,46	(Lys)	0,69	(Lys)	0,54	(Lys)	0,52	(Trp)	0,38	(Trp)
Yellow dent maize	(Cervantes-Pahm, 2014)	Porc	maïs	0,39	(Trp)	0,27	(Trp)	0,54	(Lys)	0,40	(Lys)	0,64	(Lys)	0,48	(Lys)	0,53	(Lys)	0,39	(Lys)
Millet 1006.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	millet	0,26	(Lys)	0,21	(Lys)	0,32	(Lys)	0,26	(Lys)	0,38	(Lys)	0,31	(Lys)	0,31	(Lys)	0,25	(Lys)
Millet, (pearl millet) 1013.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	millet	0,26	(Lys)	0,21	(Lys)	0,32	(Lys)	0,26	(Lys)	0,38	(Lys)	0,31	(Lys)	0,31	(Lys)	0,25	(Lys)
Barley	(AMiPig, 2000)	Porc	orge	0,53	(Lys)	0,40	(Lys)	0,64	(Lys)	0,48	(Lys)	0,76	(Lys)	0,57	(Lys)	0,63	(Lys)	0,47	(Lys)
Barley 1005.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	orge	0,52	(Lys)	0,40	(Lys)	0,63	(Lys)	0,48	(Lys)	0,75	(Lys)	0,57	(Lys)	0,62	(Lys)	0,47	(Lys)
Barley brewers' grains	(AMiPig, 2000)	Porc	orge	0,51	(Lys)	0,42	(Lys)	0,61	(Lys)	0,50	(Lys)	0,73	(Lys)	0,60	(Lys)	0,60	(Lys)	0,49	(Lys)
Barley distillers' grains, ethanol byproduct	(AMiPig, 2000)	Porc	orge	0,42	(Lys)	0,31	(Lys)	0,51	(Lys)	0,38	(Lys)	0,61	(Lys)	0,45	(Lys)	0,51	(Lys)	0,37	(Lys)
Barley feed, high grade 1005.112/0/0	(CVB, 2016)	Porc	orge	0,62	(Lys)	0,42	(Lys)	0,75	(Lys)	0,51	(Lys)	0,90	(Lys)	0,61	(Lys)	0,74	(Lys)	0,50	(Lys)
Barley, dry (Hackl, 2010) (CP : Apparent) Trp nd	(Hackl, 2010)	Porc	orge	0,49	(Lys)	0,36	(Lys)	0,59	(Lys)	0,44	(Lys)	0,70	(Lys)	0,52	(Lys)	0,58	(Lys)	0,43	(Lys)

Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 – 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Barley, mill by-product 1005.105/0/0	(CVB, 2016)	Porc	orge	0,62	(Lys)	0,41	(Lys)	0,75	(Lys)	0,49	(Lys)	0,90	(Lys)	0,58	(Lys)	0,74	(Lys)	0,48	(Lys)
Dehulled barley	(Cervantes-Pahm, 2014)	Porc	orge	0,48	(Lys)	0,35	(Lys)	0,58	(Lys)	0,43	(Lys)	0,69	(Lys)	0,51	(Lys)	0,57	(Lys)	0,42	(Lys)
Dehulled oats	(Cervantes-Pahm, 2014)	Porc	orge	0,45	(Trp)	0,37	(Trp)	0,76	(Lys)	0,65	(Lys)	0,91	(Lys)	0,77	(Lys)	0,69	(Trp)	0,57	(Trp)
Oat protein concentrate	(Abelilla, 2017)	Porc	orge	0,52	(Lys)	0,44	(Lys)	0,63	(Lys)	0,54	(Lys)	0,74	(Lys)	0,64	(Lys)	0,62	(Lys)	0,53	(Lys)
Oats	(AMiPig, 2000)	Porc	orge	0,59	(Lys)	0,43	(Lys)	0,72	(Lys)	0,52	(Lys)	0,85	(Lys)	0,62	(Lys)	0,71	(Lys)	0,52	(Lys)
Oats, decorticated	(AMiPig, 2000)	Porc	orge	0,58	(Lys)	0,46	(Lys)	0,70	(Lys)	0,56	(Lys)	0,84	(Lys)	0,66	(Lys)	0,69	(Lys)	0,55	(Lys)
Bread (remains) 1010.612/0/0	(CVB, 2016)	Porc	pain	0,36	(Lys)	0,33	(Lys)	0,44	(Lys)	0,40	(Lys)	0,52	(Lys)	0,48	(Lys)	0,43	(Lys)	0,40	(Lys)
Sweet potatoes, dired 4007.611/0/0	(CVB, 2016)	Porc	patate douce	0,56	(Ile)	0,30	(Ile)	0,70	(Lys)	0,38	(Lys)	0,83	(Lys)	0,45	(Lys)	0,69	(Lys)	0,37	(Lys)
Pea	(AMiPig, 2000)	Porc	pois	0,52	(Trp)	0,38	(Trp)	0,83	(SAA)	0,63	(SAA)	0,98	(SAA)	0,73	(SAA)	0,81	(Trp)	0,59	(Trp)
Pea protein concentrate	(Mathai, 2017)	Porc	pois	0,52	(Trp)	0,45	(Trp)	0,76	(SAA)	0,62	(SAA)	0,89	(SAA)	0,73	(SAA)	0,80	(Trp)	0,67	(SAA)
Pea, extruded	(AMiPig, 2000)	Porc	pois	0,48	(Trp)	0,43	(Trp)	0,83	(SAA)	0,72	(SAA)	0,97	(SAA)	0,85	(SAA)	0,74	(Trp)	0,66	(Trp)
Peas 2006.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	pois	0,53	(Trp)	0,37	(Trp)	0,93	(SAA)	0,65	(SAA)	1,09	(SAA)	0,77	(SAA)	0,82	(Trp)	0,57	(Trp)
Fish meal	(AMiPig, 2000)	Porc	poisson	0,63	(Trp)	0,56	(Trp)	1,10	(Leu)	1,03	(Leu)	1,19	(Leu)	1,12	(Leu)	0,97	(Trp)	0,86	(Trp)
Fish meal, treated 8015.000	(CVB, 2016)	Porc	poisson	0,65	(Trp)	0,56	(Trp)	1,11	(Leu)	1,00	(Leu)	1,20	(Leu)	1,08	(Leu)	1,00	(Trp)	0,86	(Trp)
Fish solubles	(AMiPig, 2000)	Porc	poisson	0,31	(AAA)	0,31	(AAA)	0,57	(AAA)	0,56	(Ile)	0,61	(Ile)	0,59	(Ile)	0,47	(AAA)	0,46	(AAA)
Potato crisps 4001.664/0/0	(CVB, 2016)	Porc	pomme de terre	0,53	(Trp)	0,26	(Trp)	0,85	(His)	0,42	(His)	1,00	(Leu)	0,49	(Leu)	0,82	(Trp)	0,41	(Trp)
Potato cuttings/chips, prefried 4001.637	(CVB, 2016)	Porc	pomme de terre	0,53	(Trp)	0,29	(Trp)	0,85	(His)	0,46	(His)	1,00	(Leu)	0,55	(Leu)	0,82	(Trp)	0,45	(Trp)
Potato protein 4001.203/1/0	(CVB, 2016)	Porc	pomme de terre	0,82	(Trp)	0,66	(Trp)	1,10	(His)	0,96	(His)	1,38	(His)	1,20	(His)	1,16	(His)	1,01	(His)
Potato protein concentrate	(AMiPig, 2000)	Porc	pomme de terre	0,55	(Trp)	0,41	(Trp)	1,11	(Trp)	0,83	(Trp)	1,42	(Trp)	1,07	(Trp)	0,85	(Trp)	0,64	(Trp)

Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 – 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Potato pulp, dried CP < 90g/kg 4001.202/1/0	(CVB, 2016)	Porc	pomme de terre	0,64	(Leu)	0,25	(Leu)	0,92	(Leu)	0,37	(Leu)	1,00	(Leu)	0,40	(Leu)	0,92	(Leu)	0,37	(Leu)
Potato pulp, dried CP 90 - 130 g/kg 4001.202/1/0	(CVB, 2016)	Porc	pomme de terre	0,64	(Leu)	0,32	(Leu)	0,92	(Leu)	0,46	(Leu)	1,00	(Leu)	0,50	(Leu)	0,92	(Leu)	0,46	(Leu)
Potatoes, dried 4001.611/0/0	(CVB, 2016)	Porc	pomme de terre	0,72	(Leu)	0,43	(Leu)	0,85	(His)	0,50	(His)	1,06	(His)	0,63	(His)	0,89	(His)	0,53	(His)
Potato-peelings, steamed 4001.638	(CVB, 2016)	Porc	pomme de terre	0,59	(Trp)	0,31	(Trp)	0,85	(His)	0,51	(His)	1,02	(Leu)	0,62	(Leu)	0,89	(His)	0,48	(Trp)
Citrus pulp 6022.305/0/0	(CVB, 2016)	Porc	pulpe de citron	0,38	(Lys)	0,14	(Lys)	0,46	(Lys)	0,17	(Lys)	0,54	(Lys)	0,20	(Lys)	0,45	(Lys)	0,17	(Lys)
Polished white rice	(Cervantes-Pahm, 2014)	Porc	riz	0,46	(Trp)	0,43	(Trp)	0,58	(Lys)	0,54	(Lys)	0,69	(Lys)	0,64	(Lys)	0,57	(Lys)	0,53	(Lys)
Rice (parental rice) (Hu, 2010) (Dig tronquée)	(Hu, 2010)	Porc	riz	0,36	(Trp)	0,36	(Trp)	0,58	(Lys)	0,55	(Lys)	0,69	(Lys)	0,65	(Lys)	0,55	(Trp)	0,54	(Lys)
Rice bran	(AMiPig, 2000)	Porc	riz	0,66	(Trp)	0,48	(Ile)	0,88	(Lys)	0,66	(Lys)	1,04	(Lys)	0,78	(Lys)	0,86	(Lys)	0,65	(Lys)
Rice bran meal, solvent extracted 1003.416/0/0	(CVB, 2016)	Porc	riz	0,61	(Lys)	0,38	(Lys)	0,74	(Lys)	0,46	(Lys)	0,88	(Lys)	0,54	(Lys)	0,72	(Lys)	0,45	(Lys)
Rice feed meal ASH < 90 g/kg 1003.122/1/0	(CVB, 2016)	Porc	riz	0,61	(Lys)	0,38	(Lys)	0,74	(Lys)	0,46	(Lys)	0,88	(Lys)	0,54	(Lys)	0,72	(Lys)	0,45	(Lys)
Rice feed meal ASH > 90 g/kg 1003.122/2/0	(CVB, 2016)	Porc	riz	0,61	(Lys)	0,38	(Lys)	0,74	(Lys)	0,46	(Lys)	0,88	(Lys)	0,54	(Lys)	0,72	(Lys)	0,45	(Lys)
Rice husk 1003.115/0/0	(CVB, 2016)	Porc	riz	0,61	(Lys)	0,24	(Lys)	0,74	(Lys)	0,29	(Lys)	0,88	(Lys)	0,35	(Lys)	0,72	(Lys)	0,29	(Lys)
Rice with hulls 1003.000/2/0	(CVB, 2016)	Porc	riz	0,61	(Lys)	0,49	(Lys)	0,74	(Lys)	0,59	(Lys)	0,88	(Lys)	0,70	(Lys)	0,72	(Lys)	0,58	(Lys)
Rice-dehulled 1003.000/1/0	(CVB, 2016)	Porc	riz	0,61	(Lys)	0,57	(Lys)	0,74	(Lys)	0,69	(Lys)	0,88	(Lys)	0,82	(Lys)	0,72	(Lys)	0,68	(Lys)
Rice-genetically modified (expressing human lactoferrin gene) (Hu, 2010) (Dig tronquée)	(Hu, 2010)	Porc	riz	0,36	(Trp)	0,36	(Trp)	0,69	(Lys)	0,68	(Lys)	0,82	(Lys)	0,81	(Lys)	0,56	(Trp)	0,56	(Trp)
Rye	(AMiPig, 2000)	Porc	seigle	0,59	(Lys)	0,42	(Lys)	0,71	(Lys)	0,51	(Lys)	0,84	(Lys)	0,61	(Lys)	0,70	(Lys)	0,50	(Lys)
Rye	(Cervantes-Pahm, 2014)	Porc	seigle	0,44	(Trp)	0,33	(Trp)	0,59	(Lys)	0,40	(Lys)	0,71	(Lys)	0,47	(Lys)	0,58	(Lys)	0,39	(Lys)
Rye 1007.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	seigle	0,55	(Lys)	0,41	(Lys)	0,67	(Lys)	0,50	(Lys)	0,79	(Lys)	0,59	(Lys)	0,66	(Lys)	0,49	(Lys)

Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 - 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Sesame meal, solvent extracted	(AMiPig, 2000)	Porc	sésame	0,38	(Lys)	0,33	(Lys)	0,46	(Lys)	0,40	(Lys)	0,55	(Lys)	0,48	(Lys)	0,46	(Lys)	0,40	(Lys)
Sesame seed expeller or solvent extracted 3005.401/407	(CVB, 2016)	Porc	sésame	0,36	(Lys)	0,30	(Lys)	0,44	(Lys)	0,36	(Lys)	0,52	(Lys)	0,43	(Lys)	0,43	(Lys)	0,35	(Lys)
Soy proteins (Gaudichon, 2002)	(Gaudichon, 2002)	Homme	soja	0,75	(AAA)	0,72	(AAA)	0,99	(Lys)	0,94	(Lys)	1,18	(Lys)	1,12	(Lys)	0,98	(Lys)	0,93	(Lys)
Soya bean expeller 3012.401/0/0	(CVB, 2016)	Porc	soja	0,76	(Trp)	0,67	(Trp)	1,07	(SAA)	0,93	(SAA)	1,20	(Val)	1,04	(Val)	1,07	(Lys)	0,95	(Lys)
Soya bean hulls 3012.505	(CVB, 2016)	Porc	soja	0,65	(Trp)	0,39	(Trp)	0,95	(Leu)	0,63	(Leu)	1,03	(Leu)	0,68	(Leu)	0,95	(Leu)	0,60	(Trp)
Soya bean meal, solvent extracted 3012.407	(CVB, 2016)	Porc	soja	0,76	(Trp)	0,67	(Trp)	1,07	(SAA)	0,92	(SAA)	1,20	(Val)	1,03	(Val)	1,07	(Lys)	0,94	(Lys)
Soya bean meal, solvent extracted-HiPro CF < 45 g/kg 3012.407/1	(CVB, 2016)	Porc	soja	0,76	(Trp)	0,68	(Trp)	1,07	(SAA)	0,94	(SAA)	1,20	(Val)	1,06	(Val)	1,07	(Lys)	0,96	(Lys)
Soya bean meal, solvent extracted-HiPro CF 45 - 70 g/kg 3012.407/2	(CVB, 2016)	Porc	soja	0,76	(Trp)	0,67	(Trp)	1,07	(SAA)	0,92	(SAA)	1,20	(Val)	1,03	(Val)	1,07	(Lys)	0,94	(Lys)
Soya bean, heat treated 3012.616/0/0	(CVB, 2016)	Porc	soja	0,76	(Trp)	0,63	(Leu)	1,07	(SAA)	0,84	(SAA)	1,20	(Val)	0,94	(Val)	1,07	(Lys)	0,89	(Lys)
Soya flour	(Mathai, 2017)	Porc	soja	0,80	(Leu)	0,73	(Leu)	1,03	(SAA)	0,89	(SAA)	1,21	(SAA)	1,05	(SAA)	1,09	(Lys)	0,97	(SAA)
Soya protein isolate	(Mathai, 2017)	Porc	soja	0,73	(SAA)	0,69	(SAA)	0,90	(SAA)	0,84	(SAA)	1,05	(SAA)	0,98	(SAA)	0,97	(SAA)	0,91	(SAA)
Soybean concentrate	(AMiPig, 2000)	Porc	soja	0,72	(Trp)	0,68	(Trp)	1,15	(Lys)	1,10	(Lys)	1,27	(Val)	1,19	(Val)	1,11	(Trp)	1,05	(Trp)
Soybean hulls	(AMiPig, 2000)	Porc	soja	0,66	(Leu)	0,42	(Trp)	0,95	(Leu)	0,58	(Lys)	1,03	(Leu)	0,67	(Val)	0,95	(Lys)	0,57	(Lys)
Soybean meal (Petersen, 2005)	(Petersen, 2005)	Porc	soja	0,83	(Leu)	0,74	(Leu)	1,13	(SAA)	1,01	(SAA)	1,26	(Val)	1,11	(Val)	1,12	(Lys)	1,01	(Lys)
Soybean meal mixture	(Rojas, 2013)	Porc	soja	0,90	(Leu)	0,80	(Leu)	1,11	(SAA)	0,99	(SAA)	1,30	(SAA)	1,17	(SAA)	1,20	(SAA)	1,07	(SAA)
Soybean meal, crude fibre < 5%	(AMiPig, 2000)	Porc	soja	0,72	(Trp)	0,67	(Trp)	1,05	(SAA)	0,95	(SAA)	1,18	(Val)	1,06	(Val)	1,05	(Lys)	0,97	(Lys)
Soybean meal, crude fibre > 5%	(AMiPig, 2000)	Porc	soja	0,76	(Trp)	0,67	(Trp)	1,00	(SAA)	0,88	(SAA)	1,18	(SAA)	1,03	(SAA)	1,05	(Lys)	0,93	(Lys)
Soybean meal, extruded	(AMiPig, 2000)	Porc	soja	0,78	(Leu)	0,67	(Trp)	1,08	(Lys)	0,96	(Lys)	1,21	(Val)	1,06	(Val)	1,06	(Lys)	0,95	(Lys)
Soybean, full-fat, treated	(AMiPig, 2000)	Porc	soja	0,72	(Trp)	0,58	(Trp)	1,11	(Lys)	0,90	(SAA)	1,28	(Val)	1,00	(Val)	1,09	(Lys)	0,89	(Trp)
Spent hen-soybean meal mixture	(Rojas, 2013)	Porc	soja viande	0,62	(Trp)	0,56	(Trp)	1,04	(Val)	0,71	(SAA)	1,12	(Val)	0,83	(SAA)	0,95	(Trp)	0,76	(SAA)
Sorghum	(AMiPig, 2000)	Porc	sorgho	0,31	(Lys)	0,23	(Lys)	0,38	(Lys)	0,28	(Lys)	0,45	(Lys)	0,33	(Lys)	0,37	(Lys)	0,28	(Lys)

Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 – 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Sorghum	(Cervantes-Pahm, 2014)	Porc	sorgho	0,30	(Lys)	0,20	(Lys)	0,36	(Lys)	0,25	(Lys)	0,43	(Lys)	0,29	(Lys)	0,35	(Lys)	0,24	(Lys)
Sorghum 1008.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	sorgho	0,35	(Lys)	0,28	(Lys)	0,42	(Lys)	0,34	(Lys)	0,50	(Lys)	0,40	(Lys)	0,41	(Lys)	0,33	(Lys)
Sorghum gluten meal 1008.204/0/0	(CVB, 2016)	Porc	sorgho	0,33	(Lys)	0,27	(Lys)	0,40	(Lys)	0,33	(Lys)	0,48	(Lys)	0,39	(Lys)	0,40	(Lys)	0,33	(Lys)
Tapioca, dried 4008.611	(CVB, 2016)	Porc	tapioca	0,54	(Lys)	0,29	(Lys)	0,65	(Lys)	0,35	(Lys)	0,77	(Lys)	0,42	(Lys)	0,64	(Lys)	0,34	(Lys)
Sunflower meal, not decorticated	(AMiPig, 2000)	Porc	tournesol	0,52	(Lys)	0,41	(Lys)	0,63	(Lys)	0,50	(Lys)	0,74	(Lys)	0,59	(Lys)	0,61	(Lys)	0,49	(Lys)
Sunflower meal, partially decorticated	(AMiPig, 2000)	Porc	tournesol	0,53	(Lys)	0,43	(Lys)	0,64	(Lys)	0,52	(Lys)	0,75	(Lys)	0,62	(Lys)	0,62	(Lys)	0,51	(Lys)
Sunflower seed or meal expeller-dehulled 3003.401	(CVB, 2016)	Porc	tournesol	0,51	(Lys)	0,40	(Lys)	0,61	(Lys)	0,49	(Lys)	0,73	(Lys)	0,58	(Lys)	0,60	(Lys)	0,48	(Lys)
Triticale 1012.000/0/0	(CVB, 2016)	Porc	triticale	0,48	(Lys)	0,40	(Lys)	0,58	(Lys)	0,48	(Lys)	0,69	(Lys)	0,57	(Lys)	0,57	(Lys)	0,47	(Lys)
Triticale	(AMiPig, 2000)	Porc	triticale	0,52	(Lys)	0,43	(Lys)	0,63	(Lys)	0,52	(Lys)	0,75	(Lys)	0,62	(Lys)	0,62	(Lys)	0,51	(Lys)
Beef gelatin (Petersen, 2005)	(Petersen, 2005)	Porc	viande	0,26	(AAA)	0,23	(AAA)	0,47	(AAA)	0,42	(AAA)	0,54	(Leu)	0,47	(Leu)	0,39	(AAA)	0,34	(AAA)
Bovine collagen hydrolyzate	(Bindari, 2018)	Porc	viande	0,03	(Trp)	0,02	(Trp)	0,05	(Trp)	0,05	(Trp)	0,07	(Trp)	0,06	(Trp)	0,04	(Trp)	0,04	(Trp)
Bovine Meat, Boiled	(Hodgkinson, 2018)	Porc	viande	0,69	(AAA)	0,68	(AAA)	0,96	(SAA)	0,95	(SAA)	1,08	(Val)	1,07	(Val)	1,03	(AAA)	1,02	(AAA)
Bovine Meat, Grilled	(Hodgkinson, 2018)	Porc	viande	0,61	(AAA)	0,60	(AAA)	0,82	(Val)	0,80	(Val)	0,89	(Val)	0,86	(Val)	0,89	(SAA)	0,87	(SAA)
Bovine Meat, Pan-fried	(Hodgkinson, 2018)	Porc	viande	0,67	(AAA)	0,66	(AAA)	0,94	(SAA)	0,93	(SAA)	1,09	(Val)	1,07	(Val)	1,00	(AAA)	0,99	(AAA)
Bovine Meat, Raw	(Hodgkinson, 2018)	Porc	viande	0,67	(AAA)	0,66	(AAA)	0,91	(SAA)	0,90	(SAA)	1,04	(Val)	1,02	(Val)	0,98	(SAA)	0,97	(SAA)
Bovine Meat, Roasted	(Hodgkinson, 2018)	Porc	viande	0,63	(AAA)	0,62	(AAA)	0,84	(SAA)	0,83	(SAA)	0,98	(Val)	0,96	(Val)	0,91	(SAA)	0,90	(SAA)
Bovine muscle hydrolyzate	(Bindari, 2018)	Porc	viande	0,32	(AAA)	0,29	(AAA)	0,58	(AAA)	0,53	(AAA)	0,73	(AAA)	0,67	(AAA)	0,48	(AAA)	0,44	(AAA)
Chicken meal	(Rojas, 2013)	Porc	viande	0,62	(Trp)	0,43	(Trp)	1,07	(Val)	0,65	(Lys)	1,15	(Val)	0,73	(Val)	0,95	(Trp)	0,64	(Lys)
Hydrolyzed intestines	(Rojas, 2013)	Porc	viande	0,71	(Trp)	0,39	(SAA)	1,05	(SAA)	0,48	(SAA)	1,19	(Val)	0,56	(SAA)	1,09	(Trp)	0,52	(SAA)
Meat meal 8001.001	(CVB, 2016)	Porc	viande	0,41	(Trp)	0,30	(Trp)	0,82	(Trp)	0,56	(SAA)	0,93	(Ile)	0,66	(SAA)	0,64	(Trp)	0,46	(Trp)
Meat meal, Dutch origin 8001.003/0/0	(CVB, 2016)	Porc	viande	0,47	(Trp)	0,34	(Trp)	0,94	(Trp)	0,64	(SAA)	1,07	(Ile)	0,75	(SAA)	0,73	(Trp)	0,53	(Trp)
Meat-and-bone meal 8004.000	(CVB, 2016)	Porc	viande	0,29	(Trp)	0,11	(Trp)	0,59	(Trp)	0,22	(Trp)	0,76	(Trp)	0,29	(Trp)	0,45	(Trp)	0,17	(Trp)

