



## UNIVERSITÉ DE LILLE 1 – SCIENCES ET TECHNOLOGIES École doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

## THÈSE DE DOCTORAT

#### Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Présentée par

Juliette CARON

Pour l'obtention du grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 1

Devenir des peptides bioactifs générés au cours de la digestion gastro-intestinale d'une protéine agroalimentaire et leurs rôles dans la régulation de l'homéostasie énergétique

Préparée au laboratoire : **Institut Charles Viollette – ICV – EA 7394** Equipe ProBioGEM : Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien

Sous la direction du Pr Pascal Dhulster

Soutenue publiquement le 8 décembre 2016, devant le jury composé de :

M. Pascal Dhulster	Professeur (Université Lille 1)	Directeur de thèse
M. Benoit Cudennec	Maître de conférences (Université Lille 1)	Co-encadrant
Mme Rozenn Ravallec	Maître de conférences (Université Lille 1)	Co-encadrante
M. Didier Dupont	Professeur (INRA STLO)	Rapporteur
M. John Van Camp	Professeur (Université de Gand)	Rapporteur
Mme Monique Alric	Professeur (Université Clermont 1)	Examinatrice
Mme Sophie Lestavel	Professeur (Université Lille 2)	Invitée
M. Jean-François Goossens	Professeur (Université Lille 2)	Invité
M. Jean Lesage	Professeur (Université Lille 1)	Invité

#### Remerciements

En tout premier lieu, je souhaite remercier tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner mon travail. Je tiens plus particulièrement à remercier Messieurs Didier Dupont et John van Camp d'avoir accepté d'être rapporteurs au sein de ce jury et à Madame Monique Alric d'avoir été la présidente de ce jury.

Ce projet de thèse s'est inscrit dans un cadre collaboratif regroupant plusieurs laboratoires de l'université de Lille ainsi que des collaborations extérieures. La liste des personnes à remercier est donc plus qu'exhaustive mais elle reflète l'implication et le soutien dont j'ai pu bénéficier et qui m'a permis de mener à bien ces travaux.

Je remercie le Pr. Pascal Dhulster de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et d'avoir été mon directeur de thèse. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir permis d'évoluer librement au sein de plusieurs laboratoires et aux multiples congrès et colloques. J'espère avoir représenté dignement le laboratoire et d'avoir contribué, à mon échelle, aux connaissances sur le monde des peptides bioactifs.

Les deux personnes à qui la réussite du projet revient majoritairement sont mes deux encadrants, les Dr. Benoit Cudennec et Rozenn Ravallec. J'ai eu cette chance incroyable de travailler avec vous deux, aux personnalités et points de vue différents mais complémentaires, tant sur le plan scientifique que personnel. Je suis convaincue que la bonne entente et la communication entre nous trois a fortement favorisé l'avancée du projet et a mené à la rédaction de plusieurs publications et conférences. Benoit, merci pour ton infaillible enthousiasme, ta bonne humeur, ton énergie et ta conviction dans le monde des peptides bioactifs. J'ai toujours été admirative de tes idées d'expérience, de ta persévérance à continuer, même si rien ne marchait. Par contre je suis toujours perplexe de savoir comment tu arrivais à penser à mille choses à la fois pendant une expérience sans te tromper... Tes « c'est génial » m'ont toujours permis de retrouver le moral là où parfois j'avais envie de baisser les bras. Rozenn, merci pour ton sourire, ton positivisme mais aussi ton recul scientifique qui m'ont toujours permis d'y voir plus clair dans ce sujet pluri-disciplinaire où j'avais toujours un peu peur de m'éparpiller. Tu contribues largement à la bonne ambiance et à la bonne humeur de ce laboratoire et tu m'as montré que la dimension humaine au travail était parfois bien plus importante que les compétences professionnelles. Où que j'aille, je n'ai toujours entendu que du bien de toi, tu es appréciée et reconnue de tous ceux avec qui tu as travaillé, ne change pas. De manière générale, je vous remercie de m'avoir soutenu et de m'avoir fait confiance pendant ces trois années. Comme je l'avais déjà dit, j'ai bénéficié d'un encadrement extraordinaire, aussi bien humainement que scientifiquement, et je sais que ce n'est pas le cas de tout le monde. J'ai toujours mesuré et je mesure actuellement le privilège que j'ai eu de travailler avec vous. Je ne me suis jamais sentie comme une banale thésarde à vos côtés mais plus comme une collègue avec qui vous échangiez vos idées. Merci aussi de m'avoir supporté, moi, mes rires un peu sonores, mes « coups de gueule », mes propos parfois un peu « borderline » envers la recherche universitaire. Je garde en mémoire de superbes souvenirs de nos échanges, de tous les moments passés hors labo et j'espère que l'on restera en contact.

Je tiens à remercier le Dr. Christophe Flahaut pour son implication et son encadrement au sein de ce projet, surtout d'un point de vue analytique. Sans toi, les cartographies peptidiques n'auraient jamais vu le jour, ce qui aurait fortement entravé l'avancée de la thèse. Tu as véritablement contribué au développement de la peptidomique au sein du labo et à bien d'autres choses. Merci à toi aussi pour tout le soutien que tu m'as apporté ainsi que ton écoute précieuse et ta pédagogie. J'espère que l'on restera en contact.

Je tiens à remercier les deux post-doctorants qui se sont énormément impliqués dans mon projet, les Dr Dorothée Domenger et Yanath Belguesmia. Dorothée, merci pour toutes tes corrections d'article, de présentation, tes connaissances en culture cell, bio mol et autres. Ta rigueur scientifique m'a toujours impressionné et ça a été un véritable plaisir de travailler avec toi, je te souhaite bonne chance pour la suite. Yanath, merci pour les bons moments passés en culture cell et en RIA avec toi et tes blagues grivoises et pour ton soutien. J'espère vous revoir un jour tous les deux.

Je tiens à remercier la plateforme CUMA qui m'a formé en spectrométrie de masse et tout particulièrement deux personnes, le Pr Jean-François Goossens et le Dr Mostafa Kouach. Jean-François, je ne serai jamais assez reconnaissante de tout ce que tu as pu m'apporter. Tu m'as obligé à garder une rigueur scientifique, à toujours me remettre en question, à revenir aux notions fondamentales et à adopter une vision d'ensemble globale sur mon projet de thèse. Tu m'as très bien accueilli dans ton laboratoire et je me suis toujours sentie comme l'une des vôtres. Tu as toujours su t'impliquer quand j'étais face à une impasse et la diversité de tes connaissances scientifiques m'a toujours épaté. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir accompagné pendant trois ans et d'avoir été membre de mon jury, j'espère avoir à nouveau l'occasion de travailler avec toi par la suite. Mostafa, il faudrait plus que trois lignes pour te remercier...je ne pourrais compter les heures passées autour de ce sujet, les manips, les discussions, les réflexions. Tu m'as appris à aimer la spectrométrie de masse, que je ne trouvais pas vraiment attirante à la base, et que je trouve maintenant passionnante. Tu as largement participé à mon intégration dans ton équipe et tu n'as jamais hésité à rester tard pour m'aider à finir les manips. Merci aussi pour tes qualités humaines et toutes nos discussions scientifiques ou non. Merci à vous deux de m'avoir fait confiance et merci à toute votre équipe de m'avoir accepté parmi vous, Amandine, Mike, Brigitte, Nathalie, Céline, Jean-Paul et Fatiha.

Je tiens à remercier le Pr. Sophie Lestavel de m'avoir suivi pendant ces trois années jusqu'à ma soutenance et de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour les passages de barrière Caco-2. J'espère que le monde analytique ne vous est plus si étranger maintenant. Merci à Véronique pour son soutien et son aide pendant les manips.

Je tiens à remercier le Pr Jean Lesage de m'avoir également suivi pendant trois ans et d'avoir fait partie de mon jury de thèse. Je remercie également toute son équipe de m'avoir accueilli dans son labo pour les expériences de RIA.

Je tiens à remercier le Dr Sylvain Denis ainsi que Sandrine Chalançon pour les expériences de digestion dynamique. Ce furent deux semaines de manip intenses mais elles ont permis de conclure en beauté ce long travail, alors merci à vous pour cette pause auvergnate. Merci au Pr. Monique Alric de m'avoir accueilli dans son équipe.

Je tiens à remercier le Pr John Van Camp de m'avoir suivi pendant ces trois années et de nous avoir permis de monter une collaboration entre nos deux laboratoires. John, un grand merci pour votre soutien et vos conseils. Je tiens également à remercier le Dr. Nadin Al Shukor pour son aide lors de mes venues à l'université de Gand.

Je tiens à remercier le Pr Manuel Dauchez ainsi que son équipe pour les expériences de docking. Cette collaboration a été montée à la toute fin de mon projet mais elle a apporté des perspectives intéressantes. Manu, merci à toi d'avoir lancé tout ça et merci à la Reims Team d'avoir fait les expériences de docking.

Enfin, il me reste à remercier toutes les personnes du laboratoire ProBioGEM qui ont acompagné ma vie au labo pendant ces trois années. Un grand merci à Corinne qui se démène tous les jours pour faire vivre le labo et trouver des solutions lorsqu'on est en panne. Merci à Gabrielle pour son expertise analytique qui m'a été très précieuse pendant ces trois années. Et les meilleurs pour la fin, un immense merci à mes collègues docteurs, futurs docteurs et autres. Merci d'avoir supporté mes bavardages, mes rires, mes propos délirants, sûrement agaçants et pénibles par moment. Cette thèse a été ponctuée de laser game, chinois, futsal, piscine, sorties lilloises et plein d'autres choses encore, j'en garde un souvenir heureux et je suis contente d'y avoir trouvé de véritables amis au-delà de simples collègues. Alors merci à Rémi, Kalim, Amirouche, Luiz, Fanny, Cyril, Alexandra, Maxime, Antoine, Mickaël, Delphine, Sandy, Justine, Barbara, Florie, à la « mafia irakienne » Yazeen, Ahmed, Qassim, Ameen, Hamza, Alaa et tous les autres que je ne voudrai pas oublier. Je ne pense pas trouver une ambiance de travail aussi drôle dans les prochaines années à venir et j'ai plus ri en trois ans que toutes les années précédentes. Restez comme vous êtes et courage aux futurs docteurs, la fin arrive beaucoup plus vite qu'on ne le pense. Merci à l'équipe de Deino avec qui j'ai partagé le labo et tout particulièrement à Majorie et Sophie. D'une manière générale, merci à tous ceux dont j'ai pu croiser la route pendant cette thèse et qui ont apporté, à leur manière, leur pierre à l'édifice.

Je tiens à remercier ma famille qui est venue très nombreuse le jour de ma soutenance et qui m'a continuellement soutenu pendant mes études, mes parents, ma sœur, mon frère, mes grands-parents, ma grand-tante. Merci pour ce beau rassemblement familial, j'espère qu'il y en aura d'autres à l'avenir.

### Résumé

Les protéines alimentaires sont plus qu'une simple source d'acides aminés pour notre organisme. Elles interviennent dans l'homéostasie énergétique en modulant notamment la sécrétion d'hormones intestinales, telles que les cholécystokinines (CCK) ou le Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1). L'objectif global de cette thèse a été de comprendre comment la digestion gastro-intestinale (GI) d'une protéine alimentaire pouvait générer des peptides bioactifs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. L'hémoglobine bovine a été choisie comme protéine modèle. Les activités biologiques ciblées ont été la régulation de la sécrétion des hormones CCK et GLP-1 ainsi que l'inhibition de la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) qui module l'activité du GLP-1. Un modèle statique de digestion GI in vitro a d'abord été mis en place. La caractérisation analytique des digestats d'hémoglobine a été réalisée et a abouti à la création de cartographies peptidiques au sein des différents compartiments du tractus GI. Ensuite, les activités biologiques des digestats ont été étudiées et le digestat intestinal a ensuite été sélectionné pour son potentiel bioactif. Des étapes de fractionnement successives ont permis d'isoler les fractions peptidiques bioactives. L'utilisation de modèles cellulaires a permis d'étudier le passage des peptides contenus dans une fraction au travers de la barrière intestinale et de tester leur potentiel bioactif dans des conditions proches des conditions physiologiques. Enfin, le mode d'action des peptides actifs identifiés a été étudié.

**Mots clés** : Hémoglobine bovine, digestion gastro-intestinale, peptides bioactifs, homéostasie énergétique, CCK, GLP-1, DPP-IV

#### Abstract

Dietary proteins already gave evidence to generate a strong satiety feeling when entering the gastrointestinal (GI) tract by stimulating gut hormone secretion such as cholecystokinin (CCK) and Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1). Moreover, GI digestion of various protein sources has proved to release bioactive peptides which may inhibit dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) activity, an ubiquitous enzyme responsible for inactivating GLP-1. Considering the great potential of dietary proteins, there is a need to understand how GI digestion can generate bioactive peptides involved in energy homeostasis. Bovine haemoglobin was here chosen as a model protein. CCK and GLP-1 secretion enhancing properties as well as DPP-IV inhibition potential of the resultant digests were investigated. The first part of this work dealt with setting up a simulated GI digestion protocol and characterising resultant digests by various analytical tools. Peptide mappings and heat maps were designed to represent each digest. Then, bioactive potentials of the digests were investigated and the final intestinal digest stood up by combining the best DPP-IV inhibitory and CCK and GLP-1 enhancing properties. Successive fractionation steps succeed in isolating a couple of bioactive fractions. The use of an intestinal barrier model aimed at predicting peptide transport of one specific bioactive fraction and its consequences on fraction bioactivity. Lastly, peptide sequences from the most bioactive fractions were characterised and their related ways of action were studied.

Key words: bovine haemoglobin, gastrointestinal digestion, bioactive peptides, energy homeostasis, CCK, GLP-1, DPP-IV

## Abréviations

4-AMBA	Acide 4-aminométhylbenzoïque
AA	Acide aminé
AgRP	Agouti Related Peptide
AHA	Aire antérieure hypothalamique
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
APO AIV	Apolipoprotéine A-IV
ARC	Noyau arqué
ARNm	Acide ribonucléique messager
ATP	Adénosine Triphosphate
CART	Cocaine- and amphetamine-regulated transcript
CaSR	Calcium Sensing Receptor
ССК	Cholécystokinines
CE	Electrophorèse capillaire
CEE	Cellule entéroendocrine
СНО	Chinese Hamster Ovary
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
DBI	Diazepam-binding inhibitor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMH	Noyau hypothalamique dorsomédian
DPP-IV	Dipeptidyl Peptidase IV
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESI	Ionisation par électrospray
FDR	False Discovery Rate
GABA	Acide γ-amino-butyrique
GI	Gastro-intestinal
GIP	Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
GLP-2	Glucagon-Like Peptide 2
Gly-Pro-AMC	Gly-Pro-7-amido-4-méthylcoumarine
Gly-Pro-pNA	Gly-Pro-p-nitroaniline

GRP	Gastrin-Releasing Peptide
Gαq	Sous-unité α des protéines Gq
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HR	Haute résolution
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice
IGN	Néoglucogenèse intestinal
IP-1, IP-2	Intervening peptides 1 et 2
IP <sub>3</sub>	Inositol Triphosphate
LC	Chromatographie liquide
LCRF	Luminal CCK-Releasing Factor
LHA	Aire hypothalamique latérale
LR	Basse résolution
LY	Lucifer Yellow
MALDI	Désorption-Ionisation laser assistée par matrice
МСН	Melanin-concentrating hormone
MOR	Récepteur µ-opioïde
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Spectrométrie de masse
MS-MS	Spectrométrie de masse en tandem
NPY	Neuropeptide Y
NTS	Noyau du tractus solitaire
OXY	Ocytocine
PBS	Tampon phosphate salin
PC	Prohormone Convertase
PG	Proglucagon
РНА	Aire hypothalamique postérieure
РКА	Phospholipase kinase A
РО	Noyau pré-optique
POMC	Pro-opiomélanocortine
PP	Polypeptide-fold
PpiA	Peptidylprolyl isomérase

PSM	Peptide Spectrum Match
PVN	Noyau paraventriculaire
РҮҮ	Peptide YY
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RP	Phase inverse
SEC	Chromatographie d'exclusion stérique
SIM	Selected Ion Monitoring
SNC	Système Nerveux Central
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TRH	Thyrotropin-releasing hormone
TRP	Transient Receptor Potential
VMH	Noyau ventromédian hypothalamique
VTF	Venus Fly Trap
Y2R	Récepteur Y2
α-MSH	$\alpha$ -Melanocyte Stimulating Hormone

## Sommaire

Résumé1
Abstract
Abréviations7
Sommaire
Listes des figures
Liste des tableaux
Introduction Générale
Synthèse bibliographique
1 La digestion gastro-intestinale des protéines alimentaires
1.1 Présentation anatomique de l'appareil digestif
1.2 Digestion GI des aliments
1.2.1 La bouche
1.2.2 L'estomac
1.2.3 L'intestin grêle
1.2.3.1 Anatomie de l'intestin grêle
1.2.3.2 Les sécrétions pancréatiques
1.2.3.3 Les sécrétions biliaires
1.2.4 Le côlon
1.3 Absorption intestinale des nutriments
1.3.1 Anatomie de l'épithélium intestinal
1.3.2 Absorption intestinale des acides aminés libres et des peptides
1.3.2.1 Absorption intestinale des acides aminés
1.3.2.2 Absorption intestinale des peptides
1.3.3 Absorption intestinale des glucides et des lipides
1.4 Modélisations <i>in vitro</i> de l'appareil digestif et de l'absorption au niveau de la
barrière intestinale

	1.4.1	Les modèles in vitro de digestion GI	
	1.4.2	Les modèles in vitro d'absorption intestinale	
	1.5 C	onclusion	
2	Homéo	ostasie énergétique et régulation de la prise alimentaire	51
	2.1 D	éfinition de l'homéostasie énergétique	
	2.2 R	ôle du système nerveux central dans l'homéostasie énergétique	
	2.2.1	L'hypothalamus et son rôle dans l'homéostasie énergétique	
	2.2.2	Intégration des signaux périphériques par l'hypothalamus	
	2.2.3 énergé	Autres régions de l'hypothalamus impliquées dans tique	l'homéostasie 57
	2.2.4 énergé	Le noyau du tractus solitaire (NTS) et son implication dans tique	l'homéostasie
	2.3 R	ôle du système périphérique dans l'homéostasie énergétique	
	2.3.1	Les signaux de régulation à court terme	59
	2.3.1	1.1 La distension gastrique	
	2.3.1	1.2 Les sécrétions hormonales du tractus GI et du pancréas	
	a.	Généralités sur les cellules entéroendocrines	
	b.	Les cholécystokinines (CCK)	
	c.	La famille des peptides polypeptide-fold (PP)	
	d.	La famille des incrétines	
	e.	Autres hormones intestinales dérivant du préproglucagon	72
	f.	L'amyline	73
	g.	La somatostatine	73
	h.	Les hormones peptidiques de satiété spécifiques aux lipides	73
	i.	Autres hormones peptidiques gastro-intestinales	74
	2.3.1	1.3 La dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV)	74
	2.3.2	Les signaux de régulation à long terme	
	2.3.2	2.1 La ghréline	
			11

2.3.2.2 La leptine	7
2.3.2.3 L'insuline	7
2.4 Les dysfonctionnements de l'homéostasie énergétique	78
2.4.1 Généralités	78
2.4.2 Les hormones intestinales : nouvelle cible thérapeutique	19
2.4.3 Implication du microbiote dans la régulation de l'homéostasie énergétique .	31
2.5 Conclusion	31
3 Peptides biactifs issus de de protéines alimentaires et régulation de l'homéostas énergétique	ie 32
3.1 Rappel biochimique sur les peptides	32
3.2 Généralités sur les peptides bioactifs	33
3.3 Digestion GI des protéines alimentaires et régulation de l'homéostas	ie
énergétique	35
3.3.1 Peptides bioactifs et régulation de la sécrétion des CCK	36
3.3.2 Peptides bioactifs et GLP-1	)1
3.3.3 Peptides bioactifs et inhibition de l'activité de la DPP-IV	)5
3.3.3.1 Généralités sur les peptides inhibiteurs de la DPP-IV	)5
3.3.3.2 Peptides inhibiteurs de la DPP-IV et digestion GI des protéines	)7
3.3.4 Peptides bioactifs et récepteurs opioïdes	)0
3.4 Conclusion10	)1
4 Stratégies d'identification des peptides bioactifs d'origine alimentaire 10	)3
4.2 Approches expérimentales d'identification des peptides bioactifs d'originalimentaire	1e )4
4.2.1 Approche empirique d'identification des peptides bioactifs	)5
4.2.2 Approches bio-informatiques d'identification des peptides bioactifs 10	)7
4.3 La peptidomique appliquée à la digestion GI des protéines alimentaires 10	)9
4.3.1 Définition de la digestomique10	)9
4.3.2 Enjeux de la digestomique10	)9

4.4	Co	onclusion	12
Motárial	ls at M	áthodas 11	13
	Protéin	e modèle de l'étude : l'hémoglobine bovine 1 l	4
1.1	Pr	ésentation générale11	4
1.2	St	ructures des chaînes $\alpha$ et $\beta$	14
2 \$	Simula	tion de la digestion gastro-intestinale de l'hémoglobine bovine et méthodes o	de
caract	térisati	ons analytiques11	15
2.1	М	atériels11	15
2.2	Ré	éalisation des matrices alimentaires11	16
2.3	М	odèle de digestion statique <i>in vitro</i> 11	16
2.4	M	odèle de digestion dynamique <i>in vitro</i> 11	19
2.5	Es	stimation de la concentration peptidique dans les échantillons issus de	es
dig	estions	GI in vitro	20
3 7	Fechnie	ques chromatographiques appliquées aux échantillons issus de	es
digest	tions G	Я 12	21
3.1	Cł	nromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à la détection UV 12	21
3	3.1.1	Principe de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC)12	21
3	3.1.2	Protocole expérimental	22
3	3.1.3	Chromatographie liquide en phase inverse couplée à la détection U	V
(	(RP-HF	PLC)	22
	3.1.3	8.1 Principe de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) 12	22
	3.1.3	2.2 Protocole expérimental	23
3.2	Id	entification des séquences peptidiques des digestats par spectrométrie de mass	se
	12	23	
3	3.2.1	Principe général de la spectrométrie de masse 12	23
3	3.2.2	Fragmentation d'un peptide12	24
3	3.2.3	Identification des séquences peptidiques par MALDI-MS-MS 12	26

3.2.4 Identification des peptides par ESI-MS-MS pour l'élaboration des cartes
peptidiques
3.2.4.1 Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse basse résolution en mode tandem (LC-LR-ESI-MS-MS)
3.2.4.2 Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse haute
résolution en mode tandem (Nano LC- HR-ESI-MS-MS)127
3.2.4.3 Traitement des données de spectrométrie de masse
3.2.5 Etablissement des cartographies peptidiques
4 Méthodes de mise en évidence des peptides bioactifs impliqués dans la régulation de
l'homéostasie énergétique
4.1 Matériels
4.2 Préparation des échantillons pour les tests d'activités biologiques
4.2.1 Protocole expérimental de fractionnement SEC
4.2.2 Protocole expérimental de fractionnement RP-HPLC (semi-préparatif) 130
4.3 Méthodes générales de culture cellulaire
4.3.1 La lignée STC-1
4.3.2 La lignée Caco-2
4.4   Test de cytotoxicité
4.5 Etude de la stimulation de la sécrétion des hormones CCK et GLP-1
4.5.1 Protocole du test de contact des échantillons avec les cellules STC-1 133
4.5.2 Dosage des hormones intestinales CCK et GLP-1
4.5.3 Identification des séquences peptidiques impliquées dans la stimulation de la
sécrétion des hormones intestinales par spectrométrie de masse
4.5.3.1 Analyse LC-MS des fractions FPLC issus du digestat intestinal final 135
4.5.3.2 Analyse LC-MS-MS des sous-fractions impliquées dans la sécrétion des
hormones intestinales
4.6 Étude de la modulation de l'expression des gènes
4.6.1 Principe de la PCR quantitative en temps réel (rt-qPCR)

4.6.2 Protocole de la mise en contact des échantillons avec les cellules STC-1137
4.6.3 Protocole de culture des cellules Caco-2 pour l'étude de l'expression du gène
codant pour la DPP-IV138
4.6.4 PCR quantitative en temps réel (rt-qPCR)
4.7 Test d'inhibition de l'activité enzymatique de la DPP-IV
4.7.1 Principes généraux des méthodes spectrométriques utilisées
4.7.1.1 Spectrométrie d'absorption dans le domaine de l'ultraviolet et du visible
(UV-Vis)
4.7.1.2 Fluorimétrie
4.7.2 Principe général du test d'inhibition de l'activité de la DPP-IV 140
4.7.3 Mesure par spectrophotométrie
4.7.4 Mesure par fluorimétrie
4.7.4.1 Test d'inhibition de l'activité DPP-IV avec l'enzyme purifiée
4.7.4.2 Test d'inhibition in situ de l'activité DPP-IV sur cellules Caco-2
4.8 Passage d'une barrière de cellules Caco-2, modèle de la barrière intestinale 143
4.8.1 Protocole de l'expérience de passage de barrière de cellules Caco-2
4.8.2 Estimation de la perméabilité apparente de la barrière cellulaire
4.8.2.1 Principe de l'expérience
4.8.2.2 Protocole d'estimation de la perméabilité apparente d'une barrière
cellulaire Caco-2
4.8.3 Identification des séquences peptidiques dans les surnageants par
spectrométrie de masse en mode tandem145
4.8.3.1 Analyse LC-MS-MS des surnageants apicaux et basolatéraux des
expériences de passage de la barrière de cellules Caco-2 145
4.8.3.2 Analyse MRM des surnageants apicaux et basolatéraux provenant de
1 experience de passage de la barrière de cenules Caco-2
4.8.3.3 Traitement des données de spectrometrie de masse
5 Traitement statistique des données

Résultats
1 Digestion gastro-intestinale de l'hémoglobine bovine : modèles in vitro et
caractérisations analytiques des peptidomes générés150
1.1 Introduction
1.2 Description du modèle de digestion <i>in vitro</i> statique
1.3 Démarche analytique adoptée
1.4 Contrôle de la qualité des digestats gastriques et intestinaux d'hémoglobine
bovine 152
1.4.1 Analyses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) 152
1.4.3 Analyse MALDI-MS-MS du digestat gastrique 120 min 156
1.5 Etablissement de cartographies peptidiques des digestats gastriques et intestinaux
finaux 157
1.5.1 Identification des peptidomes gastriques et intestinaux par LC-MS-MS 158
1.5.1.1 Analyse LC-LR-ESI-MS-MS des peptidomes gastriques et intestinaux. 158
1.5.1.2 Analyse LC-HR-ESI-MS-MS des peptidomes gastriques et intestinaux 160
1.5.1.3 Comparaison du nombre de séquences identifiées au sein des peptidomes
gastriques et intestinaux163
1.5.2 Etablissement des cartes de chaleur associées aux cartographies des
peptidomes gastrique et intestinal164
1.5.2.1 Cartographie et carte de chaleur du peptidome gastrique
1.5.2.2 Cartographie et carte de chaleur du peptidome intestinal
1.5.2.3 Séquences peptidiques strictement communes aux peptidomes gastrique et
intestinal167
1.6 Digestion GI statique in vitro de matrices alimentaires à base d'hémoglobine
bovine et caractérisation analytique168
1.6.1 Contexte
1.6.2 Conception des matrices alimentaires
1.7 Validation du modèle d'étude par un modèle de digestion GI <i>in vitro</i> dynamique
171

1.7.1 Caractérisation par RP-HPLC des populations peptidiques générées 172
1.7.1.1 Profils chromatographiques issus de la digestion dynamique in vitro de l'hémoglobine bovine
1.7.1.2 Profils chromatographiques issus de la digestion dynamique in vitro de la matrice à base d'hémoglobine bovine
1.7.1.3 Comparaison des profils chromatographiques des digestats d'hémoglobine bovine à ceux de la matrice
<ul><li>1.7.2 Caractérisation des populations peptidiques générées au cours des digestions</li><li>GI dynamique <i>in vitro</i> par SEC</li></ul>
1.7.3 Identification des séquences peptidiques générées au cours des digestions
dynamiques de l'hémoglobine et de la matrice à base d'hémoglobine
1.7.3.1 Influence de la matrice et du temps de digestion sur la génération des séquences peptidiques
1.7.3.2 Comparaison des séquences peptidiques identifiées dans les échantillons
d'absorption jéjunale avec celles du peptidome intestinal du modèle in vitro
statique 188
1.8 Discussion
181 Direction de l'hémoglabing having on conditions CL in with statiques at
1.8.1 Digestion de l'hemoglobine bovine en conditions of <i>in vitro</i> statiques et
dynamiques
1.8.1       Digestion de l'hemogrobine bovine en conditions Of <i>m vitro</i> statiques et dynamiques
1.8.1       Digestion de l'hemogrobhie bovine en conditions GI <i>m vitro</i> statiques et dynamiques
<ul> <li>1.8.1 Digestion de l'hemoglobine bovine en conditions GI <i>m villo</i> statiques et dynamiques</li></ul>
<ul> <li>1.8.1 Digestion de l'hemoglobine bovine en conditions GI <i>m villo</i> statiques et dynamiques</li></ul>
<ul> <li>1.8.1 Digestion de l'hemoglobine bovine en conditions GI <i>m vurb</i> statiques et dynamiques</li></ul>
1.8.1       Digestion de l'hemogroome bovine en conditions of <i>m vino</i> statiques et dynamiques         1.8.2       Cartographies des peptidomes gastriques et intestinaux et mise en évidence de motifs récurrents         1.8.3       Avantages et limites de l'approche peptidomique appliquée à la digestion GI de l'hémoglobine bovine         1.8.4       Elaboration de matrices alimentaires : effet sur la digestion de l'hémoglobine bovine         1.98       1.9         Conclusion       201
<ul> <li>1.8.1 Digestion de l'hémoglobine bovine en conditions GI <i>m</i> virro statiques et dynamiques</li></ul>
<ul> <li>1.8.1 Digestion de l'hemoglobine bovine en conditions GI <i>m virro</i> statiques et dynamiques</li></ul>
<ul> <li>1.8.1 Digestion de l'hemogroome bovine en conditions GLM vullo statiques et dynamiques</li></ul>

2.2 Car	actérisation des activités biologiques des digestats d'hémoglobine bovine. 203
2.2.1	Effet des digestats sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales
produites	s par les cellules STC-1
2.2.2	Effet des digestats sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV 205
2.2.3	Effet du digestat intestinal 120 min sur l'expression des gènes codant pour les
hormone	es CCK et GLP-1
2.3 Frac	ctionnement du digestat intestinal et potentiels bioactifs
2.3.1	Plan de fractionnement du digestat intestinal 120 min
2.3.2	Effets des différentes fractions obtenues par SEC sur la stimulation de la
sécrétion	des CCK et la régulation de l'expression de leur gène
2.3.2.1	Effet des fractions SEC sur la stimulation de la sécrétion des CCK 211
2.3.2.2	2 Effet des fractions SEC sur l'expression du gène codant pour les CCK. 212
2.3.3	Effets des fractions obtenues par SEC sur la sécrétion de GLP-1 et
l'express	sion du gène codant pour le proglucagon
2.3.3.1	Effet des fractions obtenues par SEC sur la sécrétion du GLP-1 213
2.3.3.2	2 Effet des fractions obtenues par SEC sur l'expression du gène codant pour
le prog	glucagon
2.3.4	Effet des fractions obtenues par SEC sur l'inhibition de l'activité de
la DPP-I	V
2.4 Frac	ctionnement des fractions B et C et potentiels bioactifs sur la stimulation de la
sécrétion de	e GLP-1 et l'inhibition de la DPP-IV
2.4.1	Plan de sous-fractionnement de la fraction BC par RP-HPLC
2.4.2	Effet des sous-fractions FBC sur la stimulation de la sécrétion de GLP-1 218
2.4.3	Effet des sous-fractions FBC sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV 219
2.5 Util	lisation de la cellule Caco-2 comme modèle de la barrière intestinale 221
2.5.1	Etude du passage de la sous-fraction FBC-3 au travers d'une monocouche de
cellules (	Caco-2
2.5.1.1	Modèle de barrière Caco-2 utilisé
2.5.1.2	2 Stratégie analytique adoptée

2.5.1.3 Etude préliminaire : optimisation de la concentration de lasous-fraction FBC-3223
2.5.1.4 Identification des séquences peptidiques passant intactes la barrière de cellules Caco-2 et provenant de la sous-fraction FBC-3
a. Test de l'intégrité de la barrière cellulaire Caco-2
b. Identification exhaustive des peptides de la solution initiale FBC-3 228
c. Identification des peptides dans les surnageants du modèle de monocouche de cellules Caco-2
d. Synthèse des résultats de passage de la monocouche de cellules Caco-2.230
2.5.1.5 Effet des surnageants issus du passage de la barrière de cellules Caco-2 sur l'inhibition de la DPP-IV
2.5.2 Utilisation de cellules Caco-2 <i>in situ</i> comme source d'enzymes DPP-IV 232
2.5.2.1Caractérisationdel'activitéDPP-IVdescellulesCaco-2non différenciées in situ232
2.5.2.2 Effet des digestats gastriques et intestinaux sur l'activité DPP-IV des cellules Caco-2 in situ
2.6 Discussion
2.6.1 Caractérisation des groupes peptidiques impliqués dans la sécrétion des hormones intestinales et l'inhibition de l'activité de la DPP-IV
2.6.1.1 Effet des digestats et fractions sur la sécrétion des hormones intestinales CCK et GLP-1
2.6.1.2 Effet des digestats et fractions sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV
2.6.2 Suivi du devenir d'une fraction peptidique bioactive lors du passage d'une
barrière de cellules Caco-2
2.6.2.1 Mise en évidence de séquences peptidiques passant intactes la barrière de cellules Caco-2
2.6.2.2 Devenir du potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV des populations
peptidiques suite au passage au travers du modèle de barrière

2.6.2.3 Stratégies analytiques pour le suivi des peptides au cours des expériences
de passage in vitro de la barrière intestinale
2.6.3 Etude du potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV : développement d'un nouveau modèle <i>in situ</i>
2.7 Conclusion
3 Identification et caractérisation des peptides responsables des activités biologiques
étudiées et étude de leurs modes d'action
3.1 Introduction
3.2 Identification des séquences impliquées dans la stimulation de la sécrétion des CCK
3.2.1 Démarche adoptée
3.2.2 Sous-fractionnement de la fraction FC et identification des sous-fractions
stimulatrices de la sécrétion des CCK
3.2.3 Identification des séquences peptidiques des sous-fractions FC-4 et FC-6 par
LC-MS-MS
3.2.4 Sous-fractionnement de la fraction FD et identification des sous-fractions impliquées dans la stimulation de la sécrétion des CCK
3.2.5 Identification des séquences des sous-fractions FD-3 et FD-5 par
LC-MS-MS
3.2.6 Etude de la stimulation de la sécrétion des CCK en présence de l'inhibiteur du récepteur CaSR
3.3 Sélection de peptides au sein de la liste des peptides passant intacts la barrière de cellules Caco-2 pour l'étude des activités DPP-IV/GLP-1
3.4 Etude du potentiel bioactif des peptides synthétiques à inhiber la DPP-IV et à
stimuler la sécrétion de GLP-1264
3.4.1 Etude du potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV des peptides synthétiques
3.4.2 Etude du potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV du peptide VAAA en
présence d'autres peptides synthétiques

3.4.3Etude du potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV du peptide VAAA avec lemodèle Caco-2 <i>in situ</i>
3.4.4 Etude du passage du peptide VAAA au travers de la monocouche de cellules Caco-2
3.4.4.1 Effet du peptide VAAA sur l'intégrité de la barrière de cellules Caco-2 267
3.4.4.2 Evolution des concentrations apicale et basale du peptide VAAA
3.4.5 Etude du potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 des peptides synthétiques
3.4.5.1 Effets des peptides synthétiques sur la sécrétion de GLP-1
3.4.5.2 Effet d'un inhibiteur du transporteur PepT1 sur la sécrétion de GLP-1 en présence des peptides synthétiques
3.5 Discussion
3.5.1 Mise en évidence d'un nouveau peptide inhibiteur de la DPP-IV
3.5.2 Mise en évidence de nouvelles séquences et des récepteurs impliqués dans la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales
3.5.2.1 Mise en évidence des peptides et des récepteurs potentiellement impliqués dans la sécrétion des CCK
3.5.2.2 Mise en évidence des peptides et des récepteurs potentiellement impliqués dans la stimulation de la sécrétion du GLP-1
3.6 Conclusion
Conclusions et perspectives
1 Modélisation de la digestion GI
2 Techniques analytiques appliquées à la caractérisation des peptides
3 Peptides alimentaires et régulation de l'homéostasie énergétique
4 Perspectives
Références bibliographiques
Production scientifique
Annexes

## Listes des figures

Figure 1 : L'appareil digestif humain	
Figure 2 : Anatomie de la muqueuse intestinale	
Figure 3 : Les différents niveaux d'organisation de la barrière intestinale	
Figure 4 : La barrière intestinale à l'interface entre lumière intestinale et milieu	intérieur41
Figure 5 : Voies de transport cellulaires des acides aminés libres (AA) et des a	oligopeptides
au niveau de la barrière épithéliale	
Figure 6 : Les complexes d'adhésion cellulaire présents au niveau de la barrièn	re intestinale
(modifiée sous accord d'après Jefferson et al., 2004)	
Figure 7 : Acteurs et voies de signalisation impliqués dans le maintien de l	'homéostasie
énergétique	52
Figure 8 : Schéma des structures cérébrales du système nerveux central	53
Figure 9 : Les principaux noyaux hypothalamiques.	
Figure 10 : Circuits neuronaux activés par la leptine et l'insuline	au sein de
l'hypothalamus	
Figure 11 : Principales populations de cellules entéroendocrines présentes a	u niveau du
tractus GI	61
Figure 12 : Le tractus GI et ses sécrétions hormonales impliquées dans la r	égulation de
l'homéostasie énergétique	
Figure 13 : Partie C-terminale des CCK	64
Figure 14 : Les différentes CCK générées à partie de la pré-pro-CCK	64
Figure 15 : Les produits issus du clivage du proglucagon	
Figure 16 : Spécificité de clivage de la DPP-IV	
Figure 17 : Représentation de la DPP-IV transmembranaire	
Figure 18 : Représentation schématique d'un peptide	
Figure 19 : Evolution du nombre de documents scientifiques publiés sur le thème	des peptides
bioactifs depuis 1980 jusqu'à 2015	
Figure 20 : Voies de signalisation activées par les peptides et acides aminés imp	liquées dans
la sécrétion et la synthèse des CCK au niveau de la cellule entéroendocrine	
Figure 21 : Voies de signalisation activées par les acides aminés libres et les pep	tides dans la
synthèse et la sécrétion de GLP-1 par la cellule entéroendocrine	

