

INTERET DE LA PROTEOMIQUE POUR ETUDIER LA CINETIQUE DE DIGESTION DES PROTEINES DE COLZA CHEZ LE POULET DE CHAIR

Recoules Emilie¹, Lessire Michel¹, Labas Valérie^{2,3}, Duclos Michel J.¹, Combes-Soia Lucie^{2,3}, Lardic Lionel¹, Peyronnet Corinne⁴, Quinsac Alain⁵, Narcy Agnès¹, Réhault-Godbert Sophie¹

¹BOA INRA, UNIVERSITE DE TOURS - 37380 NOUZILLY,

²PRC INRA, CNRS, IFCE, UNIVERSITE DE TOURS - 37380 NOUZILLY,

³PLATE-FORME CIRE, POLE D'ANALYSES ET D'IMAGERIE DES BIOMOLECULES, INRA, UNIVERSITE DE TOURS, CHRU DE TOURS - 37380 NOUZILLY

⁴TERRES UNIVIA - 11 rue de Monceau - 75008 PARIS

⁵TERRES INOVIA - 11 rue Monge, Parc industriel - 33600 PESSAC

emilie.recoules@inra.fr ou sophie.rehault-godbert@inra.fr

RÉSUMÉ

Pour mieux comprendre le processus de digestion des protéines de colza chez le poulet de chair, nous avons analysé leur cinétique de dégradation dans les différents segments du tractus digestif. Des poulets de chair (n = 24) ont reçu un régime semi-synthétique contenant du tourteau de colza comme seule source de protéines. A 21 jours, les animaux ont été mis à jeun, puis réalimentés et euthanasiés à trois temps différents après la fin de la période d'alimentation (A : 0 mn, B : 1h30 et C : 3h). Les contenus digestifs des différents segments ont été collectés et leur contenu en protéines a été analysé par électrophorèse, zymographie en gélatine et spectrométrie de masse. Les résultats montrent que les profils protéiques du jabot, proventricule/gésier et duodénum sont très différents tandis que le jéjunum et l'iléon présentent des profils électrophorétiques très similaires. Une activité protéolytique est visible dès le proventricule/gésier et se révèle particulièrement intense dans le jéjunum et l'iléon. L'analyse par spectrométrie de masse des contenus de tous les compartiments a permis d'identifier 86 protéines de poulet (*Gallus gallus*) et 38 protéines végétales. Nous avons également mis en évidence des spécificités de composition protéique par segment digestif, ce qui nous a permis de préciser leurs fonctions respectives. En outre, nous avons identifié 9 protéines de colza qui ne sont pas complètement dégradées et ce, même après 3h de digestion. Ce travail souligne l'intérêt des approches protéomiques pour mieux caractériser la chronologie des processus digestifs chez le poulet lors de l'utilisation de matières premières variées. A terme, ces nouvelles connaissances permettront de proposer des leviers d'amélioration de la digestibilité des aliments, en jouant notamment sur les procédés de fabrication et/ou l'ajout d'enzymes exogènes.

ABSTRACT

Studying the digestion kinetics of rapeseed proteins along the digestive tract in broiler chickens using proteomics

To better understand the digestion of rapeseed proteins in chickens, we studied their kinetic of digestion all along the digestive tract. Ross PM3 broilers (n = 24) were fed a semi-synthetic experimental diet containing rapeseed meal as the unique protein source. On day 21, after 5 hours of fasting followed by 3 hours of synchronized feeding, birds were euthanized at three different times after feed withdrawal (A: 0 mn ; B: 1h30 and C: 3h). The digestive content of the different digestive segments (crop, proventriculus/gizzard, duodenum, jejunum, ileum) were collected for further analyses by SDS-PAGE, zymography and mass spectrometry. Results showed that proteolytic profiles of the crop, proventriculus/gizzard and duodenum contents were quite different whereas those of jejunum and ileum were very similar. Proteolytic activities were detectable from the proventriculus/gizzard onwards, while intensity was progressively increased in distal segments. Mass spectrometry analysis allowed the identification of 86 chicken (*Gallus gallus*) proteins and 38 rapeseed (*Brassica napus*) proteins, including proteins that were "segment-specific". In addition, we identified 9 poorly digestible rapeseed proteins (recovered in the ileum), even after 3h of digestion. This works provides insights on the role of each digestive segment in protein digestion and highlights the usefulness of proteomic approaches to better characterize the kinetic of protein digestion in broilers. In a longer term, these knowledges could help identifying levers to improve protein digestion of various feedstuffs using different technological processes (to denaturate proteins resisting digestion) or enzyme supplementation (to increase protein digestibility).

