HAL
open science

Caractérisation des protéines dans le tractus digestif de poulets de chair nourris avec quatre matières premières protéiques différentes

Emilie Recoules, Houda Sabboh-Jourdan, Agnès Narcy, Michel Lessire, Grégoire Harichaux, Michel Jacques M.J. Duclos, Sophie Réhault-Godbert

To cite this version:

Emilie Recoules, Houda Sabboh-Jourdan, Agnès Narcy, Michel Lessire, Grégoire Harichaux, et al.. Caractérisation des protéines dans le tractus digestif de poulets de chair nourris avec quatre matières premières protéiques différentes. 11. Journées de la Recherche Avicole et des Palmipèdes à Foie Gras, Mar 2015, Tours, France. hal-02740620

HAL Id: hal-02740620

https://hal.inrae.fr/hal-02740620v1

Submitted on 2 Jun 2020

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.

CARACTERISATION DES PROTEINES DANS LE TRACTUS DIGESTIF DE POULETS DE CHAIR NOURRIS AVEC QUATRE MATIERES PREMIERES PROTEIQUES DIFFERENTES

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
L'amélioration de l'utilisation de matières premières locales riches en protéines dans l'alimentation des poulets de chair nécessite de mieux comprendre la digestion des protéines. L'objectif de cette étude est de caractériser la digestion des protéines chez des poulets de chair (n = 72) recevant comme seule source protéique du tourteau de soja (S), du tourteau de colza (C), du pois (P), ou des drêches de maïs (D) entre 7 et 21 jours. 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). Le pH des contenus a été mesuré et les protéines solubles des contenus ont été analysées par SDS-PAGE. Les résultats montrent que le régime influence le pH des contenus uniquement dans le gésier (P : 2,48 ± 0,43 *vs.* S : 4,61 ± 0,22; P <0,05). L'analyse SDS-PAGE révèle cinq bandes à 25, 26, 27, 36 et 55 kDa, présentes dans tous les compartiments digestifs des différents régimes et 3 bandes spécifiques des régimes (S : 18 kDa; P : 16 et 24 kDa). La composition en protéines de ces bandes a été analysée dans le jéjunum par spectrométrie de masse; 42 protéines de poulet (*Gallus gallus*) et 17 protéines de plantes ont été identifiées. Parmi les protéines de poulet identifiées, 16 ne l'ont été que dans un seul régime (S : 13; P : 3) et 18 l'ont été dans tous les régimes. Ce travail a permis d'identifier les principaux acteurs de la digestion des protéines, de confirmer l'existence de protéines qui n'étaient jusqu'alors que prédites chez le poulet et d'identifier la présence d'inhibiteurs de protéases (S et P). Une meilleure connaissance des protéases impliquées dans la digestion et des spécificités liées à la matière première protéique de l'aliment permettra d'identifier des leviers afin d'améliorer l'efficacité d'utilisation de différentes matières premières protéiques par les animaux.

ABSTRACT
Characterization of proteins in the digestive tract of broilers fed with four different protein sources
Improving the use of local protein sources in broiler diets requires a better understanding of protein digestion. The objective of this study is to characterize protein digestion in broilers (n = 72) fed with soybean meal (S), rapeseed meal (C), pea (P) or corn distiller's dried grain with solubles (D) as the unique protein source in the diet, between 7 and 21 days. At day 21, birds were euthanized by a lethal injection of sodium pentobarbital and contents of digestive compartments (gizzard, duodenum, jejunum, ileum) were collected (n = 12 per diet). The pH of digestive contents was measured and soluble proteins of digestive contents were analyzed by SDS-PAGE. Results indicate that the diet affects the pH of the digestive contents but only in the gizzard (P: 2.48 ± 0.43 *vs.* S: 4.61 ± 0.22; P <0.05). From the SDS-PAGE analysis, 5 bands of 25, 26, 27, 36 and 55 kDa are present in all the digestive compartments of the four diets et 3 bands are diet specific (S: 18 kDa; P: 16 and 24 kDa). Protein composition of these bands was analyzed in the jejunum by mass spectrometry analysis. Forty-two *Gallus gallus* proteins and 17 plant proteins were identified. Among the chicken proteins, 16 were identified in only one diet (S: 13 and P: 3) and 18 in all diets. This study allowed a better characterization of the main actors in digestion, a confirmation of the existence of proteins that were by now only predicted and the identification of protease inhibitors (S and P). Better knowledge about proteases involved in digestion and specificities related to protein sources in the diet would be a way to identify levers of action to improve the efficiency of utilization of local protein sources by broilers.