Figure 22 : Boucle de régulation de la prise alimentaire induite par la digestion des
protéines : implication des récepteurs μ-opioïdes (MOR)101
Figure 23 : Approches empiriques et bio-informatiques dédiées à la recherche de peptides
bioactifs
Figure 24 : Conformation spatiale de l'hémoglobine bovine à pH 7,2
<i>Figure 25 :</i> Séquence peptidique de la chaîne α de l'hémoglobine bovine
<i>Figure 26 :</i> Séquence peptidique de la chaîne $\beta$ de l'hémoglobine bovine
Figure 27 : Schéma du modèle de digestion GI in vitro statique mis en place pour
l'étude
Figure 28 : Montage expérimental de simulation de la digestion GI in vitro statique de
l'hémoglobine bovine
Figure 29 : Montage expérimental de simulation de la digestion GI dynamique de
l'hémoglobine bovine (TIM)
Figure 30 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse
Figure 31 : Fragments résultant d'un double clivage de la chaîne principale du peptide 125
Figure 32 : Exemple de cartographie peptidique et de carte de chaleur de la chaîne $\alpha$ de
l'hémoglobine bovine
Figure 33 : Cellules STC-1 cultivées en flasque T75 (MO X20)
Figure 34 : Cellules Caco-2 cultivées en flasque T75 (MO X40)
Figure 35 : Modèle de digestion statique in vitro de l'hémoglobine bovine
Figure 36 : Démarche analytique adoptée pour l'analyse du peptidome
Figure 37 : Profils de séparation SEC des digestats gastriques et intestinaux 120 min 153
Figure 38 : Profil de séparation RP-HPLC de la phase salivaire
Figure 39 : Profils de séparation RP-HPLC des digestats de la phase gastrique
Figure 40 : Profils de séparation RP-HPLC des digestats de la phase intestinale
Figure 41: Cartographies peptidiques du digestat gastrique 120 min établies par MALDI-
MS-MS
Figure 42 : Profils tridimensionnels (temps de rétention en fonction du rapport m/z et de
l'intensité du signal MS) des données LC- LR-ESI-MS-MS
Figure 43: Cartographies peptidiques des chaînes $\alpha$ et $\beta$ du digestat gastrique obtenues par
LC-LR-ESI-MS-MS
<b>Figure 44</b> : Cartographies peptidiques des chaînes $\alpha$ et $\beta$ du digestat intestinal obtenues par
<i>LC-LR-ESI-MS-MS</i>

Figure 45 : Profils tridimensionnels (temps de rétention en fonction de m/z et de l'intensité du
signal MS) des données LC-HR-ESI-MS-MS161
Figure 46 : Cartographies peptidiques des chaînes $\alpha$ et $\beta$ du digestat gastrique obtenues à
partir des analyses LC-HR-ESI-MS-MS
Figure 47 : Cartographies peptidiques des chaînes $\alpha$ et $\beta$ du peptidome intestinal réalisées à
partir des analyses LC-HR-ESI-MS-MS
Figure 48 : Cartographies peptidiques et cartes de chaleur des peptidomes gastriques et
intestinaux
Figure 49 : Cartographies peptidiques et cartes de chaleur des peptides communs aux
peptidomes gastriques et intestinaux167
Figure 50 : Profils de séparation RP-HPLC de digestats GI d'hémoglobine et de matrice. 170
Figure 51 : Photographie du digesteur TIM
Figure 52 : Profils RP-HPLC des digestats gastriques issus de la digestion dynamique
« blanc »
Figure 53: Profils de séparation RP-HPLC des digestats duodénaux issus de la digestion
dynamique « blanc »
Figure 54 : Profils de séparation RP-HPLC des prélèvements directs de la digestion
dynamique de l'hémoglobine bovine174
Figure 55 : Evolution de l'abondance peptidique dans chaque compartiment durant la
digestion dynamique de l'hémoglobine bovine176
Figure 56 : Profils de séparation RP-HPLC des échantillons d'absorption jéjunale et
iléale177
Figure 57 : Evolution de l'abondance peptidique dans les absorptions jéjunales et iléales au
cours de la digestion dynamique de l'hémoglobine bovine178
Figure 58 : Profils de séparation RP-HPLC des prélèvements directs de la digestion
dynamique de la matrice à base d'hémoglobine bovine179
Figure 59 : Evolution de l'abondance peptidique dans chaque compartiment durant la
digestion dynamique de la matrice à base d'hémoglobine
Figure 60 : Profils de séparation RP-HPLC des absorptions jéjunales et iléales de la
digestion dynamique de la matrice à base d'hémoglobine bovine
Figure 61: Evolution de l'abondance peptidique dans les absorptions jéjunales et iléales au
cours de la digestion dynamique de la matrice à base d'hémoglobine bovine
Figure 62 : Profils chromatographiques obtenus par SEC des prélèvements directs obtenus
lors de la digestion dynamique de la matrice

Figure 63 : Cartographies peptidiques et cartes de chaleur du peptidome de l'absorption
jéjunale entre 2 et 5 h de digestion dynamique de l'hémoglobine bovine
Figure 64: Effet du prélèvement salivaire et des digestats gastriques et intestinaux sur la
sécrétion des hormones CCK et GP-1 actif par les cellules STC-1
Figure 65: Inhibition de l'activité de la DPP-IV par les digestats gastriques et intestinaux 205
Figure 66: Effet de du digestat intestinal 120 min (1120min) sur l'expression des gènes codant
pour les hormones CCK, PG et la PC-1
Figure 67: Profil de distribution des poids moléculaires du digestat intestinal 120 min.
obtenu par SEC
Figure 68: Profils tridimensionnels des analyses LC-MS des fractions SEC
Figure 69: Effets du digestat intestinal 120 min et des 4 fractions du digestat obtenus par
SEC sur la sécrétion des CCK par les cellules STC-1
Figure 70: Effet des fractions du digestat intestinal 120 min sur l'expression du gène codant
pour les CCK dans la cellule STC-1
Figure 71: Effets du digestat intestinal 120 min et des 4 fractions obtenues par SEC sur la
sécrétion de GLP-1 actif par les cellules STC-1
Figure 72: Effet des fractions du digestat intestinal 120 min sur l'expression du gène codant
pour le PG (proglucagon) dans la cellule STC-1
Figure 73: Effet des fractions SEC du digestat sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV. 216
Figure 74 : Profil de séparation RP-HPLC de la fraction FBC
Figure 75 : Effets des sous-fractions issues de FBC et de la fraction FBC sur la sécrétion de
GP-1 actif par les cellules STC-1
Figure 76: Effet des sous-fractions de la fraction FBC obtenues par RP-HPLC en mode semi
préparatif sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV
Figure 77: Modèle de barrière de cellules Caco-2 différenciées utilisé pour l'étude du
passage des peptides
Figure 78: Profils tridimensionnels des solutions initiales FBC-3 (avant contact avec les
cellules) et des surnageants basolatéraux d'un modèle de barrière Caco-2 établis par
<i>LC-MS-MS</i>
Figure 79: Inhibition de l'activité de la DPP-IV par les surnageants apicaux et basolatéraux
issus des expériences de passage de barrière Caco-2 de la sous-fraction FBC-3
<i>Figure 80</i> : <i>Expression du gène codant pour la DPP-IV chez les cellules Caco-2</i>
Figure 81: Inhibition de l'activité de la DPP-IV par Ile-Pro-Ile (IPI) sur enzyme purifiée et
sur cellules Caco-2

Figure 82 : Inhibition de l'activité DPP-IV de l'enzyme purifiée et des cellules Caco-2 in situ
par les digestats d'hémoglobine bovine (modèle statique)
Figure 83 : Démarche de fractionnements du digestat intestinal pour la recherche de peptides
bioactifs
Figure 84 : Profil de séparation RP-HPLC en mode semi-préparatif de de la fraction
FC
Figure 85: Effets de la fraction FC et de ses sous-fractions sur la stimulation de la sécrétion
des CCK par les cellules SCT-1
Figure 86 : Profils de séparation RP-HPLC des sous-fractions FC-4 et FC-6
Figure 87 : Profil UV de séparation RP-HPLC en mode semi-préparatif de la fraction FD.
Figure 88: Effets des sous-fractions issues de la fraction FD sur la stimulation de la sécrétion
des CCK par les cellules STC-1
Figure 89: Profils UV de séparation RP-HPLC des sous-fractions FD-3 et FD-5 259
Figure 90: Effet d'un inhibiteur de CaSR sur la sécrétion des CCK par les cellules STC-1 en
présence des fractions FD-3, FD-5 et FD
Figure 91: Représentation de Lineweaver et Burk pour l'inhibition de l'activité de la DPP-IV
par le peptide VAAA
Figure 92: Inhibition de l'activité de la DPP-IV par le peptide VAAA en présence d'un
mélange équimolaire de peptides synthétiques
Figure 93 : Spectre de fragmentation du peptide VAAA ( $m/z = 331,2$ )
Figure 94: Évolution de la concentration du peptide VAAA dans les compartiments apicaux et
basolatéraux du modèle de barrière de cellules Caco-2
Figure 95: Effet des peptides synthétiques sur la sécrétion de GLP-1 par les
cellules STC-1
Figure 96: Effet des peptides TKAVEH, ANVST, DLSHGSAQ, YGAE et KAAVT sur la
stimulation de la sécrétion de GLP-1 par les cellules STC-1
Figure 97: Effet d'un inhibiteur de PepT1 sur la sécrétion de GLP-1 par les cellules STC-1
en présence des peptides TKAVEH, ANVST et KAAVT

## Liste des tableaux

Tableau 1: Neuromédiateurs hypothalamiques impliqués dans le contrôle de
l'homéostasie énergétique
<b>Tableau 2</b> : Composition chimique des fluides simulés de la digestion GI in vitro statique 117
Tableau 3 : Gradient du solvant B appliqué dans l'analyse LC-MS-MS des sous-fractions
bioactives
Tableau 4 : Conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse LC-MS-MS des
surnageants du passage de barrière Caco-2146
Tableau 5: Comparaison du nombre de séquences uniques identifiées dans les peptidomes
gastriques et intestinaux par LC-MS-MS de haute résolution (HR) et de basse résolution
( <i>LR</i> )
Tableau 6 : Liste des motifs d'acides aminés récurrents issus des cartes de chaleur des
peptidomes gastriques et intestinaux avec A fréquence d'apparition du motif166
Tableau 7: Estimation de la concentration peptidique des digestats déterminées par dosage
BCA
Tableau 8: Comparaison des séquences peptidiques identifiées par LC-MS-MS et identifiées
par PEAKS dans les échantillons d'absorption jéjunale des digestions dynamiques de
l'hémoglobine et de la matrice à base d'hémoglobine187
Tableau 9: Concentrations inhibitrices induisant 50% d'inhibition (IC <sub>50</sub> ) des digestats
d'hémoglobine bovine et de la diprotine A
Tableau 10: Concentrations inhibitrices induisant 50 % d'inhibition de l'activité de la DPP-
IV (IC <sub>50</sub> ) des fractions issues du digestat intestinal
Tableau 11 : Valeurs des $IC_{50}$ des sous-fractions de la fraction BC inhibant l'activité de la
DPP-IV
Tableau 12: Conditions expérimentales du passage d'une barrière de cellules Caco-2 de la
sous-fraction FBC-3
Tableau 13: Coefficients de perméabilité apparente $(P_{app})$ de la monocouche de cellules
Caco-2 en présence du contrôle ou de la solution FBC-3 4 g.L <sup>-1</sup>
Tableau 14: Nombre de séquences peptidiques identifiées par HILIC/RPLC-MS-MS couplé
au logiciel Peaks
Tableau 15 : Valeurs des $IC_{50}$ des digestats et de Ile-Pro-Ile obtenues par test enzymatique
utilisant soit l'enzyme purifiée soit les cellules Caco-2

Tableau 16: Liste des séquences peptidiques identifiées dans les sous-fractions	FC-4 et
FC-6	255
Tableau 17 : Liste des séquences peptidiques identifiées dans les sous-fractions FD-3	et FD-5
par LC-MS-MS et Peaks7.0	259
Tableau 18: Liste des peptides et leurs rapports m/z pour l'analyse SIM	262
<b>Tableau 19</b> : Liste des peptides résistants sélectionnés pour la synthèse peptidique	263
Tableau 20: Valeurs d'IC <sub>50</sub> de l'activité DPP-IV des peptides IPI et VAAA avec le	substrat
Gly-Pro-AMC	266

# **Introduction Générale**

Afin de maintenir son organisme en bonne santé, chaque être individu doit pouvoir couvrir quotidiennement et de manière équilibrée ses besoins énergétiques. La consommation de protéines alimentaires est un élément fondamental pour la croissance et le fonctionnement du corps humain. Elle répond au besoin de l'organisme en acides aminés afin de remplir ses besoins métaboliques et de maintenir l'équilibre azoté. La demande mondiale en protéines alimentaires d'origine animale (viande, poisson, produits laitiers) ne cesse d'augmenter : ces trente dernières années dans les pays industrialisés, la demande en viande a augmenté de 150 % et celle en produits laitiers de 60 %. D'ici 2050, les experts estiment que la population mondiale atteindra 9,1 milliards de personnes et que la production en denrées alimentaires devrait augmenter de 70 % afin de nourrir correctement les hommes, sans pour autant compromettre leur sécurité alimentaire. En France, les quantités en kilogrammes de poisson, viande et produits laitiers consommées par habitant et par année ont doublé depuis les années 1950 (Rapport « Pour une politique nutritionnelle de santé publique en France » HCSP, 1999). Les protéines attirent les industries agro-alimentaires, non seulement pour leurs propriétés nutritionnelles mais aussi pour leurs propriétés fonctionnelles (émulsifiantes, gélifiantes), permettant d'améliorer la stabilité des formulations, et bien sûr pour leur bénéfice santé. Les protéines alimentaires ont en effet démontré leur capacité à libérer des peptides bioactifs, produits par hydrolyse enzymatique ou fermentation bactérienne, dont les activités peuvent être multiples (antimicrobienne, anti-hypertensive ou encore anti-inflammatoire). Dans un contexte d'explosion mondiale du surpoids et de l'obésité, comprendre le devenir des aliments ingérés est devenu un enjeu essentiel afin de prévenir durablement l'expansion de ces maladies qui constituent un véritable problème de santé publique majeur. Parallèlement, un intérêt croissant pour le tractus gastro-intestinal a récemment gagné les scientifiques : longtemps considéré comme un simple lieu de dégradation et de transit des aliments, de nombreux travaux de recherche ou de vulgarisation scientifique ont émergé, le décrivant comme le deuxième cerveau (Enders, 2015).

L'ingestion de protéines alimentaires et/ou de leurs hydrolysats a montré avoir des effets particulièrement intéressants dans le cadre du traitement du diabète de type 2 mais aussi de manière générale sur la régulation de l'homéostasie énergétique. Ce système de régulation permet un équilibre sur le long terme entre l'apport et la dépense énergétique assurant le maintien de la masse corporelle. Cet équilibre repose entre autres sur une forte communication entre le tractus gastro-intestinal et le cerveau grâce à un échange d'information par l'intermédiaire de signaux chimiques ou mécaniques. L'étape de digestion

gastro-intestinale des aliments joue un rôle central puisqu'elle est à l'origine de molécules capables d'interagir avec l'environnement gastro-intestinal et d'intervenir indirectement sur les paramètres de l'homéostasie énergétique. Certains mécanismes d'action sont à ce jour partiellement identifiés mais beaucoup de questions restent toutefois encore non élucidées comme la digestion des protéines alimentaires et son implication dans l'homéostasie énergétique.

L'objectif de ce projet était de choisir une protéine modèle, de simuler sa digestion gastrointestinale in vitro dans des conditions expérimentales proches des conditions réelles et de comprendre comment les hydrolysats obtenus pouvaient être impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Compte tenu de l'antériorité des travaux d'hydrolyse et de cartographies peptidiques menés sur l'hémoglobine bovine au laboratoire, cette protéine a été choisie comme protéine modèle de l'étude. Le premier axe du projet s'est focalisé sur la mise au point d'un protocole de digestion gastro-intestinale in vitro statique et sur la caractérisation, par diverses techniques analytiques, des hydrolysats d'hémoglobine bovine. L'élaboration de matrices alimentaires à base d'hémoglobine bovine et la simulation d'une digestion in vitro dynamique ont permis de complexifier le modèle et de se rapprocher de conditions plus proches de la digestion humaine d'un aliment. Le deuxième axe du projet s'est intéressé à la mise en évidence des activités biologiques des digestats d'hémoglobine bovine générés. L'étude a porté sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales cholécystokinines (CCK) et Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) par une lignée cellulaire entéroendocrine et sur l'inhibition de l'activité de la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) étroitement liée à l'action du GLP-1. Les séquences peptidiques ou populations peptidiques impliquées ont été mises en évidence par différentes techniques analytiques. Enfin, le troisième et dernier axe a concerné l'étude des mécanismes d'action moléculaires des peptides ou groupes peptidiques impliqués dans les activités biologiques citées précédemment.

# Synthèse bibliographique

#### 1 La digestion gastro-intestinale des protéines alimentaires



#### 1.1 Présentation anatomique de l'appareil digestif

*Figure 1* : *L'appareil digestif humain* Image modifiée d'après Servier Medical Art

L'appareil digestif est composé du tube digestif ou tractus GI et des organes digestifs accessoires (*Figure 1*). Ces derniers sont les glandes salivaires, le pancréas exocrine, le foie et la vésicule biliaire. Situés à l'extérieur du tractus GI, ils y déversent leurs sécrétions par des canaux excréteurs situés dans sa lumière. Le tractus GI, long de plus de 4,5 m chez l'homme, se divise en deux parties : le tractus supérieur allant des lèvres aux ligaments de Treitz du duodénum et le tractus inférieur allant de la fin du duodénum à l'anus. Le tractus inférieur est lui-même sous-divisé en deux parties : l'intestin grêle composé de la fin du duodénum, du jéjunum et de l'iléon suivi par le gros intestin composé du cæcum, de l'appendice, du côlon, et du rectum. Tous ces organes sont en continuité depuis la bouche jusque l'anus et donc avec l'extérieur.

La paroi du tractus GI constitue donc une barrière entre le milieu extérieur et le milieu intérieur dont l'intégrité se doit d'être constamment maintenue : les conditions acides de l'estomac ou les populations microbiennes peuplant le côlon seraient nocives pour le milieu

intérieur. La structure de la paroi du tractus GI est quasiment la même sur toute sa longueur. L'anatomie de la muqueuse intestinale est représentée *Figure 2*.



*Figure 2* : *Anatomie de la muqueuse intestinale* Image modifiée d'après Servier Medical Art

On distingue quatre couches (de l'intérieur vers l'extérieur) : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse externe et la séreuse (Sherwood, 2006).

### 1.2 Digestion GI des aliments

La fonction principale de l'appareil digestif est de transformer les aliments ingérés en sources d'énergie utilisables par notre organisme sous forme de nutriments, mais également d'assurer leur transfert, accompagnés de l'eau et des électrolytes provenant de l'alimentation, vers le milieu intérieur. L'appareil digestif remplit quatre fonctions : la **motilité** liée à la contraction du muscle lisse du tube digestif et assurant la progression du bol alimentaire grâce à la propulsion et au brassage, la **sécrétion** des sucs digestifs par des glandes exocrines sous l'action de stimuli hormonaux ou nerveux, la **digestion** par hydrolyse enzymatique des aliments ingérés en nutriments absorbables et l'**absorption** des nutriments au niveau de l'intestin grêle. Les sécrétions digestives sont ajustées de manière à optimiser la digestion et l'absorption des aliments. Elles sont régulées par l'action des voies nerveuses (système nerveux entérique et innervation extrinsèque reliée au système nerveux central) qui innervent le muscle lisse, les glandes endocrines et exocrines permettant à la fois d'influencer la motilité et la sécrétion des sucs digestifs et de coordonner l'activité de différentes régions de l'appareil digestif. Le bol alimentaire va passer successivement dans trois compartiments caractérisés par leur équipement enzymatique et leurs conditions physico-chimiques.
### 1.2.1 La bouche

L'action mécanique de la mâchoire va permettre une première déstructuration de la matrice alimentaire couplée à l'action dénaturante de la salive. La salive est composée à 99 % d'eau, le 1 % restant contient un mélange d'ions, d'enzymes et d'autres protéines dont les plus importantes sont l'amylase, le mucus et le lysozyme. Les enzymes salivaires commencent la digestion des glucides (amylase) et des lipides (lipase) mais ont également une activité antimicrobienne (lactoperoxydase, lysozyme). La salive est secrétée de manière discontinue (entre 0,7 et 1 L pendant 24 heures avec un pic de sécrétion au moment des repas). Elle humidifie les aliments et sert de liant à la formation du bol alimentaire. Elle sert également à lubrifier et à nettoyer la bouche. Sa composition neutre permet également, lorsque le bol alimentaire est transféré dans l'estomac, d'y provoquer une légère augmentation de pH permettant ainsi aux enzymes salivaires de poursuivre leurs actions (van der Bilt, 2009).

# 1.2.2 L'estomac

Le bol alimentaire est transféré depuis la cavité buccale jusqu'à l'estomac par péristaltisme le long de l'œsophage. L'estomac est un sac en forme de J dans lequel on distingue le fundus (partie supérieure à l'orifice œsophagien), le corps et l'antre (partie la plus distale) dotée d'une couche musculaire plus importante. Le sphincter pylorique relie l'antre au duodénum. L'estomac reçoit le bol alimentaire et va le transformer en chyme sous l'action des sécrétions gastriques et enzymatiques couplée à une action mécanique de brassage principalement assurée par l'antre. C'est dans cet organe que la digestion des protéines commence véritablement. Les cellules G de la muqueuse antrale produisent la gastrine (présentée au paragraphe 2.3.1.2) en présence d'oligopeptides et du Gastrin-Releasing Peptide (GRP) qui contribue à stimuler la sécrétion d'acide gastrique au niveau des cellules pariétales. Un contrôle nerveux parasympathique impliquant l'acétylcholine participe également à la sécrétion d'acide. Afin de ne pas endommager la muqueuse gastrique, la somatostatine et les prostaglandines inhibent respectivement la sécrétion de gastrine et d'acide gastrique. Le pH gastrique peut se situer entre 1 et 5 et varie en fonction de l'individu et de l'état de jeûne du sujet. L'acidité gastrique n'est pas directement impliquée dans la digestion en tant que telle mais elle favorise l'activation du pepsinogène (précurseur de la pepsine), assure la dénaturation des protéines alimentaires facilitant ainsi leur hydrolyse pepsique et joue un rôle antibactérien en tuant les micro-organismes potentiellement toxiques pour l'organisme. En théorie, le pH acide inactive les enzymes salivaires mais le mélange de salive alcaline au suc gastrique peut augmenter le pH jusque des valeurs comprises entre 5 et 6 permettant ainsi aux enzymes salivaires de continuer leur travail amylolytique. La pepsine, résultat de l'autocatalyse du pepsinogène, initie la digestion des protéines et génère une première population d'oligopeptides (Sherwood, 2006). L'hydrolyse pepsique ne génère toutefois qu'une petite quantité d'acides aminés libres, la digestion des protéines ayant lieu principalement dans l'intestin (Caspary, 1992). Une résistance de certaines protéines alimentaires à l'activité pepsique a été identifiée comme un potentiel facteur d'allergénicité notamment pour certaines protéines du lait de vache et de soja ou encore des noix. Toutefois, il n'est pas toujours possible de prédire le caractère allergène d'une protéine en se fondant uniquement sur sa stabilité gastrique (Wickham et al., 2009).

La quantité de chyme est le principal facteur influençant la force de contraction de l'antre. Les contractions péristaltiques de l'antre procurent au chyme la force motrice nécessaire pour passer dans le duodénum par le sphincter pylorique. L'intensité de la contraction du sphincter et la vitesse de la vidange sont sous le contrôle de facteurs intragastriques (gastrine, réflexe vagal) et de facteurs duodénaux (réflexe entéro-gastrique, hormones intestinales).

#### 1.2.3 L'intestin grêle

#### 1.2.3.1 Anatomie de l'intestin grêle

Constitué de trois segments successifs (duodénum, jéjunum et iléon représentés *Figure 1*), l'intestin grêle constitue le siège principal de l'absorption des nutriments. Le chyme est expulsé dans le duodénum grâce aux contractions péristaltiques de l'estomac et se mélange au suc duodénal et aux sécrétions pancréatiques et biliaires. Le duodénum mesure environ 30 cm de long chez l'homme et il est principalement le lieu d'absorption passive de l'eau et des électrolytes. Le jéjunum, long de 3 à 4 m chez l'homme, est le lieu de l'absorption des glucides, lipides et protides alors que l'iléon, long de 1 m, est plutôt consacré aux absorptions spécifiques comme la réabsorption des sels biliaires. La progression du chyme le long de l'intestin est assurée par deux mécanismes : la segmentation et le complexe moteur migrant. La segmentation consiste en des contractions annulaires du muscle lisse et l'alternance de contractions et de relâchements permet un brassage optimal du chyme. À la fin de l'absorption du repas, la segmentation est remplacée par le complexe migrant moteur. Constitué d'ondes péristaltiques allant du duodénum jusqu'à l'extrémité de l'iléon, il assure le nettoyage de l'intestin en évacuant les restes vers le côlon (Sherwood, 2006).

### 1.2.3.2 Les sécrétions pancréatiques

Le pancréas exocrine sécrète une solution alcaline riche en ions HCO<sub>3</sub> permettant de neutraliser le chyme acide et d'inactiver la pepsine. Les enzymes pancréatiques sont constituées d'un mélange de protéases, lipases, amylases et nucléases. Les protéases sont composées des endopeptidases et des exopeptidases. Les trois principales endopeptidases pancréatiques sécrétées sont la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase. Elles sont sécrétées sous forme inactive nommées respectivement trypsinogène, chymotrypsinogène et proélastase. L'entérokinase, située à la partie apicale des cellules épithéliales du duodénum, va activer le trypsinogène en trypsine initiant une cascade de réactions permettant l'activation des autres enzymes pancréatiques. La trypsine fonctionne à un pH optimal de 7,8 et clive préférentiellement la partie C-terminale du peptide contenant un résidu d'arginine ou de lysine. La chymotrypsine, présente majoritairement sous deux formes A et B, clive préférentiellement les liaisons peptidiques adjacentes à des résidus d'acide aminés hydrophobes tels que la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine. Son pH optimal se situe entre 7,8 et 8,0. L'élastase (ou élastoprotéinase) est quant à elle moins spécifique que les deux autres endopeptidases et clive les liaisons peptidiques adjacentes à des résidus d'acides aminés aliphatiques (sérine, leucine, alanine, valine). Les exopeptidases sont représentées par les carboxypeptidases A et B (sécrétées sous forme de procarboxypeptidases). Elles hydrolysent préférentiellement les liaisons peptidiques du côté C-terminal avec une préférence pour les résidus d'acides aminés aromatiques dans le cas de la carboxypeptidase A. La carboxypeptidase B agit en complémentarité en hydrolysant toutes les liaisons non hydrolysées par la carboxypeptidase A comme celles adjacentes à des résidus d'acides aminés basiques (Beck, 1973). D'autres enzymes telles que l'amylase, la lipase pancréatique et la phospholipase sont sécrétées par le pancréas poursuivant ainsi la digestion des lipides et des glucides. Au niveau du pancréas exocrine, l'acinus est le siège de la synthèse et de la sécrétion des enzymes pancréatiques alors que les canaux excréteurs sont responsables de la sécrétion des ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La sécrétion acinaire est majoritairement sous contrôle hormonale (CCK, motiline) et neurale. La sécrétion des ions HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> est stimulée par la sécrétine, ellemême sécrétée par le duodénum en réponse à un environnement acide.

# 1.2.3.3 Les sécrétions biliaires

La bile est déversée au niveau du duodénum par le canal cholédoque. L'embouchure de ce dernier est gardée sous contrôle du sphincter d'Oddi empêchant la bile de rentrer dans le

duodénum entre les repas. Elle est composée d'un mélange de sels biliaires (dérivés du cholestérol), cholestérol, lécithine et bilirubine (provenant du foie). Plus de 95 % des sels biliaires sont réabsorbés au niveau de l'iléon et envoyés vers le foie par un système de transport actif nommé cycle entéro-hépatique (Maldonado-Valderrama et al., 2011). La fonction première de la bile est de faciliter le transport des lipides par la barrière intestinale. Grâce aux propriétés émulsifiantes des sels biliaires, les lipides hydrolysés en acides gras libres et en 2-monoacylglycérols sont incorporés dans des micelles stabilisées par les sels biliaires. Par ailleurs, les acides biliaires peuvent également améliorer la protéolyse de certaines protéines alimentaires en déstabilisant leur structure (Gass et al., 2007). Enfin, les acides biliaires participent également à la régulation du métabolisme énergétique en agissant par exemple sur la régulation de la glycémie (Vítek and Haluzík, 2016).

# 1.2.4 Le côlon

Partie la plus longue du gros intestin, le côlon est constitué de trois parties (côlon ascendant, transverse et descendant) dans lequel se retrouvent tous les résidus non digérés (ex : fibres alimentaires) et les constituants non absorbés. Le côlon absorbe l'eau et les sels et le contenu résiduel participera en partie à la formation des fèces. Le rôle principal du côlon est de stocker les selles. Lors de l'arrivée d'aliments dans l'estomac, la motilité du côlon est activée par le réflexe gastro-colique dans lequel interviennent le système nerveux extrinsèque et la gastrine. Le côlon se distingue des autres segments du tractus GI par l'abondance et la diversité de sa flore microbienne. Bien qu'il existe une très large diversité interindividuelle, 90 % de ces microorganismes appartiennent aux familles phylogénétiques des Firmicutes et des Bactéroidetes suivis par celles des Actinobactéries et des Protéobactéries (Guinane and Cotter, 2013). Le rôle principal de cette flore est d'assurer la dégradation des résidus alimentaires non digérés dans la partie supérieure de l'intestin. Elle transforme les glucides non dégradés comme les fibres alimentaires mais également les résidus protéiques et lipidiques menant à la libération d'une grande diversité d'acides gras à courte chaine (chaîne carbonée contenant moins de 6 atomes de carbone), de phénols, d'indoles, d'amines et des composés sulfurés (Scott et al., 2013). Le microbiote intestinal joue un rôle important dans le phénomène d'absorption des minéraux (calcium, magnésium, fer) et dans la synthèse de vitamines K et B (Scarpellini et al., 2010).

# 1.3 Absorption intestinale des nutriments

Après avoir subi une succession de modifications mécaniques et chimiques, le chyme arrive au contact de l'épithélium intestinal où l'absorption a lieu. L'absorption se définit comme le transport de nutriments à travers une barrière de cellules épithéliales de la muqueuse intestinale, vers le sang ou le système lymphatique. Dans cette partie, l'absorption des protéines et des acides aminés sera principalement exposée.

# 1.3.1 Anatomie de l'épithélium intestinal

L'épithélium intestinal est la plus grande couche monocellulaire de l'organisme à constituer une barrière contre le milieu extérieur. Outre l'absorption de nutriments, d'électrolytes et d'eau, il assure la protection du milieu intérieur contre les toxines intraluminales, les antigènes et la flore entérique (Groschwitz and Hogan, 2009). La muqueuse intestinale, directement en contact avec la lumière intestinale, est particulièrement adaptée à l'absorption car elle représente une très grande surface d'échange.



*Figure 3* : *Les différents niveaux d'organisation de la barrière intestinale* Image modifiée d'après Viswanathan et al., 2008

Elle est constituée de replis annulaires ou valvules conniventes qui augmentent d'un facteur 3 la surface d'échange (*Figure 3*). Chaque valvule présente elle-même des repliements appelés villosités présentant une forme de doigt et augmentant la surface par un facteur 30. Chaque villosité est constituée de cellules épithéliales (environ <sup>3</sup>/<sub>4</sub> de la hauteur de la villosité) présentant à leur pôle apical des microvillosités : chaque cellule épithéliale peut porter jusqu'à 6000 microvillosités, rendant la surface de l'intestin 600 fois supérieure à ce qu'elle serait si

l'intestin était un tube de paroi lisse. L'ensemble des microvillosités forme la bordure en brosse. La surface d'échange de l'intestin grêle est d'environ de 100 000 cm<sup>2</sup> sans considérer la surface des microvillosités (Ekmekcioglu, 2002). La membrane de la bordure en brosse est caractérisée par sa forte activité enzymatique. Elle contient trois catégories d'enzymes différentes : l'entérokinase activant le trypsinogène en trypsine, des disaccharidases terminant la digestion des glucides et des aminopeptidases terminant la digestion des protéines.

Enfouies à la base de la villosité se trouvent les cryptes de Lieberkühn contenant entre autres des cellules souches qui, en se différenciant, migrent vers le haut de la villosité. Un renouvellement continu des cellules épithéliales est assuré par les cryptes : environ 100 millions de cellules intestinales desquament chaque minute (Sherwood, 2006). De manière générale, les cellules épithéliales sont caractérisées par leur morphologie bien définie (cubique, prismatique ou pavimenteuse), le développement d'interactions intercellulaires et une polarité cellulaire marquée. Le pôle apical de la cellule épithéliale intestinale présentant les microvillosités est en regard de la lumière alors que le pôle basolatéral est en contact avec la lame basale. L'interaction intercellulaire est assurée par les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Il existe quatre grands types de cellules épithéliale : les entérocytes, les cellules entéroendocrines (CEE), les cellules calciformes et les cellules de Paneth. Les entérocytes assurent le transport des acides gras, des acides aminés et des oligosaccharides grâce à la multitude de transporteurs présents sur leur pôle apical (Janssen and Depoortere, 2013). Les CEE sécrètent des hormones intestinales régulant la prise alimentaire. Les cellules calciformes, présentes entre les entérocytes, produisent le mucus intestinal servant à lubrifier et à protéger la muqueuse intestinale. Les cellules de Paneth, à forme pyramidale, sécrètent des enzymes à activité antimicrobienne et sont absentes du côlon pour ne pas empêcher le développement de la flore microbienne. Enfin, la défense immunitaire du tube digestif est assurée par les cellules T présentes sous 3 formes : des agrégations lymphoïdes nommés patchs de Peyer, des follicules lymphoïdes dispersés dans le tissu conjonctif et des lymphocytes intraépithéliaux (Furness et al., 2013). L'organisation de la barrière épithéliale est schématisée dans la Figure 4.



*Figure 4* : *La barrière intestinale à l'interface entre lumière intestinale et milieu intérieur.* CP : cellules de Paneth ; CT : cellule T ; CD : cellule dendritique ; CEE : cellule entéroendocrine ; FCT : transporteur de composés étrangers ; RCPG : récepteurs couplés aux protéines G ; TLR : récepteur Toll-Like (image modifiée sous accord d'après Furness et al., 2013).

# 1.3.2 Absorption intestinale des acides aminés libres et des peptides

# 1.3.2.1 Absorption intestinale des acides aminés

Les acides aminés sont une source essentielle du métabolisme cellulaire et sont utilisés dans la synthèse de tissus ou comme précurseurs dans la synthèse de composés azotés, sulfurés et aromatiques. L'apport protéique dans le corps humain a deux origines : une origine exogène que sont les aliments ingérés et qui représente entre 70 et 100 g de protéines alimentaires par jour (repas occidental moyen) et une origine endogène, apportée par les sucs salivaires, gastriques et pancréatiques ainsi que les protéines constitutives des villosités suite au renouvellement de la muqueuse et qui représente environ 35 g par jour (Kiela and Ghishan, 2016). L'absorption des protéines a principalement lieu au niveau du duodénum et du jéjunum. Enfin, la flore intestinale présente au niveau de l'intestin grêle, bien que moins abondante que celle localisée dans le côlon, peut favoriser la digestion des protéines en dégradant les fibres alimentaires végétales et en facilitant l'accès aux protéines pour les enzymes digestives (Moughan, 2009).

Après avoir été successivement hydrolysées par la pepsine et les enzymes pancréatiques, la digestion des protéines s'achève au contact de la membrane de la bordure en brosse générant une population d'oligopeptides et d'acides aminés libres. Au niveau de la membrane de la bordure en brosse, on distingue neuf peptidases majoritaires : les aminopeptidases N, A, P, W, les endopeptidases-24 et 2, la DPP-IV (dipeptidyl peptidase IV), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et la carboxypeptidase P. Elles sont toutes présentes sur l'ensemble de l'intestin grêle mais leur activité enzymatique varie selon leur localisation. La DPP-IV est la plus active au niveau de l'iléon et du jéjunum d'intestin de rat (Bai, 1994). Il a été estimé que l'action des peptidases de la bordure en brosse générait 40 % d'acides aminés libres et 60 % d'oligopeptides. La dégradation des peptides est ensuite finalisée par l'action des enzymes cytosoliques après absorption par les entérocytes. Les systèmes transporteurs d'acides aminés sont composés de co-transporteurs acides aminés/Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> localisés au niveau du pôle apical. Une pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase en pôle basolatéral crée un gradient de Na<sup>+</sup> en rejetant des ions Na<sup>+</sup> à l'extérieur de l'entérocyte. D'autres transporteurs présents sur la membrane basolatérale assurent le passage des acides aminés libres du cytoplasme vers les capillaires sanguins.

