IMPACT DES MATIERES PREMIERES SUR LES ACTIVITES DES PROTEASES DIGESTIVES CHEZ LE POULET DE CHAIR

Recoules Emilie[1], Sabboh-Jourdan Houda[1], Narcy Agnès[1], Lessire Michel[1], Harichaux Grégoire[2], Duclos Michel[1], Réhault-Godbert Sophie[1]

[1]INRA - UR0083 Recherches Avicoles – 37380 – Nouzilly –France
[2]INRA - Plate-forme d'Analyse Intégrative des Biomolécules et de Phénomique des Animaux d'Intérêt Bio-agronomique – 37380 – Nouzilly – France

emilie.recoules@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

Dans un contexte de durabilité, l'amélioration de l'utilisation de matières premières locales riches en protéines dans l'alimentation des poulets de chair nécessite une meilleure compréhension des mécanismes de digestion. L'objectif est d'identifier des spécificités liées à chaque matière première afin de trouver, à terme, des moyens d'en optimiser la digestibilité chez le poulet de chair. Nous nous sommes intéressés aux protéases impliquées dans la digestion chez des poulets recevant comme source unique de protéines, du tourteau de soja (S), du tourteau de colza (C), du pois (P) ou des drêches de maïs (D). A 21 jours, les animaux ont été euthanasiés et les contenus des différents compartiments digestifs (gésier, duodénum, jéjunum, iléon) ont été collectés (n = 12 par régime). Les protéines solubles des contenus ont été dosées, poolées par compartiment digestif puis analysées par zymographie. Une activité à 37 kDa, commune à tous les régimes, a été observée. Des bandes sont également visibles à 18 et 20 kDa pour les régimes S, C et D et une bande est visible à 36 kDa dans le régime P. L'analyse par SDS-PAGE en conditions non dénaturantes de la bande à 36 kDa du régime P (iléon) couplée à des analyses par spectrométrie de masse révèlent la présence de 4 protéases de poulet (chymotrypsinogène, trypsinogène, précurseur de trypsine I-P38, carboxypeptidase A5) et d'un inhibiteur de protéase spécifique de la graine de pois (inhibiteur de Bowman-Birk). L'inhibiteur ayant un poids moléculaire de 8 kDa et se complexant généralement avec le trypsinogène (27 kDa) ou chymotrypsinogène (29 kDa), sa présence dans la bande à 36 kDa suggère qu'il serait complexé à une protéase et inhiberait son activité. Ce travail a permis de mieux caractériser les activités protéolytiques dans les différents compartiments du tractus digestif des poulets de chair et d'identifier une particularité induite par un régime à base de pois, qui pourrait en limiter la digestibilité.

ABSTRACT

Protein sources impact endogenous proteolytic activities of digestive enzymes in broiler

In a context of sustainability, the use of local protein sources by animals to replace imported soybean requires a better understanding of mechanisms involved in protein digestion. The objective is to identify digestive differences between protein sources, especially between soybean meal and local protein sources in broiler and find levers to improve digestion of local protein sources. This study focuses on proteases involved in protein digestion in broilers fed either with soybean meal (S), rapeseed meal (C), pea (P), or corn distillers'dried grains with solubles (D) as the unique source of protein. At day 21, birds were euthanized by a lethal injection of sodium pentobarbital and digestive contents of the gastrointestinal tract (gizzard, duodenum, jejunum, ileum) were collected (n = 12 per diet). Soluble proteins in digestive contents were measured, pooled by digestive compartment and then analyzed by gelatin zymography. A protease activity was observed at 37 kDa in all diets. Bands were also visible at 18 and 20 kDa in S, C and D diets and one band was observed at 36 kDa in the P diet. Analysis by SDS-PAGE (non-denaturing conditions) of the 36 kDa band (ileum) combined with mass spectrometry analysis revealed 4 chicken proteases (chymotrypsinogen, trypsinogen, trypsinogen-I-P38 and carboxypeptidase A5) and one protease inhibitor specific of the pea (Bowman-Birk inhibitor, BBI). The BBI has a theoretical molecular weight of 8 kDa and forms a complex with trypsinogen (27 kDa) or chymotrypsinogen (29 kDa). The presence of the BBI together with chicken proteases in the 36 kDa band suggests that it is in complex with a protease to inhibit it. This study allowed a better characterization of active proteases in the different compartments of the digestive tract in broiler and the identification of specificity in the P diet that may affect its digestibility by altering endogenous proteases activities.

