



**HAL**  
open science

## Altération de l'activité des protéases digestives du poulet par un inhibiteur trypsique (Bowman-Birk inhibitor) présent dans l'aliment à base de pois

Emilie Recoules, Marion de Pauw, Michel Lessire, Thierry Moreau, Valérie Labas, Agnès Narcy, Sophie Réhault-Godbert

### ► To cite this version:

Emilie Recoules, Marion de Pauw, Michel Lessire, Thierry Moreau, Valérie Labas, et al.. Altération de l'activité des protéases digestives du poulet par un inhibiteur trypsique (Bowman-Birk inhibitor) présent dans l'aliment à base de pois. RFL2: 2eme Rencontres Francophones sur les Légumineuses, Oct 2018, Toulouse, France. 2018. hal-02785479

**HAL Id: hal-02785479**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02785479v1>**

Submitted on 4 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.

De Pauw M.<sup>1</sup>, Recoules E.<sup>1</sup>, Lessire M.<sup>1</sup>, Moreau T.<sup>1</sup>, Labas, V.<sup>2</sup>, Narcy A.<sup>1</sup>, Rehault-Godbert S.<sup>1</sup>

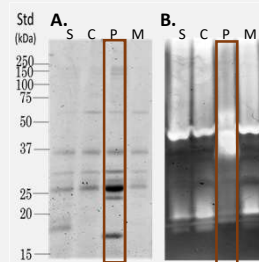
<sup>1</sup>BOA, INRA, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

<sup>2</sup>PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université de Tours, 37380, Nouzilly, France

## Introduction et objectifs

Pour s'affranchir peu à peu des importations de soja, source protéique majeure dans l'alimentation des volailles, la France s'oriente vers des sources alternatives cultivées localement, comme le pois. Toutefois, cette légumineuse contient le **Bowman Birk-inhibitor (BBI)**, un inhibiteur de protéases, qui peuvent altérer la digestibilité globale de l'aliment par l'animal. De fait, des analyses préliminaires ont démontré que les contenus digestifs de poulets nourris avec un aliment à base de pois présentaient des profils biochimiques et protéolytiques différents d'un régime à base de colza, soja ou maïs (Figure 1A et 1B). De plus, des analyses protéomiques récentes ont montré la présence d'une protéase de type trypsine (PRSS3) uniquement chez les animaux ayant reçu le régime à base de pois (Recoules *et al.* Poul. Sci. 2017; 96(6):1735). Cette PRSS3 est décrite chez l'homme comme une protéase sécrétée par l'hôte pour dégrader des inhibiteurs délétères (adaptation/mécanisme de défense de l'hôte), car ces derniers inhibent l'activité des protéases digestives telle que la trypsine PRSS2.

L'objectif de ce travail était donc de 1) purifier et caractériser le BBI à partir d'un aliment à base de pois, 2) identifier ses protéases digestives cibles chez le poulet, en utilisant le BBI purifié pour générer une chromatographie d'affinité BBI-sépharose et 3) d'évaluer *in silico* l'interaction des trypsines PRSS2 et PRSS3 avec le BBI, pour mieux apprécier le mécanisme d'action de la PRSS3 de « défense ».



**Figure 1**– SDS-PAGE (A., conditions dénaturantes / réductrices) et zymographie en gel de gélatine (B., conditions non réductrices), de contenus jéjunaux de poulets nourris avec du soja (S), du colza (C), du pois (P, encadré marron) et des drèches de maïs (M).

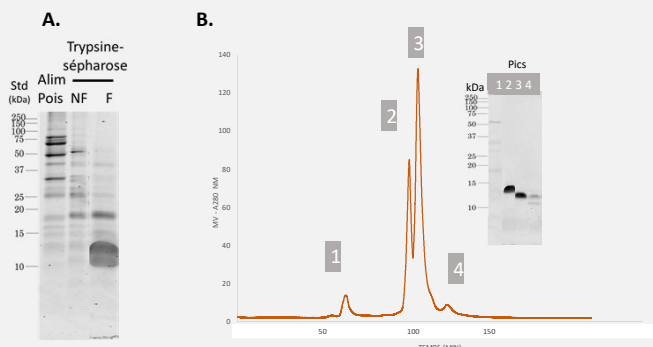
## Résultats

### Objectif 1 - Purification du BBI

#### Etape 1

-Extraction de la part soluble de l'aliment « pois » (Figure 2, Alim Pois)

-Chromatographie d'affinité (Figure 2, non fixé NF et fixé F) et chromatographie d'exclusion sur la fraction Fixée de la chromatographie d'affinité



**Figure 2** – Les différentes étapes de la purification du BBI à partir de l'aliment pois. A. SDS-PAGE 15% de la fraction soluble de l'aliment pois (Alim Pois) et de la fraction non fixée (NF) et fixée (F) de la trypsine-sépharose. B. Profil chromatographique de la fraction fixée de la trypsine-sépharose. Insert : SDS-PAGE 15% des différents pics 1, 2, 3, 4.