# 1.3.2.2 Absorption intestinale des peptides

### • Historique

Les protéines ne sont normalement pas absorbées sous forme native chez l'adulte sauf en cas d'altérations de la barrière intestinale. Toutefois, l'idée que des peptides de bas poids moléculaire pouvaient être absorbés et relâchés dans le sang portal sous forme intacte a émergé au début du XX<sup>ème</sup> siècle. Plusieurs chercheurs avaient observé dans les années 1930 que les peptones, produits d'une hydrolyse extensive de protéines alimentaires, étaient plus rapidement assimilées qu'un mélange comparable d'acides aminés libres. En 1959, Newey et Smith ont mis en évidence que le transport des acides aminés libres et des oligopeptides se faisaient par deux systèmes distincts. Ce résultat a été rapidement confirmé par plusieurs études entre les années 60 et 70 qui ont démontré deux voies d'absorption possibles pour les oligopeptides : soit une hydrolyse en acides aminés au contact de la barrière intestinale suivie de leur transport par des mécanismes semblables à ceux des acides aminés libres, soit une entrée au sein de la cellule suivi par hydrolyse. En revanche, toutes les hypothèses convergeaient vers une hydrolyse totale des oligopeptides (Matthews, 1971). Ganapathy et Leibach ont démontré en 1985 que le transport de peptides impliquait un co-transport de protons et qu'un gradient de protons était la force motrice du transport actif peptidique. Il a

été plus tard admis que les di- et tri-peptides pouvaient être absorbés et libérés intacts dans la circulation sanguine. Ces peptides possédaient fréquemment un résidu de proline et leur poids moléculaire était approximativement de 500 Da (Webb, 1990). Actuellement, plusieurs voies d'absorption des peptides, ne se limitant pas aux di- et tri-peptides, ont été mises en évidence impliquant deux types de voies : la voie transcellulaire et la voie paracellulaire. Chez un sujet sain, la majorité de l'absorption des peptides se fait par voie transcellulaire, bien que cette voie soit plus coûteuse en énergie pour le métabolisme cellulaire. La voie paracellulaire a été observée comme étant prédominante chez des sujets malades ou en cas d'exfoliation de la muqueuse (Gardner, 1988).

• Transports transcellulaires et paracellulaires des peptides

L'ensemble des modes de transport des peptides a été récapitulé dans la Figure 5.



*Figure 5* : Voies de transport cellulaires des acides aminés libres (AA) et des oligopeptides au niveau de la barrière épithéliale.

1) diffusion passive, 2) passage paracellulaire, 3) endocytose, 4) transport actif des di et tripeptides par PepT1 et 5) transport actif des acides aminés libres.

Le premier mode de transport transcellulaire mis en évidence est un transport actif de protons assuré par le transporteur PepT1. Il fait partie de la famille des transporteurs protonoligopeptides (POT) ou des *peptide transporters* (PTR). Il comporte douze domaines transmembranaires dont les deux extrémités N- et C-terminal sont localisées dans le cytoplasme. La séquence du gène codant pour PepT1 est très conservée chez les mammifères. PepT1 est un co-transporteur peptide/proton et dépend de l'activité antiport Na<sup>+</sup>/proton (NHE3) assurant le maintien du gradient de protons. PepT1 accepte comme substrats plus d'un millier de di- et tri-peptides dont la charge, la polarité et le poids moléculaire varient (Adibi, 1997). La conformation serait probablement le critère modulant le transport des peptides : la chaîne peptidique doit être dans une conformation *trans* et la longueur séparant les extrémités N- et C-terminal doit être comprise entre 5,5 et 6,3 Å. Cela expliquerait ainsi pourquoi ni les acides aminés libres ni les tétra-peptides ne sont acceptés par le transporteur (Daniel, 2004). La modulation de l'abondance et de l'activité de PepT1 est sous le contrôle de plusieurs hormones telles que l'insuline, la leptine, les hormones de croissance et l'hormone thyroïdienne (Thamotharan et al., 1999). Les concentrations en acides aminés libres et en oligopeptides sont également capables de moduler l'expression de PepT1. Le deuxième mode de transport transcellulaire est la diffusion passive des molécules à travers la membrane apicale qui est fortement conditionnée par les propriétés lipophiles des peptides et ne concerne donc que certains peptides (Choonara et al., 2014). Le troisième mode transcellulaire, plus répandu pour les peptides de plus grande taille, est l'endocytose faisant intervenir un récepteur spécifique localisé au niveau apical. Les peptides sont transportés par des vésicules migrant du pôle apical vers le pôle basolatéral où elles fusionnent avec la membrane pour libérer les peptide par exocytose (Gardner, 1988).

Le **transport paracellulaire** est également un mode de transport des peptides dépendant de leur taille et des propriétés hydrophiles des peptides (Artursson et al., 2001). Ce mode de transport est conditionné par l'organisation de l'espace intercellulaire de la barrière intestinale (*Figure 6*).



*Figure 6* : Les complexes d'adhésion cellulaire présents au niveau de la barrière intestinale (modifiée sous accord d'après Jefferson et al., 2004)

Afin de former une barrière intègre, les cellules épithéliales sont maintenues en contact les unes aux autres grâce à la présence de trois types de jonctions : les jonctions d'ancrage, les jonctions communicantes et les jonctions serrées (Jefferson et al., 2004). Les jonctions d'ancrage sont impliquées dans des interactions cellule/cellule (ceinture d'adhérence, desmosome) ou cellule/matrice extracellulaire (point de contact focal, hémidesmosome) qui assurent une communication entre le cytosquelette et l'environnement extérieur par l'intermédiaire de complexes protéiques. La ceinture d'adhérence forme une bande continue le long des parois latérales cellulaires grâce aux cadhérines, protéines transmembranaires. Côté intracellulaire, elles sont reliées aux filaments d'actine par le biais de protéines d'association. Côté extracellulaire, elles interagissent entre elles grâce à des liaisons ioniques. Les desmosomes sont également constitués d'une partie extracellulaire permettant l'association entre deux cellules voisines assurée par les cadhérines desmosomales (desmogléines et desmocollines) et d'une partie intracellulaire formée d'une plaque protéique dense associée aux filaments intermédiaires. Les points de contact focaux assurent les liaisons entre cellules et lame basale grâce aux intégrines, associées aux filaments d'actine côté cytosolique et aux fibronectines et laminines côté extracellulaire. L'hémidesmosome associe la cellule à la matrice extracellulaire grâce à la présence d'intégrines côté extracellulaire. Le côté intracellulaire est composé des mêmes éléments que le desmosome. Les **jonctions communicantes** (*gap junctions*) assurent une communication entre les cytosols de deux cellules adjacentes et permettent le passage de petites molécules d'une cellule à l'autre. Elles sont constituées de protéines transmembranaires appelées connexines groupées en complexe nommé connexon. Enfin, les **jonctions serrées** sont des complexes adhésifs protéiques localisés à proximité du pôle apical cellulaire. Les claudines et occludines sont présentes dans l'espace intercellulaire et sont connectées aux filaments d'actine intracellulaires par l'intermédiaire des *zonula occludens*. Les jonction serrées fonctionnent comme une barrière semi-perméable et conditionnent le passage des ions et des solutés dans l'espace intercellulaire (Groschwitz and Hogan, 2009).

# **1.3.3** Absorption intestinale des glucides et des lipides

Tout comme les protéines, la digestion des glucides se termine au contact des enzymes de la bordure en brosse libérant ainsi des oligosaccharides tels que le glucose, le galactose et le fructose. L'absorption du glucose et du galactose a lieu majoritairement dans le duodénum et est réalisée par un transport actif secondaire impliquant un co-transport Na<sup>+</sup>/glucose ou galactose (SGLT1) et un gradient de concentration établi par la pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase située au niveau basolatéral de l'entérocyte. Le fructose pénètre spécifiquement grâce au transporteur membranaire apical GLUT5 alors que tous les glucides sont libérés vers la circulation sanguine via le transporteur membranaire basolatéral GLUT2 (Sherwood, 2006). Les lipides, hydrolysés pendant la digestion GI et incorporés dans des micelles, sont majoritairement absorbés par les entérocytes du duodénum et du jéjunum. La question d'un transport facilité ou actif reste toujours en suspens. En ce qui concerne les acides gras et les monoglycérides, plusieurs études ont démontré l'implication des deux voies (absorption et transport actif) avec la participation de transporteurs protéiques (FATP-4) mais l'importance relative de chaque voie n'a pas été élucidée. Le transport du cholestérol se fait majoritairement par des transporteurs protéiques apicaux (FAT/CD36, NPC1-L1) couplés avec des transporteurs protéiques localisés au niveau basolatéral de la membrane (Lairon, 2009).

# 1.4 <u>Modélisations *in vitro* de l'appareil digestif et de l'absorption au niveau de la barrière</u> <u>intestinale</u>

# 1.4.1 Les modèles in vitro de digestion GI

Le tractus GI constitue une interface dynamique entre le milieu extérieur et le milieu intérieur de notre organisme. Outre son rôle digestif, il est bien souvent la voie privilégiée pour l'absorption de molécules pharmacologiques, de polluants ou de contamination par des pathogènes. Face aux nombreux problèmes éthiques, techniques et financiers qu'engendrent les études in vivo et cliniques, des systèmes in vitro visant à reproduire le plus fidèlement possible les conditions GI ont émergé depuis ces vingt dernières années dans les domaines de la nutrition, de la toxicologie, de la pharmacologie et de la microbiologie (Guerra et al., 2012). Comme présenté dans cette partie, chaque organe de l'appareil digestif occupe un rôle particulier dans la digestion des aliments et se caractérise par des conditions mécaniques et biochimiques particulières. Les trois principaux organes le plus souvent représentés dans ces systèmes sont la bouche, l'estomac et l'intestin grêle simulés indépendamment ou successivement. Le modèle de digestion GI in vitro tend à les reproduire par l'utilisation séquentielle des enzymes digestives, une reproduction appropriée du pH, un temps de transit proche de celui d'un repas, l'action mécanique du tube digestif et enfin les processus d'absorption intestinale et de fermentation bactérienne (Venema et al., 2009). Plusieurs modèles in vitro ont alors émergé se distinguant par le nombre de compartiments représentés (mono- ou pluri-compartimenté) et la modélisation de la motilité GI (statique ou dynamique). Si les deux modèles utilisent bien souvent les mêmes sources enzymatiques (amylase, pepsine, enzymes intestinales et autres) et les mêmes électrolytes pour simuler les sécrétions GI, le modèle dynamique se distingue par la simulation des procédés mécaniques mis en œuvre dans le tube digestif ainsi que par les cinétiques de modification des conditions physico-chimiques ayant lieu in vivo. Le contrôle des paramètres gastro-intestinaux permet de simuler des conditions physiologiques particulières dépendant de l'espèce (humain, chien, porc), de l'âge (jeunes enfants, personnes âgées), des pathologies ou de l'état nutritionnel lié au repas (à jeun ou non). Il a été démontré que les états pré ou postprandiaux de sujets humains avaient des effets significatifs sur le pH, la composition de la bile, le pouvoir tampon et l'osmolalité des fluides digestifs (Kalantzi et al., 2006).

Les modèles statiques mono-compartimentés sont les plus utilisés grâce à leur simplicité de mise en œuvre et leur rapidité. Ils consistent à simuler dans un réacteur thermostaté les

conditions physico-chimiques des différentes étapes de la digestion GI par ajout des enzymes, variation du pH et du temps de résidence. L'agitation est maintenue constante grâce à un barreau aimanté ou une pale. Ces modèles sont essentiellement utilisés pour l'étude de la bioaccessibilité de métabolites secondaires végétaux, de contaminants (Versantvoort et al., 2005) ou pour la digestion des macronutriments (Kopf-Bolanz et al., 2012). Le modèle statique est très fréquemment utilisé pour estimer le potentiel allergène d'une protéine alimentaire lié à sa faible, ou non, dégradation pendant la digestion, lui permettant de survivre dans la lumière du tube digestif et de rentrer en interaction avec le système immunitaire intestinal (Javier Moreno, 2007). La résistance à l'action de la pepsine est souvent l'un des critères avancés, bien que souvent discuté, pour qualifier le potentiel allergène d'une protéine (Wickham et al., 2009). Les études portent fréquemment sur les allergènes issus des protéines de lait (Mandalari et al., 2009), de l'ovalbumine (Martos et al., 2010), de noix (Javier Moreno et al., 2005), de cacahuètes ou de soja (van Boxtel et al., 2008). Cependant, ce modèle reste assez simpliste et ne s'attache pas à représenter les procédés mécaniques digestifs, la progression du chyme dans le tractus ou encore le changement de débit des sécrétions digestives. De plus, les modèles statiques utilisés diffèrent par les ratios enzyme : substrat, le temps d'incubation, les sources enzymatiques et les sources de bile, rendant les comparaisons des protocoles et des résultats obtenus parfois difficiles. Un protocole de digestion in vitro statique mono-compartimenté a récemment été établi s'appliquant aussi bien aux aliments liquides et solides et visant à harmoniser les conditions de digestion GI se fondant sur des données physiologiques. L'utilisation d'un tel protocole devrait permettre de générer des données comparables (Minekus et al., 2014). Pour pallier les imperfections du modèle statique, quelques modèles dynamiques ont été conçus et, à ce jour, le TIM est le modèle de digestion GI in vitro dynamique le plus abouti associant action mécanique et pluricompartimentation. Développé et commercialisé par l'entreprise néerlandaise TNO, il simule plusieurs paramètres physiologiques tels que la variation temporelle de pH, le transit du chyme, la sécrétion et la composition de fluides digestifs ou encore l'absorption d'eau et de nutriments. Le TIM-1 est constitué de quatre compartiments successifs mimant l'estomac, le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Chaque compartiment est connecté à des pompes péristaltiques assurant la mise en mouvement du chyme à l'intérieur du système (Minekus et al., 1999). Le TinyTIM est une version simplifié du TIM-1 et n'est composé que des compartiments gastrique et duodénal (Minekus, 2015). Le TIM-2 simule quant à lui le gros intestin. Il est construit sur le même principe que le TIM-1 et est inoculé avec un microbiote intestinal standard. La validation du TIM-2 a été réalisée grâce à des études cliniques de

digestions GI de plusieurs macronutriments, de survie de probiotiques ou encore, à cause de la non-accessibilité à la flore intestinale du côlon, grâce à l'étude de l'activité et la composition des microbiotes intestinaux de sujets décédés subitement (Venema et al., 2009). Le SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem) est actuellement le seul système à modéliser le tube digestif de l'estomac au côlon de manière continue mais se focalise plus sur les interactions entre les aliments ingérés et le microbiote intestinal. Bien que de nombreux progrès technologiques et scientifiques ont permis d'améliorer la pertinence des modèles de digestion in vitro, plusieurs paramètres physiologiques intervenant dans le contrôle de la digestion ne sont actuellement pas modélisés comme la régulation hormonale et neuronale, la détection du contenu nutritionnel du repas ou l'intervention du système immunitaire (Guerra et al., 2012). Si à l'heure actuelle, aucun modèle ne remplace l'étude in vivo, le récent développement de tissus en 3D dérivant de cellules souches pluripotentes du tube digestif apporte de nouveaux outils de recherche in vitro notamment dans le domaine des maladies digestives ou dans les interactions entre le microbiote et les tissus intestinaux (Dedhia et al., 2016). Leurs applications sont essentiellement limitées à des fins médicales mais pourraient potentiellement être étendues à la modélisation de la digestion GI in vitro.

#### 1.4.2 Les modèles *in vitro* d'absorption intestinale

La barrière intestinale est en interaction dynamique avec le contenu luminal et ne constitue pas uniquement une barrière physique entre milieu intérieur et extérieur. Comme discuté au paragraphe 1.3.2, elle prolonge la digestion des protéines et des glucides. Elle est le lieu de transport des nutriments vers la circulation sanguine et communique avec le système immunitaire. Son rôle a été particulièrement étudié lors des études de pharmacocinétique qui visaient à suivre le devenir d'une molécule pharmacologique durant l'absorption intestinale (Artursson et al., 2001). Les modèles cellulaires de barrière intestinale in vitro ont été développés afin de pouvoir créer un outil fiable, rapide et peu coûteux. De plus, la mise en place de ces modèles a permis d'augmenter les connaissances sur les mécanismes d'absorption cellulaires et d'établir des stratégies pharmaceutiques afin d'optimiser la conception de nouvelles molécules (Pauletti et al., 1996). Comme la culture in vitro de cellules épithéliales primaires s'est révélée difficile, des lignées cellulaires épithéliales dérivées d'adénocarcinome de côlon ont été isolées et représentent aujourd'hui des modèles représentatifs des situations physiologiques. Les deux lignées les plus utilisées pour la modélisation de la barrière intestinale sont les lignées Caco-2 et HT-29. La lignée Caco-2 a été développée dans les années 70 et présente les avantages de se différencier spontanément

en culture in vitro et d'avoir des caractéristiques morphologiques très proches de celles d'un entérocyte, à savoir une croissance en monocouche, une polarisation avec la présence de microvillosités au pôle apical, des jonctions serrées permettant l'intégrité de la monocouche et l'expression de nombreuses enzymes intestinales comme la DPP-IV ou l'aminopeptidase N (Sambuy et al., 2005). Depuis les années 90, des modèles de cellules Caco-2 ont été utilisés pour étudier l'absorption de nutriments ou de minéraux provenant de digestions GI in vitro d'aliments. Ainsi, de bonnes corrélations avec des études d'absorption in vivo ont été observées comme par exemple lors de l'étude de la biodisponibilité du fer (Glahn, 2009). Ce modèle présente toutefois quelques limites dont l'absence de production de mucus. La lignée cellulaire HT29 est l'autre modèle cellulaire employé pour étudier la barrière épithéliale. Elle présente également des similarités avec des cellules épithéliales matures comme une polarité, l'organisation en une monocouche intègre grâce à la présence de jonctions serrées, la présence de microvillosités en pôle apical et l'expression de plusieurs enzymes de la bordure en brosse. Les activités enzymatiques et la résistance transépithéliale (caractérisant l'intégrité de la barrière cellulaire) sont néanmoins plus faibles que celles exprimées par les cellules Caco-2. La lignée HT29 s'est distinguée comme étant d'une part un bon modèle d'étude des mécanismes moléculaires de la différenciation cellulaire intestinale et d'autre part grâce sa production de mucine. Une exposition séquentielle des cellules au métotréxate (MTX) induit une différentiation en cellules productrices de mucines (HT29-MTX). De même que la lignée Caco-2, la lignée HT29 est un outil remarquable pour le criblage ou l'étude de mécanismes moléculaires et est à utiliser en complémentarité d'études in vivo (Martínez-Maqueda et al., 2015). Les modèles de co-culture de ces deux lignées cellulaires (Béduneau et al., 2014) ou avec d'autres cellules comme des cellules lymphoblastoïdes (Hégarat et al., 2012) améliorent constamment les modèles de barrière épithéliale en prenant en compte un nombre croissant de paramètres physiologiques influençant l'absorption intestinale.

### 1.5 <u>Conclusion</u>

Le tube digestif est une remarquable association de plusieurs organes coordonnés jouant chacun un rôle spécifique dans la transformation des aliments ingérés en nutriments, sources d'énergie utilisables par les cellules de notre organisme, et absorbés au niveau de la barrière épithéliale intestinale. Les modélisations *in vitro* de la digestion et de l'absorption améliorent continuellement notre compréhension des phénomènes associés. Ainsi, les avancées de l'étude de la digestion GI des protéines alimentaires ont démontré que leur devenir ne résidait pas uniquement en la production d'acides aminés libres comme source d'azote. Des peptides

peuvent survivre aux conditions drastiques du tube digestif et y exercer, pour certains d'entre eux, des activités biologiques variées, et en particulier être impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

# 2 Homéostasie énergétique et régulation de la prise alimentaire

# 2.1 <u>Définition de l'homéostasie énergétique</u>

L'homéostasie énergétique est définie comme un état d'équilibre dynamique entre les apports et les dépenses énergétiques de l'organisme et vise à maintenir un poids corporel et une masse grasse stables sur le long terme. La notion d'homéostasie, initialement définie par Claude Bernard dès 1850, reflète la capacité d'un organisme à maintenir un facteur constant sur le long terme (température corporelle, glycémie,...) par un processus de régulation impliquant différents systèmes et appareils de l'organisme (Sherwood, 2006; Keesey and Powley, 2008). Dans le cadre de l'homéostasie énergétique, les nutriments apportés par l'alimentation sont la principale entrée d'énergie nécessaire à la survie et au fonctionnement des cellules de l'organisme. La dépense énergétique est constituée du coût énergétique de l'activité physique, de la thermogénèse et du métabolisme basal cellulaire (Westerterp-Plantenga, 2008). Le maintien de cet équilibre est très finement régulé par un système neuro-hormonal intégré qui permet de minimiser l'impact des fluctuations quotidiennes de la balance énergétique sur la masse grasse et le poids corporel (Woods et al., 1998). Le système nerveux central (SNC) est le principal chef d'orchestre du processus de régulation : il reçoit en permanence des signaux nerveux d'origine mécanique, hormonale et neuronaux provenant de la périphérie renseignant sur l'état énergétique corporel. Il les intègre et génère en retour les réponses appropriées afin de maintenir l'homéostasie, soit en augmentant, soit en diminuant la prise alimentaire. Les signaux périphériques intégrés d'origines variées agissent à différents niveaux sur le système de régulation. Les signaux provenant du tractus gastro-intestinal (GI) interviennent dans la régulation à court terme de la prise alimentaire, c'est-à-dire entre deux repas, et sont générés en réponse à la présence du chyme et des nutriments. Ces signaux sont essentiellement de nature hormonale (hormones intestinales) et mécaniques (distension gastrique). Les signaux hormonaux en rapport avec le tissu adipeux et la glycémie sont quant à eux impliqués dans la régulation à long terme de la prise alimentaire (Bauer et al., 2015; Cummings and Overduin, 2007; Woods et al., 1998). Enfin, des signaux provenant de notre environnement extérieur comme les propriétés organoleptiques des aliments, les facteurs psychosociaux (stress, anxiété, dépression) ou la quantité d'aliments disponibles vont également influencer la prise alimentaire (Sherwood, 2006). Plus récemment, l'implication du microbiote intestinal dans l'homéostasie énergétique a été mise en évidence grâce à des expériences de transplantations de flores de souris obèses dans des souris gnotobiotes : une augmentation significative de la masse graisseuse chez les souris transplantées a été observée alors que leur prise alimentaire ne diffère pas de celui du groupe contrôle (Turnbaugh et al., 2006). La *Figure 7* récapitule les principaux acteurs et voies de signalisation impliquées dans l'homéostasie énergétique.



*Figure 7 : Acteurs et voies de signalisation impliqués dans le maintien de l'homéostasie énergétique.* NTS : noyau du tractus solitaire ; ARC : noyau arqué ; PVN : noyau paraventriculaire ; LHA : aire hypothalamique latérale ; NRY : neuropeptide Y ; AgRP : Agouti-Related Peptide ; POMC : proopiomelanocortin ; CART : cocaine- and amphetamine-regulated transcript ; TRH : thyrotropin-releasing hormone ; OXY : ocytocine ; CRH : corticotropin-releasing hormone ; MCH : melanin-concentrating hormone. Les voies anorexigènes sont représentées en rouge, les voies orexigènes en vert.

# 2.2 Rôle du système nerveux central dans l'homéostasie énergétique

Le système nerveux central occupe un rôle essentiel dans la coordination et l'intégration des signaux impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Il se compose de différentes structures cérébrales présentées *Figure 8*.



*Figure 8* : *Schéma des structures cérébrales du système nerveux central* Image : Servier Medical Art

Certaines structures jouent un rôle prépondérant dans le processus d'homéostasie énergétique. L'hypothalamus et le noyau du tractus solitaire seront plus particulièrement abordés.

# 2.2.1 L'hypothalamus et son rôle dans l'homéostasie énergétique

L'hypothalamus, situé sous le thalamus dans le SNC (*Figure 8*) est constitué d'un ensemble de noyaux spécifiques et représente un centre intégrateur neuroendocrine pour de nombreuses fonctions homéostatiques comme le sommeil, la thermorégulation, la faim et la soif entre autres. L'implication de l'hypothalamus dans la régulation de l'homéostasie énergétique et plus particulièrement dans la régulation de la prise alimentaire a été mise en évidence dans les années 1940. Hetherington et Ranson ont pu observer que des lésions de la partie ventromédiane de l'hypothalamus augmentaient significativement la prise alimentaire alors que celles localisées dans la partie ventrolatérale la supprimaient. Ceci a été également observé dans les années 50 par Anand et Brobeck (Anand and Brobeck, 1951). Les principales régions de l'hypothalamus impliquées dans l'homéostasie énergétique sont le noyau arqué (ARC), les noyaux paraventriculaire (PVN) et ventromédian (VMH) hypothalamiques, le noyau hypothalamique dorsomédian (DMH) et l'aire latérale hypothalamique (LHA) (Williams et al., 2000) et sont représentées *Figure 9*.



Figure 9 : Les principaux noyaux hypothalamiques.

Le noyau arqué de l'hypothalamus occupe un rôle prépondérant dans le contrôle de la prise alimentaire. Composé d'un ensemble de neurones adjacent au plancher du troisième ventricule, deux grandes populations antagonistes de neuropeptides impliqués dans la prise alimentaire y sont sécrétées (*Figure 7*) :

- Les neuropeptides à action **orexigène** (qui stimule la prise alimentaire) : le neuropeptide Y (NPY) et la protéine AgRP (*agouti-related protein*)
- Les neuropeptides à action anorexigène (qui diminue la prise alimentaire) : l'α-MSH (α-Melanocyte Stimulating Hormone), une mélanocortine issue du clivage spécifique de la pro-opiomélanocortine (POMC) au niveau de l'hypothalamus, la protéine CART (Cocaine Amphetamine Regulated Transcript)

La mise en évidence de l'action de ces neuropeptides a été principalement réalisée par des expériences d'ablation ou d'injections centrales, la plupart ayant été référencées dans la revue établie par Waterson et Horvath focalisée sur la régulation neuronale de l'homéostasie énergétique (Waterson and Horvath, 2015). Stanley *et al.* ont démontré qu'une injection centrale du NPY chez le rat réduit le stockage de la masse graisseuse, particulièrement lorsque l'injection est localisée sur le PVN où les récepteurs NPY sont largement exprimés (Stanley et al., 1986). Le neuropeptide AgRP agit principalement par antagonisme d'effet avec l' $\alpha$ -MSH avec laquelle il est en compétition pour le récepteur MC-4. Des infusions centrales chroniques du neuropeptide CART ont induit une baisse de masse corporelle ainsi qu'une diminution de la prise alimentaire chez des rats sains et Zucker obèses (Larsen et al., 2000). Vicentic et Jones ont recensé à travers une revue tous les rôles connus du neuropeptide CART. Ils ont démontré que ce neuropeptide peut agir sur la dépense énergétique mais également sur la

PHA : aire hypothalamique postérieure ; DMH : noyau hypothalamique dorsomédian ; VMH : noyau hypothalamique vendromédian ; ARC : noyau arqué ; PO : noyau pré-optique ; AHA : aire antérieure hypothalamique ; PVN : noyau paraventriculaire ; LHA : aire latérale hypothalamique (Image : Servier Medical Art).

vidange gastrique et l'ingestion d'aliments. Son action se poursuit au-delà de la prise alimentaire comme médiateur des effets postprandiaux des cholécystokinines (Vicentic and Jones, 2007). L' $\alpha$ -MSH est fortement impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire notamment par activation des récepteurs MC-3 et MC-4, ceci ayant été mis en évidence chez des souris déficientes du récepteur MC-4 souffrant d'hyperphagie et d'obésité (Huszar et al., 1997). Les neurones POMC peuvent également être inhibés par l'action antagoniste du neuropeptide AgRP agissant au niveau des récepteurs MC-3 et MC-4 (Woods et al., 1998). De plus, les neurones NPY/AgRP sécrètent de l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique (GABA) et inhibent ainsi l'activité des neurones POMC en activant le récepteur GABA (Wu et al., 2009).

# 2.2.2 Intégration des signaux périphériques par l'hypothalamus

La proximité de l'ARC avec le troisième ventricule lui permet d'être en contact avec une zone plus perméable de la barrière hémato-encéphalique et par conséquent plus sensible aux signaux métaboliques circulants impliqués dans l'homéostasie énergétique telles que les hormones et les nutriments. Ainsi, les hormones impliquées dans la régulation à long terme de la prise alimentaire telles que l'insuline, la ghréline et la leptine agissent au niveau de l'hypothalamus pour induire leurs effets orexigènes (ghréline) et anorexigènes (leptine et insuline). Leur action est plus précisément localisée au niveau des récepteurs exprimés par les neurones POMC/CART, NPY/AgRP de l'ARC (Roh et al., 2016). La plupart des effets observés a été étudiée chez les rongeurs. La ghréline, hormone de la faim produite au niveau de l'estomac, stimule les neurones exprimant NPY, AgRP et oréxine alors qu'elle exerce un effet inhibiteur des neurones POMC et CRH. L'action de la ghréline au niveau de l'ARC est par ailleurs médiée par le noyau du tractus solitaire (NTS) par l'intermédiaire de la voie afférente vagale, partie dorso-médiane du bulbe rachidien décrite dans le paragraphe 2.2.4 (Nakazato et al., 2001). La leptine, synthétisée par les adipocytes, exerce les effets inverses stimulant l'expression des neuropeptides anorexigènes (POMC) et inhibant celle des neuropeptides orexigènes (NPY/AgRP) afin de freiner la prise alimentaire et d'induire le sentiment de satiété. (Klok et al., 2007). L'insuline, hormone d'origine pancréatique et impliquée dans la régulation de la glycémie, peut également agir au niveau des neurones cérébraux pour induire une baisse de la prise alimentaire et de masse corporelle. Une injection centrale d'insuline diminue l'expression du gène NPY dans l'ARC chez des rats diabétiques et hyperphagiques (Morton and Schwartz, 2001). Découverte avant la leptine, plusieurs chercheurs attribuaient déjà à cette hormone la capacité à refléter la quantité de masse graisseuse : présence de récepteurs à l'insuline dans l'hypothalamus, variation de

l'insuline en fonction de la quantité de graisses stockée ou encore une réponse dosedépendante de la baisse de la prise alimentaire et de la masse corporelle en réponse à une injection directe d'insuline dans le SNC (Roh et al., 2016). La leptine et l'insuline sont donc souvent qualifiées de signaux adipeux permettant de renseigner l'organisme au niveau central sur l'état nutritionnel et qui partagent des propriétés semblables en stimulant les voies cataboliques centrales et en inhibant les voies anaboliques (Woods et al., 1998). Ainsi, l'action de ces signaux adipeux est souvent qualifiée de rétroaction négative ou *adiposity negative feedback.* Les critères définissant ce type de signal sont multiples : les concentrations circulantes du signal doivent être proportionnelles à la masse du tissu adipeux, le signal doit stimuler une perte de poids en agissant sur les voies neuronales impliquées dans l'homéostasie énergétique et l'inhibition de ces mêmes voies doit provoquer une augmentation de la prise alimentaire et de la masse corporelle. Seules la leptine et l'insuline répondent à chacun de ces critères (Figlewicz, 2003; Morton et al., 2006). L'ensemble des voies activées par la leptine et l'insuline au niveau de l'hypothalamus est représenté dans la *Figure 10*.



*Figure 10* : *Circuits neuronaux activés par la leptine et l'insuline au sein de l'hypothalamus* ARC : noyau arqué, PVN : noyau paraventriculaire, NTS : noyau du tractus solitaire, LHA : aire latérale hypothalamique, 3V : troisième ventricule (d'après Morton at al., 2006).

# 2.2.3 Autres régions de l'hypothalamus impliquées dans l'homéostasie énergétique

Les neurones présents dans l'ARC sont appelés de premier ordre et se projettent dans d'autres régions hypothalamiques où les neurones sont dits de deuxième ordre (Figure 7). Le PVN contient de nombreuses voies neuronales impliquées dans l'homéostasie énergétique comme la projection des neurones issus de l'ARC, notamment ceux exprimant NPY/AgRP et POMC/CART. Les neurones présents dans le PVN sécrètent des neuropeptides à action anorexigène comme les neuropeptides CRH (Corticotropin-releasing hormone) et TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone) et l'ocytocine, la vasopressine et la somatostatine. Une injection centrale de TRH ou CRH chez des rats provoque une baisse de la prise alimentaire (Valassi et al., 2008). Les neurones du PVN contrôlent également la réponse efférente sympathique vers les organes métaboliques périphériques se traduisant par une lipolyse et une oxydation des acides gras (Foster et al., 2010). La LHA présente des neurones sécrétant les oréxines et la MCH (Melanin Contrating Hormone). Elle est considérée comme le centre de la prise alimentaire car sa destruction conduit à une baisse de poids et à une anorexie. Les parties terminales des neurones NPY/AgRP et POMC sont en contact avec les neurones des oréxines et de la MCH et sont à l'origine d'interactions complexes (Williams et al., 2000). Enfin, le DMN contient de nombreuses terminaisons des neurones exprimant NPY et a-MSH provenant de l'ARC et est également impliqué dans la prise alimentaire (Bellinger and Bernardis, 2002).

Les peptides exprimés dans l'hypothalamus et impliqués dans la régulation de la prise alimentaire sont regroupés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1**) :

Prise alimentaire	
Stimulation	Diminution
Neuropeptide Y (NPY)	Pro-opio mélanocortine (POMC), α-MH
Agouti Related Peptide (AgRP)	Corticotrophin-Releasing Hormone (CRH)
Oréxines	Cocaine Amphetamine Regulated Transcript (CART)
Melanin-Concentrating Hormone (MCH)	Thyrotropin Releasing Hormone (TRH)
Galanine	Ocytocine
β-endorphine	Néfastine
Endocannabinoïdes	

**Tableau 1**: Neuromédiateurs hypothalamiques impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique

Enfin, de récentes études ont mis en évidence l'importance des endocannabinoïdes dans la stimulation de la voie anabolique (orexigène) en stimulant la prise alimentaire par les récepteurs CB1. Bien que peu exprimés dans l'hypothalamus, leur activation engendre des effets significatifs dans la communication entre l'hypothalamus et les organes périphériques (Cristino et al., 2014). L'activation des neurones POMC *via* la stimulation du récepteur CB1 engendre une libération de  $\beta$ -endorphine qui induit la prise alimentaire (Koch et al., 2015), montrant ainsi que la stricte compartimentation des neurones (orexigène/anorexigène) peut être modulable (Waterson and Horvath, 2015).

# 2.2.4 Le noyau du tractus solitaire (NTS) et son implication dans l'homéostasie énergétique

Le noyau du tractus solitaire (NTS) constitue le principal point d'entrée du nerf vague (X) dans le SNC. Situé dans la partie dorso-médiane du bulbe rachidien (Figure 8), il reçoit les afférences provenant de la sphère orosensorielle (palais, larynx) et des branches hépatique et cœliaque (Norgren and Smith, 1988). Le NTS intègre les signaux périphériques provenant du tractus GI. Ce dernier étant densément innervé par le nerf vague, les voies afférentes vagales sont activées par des mécanorécepteurs et des chimiorécepteurs en réponse à la distension gastrique, aux hormones intestinales et à la circulation de nutriments suite à la prise alimentaire (Sobrino Crespo et al., 2014). À titre d'exemple, les récepteurs µ-opioïdes (MOR), présents au niveau de la veine porte entérale, participent à la détection de di-peptides exogènes ayant franchi la barrière intestinale et relayent l'information au NTS via le nerf vague (De Vadder et al., 2013a). Les projections neuronales provenant du NTS envoient les signaux vers l'hypothalamus et le cortex de manière directe ou indirecte relayés par le noyau parabrachial et le locus cœruleus. Des neurones catécholaminergiques semblent être impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. L'intégration de ces signaux se fait au niveau de l'hypothalamus et les réponses efférentes partent via le NDM vers le tractus GI (Berthoud, 2008).

# 2.3 <u>Rôle du système périphérique dans l'homéostasie énergétique</u>

Le système nerveux central reçoit des informations en provenance du système périphérique le renseignant sur l'état nutritionnel et l'adiposité de l'organisme. En fonction des besoins de ce dernier, la réponse générée visera à promouvoir ou à terminer la prise alimentaire. Tous les signaux envoyés au cerveau en vue de diminuer et arrêter la prise alimentaire du repas en cours (court terme) font référence à la satiation alors que la satiété désigne littéralement les

évènements postprandiaux ayant lieu jusqu'au prochain repas caractérisant une absence de faim ou d'appétit (long terme) (Wilde, 2009). Un abus de langage est donc communément fait en parlant des signaux de la satiété désignant les signaux émanant du tractus GI en réponse à la présence de nutriments (Cummings and Overduin, 2007). Les signaux de satiation sont de nature neuronale et hormonale et se répartissent en deux catégories :

- les signaux impliqués dans la **régulation à court terme** : générés pendant la période postprandiale, ils visent à induire le sentiment de satiété et diminuer la prise alimentaire afin d'empêcher la surconsommation d'aliments. Ces signaux proviennent du tractus GI et sont majoritairement représentés par les hormones intestinales et la distension gastrique. Les signaux sensoriels liés aux propriétés organoleptiques de l'aliment agissent avant et pendant la phase d'ingestion de l'aliment et peuvent favoriser ou diminuer la prise alimentaire selon la palatabilité de l'aliment et l'adaptation anticipatoire (expérience antérieure associant un aliment à une valeur affective),
- les signaux impliqués dans la régulation à long terme : ils permettent de maintenir un poids corporel stable sur le long terme malgré les variations quotidiennes de la balance énergétique. Ils sont représentés par la leptine et l'insuline dont l'action s'effectue au niveau de l'hypothalamus (2.2.1). La ghréline, hormone orexigène, participe également à la régulation sur le long terme et son action sur l'hypothalamus est médiée directement (présence de récepteurs à la ghréline sur les neurones de l'ARC) et indirectement par le NTS (2.2.4).

# 2.3.1 Les signaux de régulation à court terme

# 2.3.1.1 La distension gastrique

L'estomac est innervé par des nerfs afférents vagaux et des nerfs splanchniques appartenant au système nerveux autonome. Des études sur des rats dont le pylore (extrémité de sortie de l'estomac) était réversiblement ligaturé ont démontré que l'estomac était lui-même source de signaux de satiation. Le phénomène de distension gastrique, lié à la présence du bolus alimentaire, active des mécanorécepteurs présents dans les couches musculaires extérieures relayant l'information au cerveau par les nerfs vagaux (Cummings and Overduin, 2007). Plusieurs expériences menées sur des rats ont prouvé que la suppression de la prise alimentaire était dose-dépendante avec le volume de solution saline injectée et que le volume du bolus avait plus d'influence sur la prise alimentaire que le contenu nutritionnel (Phillips and Powley, 1996). Puis, il a été démontré que le nerf vague fonctionnait comme médiateur de la distension gastrique et que la réponse à la charge gastrique dépendait de la densité et de l'origine des terminaisons nerveuses (Phillips and Powley, 1998). L'implication particulière de la branche hépatique a également été mise en évidence dans ce phénomène (Powley and Phillips, 2004). Enfin, ces mêmes auteurs ont distingué deux grands types de mécanorécepteurs : les IGLE (*intraganglionic laminar ending*) détectant la tension musculaire et les IMA (*intramuscular array*) détectant l'élasticité ou la distension (Phillips and Powley, 2000). L'estomac peut également sentir le contenu nutritionnel du bolus mais les mécanismes impliqués n'interviennent pas dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Ils seront toutefois décrits dans la partie dédiée à la digestion GI.