INTRODUCTION

Dans le contexte actuel où les productions animales se doivent d'être plus durables à la fois sur des aspects environnementaux, économiques et sociaux, la réduction de la dépendance protéique de la France vis à vis des pays producteurs de soja est un enjeu majeur. Bien que le tourteau de soja soit la principale source de protéines dans l'alimentation des poulets de chair, son utilisation a des conséquences i) économiques, liées à la volatilité des prix, ii) environnementales, liées au transport et à la déforestation et enfin iii) sociales puisqu'il s'agit majoritairement de variétés génétiquement modifiées, dont l'acceptabilité reste controversée en France (de Visser et al., 2014). Une meilleure utilisation des sources de protéines locales par les animaux passe notamment par une meilleure digestion des protéines par l'animal. La digestion des nutriments se fait de manière mécanique et enzymatique. L'action mécanique du gésier sur le digesta ainsi que les reflux de digesta entre les compartiments digestifs sont nécessaires à une meilleure action des enzymes digestives (Klasing, 1999). Les protéases ou enzymes protéolytiques sont des enzymes digestives permettant d'hydrolyser les protéines alimentaires par rupture des liaisons peptidiques. Il existe plusieurs types de protéases qui diffèrent par leur mode d'action. On distingue notamment les exopeptidases des endopeptidases. Les premières coupent les liaisons peptidiques aux extrémités de la chaîne (aminopeptidases ou carboxypeptidases selon qu'elles coupent aux extrémités N-terminale ou C-terminale) tandis que les secondes coupent les liaisons à l'intérieur de la chaîne peptidique. L'action de ces enzymes est indispensable à l'hydrolyse des protéines et des peptides afin de rendre les acides aminés disponibles pour l'organisme. De nombreuses protéases sont sécrétées sous forme zymogène (proenzymes), inactives avant d'être activées. Cette activation dépend de plusieurs paramètres qui peuvent également avoir un impact sur l'activité même des protéases activées. Parmi eux, on peut citer le pH, l'osmolarité ou la présence d'inhibiteurs apportés de manière exogène (par l'alimentation notamment). Par exemple, la pepsine sécrétée dans le proventricule sous forme de pepsinogène est activée par l'acide chlorhydrique et est active à des pH acides tandis que les proenzymes digestives d'origine pancréatique telles que le chymotrypsinogène ou les carboxypeptidases sont activées par la trypsine et sont actives à des pH proches de la neutralité voire légèrement alcalins. Des inhibiteurs de protéases peuvent se retrouver dans certains aliments tels que le pois (Li de la Sierra et al., 1999) ou le soja (Kunitz, 1947). Ils se complexent avec la ou les protéases cibles et inhibent leur action. Par conséquent, une action efficace des protéases sur les protéines alimentaires nécessite donc que les protéases soient actives à l'endroit où elles sont attendues pour exercer leur action protéolytique/physiologique.

Trois matières premières, susceptibles de présenter un intérêt comme alternatives au soja ont été étudiées. L'effet de ces trois sources de protéines sur les activités des protéases digestives a été analysé. L'objectif est d'améliorer les connaissances sur les activités des protéases digestives et de mettre en évidence des différences entre matières premières. Ce projet vise, à terme, à mieux appréhender les paramètres qui peuvent avoir un impact sur l'activité des protéases digestives pour essayer de les optimiser. Cette étude vient en complément d'une étude protéomique où les protéines présentes dans ces mêmes échantillons ont été identifiées (Recoules et al., 2015).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental et acquisition des données