✓ Deux protéines majeures de masse apparente de 13-14 kDa ont été enrichies grâce à la chromatographie d'affinité à la trypsine (Fig. 1A), puis purifiées par HPLC (Fig. 1B, pics 2 et 3)

#### Etape 2

Identification des protéines présentes dans les pics chromatographiques majeurs 2 et 3, par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 3)

**Pic 2** Seed trypsin/chymotrypsin inhibitor IVB; 1-72; Masse moyenne : 7849,9436  
Séquence : GDDVKSACCDTCLCTKSNPPTCRCVDVGETCHSALCSLCAYSNPPKQCQCFDTQKFCYKACHNSELEEVIKN

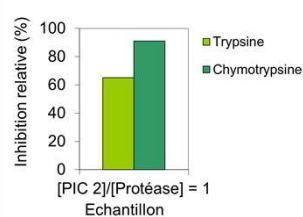
**Pic 3** Seed trypsin/chymotrypsin inhibitor II; 1-63 Masse moyenne : 6807,7892  
Séquence : GDDVKSACCDTCLCTKSNPPTCRCVDVGETCHSALCSLCAYSNPPKQCQCFDTQKFCYKACHN

**Figure 3** – Résultats de spectrométrie de masse

✓ Les deux pics obtenus contiennent les deux protéoformes connus du BBI (1-72, pic 2 et 1-63, pic 3)

#### Etape 3

Validation de l'intégrité des activités inhibitrices du BBI purifié contre deux protéases pancréatiques, la trypsine et chymotrypsine bovines

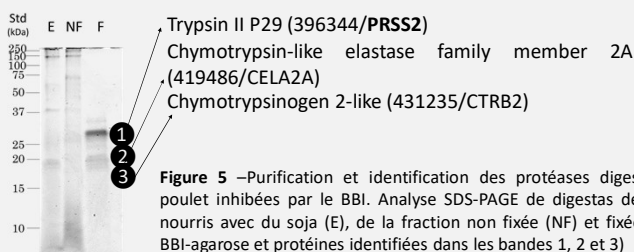


**Figure 4** – Pourcentage d'inhibition du pic 2 purifié contre la trypsine et la chymotrypsine bovines

✓ Après purification, le BBI (pic 2) inhibe 64% et 90% des activités trypsine et chymotrypsine, respectivement. NB: Des résultats similaires ont été observés avec le pic 3

### Objectif 2 – Identification des protéases digestives cibles chez le poulet

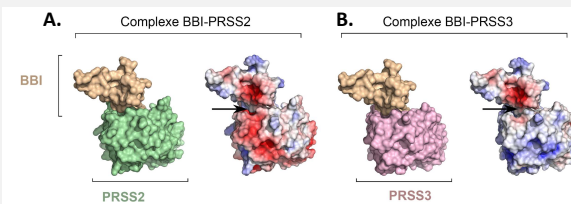
Génération d'une colonne d'affinité BBI-agarose, purification des protéases cibles à partir de digestas jéjunaux de poulets nourris à base de soja (qui ne contiennent pas de PRSS3, voir introduction) et identification des protéases cibles par spectrométrie de masse



**Figure 5** – Purification et identification des protéases digestives du poulet inhibées par le BBI. Analyse SDS-PAGE de digestas de poulets nourris avec du soja (E), de la fraction non fixée (NF) et fixée (F) à la BBI-agarose et protéines identifiées dans les bandes 1, 2 et 3)

✓ Trois protéases présentes dans le jéjunum de poulets nourris au soja interagissent avec le BBI de pois, dont la trypsine, PRSS2. La PRSS2 digestive du poulet est donc bien une cible privilégiée du BBI

### Objectif 3 – Etude structurale de l'interaction du BBI avec la trypsine digestive PRSS2 et la trypsine PRSS3 spécifique du régime « pois »



**Figure 6** - Modélisation de l'interaction de la PRSS2 (en vert, A.) et de la PRSS3 (en rose B.) de poulet avec le BBI de pois (en orange, A., B.); Les régions chargées positivement et négativement sont colorées en bleu et en rouge respectivement sur la surface moléculaire. La flèche positionne le site d'interaction protéase/inhibiteur. La structure du BBI a été obtenue à la PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org): fichier 1PBI). Les modèles de structure des 2 protéases ont été obtenus par modélisation comparative en utilisant les outils SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) puis PYMOL (<https://pymol.org/2/>).

✓ Dans le modèle d'interaction BBI/PRSS2 (A.), il y a un conflit de charges entre deux régions chargées négativement (en rouge) qui n'est pas observé dans le complexe BBI/PRSS3 (B.). Le BBI pourrait interagir préférentiellement avec la PRSS3 (protéase suicide) et préserver ainsi l'activité de la PRSS2

## Conclusion

Ce travail a permis de montrer que 1) le BBI incorporé dans l'aliment de poulet n'était pas inactivé par le processus de fabrication de l'aliment (le BBI purifié à partir de l'aliment est actif) et 2) qu'il est capable d'inhiber au moins trois protéases digestives chez le poulet: la trypsine II P29 (PRSS2), la chymotrypsin-like elastase family member 2A (CELA2A) et la Chymotrypsinogen 2-like (CTRB2). Des premiers éléments de comparaison de structures 3D entre PRSS2 et PRSS3 suggèrent que la PRSS3 sécrétée spécifiquement suite à l'ingestion d'un aliment à base de pois pourrait interagir préférentiellement avec le BBI pour permettre à la PRSS2 de poursuivre la digestion. Au regard de ces résultats, on peut s'interroger sur l'effet à long terme de la présence du BBI de pois dans l'alimentation sur l'efficacité et la santé digestive du poulet, sachant que le BBI du soja aurait des propriétés bénéfiques sur la santé digestive d'autres monogastriques, dont l'Homme. De plus, les petits inhibiteurs de plantes présentent également un intérêt comme agents anticancéreux (Srikanth et Chen. *Front Pharmacol.* 2016;7:470). Une comparaison des activités (stabilité, protéases cibles) et des effets *in vivo* du BBI de pois et du BBI de soja chez le poulet, le porc et l'Homme, pourrait donc s'avérer particulièrement intéressante.