# 2.3.1.2 Les sécrétions hormonales du tractus GI et du pancréas

# a. Généralités sur les cellules entéroendocrines

Comme l'ont affirmé Powley et Phillips, les régulations de la satiété par l'estomac sont d'origine mécanique alors que ceux issus de l'intestin sont plutôt d'origine nutritionnelle (Powley and Phillips, 2004). L'intestin, dont la physiologie a été décrite de manière plus approfondie dans la section 1.2.3, doit son titre de plus grand organe endocrine du corps grâce à la présence de cellules entéroendocrines (CEE) qui sécrètent une grande variété d'hormones intestinales en réponse à la présence de nutriments dans le tractus. Une douzaine de CEE sont connues à ce jour qui sécrète au total plus d'une vingtaine d'hormones gastro-intestinales. Bien que ne représentant qu'1 % de toute la population cellulaire intestinale, elles constituent ainsi le premier niveau d'intégration de l'information nutritionnelle luminale relayée au cerveau par l'intermédiaire des hormones intestinales (Sternini et al., 2008). L'ensemble des CEE abordées dans cette synthèse a été récapitulé dans la *Figure 11*.



*Figure 11* : *Principales populations de cellules entéroendocrines présentes au niveau du tractus GI* Image modifiée sous accord d'après Latorre et al., 2016

Elles sont issues de la différentiation de cellules pluripotentes venant de la crypte intestinale. Selon leur morphologie et leur localisation dans la muqueuse gastrique et intestinale, deux types cellulaires sont distingués : les cellules de type ouvertes ou *open type* dont le prolongement apical sous forme de microvillosités est en contact direct avec le lumen et les cellules de type fermé ou *closed type*, enfouies plus profondément dans la muqueuse à proximité de la membrane basale. Ces dernières détectent le contenu luminal de manière indirecte par voie nerveuse ou hormonale. Les CEE présentes au niveau de la partie sécrétrice de l'estomac n'ont aucun contact avec la lumière et intègrent les signaux paracrine, endocrine et neuroendocrine. Ceci est notablement le cas pour les cellules D, les cellules *X/A-like* et les cellules *enterochromaffin-like* (Dockray, 2010). Les deux types cellulaires accumulent les hormones dans des granules cytoplasmiques qui sont excrétées au niveau basolatéral de la cellule en réponse à des stimuli chimiques, mécaniques ou nerveux (Latorre et al., 2016). Le

postulat « une cellule-une hormone » a également été remis en question puisqu'un même type cellulaire n'est pas cantonné à la sécrétion d'une seule hormone : c'est notamment le cas de la cellule L qui sécrète les hormones GLP-1, GLP-2, PYY dont les rôles physiologiques seront décrits plus bas (2.3.1.2.).

Plus récemment, la découverte de nombreux récepteurs sensoriels dont certains appartiennent à la famille des récepteurs du goût a permis de mettre en avant le rôle clé joué par les CEE dans le mécanisme de chimiodétection (*chemosensing*) intervenant dans le processus de régulation de l'homéostasie énergétique (Furness et al., 2013). À ce jour, ce sont principalement des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui ont été mis en évidence en lien avec la sécrétion des hormones GI : on peut notamment citer les récepteurs à l'amertume T1R1/T1R3, sensibles aux acides aminés L, dont le lien avec la prise alimentaire n'est pas encore complètement établi, les récepteurs aux acides gras FFAR1 et GPR120 sensibles aux acides gras à chaîne moyenne et courte, le récepteur Umami sensible au L-glutamate et le récepteur au sucré T1R2/T1R3 sensible aux monosaccharides et aux acides aminés D sucrés comme les édulcorants (Rasoamanana et al., 2012, Janssen and Depoortere, 2013). Les récepteurs impliqués dans la détection des acides aminés libres et des peptides ont été décrits plus spécifiquement dans la partie consacrée aux rôles des peptides bioactifs dans la régulation de l'homéostasie énergétique (partie 3.3.).

L'ensemble des hormones sécrétées par les CEE et impliquées dans la digestion GI et la régulation de l'homéostasie énergétique a été récapitulée *Figure 12*.



*Figure 12* : Le tractus GI et ses sécrétions hormonales impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

CCK : cholécystokinines ; GIP : Glucose-dependent insulinotropic peptide ; GLP-1 et 2 ; Glucagon-Like Peptides 1 et 2 ; PYY : Peptide YY ; PP : polypeptide-fold.

# b. Les cholécystokinines (CCK)

Les cholécystokinines (CCK) ont été les premières hormones intestinales identifiées dans la régulation de la prise alimentaire. Originellement, elles ont été découvertes en 1928 par Ivy et Oldberg lors d'expériences menées sur le chien : l'ingestion d'extraits intestinaux favorisait la sécrétion de la vésicule biliaire. Ce n'est qu'en 1973 que l'équipe du Pr. Gibbs découvrit l'action des CCK sur la régulation de la prise alimentaire. Les CCK dérivent d'un précurseur de 115 acides aminés, la pré-pro-cholécystokinine qui subit différents clivages sélectifs donnant lieu à plusieurs formes bioactives.

$$\begin{array}{c} \mathsf{HSO}_{3} \\ \mathsf{-} \mathsf{Asp} - \mathsf{Tyr} - \mathsf{Met} - \mathsf{Gly} - \mathsf{Trp} - \mathsf{Met} - \mathsf{Asp} - \mathsf{Phe} - \mathsf{NH}_{2} \end{array}$$

Figure 13 : Partie C-terminale des CCK

La partie C-terminale du peptide, représentée *Figure 13*, lui confère son activité biologique liée à un enchainement de 7 acides aminés et tout particulièrement à la présence d'une tyrosine O-sulfatée (Rehfeld, 1981). Cette propriété structurelle est également partagée par la gastrine, ce qui a donné lieu à de nombreuses réactions croisées lors du développement de méthodes de dosages des CCK par radioimmunologie, sachant que la gastrine circulante est présente à des concentrations jusqu'à 100 fois supérieures à celles des CCK (Liddle, 1997). L'octapeptide CCK-8, constitué de la partie C-terminale active, est admis comme étant le peptide le plus actif qui a été isolé à ce jour mais il ne peut cependant pas passer la barrière hémato-encéphalique. Le peptide CCK-58 est la forme la plus répandue dans l'organisme, principalement au niveau du cerveau. Cependant, Overduin *et al.* ont récemment démontré que la CCK-58 était capable de stimuler la satiété et la satiation chez le rat alors que la CCK-8 (Overduin et al., 2014). Les formes peptidiques CCK-39, CCK-12, CCK-33 et CCK-22 ont été recensées comme les formes majoritairement circulantes dans l'organisme (*Figure 14*).



Figure 14 : Les différentes CCK générées à partie de la pré-pro-CCK

Les CCK sont sécrétées par les cellules I principalement présentes au niveau du duodénum et du jéjunum (Figure 11) dont les principaux stimuli sont les lipides et les protéines. En termes de récepteurs sensoriels, les cellules I expriment le récepteur FFAR1 sensible aux acides gras à courte et moyenne chaîne ainsi que le Calcium Sensing Receptor (CaSR), membre de la famille C des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG), sensible aux acides aminés aromatiques de type L (Janssen and Depoortere, 2013) et le récepteur GPR93 sensible aux peptones (Choi et al., 2007a). Des facteurs endogènes sécrétés suite à l'ingestion des aliments ont également un potentiel stimulateur de la sécrétion des CCK comme le Luminal CCK-Releasing Factor (LCRF). Le LCRF est sécrété au niveau de la muqueuse intestinale en réponse à la présence luminale de nutriments et stimule la sécrétion de CCK en agissant sur des canaux Ca<sup>2+</sup> de type L (Wang et al., 2002). Deux types de récepteur aux CCK sont connus à ce jour : le CCK1-R (anciennement CCK A pour alimentary) principalement exprimé au niveau du tractus GI, mais également présent au niveau du tronc cérébral ainsi que dans le noyau dorsomédian de l'hypothalamus et le CCK2-R (anciennement CCK B pour brain) principalement exprimé au niveau du cerveau. La sécrétion de CCK apparait rapidement après la prise alimentaire et sa concentration plasmatique peut rester élevée jusqu'à 5 heures après la fin du repas (Chaudhri et al., 2008). Les principaux effets directs des CCK sont la stimulation des sécrétions pancréatiques, la contraction de la vésicule biliaire, le ralentissement de la vidange gastrique, la relaxation du sphincter d'Oddi, actions principalement médiées par les nerfs afférents vagaux exprimant le CCK1-R (Reidelberger et al., 2003c). Ces effets visent à optimiser la digestion des lipides et des protéines dans l'intestin (Dockray, 2009). Les CCK exercent également une action sur la diminution de la prise alimentaire, principalement médiée par le CCK1-R périphérique au niveau des voies afférentes vagales, en réponse à la présence de nutriments et relayée au niveau du NTS (Reidelberger et al., 2003a). Néanmoins, quelques expériences menées avec des antagonistes de CCK1-R sur des rats et des humains ont soulevé l'importance du rôle du CCK1-R cérébral dans le contrôle de la prise alimentaire (Ritter, 2004). L'activité anorexigène des CCK pourrait s'exprimer par la stimulation des neurones POMC de l'hypothalamus. En effet, les CCK sont co-exprimées avec l'ocytocine dans le noyau supraoptique de l'hypothalamus et pourraient y jouer un rôle sur la prise alimentaire (Millington, 2007). Une action potentielle des CCK sur la stimulation de la production/sécrétion de CART a été démontrée sur des neurones afférents vagaux cultivés et sur des rats (de Lartigue et al., 2010). La sérotonine (5-HT) a également été suggérée comme médiateur de la sensation de satiété générée par les CCK et impliquant le récepteur 5-HT3 (Hayes and Covasa, 2005). L'activation du CCK2-R par les CCK stimule les processus d'apprentissage et de mémoire, les sécrétions pancréatiques exocrines et d'acide gastrique et la croissance de la muqueuse gastrique. Elle n'est *a priori* pas impliquée dans la régulation de la prise alimentaire (Staljanssens et al., 2011). Enfin, les CCK sont également impliquées dans la stimulation de la sécrétion d'insuline et agissent comme un facteur de croissance des cellules pancréatiques  $\beta$  ainsi que comme agent anti-apoptotique (Irwin and Flatt, 2013).

# c. La famille des peptides polypeptide-fold (PP)

Cette famille est constituée du neuropeptide Y et de deux peptides issus du système pancréatique endocrine : le peptide YY (PYY) et le PP pancréatique. Les peptides de cette famille ont tous une longueur de 36 acides aminés et subissent une amidation en C-terminal qui leur confère l'activité biologique. Ils sont constitués d'une structure secondaire comprenant une hélice proline de type II et une hélice  $\alpha$  liée à un coude  $\beta$ , caractéristiques de la famille des PP. Chez l'humain, quatre récepteurs appartenant à la famille des RCPG sont connus Y1, Y2, Y4 et Y5, chacun étant capable de se lier au moins à deux des trois peptides PP (Berglund et al., 2003).

### • Le Polypeptide-fold pancréatique

Le PP pancréatique est principalement synthétisé par les cellules F situées à la périphérie des îlots pancréatiques de Langerhans mais il est également synthétisé dans le pancréas exocrine et à moindre niveau, au niveau du côlon et du rectum. Les concentrations circulantes du PP pancréatique sont basses en phase préprandiale et augmentent en phase postprandiale, proportionnellement à la charge calorique ingérée. Elles restent élevées jusqu'à 6 heures après le repas (Hameed et al., 2009). La sécrétion du PP pancréatique est également sujette à un rythme circadien avec un accroissement progressif de sa concentration jusqu'à 21 h et une baisse jusqu'à 2 h du matin. Les effets principaux du PP pancréatique sur le tractus GI sont la stimulation de la motilité GI, de la contraction de la vésicule biliaire et de la sécrétion d'acide gastrique. Une administration centrale du PP pancréatique augmente la prise alimentaire et la vidange gastrique. À l'inverse, une injection périphérique du PP pancréatique génère une baisse de la prise alimentaire et un sentiment de satiété chez les sujets sains et obèses, qui perdurent dans le temps (Huda et al., 2006). Le PP pancréatique peut également avoir un effet inhibiteur sur la vidange gastrique. Le PP pancréatique a démontré une forte affinité pour le récepteur Y4 associée à une diminution de la prise alimentaire, effet annulé chez des souris dépourvues du récepteur Y4. Ce récepteur est situé dans l'hypothalamus et plus précisément

dans l'ARC et dans le tronc cérébral. Cependant, la voie de signalisation activant le récepteur Y4 et aboutissant à une régulation de la prise alimentaire et de la masse corporelle reste encore partiellement élucidée (Perry and Wang, 2012). Une affinité modérée pour le récepteur Y5 a également été démontrée avec l'implication du récepteur Y5 dans la stimulation de la prise alimentaire générée par le PP sécrété au niveau du SNC (Kanatani et al., 2000). Néanmoins, une étude clinique menée sur des sujets obèses et réalisée avec un antagoniste du récepteur Y5, n'a révélé aucune perte de poids significative, concluant que l'utilisation seule d'un antagoniste sélectif du récepteur ne constituait pas une approche viable dans une stratégie thérapeutique anti-obésité (Erondu et al., 2006). Le rôle physiologique de ce peptide reste donc encore partiellement connu.

# • Le peptide YY (PYY<sub>3-36</sub>)

Le PYY doit son nom à la présence de résidus de tyrosine aux extrémités N- et C-terminal de la chaine peptidique. Il est synthétisé par les cellules L situées dans la partie distale de l'intestin (Figure 11) et est sécrété en réponse à la prise alimentaire proportionnellement à la charge calorique. Il est sécrété sous forme de PYY<sub>1-36</sub> et est rapidement tronqué au niveau Nterminal par la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) en PYY<sub>3-36</sub>, sa forme circulante la plus abondante. Tous les nutriments semblent agir sur la sécrétion de PYY<sub>3-36</sub>. La concentration plasmatique de PYY<sub>3-36</sub> augmente dès 15 min suivant la prise alimentaire, bien avant que les nutriments aient eu le temps d'arriver à l'intestin distal, et perdure jusqu'à 6 h après l'ingestion. Des mécanismes neuronaux ou hormonaux sont donc impliqués dans la sécrétion de PYY<sub>3-36</sub> relayés par la détection directe des nutriments et par la détection des nutriments au niveau du duodénum (Moran and Dailey, 2009). Les principaux effets du PYY<sub>3-36</sub> sur le tractus GI sont un retard de la vidange gastrique et une inhibition de la vidange de la vésicule biliaire probablement médiée par le nerf vague (Kazanjian et al., 2003). Ainsi, PYY<sub>3-36</sub> serait impliqué dans l'effet ileal brake, une boucle de régulation exercée par l'iléon en présence de nutriments qui conduit à l'inhibition de la motilité des parties intestinales proximales et de leurs sécrétions pendant la digestion (Maljaars et al., 2008). Le PYY se lie avec tous les récepteurs Y mais le PYY<sub>3-36</sub> exerce une grande affinité pour le récepteur Y2. Ses effets satiétogènes sont encore débattus et il convient de distinguer les observations faites suite à des injections périphériques de PYY<sub>3-36</sub> de celles faites suite à des injections directes au niveau du SNC. Une injection périphérique de PYY<sub>3-36</sub> a induit une baisse significative de la prise alimentaire aussi bien chez les rongeurs que chez des humains (Batterham et al., 2004), effets qui seraient médiés par le récepteur Y2 au niveau de l'ARC aboutissant à une inhibition des neuropeptides orexigènes NPY/AgRP et une augmentation de l' $\alpha$ -MSH (Batterham and Bloom, 2003). Le récepteur Y2 est également exprimé dans le NTS et PYY<sub>3-36</sub> pourrait inhiber la prise alimentaire en stimulant le nerf vague et donc par extension exciter les neurones anorexigènes POMC (Valassi et al., 2008). Une concentration très basse de PYY<sub>3-36</sub> a été observée chez des sujets humains obèses ne présentant pour autant aucune résistance à PYY<sub>3-36</sub>. Une injection périphérique a conduit à une réduction comparable de l'apport calorique ingéré chez des sujets humains sains et obèses (Batterham et al., 2003). En injection centrale, PYY<sub>3-36</sub> a montré à la fois des effets orexigènes et anorexigènes suivant le sujet (rat, humain) et la localisation précise de l'injection (ARC, PVN, fluide cérébrospinal). *A priori*, les actions de PYY et PYY<sub>3-36</sub>, injectés centralement, seraient médiées par les récepteurs Y1 et Y5 et mènerait à un effet orexigène. Les effets anorexigènes observés seraient quant à eux liés au récepteur Y2 au niveau dde l'ARC (Huda et al., 2006). Toutefois, le peptide PYY<sub>3-36</sub> reste une cible potentielle encourageante dans le traitement de l'obésité (Chaudhri et al., 2008).

# d. La famille des incrétines

Le terme incrétine désigne la capacité d'une hormone à stimuler la sécrétion d'insuline suite à une ingestion orale de glucose atteignant des concentrations supérieures à celles induites par une injection intraveineuse de glucose. Ce terme fut inventé en 1932 par le professeur La Barre à partir des termes **sécrétine**, enzyme sécrétée par les muqueuses duodénales stimulant les sécrétions pancréatiques et **ingestion**, phénomène à la suite duquel les hormones sont sécrétées (La Barre, 1932). La première hormone incrétine fut découverte dans les années 70 et fut nommée *gastric inhibitory polypeptide* (GIP) de par sa capacité à stimuler la sécrétion d'acide gastrique. La deuxième hormone fut identifiée grâce à des expériences de clonage du gène proglucagon et nommée Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1). Les incrétines jouent un rôle clé dans la sécrétion d'insuline : il a été estimé que l'action des incrétines sur la sécrétion d'insuline représentait entre 70 et 80 % de la réponse insulinémique observée suite à une administration orale de glucose (Ahmadieh and Azar, 2014). Le devenir des incrétines est toutefois fortement modulé par l'activité de la DPP-IV.

• Le Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP)

Renommé *Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide* au lieu de *Gastric Inhibitory Polypeptide* suite à la découverte de son action incrétine, le GIP est un polypeptide de 42 résidus d'acides aminés synthétisé par les cellules K localisées au niveau du duodénum et du jéjunum (Figure 11). Il a également été localisé au niveau du SNC où il jouerait un rôle dans le contrôle de la survie cellulaire. Le principal stimulus de la sécrétion de GIP est l'ingestion de nutriments : les concentrations de GIP circulantes augmentent quelques minutes après la prise alimentaire, suggérant ainsi l'implication de voies nerveuses et/ou hormonales dans la sécrétion de GIP (Drucker, 2006). Plus précisément, le glucose est un des meilleurs stimulants de la sécrétion de GIP et agit, entre autres, au niveau du corécepteur sodium glucose (SGLT). Le récepteur du goût T1R1/T1R3, membre de la famille des RCPG, ainsi que la gustducine α, localisés dans les cellules K, seraient potentiellement impliqués dans l'une des voies activées suite à la détection de glucose (Ezcurra et al., 2013). L'action incrétine du GIP se fait via l'activation de récepteurs de type RCPG exprimés directement par les cellules  $\beta$ pancréatiques. Outre sa capacité à stimuler la sécrétion d'insuline, le GIP stimule la transcription du gène codant pour la proinsuline et sa traduction. Il est également impliqué dans la stimulation de la croissance, la différentiation, la prolifération et la survie des cellules  $\beta$ . Le récepteur du GIP est présent sous deux isoformes et est exprimé dans les cellules  $\beta$ pancréatiques, le tissu adipeux, le cœur et le cerveau. Le GIP exerce également des effets extra-pancréatiques, toujours en relation avec la baisse de la glycémie, en agissant sur la production de glucose hépatique ou au niveau des adipocytes pour augmenter la synthèse des acides gras et stimuler le transport du glucose (Gault et al., 2003). Une fois sécrété, il est dégradé en quelques minutes par l'action protéolytique de l'enzyme DPP-IV en GIP<sub>3-42</sub> (forme inactive) au niveau du résidu d'alanine, en avant-dernière position du côté N-terminal.

• Le Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1)

Le GLP-1 est un des produits du proglucagon, lui-même produit à partir de la prohormone préproglucagon. Le proglucagon, peptide de 160 acides aminés, est synthétisé au niveau des cellules  $\alpha$  des ilots pancréatiques, dans les cellules L de l'intestin et dans le SNC. Sous l'action des enzymes prohormones convertase 1 et 2 (PC1 et PC2) et selon la spécificité du tissu, le proglucagon est clivé en plusieurs fragments bioactifs (*Figure 15*).



Figure 15 : Les produits issus du clivage du proglucagon

Le numéro correspond au numéro de l'acide aminé auquel le clivage se produit. GLP-1 et GLP-2 : Glucagon-Like Peptide 1 et 2 ; GRPP : glicentin-related polypeptide ; IP-1 et IP-2 : intervening peptides 1 et 2. Inspiré de Chaudhri et al. (2006).

Au niveau du cerveau et de l'intestin, les Glucagon-Like Peptides 1 et 2 (GLP-1 et GLP-2), l'oxyntomoduline, la glycentine sont générés sous l'action de la PC. Le GLP-1 est un peptide de 36 ou 37 acides aminés, selon la présence ou non du résidu de glycine au niveau C-terminal, dont aucune des deux formes n'est active. Un second clivage au niveau N-terminal est nécessaire pour conférer au GLP-1 ses propriétés biologiques. Deux formes actives sont distinguées : le GLP-1 (7-36) pourvu d'un groupement amide et le GLP-1 (7-37), qui seront regroupées sous le terme générique GLP-1 dans le manuscrit. Ces deux formes sont dégradées sous l'action de la DPP-IV due à la présence d'un résidu d'alanine en position P1 en N-terminal comme le GIP (Heijboer et al., 2011).

L'ingestion de nutriments, en particulier les glucides et les lipides, est le principal stimulus à l'origine de la sécrétion de GLP-1. La détection des glucides est en partie réalisée par des récepteurs sensoriels au niveau des cellules L qui sont impliqués dans les voies de stimulation de la sécrétion du GLP-1. Les principaux récepteurs connus à ce jour sont les canaux potassium sensibles à l'ATP ( $K_{ATP}$ ), le cotransporteur sodium glucose (SGLT) et plusieurs récepteurs du goût mis en évidence par l'identification du récepteur sensible au sucré T1R2/T1R3 ou des protéines G comme la gustducine  $\alpha$ , impliquée dans les voies de
signalisation du goût (Diakogiannaki et al., 2012). La détection de lipides au niveau des cellules L est assurée par des récepteurs de la famille des RCPG comme GPR120, GPR119, GPR40 (FFAR1). Ces récepteurs répondent principalement à des acides gras libres à moyenne et courte chaines en activant une voie de signalisation impliquant une sécrétion d'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) calcium dépendante aboutissant à la sécrétion de GLP-1 (Ezcurra et al., 2013). Le récepteur au GLP-1 (GLP-1R), membre de la famille des RCPG, est composé de 463 acides aminés et est très largement distribué dans les organes périphériques (poumons, cœur, intestin, reins, îlots pancréatiques) et dans le SNC, notamment au niveau de l'hypothalamus, zone contrôlant la satiété. Outre son action incrétine précédemment évoquée, le GLP-1 exerce de nombreuses actions, sur différents organes, dont plusieurs interviennent dans la régulation de la prise alimentaire et justifient son rôle anorexigène. Au niveau de l'estomac, il induit un ralentissement de la vidange gastrique et de la stimulation de la sécrétion d'acide gastrique. À ce titre, le GLP-1 est considéré comme un des médiateurs clés dans le phénomène d'ileal brake, précédemment décrit. Outre le fait qu'il stimule la sécrétion d'insuline au niveau du pancréas, il inhibe la sécrétion du glucagon et favorise une augmentation du nombre des cellules β. Il exerce également plusieurs effets au niveau du système cardio-vasculaire, favorise la néoglucogenèse hépatique et améliore la sensibilité à l'insuline des muscles (Burcelin et al., 2013). La concentration plasmatique de GLP-1 augmente dans les 15 premières minutes de la digestion suggérant ainsi l'implication d'une boucle proximo-distale où la détection des nutriments réalisée dans la partie supérieure de l'intestin serait relayée à la partie distale par un contrôle neuronal et hormonal : le GIP serait le principal médiateur de cette boucle en agissant sur des fibres cholinergiques du nerf vague. Un neuropeptide, le gastrin releasing peptide (GRP), ferait également partie de la boucle de régulation (Lim and Brubaker, 2006). Des cellules L localisées en quantité suffisante dans le duodénum participeraient à cette voie de signalisation (Tolhurst et al., 2009). Un deuxième pic de GLP-1 survient environ 90 à 120 minutes après la prise alimentaire suite au contact des nutriments avec les cellules L localisées dans les parties plus distales de l'intestin (iléon et côlon). Les concentrations plasmatiques de GLP-1 peuvent rester relativement élevées après l'arrêt de la prise alimentaire. Cependant, tout comme le GIP, le GLP-1 est rapidement dégradé par l'action de la DPP-IV en un peptide tronqué inactif (GLP-19-36), le clivage s'effectuant au niveau du résidu d'alanine situé en positon P1 du côté N-terminal. Son temps de demi-vie est estimé entre 2 et 5 minutes. Enfin, le GLP-1 est également dégradé, dans une moindre mesure, par plusieurs endopeptidases et aminopeptidases présentes au niveau du foie ou des poumons (João et al., 2016).

#### e. Autres hormones intestinales dérivant du préproglucagon

Le clivage du proglucagon et de ses produits ont été représentés sur la Figure 15.

• L'oxyntomoduline

Hormone dérivée de la glicentine et elle-même provenant du préproglucagon libérée par l'action de la PC1/3, l'oxyntomoduline est constituée de 37 acides aminés dont les 29 premiers sont communs avec le glucagon. Elle est co-sécrétée avec le GLP-1 par les cellules L suite à la prise alimentaire et également en concentrations proportionnelles à la charge calorique ingérée. Ses effets physiologiques visent à réduire la motilité et la sécrétion gastrique chez l'homme et les rongeurs. Le rôle de l'oxyntomoduline dans la régulation de la prise alimentaire a été mis en évidence par des injections centrales et périphériques qui provoquaient une baisse de la prise alimentaire, stimulaient le sentiment de satiété ainsi que la dépense énergétique chez les rongeurs et chez l'homme (Perry and Wang, 2012). L'oxyntomoduline est également impliquée dans le métabolisme du glucose grâce à des propriétés glycogénolytiques mises en évidence dans des foies de souris perfusés (Pocai, 2014). Bien que ses mécanismes d'action restent encore partiellement à élucider, l'oxyntomoduline a été identifiée comme étant un agoniste du GLP-1R dont l'activation est à l'origine des effets anorexigènes. Cette hormone est également un agoniste du récepteur du glucagon dont la liaison au récepteur serait à l'origine de son effet stimulateur de la dépense énergétique. L'oxyntomoduline est dégradée sous l'action de la DPP-IV lui conférant une demi-vie comprise entre 6 et 7 minutes (Troke et al., 2014). Son potentiel en tant qu'incrétine est plus faible que le GLP-1 mais elle exerce un effet notable sur la diminution du poids qui serait en lien avec une augmentation de la dépense énergétique (Wren and Bloom, 2007).

# • Le Glucagon-Like Peptide 2 (GLP-2)

Le GLP-2 est un autre produit dérivé du proglucagon et est co-sécrété avec le GLP-1, la glicentine et l'oxyntomoduline par les cellules L colorectales (*Figure 11*). Composé de 33 acides aminés, il possède également un résidu d'alanine en avant-dernière position le rendant donc substrat de la DPP-IV. Si une administration centrale de GLP-2 induit une baisse de la prise alimentaire, ses principales actions physiologiques sont plutôt tournées vers la stimulation de la croissance des cellules de la muqueuse intestinale, l'amélioration de l'absorption intestinale et l'augmentation de la densité osseuse (Sinclair and Drucker, 2005). Le récepteur GLP-2 (GLP-2R) est localisé au niveau de l'intestin et de l'hypothalamus (Brubaker and Anini, 2003).

# f. L'amyline

L'amyline est une hormone peptidique co-sécrétée avec l'insuline de façon postprandiale par les cellules  $\beta$  pancréatiques. Elle fait partie de la famille des protéines *calcitonin-like* et possède 37 résidus. Elle inhibe la vidange gastrique, la sécrétion d'acide gastrique et de glucagon (Cummings and Overduin, 2007). Injectée au niveau périphérique ou central chez le rat, elle induit une baisse de la prise alimentaire par une diminution de la taille du repas ingéré et une régulation de la prise alimentaire (Moran and Dailey, 2009). Contrairement aux autres hormones peptidiques, elle agirait principalement au niveau de l'*area postrema* et son action serait indépendante du nerf vague.

# g. La somatostatine

La somatostatine est sécrétée par les cellules D localisées au niveau de l'estomac, de l'intestin grêle et du pancréas endocrine (*Figure 11*). La somatostatine sécrétée par les cellules D de type ouvert inhibe la sécrétion d'acide gastrique en inhibant la production et de la sécrétion de gastrine (Latorre et al., 2016). Ses actions visent principalement des sécrétions exocrines pancréatiques (Egerod et al., 2012). Son rôle physiologique dans la régulation de la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique est à l'heure actuelle très peu étudié.

h. Les hormones peptidiques de satiété spécifiques aux lipides

• L'apolipoprotéine A-IV (APO AIV)

L'APO AIV est une glycoprotéine synthétisée par les cellules intestinales du jéjunum en réponse à l'ingestion de lipides et à la formation de chylomicrons. Elle est également présente au niveau de l'ARC. Elle inhibe la sécrétion gastrique et la motilité intestinale. Une administration périphérique d'APO AIV provoque une baisse de la prise alimentaire chez les rats mais son rôle reste encore à déterminer. Cependant, elle pourrait représenter un lien entre les régulations à court terme et à long terme du métabolisme lipidique (Chaudhri et al., 2008).

• L'entérostatine

L'entérostatine est un pentapeptide issu du clivage trypsique de la procolipase. Cette dernière est sécrétée en réponse à l'ingestion de lipides par le pancréas exocrine. Elle a également été retrouvée dans certaines zones du cerveau en relation avec la satiété et dans l'intestin. Des injections périphériques et centrales d'entérostatine ont induit une baisse significative de la prise alimentaire (notamment de lipides) chez les rongeurs. Le nerf vague serait impliqué dans la voie de signalisation activée vers le NTS (Bray, 2000). À ce jour, aucun effet sur la prise

alimentaire, la dépense énergétique ou le poids corporel n'a été observé suite à une administration d'entérostatine chez l'homme (Cummings and Overduin, 2007).

i. Autres hormones peptidiques gastro-intestinales

Certaines hormones intestinales sont sécrétées par les CEE et favorisent la digestion GI (*Figure 11*). Cependant, leur action dans la régulation de la prise alimentaire n'a pas été clairement mise en évidence à ce jour et reste encore à confirmer. La gastrine, la sécrétine et la motiline peuvent entre autres être citées. La gastrine est sécrétée par les cellules G de l'estomac et stimule la sécrétion d'acide gastrique. La sécrétine est synthétisée par les cellules S de l'intestin proximal et stimule la sécrétion de bicarbonate afin de réduire l'acidité dans l'intestin. La motiline, quant à elle, est sécrétée par les cellules M de la partie supérieure du duodénum. Elle stimule la contraction de la vésicule biliaire et les sécrétions enzymatiques dans l'estomac et le pancréas (Furness et al., 2013).

# 2.3.1.3 La dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV)

La DPP-IV est une aminopeptidase stricte de 766 acides aminés qui clive son substrat au niveau de l'avant-dernière liaison peptidique côté N-terminal et libère un dipeptide. Elle coupe préférentiellement au niveau d'un résidu de proline ou d'alanine en avant dernière position. La présence de L-sérine, L-glycine, L-valine ou L-leucine sur le substrat a pour conséquence une plus faible affinité de l'enzyme pour son substrat. La présence d'un résidu de L-proline ou L-hydroxyproline en troisième position inactive totalement la DPP-IV (Engel et al., 2006). Les spécificités de clivage de la DPP-IV ont été schématisées *Figure 16*.



*Figure 16* : *Spécificité de clivage de la DPP-IV* Schéma inspiré d'après Power et al., 2013

L'enzyme est présente dans l'organisme sous une forme transmembranaire (l'interaction avec le substrat se faisant donc avec la partie extracellulaire de l'enzyme) et une forme soluble. Elle est exprimée dans de nombreux organes comme le rein, les poumons, le foie, et l'intestin, et par de nombreux types cellulaires comme les lymphocytes et les cellules endothéliales. Elle possède de très nombreux substrats comme les hormones gastro-intestinales (GLP-1, GLP-2, PYY, GIP) mais également des neuropeptides, des cytokinines et des chémokinines (Drucker and Nauck, 2006). La forme transmembranaire est une glycoprotéine dimérique dont chacune des sous-unités (110 kDa) est accrochée à la membrane plasmique par une hélice hydrophobe du côté N-terminal. Le domaine extracellulaire de chaque monomère se compose d'un domaine hydrolase  $\alpha/\beta$ , d'un domaine  $\beta$ -propeller et d'un site actif compris entre les deux (Chung et al., 2010) qui contient une région glycosylée, une région riche en résidus de cystéine et un domaine catalytique C-terminal (Mentlein, 1999). La forme transmembranaire de la DPP-IV a été représentée **Figure 17**.



**Figure 17** : Représentation de la DPP-IV transmembranaire Le domaine  $\beta$ -propeller est représenté en noir et le domaine hydrolase  $\alpha/\beta$  en noir du côté extracellulaire. D'après Chung et al., 2010.

Le site catalytique de l'enzyme s'étend entre les résidus Gln509 et Pro766 et est situé dans une poche hydrophobe S1. Il est caractérisé par l'enchaînement des résidus Trp-Ser-Tyr constituant la triade catalytique (Chung et al., 2010). Un pont disulfure entre la Cys649 et la Cys762 permet de stabiliser la structure tertiaire du site. L'accès au substrat est limité par la présence d'une structure  $\beta$ -propeller : soit le substrat passe par le tunnel de la structure  $\beta$ propeller, soit il emprunte une ouverture placée sur le côté du site entre les feuillets I et II (Engel et al., 2003). La poche S1 du site catalytique, étroite et lipophile, accepte les résidus proline ainsi que les résidus non chargés comme la sérine ou l'alanine en position P1 (Rummey et al., 2006). Les résidus Tyr 662, Tyr666, Phe357 et Arg125 présents dans la poche S1 participent à l'interaction avec le substrat (Nongonierma et al., 2014). La DPP-IV est également exprimée à la surface des lymphocytes T (connue sous l'acronyme CD26) et joue un rôle important dans le système immunitaire en interagissant avec des antigènes membranaires (Idris and Donnelly, 2007).

#### 2.3.2 Les signaux de régulation à long terme

Les actions principales de ces signaux hormonaux dans la régulation de l'homéostasie énergétique ont été reportées dans la *Figure 7*.

# 2.3.2.1 La ghréline

La ghréline dérive de l'hormone prépro-ghréline constituée de 117 acides aminés. Le peptide mature en contient 28 suite à une acylation post-traductionnelle sur le résidu de sérine en position 3 (N-terminal). La ghréline est sécrétée par les cellules A/X-like au niveau de la muqueuse stomacale mais elle a été identifiée dans d'autres tissus périphériques comme le tractus GI et le pancréas (Figure 11). Au niveau cérébral, des neurones sécrétant la ghréline ont été identifiés dans l'ARC, le troisième ventricule et l'hypophyse. La ghréline se lie avec le récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance GHS-R (Growth Hormone Secretagogue-Receptor) présent dans l'hypophyse, dans différentes zones de l'hypothalamus mais également dans le tractus GI, les ovaires et les testicules. La ghréline agit à court terme sur la régulation de la prise alimentaire en exerçant un effet orexigène. Les voies d'action proposées sont triples: 1) elle agirait directement sur ses récepteurs au niveau de l'hypothalamus après passage de la barrière hémato-encéphalique, 2) elle stimulerait le nerf vague et l'information serait relayée par le NTS, 3) elle serait produite localement dans l'hypothalamus. Au niveau de l'ARC, la ghréline exerce un effet inhibiteur sur les neurones POMC et stimulateur des neurones NPY, AgRP. (Klok et al., 2007). Administrée en périphérie ou centralement, elle provoque une prise de poids et une augmentation de la prise alimentaire chez les rongeurs et les humains. Elle est également la seule hormone GI à initier la prise alimentaire : les concentrations plasmatiques de ghréline augmentent pendant la période préprandiale et diminuent pendant la période postprandiale. De plus, les concentrations basales ont montré des fluctuations diurnes influencées par l'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle, les hormones de croissance, l'insuline et le glucose. Outre son rôle dans la régulation à court terme, la ghréline pourrait également jouer un rôle dans la régulation à long terme de l'homéostasie énergétique. Il a été démontré que les concentrations circulantes de ghréline étaient négativement corrélées avec l'indice de masse corporelle : elles augmentent chez un sujet obèse alors qu'elles diminuent chez un sujet anorexique (Moran and Dailey, 2009).

