

REGULATION DU GLYCOGENE MUSCULAIRE ET RELATION AVEC LA QUALITE DE LA VIANDE DE POULET

Jlali M.¹, Sibut V.^{1,2}, Gigaud V.², Sellier¹ N., Tesseraud S.¹, Métayer Coustard S.¹, Duclos M. J.¹, Le Bihan-Duval E.¹, Berri C.¹

¹INRA, UR83 Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly ;

²ITAVI, 37380 Nouzilly

RÉSUMÉ

Cette étude vise à évaluer l'impact du génotype et de la nutrition sur les caractéristiques de qualité de viande et à approfondir l'étude des voies métaboliques susceptibles d'être impliquées dans les variations observées. Nous avons étudié l'effet de deux aliments isoénergétiques différant pour la teneur en protéines (P+ à 22,9% MAT ou P- à 17% MAT) sur les caractéristiques musculaires et de qualité de viande de deux lignées expérimentales de poulets différant pour l'engraissement abdominal (lignées maigres et grasses). L'aliment affecte les réserves en glycogène musculaire uniquement chez les animaux maigres. Celles-ci sont plus élevées avec le régime P+ qu'avec le régime P-. En accord avec ces variations, le pH ultime musculaire et les caractéristiques de couleur et de rétention en eau de la viande sont affectés par l'aliment. Pour comprendre les mécanismes impliqués, nous avons évalué l'impact de l'aliment et du génotype sur l'activation d'un certain nombre d'enzymes contrôlant la synthèse et la dégradation du glycogène. Un effet significatif du traitement a été observé sur les niveaux de phosphorylation de l'AMPK α , de la protéine kinase B (PKB ou Akt) et de la glycogène synthase (GS), avec des niveaux supérieurs observés chez les poulets maigres nourris avec le régime P-, c'est-à-dire chez les animaux présentant les réserves en glycogène musculaire les plus faibles. Selon nos observations, une restriction en protéines aurait pour conséquence de stimuler les voies impliquées dans l'utilisation du glycogène musculaire, en particulier chez des animaux présentant des dépôts adipeux réduits. La réponse accrue de ce type d'animaux pourrait être liée à leur moindre capacité à stocker le glycogène, avec des activités enzymatiques qui à la fois inhibent sa synthèse et activent sa dégradation *in situ*. Par ailleurs, nous avons montré que l'activation de l'AMPK dans le muscle *in vivo* intervient aussi dans la régulation post-mortem de la glycolyse et donc de la chute de pH. Sur le plan pratique, cette étude confirme le contrôle génétique des caractéristiques musculaires en lien avec la qualité technologique de la viande de volaille et indique par ailleurs que l'alimentation pourrait constituer un levier efficace pour moduler l'ensemble de ces caractéristiques.

ABSTRACT

The present study aims at evaluating the impact of genotype and diet on the technological meat traits and at investigating molecular mechanisms implied in the observed variations. We studied the effect of two isoenergetic diets differing in crude protein content (P+: 22.9% CP vs P-: 17% CP) on breast muscle characteristics and meat quality traits from 2 experimental lines of chicken divergently selected on abdominal fatness (the fat and lean lines). The diet affected muscle glycogen content only in lean chickens. Glycogen was higher with the P+ than with P- diet. Changes in muscle glycogen were accompanied by consistent changes in terms of breast meat ultimate pH, colour and drip loss. To investigate the molecular mechanisms underlying these metabolic changes, we evaluated the impact of diet and genotype on the activation of enzymes involved in the control of glycogen synthesis and degradation. A significant effect of diet was observed on the levels of phosphorylation of AMPK α , protein kinase B (PKB or Akt) and glycogen synthase (GS), with higher levels observed in lean chickens fed with the P- diet, i.e. in the animals exhibiting the lowest muscle glycogen content at death. A restriction in protein would result in the use of muscle glycogen, particularly in animals with reduced fat deposits. The greater response of such animals could be linked to their lower capacity to store glycogen, with enzymatic activities which inhibits its synthesis and activates its degradation *in situ*. Besides, we highlighted that AMPK activation *in vivo* is also involved in the regulation of post-mortem glycolysis and thus muscle pH fall rate. The present study confirms the genetic control of muscle traits in relation to poultry meat quality and more originally suggests nutrition as an efficient tool to modulate these characteristics.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, nous assistons à une forte progression de la consommation des produits élaborés (découpe, jambons, etc.) au détriment des volailles consommées en carcasses entières. Ceci pose la question de l'adaptation de la viande à ces nouvelles formes d'utilisation et renforce l'importance de sa qualité technologique. Chez le poulet, plusieurs études ont montré que l'évolution du pH de la viande après la mort est en grande partie déterminée par la teneur en glycogène du muscle au moment de l'abattage (Berri et al., 2007). En effet, ces réserves énergétiques musculaires disponibles au moment de la mort (estimées au travers du potentiel glycolytique) constituent un élément déterminant de la qualité *via* leur effet sur le pH ultime de la viande (Le Bihan et al., 2008). L'objectif du présent travail vise à approfondir l'étude des voies métaboliques impliquées dans les variations de glycogène musculaire, au travers de l'activité d'enzymes contrôlant sa synthèse et sa dégradation dans le muscle telles que l'AMP-activated protéine kinase (AMPK), la protéine kinase B (Akt), la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) et la glycogène synthase (GS) (Figure 1).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et dispositif expérimental