INTRODUCTION

Le tourteau de colza est une ressource protéique intéressante dans l'alimentation du poulet de chair. Sa teneur en protéines, bien qu'inférieure à celle du tourteau de soja reste élevée et son profil en acides aminés est bien équilibré. Cependant, plusieurs constituants limitent son incorporation dans les aliments, notamment ses facteurs antinutritionnels, sa teneur en fibres et une digestibilité des protéines inférieure à celle du tourteau de soja. Cette différence de valeur nutritionnelle peut s'expliquer par des différences en termes de composition chimique mais aussi par la nature de certaines protéines constitutives. Chez le poulet de chair, les napines et cruciférines ont été rapportées pour être relativement bien digérées (Kasprzak *et al.* 2016) bien que certaines protéines soient présentes en fin de tractus digestif. Ces données indiquent que les acides aminés issus de ces protéines ne seront pas ou seulement partiellement absorbés et disponibles pour l'animal. Au-delà de ces exemples, très peu de données sont disponibles sur les autres protéines et sur les facteurs qui peuvent restreindre l'utilisation des protéines de colza par le poulet de chair. Afin de permettre une meilleure valorisation du colza dans les aliments, il convient d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la digestion des protéines afin d'identifier des leviers potentiels permettant une amélioration de leur digestibilité. Les objectifs de l'étude étaient 1) de caractériser le rôle des différents segments digestifs dans la digestion des protéines, 2) d'identifier les protéines impliquées dans les processus de digestion, 3) d'identifier d'éventuelles protéines de colza résistantes à la digestion.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Dispositif expérimental

Nous avons utilisé des poulets de chair Ross PM3 (n = 24) pendant une période d'élevage de 21 jours. De J0 à J7 les animaux ont été élevés au sol. A J7 les animaux ont été placés en cage individuelle. De J0 à J13 les animaux ont reçu un régime démarrage à base de blé, maïs et tourteau de soja. Pendant la période d'adaptation (J13-J17), l'aliment était un mélange d'aliment démarrage et d'aliment expérimental (50/50) puis pendant la phase expérimentale (J17-J21), les animaux ont reçu 100% d'aliment expérimental. Celui-ci était un régime semi-synthétique (tourteau de colza : 56,5%, amidon de maïs : 22,43%, saccharose : 11,05%) avec le tourteau de colza comme source unique de protéines. Du dioxyde de titane a été ajouté à l'aliment (0,5%) afin de mesurer la digestibilité iléale de l'azote. Des mesures hebdomadaires de poids vif et consommation d'aliment ont été réalisées. Les apports en eau et en aliments granulés étaient fournis *ad libitum* pendant toute la période d'élevage. Sur la base du poids vif à

J17 et du gain de poids entre J13 et J17, les animaux ont été répartis en 3 groupes homogènes (A, B et C, soit n = 8 par groupe). A J21, les animaux qui avaient préalablement été mis à jeun pendant 5h ont été réalimentés de manière synchronisée pendant 3h puis euthanasiés par injection de pentobarbital sodique. L'euthanasie a eu lieu à 3 temps différents après la fin de la période de réalimentation (groupe A : 0 mn, groupe B : 1h30 et groupe C : 3h). Les contenus de 5 compartiments digestifs (jabot, proventricule/gésier, duodénum, jéjunum, iléon) ont été collectés et conservés à - 80 °C.