# 2.3.2.2 La leptine

La leptine, protéine de 166 acides aminés, est essentiellement exprimée dans le tissu adipeux humain. Elle a également été détectée en faibles quantités dans l'estomac, le placenta et le cœur. Le récepteur de la leptine OBR est fortement exprimé dans le cerveau, notamment au niveau de l'hypothalamus mais également dans le placenta, l'estomac et le système vasculaire. La leptine est une hormone clé dans la régulation à long terme de l'homéostasie (Figure 7). Les concentrations circulantes de leptine sont proportionnelles à la masse graisseuse corporelle reflétant ainsi le stock d'énergie disponible. Sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique lui permet de renseigner le cerveau sur l'état des réserves énergétiques. Chez les humains et les rongeurs, la leptine augmente la dépense énergétique et diminue la prise alimentaire. Des administrations périphériques ou centrales de leptine ont montré une baisse de la prise alimentaire et du poids des rongeurs. Au niveau central, la leptine peut influencer l'expression de divers neuropeptides orexigènes et anorexigènes comme évoqué précédemment par la *Figure 10* (Perry and Wang, 2012). Plus récemment, il a été démontré que la leptine semblait également jouer un rôle en tant que signal à court terme de la régulation de la prise alimentaire. Étant synthétisée en faible quantité dans certains tissus périphériques, elle pourrait coopérer avec des peptides satiétogènes pour le contrôle de la taille du repas. Par exemple, les récepteurs de l'insuline et de la leptine sont exprimés par les cellules L et leur activation aboutit à une augmentation de la sécrétion de GLP-1 (Klok et al., 2007). Une faible concentration circulante de leptine provoquée, après plusieurs jours de restriction, peut limiter l'effet satiétogène des CCK menant à une prise alimentaire plus importante afin de restaurer la balance énergétique (Graaf et al., 2004).

# 2.3.2.3 L'insuline

L'insuline est plus souvent connue pour son rôle dans la régulation de la glycémie. Produite par les cellules  $\beta$  du pancréas endocrine, l'insuline est sécrétée en réponse à une élévation de la glycémie (par exemple, après un repas) qu'elle stabilise en supprimant la production de glucose hépatique et en stimulant l'utilisation de glucose par les tissus périphériques. Toutefois, l'insuline est également un signal à long terme de la régulation de l'homéostasie énergétique (*Figure 7*). Les concentrations plasmatiques d'insuline sont corrélées avec la masse graisseuse corporelle et l'insuline peut agir directement au niveau de l'hypothalamus en franchissant la barrière hémato-encéphalique (Könner et al., 2009). Bien que moins puissante que la leptine, l'insuline peut également exercer des effets suppresseurs sur la prise alimentaire, effets amoindris chez des sujets obèses. Enfin, il existe un dialogue entre leptine et insuline puisque qu'elles partagent des cibles communes au niveau de l'hypothalamus, ainsi que des voies de signalisation (*Figure 10*) et elles régulent leur expression l'une l'autre. L'insulino-résistance est un symptôme clé des syndromes d'obésité et de diabète de type 2 (Graaf et al., 2004; Perry and Wang, 2012).

# 2.4 Les dysfonctionnements de l'homéostasie énergétique

# 2.4.1 Généralités

Bien que notre organisme ait mis en place des systèmes de régulation ingénieux et complexes pour maintenir un équilibre stable entre apport et dépense énergétique, plusieurs facteurs (génétiques, environnementaux) peuvent engendrer une dérégulation durable de l'équilibre du système se traduisant par des troubles alimentaires. L'équilibre de cette balance peut se déplacer soit en faveur d'un apport supérieur à la dépense qui peut être à l'origine du surpoids pouvant évoluer en obésité. Dans le cas où la dépense est supérieure à l'apport, un état de jeûne prolongé s'installe et l'organisme peut atteindre une maigreur extrême. L'augmentation exponentielle des cas de surpoids et d'obésité dans le monde ne cesse d'alerter les politiques sur les conséquences personnelles, sociétales et économiques de ce problème de santé publique (Hedley et al., 2004). L'obésité et le surpoids sont des facteurs de risques importants propices au développement de maladies cardio-vasculaires, du diabète de type 2 et de mort prématurée. Le diabète de type 2 est une maladie multifactorielle se caractérisant par une glycémie dérégulée (production de glucose hépatique excessive et réduction du captage de glucose) liée à une diminution de l'insulinosécrétion et de l'insulinosensibilité des cellules pancréatiques  $\beta$ . Le maintien d'un état hyperglycémique engendre des perturbations à long terme au niveau du pancréas mais aussi du foie, du cerveau et du tissu adipeux (Guillausseau et al., 2008). En 2014, cette maladie concernait 422 millions d'individus dans le monde et a engendré 1,5 millions de décès (WHO, 2016). Bien que l'obésité puisse être traitée avec une modification des habitudes alimentaires et de l'activité physique, cette stratégie perdure rarement sur le long terme chez les individus concernés (Field et al., 2012). De plus, l'origine de ce déséquilibre métabolique ne réside probablement pas uniquement dans quelques défaillances ponctuelles de notre organisme mais peut-être également dans le fait que notre

système de régulation est incapable de faire face à un mode de vie sédentaire couplé à une alimentation quotidienne riche en calories (Murphy and Bloom, 2006). Si les problèmes concernant l'anorexie touchent un nombre plus restreint de personnes, la perte d'appétit et de poids chez les personnes âgées ou les patients en chimiothérapie est devenue un problème récurrent auquel de nouvelles stratégies de traitement cherchent à apporter une réponse. Ainsi, il est apparu nécessaire pour la communauté scientifique de comprendre les mécanismes de régulation de l'appétit et plus globalement, de l'homéostasie énergétique. Les hormones intestinales sont entre autres devenues une des nouvelles cibles thérapeutiques pour lutter contre l'obésité et le diabète de type 2.

#### 2.4.2 Les hormones intestinales : nouvelle cible thérapeutique

Le rôle clé des hormones intestinales dans la régulation de l'homéostasie énergétique a été mis en avant suite aux résultats prometteurs de la chirurgie bariatrique sur des patients atteints d'obésité morbide. Cette technique consistait initialement à réduire l'absorption de calories en modifiant l'anatomie du tractus GI. Le *Roux-en-Y gastric bypass* est une technique opératoire visant à court-circuiter l'estomac en amenant le bol alimentaire directement en contact avec l'intestin grêle. Si la baisse de poids et d'appétit durable observée était initialement attribuée à la restriction du volume gastrique et à la malabsorption des nutriments, de nombreuses études ont éclairci le rôle central joué par les hormones intestinales et par conséquent, leur potentiel thérapeutique (Neary and Batterham, 2009; Batterham and Cummings, 2016).

Une des approches les plus courantes consiste à administrer des analogues de ces récepteurs des hormones intestinales. Cependant, ces molécules pharmacologiques sont souvent sensibles à l'activité protéolytique des enzymes circulantes et peuvent générer des effets secondaires. Ainsi, un analogue des CCK a été conçu afin d'améliorer sa résistance à la dégradation enzymatique tout en conservant ses propriétés satiétogènes. Issu d'une modification en N-terminal, le (pGlu-Gln)-CCK-8, est actuellement en phase de développement et a montré des résultats encourageants comme molécule anti-obésité : aucun phénomène d'accoutumance, des effets bénéfiques durables sur la réduction de la prise alimentaire et un possible effet protecteur des cellules pancréatiques  $\beta$  (Irwin et al., 2012). Des analogues pharmacologiques des incrétines, et plus principalement du GLP-1, ont déjà fait l'objet de développement dans le cadre du diabète de type 2 et plus récemment, de l'obésité. En effet, l'action insulinotropique du GLP-1 est préservée chez les sujets atteints de diabète de type 2 (contrairement au GIP) et plusieurs expériences ont montré l'implication du

GLP-1 dans une perte de poids. Ainsi, des analogues de GLP-1 et des inhibiteurs de la DPP-IV sont actuellement administrés dans le cadre du traitement du diabète de type 2. Début 2015, 5 analogues du GLP-1 étaient légalement commercialisables selon les institutions de santé publique américaines et européennes : exénatide, lixisénatide, liraglutide, dulaglutide et albiglutide (Finan et al., 2015). En effet, comme précédemment décrite, l'action de la DPP-IV module fortement l'action du GLP-1 d'où la conception d'inhibiteurs de la DPP-IV ont été conçus dans le cadre du traitement du diabète de type 2. Les molécules les plus connues appartiennent à la famille des gliptines comme la vildaglipitine ou la sitagliptine. Les inhibiteurs de la DPP-IV provoquent moins d'effets secondaires que les analogues du GLP-1 (nausée) mais ces derniers ont un effet plus significatif sur la perte de poids (Drucker and Nauck, 2006). D'autres hormones intestinales comme le peptide YY ou l'amyline sont considérées comme de nouvelles cibles prometteuses mais aucune molécule analogue n'a été à l'heure actuelle testée en phase clinique. Enfin, une nouvelle approche visant à combiner les effets de plusieurs hormones GI émerge progressivement. Des injections simultanées de plusieurs hormones ont démontré une action synergique sur la perte de poids : c'est notamment le cas du peptide YY et de l'oxyntomoduline qui, administrés centralement, ont montré une baisse de prise alimentaire non constatée lors de l'administration séparée de chacune d'entre elles (Troke et al., 2014). Plusieurs combinaisons alliant des agonistes de GLP-1R avec les récepteurs de l'amyline, le GIP, l'oxyntomoduline voire des triples combinaisons telles que GLP-1/GIP/glucagon ont démontré une réelle efficacité sur le contrôle du poids et le diabète de type 2 (Finan et al., 2015). Dans la même optique, des polyagonistes sont en cours de développement se fondant sur la similitude structurale de plusieurs récepteurs comme les récepteurs du glucagon, du GIP et du GLP-1 (Tschöp et al., 2016).

Plus récemment encore, une nouvelle cible thérapeutique dans le cadre de la régulation de l'homéostasie énergétique vise les récepteurs sensoriels du tractus GI (Reimann and Gribble, 2015). Il est désormais admis que le tractus GI est plus qu'un simple enchainement d'actions mécaniques et biochimiques servant à dégrader les aliments ingérés et à fournir à l'organisme de l'énergie sous forme de nutriments. L'intestin en particulier est équipé de récepteurs sensoriels qui activent quatre systèmes effecteurs principaux : le système entéroendocrine, le système nerveux, le système immunitaire intestinal et le système de défense non-immunitaire. Cet équipement lui permet d'apprécier le contenu alimentaire et nutritionnel du chyme ainsi que les potentiels contaminants. Ces récepteurs sensoriels sont localisés au niveau des CEE,

des neurones sensoriels, du microbiote intestinal et des mécanismes de défense non immunitaires (Furness et al., 2013). Les CEE sont équipées d'une multitude de récepteurs sensoriels leur permettant de détecter la présence de glucides, lipides et protides dans le lumen et, après activation, de sécréter les hormones intestinales. De récents travaux de recherche menés sur des lignées de CEE ont ainsi prouvé que la plupart de ces récepteurs appartenaient à la famille des RCPG incluant les récepteurs des goûts sucré, amer et umami ainsi que des récepteurs sensibles aux acides gras, aux acides aminés libres et aux hydrolysats protéiques (Raybould, 2010).

# 2.4.3 Implication du microbiote dans la régulation de l'homéostasie énergétique

Le microbiote intestinal joue certainement plus d'un rôle métabolique au sein de notre organisme. Influencé par une diversité de facteurs comme l'usage d'antibiotiques, la génétique interindividuelle ou des facteurs immunologiques, le microbiote peut également être modulé par l'alimentation et participe activement à la régulation de l'homéostasie énergétique. Les fibres alimentaires sont la principale source d'énergie pour la population microbienne peuplant le côlon. Dégradées par fermentation, elles génèrent une grande variété d'acides gras à chaine courte dont les trois majoritaires sont le butyrate, l'acétate et le propionate utilisés comme nutriments au niveau du côlon distal mais qui peuvent également influencer l'homéostasie énergétique et les mécanismes de stockage énergétique (Guillon and Champ, 2000). Il existe une très forte relation entre le régime alimentaire et le microbiote intestinal, pouvant avoir des conséquences sur la santé de l'hôte. Ainsi, une dérégulation du microbiote intestinal ou dysbiose serait impliquée dans de nombreuses pathologies dont l'obésité (Turnbaugh et al., 2006; Scarpellini et al., 2010; Guinane and Cotter, 2013). Toutefois, une récente étude menée par Reijnders et al. démontre qu'une perturbation du microbiote sur le court terme (utilisation d'antibiotiques) n'est pas suffisante pour modifier son intégrité et avoir des conséquences notables sur la régulation de l'homéostasie énergétique (Reijnders et al., 2016).

### 2.5 Conclusion

L'homéostasie énergétique est un système intégré de signaux hormonaux, nerveux et environnementaux qui, en réponse au statut nutritionnel de notre organisme, vise à assurer le maintien d'une masse corporelle stable sur le long terme. Les défaillances de ce système touchent actuellement un nombre croissant de personnes à travers le monde, aussi bien dans les pays occidentaux que dans les pays en voie de développement, et peuvent conduire à de nombreuses pathologies (diabète de type 2, maladies cardio-vasculaires, hypertension). Dans ce contexte, de nouvelles stratégies thérapeutiques ont été mises en œuvre, principalement centrées sur la lutte contre le surpoids et l'obésité, et ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur les mécanismes régulant l'homéostasie énergétique et tout particulièrement, la régulation de la prise alimentaire. Les hormones intestinales sont devenues une des cibles principales, grâce à leur rôle anorexigène, dans la lutte contre l'obésité et les pathologies associées. Ainsi, plusieurs approches pharmacologiques sont actuellement en cours d'étude et l'une d'entre elles repose sur les récepteurs sensoriels des CEE qui, stimulés par la présence sélective de nutriments dans le lumen, initient les mécanismes conduisant à la sécrétion des hormones intestinales. La spécificité des interactions nutriment-récepteur et l'activation des voies de signalisation cellulaire restent encore partiellement établies, notamment pour les acides aminés libres et les oligopeptides. Enfin, le rôle indéniable du microbiote intestinal reste encore à explorer.

# **3** Peptides biactifs issus de de protéines alimentaires et régulation de l'homéostasie énergétique

#### 3.1 <u>Rappel biochimique sur les peptides</u>

Les peptides dérivés des protéines alimentaires sont formés par des L-acides aminés liés les uns aux autre grâce à une liaison amide -C=O-NH résultant de la réaction entre une extrémité  $-NH_2$  et une extrémité COOH<sup>-</sup> de deux acides aminés adjacents (*Figure 18*).



*Figure 18 : Représentation schématique d'un peptide* Rx chaîne latérale de l'acide aminé n. La liaison peptidique est indiquée en rouge.

Il existe une vingtaine d'acides aminés pouvant composer les peptides dérivés des protéines alimentaires aux propriétés physico-chimiques et nutritionnelles différentes. La taille d'un peptide commence à 2 résidus d'acides aminés (dipeptide) et le terme d'oligopeptide est attribué lorsque la chaîne comporte 10 résidus ou moins. Au-dessus, on parle de polypeptide. La limite entre polypeptide et protéine n'est toutefois pas toujours claire : il est généralement admis qu'une chaîne polypeptidique au-dessus de 10 kDa est appelée protéine. Elle est surtout caractérisée par une structure secondaire, tertiaire et parfois quaternaire ce qui n'est pas toujours communément admis pour les peptides. Les peptides possèdent tous au moins une fonction acide (carboxyle) et une fonction basique (amine) et sont caractérisés par une ou plusieurs constantes de dissociation et un point isoélectrique dépendants de leur composition en acides aminés. Les peptides sont donc des entités chimiques capables de réagir avec le milieu environnant (Belitz et al., 2009).

## 3.2 <u>Généralités sur les peptides bioactifs</u>

Au-delà de leur rôle nutritionnel, les protéines alimentaires sont une source pertinente de peptides bioactifs, c'est-à-dire des fragments peptidiques encryptés dans la protéine native qui exercent leur activité biologique une fois libérés. Un peptide est considéré comme bioactif si son action influence positivement des fonctions ou conditions physiologiques aboutissant à une amélioration de la santé (Kitts and Weiler, 2003). La libération de ces fragments actifs peut se faire soit par l'action des enzymes digestives, des enzymes extraites de plantes ou de microorganismes, ou soit par fermentation bactérienne (Korhonen and Pihlanto, 2006). La taille des peptides bioactifs est généralement comprise entre 2 et 20 résidus d'acides aminés mais certaines séquences contenant plus de 20 résidus ont été identifiées (Ryan et al., 2011). Le profil de la population peptidique et son potentiel bioactif dépendent de la source protéique initiale, des enzymes et des conditions expérimentales (Alice B Nongonierma et al., 2016). Plusieurs facteurs comme la présence d'autres macronutriments ou l'application de procédés agro-alimentaires peuvent influencer les populations peptidiques générées (Kopf-Bolanz et al., 2014). Les champs d'action des peptides recensés à ce jour sont extrêmement larges et variés. Les activités biologiques peptidiques peuvent agir au niveau des systèmes cardiovasculaire, inflammatoire, nerveux, osseux, immunitaire, digestif et énergétique, tout en sachant qu'un même peptide peut exercer plusieurs activités (Erdmann et al., 2008; Moughan et al., 2014; Patil et al., 2015). À ce jour, plus de 3000 séquences peptidiques bioactives sont recensées dans la base de données BIOPEP couvrant une quarantaine d'activités biologiques. L'activité opioïde fut la première découverte suivie de l'activité immunomodulatrice (Sharma et al., 2011). Actuellement, les activités les plus représentées dans les banques de données de peptides bioactifs concernent l'inhibition de l'ECA, les activités antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et opioïde (Hartmann and Meisel, 2007). Les nombreuses

séquences recensées ont démontré leurs activités *in vitro* mais seulement un faible pourcentage d'entre elles a été testé *in vivo*. À l'inverse, les études *in vivo* sont souvent menées avec des hydrolysats protéiques complexes et, le ou les peptide(s) impliqués dans les effets observés ne sont pas toujours identifiés (Möller et al., 2008). Le peptide bioactif, ingéré par voie orale ou libéré suite à la digestion GI de la protéine, doit traverser le tube digestif et parfois la barrière intestinale avant d'exercer son action sur l'organe cible. Si la digestion GI peut être simulée, de nombreuses études ne prennent pas en compte les peptidases de la bordure en brosse, ni les peptidases cytosoliques pouvant compromettre l'intégrité du peptide et donc son activité biologique (Wada and Lönnerdal, 2015).



*Figure 19* : Evolution du nombre de documents scientifiques publiés sur le thème des peptides bioactifs depuis 1980 jusqu'à 2015

Comme en témoigne l'explosion des revues et des études scientifiques au cours de ces vingt dernières années (*Figure 19*), les peptides bioactifs ont connu un véritable engouement car ils représentent un potentiel commercial considérable pour le marché des aliments fonctionnels et des médicaments. En effet, le développement et la mise sur le marché d'une nouvelle molécule pharmaceutique est souvent longue, coûteuse et son administration s'accompagne fréquemment d'effets secondaires indésirables. Étant présents de manière endogène sous diverses formes (hormones et neuropeptides entre autres), les peptides sont généralement bien tolérés et rapidement éliminés par l'organisme. Malgré leur temps de demi-vie court et leur instabilité, les peptides dérivés des protéines alimentaires représentent une nouvelle opportunité pour le secteur pharmaceutique (Agyei and Danquah, 2011). Le marché des aliments fonctionnels connaît également une forte croissance liée à la prise de conscience des

consommateurs de l'impact de leur régime alimentaire sur leur santé. L'augmentation exponentielle du nombre de maladies liées à un régime alimentaire déséquilibré telles que le syndrome d'obésité et les maladies associées comme l'hypertension et le diabète de type 2 a favorisé la demande pour des aliments permettant d'apporter, en plus de leur fonction nutritionnelle, un bénéfice santé (Pang et al., 2012). Toutefois, les réglementations mondiales et notamment européennes demandent de plus en plus de preuves au sujet de l'origine du potentiel bioactif et de son efficacité sur la santé humaine (Hartmann and Meisel, 2007).

#### 3.3 Digestion GI des protéines alimentaires et régulation de l'homéostasie énergétique

La propagation des cas d'obésité dans le monde a amené les scientifiques à rechercher de nouvelles stratégies curatives. Elles doivent permettre une baisse de poids, en particulier de la masse grasse, et à maintenir un poids stable sur le long terme en générant la sensation de satiété en dépit d'un faible apport calorique (Westerterp-Plantenga et al., 2012). Les protéines alimentaires ont un pouvoir de satiété plus important que les glucides et les lipides consommés à calories égales (Bensaïd et al., 2002). Cependant, ce pouvoir n'est pas toujours équivalent entre toutes les sources protéiques (Hall et al., 2003). Les propriétés satiétogènes des protéines proviennent de leurs actions sur plusieurs paramètres physiologiques comme la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales, l'augmentation de la dépense énergétique, les concentrations circulantes d'acides aminés et la stimulation de la néoglucogenèse (Westerterp-Plantenga, 2008). Dans le cadre du traitement de l'obésité et du diabète de type 2, l'ingestion de certaines sources protéiques a montré des effets positifs sur la baisse de la glycémie, la sécrétion d'insuline et la perte de masse grasse (Layman et al., 2003; Jakubowicz and Froy, 2013). Comme évoqué dans le paragraphe précédent, le processus de digestion GI des protéines alimentaires est capable de libérer des peptides bioactifs dont les concentrations, souvent difficilement quantifiables, peuvent avoir un effet physiologique significatif (Moughan et al., 2014). L'origine des effets bénéfiques des protéines alimentaires sur la régulation de l'homéostasie énergétique reste partiellement élucidée mais est à l'heure actuelle imputée à la composition en acides aminés (Westerterp-Plantenga et al., 2012). Les peptides dérivés des protéines laitières (caséines et protéines du lactosérum) ont été les mieux caractérisés et ont démontré plusieurs actions biologiques variées aboutissant à la régulation de la glycémie (Horner et al., 2016). Toutefois, les déterminants précis de leurs effets physiologiques restent encore à définir.

Au cours de cette synthèse bibliographique, il a été choisi de se focaliser sur tous les peptides bioactifs, libérés par digestion GI ou non, en relation avec la sécrétion des hormones intestinales CCK et GLP-1, et en relation avec l'inhibition de l'activité de la DPP-IV. L'interaction des peptides avec les récepteurs opioïdes est également résumée ici.

#### 3.3.1 Peptides bioactifs et régulation de la sécrétion des CCK

Comme décrit dans la partie 2.3.1.2b, les CCK peuvent agir à différents niveaux sur la prise alimentaire comme le ralentissement de la vidange gastrique, la stimulation des sécrétions pancréatiques ou la réduction de la prise alimentaire. Plusieurs études in vivo menées sur l'homme ou le rat ont effectivement démontré que l'ingestion de protéines ou d'hydrolysats protéiques stimulait la sécrétion des CCK corrélée avec un ralentissement de la vidange gastrique (Shi et al., 1997; Nishi et al., 2003b), une inhibition de l'activité protéasique intraluminale (Liddle et al., 1986) ou une baisse de la prise alimentaire (Brennan et al., 2012). Le processus de digestion GI est un déterminant clé de l'effet satiétogène des protéines : il conduit à la libération séquentielle de peptides qui sont les principaux stimuli de la sécrétion des CCK. Les acides aminés libres, pourtant libérés lors de la digestion, semblent exercer un effet stimulateur moindre. Sharara et al. ont suggéré que les protéines digérées stimulaient la sécrétion postprandiale des CCK chez le rat alors qu'une ingestion d'acides aminés n'avait eu aucun effet significatif, tout en soulignant que la stimulation de la sécrétion des CCK par les peptides se faisait de manière indirecte (Sharara et al., 1993). L'ingestion de protéines de soja ou de caséines intactes par des rats a provoqué un retard dans la diminution de la prise alimentaire observée comparée à celle induite par les hydrolysats protéiques respectifs, lié à la génération plus lente des premiers peptides bioactifs par le processus de digestion GI des protéines natives (Pupovac and Anderson, 2002). Parallèlement aux études in vivo, de nombreuses études in vitro menées avec la lignée entéroendocrine STC-1 ont confirmé cet effet « peptide » sur la stimulation de la sécrétion des CCK par l'utilisation d'hydrolysats ou de peptones issus de sources protéiques animales (lait, poulet, porc, bœuf, poisson, blanc d'œuf) et végétales (pois, soja, blé) et ce, en les comparant à un mélange d'acides aminés libres équivalents. En effet, des mélange d'acides aminés représentant la composition d'hydrolysats de soja (Nishi et al., 2001), de merlan bleu (Cudennec et al., 2012), de crevettes (Cudennec et al., 2008) ou de peptones d'origine animale (Cordier-Bussat et al., 1997) avaient des effets bien moins significatifs sur la stimulation de la sécrétion des CCK que leurs hydrolysats respectifs associés. Un effet bénéfique de l'allongement du temps d'hydrolyse pepsique sur le potentiel stimulateur d'un hydrolysat de soja a également été observé (Nishi et

al., 2001). Bien que parfois remise en question (Geraedts et al., 2011), la structure peptidique est un déterminant clé dans la stimulation de la sécrétion des CCK et met en évidence le rôle central de la digestion dans la libération de peptides bioactifs suite à l'ingestion des protéines alimentaires. L'administration de protéines en pré-charge avant un repas tend à diminuer la quantité de nourriture ingérée et à générer plus rapidement le sentiment de satiété. Les protéines de lactosérum, administrées en pré-charge à des sujets sains, ont provoqué une diminution de la prise alimentaire et une sensation de satiété plus importante que celles engendrées par les caséines, effet dû entre autre à une concentration des CCK plasmatique plus élevée (Hall et al., 2003). L'origine de la source protéique semblerait donc influencer le potentiel stimulateur des CCK mais ceci n'est pas toujours clairement mis en évidence.

Une fois présents dans la lumière intestinale, les peptides arrivent au contact de la bordure en brosse avec laquelle ils interagissent pour stimuler la sécrétion hormonale. Les différentes voies d'activation connues à ce jour ont été récapitulées dans la *Figure 20*.





Les peptides présents dans le lumen intestinal peuvent activer la sécrétion des CCK par (1) une augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire résultant d'une activation du CaSR ou de GPR93.Les canaux  $Ca^{2+}$  voltage dépendant permettent une entrée de  $Ca^{2+}$  intracellulaire sous l'action des récepteurs CaSR et GPR93 ou d'une dépolarisation de membrane provoquée par le transport de di-peptides par PepT1. L'activation de GPR93 par les peptides peut engendrer une activation de la transcription du gène CCK (2) en activant les voies de signalisation ERK 1/2 et PKA. D'autres voies de signalisation inconnues à ce jour (3) impliquent le transporteur PepT1 de manière indirecte ou le facteur LCRF dans la stimulation de la sécrétion des CCK.

Nishi *et al.* ont isolé un fragment peptidique de la  $\beta$ -conglycinine de soja ( $\beta$ 51-63) capable d'induire une diminution de la prise alimentaire chez le rat en corrélation avec la stimulation de la sécrétion des CCK. Ce même fragment possédait ex vivo la plus forte affinité de liaison pour la membrane intestinale de rat (estimée par résonance des plasmons de surface) comparée à d'autres fragments issus de la β-conglycinine dont les potentiels stimulateurs de la sécrétion des CCK étaient inférieurs (Nishi et al., 2003b). La composition en acides aminés de ce fragment, riche en résidus d'arginine, serait impliquée dans cet effet (Nishi et al., 2003a). Parallèlement, un hydrolysat de porc a montré une très forte capacité à se lier avec la bordure en brosse d'intestin de rat (évalué par résonance des plasmons de surface) couplé à un potentiel stimulateur dose-dépendant de la sécrétion des CCK dans les cellules STC-1. De plus, un encas oro-gastrique de ce même hydrolysat a significativement réduit la prise alimentaire chez le rat (Sufian et al., 2006). Une interaction entre les peptides et la muqueuse intestinale semble donc indispensable pour initier la sécrétion hormonale. La stimulation de la sécrétion des CCK par les peptides alimentaires pourrait se faire de manière directe au niveau des cellules I ou indirecte au niveau de la muqueuse, impliquant des facteurs intermédiaires comme le LCRF (défini au paragraphe 2.3.1.2b). En effet, les muqueuses intestinales possèdent, outre les CEE, une grande variété de cellules qui peuvent potentiellement être stimulées par les peptides et être des acteurs indirects de la sécrétion hormonale (Nishi et al., 2003b). À ce jour, les récepteurs et les voies de signalisation activées par les peptides n'ont été que partiellement identifiés. L'implication du calcium intracellulaire a tout d'abord été démontrée dans des modèles cellulaires. Némoz-Gaillard et al. ont mis en évidence avec le modèle STC-1 que des peptones d'albumine de blanc d'œuf stimulaient effectivement la sécrétion des CCK en activant une protéine G sensible à la toxine pertussis induisant une entrée cytosolique de Ca<sup>2+</sup> à travers des canaux Ca<sup>2+</sup> voltage dépendant (Némoz-Gaillard et al., 1998). L'activation de canaux  $Ca^{2+}$  semblerait être la première étape de la voie de signalisation conduisant à la sécrétion des CCK : les canaux de type L sont activés par le DBI (diazepam-binding inhibitor), facteur isolé de muqueuses intestinales de rat induisant la sécrétion des CCK (Yoshida et al., 1999; Liou et al., 2011). Le récepteur GPR93, appartenant à la famille des RCPG, a été par la suite identifié dans les cellules STC-1 (Choi et al., 2007a). Son activation par des peptones provoque une augmentation intracellulaire de calcium de manière dose dépendante. L'activation des sous-unités alpha (G $\alpha_s$  ou G $\alpha_a$ ) dépend de l'activateur de GPR93 (peptones ou agoniste spécifique). GPR93 pourrait faire partie des mécanismes de chimiodétection des nutriments engendrant une sécrétion des CCK (Choi et al., 2007b). Le Calcium Sensing Receptor (CaSR) est l'autre récepteur impliqué dans la détection des peptides luminaux et relayant la sécrétion des CCK. Faisant partie de la famille C des RCPG, son extrémité N-terminal située dans le milieu extracellulaire est de type Venus Fly Trap (VTF) et possède un domaine riche en résidus de cystéine (Conigrave and Hampson, 2010). Il est activé par de nombreux métabolites, par le calcium extracellulaire et par les acides aminés basique de type L, ces derniers se liant au domaine VTF. Ce récepteur est exprimé dans de nombreux tissus dont ceux présents dans le tractus GI et est impliqué dans le métabolisme du calcium (Conigrave et al., 2007). Récemment, CaSR a démontré être impliqué dans la stimulation de la sécrétion des CCK. En présence de L-Phénylalanine, stimulateur de la sécrétion des CCK dans les cellules STC-1 (Mangel et al., 1995), le récepteur CaSR est à l'origine d'une mobilisation de calcium intracellulaire aboutissant à la sécrétion des CCK (Hira et al., 2008). Le fragment peptidique  $\beta$  51-63 de la  $\beta$ -conglycinine, capable de stimuler la sécrétion des CCK dans les cellules STC-1, provoque une augmentation de calcium intracellulaire médié par CaSR (Nakajima et al., 2010). La même équipe démontra plus tard que CaSR était également impliqué dans la détection d'hydrolysats peptidiques et la stimulation de la sécrétion des CCK dans les cellules STC-1. Un traitement des cellules avec un antagoniste de CaSR a réduit considérablement la réponse hormonale en présence des hydrolysats protéiques (Nakajima et al., 2012). Même si les hydrolysats sont souvent riches en acides aminés libres, ce sont bien les peptides de bas poids moléculaires (inférieur à 1000 Da) qui sont suggérés comme étant les meilleurs stimuli de la sécrétion des CCK via l'activation de CaSR. À ce jour, aucun motif peptidique n'a encore été caractérisé comme ligand spécifique de CaSR.

Les peptides alimentaires peuvent donc influencer la stimulation de la sécrétion des CCK par différentes voies mais ils ont aussi montré une action sur la transcription du gène codant pour les CCK. Cordier-Bussat *et al.* ont démontré que des peptones de viande et d'albumine d'œuf avaient un effet dose dépendant sur la stimulation de la sécrétion des CCK dans les cellules STC-1, mais également sur l'augmentation des quantités d'ARNm transcrits du gène codant pour les CCK dans ces mêmes cellules (Cordier-Bussat et al., 1997). La même équipe a démontré plus tard que les peptones stimulaient la production d'AMP cyclique et l'activité enzymatique de la phosphokinase A (PKA), cette dernière induisant une phosphorylation du facteur de transcription CREB dont l'activité est requise pour activer le promoteur du gène codant pour les CCK dans les cellules STC-1 (Gevrey et al., 2002). Choi *et al.* ont également constaté, en utilisant le même modèle cellulaire, que l'activation du récepteur GPR93 par des peptones, ou un agoniste spécifique, conduisait à une augmentation des quantités d'ARNm

transcrits du gène codant pour les CCK. Les peptones ont induit une activation de la voie PKA menant à une activation du promoteur du gène codant pour les CCK, effet non retrouvé lors du traitement avec l'agoniste spécifique. L'activation du récepteur GPR93 par les oligopeptides active différentes voies de signalisation pouvant influencer sur la synthèse et la sécrétion des CCK (Choi et al., 2007b).

Les effets anorexigènes des peptides issus de protéines alimentaires sont entre autre médiés par le récepteur CCK1-R (Reidelberger et al., 2003b; Nishi et al., 2003b; Pupovac and Anderson, 2002), l'activation de ce récepteur étant relayée par la voie vagale afférente (Eastwood et al., 1998). En effet, Rayboult et al. ont démontré que les nutriments présents dans la lumière intestinale stimulaient la sécrétion des CCK qui, à leur tour, activait les voies afférentes vagales et inhibait la vidange gastrique (Raybould et al., 1994). Plus tard, Darcel et al. ont mis en évidence que le transporteur de di- et tri-peptides PepT1 était également impliqué dans la voie de signalisation de sécrétion des CCK. Les auteurs ont démontré qu'une infusion duodénale de peptones de viande engendrait une décharge de la fibre vagale afférente, annulée en présence d'un inhibiteur de PepT1 perfusé dans la muqueuse duodénale (Darcel et al., 2005). Le rôle indirect de PepT1 dans la sécrétion des CCK induite par des hydrolysats peptidiques a clairement été mis en évidence aussi bien dans les cellules STC-1 que dans des cellules intestinales natives : le transport de di- ou tri-peptides par PepT1 pourrait initier la sécrétion de facteurs de signalisations dans la cellule I aboutissant à une sécrétion des CCK (Liou et al., 2011). Les peptides alimentaires peuvent également se comporter comme des agonistes du CCK1-R : des hydrolysats de soja et de pomme de terre, ayant démontré leur potentiel stimulateur de la sécrétion de CCK par les cellules STC-1, ont agi comme des agonistes partiels de CCK1-R des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) surexprimant le récepteur. Sachant que la muqueuse intestinale est très densément innervée, des voies afférentes vagales exprimant CCK1-R pourraient être accessibles au contenu luminal et être directement activées par les peptides (Foltz et al., 2008). Staljanssens et al. ont également démontré que des hydrolysats obtenus après digestion GI de la β-conglycinine activaient partiellement le récepteur CCK1-R dans des cellules CHO. Toutefois, ce même hydrolysat a montré activer les cellules CHO dépourvues du récepteur, effet diminué en présence d'un antagoniste du CCK1-R, suggérant ainsi que d'autres récepteurs pouvaient être impliqués dans la mobilisation de calcium. Ainsi, la β-conglycinine serait source de peptides bioactifs, libérés par digestion GI, agissant à la fois sur la stimulation directe de la sécrétion des CCK et l'activation directe du CCK1-R (Staljanssens et al., 2012). Dernièrement, une étude menée sur des cochons vagotomisés a remis en question la suprématie de la voie vagale : le blocage des récepteurs CCK1-R au niveau des voies vagales afférentes abdominales n'a pas empêché l'augmentation des concentrations plasmatiques des CCK et l'induction de la satiété chez l'animal lors de la prise d'un repas liquide (Ripken et al., 2015). Cette étude suggère notamment que d'autres récepteurs CCK1-R périphériques seraient impliqués et auraient plus d'importance que ceux localisés dans les terminaisons vagales.

Pour résumer, les peptides alimentaires activent plusieurs voies de signalisation distinctes conduisant à la sécrétion des CCK afin de promouvoir la satiété et de diminuer la prise alimentaire. Ils peuvent ainsi intervenir au niveau des cellules I en activant des récepteurs (CaSR, GPR93) qui induisent une stimulation de la sécrétion des CCK *via* une mobilisation intracellulaire de Ca<sup>2+</sup>. Les peptides peuvent également agir de manière indirecte en stimulant au niveau de la muqueuse intestinale la sécrétion de facteurs intermédiaires (LCRF) qui induisent une stimulation de la sécrétion des CCK au niveau des cellules I. Une autre voie stimulée par les peptides implique le récepteur PepT1 mais cette voie de signalisation n'a pas encore été déterminée. Les peptides peuvent également interagir avec les récepteurs CCK1-R, soit en tant qu'agoniste partiel sur les terminaisons nerveuses innervant la muqueuse, soit de manière indirecte en activant une voie de signalisation impliquant PepT1. Enfin, les peptides alimentaires agissent sur la synthèse hormonale en régulant la transcription du gène codant pour les CCK.

#### **3.3.2** Peptides bioactifs et GLP-1

Le GLP-1 joue un rôle significatif dans la régulation de l'homéostasie énergétique à la fois grâce à ses propriétés anorexigènes et à sa fonction incrétine (partie 2.3.1.2d). Il est ainsi devenu une cible thérapeutique privilégiée dans la recherche et le développement de traitements contre l'obésité et le diabète de type 2. Les résultats positifs obtenus suite à des opérations de chirurgie bariatrique (perte de poids sur le long terme, amélioration de la régulation de la glycémie) ont été en partie attribués aux concentrations circulantes élevées de GLP-1 dont l'origine reste encore partiellement inexpliquée (Meek et al., 2016a). L'ingestion de protéines alimentaires est l'un des stimuli de la sécrétion de GLP-1 par les cellules L, plus abondantes dans l'intestin distal et active différentes voies de signalisation (*Figure 21*).



*Figure 21* : Voies de signalisation activées par les acides aminés libres et les peptides dans la synthèse et la sécrétion de GLP-1 par la cellule entéroendocrine.

Les acides aminés libres et peptides présents au niveau du lumen intestinal peuvent stimuler la sécrétion de GLP-1 en activant les récepteurs CaSR et GPRC6A (1). Ces derniers activent la sousunité  $\alpha$  Gq déclenchant elle-même une voie de signalisation PLC et IP<sub>3</sub> dépendante menant à une augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Cette dernière résulte également de l'activation des canaux Ca<sup>2+</sup> voltage dépendant par les canaux TRP ou le CaSR. Les peptides peuvent favoriser la synthèse du gène proglucagon par une voie AMPc dépendante activant la phosphorylation de CREB (2). Certaines voies impliquées dans la stimulation de la sécrétion de GLP-1 ne sont pas encore caractérisées et pourraient impliquer la phosphorilation des ERK 1/2 ou l'entrée de protons couplée au transport des peptides par PepT1 (3).