Nous avons utilisé 72 poulets Ross PM3 (Grelier-Perrot, Saint-Laurent de la Plaine) pendant une période d'élevage de 21 j divisée en 3 parties : i) démarrage J1-J7, ii) adaptation J7-J17 et iii) expérimentation J17-J21. Pendant la phase de démarrage, les animaux étaient deux par cages et ont reçu un aliment à base de maïs, blé et soja. A J7, les animaux ont été répartis de manière homogène sur la base du poids vif entre 4 régimes alimentaires et ont été placés en cages individuelles. Les régimes d'adaptation étaient un mélange du régime démarrage et des régimes expérimentaux (50/50). A J17, les animaux ont reçu 100 % d'aliment expérimental jusqu'à J21. Les régimes expérimentaux étaient des régimes semi-synthétiques avec du tourteau de soja (S), tourteau de colza (C), pois (P) ou des drêches de maïs (D) comme source unique de protéines. L'apport énergétique a été effectué par un mélange d'amidon de maïs, de sucre et d'huile de soja. Les apports en eau et aliments granulés étaient *ad libitum* pendant toute la période d'élevage. A J21, les animaux qui avaient préalablement été mis à jeun pendant 5 h ont été réalimentés de manière synchronisée pendant 3 h puis euthanasiés par injection de pentobarbital sodique. Les contenus des différents compartiments digestifs (gésier, duodénum, jéjunum, iléon) ont été collectés et conservés à - 80 °C.

1.2. Analyses des contenus digestifs

Les contenus digestifs ont été broyés avec du tampon Tris HCl 0,5M (pH 6,8, 150 mM NaCl, 2 g de contenu/4 ml de tampon) à l'aide d'un Ultra Thurrax T25 (IKA, Allemagne) pendant 30 sec puis centrifugés à 4000 rpm pendant 10 min à 4 °C. La concentration en protéines des surnageants obtenus a été mesurée par dosage colorimétrique (Bradford, 1976). A partir des concentrations individuelles en protéines, les échantillons ont été poolés (n = 12 par