1.2. Analyses des contenus digestifs

Le pH des contenus des différents segments digestifs ont été mesurés (pH-mètre SevenGoTM SG2, électrodes InLabbs Solids Pro ; Mettler-Toledo, France). Les échantillons de digesta ont été préparés selon la méthode décrite dans Recoules *et al.* (2017). Pour chaque échantillon, le poids initial (prise d'essai + tampon) ainsi que le poids final (poids du culot après centrifugation et récupération du surnageant) ont été utilisés pour calculer le poids de la part insoluble : $(\text{poids final} / \text{poids initial}) * 100$. La concentration en protéines des surnageants a été mesurée par DC Biorad (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Après avoir vérifié l'homogénéité des échantillons individuels par SDS-PAGE, les échantillons ont été poolés par groupe et segments digestifs (n = 8). Les pools ont été constitués sur la base de la concentration protéique afin que chaque échantillon contribue à part égale à la concentration protéique du pool. Les pools ont ensuite été analysés par SDS-PAGE puis zymographie (Réhault-Godbert *et al.* 2008; Recoules *et al.* 2017). La zymographie a été réalisée à pH physiologiques pour les différents segments digestifs afin de se rapprocher au mieux des conditions *in vivo*. Les échantillons (aliment, n=1 et contenus digestifs, n=15 : 3 groupes*5 segments) ont ensuite été inclus dans un gel d'acrylamide sans réaliser de fractionnement (concentration des protéines en une seule bande), colorées au bleu de Coomassie puis analysées par nanoLC-MS/MS (Marie *et al.* 2015).

1.3 Analyses statistiques

Les effets du segment digestif et/ou du groupe (A, B ou C) sur le pH, la part insoluble, la concentration en protéines du surnageant ont été analysés avec le logiciel R en utilisant le modèle linéaire généralisé ou le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis selon la distribution des variables. La différence a été considérée significative pour $P < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Consommation, pH et digestibilité

La consommation d'aliment pendant les 3 heures de réalimentation a été similaire pour les 3 groupes (A :

35 ± 6,7 g; B : 31 ± 5,7 g et C : 34 ± 3,6 g). Les pH des contenus des différents segments digestifs sont représentés sur la figure 1. Les valeurs varient de 4,0 ± 0,85 (Prov/Gésier) à 8,2 ± 0,25 (Iléon). Une différence significative a été observée entre le proventricule/gésier, le jéjunum et l'iléon. La digestibilité iléale apparente de l'azote était de 72 ± 5,3 % en moyenne. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes (A : 69 ± 5,8%, B : 74 ± 3,8% et C : 72 ± 5,4%).

2.2 Concentration en protéines et part insoluble des contenus digestifs

La comparaison des concentrations en protéines entre les segments digestifs n'a été faite que pour le groupe A (jabots vides pour la plupart des animaux des groupes B et C). La teneur en protéines varie de 12,4 ± 3,7 mg/ml (Iléon) à 25,8 ± 10,5 mg/ml (Duodénum). La concentration en protéines dans le duodénum est significativement supérieure à celles obtenues dans les autres segments. La part relative d'échantillon insoluble varie de 11,4 ± 3,1% (Duodénum) à 34,7 ± 3,3% (Iléon). Elle diminue du jabot au duodénum et augmente dans le jéjunum et l'iléon (résultats non montrés). Ces résultats indiquent que le contenu digestif contient principalement des composés solubles. La part plus importante de composés insolubles (indigestibles) en fin de tractus digestif pourrait s'expliquer par l'absorption des composés solubles. Si l'on compare les groupes A, B et C (résultats non montrés), la teneur en protéines est plus faible dans le groupe C certainement due à l'hydrolyse progressive et l'absorption des protéines par l'animal au cours du temps. Cependant, la part insoluble reste relativement stable entre les groupes ce qui indique qu'une partie de l'aliment reste insoluble et potentiellement indigestible.