INTRODUCTION

L'apport protéique dans l'alimentation des poulets de chair se fait principalement avec du tourteau de soja. Cependant, dans un contexte d'amélioration de la durabilité des productions animales, il apparaît nécessaire de réduire la dépendance protéique de la France vis-à-vis des pays producteurs de soja en améliorant l'utilisation des matières premières locales. En effet, l'utilisation du tourteau de soja importé d'Amérique 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). Différentes matières premières locales riches en protéines peuvent être utilisées en alimentation animale (tourteau de colza, tourteau de tournesol, pois, drêches de blé ou de maïs) mais elles sont généralement plus riches en fibres, en facteurs antinutritionnels ou ont un profil en acides aminés déséquilibré comparé au tourteau de soja. Plusieurs travaux ont déjà été réalisés sur ces matières premières afin d'améliorer leur utilisation par les animaux, que ce soit par de la sélection variétale (Slominski et al., 1999), des traitements technologiques (Khajali et Slominski, 2012), des traitements thermiques (Clarke et Wiseman, 2007) ou l'ajout d'enzymes exogènes (Freitas et al., 2011, Fru-Nji et al., 2011). Malgré cela, le tourteau de soja reste encore aujourd'hui la source de protéines majoritairement utilisée.

Dans ce projet, la digestion des protéines de trois matières premières susceptibles de présenter un intérêt comme alternatives au soja a été étudiée. L'objectif est de comprendre les mécanismes et les spécificités associés à chacune d'entre-elles. Ce projet vise, à terme, à identifier comment améliorer l'utilisation de sources de protéines locales par les animaux.

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 trois : 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 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 consistaient en des régimes semi-synthétiques contenant 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 réalisé par un mélange d'amidon de maïs, de sucre et d'huile de soja. Les apports en eau et en 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

Le pH des contenus digestifs a été mesuré (n = 12) (pH-mètre SevenGoTM SG2, électrodes InLabbs Solids Pro ; Mettler-Toledo, France). Les contenus digestifs ont été broyés avec du tampon Tris HCl 0,5M (pH 6,8; 2 g de contenu/4 mL de tampon) à l'aide d'un Ultra Thurax T25 (IKA, Allemagne) pendant 30 sec puis centrifugés à 4000 rpm pendant 10 min at 4 °C, afin d'éliminer la fraction insoluble. 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 et β-mercaptoethanol) puis chauffés à 95 °C pendant 5 min. Un standard de poids moléculaire (Precision Plus ProteinTM All Blue Standards, BioRad, France) et ces échantillons ont été analysés par SDS-PAGE. Les protéines ont ensuite été révélées par coloration au bleu de Coomassie R250. Pour les 4 régimes, les bandes observées dans le jéjunum 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 effectuée de façon automatique et les données obtenues ont été transformées à l'aide du logiciel Proteome discoverer 1.4 puis confrontées à la banque de données NCBI (220114) 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, USA).

1.4 Analyses statistiques

L'effet de la source de protéines dans l'aliment sur le pH des contenus digestifs a été analysé avec le logiciel R par le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis. Lorsque celui-ci était significatif, un test de comparaison multiple a été effectué.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Effet de la matière première sur le pH des contenus digestifs

Dans le gésier, le régime P a le pH le plus faible (2,48 ± 0,43) et le S a le pH le plus élevé (4,61 ± 0,22). La différence entre ces deux régimes est significative (P <0,05). Au contraire, dans le duodénum et le jéjunum le pH des contenus du régime P a tendance à être légèrement supérieur. Par contre, dans l'iléon, aucune différence entre les 4 régimes n'est observée (Figure 1). Ainsi, les différences de pH observées dans les compartiments supérieurs (gésier, duodénum) tendent à être compensées dès le jéjunum. La faible valeur de pH observée dans le gésier pour le régime P est en accord avec des données antérieures où il a été rapporté que l'ajout de pellicules de pois (tégument externe de la graine) dans le régime entraîne une baisse du pH dans le gésier mais pas dans le duodénum (Jiménez-Moreno et al., 2011). Par ailleurs, un régime riche en fibres peut induire un pH plus faible dans le gésier (Jiménez-Moreno et al., 2013). Cependant, selon les tables de composition nutritionnelle (INRA-AFZ, 2004), le régime à base de drêches de maïs est plus riche en fibres que les autres aliments testés. Par ailleurs, la quantité d'aliment ingérée avant abattage pourrait influencer les sécrétions gastriques et par conséquent le pH du gésier. Or, les consommations observées pendant les 3 h de réalimentation avant abattage (S : 29 g; C : 28 g ; P : 25 g ; D : 31 g) ne confirment pas cette hypothèse puisque le régime P a la plus faible quantité d'aliment ingérée sur cette période. Enfin, le pouvoir tampon des matières premières semble être l'explication la plus pertinente puisque Gomez et Corniaux (2009) rapportent des pouvoirs tampon de 121 pour le pois, 276 pour le tourteau de colza et 282 pour le tourteau de soja. Chez le porc, Lawlor et al. (2005) rapportent un pouvoir tampon à pH 4 de 210, 215, 98 et 262 pour le tourteau de soja, tourteau de colza, pois et drêches de maïs respectivement. Or, un pouvoir tampon faible indique une moindre capacité à résister à une variation de pH lors d'un ajout de sécrétions acides telles que celles observées dans le gésier. Ainsi, le faible pouvoir tampon du pois pourrait expliquer le pH bas observé dans le gésier du régime P et un pH plus élevé de 2 unités pour le régime S.