régime et par compartiment digestif) pour avoir un apport similaire en protéines de chaque individu. Les surnageants ont été dilués avec du tampon Tris HCl 0,5M pH 6,8 et du bleu (Tris HCl 0,25M pH 6,8, bleu de bromophenol, glycerol, SDS). Un standard de poids moléculaire (Precision Plus ProteinTM All Blue Standards, BioRad, France) et ces échantillons ont été analysés par zymographie ou par SDS-PAGE (12,5 % ; conditions non dénaturantes : sans agents réducteurs et sans bouillir) puis les protéines ont été révélées avec du bleu de Coomassie R250 (2,5 g/L). Les surnageants ont également été dilués avec du tampon Tris HCl 0,5M, pH 6,8 et du bleu (Tris HCl 0,25M, pH 6,8 ; bleu de bromophenol glycerol, SDS et β-mercaptoethanol), chauffés à 95 °C pendant 5 min pour réduire les ponts disulfures puis analysés par SDS-PAGE (12,5 % ; conditions dénaturantes).
Les bandes d'intérêt observées en SDS-PAGE non dénaturant ont été analysées par spectrométrie de masse. Les peptides issus de la digestion des bandes ont été analysés par un système nanoUHPLC Ultimate 3000 RSLC (Dionex) couplé à un spectromètre de masse à haute résolution LTQ Velos Orbitrap ETD (Thermo Electron, USA). L'acquisition des données a été faite de façon automatique et les données obtenues ont été transformées à l'aide du logiciel Proteome discoverer 1.4 puis confrontées aux banques de données *via* le logiciel MASCOT Daemon (server local version 2.2.2). Les peptides et protéines identifiés ont été validés à l'aide du logiciel Scaffold 4 (version 4.1, Proteome Software, Portland, USA).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les activités protéolytiques observées par zymographie (Figure 1) mettent en évidence des profils similaires pour les régimes S, C et D avec des bandes à 18, 20 et 37 kDa qui semblent plus intenses dans l'iléon que dans les autres compartiments. Le régime P présente un profil spécifique avec une bande à 36 kDa dont l'intensité augmente du gésier à l'iléon. Un gel SDS-PAGE en conditions non dénaturantes a été réalisé sur les contenus digestifs de l'iléon afin de pouvoir identifier les protéines contenues dans cette bande à 36 kDa (Figure 2). L'analyse par spectrométrie de masse de cette bande (36 kDa) révèle la présence de quatre protéases de poulets dont trois endopeptidases (chymotrypsinogen 2-like precursor [Gallus gallus], gi|478621048, 29 kDa; trypsinogen [Gallus gallus], gi|25814806, 27 kDa ; RecName: Full=Trypsin I-P38; Flags Precursor, gi|2499863, 26 kDa) et une exopeptidase (carboxypeptidase A5 precursor [Gallus gallus], gi|356582409, 47 kDa) ainsi qu'une protéine de pois. Parmi les quatre protéases identifiées, il y a deux précurseurs de trypsine qui ont des poids moléculaires théoriques très proches. Afin de confirmer qu'il s'agit bien de deux protéases distinctes, un alignement de séquences a été réalisé (Swiss Institute of Bioinformatics, 2011). Malgré de nombreuses similitudes, les deux séquences sont effectivement différentes, ce qui confirme la présence de deux précurseurs de trypsine ayant un rôle dans la digestion des protéines. Les quatre protéases identifiées sont d'origine pancréatique et sont classiquement retrouvées dans les contenus digestifs de l'intestin (Larbier et Leclercq, 1992).
La protéine de pois identifiée est un inhibiteur trypsique (inhibiteur de Bowman-Birk, BBI) qui a la capacité de se complexer avec la trypsine, la chymotrypsine, voire avec les deux simultanément (Li de la Sierra et al., 1999) et d'inhiber leur action protéolytique. Le BBI, de poids moléculaire théorique 8 kDa, a été identifié dans la bande à 36 kDa ce qui suggère qu'il serait complexé avec la trypsine ou la chymotrypsine et inhiberait son activité. Les zymographies du régime P ne présentent pas de bandes à 18 et 20 kDa pourtant visibles dans les trois autres régimes (Figure 1). L'hypothèse est que ces bandes reflèteraient la présence de trypsine ou chymotrypsine activées voire dégradées (le poids moléculaire de la forme mature de ces protéases étant de 26 à 29 kDa) et que dans le régime P ces protéases seraient complexées à l'inhibiteur et apparaîtraient donc à 36 kDa. L'analyse par SDS-PAGE en conditions non dénaturantes révèle la présence de bandes à 20 kDa dans tous les régimes, y compris dans le régime P où pourtant aucune activité n'a été détectée à 20 kDa en zymographie. L'analyse par spectrométrie de masse de ces bandes autour de 20 kDa n'a pas permis d'identifier de protéases de poulet ni de protéines de plantes. L'hypothèse qu'il s'agisse de trypsine ou chymotrypsine n'a pas pu être validée. Afin de vérifier si la bande à 36 kDa reflète bien la présence d'un complexe BBI/protéase, un SDS-PAGE en conditions dénaturantes a été réalisé (Figure 3). Les conditions dénaturantes doivent permettre de rompre le complexe et d'identifier deux bandes de poids moléculaires différents et correspondant à la protéase et à l'inhibiteur dissociés. Cette analyse SDS-PAGE révèle une bande très nette à 16 kDa qui contiendrait le BBI (Recoules et al., 2015). Sa présence dans une bande à 16 kDa alors qu'il est attendu autour de 8 kDa sur la base de sa masse théorique, suggère une dimérisation de cet inhibiteur. En effet, Ferrasson et al. (1995) ont purifié 6 inhibiteurs trypsiques de pois et l'analyse SDS-PAGE de ces inhibiteurs révèle la présence de bandes aux alentours de 13-15 kDa alors que les poids moléculaires théoriques sont de 7-8 kDa. La dimérisation voire la multimérisation des inhibiteurs de pois a été confirmée grâce à la résolution de la structure tridimensionnelle d'inhibiteurs purifiés à partir du pois. La structure 3D du BBI révèle en effet la présence de domaines hydrophobes exposés qui contribuent à sa multimérisation (Rao et Suresh, 2007). Par ailleurs, Li de la Sierra et al. (1999) rapportent que la forme dimère de l'inhibiteur trypsique du pois serait plus stable que la forme monomère. L'ensemble de ces données pourrait