Aliment	Référence	Modèle	Catégorie	Bébé (0 - 6 mois)				Enfant (6 mois - 3 ans)				Enfant âgé, adolescent, adulte				Enfant d'âge préscolaire (2 – 5)			
				PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)		PDCAAS (%)		DIAAS (%)	
Porcine heart hydrolyzate	(Bindari, 2018)	Porc	viande	0,32	(AAA)	0,29	(AAA)	0,58	(AAA)	0,53	(AAA)	0,73	(AAA)	0,67	(AAA)	0,48	(AAA)	0,43	(AAA)
Porcine muscle hydrolyzate	(Bindari, 2018)	Porc	viande	0,19	(AAA)	0,18	(AAA)	0,35	(AAA)	0,32	(AAA)	0,44	(AAA)	0,41	(AAA)	0,29	(AAA)	0,27	(AAA)
Porcine plasma hydrolyzate	(Bindari, 2018)	Porc	viande	0,53	(AAA)	0,47	(AAA)	0,96	(AAA)	0,81	(SAA)	1,22	(AAA)	0,96	(SAA)	0,79	(AAA)	0,70	(AAA)
Pork gelatin (Petersen, 2005)	(Petersen, 2005)	Porc	viande	0,29	(AAA)	0,27	(AAA)	0,45	(Leu)	0,40	(Leu)	0,49	(Leu)	0,43	(Leu)	0,43	(AAA)	0,40	(AAA)
Poultry byproduct meal	(Rojas, 2013)	Porc	viande	0,63	(Trp)	0,46	(Trp)	1,04	(SAA)	0,70	(SAA)	1,20	(Leu)	0,82	(Leu)	0,97	(Trp)	0,71	(Trp)
Poultry offal meal	(AMiPig, 2000)	Porc	viande	0,44	(Trp)	0,31	(Trp)	0,74	(Lys)	0,57	(Lys)	0,88	(Lys)	0,68	(Lys)	0,69	(Trp)	0,47	(Trp)

**Tableau 36 :** Paramétrages du DiDGI® utilisés dans la littérature (en rouge les données non disponibles)

Programme	Modèle fromage (STLO) utilisé précédemment et adapté	Lipid oxydation and its inhibition by apple polyphenols (INRA Avignon)	Digestion of an innovative Citrus concentrate: Bioaccessibility of its phytomicronutrients (INRA Avignon)	Emulsion encapsulation in alginate beads retards lipolysis (INRA Nantes)	Impact of mastication on the gastric digestion of frankfurters: case of elderly (INRA Clermont)
Nature du substrat	Fromages	Emulsion ou Emulsion/Purée (9:1)	Jus de fruits	Emulsion	Masticats de saucisses
Quantité de substrat	50 g	200 g	?	?	?
Ratio (Substrat : Liquide Salivaire) + Préchauffage	1:1 (2 min 37°C)	0	?	?	?
Quantité de Solution Electrolytique Gastrique ajoutée	24 g	0	?	?	?
D <sub>injection</sub> du Substrat	En une fois à t <sub>0</sub>	En une fois à t <sub>0</sub>	?	?	?
Prélèvements (Volume, Temps, Type)	2 ml, toutes les 30 min, dessus	?	?	?	30, 60, 90, 120, 150 min
t <sub>1/2</sub> Gastrique	85 min	60 min	60 min	45 min	90 min
β <sub>Gastrique</sub>	1,8	1	?	1,5	2
t <sub>1/2</sub> Duodéal	250 min	-	-	?	-
B <sub>Duodéal</sub>	2,5	-	-	?	-
pH <sub>Gastrique</sub> et [HCl] <sub>Gastrique</sub>	pH=1.68+(pHinitial-1,68)exp <sup>-t/42</sup> & 1 M	pH 5 --> 2 en 120 min & 0,1 M	pH 5 --> 2 en 120 min & ? M	?	pH 6 --> 2 en 120 min (Adults) / pH 6 --> 4 en 120 min (Eld)
pH <sub>Duodéal</sub> & [Base] <sub>Duodéal</sub>	6,8 & [NaOH] = 1 M	6,5 & [Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ] = 0,5 M	6,5 & [Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ] = ? M	?	-
[Pepsine] <sub>Gastrique</sub> et D <sub>pepsine</sub>	2000 U.ml <sup>-1</sup> (P6887); 0,5 ml.min <sup>-1</sup>	0,3 % (P6887); 0,5 ml.min <sup>-1</sup>	0,01 % (P6887); ? ml.min <sup>-1</sup>	?	2080 (Adults) / 1248 (Eldery) U.ml <sup>-1</sup> (P6887); 0,25 ml.min <sup>-1</sup>
[Pancréatine] <sub>Duodéal</sub> et D <sub>pancréatine</sub>	7 % (P7545); 0,25 ml.min <sup>-1</sup>	0,4 % (P7545); 0,25 ml.min <sup>-1</sup>	0,035 % (P7545); ? ml.min <sup>-1</sup>	?	?
[Bile1] <sub>Duodéal</sub> et D <sub>Bile1</sub> et intervalle de temps	4 % (B8631); [0,30] min : 0,5 ml.min <sup>-1</sup>	5,5 % (B8631); 0,4 ml.min <sup>-1</sup>	?	?	?
[Bile2] <sub>Duodéal</sub> et D <sub>Bile2</sub> et intervalle de temps	2 % (B8631); [30, ∞[ min : 0,5 ml.min <sup>-1</sup>	-	-	?	-
[NaCl] <sub>Intestinal</sub> et D <sub>NaCl</sub>	150 mM ; 0,5 ml.min <sup>-1</sup>	-	-	?	-
Températures	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Référence		(Boléa, 2017)	(Gence, 2017)	(Corstens, 2017)	(Sayd, 2017)