Les poulets (mâles et femelles) étudiés sont issus de deux lignées expérimentales grasse (G) et maigre (M) sélectionnées de manière divergente pour ou contre l'engraissement abdominal (Leclercq et al., 1980). A partir de 3 semaines d'âge et jusqu'à l'abattage à 9 semaines, les animaux ont reçu à volonté deux aliments iso-énergétiques, mais qui diffèrent pour la teneur en protéines : P+ (22,9% MAT) ou P- (17% MAT). Au total 608 poulets ont été mis en élevage (76 par lignée/aliment/sexe). Parmi eux, 496 ont été abattus (après une mise à jeun de 8 h) à l'abattoir expérimental de l'INRA de Nouzilly (62 par génotype/aliment/sexe).

1.2. Croissance, composition corporelle et caractéristiques musculaires

Quinze minutes après l'abattage, nous avons prélevé et stocké à -80°C du muscle *Pectoralis major* en vue des analyses biochimiques (20 animaux par traitement). Le lendemain de l'abattage, nous avons prélevé les filets et le gras abdominal sur l'ensemble des animaux abattus afin de déterminer leur composition corporelle (% filet et % de gras abdominal) en rapport au poids vif. Le potentiel glycolytique (PG en μM équivalent lactate/g de muscle) du muscle *Pectoralis major* a été estimé selon l'équation de Monin et Sellier (1985) : $\text{PG} = 2 \times [\text{glycogène} + \text{glucose-6-phosphate} + \text{glucose libre}] + \text{lactate}$, à partir d'échantillons prélevés 15 min *post-*

mortem. La mesure de PG a été réalisée sur 20 animaux par traitement (lignée/aliment/sexe).

1.3. Indicateurs de la qualité de la viande

Le pH du muscle *Pectoralis major* a été mesuré 15 min après abattage (pH15) après broyage dans une solution 15mM KCl - 5mM iodoacétate (2g / 18ml) avec un pH- mètre portable muni d'une électrode en verre (Modèle 506, Crison Instruments, SA, Espagne). Le pH ultime (pHu) a été mesuré 24 h *post-mortem* par insertion directe de la sonde du pH-mètre. Les paramètres de couleur ont été mesurés à 24 h *post-mortem* sur la face ventrale du muscle au niveau de sa partie la plus épaisse à l'aide d'un spectrophotomètre portable (Hunterlab, reston, VA 20190, USA). Les paramètres évalués étaient la luminance L^* , qui est liée au pouvoir de réflectance de la viande, et les indices de coloration rouge a^* et jaune b^* . L'exsudat a été mesuré à 5 jours *post-mortem* après 4 jours de ressuage en sachet plastique suspendu en chambre froide (+2°C). Les pertes en eau par exsudation sont exprimées en pour cent du poids du muscle avant ressuage. L'ensemble des critères de qualité de viande a été mesuré sur tous les animaux abattus, sauf le pH15 qui a été seulement évalué sur 160 animaux correspondants à 20 animaux par traitement (génotype/aliment/sexe).

1.4. Quantification des niveaux protéiques et de l'état de phosphorylation

L'objectif des analyses biochimiques était dans un premier temps d'identifier des mécanismes physiologiques à l'origine des différences observées en terme de glycogène musculaire en relation avec le régime alimentaire et l'origine génétique. Pour cette raison les analyses ont été réalisées sur les poulets mâles issus de 3 groupes : poulets gras nourris avec le régime P- (GP-), poulets maigres nourris avec le régime P- (MP-) et poulets maigres nourris avec le régime P+ (MP+). Les mesures ont été réalisées par Western Blot sur 6 animaux représentatifs par groupe en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre des protéines phosphorylées ou non. Les enzymes étudiées sont l'AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylée ou non sur la thr172, la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3 α/β) phosphorylée sur la Ser21/9, la glycogène synthase (GS) phosphorylée sur la Ser641 et la protéine kinase B (PKB ou Akt) phosphorylée ou non sur la Ser473. Les données ont été normalisées par la vinculine (protéine de référence) dont l'expression ne varie pas en fonction des traitements.