Cette sécrétion est associée à une baisse de la prise alimentaire, une sensation de satiété et également une amélioration de la glycémie. Ces effets ont été observés aussi bien suite à l'ingestion de sources protéiques animales notamment les protéines de lait (Hutchison et al., 2015) et de poisson (Nobile et al., 2016) que végétales (Stringer et al., 2013). L'ingestion d'un encas protéique à base de lactosérum avant un repas induit une baisse de la prise alimentaire et une stimulation rapide de la satiété corrélées à des concentrations hormonales circulantes plus élevés notamment celle du GLP-1 sur des sujets sains (Hall et al., 2003), mais également sur des sujets atteints de diabète de type 2 (Ma et al., 2009). Un régime riche en protéines a significativement augmenté les concentrations postprandiales de GLP-1 comparé à un régime à teneur protéique conventionnelle chez des sujets sains et a prolongé la sensation

de satiété induite, entre autres, par le GLP-1 (Lejeune et al., 2006). Une pré-charge d'hydrolysats de merlan bleu administrés à des rats a induit une baisse de la prise alimentaire sur le court terme avec une augmentation plasmatique des CCK et de GLP-1 (Cudennec et al., 2012). En plus de son effet satiétogène, l'ingestion de protéines alimentaires peut également améliorer la régulation de la glycémie en stimulant la sécrétion de GLP-1 et en inhibant l'activité DPP-IV plasmatique (Diepvens et al., 2008; Mochida et al., 2010; Hsieh et al., 2015; Ishikawa et al., 2015) . Les protéines de lactosérum possèdent notamment la capacité de générer des peptides bioactifs pouvant à la fois agir sur la stimulation de la sécrétion de GLP-1, l'inhibition de la DPP-IV et la stimulation d'insuline dans des cellules pancréatiques (Power-Grant et al., 2015). En revanche, le potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 des protéines reste controversé comparé à celui d'autres macronutriments, en particulier les glucides. L'ingestion d'un repas protéique a engendré une augmentation légère de la concentration de GLP-1 mais inférieure à celles induites par des repas isocaloriques de lipides ou de glucides (Elliott et al., 1993). De plus, l'augmentation de la concentration plasmatique de GLP-1 observée suite à une ingestion protéique n'est pas toujours associée à des effets satiétogènes (van der Klaauw et al., 2013). La reproductibilité des effets satiétogènes des protéines corrélés au GLP-1 semble dépendre de plusieurs facteurs comme l'état physiologique du sujet (sexe, poids) et les conditions expérimentales de l'étude (présence d'autres macronutriments, temps d'intervalle après l'administration de la pré-charge protéique, nature de la source protéique), rendant la comparaison des résultats délicate entre les études (Dougkas and Östman, 2016).

Les peptides alimentaires déclenchent la sécrétion de GLP-1 par un contact direct avec les cellules L de l'iléon et une activation des voies afférentes vagales au niveau du duodénum qui stimulent indirectement la sécrétion de GLP-1 dans les cellules L de l'intestin distal (Herrmann et al., 1995; Hira et al., 2009). Afin de mieux comprendre les mécanismes de détection des nutriments, les modèles cellulaires *in vitro* sont devenus des outils indispensables. Des hydrolysats de protéines animales (viande, albumine de blanc d'œuf) ou végétales (zéine, riz) ont démontré leur potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 sur des lignées cellulaires entéroendocrines murines comme les STC-1 (Cordier-Bussat et al., 1998), les GLUTag (Diakogiannaki et al., 2013) ou des lignées humaines comme les NCI-H716 (Reimer et al., 2001). Les acides aminés libres possèdent également un potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 mais ce potentiel apparait être inférieur à celui des peptides (Cordier-Bussat et al., 1998; Cudennec et al., 2012). Les mécanismes d'action conduisant à la

sécrétion de GLP-1 par les acides aminés libres sont bien mieux caractérisés. Ainsi, la Lglutamine agit *via* une dépolarisation de la membrane et l'activation d'une voie métabolique impliquant notamment une mobilisation de calcium intracellulaire dans la cellule GLUTag (Reimann et al., 2004). Cette voie a été plus tard identifiée par les mêmes auteurs sur des cellules primaires intestinales : la L-glutamine stimule la sécrétion de GLP-1 en déclenchant une dépolarisation de la membrane et en augmentant la concentration d'AMP cyclique et de calcium intracellulaire, ceci probablement médié par un récepteur type RCPG (Tolhurst et al., 2011). En revanche l'ingestion par des sujets sains et atteints du diabète de type 2 de Lglutamine encapsulée n'a pas provoqué de modification des concentrations de GLP-1 plasmatiques suffisante pour induire des effets métaboliques bénéfiques. Elle a également été suivie d'une augmentation de la prise alimentaire, suggérant ainsi que la L-glutamine a potentiellement interagi avec d'autres voies orexigènes (Meek et al., 2016b). Le récepteur CaSR, activé préférentiellement par les acides aminés aromatiques et exprimé par les cellules L, est un des récepteurs impliqués dans les mécanismes de sécrétion de GLP-1 : la présence d'acides aminés de type L (phénylalanine, tryptophane, arginine, glutamine et asparagine) stimule la sécrétion de GLP-1 dans des intestins isolés de rats, effet fortement diminué en présence d'un inhibiteur du CaSR (Mace et al., 2012). Un autre récepteur de la famille C des RCPG, le GPRC6A, a été caractérisé comme un chimiodétecteur d'acides aminés avec une préférence pour les acides aminés basiques et contenant un groupement hydroxyl ou sulfuryl : la liaison extracellulaire de L-ornithine avec GPRC6A augmente l'exocytose de GLP-1 par l'activation d'une voie impliquant le calcium intracellulaire et l'inositol-tri-phosphate dans la cellule GLUTag (Oya et al., 2013).

Les voies activées par les mélanges peptidiques sont en cours de caractérisation et comportent des éléments communs avec celles activées par les acides aminés libres comme l'augmentation du calcium intracellulaire. Un tétra-peptide de résidus de glycine stimule la sécrétion de GLP-1 dans les cellules NCI-H716 associée à une augmentation du calcium intracellulaire (Le Nevé and Daniel, 2011). Deux voies de détection distinctes des peptides alimentaires ont été mises en évidence dans les cellules L natives, l'une l'impliquant l'activation du récepteur CaSR et une variation de calcium intracellulaire, l'autre le transport de peptides par le transporteur PepT1 associé à une dépolarisation membranaire (Diakogiannaki et al., 2013). D'autres transporteurs impliqués dans la régulation du calcium intracellulaire comme les canaux calcium voltage dépendant de type Q ou les canaux ioniques TRP (*Transient Receptor Potential*) sont activés par des hydrolysats protéiques et participent

à la sécrétion de GLP-1dans des cellules L natives murines (Pais et al., 2016). Une autre voie de signalisation intracellulaire a été caractérisée dans les cellules NCI-H716 et fait intervenir des métabolites de la famille des MAP kinases : la phosphorylation des ERK 1/2 activée par des hydrolysats de viande engendre la sécrétion de GLP-1 (Reimer, 2006). Enfin, les peptides sont également capables d'agir positivement sur la transcription du gène du proglucagon dans des lignées STC-1 et GLUTag (Cordier-Bussat et al., 1998) par l'augmentation d'AMP cyclique et la phosphorylation du facteur de transcription CREB (Gevrey et a.l., 2004). À ce jour, aucun motif peptidique en dehors du tétra-peptide de glycine n'a été caractérisé pour son potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1.

## 3.3.3 Peptides bioactifs et inhibition de l'activité de la DPP-IV

## 3.3.3.1 Généralités sur les peptides inhibiteurs de la DPP-IV

Si les fonctions physiologiques de la DPP-IV ne sont pas en lien direct avec l'homéostasie énergétique, elles conditionnent l'activité de plusieurs hormones intestinales faisant partie des signaux à court terme maintenant l'équilibre de la balance énergétique. En effet, les souris et rats dépourvus du gène codant la DPP-IV ont une glycémie plus basse et des concentrations circulantes de GLP-1 plus élevées que celles observées chez des rongeurs témoins (Drucker, 2003). Le développement d'inhibiteurs synthétiques de la DPP-IV est une des voies les plus prometteuses dans les stratégies thérapeutiques du diabète de type 2 et a déjà démontré son efficacité dans l'amélioration de la régulation de la glycémie (Meduru et al., 2016a). Parallèlement, l'essor des aliments fonctionnels a fait émerger les protéines comme sources potentielles de peptides inhibiteurs de la DPP-IV. Bien qu'à ce jour les potentiels inhibiteurs de la DPP-IV des peptides bioactifs soient au moins 100 fois inférieurs à ceux des inhibiteurs synthétiques, ils n'en restent pas moins une alternative intéressante grâce à leurs faibles effets secondaires associés et à leur faible toxicité pour l'organisme (Power et al., 2014). Une multitude de séquences bioactives, provenant de sources protéiques variées aussi bien animales (lait de vache et de chèvre, viande, poisson, mollusque) que végétales (amarante, son de riz, haricot azuki), a été caractérisée in vitro grâce à un test enzymatique mettant en contact la DPP-IV, un substrat préférentiel chromophore et les potentiels inhibiteurs peptidiques de l'enzyme (Power et al., 2014; Jao et al., 2015; Patil et al., 2015). Le potentiel inhibiteur du peptide ou de l'hydrolysat est caractérisé par son IC<sub>50</sub>, concentration pour laquelle 50 % de l'inhibition de la DPP-IV est observée. La libération des peptides bioactifs est fréquemment réalisée par hydrolyse enzymatique en utilisant soit des enzymes d'origine GI (pepsine, trypsine, pancréatine), végétale (papaïne, bromélaïne) ou microbienne (Alcalase®, Flavourzyme®). La fermentation microbienne est l'autre procédé d'obtention de peptides inhibiteurs de la DPP-IV. À ce jour, le peptide bioactif Ile-Pro-Ile ou diprotine A, extrait de surnageants de culture de Bacillus cereus, présente le meilleur potentiel inhibiteur de la DPP-IV (extraite de rein de rat) avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 3,5 µM (Umezawa et al., 1984). Le meilleur hydrolysat inhibiteur de la DPP-IV dérive de l'a-lactalbumine hydrolysée par la pepsine avec une IC<sub>50</sub> de 0,036 mg.mL<sup>-1</sup> (Lacroix and Li-Chan, 2013). Les conditions d'hydrolyse ou de fermentation sont adaptées selon les conditions optimales de l'enzyme ou du micro-organisme (température, pH, temps d'incubation) et ont des effets significatifs sur la libération de peptides inhibiteurs de la DPP-IV (Alice B Nongonierma et al., 2016). Le nombre d'études consacrées à la recherche de ces inhibiteurs s'est multiplié ces dix dernières années mais les banques de données peptidiques recensent moins d'une centaine de peptides actifs. La comparaison de toutes ces séquences n'a pas abouti pour le moment à un consensus sur les caractéristiques physico-chimiques des peptides inhibiteurs de la DPP-IV. Cependant, la présence d'un résidu de proline ou d'alanine en avant dernière position du côté N-terminal semble être un critère relativement fiable et récurrent (Nongonierma and FitzGerald, 2016a). Le nombre d'acides aminés des séquences inhibitrices est compris entre 2 et 15 résidus et la plupart d'entre elles possède un résidu de proline et/ou d'acides aminés hydrophobes au sein de leur séquence (Lacroix and Li-Chan, 2012a). Les séquences peptidiques comportant un résidu de proline ou de tryptophane en avant-dernière position côté N-terminal ont des valeurs d'IC<sub>50</sub> inférieures à 200 µM pouvant être ainsi considérées comme de bons inhibiteurs de la DPP-IV (Nongonierma and FitzGerald, 2014). La nature et le positionnement des acides aminés semblent être des déterminants plus pertinents que la longueur de la chaine peptidique (Velarde-Salcedo et al., 2013). La présence d'un résidu de proline en C-terminal n'engendre pas systématiquement un effet inhibiteur de la DPP-IV équivalent à celui observé lors de sa présence en N-terminal. Par exemple, le peptide Ile-Pro possède une IC<sub>50</sub> égale à 149,6  $\pm$  3,5 µM alors que les dipeptides Leu-Pro, Tyr-Pro et Gln-Pro ont des valeurs d'IC<sub>50</sub> supérieurs à 700 µM (Nongonierma and FitzGerald, 2013a). Les dipeptides présentant un résidu de tryptophane ne possèdent pas le même potentiel inhibiteur si le résidu est placé du côté N- ou C-terminal de la chaîne peptidique : les dipeptides synthétiques Trp-Arg, Trp-Lys Trp-Leu et Trp-Pro possèdent des valeurs d'IC50 inférieures à 50 µM alors que les mêmes séquences inversées n'inhibent pas la DPP-IV (Nongonierma and FitzGerald, 2013b). Les séquences peptidiques peuvent inhiber l'activité de la DPP-IV de manière compétitive, non compétitive ou mixte. Un complexe inhibiteur-enzyme-inhibiteur a été mis en évidence avec un inhibiteur présent au niveau du site actif et un autre sur un site alternatif. Il a également été prouvé que le motif Xaa-Xaa-Pro- (Xaa acide aminé) n'était pas une condition suffisante pour conférer à un peptide une activité inhibitrice de la DPP-IV. De plus, ils ont également souligné le fait que la substitution d'un résidu d'un peptide inhibiteur pouvait totalement changer son mode d'inhibition (Lorey et al., 2003).

# 3.3.3.2 Peptides inhibiteurs de la DPP-IV et digestion GI des protéines

La digestion GI des protéines est un procédé enzymatique naturel pouvant conduire à la libération de peptides inhibiteurs de la DPP-IV dont le potentiel est tout à fait comparable à ceux libérés par hydrolyse enzymatique contrôlée. Les valeurs d'IC50 des digestats (hydrolysat obtenu par digestion GI in vitro) sont généralement comprises entre 1 et 5 mg.mL<sup>-</sup> <sup>1</sup>, comme pour la majorité des hydrolysats protéiques. En effet, la digestion GI *in vitro* de plusieurs protéines laitières a généré des digestats potentiellement inhibiteurs de la DPP-IV dont les IC<sub>50</sub> atteignaient des valeurs similaires à celles des hydrolysats issus des mêmes sources protéiques hydrolysées par des enzymes d'origine microbienne type Alcalase® ou Flavourzyme® (Lacroix and Li-Chan, 2012b). La digestion GI de gruyère s'est révélée être une bonne source des peptides Ile-Pro-Ala et Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val connus pour leurs propriétés inhibitrices de la DPP-IV (Kopf-Bolanz et al., 2014). De même, des digestats GI de collagène de colin d'Alaska (Theragra chalcogramma) ont montré des valeurs d'IC<sub>50</sub> comprises entre 1 et 2 mg.mL<sup>-1</sup> (Guo et al., 2015), valeurs également obtenues suite à une hydrolyse enzymatique contrôlée de collagène de saumon (Li-Chan et al., 2012a). La même tendance a été observée avec la digestion GI de protéines végétales. Des digestats GI de graines d'amarante (Amaranthus hypochondriacus L.) possèdent des valeurs d'IC<sub>50</sub> proches de 1 mg.mL<sup>-1</sup> (Velarde-Salcedo et al., 2013). La digestion GI de graines de niébé (Vigna unguiculata) germinées ou non conduit également à des digestats inhibiteurs de la DPP-IV (0,58 mg.mL<sup>-1</sup> protéine soluble). Deux peptides Thr-Thr-Ala-Gly-Leu-Leu-Gln et Lys-Val-Ser-Val-Val-Ala-Leu identifiés par LC-MS-MS dans ces digestats seraient de bons inhibiteurs de la DPP-IV (de Souza Rocha et al., 2014). Une étude de docking (modélisation des interactions ligand-récepteur) a révélé que ces deux peptides auraient une forte interaction avec le site catalytique de la DPP-IV. La digestion GI de protéines alimentaires serait donc naturellement capable de libérer des peptides inhibiteurs de la DPP-IV. De plus, le potentiel inhibiteur des digestats évolue en cours de digestion : les digestats intestinaux ont des valeurs d'IC<sub>50</sub> généralement inférieures à celles des digestats gastriques. Cependant, la plupart des études s'oriente vers la digestion GI d'hydrolysats protéiques et le devenir ou la conservation de leur potentiel inhibiteur. En effet, les digestats des hydrolysats protéiques présentent souvent des potentiels inhibiteurs de la DPP-IV supérieurs à ceux des digestats de protéines natives. Ceci a été démontré avec des hydrolysats de seiche (Cudennec et al., 2015), de riz, pois, soja, chanvre (Nongonierma and FitzGerald, 2015) ou encore des hydrolysats de protéine de lactosérum (Nongonierma and FitzGerald, 2013c). Une constatation similaire a été établie avec la comparaison du potentiel inhibiteur de la DPP-IV d'un yaourt de lait de vache obtenu par fermentation bactérienne et de ses digestats GI. Le potentiel inhibiteur des digestats était supérieur à celui du yaourt et il augmentait tout au long de la digestion (Jin et al., 2016). La digestion GI prolonge donc l'hydrolyse protéique et les peptides générés peuvent également exhiber un potentiel bioactif. Dans ce sens, la plupart des études s'attachent d'abord à optimiser les conditions d'hydrolyse pour libérer des peptides bioactifs puis envisagent d'étudier la stabilité des peptides, ou hydrolysats, et le devenir de leur bioactivité dans des conditions GI simulées. Qu'il soit produit par hydrolyse enzymatique exogène (administration orale de peptides ou d'hydrolysats protéiques) ou endogène (digestion GI de protéines alimentaires ou de protéines endogènes), le peptide doit survivre aux conditions GI et passer la barrière intestinale avant d'exercer son effet inhibiteur sur la DPP-IV circulante (forme impactant le plus l'action du GLP-1). Les conditions GI peuvent compromettre sa biodisponiblité et sa bioactivité. Par conséquent, la simulation d'une digestion GI in vitro est une étape préliminaire essentielle à l'étude in vivo et permet d'évaluer en amont la potentielle stabilité du peptide bioactif ou d'un hydrolysat protéique face aux activités protéolytiques des enzymes. Ainsi, trois peptides isolés à partir d'un hydrolysat de macroalgue (Palmaria palmata) Ile-Leu-Ala-Pro, Leu-Leu-Ala-Pro et Met-Ala-Gly-Val-Asp-His-Ile conservent leur potentiel inhibiteur de la DPP-IV après la simulation de leur passage dans les compartiments gastriques et intestinaux (Harnedy et al., 2015). De même, une fraction isolée d'un hydrolysat d'a-lactalbumine a conservé son potentiel inhibiteur de la DPP-IV suite à une digestion simulée  $(1,20 \pm 0,12 \text{ mg.mL}^{-1})$ . Toutefois l'identification des populations peptidiques de différentes fractions (digérées ou non) par LC-MS-MS a conduit à la conclusion que l'effet inhibiteur de la DPP-IV observée n'impliquait probablement pas les mêmes séquences peptidiques avant et après digestion de la fraction (Alice B. Nongonierma et al., 2016). L'action des enzymes GI peut également générer de nouveaux peptides bioactifs au potentiel inhibiteur de la DPP-IV supérieur à celui du peptide natif. C'est notamment le cas pour trois peptides bioactifs extraits d'un hydrolysat de thon cuit (Thunnus tonggol) par hydrolyse enzymatique d'origine microbienne. Ils ont vu leur potentiel DPP-IV s'améliorer suite à la simulation d'une digestion GI (Huang et al., 2012). Récemment, quelques études se

sont tournées vers le potentiel inhibiteur de la DPP-IV des peptides endogènes. Comme mentionné dans la partie 1, les protéines endogènes constituent un apport protéique quotidien non négligeable et elles sont également soumises à la digestion GI. Elles sont donc, au même titre que les protéines alimentaires, des sources potentielles de peptides bioactifs. Un digestat d'albumine de sérum humain a montré une activité inhibitrice de la DPP-IV, ce qui a également été le cas pour des fractions enrichies de ce même digestat et d'un digestat GI de lysozyme (Dave et al., 2016a). Deux peptides inhibiteurs de la DPP-IV issus de la digestion GI *in silico* de protéines endogènes ont été mis en évidence suite à un test *in vitro* : Met-Ile-Met issu de l'albumine de sérum humain (IC<sub>50</sub> =  $800,51 \pm 4,9 \,\mu$ M) et Arg-Pro-Cys-Phe issu d'une endoribonucléase (IC<sub>50</sub> = 1056, 78 ± 61,11  $\mu$ M). Bien que le potentiel inhibiteur de ces séquences soit inférieur à celui des meilleures séquences peptidiques d'origine alimentaire, les protéines endogènes sont une source potentielle supplémentaire de peptides bioactifs (Dave et al., 2016b).

L'ingestion de protéines, d'hydrolysats ou de peptides pourrait alors avoir un effet bénéfique dans le traitement et/ou la prévention de l'obésité ou du diabète de type 2 en agissant entre autres sur l'activité de la DPP-IV. Actuellement, peu d'études in vivo ont pu confirmer l'action des hydrolysats ou des peptides identifiés in vitro. Les études menées sur des rats diabétiques, induits par la streptozocine, ont démontré que l'ingestion d'hydrolysats ou de peptides avait des effets sur l'amélioration de la glycémie, l'augmentation des concentrations circulantes de GLP-1 et de l'insuline et engendraient une diminution de l'activité plasmatique de la DPP-IV. Ces effets ont été décrits suite à des ingestions d'hydrolysats de zéine (Mochida et al., 2010b), de  $\beta$ -lactoglobuline (Uchida et al., 2011), de gélatine de peau de porc (Huang et al., 2014), de gélatine de saumon (Hsieh et al., 2015) et de gélatine de tilapia (Wang et al., 2012). Le peptide Leu-Pro-Gln-Asp-Ile-Pro-Pro-Leu, fragment de la β-caséine isolé dans un gouda, a exercé la meilleure activité inhibitrice de la DPP-IV in vitro parmi les peptides isolés (IC<sub>50</sub> = 46  $\mu$ M) et une amélioration de la glycémie de rats diabétiques après un test oral de tolérance au glucose. Les auteurs n'ont cependant pas identifié clairement si cet effet provenait d'une inhibition de l'activité de la DPP-IV (Uenishi et al., 2012). L'ingestion de protéines et d'hydrolysats peut également améliorer la glycémie de rats diabétiques sans diminuer l'activité DPP-IV plasmatique : l'activité DPP-IV plasmatique de rats diabétiques restait supérieure à celle des rats normaux après 6 semaines de régime contenant des caséines ou de l'hydrolysat de blanc d'œuf, bien qu'une amélioration de la glycémie à jeun et des concentrations circulantes d'insuline aient été observées chez les rats diabétiques (Ochiai et al., 2014). Enfin, comme présenté dans la partie 2.3.1.2d, la DPP-IV clive d'autres hormones et peut donc être impliquée dans d'autres systèmes de régulation que l'homéostasie énergétique. Une diminution de l'activité plasmatique de la DPP-IV a été observée suite à l'ingestion de protéines ou d'hydrolysats mais dans des contextes de recherche différents. À la suite de régimes enrichis en caséine ou en protéines de lactosérum ou de soja et administrés à des rats atteints d'hypoplasie de la muqueuse intestinale, une augmentation des concentrations plasmatiques de GLP-2, lui-même sensible à l'activité de la DPP-IV, a été observée (Liu et al., 2011).

# 3.3.4 Peptides bioactifs et récepteurs opioïdes

La régulation de la prise alimentaire est un des déterminants clé du maintien de l'équilibre de la balance énergétique. L'ingestion des protéines alimentaires participe à cette régulation en agissant sur différents leviers physiologiques dont la stimulation de la sécrétion des hormones GI (partie 3.3). Les récepteurs opioïdes périphériques interviennent dans l'inhibition de la vidange gastrique ou la satiété suite à la prise alimentaire par la libération de peptides opioïdes endogènes qui vont agir au niveau du SNC (Janssen et al., 2011). Les peptides opioïdes exogènes produits par la digestion GI des protéines alimentaires pourraient interagir avec ces récepteurs et donc intervenir dans la régulation de la prise alimentaire. Chez des rats, l'ingestion de caséines et de soja induit une baisse de la prise alimentaire médiée par deux voies de signalisation distinctes, l'une impliquant le récepteur CCK1-R et l'autre, les récepteurs µ-opioïdes périphériques (MOR). La digestion GI serait à l'origine de la libération de peptides comme la β-casomorphine, peptide dérivé des caséines, connue pour ses activités opioïdes (Froetschel et al., 2001; Pupovac and Anderson, 2002). Ces oligopeptides d'origine alimentaire ont été qualifiés de « nutripioïdes ». Parallèlement, il est connu que les produits de la digestion de protéines alimentaires peuvent agir comme des antagonistes des MOR présents dans les terminaisons neuronales afférentes de la muqueuse intestinale et au niveau de la veine porte. La détection des oligopeptides induit une transmission de l'information au niveau du SNC induisant une baisse de la prise alimentaire. Cette boucle de régulation périphérique vient en complémentarité de l'action des peptides endogènes libérés suite à la prise alimentaire, comme les endorphines, et démontre la pluralité des voies engagées au niveau central et périphérique pour promouvoir la satiété (Duraffourd et al., 2012; Pfluger et al., 2012). Mithieux et al. ont proposé une boucle de régulation de la prise alimentaire impliquant les MOR et la néoglucogenèse intestinale (IGN) activée par la digestion GI de protéines alimentaires (Figure 22).



*Figure 22* : Boucle de régulation de la prise alimentaire induite par la digestion des protéines : implication des récepteurs μ-opioïdes (MOR) Image modifiée d'après Mithieux et al., 2014

Cette théorie repose sur les propriétés anorexigènes du glucose : l'action antagoniste des oligopeptides au niveau des MOR de la veine porte active l'IGN par un circuit cerveauintestin augmentant ainsi la glycémie qui active à son tour les régions de l'hypothalamus impliquées dans la régulation de la prise alimentaire. Toutefois, seuls des dipeptides ont été testés dans ces études pour valider l'implication des MOR et aucun motif peptidique issu de l'alimentation n'a été à ce jour identifié pour ses effets anorexigènes *via* cette boucle de régulation (Mithieux et al., 2005; De Vadder et al., 2013a, 2013b, Mithieux, 2014a, 2014b; Mithieux, 2014).

## 3.4 <u>Conclusion</u>

Pendant des décennies, le processus de digestion GI n'a été étudié que pour sa capacité à transformer les aliments en nutriments, sources d'énergie pour notre organisme. Ce n'est qu'assez récemment que le tractus GI a été considéré comme une interface dynamique entre l'environnement luminal et le milieu intérieur. L'interaction des nutriments avec la barrière intestinale provoque l'activation de multiples voies de signalisation dont certaines sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Avec l'augmentation exponentielle du nombre de personnes atteintes de maladies liées au syndrome métabolique, les protéines alimentaires tirent leur épingle du jeu grâce à leurs effets bénéfiques sur la réduction de la prise alimentaire, l'induction de la satiété et l'augmentation de la dépense énergétique. Les voies de régulation sous-jacentes des effets observés ne sont toutefois pas

encore totalement élucidées. Certaines ont été largement étudiées *in vitro* comme la sécrétion et la production des hormones CCK et GLP-1 ainsi que l'inhibition de l'activité DPP-IV et ont mis en avant un effet positif de peptides ou d'hydrolysats protéiques. Quelques voies de signalisation ont été mises en évidence et ont démontré une forte implication de récepteurs de la famille des RCPG activés par les peptides dans le cas de la sécrétion hormonale et sur la base de critères structuraux pour les peptides inhibiteurs de la DPP-IV. Ainsi, la présence de ces récepteurs au niveau apical des CEE constitue le premier niveau d'intégration de l'information sur le contenu luminal. Les récepteurs jouent le rôle de chimiodétecteurs et initient la traduction de l'information détectée, sous la forme d'une réponse hormonale. À ce titre, la famille des RCPG attire une attention toute particulière comme nouvelle cible des traitements thérapeutiques contre l'obésité et le diabète de type 2. En ce qui concerne les peptides, très peu de critères structuraux sont connus à ce jour pour favoriser l'activation de ces récepteurs.

Il est désormais admis que le tractus GI a la capacité de libérer des peptides bioactifs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique à partir des protéines alimentaires ingérées. Si les effets allant dans le sens d'une réduction de la prise alimentaire et d'une augmentation de la satiété ont été constatés *in vivo*, la corrélation avec une augmentation de la sécrétion des hormones intestinales ou de l'inhibition de la DPP-IV n'est pas souvent établie. La présence de peptides dans le lumen et leur éventuel passage de la barrière intestinale peut être à l'origine de l'activation d'autres voies de signalisation ayant pour effet une baisse de la prise alimentaire, comme par exemple la néoglucogenèse intestinale induite de façon indirecte par les MOR de la veine porte ou bien encore la stimulation d'autres hormones intestinales non étudiées. Enfin, l'identification *in vivo* des peptides générés au cours de la digestion GI pouvant être responsables des effets observés est encore difficilement réalisable. Ainsi, des stratégies analytiques ont été mises en place afin de pouvoir suivre *in vitro* la libération de ces peptides au cours de la digestion GI tout en s'inscrivant dans une démarche de recherche de leur potentiel bioactif.

# 4.1 <u>Définition de la peptidomique</u>

Un peptidome désigne l'ensemble des peptides au sein d'un organisme, d'un tissu ou d'une cellule. Dans le cas des peptides alimentaires, le peptidome concerne spécifiquement l'ensemble des peptides présents au sein d'une matrice alimentaire et son évolution due aux procédés technologiques, au stockage ou à la digestion GI (Minkiewicz et al., 2008). La recherche de peptides ayant une action biologique pertinente s'inscrit également dans le domaine de recherche de la peptidomique alimentaire. Cette discipline s'inscrit dans le champ de la Foodomics, terme défini comme l'ensemble des études réalisées dans le domaine de la nutrition et des sciences alimentaires par le biais d'approches « omiques », c'est-à-dire des études menées à grande échelle visant à analyser l'ensemble des interactions et des fonctions d'entités biologiques (Cifuentes, 2009). Tout comme la protéomique, la peptidomique s'inscrit dans un cadre de caractérisation de peptides et de protéines mais en adoptant une approche différente. La protéomique vise à caractériser l'ensemble des protéines d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule dénommé protéome. La démarche généralement adoptée dans cette discipline consiste à identifier des biomarqueurs à partir de peptides émergeant de protéines aux séquences connues, libérés sous l'action d'enzymes spécifiques et dont le nombre d'acides aminés est généralement compris entre 7 et 25 (Graves and Haystead, 2002). La peptidomique s'attache à caractériser des séquences peptidiques provenant d'une ou plusieurs sources protéiques et libérées sous l'action d'une ou plusieurs enzymes peu spécifiques (enzymes gastro-intestinales, Alcalase<sup>®</sup>, Flavourzyme<sup>®</sup>) ou de micro-organismes. Ces procédés d'hydrolyse ont une influence notable sur les propriétés physico-chimiques des peptides : ils génèrent des populations peptidiques variées en termes de taille (de 2 à 100 acides aminés), charge ou hydrophobie dépendant de la composition en acides aminés et de leur agencement dans la chaine peptidique. De plus, l'environnement peptidique lié à la présence de la matrice alimentaire apporte une difficulté analytique supplémentaire. Par conséquent, les méthodes sont donc largement inspirées de celles employées dans le cadre de la protéomique mais ont été adaptées à la spécificité de ces populations peptidiques (Lahrichi et al., 2013). L'approche « bottom-up » de la protéomique consiste à digérer les protéines à identifier, souvent préalablement séparées sur un gel de polyacrylamide par électrophorèse 2D, avec des enzymes au clivage spécifique (ex : trypsine) et d'identifier les peptides générés par spectrométrie de masse en mode tandem (MS-MS) couplée à une étape séparative chromatographique (LC) ou d'électrophorèse capillaire (CE). L'identification de ces peptides est généralement automatisée grâce à la spécificité de clivage de l'enzyme et à l'utilisation de base de données génomiques et protéomiques (Schrader et al., 2014). La peptidomique suit un raisonnement inverse. Elle part d'un mélange peptidique issu d'une matrice biologique dont les sources protéiques sont connues et doit aboutir à l'identification et la caractérisation des séquences peptidiques du mélange. La démarche suivie inclut des étapes de purification de l'échantillon biologique, de séparation chromatographique ou électrophorétique et d'identification des peptides par MS-MS (possibilité de couplage LC ou CE). La spectrométrie de masse s'est rapidement imposée dans cette discipline comme étant une des techniques les plus fiables, rapides et sensibles pour identifier et caractériser la structure peptidique dans un environnement biologique complexe. Le développement de techniques d'ionisation douce comme l'ionisation par électrospray (ESI) ou l'ionisation laser assistée par matrice (MALDI), ainsi que d'analyseurs de masse (ex : quadrupôle, temps de vol) a largement facilité l'usage de la spectrométrie de masse pour l'identification de peptides. Elles permettent de couvrir une large gamme de poids moléculaires avec une extrême sensibilité, particulièrement adaptée à la faible concentration peptidique des échantillons biologiques (Mamone et al., 2009). Chaque séquence peptidique identifiée découle de l'interprétation des spectres MS-MS qui peut être réalisée manuellement ou par un logiciel de protéomique en prenant en compte les possibles modifications post-traductionnelles des acides aminés et les origines protéiques variées. Cette approche est ici qualifiée de « top-down » et est applicable aussi bien à la cartographie des peptides alimentaires issus de la digestion GI, de procédés de transformation alimentaire ou aux peptides endogènes tels que des hormones ou des molécules de signalisation (Dallas et al., 2015). Le couplage de techniques séparatives analytiques à la spectrométrie de masse et à la bio-informatique s'est rapidement imposé comme des méthodes fiables et rapides pour une identification exhaustive des peptidomes alimentaires.

# 4.2 <u>Approches expérimentales d'identification des peptides bioactifs d'origine alimentaire</u>

Dans le cadre de la recherche de peptides bioactifs dérivant des protéines alimentaires, deux approches sont actuellement principalement utilisées : une approche empirique largement répandue et une approche bioinformatique émergente.

# 4.2.1 Approche empirique d'identification des peptides bioactifs

L'approche expérimentale la plus communément appliquée consiste à isoler des séquences bioactives grâce à l'utilisation combinée de tests biologiques *in vitro* et de techniques analytiques en suivant la stratégie illustrée *Figure 23* (partie gauche du schéma).



*Figure 23* : Approches empiriques et bio-informatiques dédiées à la recherche de peptides bioactifs Inspirée de Udenigwe et al., 2010 et Li-Chan et al., 2015

Les hydrolysats protéiques sont d'abord purifiés, séparés et fractionnés, généralement par des méthodes de chromatographie d'exclusion stérique (SEC), d'échange d'ions (IEX) ou de chromatographie en phase inverse (RP-HPLC). La sélection des fractions d'intérêt par les tests d'activité biologique *in vitro* est suivie de l'identification des séquences peptidiques par spectrométrie de masse en mode tandem. Les techniques les plus couramment utilisées sont la fragmentation par MALDI-MS-MS ou le couplage d'une séparation préliminaire par chromatographie liquide ou électrophorèse capillaire avec une fragmentation par ESI-MS-MS. La composition en acides aminés des peptides de courte taille a une influence importante sur leur séparation. En effet, un peptide contenant des acides aminés hydrophiles ne sera pas retenu sur la même phase qu'un peptide présentant des acides aminés hydrophobes. Afin de faire face à cette diversité physico-chimique, l'association de techniques chromatographiques complémentaires telles que la phase inverse (séparation selon l'hydrophobie de la molécule sur des phases apolaires) et la phase normale (séparation selon les propriétés hydrophiles de la

molécule sur des phases polaires) peut améliorer l'identification du peptidome (Panchaud et al., 2012). De même, les techniques d'ionisation ESI et MALDI peuvent être utilisées en complémentarité dans une démarche d'identification exhaustive : elles présentent chacune des avantages techniques (couplage avec ESI, empreinte peptidique obtenue par MALDI) et une ionisation peptidique préférentielle (l'ESI ionise plus facilement les résidus d'acides aminés hydrophobes alors que le MALDI joue en faveur des résidus basiques) (Stapels and Barofsky, 2004). Quelle que soit la technique employée, les deux critères cruciaux pour la fragmentation peptidique sont la précision de la masse moléculaire et l'énergie de collision apportée pour la fragmentation de la chaine peptidique. Dans le cas des peptides de bas poids moléculaires, la fragmentation de l'ion parent génère peu d'ions fragments, avec un signal de qualité généralement assez moyen, rendant ainsi l'identification de la séquence parfois ambiguë (Paizs and Suhai, 2005). Afin de contourner cette difficulté, l'utilisation de modèles de prédiction de temps de rétention et de la technologie séparative HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) facilite la séparation et l'identification des peptides à bas poids moléculaire. La technologie HILIC a gagné récemment en popularité, grâce à sa bonne compatibilité avec la spectrométrie de masse utilisant le mode d'ionisation ESI, et trouve parfaitement son application dans le cadre de la peptidomique (Harscoat-Schiavo et al., 2012). Définie en 1990 par Alpert, la technologie HILIC appartient à la catégorie des phases normales, c'est-à-dire qu'elle sépare les molécules selon leur polarité, les interactions hydrogène et électrostatiques (Alpert, 1990) et se prête à la séparation de peptides et d'hydrolysats protéiques (Yoshida, 2004). Le Maux et al. ont ainsi couplé un modèle de prédiction de temps de rétention fondé sur les propriétés hydrophiles des di-, tri- et tétrapeptides avec une analyse HILIC-MS. Cette stratégie analytique a mis en avant la participation de chaque résidu selon sa position dans la chaine (N- ou C-terminal) et a été validée avec l'utilisation d'un hydrolysat de protéines de lactosérum (Le Maux et al., 2015a). Appliquée à des perméats de nanofiltration d'un hydrolysat bioactif de protéines de lactosérum, cette stratégie a permis d'identifier plusieurs peptides bioactifs à courte chaîne (moins de 5 résidus d'acides aminés) et de valider leur potentiel inhibiteur de la DPP-IV (Le Maux et al., 2015b). Enfin, la combinaison de plusieurs technologies chromatographiques complémentaires, en amont de la spectrométrie de masse, est également une solution pouvant améliorer la caractérisation exhaustive d'un mélange complexe, combinant plusieurs propriétés physico-chimiques des peptides à séparer. C'est par exemple le cas de la combinaison RP/HILIC, de plus en plus employée lors de l'analyse des peptidomes, qui
augmente significativement le nombre de séquences uniques identifiées (Fichtenbaum et al., 2016; Vásquez-Villanueva et al., 2016).