2.3 Identification des protéines et activité protéolytique

L'analyse par électrophorèse (Figure 2A) a permis d'identifier des bandes dans le jabot qui sont visibles dans les groupes A, B et C. Ces bandes correspondent aux protéines de l'aliment. Le profil protéique reste identique quel que soit le groupe, ce qui suggère qu'il n'y a pas d'hydrolyse des protéines dans ce compartiment digestif. Dans le proventricule/gésier, certaines bandes visibles dans le jabot sont toujours présentes (groupe A) mais disparaissent progressivement au cours du temps (groupes B et C). Dans le duodénum, de très nombreuses bandes sont visibles et aucune différence notable n'a pu être détectée entre les groupes A, B et C. Dans le jéjunum et l'iléon, les profils sont similaires et aucune différence notable n'a été mise en évidence entre les groupes.

Les approches par zymographie ont permis d'évaluer l'activité protéolytique dans les différents segments (Figure 2B). Une légère activité a été relevée dans le

jabot des animaux du groupe B mais serait certainement liée à un reflux puisqu'elle n'est pas visible dans les autres groupes. De nombreuses bandes protéolytiques ont été détectées dans le proventricule/gésier avec une plus forte intensité pour le groupe B. L'intensité de l'activité protéolytique semble augmenter du duodénum à l'iléon, et ce dans chacun des groupes A, B et C.

2.4 Caractérisation des protéines par spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution a permis d'identifier 86 protéines de poulet (*Gallus gallus*). Le nombre de protéines identifiées dans chaque segment et pour les groupes A, B et C est présenté en Figure 3A. Pour le proventricule/gésier, le nombre de protéines le plus élevé est observé dans le groupe B. Le duodénum est le segment qui contient le plus grand nombre de protéines (n=69) et la plupart des protéines identifiées étaient spécifiques de ce segment (non retrouvées dans les autres compartiments digestifs). Ce nombre diminue légèrement avec la progression de la digestion. Dans le jéjunum, 33 protéines ont pu être identifiées. Le nombre de protéines augmente au fur et à mesure de la digestion. Cette tendance, inverse à celle observée dans le duodénum, suppose que les protéines qui disparaissent du duodénum au cours du temps, sont celles que l'on retrouve dans le jéjunum. Dans l'iléon, 23 protéines ont été identifiées et ce nombre reste relativement stable entre les groupes A, B et C.

L'annotation fonctionnelle des protéines identifiées a montré que dans le duodénum, les enzymes protéolytiques représentent environ 20% des protéines identifiées, la majorité des protéines étant impliquée dans le métabolisme des lipides, des sucres et des vitamines. La moitié des protéines est impliquée dans le maintien de l'homéostasie intestinale et la réponse au stress. Le duodénum semble donc être un segment important pour le maintien de l'intégrité et du bon fonctionnement de l'ensemble du tractus digestif. La fonction majeure du jéjunum et de l'iléon apparaît très similaire, les protéases représentant la majorité des protéines identifiées (60-70%). Ces deux segments intestinaux distaux participent davantage à la protéolyse des protéines de l'aliment.

Concernant les protéines de colza, 38 ont pu être identifiées (Figure 3B). Le jabot est un lieu de stockage de l'aliment ce qui explique que seule des protéines végétales ont été identifiées dans ce compartiment. Globalement, dans les autres compartiments, le nombre de protéines végétales diminue entre les groupes A et C, en accord avec la progression de la digestion. Les résultats indiquent que 9 protéines de colza sont encore présentes dans l'iléon, ce qui suggère qu'elles résistent partiellement à la digestion (Tableau 1).

Les principales protéines de colza identifiées au niveau iléal sont des cruciférines et des inhibiteurs

trypsiques. Les napines qui étaient visibles dans le jabot et proventricule/gésier et ce même après 3h de digestion, n'ont pas été retrouvées dans les autres segments, ce qui confirme que ces protéines sont relativement bien digérées par le poulet (Kasprzak *et al.* 2016).