1.5. Analyses statistiques

Pour les caractéristiques zootechniques et de qualité de viande, les effets du type génétique, de l'aliment et du sexe, ainsi que leurs interactions ont été testés par analyse de variance à trois facteurs (procédure GLM du logiciel SAS). Dans le cas d'interactions significatives, des analyses à un facteur ont été

réalisées. Concernant les analyses des protéines, l'effet groupe (GP-, MP-, MP+) a été testé par analyse de variance. Dans le cas d'un effet significatif, les moyennes (lsmeans) par traitement ont été comparées par le test de Tukey.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Les lignées maigres et grasses sont caractérisées par une composition corporelle différente (Tableau 1), avec un rendement en filet inférieur de 9% et en gras abdominal plus de 2 fois supérieur pour la lignée grasse par rapport à la lignée maigre. Ces différences de poids vif et de composition corporelle entre les deux lignées sont conformes à celles observées dans de précédentes études (Ricard et Leclercq, 1984 ; Sibut et al., 2008 ; Swennen et al., 2006). L'aliment riche en protéines (P+) a favorisé la croissance (+10% de poids vifs à l'abattage), le développement du filet (+2,7%) et la diminution de l'engraissement de la carcasse (-16% de gras abdominal). La faible interaction entre l'effet du sexe et de l'aliment pour le poids vif rend par ailleurs compte d'un effet légèrement plus accentué du régime chez les mâles que chez les femelles. Les poulets mâles présentent un poids vif à l'abattage nettement supérieur (+24%) à celui des femelles, qui par contre sont caractérisées par un engraissement abdominal supérieur (+31%) à celui observé chez les mâles. Les rendements en filet sont en revanche similaires entre mâles et femelles. L'analyse de l'interaction entre l'effet du génotype et de l'aliment montre que les réserves en glycogène (estimées par la mesure du PG) sont augmentées avec la distribution du régime P+ uniquement dans le cas du génotype maigre (Tableau 1). Par ailleurs, le génotype maigre ne se distingue du génotype gras que dans le cas du régime P-. Enfin, les poulets femelles sont caractérisés par un PG supérieur à celui des mâles.

L'ensemble de ces observations montre donc que le niveau de glycogène musculaire est sous la dépendance de nombreux facteurs, liés à l'animal ou à son alimentation, capables par ailleurs d'influencer les caractéristiques de composition corporelle. Ainsi, plusieurs études indiquent que les réserves en glycogène musculaire seraient supérieures chez des génotypes gras par rapport à des génotypes maigres (Berri et al., 2001 ; Sibut et al., 2008). Selon notre étude, l'alimentation pourrait aussi constituer un levier intéressant pour moduler les réserves en glycogène du muscle au moment de l'abattage et donc l'ensemble des caractéristiques de qualité de viande qui en dépendent. En effet, nos résultats confirment clairement que plus le PG du muscle est élevé au moment de l'abattage, plus le pH ultime de la viande sera acide, sa couleur claire (L^* élevé) et son pouvoir de rétention en eau faible (Tableau 2). A ce jour très peu d'études ont concerné l'impact de l'alimentation sur les caractéristiques technologiques des viandes de

volaille. Toutefois, il a récemment été montré qu'une supplémentation en lysine au-delà des besoins pour la croissance entraîne une augmentation du pH ultime et du pouvoir de rétention en eau des filets de poulet (Berri et al., 2008).

Dans notre étude, la restriction en protéines peut entraîner une diminution des réserves en glycogène musculaire, notamment chez les animaux issus de la lignée maigre. Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation du glycogène musculaire en lien avec la génétique ou l'alimentation, nous avons comparé l'activation par phosphorylation d'enzymes impliquées dans le contrôle de la synthèse et de la dégradation du glycogène dans le muscle *Pectoralis major* d'animaux mâles issus des groupes GP-, MP- et MP+. Les poulets MP- sont caractérisés par des niveaux de phosphorylation supérieurs aux autres traitements pour l'AMPK, l'Akt et la GS (Figure 2). L'activation supérieure de ces enzymes est cohérente avec les réserves en glycogène inférieures des animaux MP-. En effet, l'activation de l'AMPK et d'Akt entraîne l'inhibition par phosphorylation de la glycogène synthase (GS), qui peut en partie expliquer les teneurs en glycogène musculaire inférieures des poulets MP-. L'activation de l'AMPK est par ailleurs susceptible d'activer par phosphorylation la glycogène phosphatase (GP) (non mesurée dans notre étude), et donc stimuler la dégradation du glycogène en glucose-1-phosphate. Il n'existe pas de différences de phosphorylation de la GSK3 entre les animaux des différents traitements ce qui pourrait indiquer que le contrôle des réserves en glycogène musculaire chez le poulet n'implique pas cette enzyme.