Le traitement des spectres MS-MS est effectué par un logiciel de protéomique, soit *de novo*, soit, à partir de l'interrogation des bases de données permettant la confrontation des potentielles séquences peptidiques dérivant des sources protéiques connues aux spectres de fragmentation. La synthèse peptidique des motifs identifiés constitue l'étape suivante permettant de confirmer, in vitro et/ou in vivo, l'activité biologique de la séquence isolée et de la renseigner dans les bases de données de peptides bioactifs telles que BIOPEP ou PepBank (Sánchez-Rivera et al., 2014). La structure du peptide peut donc servir de support pour la conception d'autres peptides actifs et permet d'étudier les relations structure-fonction pour caractériser l'origine de l'activité biologique du peptide. À partir des séquences identifiées, l'établissement de cartographies peptidiques, représentant la provenance des peptides sur la chaine protéique hydrolysée, fournit une représentation visuelle de l'évolution du peptidome au cours de l'hydrolyse. Elles permettent d'illustrer les zones préférentiellement clivées et les zones conservées de la chaîne protéique et apportent ainsi des éléments de réponse sur le devenir d'une protéine durant sa dégradation. Bien que cette approche empirique soit actuellement la plus fréquemment utilisée, elle ne peut être employée dans le cadre d'une production en masse en un peptide donné (Agyei and Danquah, 2011). De plus, l'activité recherchée n'est parfois pas portée par une seule séquence mais peut résulter de l'action synergique de plusieurs peptides (Udenigwe, 2014).

#### 4.2.2 Approches bio-informatiques d'identification des peptides bioactifs

Avec la démocratisation des outils informatiques, une approche *in silico* de recherche de peptides bioactifs s'est développée en parallèle de l'approche expérimentale classique (partie droite de la *Figure 23*). L'objectif est de prédire l'activité biologique d'un peptide, d'identifier les sources protéiques potentiellement précurseurs de ces peptides et de modéliser la libération des peptides ciblés en se fondant sur les sites préférentiels d'action des enzymes grâce à des outils informatiques. Des séquences bioactives ou motifs bioactifs connus dans les banques de données peuvent être recherchés au sein de plusieurs séquences protéiques animales et végétales, permettant de réduire considérablement les tests d'activités biologiques à réaliser et constituant ainsi une approche moins coûteuse (Li-Chan, 2015). Des approches d'arrimage moléculaire (*docking*) permettent de prédire la liaison du peptide bioactif à des sites spécifiques (récepteur protéique ou enzyme) et de caractériser les interactions impliquées

(Nongonierma and FitzGerald, 2016b). Ainsi, une étude a montré que parmi la quinzaine de dipeptides identifiés *in silico* pour le potentiel inhibiteur de la DPP-IV, seulement cinq ont été prédits comme étant stables et semblent interagir avec des résidus de tyrosine dans le site actif de l'enzyme (Nongonierma et al., 2013).

Certaines études ont ainsi réalisé un criblage de sources protéiques animales et végétales sur la base de leur capacité à générer des peptides inhibiteurs de la DPP-IV, en recherchant une liste de plusieurs dizaines de séquences identifiées pour leur potentiel inhibiteur. Plusieurs indices sont alors calculés pour chaque source protéique permettant la prédiction de son potentiel à être source de peptides inhibiteurs de la DPP-IV (occurrence des motifs, recouvrement de séquences). Les caséines de lait de vache et les collagènes de viande de bœuf et de saumon ont ainsi été prédits comme de très bonnes sources de peptides inhibiteurs de la DPP-IV (Lacroix and Li-Chan, 2012a). Cependant, cette technique ne permet pas de s'affranchir de la validation in vitro par hydrolyse enzymatique de la source protéique et de la validation de la stabilité des peptides obtenus en conditions GI (Nongonierma and FitzGerald, 2014). La prédiction de l'activité biologique d'une molécule peut être réalisée par la méthode QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship), méthode quantitative visant à prédire les activités biologiques d'une molécule en fonction de ses propriétés physico-chimiques (Yousefinejad and Hemmateenejad, 2015). L'activité biologique d'un peptide (ex : IC<sub>50</sub>,) est traduite en fonction de sa structure chimique (structure secondaire, charge, enchaînement d'acides aminés) au sein d'un modèle mathématique et permet d'identifier les zones potentiellement actives de protéines alimentaires (Dziuba et al., 2003). Enfin, le docking est une technique intéressante permettant de prédire les interactions entre un récepteur ou une enzyme et une séquence peptidique et d'estimer l'affinité du peptide pour sa cible (score VINA). Toutefois, le potentiel bioactif prédit n'a pas toujours été démontré in vitro et vice versa. Ceci suggère ainsi que l'interaction entre un peptide et son récepteur impliquerait des interactions non spécifiques et d'autres sites de liaison que le site actif (Nongonierma and FitzGerald, 2014). Afin de dépasser les limites respectives des deux approches, une approche bio-informatique intégrée a été suggérée. Elle tend à associer à chaque peptide inactif, rejeté par l'étude in silico, une possible activité biologique en identifiant des motifs déterminants (présence de résidus d'acides aminés particuliers, motifs connus) au sein de la séquence (Udenigwe, 2014). Ensuite, la libération du motif bioactif doit se faire par le choix de protéases appropriées et l'activité biologique est ensuite à valider par les tests in vitro avant d'incrémenter les bases de données de peptides bioactifs.

#### 4.3 La peptidomique appliquée à la digestion GI des protéines alimentaires

#### 4.3.1 Définition de la digestomique

La peptidomique englobe à la fois la caractérisation de peptides endogènes et exogènes à l'organisme et s'intègre parfaitement dans le domaine d'étude du devenir des protéines et peptides lors de la digestion GI. L'ensemble des techniques analytiques utilisées dans ce domaine trouve parfaitement son application dans le suivi et l'évolution du « digestome » protéique, soit l'ensemble des peptides générés dans le tractus GI, mais également dans l'évolution de la circulation sanguine. La digestion et l'absorption sont les deux paramètres contrôlant majoritairement la biodisponibilité d'un peptide et pouvant altérer son activité biologique. Ainsi, la « digestomique » doit se consacrer à l'évolution des peptides non seulement dans le tractus GI mais au-delà de la barrière intestinale. Par conséquent, elle doit faire face à plusieurs limites techniques comme la complexité de la matrice alimentaire, la diversité des digestats en terme de population peptidique (issue de l'action protéolytique de plusieurs enzymes aux spécificités différentes) et l'interaction avec des peptides endogènes dans les fluides biologiques (Picariello et al., 2013b). Les techniques employées sont identiques à celles décrites pour la peptidomique avec une utilisation majoritaire de la spectrométrie de masse en mode tandem pour la caractérisation des séquences peptidiques. La RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), moins fréquemment utilisée dans ce domaine, est également un outil de suivi de la dégradation d'une protéine au cours de la digestion GI. Elle fournit une empreinte moléculaire d'un digestat protéique et permet de distinguer la présence d'acides aminés et d'autres métabolites (Bordoni et al., 2014).

#### 4.3.2 Enjeux de la digestomique

La simulation d'une digestion GI vise à étudier le devenir d'une protéine alimentaire au cours de ce procédé physiologique. La caractérisation du peptidome généré (digestome) et de son évolution est réalisée selon plusieurs objectifs. Il existe un besoin de compréhension du devenir d'une ou plusieurs protéines, pures ou au sein d'une matrice. Ceci concerne entre autres la gamme de poids moléculaire couverte par les peptides libérés, le site de clivage des enzymes sur la ou les protéines présentes dans la matrice et l'avancée de leur dégradation. Ainsi de récents travaux ont montré que la digestion GI *in vitro* de viande de bœuf séchée (Bresaola) conduit à une libération séquentielle de peptides, les premiers étant libérés par les protéines sarcoplasmiques grâce à leur rapide solubilisation en milieu aqueux. L'étude a confirmé la très bonne digestibilité de la viande bovine séchée et a démontré que les protéines

structurales musculaires (actine, myosine) étaient les principales sources de peptides de bas poids moléculaire (Ferranti et al., 2014). La cartographie peptidique est un outil de choix pour relier visuellement la composition en acides aminés, la conformation et les sites de clivage de la protéine. Digérée *in vivo*, la lactoferrine bovine, protéine globulaire, libère préférentiellement les peptides sur les parties extérieures de sa chaine protéique (Furlund et al., 2013). Une digestion *in vivo* de protéines de truite ou de bœuf chez le porc a démontré que les peptides identifiés dans l'intestin contenaient fréquemment un résidu de proline, associé à une résistance aux enzymes digestives et que tous les peptides identifiés au niveau de la partie distale avait un poids moléculaire inférieur à 2000 Da avec une majorité de peptides à bas poids moléculaire quelle que soit la protéine digérée (Bauchart et al., 2007).

Le suivi de la libération des peptides durant la digestion GI apporte non seulement une information sur les interactions enzyme-substrat mais met également en évidence les différences interindividuelles en termes d'équipement enzymatique. Cette approche met en lumière une évolution de notre système enzymatique digestif au cours du temps et apporte de nouveaux éléments de réponse sur la compréhension de l'évolution de notre physiologie digestive. La digestion GI chez des nouveaux nés a largement été référencée comme présentant de cruciales divergences avec le système adulte et doivent être prises en compte lors de la réalisation des études in vitro et de la formulation des aliments (Bourlieu et al., 2014). Ces différences ont notamment été constatées en termes de profils peptidiques suite à la simulation de digestion GI in vitro adulte/nouveau-né de β-caséine, β-lactoglobuline et d'ovalbumine (Dupont et al., 2010). Parallèlement, la même approche est progressivement développée pour comprendre le fonctionnement de la digestion chez les personnes âgées. Une récente étude de digestion dynamique in vitro de viande de bœuf cuite, comparant les conditions d'un sujet adulte et d'un sujet âgé, a mis en évidence que la digestibilité des protéines et la bioaccessibilité des peptides libérés ne semblait pas être affectée par l'âge du sujet. Toutefois, les auteurs ont déduit, grâce à l'identification des peptides et de leur provenance protéique, que certaines protéines n'étaient pas hydrolysées de la même manière dans les conditions « âgées » notamment au niveau duodénal, et en ont conclu que les protéines « rapides » étaient plus adaptées aux personnes âgées pour limiter la perte protéique corporelle (Denis et al., 2016). Au-delà de la simple connaissance de la séquence peptidique, les outils analytiques de la peptidomique fournissent une compréhension de plus en plus précise et adaptée de la dynamique de la digestion.

La digestomique tend à améliorer les connaissances sur le mode de fonctionnement de notre système digestif et de ses interactions avec notre alimentation. Il est désormais possible, grâce aux approches omiques, de mieux définir la qualité d'un aliment et de comprendre l'influence des procédés alimentaires et de sa conservation sur sa digestibilité. L'utilisation des outils bioinformatiques comme la cartographie peptidique apporte une nouvelle représentation du peptidome et s'impose comme un outil pertinent pour étudier l'influence du procédé sur la libération de peptides en conditions GI. Le traitement thermique des protéines de lait semble jouer un rôle significatif sur les peptidomes obtenus suite à une digestion dynamique in vitro. Des différences ont été observées en termes de séquences peptidiques mais également de cinétique de libération et pourraient avoir une potentielle influence sur la santé aussi bien positive que négative (Sánchez-Rivera et al., 2015). De même, le traitement thermique de l'ovalbumine, dans des conditions particulières de pH et de force ionique, induit une agrégation protéique qui rend accessible des liaisons peptidiques, inaccessible dans la protéine native, et donc susceptibles d'être clivées. Le traitement thermique de l'ovalbumine a ainsi conduit à l'obtention de profils peptidiques différents (en terme qualitatifs et quantitatifs) suite à une digestion GI in vitro (Nyemb et al., 2014). En revanche, de récents travaux ont montré que la cuisson de la viande de porc exerçait un effet significatif sur la conformation des protéines mais affectait très peu les sites de clivage des enzymes GI. Ainsi, les profils peptidiques des digestats de viande de porc cuits à différentes températures se sont avérés être très semblables (Wen et al., 2015). Enfin, une étude in vivo menée sur des mini-porcs a montré de manière exhaustive l'influence de la structure de différentes matrices laitières gélifiées par acidification ou ajout de présure. Elle en a conclu que si la structure de la matrice exerçait une faible influence sur les sites de clivage hydrolysées des protéines, elle affectait particulièrement le nombre de peptides libérés au cours de la digestion (Barbé et al., 2014).

De manière globale, les stratégies omiques s'inscrivent dans une démarche de contrôle de la qualité d'un aliment ou d'une protéine allant dans le sens d'une amélioration continue de la sécurité alimentaire. Les protéines alimentaires sont de plus en plus vues comme des « aliments santé » potentiels notamment grâce à la libération de peptides bioactifs pouvant, entre autres, avoir lieu durant la digestion GI. Un exemple exhaustif de peptides bioactifs dans le domaine de la régulation de l'homéostasie énergétique a été énuméré au paragraphe précédent. La recherche de peptides bioactifs générés lors de la digestion GI de protéines alimentaires couvre un large champ d'activités biologiques, principalement les activités anti-

ECA (Escudero et al., 2010a, 2010b), antimicrobiennes (Capriotti et al., 2015), antioxydantes, opioïdes et immunomodulatrices (Barbé et al., 2014).

#### 4.4 Conclusion

Dans un contexte où la question des effets de l'alimentation sur notre santé s'impose au centre des débats sociétaux, les scientifiques doivent relever le défi de comprendre et de maitriser le devenir d'un aliment au sein du tractus GI afin de pouvoir prévoir et envisager les interactions des molécules libérées avec notre organisme. Au-delà de leur rôle nutritionnel, les protéines alimentaires ont démontré être à la fois une source bénéfique de peptides bioactifs aux spectres d'action très larges. Un ensemble de stratégies analytiques a donc été mis en place afin de pouvoir répondre à la question du devenir des protéines alimentaires au cours de la digestion GI. Elles doivent s'affranchir des diverses limites techniques liées à la complexité structurale multi-échelle de la matrice alimentaire, aux interactions entre protéines et autres macronutriments, à la diversité physico-chimique des peptidomes générés et à la variabilité de la physiologie digestive. La spectrométrie de masse en mode tandem s'est rapidement imposée dans cette démarche comme étant l'outil le plus fiable, sélectif et rapide permettant d'atteindre une caractérisation exhaustive du peptidome. Toutefois, cette technologie génère un nombre imposant de données qui requière un traitement et une interprétation automatiques adaptés aux peptides. Pour le moment, l'interprétation des séquences peptidiques est majoritairement réalisée par des logiciels de protéomique, qui ne sont pas conçus pour cette démarche et n'intègrent pas les spécificités peptidiques, comme la présence de courtes séquences. Dans le cadre de la recherche de peptides bioactifs, l'approche bioinformatique est une approche prometteuse en termes de temps, de coût et d'efficacité mais elle ne permet actuellement pas de s'affranchir d'une vérification *in vitro* et *in vivo* des activités biologiques. Elle devra aussi tendre à intégrer de nouveaux paramètres pouvant affecter l'activité biologique du peptide comme l'environnement enzymatique GI afin d'améliorer la fiabilité des prédictions réalisées.

# **Matériels et Méthodes**

#### 1.1 <u>Présentation générale</u>

L'hémoglobine bovine est une protéine tétramérique constituée de 4 sous-unités polypeptidiques, deux de type  $\alpha$  et deux de type  $\beta$  Chaque sous-unité comporte une chaîne protéique nommée globine et un groupement non protéique hydrophobe, l'hème, dont le noyau ferreux assure le transport du dioxygène dans le sang. La protéine adopte une conformation globulaire en milieu aqueux et présente deux états, l'état T (*tense*) et l'état R (*relaxed*), ce dernier ayant une meilleure affinité pour l'oxygène que l'état T (*Figure 24*).



*Figure 24 : Conformation spatiale de l'hémoglobine bovine à pH 7,2* Source : RCSB PDB.

Cette protéine a été choisie comme protéine modèle de cette étude car son hydrolyse par la pepsine a été largement étudiée au sein du laboratoire pour la production de peptides bioactifs notamment antimicrobiens (Nedjar-Arroume et al., 2008). A ce jour, aucune étude ne s'est focalisée sur les peptides bioactifs issus de la digestion gastro-intestinale (GI) *in vitro* de l'hémoglobine bovine. En revanche, l'hydrolyse par la pepsine de cette protéine est reconnue pour la génération de peptides opioïdes ou inhibiteurs de la DPP-IV (Zhao et al., 1997; Cohen et al., 2004;).

#### 1.2 <u>Structures des chaînes $\alpha$ et $\beta$ </u>

La chaîne  $\alpha$  présente un poids moléculaire d'environ 15 000 Da et comporte 141 acides aminés dans sa séquence avec une majorité de résidus d'alanine et de leucine (14,1 % pour

chaque résidu) avec un point isoélectrique global de 8,1. La séquence de la chaîne  $\alpha$  a été représentée *Figure 25*.

VLSAADKGNV KAAWGKVGGH AAEYGAEALE RMFLSFPTTK TYFPHFDLSH GSAQVKGHGA KVAAALTKAV EHLDDLPGAL SELSDLHAHK LRVDPVNFKL LSHSLLVTLA SHLPSDFTPA VHASLDKFLA NVSTVLTSKY R

*Figure 25 : Séquence peptidique de la chaîne*  $\alpha$  *de l'hémoglobine bovine* Source : UniProt

La séquence de la chaîne  $\beta$  a été représentée *Figure 26*.

MLTAEEKAAV TAFWGKVKVD EVGGEALGRL LVVYPWTQRF FESFGDLSTA DAVMNNPKVK AHGKKVLDSF SNGMKHLDDL KGTFAALSEL HCDKLHVDPE NFKLLGNVLV VVLARNFGKE FTPVLQADFQ KVVAGVANAL AHRYH

*Figure 26 : Séquence peptidique de la chaîne*  $\beta$  *de l'hémoglobine bovine* Source : UniProt

La chaîne  $\beta$  présente un poids moléculaire d'environ 15 950 Da et comporte 145 acides aminés dans sa séquence avec une majorité de résidus de valine (12,4 %), de leucine (11,7 %) et d'alanine (11,0 %) avec un point isoélectrique global de 7,1.

# 2 Simulation de la digestion gastro-intestinale de l'hémoglobine bovine et méthodes de caractérisations analytiques

#### 2.1 Matériels

L'hémoglobine bovine, la pepsine porcine (EC 3.4.23.1, issue de muqueuse gastrique porcine,  $> 250 \text{ U.mg}^{-1}$  solide), la lipase bactérienne (Amano Lipase PS,  $>30 000 \text{ U.g}^{-1}$ ), la pancréatine de pancréas porcin (spécifications 4xUSP, EC 232-468-9), l'extrait de bile porcine, le cholate de sodium, le désoxycholate de sodium, l'albumine, le cytochrome C extrait de cœur de cheval, l'aprotinine extraite de poumon de bœuf, le glutathion, l'albumine de sérum bovin,

l'amidon de blé, l'inuline, la méthylcellulose, le kit de dosage QuantiPro<sup>™</sup> BCA Assay ainsi que tous les autres composés minéraux proviennent de chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

#### 2.2 Réalisation des matrices alimentaires

L'élaboration des matrices alimentaires est réalisée au laboratoire. Elles sont composées d'une source glucidique (amidon de blé), d'une source lipidique (huile de tournesol), d'une source équimassique de fibres solubles et insolubles (inuline et méthylcellulose) et d'une source protéique (hémoglobine bovine). Les ingrédients sont mélangés aux proportions désirées avec de l'eau ultrapure. Pour le chauffage par plaque chauffante, une température voisine de 80 °C est maintenue pendant 20 min. Pour le chauffage par four à micro-ondes, une puissance de 750 W est appliquée pendant 3 min à la matrice. Elle est ensuite laissée à température ambiante pour refroidir et est conservée à 4°C. La quantité de matrice ajoutée dans le digesteur a été calculée pour que la quantité de protéines totales apportée soit équivalente à la quantité d'hémoglobine bovine pure utilisée pour la digestion sans matrice (soit 2 g dans le protocole de digestion statique ou 9 g dans le protocole de digestion dynamique).

#### 2.3 Modèle de digestion statique in vitro

La mise en place de ce dispositif expérimental vise à reproduire le plus fidèlement possible une digestion gastro-intestinale (GI) humaine dans des conditions *in vitro*. Un modèle de digestion GI statique mono-compartimental inspiré de l'étude menée par Versantvoort *et al.* (2005) a été réalisé et adapté à la digestion des protéines alimentaires. Le but est ainsi de simuler les différentes étapes de la digestion qui ont lieu dans la bouche, l'estomac et l'intestin grêle (*Figure 27*).



Figure 27 : Schéma du modèle de digestion GI in vitro statique mis en place pour l'étude

Pour cela, des fluides simulant les conditions enzymatiques et physico-chimiques de chaque étape de la digestion sont préparés. Leur composition est indiquée dans le *Tableau 2*. L'ajustement du pH de ces fluides est réalisée à l'aide de solutions 5 M de NaOH et 5 M de HCl (Versantvoort et al., 2005). Dans le cadre de notre étude, l'extrait de bile porcine n'a pas été utilisé pour la digestion statique de l'hémoglobine bovine.

 Tableau 2: Composition chimique des fluides simulés de la digestion GI in vitro statique

	Salive	Fluide gastrique	Fluide duodénal	Fluide biliaire
Composition chimique	KCl (12 mM)	KCl (11 mM)	KCl (7,6 mM)	KCl (5 mM)
	KSCN (2 mM)	$NaH_2PO_4(2,2 \text{ mM})$	$\mathrm{KH}_{2}\mathrm{PO}_{4}\left(0,6\;\mathrm{mM}\right)$	NaCl (90 mM)
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (7,4 mM)	NH <sub>4</sub> Cl (5,7 mM)	NaCl (120 mM)	NaHCO <sub>3</sub> (69 mM)
	Na <sub>2</sub> SO4 (4 mM)	NaCl (47 mM)	NaHCO <sub>3</sub> (40 mM)	HCl (1,5 mM)
	NaCl (5 mM)	HCl (65 mM)	HCl (1,8 mM)	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (4 mM)
	NaHCO <sub>3</sub> (20 mM)	$CaCl_2(2,7 \text{ mM})$	MgCl <sub>2</sub> (0,5 mM)	
	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (3,3 mM)	CO(NH2)2(1,4 mM)	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (1,7 mM)	
Protéases		Pepsine 1/40 (p/p)	Pancréatine 1/50 (p/p)	
рН	6,8 ± 0.2	$1,3 \pm 0.2$	$8,1 \pm 0.2$	$8,2 \pm 0.2$

La réaction est menée dans un réacteur de 200 mL thermostaté à 37°C sous agitation magnétique constante. Des prélèvements sont réalisés tout au long de la digestion pour les

analyses et les tests d'activités biologiques. Une quantité de 2 g d'hémoglobine bovine lyophilisée est introduite dans le réacteur et dissoute avec 16 mL de fluide salivaire. Le pH est ensuite ajusté à  $6,8 \pm 0,2$ . Un prélèvement de 4 mL de la phase salivaire est effectué au bout de 5 min. La phase gastrique est initiée par l'ajout de 24 mL de fluide gastrique et de 37,5 mg de pepsine porcine (ratio E : S 1/40). Le pH est maintenu entre 2,5 et 3 tout le long de la phase gastrique. Des prélèvements de 4 mL sont effectués toutes les 30 min et chauffés à 95°C pendant 10 min pour stopper l'activité enzymatique. Après 2 h de phase gastrique, la phase intestinale est initiée par l'ajout de 12 mL de fluide biliaire, de 24 mL de fluide intestinal et de 4 mL de 1 M de NaHCO<sub>3</sub> dans le réacteur. Une quantité de 16,67 mg de pancréatine porcine (ratio E : S 1/50) est ensuite ajoutée au réacteur et le pH est maintenu entre 7 et 7,5 pendant deux heures. Des prélèvements de 4 mL sont effectués toutes les 30 min puis inactivés thermiquement. Tous les prélèvements sont ensuite centrifugés (10 min, 13 400 g), les surnageants sont récoltés, filtrés sur une membrane polyfluorure de vinylidène (PVDF) 0,22 µm et congelés à -20°C. La figure suivante illustre le dispositif utilisé (*Figure 28*).



*Figure 28* : Montage expérimental de simulation de la digestion GI in vitro statique de l'hémoglobine bovine

Les échantillons collectés pendant la digestion seront nommés digestats tout au long du manuscrit. Les concentrations en poids sec/volume des échantillons obtenus sont de 125 g.L<sup>-1</sup> pour la phase salivaire, 41,67 g.L<sup>-1</sup> pour la phase gastrique et 13,89 g.L<sup>-1</sup> pour la phase intestinale. L'hème, le groupement ferrique de l'hémoglobine responsable de la couleur foncée des échantillons, est éliminé des digestats. Pour cela, une précipitation de l'hème est réalisée par abaissement progressif du pH des échantillons à une valeur de 4,5 grâce à une

solution de 1 M d'HCl. Les échantillons sont ensuite centrifugés 5 min à 13 400 g et les surnageants de couleur jaune clair sont récoltés et congelés à -20°C.

#### 2.4 Modèle de digestion dynamique in vitro

Cette expérience a été réalisée en collaboration avec le Dr Sylvain Denis de l'EA CIDAM, Université d'Auvergne. Le modèle utilisé est un système dynamique multi-compartimental TIM (TNO, Pays Bas) composé de quatre compartiments successifs simulant les conditions environnementales de l'estomac et des trois premiers segments de l'intestin chez l'être humain (duodénum, jéjunum et iléon). Il est représenté *Figure 29*.



*Figure 29* : Montage expérimental de simulation de la digestion GI dynamique de l'hémoglobine bovine (TIM)

Chaque compartiment est constitué d'une partie en verre munie d'une membrane interne flexible. De l'eau chauffée à 37°C injectée entre la membrane et la partie en verre à intervalles réguliers assure le mélange du chyme et le maintien de la température dans les compartiments. Les valeurs de pH des compartiments gastriques et intestinaux sont ajustées de manière continue par ajout de solutions d'acide chlorhydrique (1,5 M HCl) ou de bicarbonate de sodium (1 M NaHCO<sub>3</sub>). Les solutions simulant les sécrétions gastriques, biliaires et pancréatiques sont introduites dans les compartiments correspondants par des pompes commandées par ordinateur. La sécrétion gastrique est constituée d'une solution saline contenant la pepsine (1040 U.mL<sup>-1</sup>) et la lipase (60 U.mL<sup>-1</sup>). La sécrétion biliaire est

constituée d'extrait de bile porcine, de cholate de sodium et de désoxycholate de sodium (27,9 mM d'acides biliaires). L'eau et les produits de digestion sont retirés des compartiments jéjunal et iléal par dialyse avec des membranes à fibres creuses en triacétate de cellulose d'une porosité de 50 Å et d'un seuil de coupure de 10-12 kDa (Sureflux L, Nipro<sup>®</sup>, Japon). L'aliment à digérer (matrice à base d'hémoglobine bovine ou hémoglobine bovine en poudre) est préparé le jour de l'expérience de la manière suivante : une quantité de 100 g de matrice à 9 % (p/p) d'hémoglobine bovine ou de 9 g de poudre d'hémoglobine bovine est mélangée avec de l'eau minérale (Volvic<sup>®</sup>, France) afin d'atteindre un poids final de 350 g. Le tout est homogénéisé (9 500 rpm pendant 5 min) l'aide d'un système Ultra Turrax (T25, IKA®-Werke, Allemagne). Une quantité de 300 g de chaque aliment est introduit dans le digesteur. La digestion contrôle est réalisée avec 300 mL d'eau minérale. La durée totale de la digestion est de 300 min et des triplicatas indépendants de chaque digestion sont réalisés. Les effluents iléaux (collectés sur glace) sont récoltés toutes les heures sur glace sans être inactivés par la suite. Les dialysats jéjunaux et iléaux sont récoltés aux intervalles de temps suivants: 0-15, 15-30, 30-60, 60-45, 45-60, 60-90, 90-120, 120-150, 150-180, 180-240 et 240-300 min. Les absorptions jéjunales sont récoltées sur les périodes de temps 0-60, 60-120, 120-180, 180-300 min et les absorptions iléales sur des périodes de temps 0-60, 60-180 et 180-300 min. Des échantillons sont prélevés directement dans les compartiments gastriques et intestinaux à 30, 120 et 240 min puis subissent un choc thermique de 10 min à 95 °C.

### 2.5 Estimation de la concentration peptidique dans les échantillons issus des digestions GI *in vitro*

La détermination de la concentration protéique des différents échantillons a été réalisée par un dosage à l'acide bicinchoninique (BCA). Le principe de la méthode repose sur la formation d'un complexe protéine- $Cu^{2+}$  dans des conditions alcalines suivies par une réduction de l'ion  $Cu^{2+}$  en ion  $Cu^+$ , réaction proportionnelle à la concentration protéique en solution. Il a été démontré que la liaison peptidique ainsi que certains acides aminés comme la tyrosine, la cystéine ou le tryptophane possèdent la capacité de réduire l'ion  $Cu^{2+}$ . Le BCA forme un complexe bleu violet avec l'ion  $Cu^+$  en conditions alcalines qui présente un maximum d'absorption entre 540 et 590 nm.

Au cours de cette étude, deux techniques chromatographiques ont été employées : la chromatographie d'exclusion stérique et la chromatographie liquide haute performance. L'objectif est de caractériser d'un point de vue analytique les populations peptidiques présentes dans les divers échantillons.

#### 3.1 Chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à la détection UV

#### 3.1.1 Principe de la chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La SEC permet de séparer les molécules suivant leur taille. Elle repose sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon dans la phase stationnaire en fonction de leur volume en solution dans la phase mobile. La phase stationnaire est constituée de polymères réticulés organiques ou minéraux se présentant sous la forme de grains sphériques et forme un gel. La phase mobile est aqueuse ou hydrophobe selon la nature de la phase stationnaire. Un détecteur branché en sortie de colonne est adapté en fonction de la nature de l'échantillon analysé (détecteur UV, réfractomètre). Le chromatogramme obtenu permet alors d'obtenir des informations sur les gammes de poids moléculaire de l'échantillon en passant par une courbe d'étalonnage. Cette dernière établit une corrélation linéaire entre le poids moléculaire connu et le coefficient de diffusion de la molécule analysée. Le coefficient de diffusion K est calculé selon la formule suivante :

$$K = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

avec  $V_e$  volume d'élution de la molécule,  $V_o$  volume d'exclusion totale et  $V_t$  volume total de phase mobile de la colonne.

Le volume d'exclusion totale désigne le volume dans lequel sont éluées les molécules dont le diamètre est plus grand que celui des plus larges pores. Grâce à l'analyse de marqueurs de poids moléculaire connu, une relation linéaire est établie corrélant le volume d'élution avec le logarithme base 10 du poids moléculaire du type :

$$K = a * \log(PM) + b$$

avec K coefficient de diffusion, PM poids moléculaire, a pente et b ordonnée à l'origine déterminée expérimentalement.

Le volume d'élution d'une molécule est plus conditionné par sa taille et la conformation qu'elle adopte dans la phase mobile que par son poids moléculaire. Dans le cas de l'analyse de mélanges complexes comme les hydrolysats peptidiques, le terme « poids moléculaire apparent » est employé plutôt que poids moléculaire.

#### 3.1.2 Protocole expérimental

L'objectif de l'utilisation de la SEC dans ce travail est dans un premier temps de connaitre les gammes de poids moléculaires couvertes par les différentes populations peptidiques analysées puis de séparer les mélanges peptidiques complexes selon leur poids moléculaire apparent. Un détecteur UV à 215 nm a donc été utilisé pour la détection des liaisons peptidiques. Les profils peptidiques des digestats sont obtenus à l'aide une colonne Superdex peptide 10/300 GL (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) montée sur une chaîne AktaPurifier (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Une élution isocratique est menée pendant une heure avec un solvant contenant 30 % d'acétonitrile, 69,9 % d'eau ultrapure, 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) à un débit de 500  $\mu$ L.min<sup>-1</sup>. Un volume de 40  $\mu$ L de digestat est injecté sur la colonne et l'élution des peptides est suivie par mesure de l'absorbance à 215 nm. La calibration de la colonne est effectuée par l'injection de marqueurs de poids moléculaires connus (Albumine, 60 kDa ; Cytochrome C, 12400 Da ; Aprotinine, 6500 Da ; Vitamine B12, 1355 Da ; Glutathion 307 Da).

### 3.1.3 Chromatographie liquide en phase inverse couplée à la détection UV (RP-HPLC)

#### 3.1.3.1 Principe de la chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Comme toute technique chromatographique, l'HPLC vise à séparer des molécules en jouant sur les interactions entre soluté-phase stationnaire, soluté-phase mobile et phase mobile-phase stationnaire. La majorité des phases stationnaires utilisées sont en gel de silice sur lesquelles peuvent être greffés plusieurs groupements fonctionnels conditionnant la nature des interactions avec les molécules présentes dans la phase mobile. Le principe général veut qu'à une phase stationnaire polaire, une phase mobile apolaire soit opposée et *vice versa*, différenciant ainsi la chromatographie en phase normale et à polarité inverse (RP-HPLC). L'optimisation de la séparation en HPLC dépend de la colonne et de ses caractéristiques, de la phase mobile et de la température.

#### 3.1.3.2 Protocole expérimental

L'objectif de l'utilisation de l'HPLC dans cette étude est de caractériser les populations peptidiques présentes dans les échantillons de digestion et d'obtenir des fractions à partir d'un mélange complexe. La séparation des digestats d'hémoglobine est réalisée avec une colonne C<sub>18</sub> 250 mm-4 mm, LiChrospher 100 Å, phase inverse (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) à température ambiante à un débit de 600 µL.min<sup>-1</sup>. Le système chromatographique est constitué d'un passeur automatique Waters Wisp 717, d'une pompe automatique Waters 600E et d'un détecteur photodiode Waters 996. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés grâce au logiciel Millenium. La détection UV en ligne est acquise entre 200 et 390 nm à une fréquence de 1,2 nm. Le solvant A utilisé est composé de 99,9 % d'eau ultrapure / 0.1 % de TFA et le solvant B, de 99,9 % d'acétonitrile / 0.1 % de TFA. Pour chaque analyse, la colonne est d'abord équilibrée avec 100 % A pendant 5 min, puis un gradient linéaire de 0 à 70 % B est appliqué en 80 min suivie par un plateau à 70 % B pendant 10 min puis un retour de 70 % B à 0 % B en 10 min suivi d'une période de rééquilibration de 15 min à 100 % A. Chaque digestat est dilué à une concentration de 6 g.L<sup>-1</sup> et un volume de 10 µL est injecté pour chaque analyse. Les chromatogrammes obtenus à la longueur d'onde de 215 nm sont utilisés pour l'analyse des données.

#### 3.2 Identification des séquences peptidiques des digestats par spectrométrie de masse

#### 3.2.1 Principe général de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est une technique de détection extrêmement sensible permettant la détermination des masses des espèces atomiques ou moléculaires de l'échantillon analysé. Elle renseigne sur la nature, la composition, la structure et la quantité de l'espèce analysée. Cette technique consiste à produire en phase gazeuse des ions de la substance à analyser et de les séparer selon leur rapport m/z avec m la masse moléculaire et z la charge de l'ion. L'ion moléculaire parent peut être ensuite fragmenté générant ainsi des ions fragments qui permettent d'accéder à la structure de la molécule. Un spectromètre de masse doit comprendre un système d'introduction, une source d'ionisation, un ou plusieurs analyseurs pour séparer les ions parents et fragments, un détecteur pour compter les ions et un système d'acquisition de données. Le principe général de l'appareil est résumé dans la *Figure 30* :



Figure 30 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse

Un spectromètre de masse peut combiner plusieurs analyseurs et fournir une énergie supplémentaire pour fragmenter les ions : il fonctionne en mode tandem (MS-MS). Il existe différents modes MS-MS selon l'appareil utilisé dont deux ont été particulièrement employés dans cette étude : le mode *Product Ion Scan* et *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Le premier consiste à balayer tous les ions fragments produits à partir d'un ion précurseur alors que le deuxième ne suit que des ions fragments spécifiques de l'ion précurseur sélectionné appelés transitions. Selon le type de source, d'analyseur et de détecteur, on distingue les spectromètres de basse et de haute résolution.

Dans le cadre de notre étude, l'objectif est d'identifier les séquences des peptides contenus dans les divers échantillons issus de la digestion *in vitro* afin d'établir une cartographie peptidique de chaque digestat et de cibler plus spécifiquement certaines séquences isolées pour leurs activités biologiques. Il a été choisi de travailler principalement avec deux techniques d'ionisations dites « douces » : l'ionisation par électrospray (ESI) et la désorption / ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Ces deux techniques ont été utilisées en mode tandem (MS-MS) c'est-à-dire que les ions identifiés ont été fragmentés pour déterminer la séquence du peptide.

#### 3.2.2 Fragmentation d'un peptide

Pour obtenir des informations structurales, la molécule étudiée doit subir la fragmentation d'une ou plusieurs liaisons de manière à relier la masse des fragments obtenus à la structure chimique. L'ionisation mène à la formation d'ions stables permettant de déterminer le poids moléculaire de l'espèce analysée. Une énergie supplémentaire est apportée à l'ion formé permettant la fragmentation dans une cellule de collision. La méthode de fragmentation la plus couramment utilisée est la dissociation induite par collision (CID) et a été appliquée lors de cette étude. Le processus de fragmentation est influencé par le niveau d'énergie apporté à la molécule : plus l'énergie de collision est haute, plus le nombre de fragments générés est

important, apportant d'un côté plus d'information mais de l'autre une plus grande complexité du spectre à interpréter. En ce qui concerne les peptides, les fragments peuvent provenir soit du clivage des liaisons peptidiques, soit des chaînes latérales des résidus d'acides aminés. La nomenclature définie par Roepstorff, Fohlmann et Biemann permet de définir les différents fragments obtenus comme décrite dans la *Figure 31* (Roepstorff and Fohlman, 1984; Biemann, 1988).