Programme	The impact of human milk pasteurisation is lower on the preterm than on the term milk digestion (INRA Rennes)	Mathematical model of in vitro digestion of infant milk formulas (INRA Rennes)	Does protein enrichment in yogurts have an effect on gastric emptying and impact proteolysis kinetics? (INRA Rennes)	Impact of the dairy matrices on the viability of cheese microorganisms during <i>in vitro</i> dynamic digestion (INRA Grignon)	Effect of dairy matrices on the survival of <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Brevibacterium aurantiacum</i> and <i>Hafnia alvei</i> during digestion (INRA Grignon)
Nature du substrat	Lait	Lait	Yaourt	Fromage & Lait	Fromage & Lait
Quantité de substrat	?	100 ml	?	133 ml	133 ml
Ratio (Substrat : Liquide Salivair) + Préchauffage	?	0	?	67 ml SSF	67 ml SSF
Quantité de Solution Electrolytique Gastrique ajoutée	?	0	?	?	?
D <sub>injection</sub> du Substrat	?	10 ml.min <sup>-1</sup> pendant 10 min	?	?	?
Prélèvements (Volume, Temps, Type)	toutes les 30 min ds G et I jusqu'à 120 min et I180	30, 60, 120, 180 min	15, 30, 60, 90, 120, 150 min	?	?
t <sub>1/2</sub> Gastrique	36 min (preterm) / 47 min (term)	?	57,7/ 69,4 / 65,3 min	85 min	?
β <sub>Gastrique</sub>	?	?	1,2 / 1,1 / 1,1	1,8	?
t <sub>1/2</sub> Duodéna	-	-	160 min	?	?
B <sub>Duodéna</sub>	-	-	1,6	?	?
pH <sub>Gastrique</sub> et [HCl] <sub>Gastrique</sub>	0,5 M ?	pH= -0,015t + pH0 (pH0 = 6,75) & 0,5 M si t ≥ 5 min	pH=1.68+3,82exp <sup>-t/42</sup> & 1 M	pH 6,5 --> 2 [0,100] min & 0,5 M	? & 0,5 M
pH <sub>Duodéna</sub> & [Base] <sub>Duodéna</sub>	?	6,5 & [Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ] = 0,1 M	6,6 & [NaOH] = ? M	6,5 & [Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ] = 1 M	6,5 & [Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ] = 1 M
[Pepsine] <sub>Gastrique</sub> et D <sub>pepsine</sub>	?	? % (P6887); 0,25 ml.min <sup>-1</sup>	2000 U.ml <sup>-1</sup> (P6887); ? ml.min <sup>-1</sup>	0,05 % (P6887); [10,90] min : 0,40 ml.min <sup>-1</sup>	0,05 % (P6887) (env. 2000 U.ml <sup>-1</sup> ) ; [0,90] min : 0,40 ml.min <sup>-1</sup>
[Pancréatine] <sub>Duodéna</sub> et D <sub>pancréatine</sub>	?	? % (P7545); 0,25 ml.min <sup>-1</sup>	7 % (P7545); 0,25 ml.min <sup>-1</sup>	2 % (P7545); [0,50] min : 0,25 ml.min <sup>-1</sup> / [50,220] min : 0,10 ml.min <sup>-1</sup>	2 % (P7545); t <sub>0</sub> : 5 ml / [0,50] min : 0,25 ml.min <sup>-1</sup> / [50,220] min : 0,10 ml.min <sup>-1</sup>
[Bile1] <sub>Duodéna</sub> et D <sub>Bile1</sub> et intervalle de temps	?	? % (B8631); 0,5 ml.min <sup>-1</sup>	4 % (B8631); 0,5 ml.min <sup>-1</sup> ; [0,30] min	4 % (B8631); [0,80] min : 0,50 ml.min <sup>-1</sup> / [80,100] min : 0,15 ml.min <sup>-1</sup>	4 % (B8631); t <sub>0</sub> : 10 ml / [0,80] min : 0,50 ml.min <sup>-1</sup> / [80,100] min : 0,15 ml.min <sup>-1</sup>
[Bile2] <sub>Duodéna</sub> et D <sub>Bile2</sub> et intervalle de temps	-	-	7 % (B8631); 0,5 ml.min <sup>-1</sup> ; [30, ∞] min	2 % (B8631); [80, 220] min : 0,20 ml.min <sup>-1</sup>	2 % (B8631); 0,20 ml.min <sup>-1</sup> ; [80, 220] min
[NaCl] <sub>Intestinal</sub> et D <sub>NaCl</sub>	-	-	?	? M ; [100,230] min : 0,5 ml.min <sup>-1</sup>	0,95 % ; [10,100] min : 0,8 ml.min <sup>-1</sup> / [100,250] min : 0,5 ml.min <sup>-1</sup>
Températures	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Référence	(De Oliveira, /?/)	(Floury, /?/)	(Ménard, /?/)	(Hernandez-Galan, /?/)	(Hernandez-Galan, 2017)