2.2 Caractérisation des protéines dans les contenus digestifs

Les résultats des analyses par SDS-PAGE sont présentés sur la Figure 2. Les bandes observées à 25, 26, 27, 36 et 55 kDa se retrouvent dans tous les compartiments digestifs et ce pour les 4 régimes étudiés. Par ailleurs, 3 bandes semblent spécifiques aux régimes : une bande à 18 kDa (S) et deux bandes à 16 et 24 kDa (P). L'analyse des bandes du jéjunum par spectrométrie de masse a permis d'identifier 69 protéines dont 52 protéines de l'espèce *Gallus gallus* et 17 protéines de plantes. Parmi les protéines de poulets, 6 immunoglobulines et 4 protéines de faible qualité (dont la séquence peut contenir des erreurs) ont été identifiées et ont été retirées de l'analyse. Les immunoglobulines sont individu-dépendantes et de ce fait, leur identification dans cette étude ne peut être généralisée à tous les individus. Quant aux protéines de faible qualité, les informations liées à ces protéines sont trop spéculatives. Aucune protéine d'origine bactérienne n'a pu être identifiée. La présence de protéines bactériennes est plus importante en fin de tractus digestif (fin de l'iléon) et pourrait expliquer ce résultat. L'identification des protéines dépend intimement du nombre de protéines et de la qualité des informations présentes dans les bases de données. Parmi les 42 protéines de poulets analysées, 37, 18, 22 et 19 protéines ont été identifiées dans les régimes S, C, P et D, respectivement. Pour chaque régime, ces protéines ont pu être classées en 5 classes selon qu'elles sont impliquées dans i) la digestion et la régulation des protéines, ii) le métabolisme des sucres, iii) le métabolisme des lipides, iv) le métabolisme des acides nucléiques et v) l'homéostase intestinale. Parmi les 42 protéines, 18 sont communes à tous les régimes. On observe que la plupart (12/18) sont impliquées dans la digestion et régulation des protéines, mais d'autres sont impliquées dans le métabolisme des sucres (3/18), des acides nucléiques (1/18) et dans l'homéostase intestinale (2/18). Enfin, parmi toutes les protéines identifiées, 16 ne l'ont été que dans un seul régime (13 dans le régime S et 3 dans le régime P). Il semble donc que ces protéines de poulet soient spécifiques des régimes S et P et révèlent une spécificité de réponse du tractus digestif du poulet qui est fonction du type de régime. Il est possible que ces protéines dites « spécifiques » soient également présentes dans les autres régimes mais en plus faible quantité et n'aient donc pas été identifiées. Il semble donc qu'il y ait un effet du régime alimentaire sur la présence de ces protéines. Parmi les protéines surreprésentées dans ces deux régimes, on retrouve i) des protéines qui participent à la dégradation des protéines alimentaires, ce qui témoigne d'une digestibilité efficace de l'aliment (régime S) mais également de la nécessité de maintenir l'équilibre de l'intestin qui est fortement stimulé (présence de protéines liées à l'homéostase, régime S) et ii) des protéines liées au stress (régime P) ce qui suppose que l'intestin est suractivé pour dégrader certains composants alimentaires à priori peu digestibles. Parmi les 42 protéines de poulets retenues dans l'analyse, 13 n'étaient jusqu'alors que prédites. Cette identification par spectrométrie de masse confirme leur existence et leur importance dans la digestion des aliments chez le poulet. Concernant les protéines de plantes, le nombre de protéines identifiées est très variable entre régimes (11, 2, 4 et 0 identifiées dans les régimes S, C, P et D respectivement). La variabilité de ces résultats peut