expliquer pourquoi l'analyse par SDS-PAGE n'a pas permis d'identifier le BBI dans la bande à 8 kDa (données non présentées) et suppose que la bande à 16 kDa observée sur le SDS-PAGE correspond à un dimère de BBI particulièrement résistant à la dénaturation. Les trois bandes de 25, 26 et 27 kDa visibles sur ce même gel (Figure 3) contiendraient des protéases telles que la chymotrypsine et la trypsine comme cela a été observée dans le jéjunum par Recoules et al. (2015).

CONCLUSION

Ce travail a permis de mettre en évidence des activités protéolytiques communes à différents régimes mais également d'identifier une spécificité du régime à base de pois. L'utilisation de la zymographie permet de révéler à la fois les formes matures des protéases mais également les formes zymogènes et apportent une idée précise des protéases effectivement fonctionnelles à différents stades de la digestion. L'hypothèse retenue dans cette étude est que la présence de l'inhibiteur trypsique du pois pourrait inhiber les protéases avec lesquelles il se complexe et par conséquent réduire la dégradation des protéines alimentaires, limitant ainsi leur digestibilité. Si une moindre digestibilité du régime à base de pois est avérée, l'objectif sera ensuite de proposer des techniques concrètes pour supprimer la présence de cet inhibiteur dans la graine de pois. Cela pourra être fait soit en sélectionnant/produisant des pois n'exprimant pas cet inhibiteur, soit en identifiant des procédés industriels (traitement thermique) permettant son inactivation, afin de pouvoir en optimiser l'utilisation en alimentation animale.

Aucune différence n'a été observée entre les régimes S, C et D. Cependant, il faut noter que les analyses se sont focalisées sur la partie soluble des protéines et il serait intéressant de pouvoir analyser ou du moins estimer la part de protéines insolubles dans chaque régime. Il serait également intéressant de pouvoir adopter une approche permettant de quantifier la présence/proportion des protéases digestives et des inhibiteurs de protéases selon la source de protéines utilisée dans l'aliment et ce, dans tous les compartiments digestifs, afin d'avoir une description fine des protéases digestives actives et de leur régulation tout au long du tractus.

Une meilleure connaissance des protéines et des activités biologiques constituant les matières premières permettraient en effet de prédire leur digestibilité et d'élaborer des stratégies permettant d'optimiser leur utilisation par l'animal. La poursuite de ce travail devrait permettre d'identifier où se situent les différences entre matières premières, de comprendre pourquoi le tourteau de soja est mieux valorisé par l'animal que d'autres sources de protéines et de proposer des moyens concrets et ciblés permettant de remédier à ces différences (process, variétés, ajout d'enzymes exogènes…). Cela doit permettre d'améliorer la valorisation de matières premières protéiques locales par les animaux. Cependant, il est à noter que ce projet dépend intimement du nombre de protéines présentes dans les bases de données pour chaque matière première étudiée. En effet, la base de données d'une espèce végétale dont le génome aura été séquencé apportera davantage d'informations comparativement à une autre (exemple : soja *vs.* pois).