Notre étude suggère qu'une restriction en protéines aurait pour conséquence de stimuler les voies impliquées dans l'utilisation du glycogène musculaire, en particulier chez des animaux présentant des dépôts adipeux réduits. La réponse accrue de ce type d'animaux pourrait être liée à leur moindre capacité à stocker le glycogène, avec des activités enzymatiques qui respectivement inhibent sa synthèse et stimulent sa dégradation *in situ*.

Dans notre étude nous avons aussi montré qu'indépendamment du traitement considéré le niveau de phosphorylation de l'AMPK est supérieur ($1,22 \pm 0,31$ vs $0,85 \pm 0,24$) chez les poulets à glycolyse *post-mortem* rapide (pH15 moyen = 6,30) par rapport à ceux à glycolyse *post-mortem* lente (pH15 moyen = 6,65). Des études antérieures (Debut et al., 2003 ; Berri et al., 2005) ont clairement montré que chez le poulet, l'activité physique avant l'abattage (en particulier l'intensité des battements d'ailes) est en grande partie responsable de l'accélération de la chute de pH *post-mortem*. Chez les mammifères, dont le porc et la souris, l'AMPK est activée consécutivement à l'augmentation du rapport AMP:ATP induit par

l'exercice (Du et al., 2005 ; Shen et Du, 2005). Ces auteurs ont suggéré que l'AMPK joue un rôle crucial dans le contrôle de la glycolyse post-mortem et ont même rapporté que le pH ultime est plus faible chez les animaux stressés ou subissant des injections d'activateurs d'AMPK (aminoimidazole carboxamide ribonucleotide ou AICAR). Nos résultats sont donc en accord avec ces données et suggèrent que chez le poulet, l'activation de la glycolyse post-mortem implique l'activation de l'AMPK.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats de notre étude a permis de mettre en évidence une association entre l'activation par phosphorylation d'enzymes et la diminution des réserves musculaires en glycogène chez le poulet. Par

ailleurs, ce travail indique que l'activation de l'AMPK dans le muscle *in vivo* intervient aussi dans la régulation post-mortem de la glycolyse et donc de la chute de pH. Sur un plan pratique, cette étude confirme le contrôle génétique des caractéristiques musculaires en lien avec la qualité technologique de la viande de volaille et indique par ailleurs que l'alimentation pourrait constituer un levier efficace pour moduler l'ensemble de ces caractéristiques. Des études complémentaires vont rapidement être mises en place afin de mieux comprendre la régulation nutritionnelle de la qualité technologique de la viande en relation notamment avec les caractéristiques de croissance et de composition corporelle des animaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Berri C., Besnard J., Relandeau C., 2008. Poult. Sci., (87), 480-484.
 Berri C.; Le Bihan-Duval E.; Debut M., Sante-Lhoutellier V., Baéza E., Gigaud V., Jégo, Y., Duclos M.J., 2007. J. Anim. Sci., (85), 2005-2011.
 Berri C., Debut M., Santé-Lhoutellier V., Arnould C., Boutten B., Sellier N., Baéza E., Jehl N., Jégo Y., Duclos M.J., Le Bihan-Duval E., 2005. Br. Poult. Sci., (46), 572-579.
 Berri C., Wacrenier N., Millet N., Le Bihan-Duval E., 2001. Poult. Sci., (80), 833-838
 Debut M., Berri C., Baeza E., Sellier, N., Amould C., Guemene D., Jehl N., Boutten B., Jégo Y., Beaumont C., Le Bihan-Duval E., 2003. Poult. Sci., (82), 1829-1838.
 Du M., Shen Q.W., Zhu, M., 2005. J. Agr. Food. Chem., (53), 3235-3239.
 Le Bihan-Duval E., Debut M., Berri C., Sellier N., Santé-Lhoutellier V., Jégo Y., Beaumont C., 2008. BMC Genetics, 9: 53.
 Leclercq B., Blum J.C., Boyer, J.P., 1980. Br. Poult. Sci., (21), 107-113.
 Monin G., Sellier P., 1985. Meat. Sci., (13), 49-63.
 Ricard F.H., Leclercq B., 1984. Ann. Gén. Séle., 16 (1), 127-130.
 Shen Q.W., Du M., 2005. J. Sci. Food. Agri., (85), 2401-2406.
 Sibut V., Le Bihan-Duval E., Tesseraud S., Godet E., Bordeau T., Cailleau-Audouin E., Chartrin P., Duclos M.J., Berri C., 2008. J. Anim. Sci., (86), 2888-2896.
 Swennen Q., Janssens G.P.J., Collin A., Le Bihan-Duval E., Verbeke K., Decuypere E., Buyse J., 2006. Poult. Sci., (85), 731-742.