s'expliquer par la nature du régime et dépend de la richesse des bases de données. De même, il est à noter que seules les protéines solubles ont été analysées. L'analyse de la fraction insoluble de ces échantillons permettrait de compléter ces résultats. Cependant, deux inhibiteurs de protéases déjà décrits dans la littérature ont pu être identifiés. Il s'agit de l'inhibiteur trypsique de type Kunitz dans le régime S et de l'inhibiteur de Bowman-Birk dans le régime P. Lorsqu'il est dénaturé, l'inhibiteur de type Kunitz est digéré/dégradé par la pepsine du gésier, la trypsine et/ou la chymotrypsine pancréatiques (Kunitz, 1947). Sa présence dans le jéjunum indique qu'il n'a pas été dénaturé lors de la fabrication des aliments, et qu'il a probablement inhibé l'activité de la trypsine, ce qui a altéré son action protéolytique. L'inhibiteur de Bowman-Birk inhibe à la fois la trypsine et la chymotrypsine. Il a été identifié à 16 kDa ce qui correspond à un dimère de la molécule. Cette forme dimérique serait plus stable que la forme monomérique (Li de la Sierra et al.,1999), ce qui lui permettrait d'être encore actif et d'inhiber l'activité de protéases digestives dans le jéjunum.

CONCLUSION

Ce travail a permis d'identifier les principaux acteurs impliqués dans la digestion des protéines, de mettre en évidence des protéines communes quel que soit le type de régime alimentaire mais également de mettre en évidence la présence spécifique de protéines liées à certains régimes. Ce travail constitue une première étape dans une perspective plus globale de mieux comprendre et caractériser les mécanismes de digestion des protéines chez le poulet de chair. Dans la continuité de ces premiers résultats, l'analyse par spectrométrie de masse des bandes des autres compartiments permettrait de reconstituer la cinétique fine de digestion des protéines tout au long du tractus. Par ailleurs, une analyse quantitative qui permettrait de connaître dans chaque bande la part relative de chaque protéine identifiée ou bien de suivre l'évolution de la quantité d'une même protéine tout au long du tractus digestif grâce à des anticorps spécifiques permettrait d'acquérir des connaissances supplémentaires. Enfin, ce travail a été focalisé sur les protéines solubles car ce sont celles qui sont potentiellement plus facilement hydrolysables et absorbables par l'organisme mais il serait nécessaire de pouvoir quantifier la part de protéines non solubles faiblement digérées dans les contenus digestifs.

Mieux connaître les mécanismes impliqués dans la cinétique de digestion des protéines doit 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 de remédier à ces différences (process, variétés, ajout d'enzymes exogènes…) afin d'améliorer la valorisation de matières premières protéiques locales par les animaux.

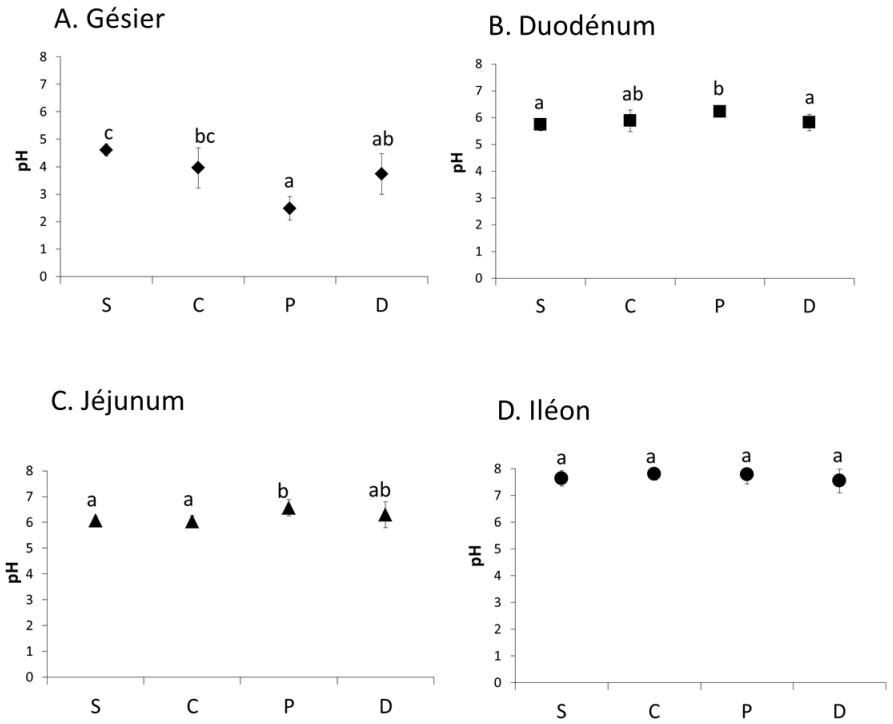
REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient l'ensemble du personnel de l'unité expérimentale de l'INRA de Nouzilly (INRA-UE 1395 PEAT) pour la réalisation de l'étude expérimentale ainsi que DSM Nutritional Products Ltd pour le financement de cette étude.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