CONCLUSION

Ce travail a permis de souligner le rôle des différents segments digestifs dans la digestion des protéines, soulignant notamment 1) le rôle clé du duodénum dans le maintien de l'intégrité digestive et la réponse

au stress et 2) la grande similarité entre le jéjunum et l'iléon. Par ailleurs, l'identification de protéines de colza plus difficiles et plus longues à digérer ainsi que la présence de facteurs antinutritionnels (inhibiteur trypsique) témoigne d'une perturbation du processus digestif et peut expliquer la présence accrue de protéines impliquées dans la réponse au stress et le maintien de l'homéostasie. Ce travail permet une meilleure compréhension du rôle des segments digestifs, de la nature des protéines non digérées et des facteurs antinutritionnels et doit conduire vers des leviers pour améliorer la digestibilité des protéines de colza.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Kasprzak, M. M., Houdijk, J. G., Liddell, S., Davis, K., Olukosi, O. A., Kightley, S., White, G. A. & Wiseman, J.(2016). Rapeseed napin and cruciferin are readily digested by poultry. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*.

Marie, P., Labas, V., Brionne, A., Harichaux, G., Hennequet-Antier, C., Nys, Y. & Gautron, J.(2015). Quantitative proteomics and bioinformatic analysis provide new insight into protein function during avian eggshell biomineralization. *J Proteomics* 113, 178-193.

Recoules, E., Sabboh-Jourdan, H., Narcy, A., Lessire, M., Harichaux, G., Labas, V., Duclos, M. J. & Rehault-Godbert, S.(2017). Exploring the in vivo digestion of plant proteins in broiler chickens. *Poultry Science* 96, 1735-1747.

Réhault-Godbert, S., Gautron, J., Labas, V., Belghazi, M. & Nys, Y.(2008). Identification and Characterization of the Precursor of Chicken Matrix Metalloprotease 2 (pro-MMP-2) in Hen Egg. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6294-6303.

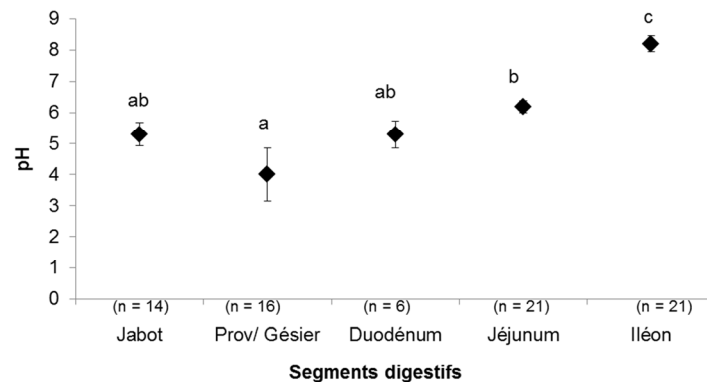


Figure 1. Valeurs de pH des contenus des différents segments digestifs (groupes A, B et C confondus).