Tableau 1. Effet du génotype (G), de l'aliment (A) et du sexe (S) sur le poids vif, la composition corporelle des animaux et les caractéristiques du muscle *Pectoralis major*

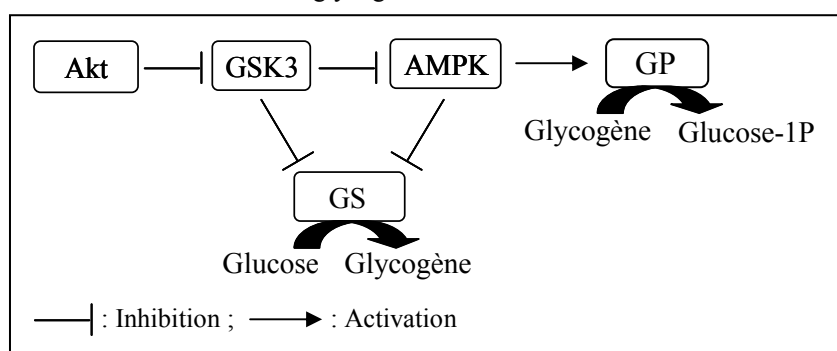
	Mâle						Femelle					
	Gras	Maigre	Effet G	P-	P+	Effet A	P-	P+	Effet A	G x A	A x S	
Poids vif	2037a	1975b	***	2099	2336	***	1703	1869	***	NS	NS	*
	Gras	Maigre	Effet G	P-	P+	Effet A	Mâle	Femelle	Effet S	G x A	G x S	A x S
% gras abdo	4,66a	2,09b	***	3,67a	3,08b	***	2,92b	3,84a	***	NS	NS	NS
% filet	12,08b	13,32a	***	12,53b	12,87a	***	12,63	12,77	NS	NS	NS	NS
pH 15 min.	6,51	6,55	NS	6,55	6,51	NS	6,51	6,55	NS	NS	NS	NS
b*	9,05b	12,44a	***	11,58a	9,91b	***	10,42b	11,07a	***	NS	NS	NS
	Gras		Maigre		Effet A	Mâle	Femelle	Effet S	G x A	G x S	A x S	
	P-	P+	P-	P+								
PG	104,8	105,4	NS	94,9b	103,9a	**	99,2a	105,9b	**	*	NS	NS
pHu	5,76	5,77	NS	5,88a	5,79b	***	5,83a	5,77b	***	***	NS	NS
L*	47,91	48,24	NS	43,95b	47,04a	***	46,08b	47,56a	***	***	NS	NS
a*	-0,17a	-0,63b	***	1,91a	0,45b	***	0,40	0,38	NS	***	NS	NS
Exsudat	1,30	1,37	NS	0,87b	1,23a	***	1,02b	1,38a	***	**	NS	NS

^{a, b} Pour un facteur de variation donné, les moyennes présentant des lettres différentes au sein d'une même ligne sont significativement différentes (P<0,05). NS : non significatif ; * P≤0,05 ; **P≤0,01 ; ***P≤0,001.

Tableau 2. Corrélations intra-lignée entre caractéristiques musculaires

	Lignée maigre	Lignée grasse
PG - pHu	-0,58***	-0,55***
pHu – L*	-0,71***	-0,51***
pHu – a*	0,48***	NS
pHu – b*	NS	-0,48***
pHu - exsudat	-0,70***	-0,36**

***P≤0,001. NS : non significatif

Figure 1. Fonction des enzymes étudiées dans la régulation du métabolisme du glycogène musculaire

Akt : Protein kinase B ; GSK3 : glycogen synthase kinase 3 ; AMPK : AMP-activated protein kinase ; GP : glycogen phosphorylase ; GS : glycogen synthase.

Figure 2. Variation des niveaux protéiques et de phosphorylation dans le muscle *Pectoralis major* de poulets issus des traitements MP-, GP- et MP+