Programme	Gastric digestion of skim milk: a dynamic <i>in vitro</i> digestion and modeling study (INRA Grignon)	Formation of toxic aldehydes during instrumented dynamic <i>in vitro</i> digestion of marine oil-enriched milk (INRA Nantes)	Comparison of the digestive fate of emulsions containing long chain n-3 lipids with a static and a dynamic <i>in vitro</i> system (INRA BIA + GMPA)	Development of an <i>in vitro</i> dynamic digestion system to study food digestion (INRA GMPA + STLO)	Development of an <i>in vitro</i> dynamic digestion system to study food digestion (INRA GMPA + STLO)
Nature du substrat	Lait	Lait	Emulsion	(Full term Infant model) Lait	(Adult model) Lait
Quantité de substrat	400 ml	100 ml	100 ml	?	?
Ratio (Substrat : Liquide Salivair) + Préchauffage	?	-	-	0	0
Quantité de Solution Electrolytique Gastrique ajoutée	?	-	30 ml SSF ? ; pH = 2,5	0	0
D <sub>injection</sub> du Substrat	?	100 ml en 3 min	100 ml en 3 min	?	?
Prélèvements (Volume, Temps, Type)	A la sortie de l'estomac + filtre ø 2 mm	G : 3,15, 45, 75, 90, 105, 120 min / I : 15, 45, 75, 105, 135, 165, 195, 225 min	?	?	?
t <sub>1/2</sub> Gastrique	90 min (exponentiel)	?	60 min	80 min	Liquide : 35 min / Solide : 170 min
β <sub>Gastrique</sub>	-	?	1	?	?
t <sub>1/2</sub> Duodénal	-	-	?	-	-
B <sub>Duodénal</sub>	-	-	?	-	-
pH <sub>Gastrique</sub> et [HCl] <sub>Gastrique</sub>	pH 1,6 ; [0,100] min & 0,1 M	pH 6,5 --> 2 ; [0, 120] min & 1 M	pH 7 --> 2 ; [0, 120] min & 1 M	pH= -0,015t + 6,53 & ? M	pH= -0,0001t <sup>2</sup> - 0,0004t + 2,5 6,53 & ? M
pH <sub>Duodénal</sub> & [Base] <sub>Duodénal</sub>	-	6,5 & [NaHCO <sub>3</sub> ] = 1 M	6,5 & [NaHCO <sub>3</sub> ] = 1 M	?	?
[Pepsine] <sub>Gastrique</sub> et D <sub>pepsine</sub>	1000 U.ml <sup>-1</sup> (P6887) + 8,8 g.l <sup>-1</sup> NaCl; 1 ml.min <sup>-1</sup>	0,9 % (P6887); ? ml.min <sup>-1</sup>	0,437 % (P6887); ? ml.min <sup>-1</sup>	260 U.ml <sup>-1</sup> (P6887); ? ml.min <sup>-1</sup>	880 U.ml <sup>-1</sup> (P6887); ? ml.min <sup>-1</sup>
[Pancréatine] <sub>Duodénal</sub> et D <sub>pancréatine</sub>	-	0,4 % (P7545); ? ml.min <sup>-1</sup>	0,112 % (P7545); ? ml.min <sup>-1</sup>	? % (P7545); ? ml.min <sup>-1</sup>	? % (P7545); ? ml.min <sup>-1</sup>
[Bile1] <sub>Duodénal</sub> et D <sub>Bile1</sub> et intervalle de temps	-	5,5 % (B8631); ? ml.min <sup>-1</sup>	11,88 % (B8631); ? ml.min <sup>-1</sup>	? % (B8631); ? ml.min <sup>-1</sup>	? % (B8631); ? ml.min <sup>-1</sup>
[Bile2] <sub>Duodénal</sub> et D <sub>Bile2</sub> et intervalle de temps	-	3,5 % (B8631); ? ml.min <sup>-1</sup>	-	-	-
[NaCl] <sub>Intestinal</sub> et D <sub>NaCl</sub>	-	-	-	-	-
Températures	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Référence	(Lefeuvre, /?/)	(Genot, /?/)	(Brestaz, /?/)	(Ménard, /?/)	(Ménard, /?/)