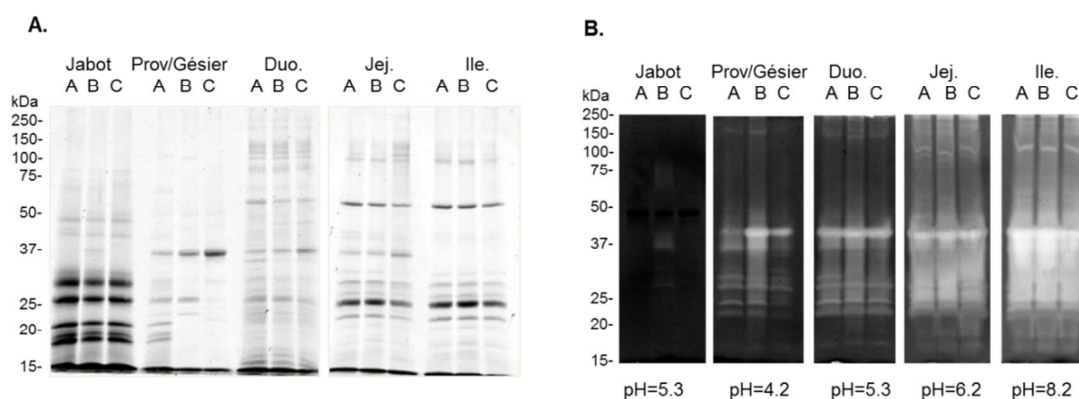


Figure 2. Profils des contenus digestifs obtenus par SDS-PAGE 12.5% (A) et zymographie (12.5%) en gélatine aux pH physiologiques (Fig. 1) (B). Prov/Gésier., proventricule-gésier ; Duo., Duodénum ; Jej., Jéjunum ; Ile., Iléon. Marqueur de taille en kDa à gauche des gels et zymographies. Dépôts de 40 μ g (SDS-PAGE) et 5 μ g (Zymographie) de protéines.

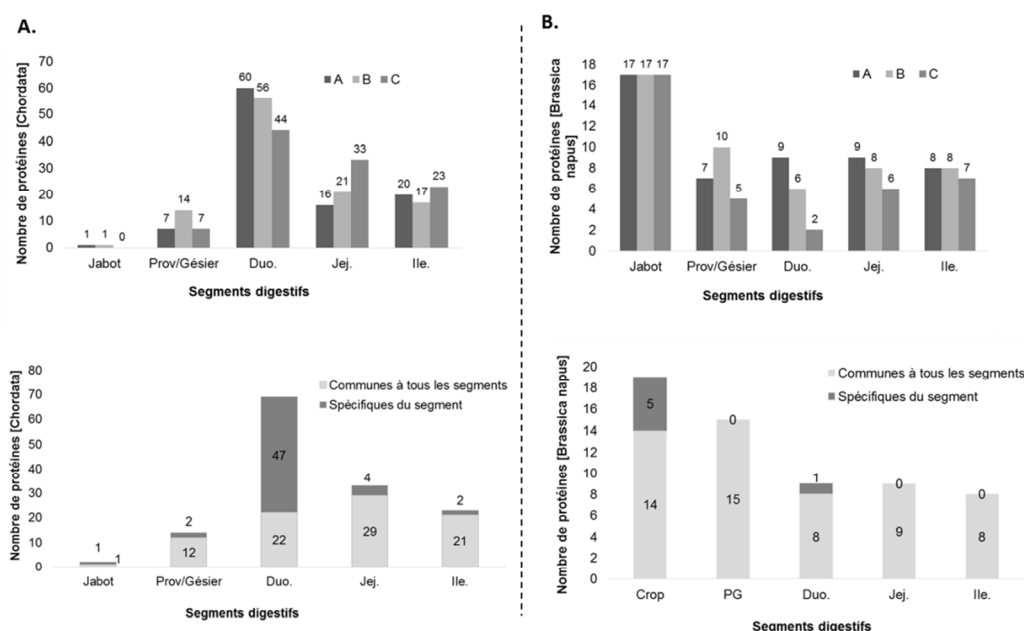


Figure 3. Nombre de protéines animales (A) et végétales (B) par segments digestifs, en fonction des groupes A, B, et C (en haut), et spécificité des protéines par segment digestif (en bas). Prov/Gésier., Proventricule-Gésier ; Duo., Duodénum ; Jej., Jéjunum ; Ile., Iléon.

Tableau 1 : Liste des 9 protéines de colza identifiées dans l'iléon

Protéines	Accession number
Rapeseed trypsin inhibitor 3	CAJ44307.1
PREDICTED: putative phosphatidylglycerol/phosphatidylinositol transfer protein DDB_G0282179	XP_013714672.1
GDSE esterase/lipase At1g54020-like precursor	NP_001302825.1
PREDICTED: trypsin inhibitor DE-3-like	XP_013713143.1
BnaA08g13680D	CDY14237.1
Cruciferin subunit,	AAK07609.1
BnaA06g36310D/cruciferin precursor	CDY22309.1
BnaA10g02240D	CDX89858.1
BnaA09g04300D	CDY19777.1