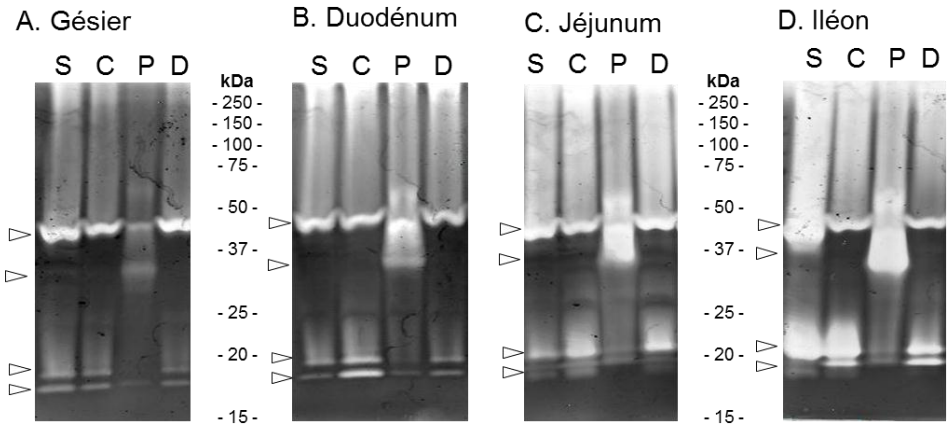
REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'ensemble du personnel de l'unité expérimentale de l'INRA de Nouzilly (INRA-UE 1295 PEAT) pour la réalisation de l'étude ainsi que DSM Nutritional Products Ltd pour le financement du projet.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

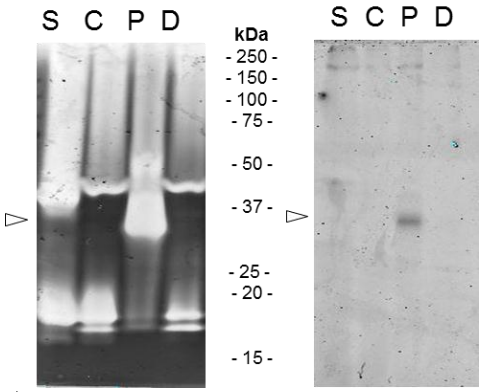
Bradford M. M., 1976. Anal. Biochem, 72, 248-254.
De Visser C. L. M., Schreuder R., Stoddard F., 2014. OCL, 21(4), D407
Ferrasson E., Quillien L. et Gueguen J., 1995. Journal of Protein Chemistry, 14(6), 467-475.
Klasing K. C., 1999. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, 8(2), 42-50.
Kunitz M., 1947. The Journal of General Physiology, 30(4), 291-310.
Larbier M. et Leclercq M., 1992, In : Nutrition et alimentation des volailles, INRA editions. p34.
Li de la Sierra I., Quillien L., Flecker P., Gueguen J. et Brunie S., 1999. Journal of Molecular Biology, 285(3), 1195-1207.
Swiss Institute of Bioinformatics, 2011. ExPASy, http://www.expasy.org/
Recoules E., Sabboh-Jourdan H., Narcy A., Lessire M., Harichaux G., Duclos M., Réhault-Godbert S., 2015, Journées de la Recherche Avicole et Palmipèdes à foie gras, Tours, France, 25/26 mars 2015
Rao K.N. et Suresh C.G., 2007. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics 1774(10): 1264-1273.

Figure 1. Zymographies des contenus digestifs de chaque compartiment et pour chaque régime (S : soja, C : Colza ; P : Pois, D : Drêches de maïs ; n = 12 par régime et par compartiment)



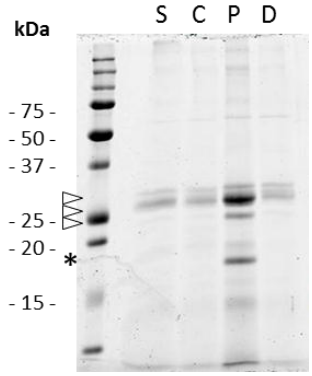
▷Bandes identifiées

Figure 2. SDS-PAGE du contenu digestif de l'iléon pour les 4 régimes testés (S : soja, C : Colza ; P : Pois, D : Drêches de maïs) réalisé en conditions non dénaturantes pour comparaison avec la zymographie



▷Bande du SDS-PAGE analysée par spectrométrie de masse

Figure 3. SDS-PAGE du contenu digestif de l'iléon pour les 4 régimes testés (S : soja, C : Colza ; P : Pois, D : Drêches de maïs) réalisé en conditions dénaturantes



▷Bandes communes aux quatre régimes ; * Bande spécifique au régime Pois