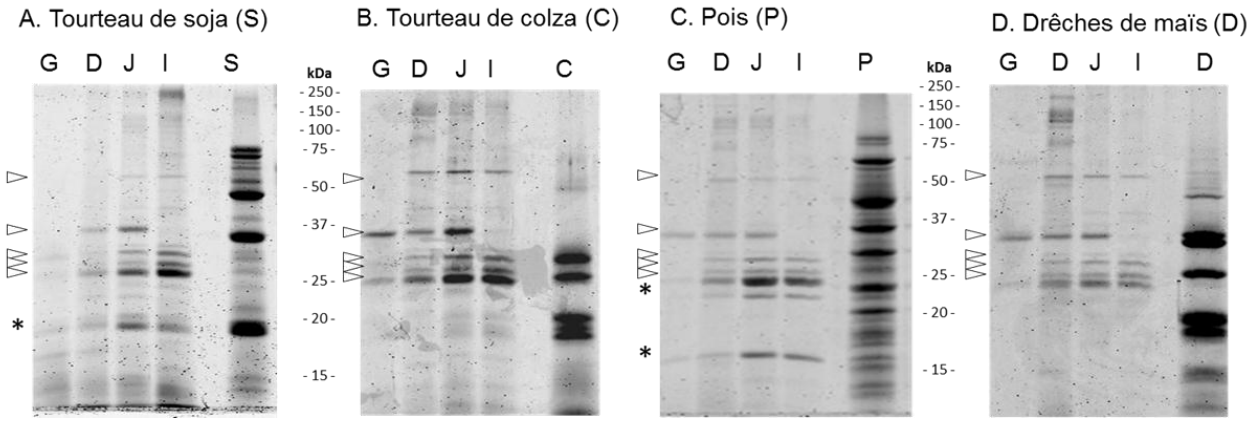
Bradford M. M., 1976. Anal. Biochem, 72, 248-254.
Clarke E., et Wiseman J., 2007. British Poultry Science, 48(6), 703-712.
De Visser C. L. M., Schreuder R., Stoddard F., 2014. OCL, 21(4), D407.
Freitas D. M., Vieira S. L., Angel C. R., Favero A., et Maiorka A., 2011. Journal of Applied Poultry Research, 20(3), 322-334.
Fru-Nji, F., Kluenter A. M., Fischer M., et Pontoppidan K., 2011. Journal of Poultry Science, 48(4), 239-246.
Gomez J. et Corniaux A., 2009. Huitième Journées de la Recherche Avicole, 35-39.
INRA-AFZ, 2004. In : Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage. Paris, INRA editions.
Jiménez-Moreno E., Chamorro S., Frikha M., Safaa H. M., Lázaro R., et Mateos G. G., 2011. Animal Feed Science and Technology, 168(1–2), 100-112.
Jiménez-Moreno E., Frikha M., de Coca-Sinova A., Lázaro R. P. et Mateos G. G., 2013. Animal Feed Science and Technology, 182(1–4), 44-52.
Khajali F. et Slominski B. A., 2012. Poultry Science, 91(10), 2564-2575.
Kunitz M., 1947. The Journal of General Physiology, 30(4), 291-310.
Lawlor P. G., Lynch P. B., Caffrey P. J., O'Reilly J. J. et O'Connell M. K., 2005. Irish Veterinary Journal, 58(8), 447-452.
Li de la Sierra I., Quillien L., Flecker P., Gueguen J. et Brunie S., 1999. Journal of Molecular Biology, 285(3), 1195-1207.
Slominski B. A., Simbaya J., Campbell L. D., Rakow G. et Guenter W., 1999. Animal Feed Science and Technology, 78(3–4), 249-262.

Figure 1. pH des contenus digestifs par compartiment et selon la source de protéines utilisée dans l'aliment (S : Soja ; C : Colza ; P : Pois ; D : Drêches de maïs ; n = 12 par régime et par compartiment)



Au sein d'un même compartiment, les régimes avec une lettre différente ont un pH différent avec P <0,05.

Figure 2. SDS-PAGE des contenus digestifs par régime alimentaire et compartiment digestif (G : Gésier ; D : Duodénum ; J : Jéjunum ; I : Iléon ; n = 12 par régime et par compartiment)



▷ Bandes qui sont présentes dans tous les compartiments des différents régimes, * Bandes qui sont spécifiques à certains régimes