Programme	Digestion of Proteins in Milk: Comparing different in vitro systems with in vivo data (INRA STLO)	Validation of a new in vitro dynamic system to simulate infant digestion (INRA GMPA + STLO)
Nature du substrat	Lait	(Model Enfant) Lait
Quantité de substrat	100 ml	150 ml
Ratio (Substrat : Liquide Salivaire) + Préchauffage	-	-
Quantité de Solution Electrolytique Gastrique ajoutée	24 ml de SGF (pH 2,2)	30 ml de pepsine 625 U.ml <sup>-1</sup> dans NaCl 150 mM; pH 3
D <sub>injection</sub> du Substrat	10 ml.min <sup>-1</sup>	
Prélèvements (Volume, Temps, Type)	G : 0,5 ; 3 ; 6 ; 8 ; 10 ; 14 ; 20 ; 30 ; 60 ; 90 min / I : 11 ; 14 ; 17 ; 20; 30 60 ; 90 ; 120: 180 min	G & D : 30 ; 60 ; 90 ; 120 ; 210 min
t <sub>1/2</sub> Gastrique	35 min	70 min
β <sub>Gastrique</sub>	1,15	1,23
t <sub>1/2</sub> Duodénal	85 min	200 min
B <sub>Duodénal</sub>	1,4	2,2
pH <sub>Gastrique</sub> et [HCl] <sub>Gastrique</sub>	pH=1.68+3,82 <sup>-t/42</sup> & 1 M	pH= -0,011t + 5,4 & 0,5 M
pH <sub>Duodénal</sub> & [Base] <sub>Duodénal</sub>	6,5 & [NaHCO <sub>3</sub> ] = 1 M	6,5 & [Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ] = 0,1 M
[Pepsine] <sub>Gastrique</sub> et D <sub>pepsine</sub>	? U.ml <sup>-1</sup> (P6887); [0;10] min : 1 ml.min <sup>-1</sup> / [10;∞[ min : 0,5 ml.min <sup>-1</sup>	1250 U.ml <sup>-1</sup> (P6887) ; 0,25 ml.min <sup>-1</sup>
[Pancréatine] <sub>Duodénal</sub> et D <sub>pancréatine</sub>	7 % (P7545); [0,180] min : 0,25 ml.min <sup>-1</sup>	t0 : 5 ml de solution (bile 1% + Pancr 10%) pH 6,5 ; 10 % (P7545) ; 0,25 ml.min <sup>-1</sup>
[Bile1] <sub>Duodénal</sub> et D <sub>Bile1</sub> et intervalle de temps	4 % (B3883); [0,30] min : 0,5 ml.min <sup>-1</sup>	1 % (B3883) ; 0,5 ml.min <sup>-1</sup>
[Bile2] <sub>Duodénal</sub> et D <sub>Bile2</sub> et intervalle de temps	2 % (B3883); [30,180] min : 0,5 ml.min <sup>-1</sup>	-
[NaCl] <sub>Intestinal</sub> et D <sub>NaCl</sub>	100 mM + CaCl <sub>2</sub> (1 mM) ; ? ml.min <sup>-1</sup>	-
Températures	37 °C	-
Référence	(Egger, 2017)	(Ménard, 2014)



**Titre :** Développement d'outils et de méthodes *in vitro* pour comprendre et simuler la digestion d'aliments à base de protéines végétales

**Mots clés :** DiDGI® ; mini-porc ; corrélation *in vivo in vitro* ; matrice alimentaire ; digestion gastro-intestinale

**Résumé :** Dans un contexte où la demande en protéines augmente, il est nécessaire de mieux connaître la qualité nutritionnelle des protéines végétales, et notamment leur digestibilité. Pour cela, les modèles humains et porcins sont préconisés, mais ils sont lourds à mettre en place et posent des questions éthiques.

L'objectif de la thèse est donc de mieux comprendre les phénomènes impliqués dans la digestion des protéines végétales et de simuler celle-ci, en cohérence avec la physiologie digestive, à partir de modèles *in vitro*. Quatre repas avec les mêmes teneurs en macronutriments ont été développés, dont les protéines sont exclusivement apportées par du seitan, du tofu, du jus de soja ou une émulsion de pois.

Dans un premier temps, nous avons récolté chez le mini-porc à différents niveaux du segment du système

digestif (l'estomac, le duodénum et l'iléon) des données *in vivo* spécifiques à chaque aliment et nécessaires au paramétrage de systèmes *in vitro* dynamiques, comme le DiDGI®. Il a été montré que des variables étaient dépendantes de la nature de l'aliment ingéré, comme l'acidification gastrique ou le flux d'arrivée du bol au niveau de l'iléon.

Dans un second temps, différentes valeurs relatives à l'état des protéines et notamment leur hydrolyse ont été suivies dans les échantillons prélevés à différents endroits et temps au cours des digestions des différents aliments dans les conditions *in vivo* et *in vitro* dynamique.

Globalement, de bons résultats de corrélation ont été trouvés entre les deux modèles, montrant que les programmes de digestion aliments-dépendants développés pour le DiDGI® permettent de mimer la digestion de manière cohérente.

**Title:** Development of *in vitro* tools and methods to understand and mimic the digestion of plant protein-based foods

**Keywords:** DiDGI®; miniature pigs ; *in vivo in vitro* correlation ; food matrix ; gastrointestinal digestion

**Abstract:** In a context of increasing demand for plant proteins, it is important to properly estimate their nutritional quality, and especially their digestibility. Human and pig models are recommended for that, but these models are complex to implement due to ethical considerations. It is therefore interesting to simulate digestion on *in vitro* systems.

This PhD project aims thus to better understand the phenomena that affect the digestion of plant proteins and to simulate it on *in vitro* models according to the physiology. Four model meals with the same macronutrient contents have been developed, whose proteins were exclusively provided by the seitan, the tofu, the soya juice or the pea emulsion.

First, we collected from the minipig at different levels of their digestive (the stomach, duodenum and the ileum),

data for each food necessary to implement dynamic *in vitro* system (DiDGI®). We observed different kinetics depending on the kind of food. The pH kinetic in the gastric phase and the flux of bolus at the ileal level were specifically impacted.

In a second step, different measurements regarding the protein breakdown were followed and compared in the samples collected at different locations and times during the *in vivo* and the dynamic *in vitro* food-dependent digestions.

Overall, good correlation results were found between the two models, showing that the food-dependent digestion programs developed for DiDGI® can mimic digestion in a consistent manner. It has been shown that some physiological parameters are dependent on the nature of the food ingested, such as the gastric acidification or the chyme flow to the ileum.