Figure 31 : Fragments résultant d'un double clivage de la chaîne principale du peptide

Le clivage de la chaîne peptidique peut se produire au niveau des liaisons  $C_{\alpha}$ -C, C-N ou N-C<sub> $\alpha$ </sub> pour donner six types de fragments désignés respectivement an, bn, cn si la charge est retenue par le côté N-terminal et respectivement  $x_n$ ,  $y_n$ ,  $z_n$  si la charge est retenue côté C-terminal. Le nombre en indice correspond au nombre d'acides aminés contenus dans le fragment. La différence de masse entre des ions consécutifs d'une même série permet de déterminer l'identité des acides aminés et de déduire la séquence du peptide. La fragmentation et le type de fragments produits sont influencés par le type d'acides aminés présents au sein du peptide. A basse énergie, les fragments obtenus correspondent souvent aux fragments de type b et y qui subissent aisément la perte de petites molécules comme H<sub>2</sub>O ou NH<sub>3</sub> à partir des groupes fonctionnels des chaînes latérales des acides aminés. La présence et la position de certains acides aminés peuvent influencer la protonation (ou déprotonation) du peptide et sa fragmentation : les résidus d'acides aminés basiques Arg, Lys, His ou Pro positionnés au niveau C-terminal favorisent la formation d'ions contenant le côté C-terminal et inversement pour le côté N-terminal. L'identification des peptides à partir des spectres générés est actuellement réalisée par des logiciels informatiques capables de séquencer de novo ou de rechercher dans une base de données protéiques les séquences pouvant potentiellement correspondre au spectre à identifier. Le profil expérimental des poids moléculaires des peptides obtenus est comparé par l'algorithme aux profils prédits sur la base des règles de clivage pour toutes les séquences présentes dans les bases de données choisies.

Dans le cadre de notre étude, la recherche des séquences peptidiques au sein des différents échantillons a été réalisée avec un logiciel de protéomique en utilisant à la fois le séquençage *de novo* et la recherche en base de données. Afin d'augmenter le nombre de séquences potentielles, aucun clivage spécifique n'a été sélectionnée pour la simulation de la digestion de l'hémoglobine bovine.

#### 3.2.3 Identification des séquences peptidiques par MALDI-MS-MS

Les échantillons collectés en sortie d'HPLC et séchés par speed vaccum sont solubilisés dans 10 µL d'un mélange 99,9 % d'eau ultrapure / 0,1 % de TFA et sont déposés sur une cible MALDI en acier poli (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) en suivant la méthode de la goutte séchée. Pour cela 1 µl de la matrice MALDI (10 mg.ml<sup>-1</sup> d'acide cyano-4hydroxycinamique (HCCA)) dissoute dans un mélange eau/ACN/TFA (400:599:1, v/v/v) et1 µl de l'échantillon sont mélangés sur la cible et mis à sécher. Les mesures MS (mode réflectron positif) et MS-MS (mode lift) sont réalisées en mode automatique sur un spectromètre de masse AUTOFLEX<sup>™</sup> Speed TOF/TOF (Bruker Daltonics) et enregistrées par le logiciel FlexControl<sup>™</sup> 3.0 (Bruker Daltonics). La calibration externe entre les gammes de masse 1000 et 3500 est réalisée en utilisant les ions monoisotopiques [M+H]<sup>+</sup> issus de la bradykinine 1-7, l'angiotensine I, l'angiotensine II, la substance P, la bombésine et l'hormone adénocorticotropique (clips 1–17 et clips 18–39) à partir d'un kit standard de calibration peptidique (Bruker Daltonics). Chaque spectre MS est acquis suite à l'accumulation de données de 500 coups laser avec un voltage d'accélération de 25 kV, un voltage réflecteur de 26,3 kV et une extraction d'ion pulsé à 120 ns. La fragmentation peptidique est réalisée en mode automatique (programmé par le fabriquant). Les ions précurseurs sont accélérés à 8 kV et sélectionnés par une fenêtre ionique chronométrée. Les ions métastables générés par la décomposition laser sont accélérés à 19 kV dans la cellule *lift* et leurs masses sont mesurées en mode réflectron négatif. Pour les ions précurseurs et fragments, chaque spectre MS-MS est produit par une accumulation de 200 à 1000 coups laser respectivement. Les spectres MS et MS-MS sont traités par les logiciels Flexanalysis<sup>™</sup> 3.3 et BioTools 3.4 (Bruker Daltonics). Les séquences peptidiques sont identifiées à partir des spectres MS-MS en utilisant le logiciel BioTools 3.4 et les chaînes de l'hémoglobine bovine comme base de données (numéros UniProt : P01966 chaîne  $\alpha$  & P02070 chaîne  $\beta$ ).

# 3.2.4 Identification des peptides par ESI-MS-MS pour l'élaboration des cartes peptidiques

# 3.2.4.1 Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse basse résolution en mode tandem (LC-LR-ESI-MS-MS)

La séparation des digestats d'hémoglobine bovine est réalisée par une colonne  $C_{18}$  250x4 mm, LiChrospher 100 Å phase inverse (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne) avec un débit de 600 µL.min<sup>-1</sup> sur un système Accela UPLC couplé à un TSQ Vantage (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France). Un volume de 20 µL contenant 120 µg de digestats est injecté et la séparation est réalisée en appliquant un gradient linéaire de 0-70 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique pendant 80 min. L'absorbance est mesurée par détection UV à une longueur d'onde de 215 nm et la détection de masse est opérée par le TSQ Vantage dans les conditions suivantes : gamme MS et MS-MS : 150-1500 Da ; mode d'acquisition de données dépendantes ; liste dynamique d'exclusion : 30 sec par 25 ions ; énergie de collision 30-35 V.

### 3.2.4.2 Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse haute résolution en mode tandem (Nano LC-HR-ESI-MS-MS)

Les digestats sont dessalés sur des ZipTip C<sub>18</sub> (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France), séchés sous speed vacuum et repris dans 20 µL d'un mélange acétonitrile/eau ultrapure/0,1% acide formique, 2:8, v/v. Les échantillons sont séparés par une étape de chromatographie en phase inverse sur une colonne capillaire de faible calibre en ligne opérée par un système Proxeon Easy-nanoLC (ThermoFisher Scientific) équipée d'une colonne Proxeon trap (100  $\mu$ m ID x 2 cm, ThermoFisher Scientific) et d'une colonne C<sub>18</sub> à garnissage (Acclaim Pepmap RSCL, 75 µm ID x 50 cm, 3 µm, ThermoFisher Scientific). L'élution est réalisée en appliquant un gradient linéaire d'acétonitrile contenant 0,1 % d'acide formique (de 5 % à 30 % d'acétonitrile pendant 120 min puis de 30 % à 90 % d'acétonitrile pendant 20 min) à un débit de 250 nL.min<sup>-1</sup>. L'éluent chromatographique est pulvérisé par électrospray directement en sortie de colonne à un voltage de 2 kV appliqué par une jonction liquide de la source nanospray. Le système chromatographique est couplé à un spectromètre de masse Orbitrap Elite (ThermoFisher Scientific) fonctionnant dans un mode Data dependant. L'ensemble des scans MS est acquis à une puissance résolutive de 70 000 (FWHM) sur des gammes de masse allant de 300 à 1600 m/z et avec une cible de 3.10<sup>6</sup> ions. Les ions précurseurs observés avec une intensité supérieure à 500 coups sont sélectionnés pour la dissociation induite par collision *«ion trap* utilisant une fenêtre d'isolation de 4 amu et une énergie de collision normalisée de 35 %. Une cible de 5000 ions et un temps d'injection maximum de 60 ms sont appliqués pour les spectres issus de la CID-MS-MS qui sont acquis sur une gamme de masse allant de 300 à 2000 *m/z*. La méthode est conçue pour analyser les 10 ions les plus intenses du *survey scan*.

#### 3.2.4.3 Traitement des données de spectrométrie de masse

Toutes les données MS et MS-MS obtenues par les spectromètres de masse Orbitrap Elite et TSQ Vantage sont traitées par le logiciel de protéomique Peaks Studio Version 7 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada). Le logiciel est programmé pour que l'identité des séquences peptidiques soit recherchée dans le protéome entier de Bos taurus (UniProtKB, taxid: 9913) contenant 6361 entrées (téléchargé le 13/11/2015) et parmi les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine (P01966 et P02070 respectivement). Dans l'algorithme Peaks Spider sont uniquement sélectionnées comme modifications post traductionnelles (PTM) les mutations connues ou non connues, acétylation (N-term, K), oxydation (M, C), déamination (N, Q, R), pyroGlu dérivé de Q et phosphorylation (S, T, Y). Les recherches sont effectuées en ne choisissant aucune enzyme spécifique avec un nombre maximum de 100 clivages manqués (missed cleavages) autorisés. Les seuils de tolérances des masses des ions précurseurs et fragments sont définis à 0,7 Da / 0,7 Da pour les données acquises sur le TSQ Vantage (basse résolution) et à 10 ppm/0,2 Da pour les données acquises sur l'Orbitrap (haute résolution). Pour ces dernières, les séquences peptidiques sont filtrées selon un taux de faux positif (False Discovery Rate) strictement inférieur à 0,2 et selon leur nombre de spectres MS-MS supérieur à 5.

#### 3.2.5 Etablissement des cartographies peptidiques

La réalisation des cartographies peptidiques n'est établie que pour les peptides identifiés comme provenant des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine. Les proportions en acides aminés de chaque chaîne, les points isoélectriques et l'index GRAVY des séquences peptidiques calculés grâce logiciel Expasy ProtParam sont au (http://web.expasy.org/protparam/). Les cartographies peptidiques sont réalisées avec un outil conçu sur Excel (Microsoft Office). L'objectif de la conception de cet outil est de calculer la fréquence d'apparition de chaque acide aminé appartenant aux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dans les séquences peptidiques identifiées. Seules les populations peptidiques caractérisées dans les digestats finaux des phases gastriques et intestinales sont étudiées et les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  sont traitées de manière indépendante. La notion de fréquence d'apparition d'un acide aminé est établie dans les approches *in silico* des études de recherche des peptides bioactifs (Lacroix and Li-Chan, 2012a). Elle est calculée comme ce qui suit :

$$A = \frac{a}{N}$$

avec **A** fréquence d'apparition de l'acide aminé X, **a** nombre d'occurrences de l'acide aminé X dans les séquences peptidiques et **N** nombre de séquences peptidiques. Selon la valeur obtenue de la fréquence d'apparition, une couleur est associée à chaque acide aminé allant de blanc (aucune fréquence d'apparition) à rouge (forte fréquence d'apparition). La figure obtenue est qualifiée de carte de chaleur. Un exemple de carte de chaleur réalisée entre les acides aminés 32 et 30 de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine est présenté *Figure 32*.



**Figure 32 :** Exemple de cartographie peptidique et de carte de chaleur de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine.

Les séquences peptidiques sont représentées par les barres grises et l'ensemble constitue la cartographie peptidique. A chaque fois qu'un acide aminé est incorporé dans une nouvelle séquence, sa fréquence d'apparition *A* s'incrémente. Le code couleur de la cellule est automatiquement généré par sa mise en forme en fonction des différentes valeurs de A tout au long de la chaîne.

### 4 Méthodes de mise en évidence des peptides bioactifs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique

#### 4.1 Matériels

Les substrats Gly-Pro-p-nitroaniline (H-Gly-Pro-pNA/HCl) et Gy-Pro-7-amido-4méthylcoumarine (H-Gly-Pro-AMC HBr), l'enzyme Dipeptidyl Peptidase IV (extraite de rein porcin, EC 3.4.14.5,  $\geq 10$  U.mg<sup>-1</sup> de protéine) ainsi que tous les composés minéraux proviennent de chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Tous les peptides synthétiques sont fournis par GeneCust (Dudelange, Luxembourg).

#### 4.2 Préparation des échantillons pour les tests d'activités biologiques

Les digestats sont utilisés tels quels ou dilués avec la solution spécifique de chaque test tout comme les fractions peptidiques ou les peptides synthétiques. Les fractions peptidiques sont issues de fractionnements chromatographiques et sont récoltées comme ce qui suit.

#### 4.2.1 Protocole expérimental de fractionnement SEC

La séparation est menée sur une colonne HiLoad 16/600 Superdex 30 prep grade montée sur une chaîne AktaPurifier (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). La calibration de la colonne est décrite au paragraphe 3.1.2. Un volume de 2 mL du digestat intestinal décoloré est injecté par fractionnement et une élution isocratique avec un mélange 29,9 % d'acétonitrile, 69,9 % d'acétonitrile, 69,9 % d'acetonitrile, 0.1 % TFA à 1 mL.min<sup>-1</sup> est menée durant 2 h. Le suivi de l'analyse est réalisé par mesure de l'absorbance à 215 nm. Les fractions sont collectées manuellement, séchées par *speed vacuum* et conservées à -20°C.

#### 4.2.2 Protocole expérimental de fractionnement RP-HPLC (semi-préparatif)

Les fractions FPLC issues du digestat intestinal sont sous-fractionnées sur une colonne C<sub>18</sub> 250 mm -10 mm, XBridge Prep BEH130 5  $\mu$ m (Waters, Guyancourt, France) à un débit de 1.8 mL.min<sup>-1</sup>. Le système chromatographique utilisé et le traitement des données sont les mêmes que ceux décrits dans la section ci-dessus (3.1.3.2). Les solvants sont également identiques ainsi que le gradient de 70 % B en 80 min. Pour chaque sous-fractionnement, les fractions sont reprises dans de l'eau ultrapure, homogénéisées par Vortex et centrifugées 5 min à 13 400 g. Les volumes d'injection sont de 150  $\mu$ L pour la séparation de la fraction FBC et de 100  $\mu$ L pour la séparation des fractions FC et FD. Les quantités injectées par séparation

sont de 13,5 mg pour FBC, 4 mg pour FC et 6,68 mg pour FD. Les sous-fractions issues de la séparation chromatographique sont collectées manuellement, séchées par *speed vacuum* et conservées à -20°C.

#### 4.3 <u>Méthodes générales de culture cellulaire</u>

#### 4.3.1 La lignée STC-1



Figure 33 : Cellules STC-1 cultivées en flasque T75 (MO X20)

La lignée cellulaire STC-1 a été gracieusement donnée par le Dr C. Roche (INSERM U865, Lyon, France). Cette lignée est dérivée d'une tumeur neuroendocrine développée dans l'intestin grêle d'une souris double transgénique (Rindi et al., 1990). L'objectif est d'utiliser cette lignée cellulaire comme modèle cellulaire d'étude de la sécrétion de deux hormones intestinales, CCK et GLP-1. Tout au long de ce projet, les cellules STC-1 ont été cultivées à  $37^{\circ}$ C, 5 % de CO<sub>2</sub> dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 4,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline, 100 µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine et 2 mM de L-glutamine. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont trypsinisées et ensemencées selon les besoins des expériences. La fréquence des passages est de deux fois par semaine et une flasque T75 est continuellement maintenue. Lors de ces travaux de recherche, les cellules ont été utilisées entre les passages 10 et 50.

#### 4.3.2 La lignée Caco-2

La lignée cellulaire Caco-2 dérive d'un adénocarcinome colorectal humain et présente des caractéristiques phénotypiques très proches de celles des entérocytes humains dont la polarisation cellulaire et la formation d'une monocouche suite à leur culture sur filtre.



Figure 34 : Cellules Caco-2 cultivées en flasque T75 (MO X40)

L'objectif est d'utiliser cette lignée comme modèle de barrière intestinale et comme source de DPP-IV d'origine humaine. Au cours de ce projet, deux clones ont été utilisés : le clone ATCC (Sigma, Steinheim, Allemagne) au sein de notre laboratoire et le clone TC7 au sein du laboratoire du Pr. Sophie Lestavel de l'UMR 1011 INSERM. Les cellules du clone ATCC sont cultivées à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> dans un milieu DMEM 4,5 g.L<sup>-1</sup> glucose supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 100 U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline, 100 µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine et 2 mM de L-glutamine. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont trypsinisées et ensemencées selon les besoins des expériences. La fréquence des passages est d'une fois par semaine et une flasque T75 est continuellement maintenue. Lors de ces travaux de recherches, les cellules Caco-2 ATCC ont été utilisées entre les passages 1 et 30. Les cellules du clone TC7 sont cultivées à 37°C, 10 % de CO<sub>2</sub> dans un milieu de culture complet (DMEM, 25 mM glucose, 2 mM L-glutamine, 100 U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline, 100 µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine, 1 % d'acides aminés non essentiels et 20 % de sérum de veau fœtal neutralisé). Lors de ces travaux de recherche, les cellules Caco-2 / TC7 ont été utilisées entre les passages 30 et 50.

#### 4.4 Test de cytotoxicité

L'objectif de l'expérience est de tester l'éventuelle toxicité des échantillons provenant des digestions GI ou des peptides. Les cellules STC-1 ou Caco-2 sont ensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 8000 cellules par puits dans un volume de 150  $\mu$ L de milieu supplémenté et cultivées à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 4 jours pour la lignée STC-1 et 7 jours pour la lignée Caco-2. Les digestats, fractions peptidiques ou peptides synthétiques à tester sont préparés dans du milieu de culture et filtrés sur une membrane PVDF 0,22  $\mu$ m. Le jour du contact, un volume de 50  $\mu$ L de chaque échantillon à tester en triplicatas est directement ajouté dans les puits. Un ajout de 50  $\mu$ L de DMEM est réalisé en triplicatas dans les puits « contrôle ». Après 24 h d'incubation à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>, tous les surnageants sont retirés. Les cellules sont ensuite lavées par 100  $\mu$ L de tampon phosphate PBS, puis, un volume de 150  $\mu$ L DMEM contenant 5 % du réactif CCK-8 (Dojindo Molecular Technologies, Japon) est ajouté dans tous les puits. Les plaques sont incubées 2 h à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>. L'absorbance de la plaque est lue à une longueur d'onde de 450 nm par un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco, Monaco). La viabilité cellulaire est calculée par rapport à la moyenne des absorbances des puits contrôle (correspondant à 100 % de cellules viables).

#### 4.5 <u>Etude de la stimulation de la sécrétion des hormones CCK et GLP-1</u>

Les expériences de dosage ont été menées en collaboration avec le Pr Jean Lesage à l'Unité Environnement Périnatal et Croissance, EA 4489, Equipe dénutritions maternelles périnatales située à l'Université de Lille 1.

#### 4.5.1 Protocole du test de contact des échantillons avec les cellules STC-1

Les cellules STC-1 sont ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 40 000 cellules par puits dans du DMEM supplémenté et cultivées jusqu'à confluence (soit environ deux jours de culture). Un tampon d'incubation (4,5 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 140 mM NaCl et 20 mM Hepes-Tris, pH 7,4) est réalisé pour la préparation des digestats, fractions peptidiques ou peptides synthétiques aux concentrations voulues. Le pH des solutions est contrôlé et ajusté à pH 7. Le jour du contact, les cellules sont rincées une fois avec 300  $\mu$ L de tampon d'incubation. Puis un volume de 300  $\mu$ L des échantillons à tester ou de tampon d'incubation (puits « contrôle ») pré-incubés à 37°C est distribué dans les puits. Toutes les conditions sont testées en triplicats. Après 2 heures d'incubation à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>, les surnageants sont collectés, centrifugés (5 min à 7000 g) puis congelés à -20°C. Dans le cadre

de l'étude de la stimulation de la sécrétion des hormones en présence d'inhibiteurs du récepteur *Calcium Sensing Receptor* (NPS2143) ou du transporteur PepT1 (4-AMBA), les cellules sont pré-incubées après rinçage pendant 20 min à 37°C avec 200  $\mu$ L d'une solution de NPS2143 (25  $\mu$ M) ou de 4-AMBA (10 mM) préparées dans du tampon d'incubation. Un volume de 100  $\mu$ L des solutions à tester est ensuite ajouté dans le puits. La suite de l'expérience est menée comme décrit ci-dessous.

#### 4.5.2 Dosage des hormones intestinales CCK et GLP-1

La quantification des sécrétions hormonales est réalisée par dosage radio-immunologique. Le principe de cette expérience repose sur la liaison d'une hormone marquée à l'iode 125 (I<sup>125</sup>) avec son anticorps spécifique et sur l'inhibition compétitive de cette liaison par son homologue non marqué contenu dans les échantillons de concentration connue (gamme étalon) ou inconnue. La gastrine marquée a été utilisée pour le dosage des CCK alors que le GLP-1 (7-36) amide marqué (forme active) a été utilisé pour le dosage du GLP-1 actif. Les dosages sont réalisés en utilisant les kits GASK-PR (CisBioassays, Codolet, France) et GLP-1 active Cat# GLP1A-35HK (EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Allemagne) pour le dosage respectif des CCK et du GLP-1 actif. Le calcul de la concentration hormonale est réalisé de la même façon pour les deux hormones. La capacité de liaison du système est évaluée par le rapport B<sub>0</sub>/T avec T radioactivité totale et B<sub>0</sub> représente la radioactivité spécifique liée à l'anticorps en absence d'une hormone non marquée. La réalisation d'une gamme étalon avec des calibreurs (différentes concentrations de l'hormone non marquée) permet d'établir une corrélation sigmoïde de type exponentiel décroissant entre la concentration hormonale et B/B<sub>0</sub>, rapport représentant le pourcentage de liaison du calibreur avec B radioactivité spécifique en présence de l'hormone non marquée. La relation peut être linéarisée par la relation mathématique suivante :

$$Logit \left(\frac{B}{B_0}\right) = Ln(\frac{\frac{B}{B_0}}{1 - \frac{B}{B_0}})$$

Une relation linéaire entre le Logit  $(B/B_0)$  et le logarithme népérien de la concentration en hormone non marquée peut ensuite être établie selon la relation mathématique suivante :

$$Logit \left(\frac{B}{B_0}\right) = a \, Ln[hormone] + b$$

Il est ainsi possible de déterminer la concentration hormonale des surnageants provenant des tests de contact avec les cellules STC-1 en utilisant la gamme étalon établie. Le déplacement de liaison avec l'anticorps induit par les peptides provenant des échantillons (digestats, fractions) a été évalué et soustrait aux valeurs hormonales calculées.

## 4.5.3 Identification des séquences peptidiques impliquées dans la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales par spectrométrie de masse

L'identification des séquences peptidiques issues des digestats en relation avec les activités biologiques a été réalisée en collaboration avec le Dr. Mostafa Kouach et le Pr. Jean-François Goossens à la plateforme « Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses » (CUMA) à la Faculté de Pharmacie de Lille. Toutes les mesures ont été réalisées sur un spectromètre de masse hybride triple quadrupôle/trappe ionique linéaire QTrap ® 5500 (AB Sciex, Foster City, CA, Etats Unis) équipé d'une source ionique Turbo VTM. L'appareil est couplé à une chaîne UFLC-XR (Shimadzu, Kyoto; Japon) avec détection UV aux longueurs d'ondes de 220 nm et 280 nm. Le contrôle de l'instrument, l'acquisition et le traitement des données sont réalisés avec le logiciel Analyst 1.5.2. Pour chaque analyse réalisée, les paramètres utilisés en MS et MS-MS sont identiques. L'analyse MS est effectuée en mode d'ionisation positif utilisant un voltage d'ionisation de 5500V. Le débit en azote du gaz rideau est réglé à 30 psi. La température de la source d'ionisation Turbo VTM est réglée à 550°C avec un débit d'air pour les gaz nébuliseur et auxiliaire à 50 psi. La vitesse de balayage des ions est de 10 000 Da.s<sup>-1</sup> et la gamme de masse balayée m/z est comprise entre 200 et 1000. Pour l'analyse MS-MS, la gamme de masse balayée est de m/z: 50 – 1000 avec une vitesse de balayage de 10 000 Da.s<sup>-1</sup>. L'énergie appliquée dans la cellule de collision est de  $50 \pm 20$  eV et la tension de désolvatation de 100 V. Les conditions LC ont été spécifiquement précisées dans les paragraphes ci-dessous selon les échantillons analysés.

#### 4.5.3.1 Analyse LC-MS des fractions FPLC issus du digestat intestinal final

L'objectif de cette expérience est de vérifier les gammes de masse contenues dans les fractions FPLC par une analyse LC-MS. La séparation de chaque fraction est réalisée sur une colonne Kromasil C<sub>18</sub> (100x2,1 mm, 3,5  $\mu$ m) équipée avec une pré-colonne (AIT France, Houilles, France). Chaque fraction est solubilisée à 0,4 % (p/v) avec une solution de 99,9 % d'eau ultrapure, 0,1 % d'acide formique. Le volume d'injection est de 20  $\mu$ L. L'élution a été réalisée avec un débit de 200  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> avec comme solvant A un mélange 99,9 % d'eau ultrapure, 0,1 % d'acide formique et comme solvant B un mélange de 99,9 % d'acétonitrile,

0,1 % d'acide formique. La colonne est pré-équilibrée avec 100 % de A pendant 10 min. Un gradient linéaire de 0 % B à 60 % de B est appliqué pendant 60 min suivi par un plateau de 10 min en 60 % de B. Le cycle d'injection complet est de 85 min en prenant en compte le temps d'équilibration de la colonne.

# 4.5.3.2 Analyse LC-MS-MS des sous-fractions impliquées dans la sécrétion des hormones intestinales

Une séparation RP-HPLC de chaque sous-fraction est réalisée sur une colonne Kromasil C<sub>18</sub> (100x2,1 mm, 3,5  $\mu$ m) équipée avec une pré-colonne (AIT France, Houilles, France). Le volume d'injection est de 30  $\mu$ L. L'élution est réalisée à un débit de 200  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> avec comme solvant A un mélange 99,9 % d'eau ultrapure, 0,1 % d'acide formique et comme solvant B un mélange de 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique. Le gradient appliqué est décrit dans le *Tableau 3*:

Tableau 3 : Gradient du solvant B appliqué dans l'analyse LC-MS-MS des sous-fractions bioactives

Temps (min)	% solvant B
5	0
15	5
16	10
26	10
27	15
37	15
40	70
45	70
50	0
60	0

Les paramètres MS-MS ont été appliqués comme expliqué en début de section (4.5.3).

#### 4.6 Étude de la modulation de l'expression des gènes

Le premier objectif de cette expérience est d'étudier l'influence d'un échantillon provenant de la digestion GI de l'hémoglobine bovine sur l'expression des gènes codant pour l'expression des CCK et du proglucagon. Le deuxième est d'étudier l'expression du gène codant pour la DPP-IV dans des cellules Caco-2 différenciées (cultivées sur insert) ou non. L'expérience est réalisée en deux temps avec une mise en contact des différents échantillons avec les cellules et

l'étude de la modulation de l'expression des gènes ciblés par PCR quantitative en temps réel (rt-qPCR).

#### 4.6.1 Principe de la PCR quantitative en temps réel (rt-qPCR)

La PCR ou *Polymerase Chain Reaction* est une technique de biologie moléculaire qui permet d'amplifier in vitro une région spécifique d'acides nucléiques donnés afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Une série de réactions aboutissant à la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle et consiste en trois étapes principales : dénaturation de l'ADN double brin, hybridation d'amorces spécifiques au niveau de la séquence à répliquer et polymérisation du brin complémentaire. La PCR quantitative en temps réel ou reverse transcriptase quantitative PCR repose sur la possibilité de suivre en temps réel le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Elle réalise la transcription d'un ARN en ADN complémentaire par une transcriptase inverse (reverse transcriptase). Elle est utilisée pour quantifier les niveaux d'expression des gènes de manière absolue ou relative. A chaque cycle de PCR, les données de fluorescence collectées représentent la quantité de données amplifiées à un instant t. Le nombre de cycles seuil ou Ct est défini comme étant le nombre minimal de cycles pour lequel la fluorescence est supérieure au bruit de fond. La méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  est la méthode de quantification relative la plus fréquemment utilisée pour calculer l'expression relative d'un gène au sein d'un tissu ou d'un organisme en présence de différents traitements par rapport aux conditions contrôle. L'utilisation d'un gène de référence, gène dont l'expression ne varie pas selon les conditions de traitement, permet de normaliser les résultats de PCR. Le calcul du  $\Delta\Delta_{Ct}$  est défini par la relation suivante (Livak and Schmittgen, 2001):

$$\Delta \Delta_{Ct} = \left( Ct_{\acute{e}chantillon} - Ct_{\acute{e}f\acute{e}rence} \right) - \left( Ct_{\acute{e}chantillon} - Ct_{contrôle} \right)$$

avec  $C_{t \ \acute{e} chantillon}$ , le nombre de cycles seuils du gène ciblé en présence de l'échantillon testé,  $C_{t \ \acute{e} férence}$ , le nombre de cycles seuils du gène de référence et  $C_{t \ contrôle}$ , le nombre de cycles seuils du gène ciblé en présence de la condition contrôle.

#### 4.6.2 Protocole de la mise en contact des échantillons avec les cellules STC-1

Les cellules STC-1 sont ensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 200 000 cellules par puits dans du DMEM supplémenté et ont été cultivées jusqu'à confluence (environ 3 jours de culture) à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Le jour de l'expérience, les surnageants sont retirés et les puits sont rincés avec 1 mL de milieu de culture sans SVF et pré-incubé à 37°C.

Les digestats ou fractions peptidiques à tester sont préparés dans du milieu de culture sans SVF, le pH est ajusté à 7 avec des solutions de NaOH (1 M) et de HCl (1 M) et ils sont équilibrés à 37°C avant le contact. Un volume de 1 mL des contrôles (milieu de culture sans SVF) et des échantillons à tester est déposé en triplicatas. Les plaques de culture sont incubées pendant 24 heures à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Les surnageants sont ensuite retirés, les cellules sont rincées avec un tampon phosphate PBS (0,01 M, pH 7,4) et congelées à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

## 4.6.3 Protocole de culture des cellules Caco-2 pour l'étude de l'expression du gène codant pour la DPP-IV

Le clone cellulaire Caco-2 ATCC a été utilisé pour étudier l'expression du gène codant pour la DPP-IV. Les cellules ont été cultivées dans une flasque T75 avec du DMEM supplémenté à  $37^{\circ}$ C, 5 % de CO<sub>2</sub> entre 3 et 7 jours, soit juste avant la différenciation (Darmoul et al., 1992). Parallèlement, des cellules ont été ensemencées à 100 000 cellules.cm<sup>-2</sup> sur des inserts de culture cellulaire de 4.2 dans du DMEM supplémenté changé tous les 2-3 jours pendant 21 jours à  $37^{\circ}$ C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Après le temps de culture choisi, les cellules sont rincées avec un tampon phosphate PBS (0,01 M, pH 7,4) et congelées à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

#### 4.6.4 PCR quantitative en temps réel (rt-qPCR)

Les niveaux relatifs de transcription des gènes codant pour les CCK, le proglucagon, la prohormone convertase 1 (PC1), la DPP-IV ainsi que les gènes de référence 36B4 et PpiA (peptidylprolyl isomérase) sont analysés par PCR quantitative en temps réel. Les gènes 36B4 et PpiA sont utilisés comme gènes de référence respectifs des gènes codant pour les hormoneset du gène codant pour la DPP-IV. Les ARN totaux des cellules STC-1 ou des cellules Caco-2 sont extraits en utilisant le kit NucleoSpin ® RNA-XS (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon les instructions données par le fournisseur. La concentration et la pureté de chaque échantillon est évaluée avec un NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Darmstadt, Allemagne). L'ADN complémentaire est obtenu par transcription inverse avec un gradient Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Allemagne) en utilisant le kit the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific). Enfin, les ADN complémentaires inverses transcrits sont quantifiés en utilisant la méthode comparative Ct avec un système StepOne<sup>™</sup> Plus, le mix ABsolute Blue qPCR SYBR Green Low Rox (Thermo Scientific) et les amorces suivantes (F) 5'-CCAATTTTTCCTGCCCGCAT-3' et (R) 5'-AGAAGGAGCAGTCAAGCCAAA-3' CCK; (F) 5'pour les

AGAGACATGCTGAAGGGACC-3' et (R) 5'-CTTTCACCAGCCACGCAATG-3' pour le 5'-GCCGAAGAACTGGGGTATGA-3' 5'proglucagon; (F) et (R) CCCACGTCACACGATCATCA-3' PC-1; (F) pour la 5'-AGCGCGTCCTGGCATTGTGTGG-3' et (R) 5'-GGGCAGCAGTGGTGGCAGCAGC-3' (F) 5'-CGGAGTCCTGGGTTTCAGTT-3' 5'pour 36B4. et (R) CCTCCAACCTCACGTGGAC-3' pour DPP-IV et (F) 5'-TGCTGACTGTGGACAACTCG-3' et (R) 5'-TGCAGCGAGAGCACAAAGAT-3'pour PpiA, toutes provenant de chez Eurogentec (Liège, Belgique). Les conditions de cycle consistent en 15 min à 95°C, 40 cycles de 15 sec à 95°C, 30 sec à 60 ou 61°C et 30 sec à 72°C suivi par une étape de courbe de fusion. Le niveau relatif d'ARN est calculé selon la méthode  $2-\Delta\Delta Ct$  ( $\Delta\Delta Ct$  method, Applied Biosystems User Bull. #2 Dec. 97) en utilisant 36B4 ou PpiA comme contrôle interne (gène de référence) et est exprimé en pourcentage relatif du niveau du groupe contrôle. Test d'inhibition de l'activité enzymatique de la DPP-IV

L'objectif de cette expérience est de mettre en évidence des inhibiteurs d'origine peptidique de l'activité de la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). Ici, deux méthodes spectrométriques ont été utilisées et sont présentées ci-dessous.

#### 4.7.1 Principes généraux des méthodes spectrométriques utilisées

## 4.7.1.1 Spectrométrie d'absorption dans le domaine de l'ultraviolet et du visible (UV-Vis)

Chaque molécule possède une énergie interne qui obéit à des règles de quantification. Lorsqu'elle est exposée à des photons provenant d'une source lumineuse du domaine UV-Vis, ils vont pouvoir être absorbés et entrainent ainsi une modification des états d'énergie de la molécule qui sont à l'origine de transitions électroniques. La spectrométrie UV-Vis est donc fondée sur le phénomène d'absorptions des photons par la molécule. Le spectre électronique est la fonction reliant l'intensité absorbée par la molécule en fonction de la longueur d'onde. Il est plus souvent représenté en fonction de l'absorbance, grandeur définie par la relation suivante :

$$A = -\log(\frac{I}{I_0})$$

avec I intensité lumineuse transmise et  $I_0$  intensité incidente.

Les groupements fonctionnels responsables du phénomène d'absorption sont appelés groupements chromophores. La spectrométrie UV-Vis est exploitée en analyse quantitative grâce à la relation de Beer-Lambert qui permet de relier l'absorbance à la concentration d'une molécule par la formule :

$$A = \varepsilon. c. l$$

avec **A** absorbance mesurée à la longueur d'onde  $\lambda$ ,  $\varepsilon$  le coefficient d'absorption molaire de la molécule à la longueur d'onde  $\lambda$  en L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>, **c** la concentration de la molécule en mol. L<sup>-1</sup> et **l** la longueur de la cuve en cm.

#### 4.7.1.2 Fluorimétrie

Suite à l'excitation par une source lumineuse, le composé peut absorber l'énergie et la restituer sous la forme d'un rayonnement ou la réémettre quasi-instantanément à une longueur d'onde plus grande que celle de la lumière d'origine. Ce composé est alors qualifié de fluorescent. La fluorescence d'une molécule peut être directement corrélée à sa rigidité structurale : plus la molécule est rigide, plus son émission radiative est majoritaire. L'intensité de la fluorescence dépend de la concentration, du pH, du solvant, de la force ionique et de la température. La relation entre concentration et fluorescence peut être établie par le calcul du rendement quantique de fluorescence  $\phi$  :

$$\phi = \frac{nombre \ de \ photons \ \acute{emis}}{nombre \ de \ photons \ absorbés} = \frac{I_f}{I_a}$$

Il est ensuite possible de relier If à la concentration du composé par une relation linéaire dépendante de la concentration, des conditions expérimentales et du composé. En dehors des molécules possédant une fluorescence naturelle, certaines peuvent le devenir suite à une modification ou une association avec une autre molécule fluorescente. Le greffage de réactifs fluorophores (comme le groupement 7-hydroxycoumarine) par réaction chimique génère de nouvelles molécules fluorescentes. Les applications de l'analyse par fluorescence sont nombreuses et variées. En biochimie, la fluorescence peut servir à quantifier les protéines ou les acides nucléiques.

#### 4.7.2 Principe général du test d'inhibition de l'activité de la DPP-IV

Deux tests ont été mis au point dont le principe général est identique. Il s'agit de mettre la DPP-IV en présence d'un substrat préférentiel chromophore ou fluorescent et d'un inhibiteur

potentiel. L'hydrolyse du substrat par l'enzyme génère le groupement chromophore ou fluorophore. En absence d'inhibiteur (témoin négatif d'inhibition), le signal détecté (absorbance ou fluorescence) correspond à 100 % d'activité d'enzymatique ou 0 % d'inhibition. Le signal mesuré en présence de l'inhibiteur, inférieur à celui mesuré pour le témoin négatif, est rapporté à celui du témoin négatif et converti en pourcentage d'inhibition. Le test par spectrophotométrie nécessite l'utilisation du substrat Gly-Pro-p-nitroaniline (Gly-Pro-pNA), qui, sous l'activité protéolytique de la DPP-IV, génère le dipeptide Gly-Pro et le groupement chromophore p-nitroaniline détectable à 405 nm et 410 nm. Le test par fluorimétrie repose sur l'utilisation du substrat Gly-Pro-7-amido-4-méthylcoumarine (Gly-Pro-AMC) libérant, sous le clivage de la DPP-IV, le dipeptide Gly-Pro et le groupement fluorophore 7-amido-4-méthylcoumarine dont les longueurs d'ondes d'excitations et d'émissions sont respectivement de 360-380 nm et de 440-460 nm. Pour les deux expériences, la concentration de l'échantillon inhibant la moitié de l'activité enzymatique ou IC<sub>50</sub> est déterminée pour chaque échantillon testé. Elle est exprimée en mg.mL<sup>-1</sup> (poids sec/volume) pour les digestats ou fractions et en µM pour les peptides synthétiques. Le pourcentage d'inhibition de l'activité DPP-IV induit par chaque échantillon est d'abord calculé grâce à la formule suivante :

% inhibition = 
$$\frac{signal (\acute{e}chantillon)}{moyenne signal (témoin négatif)}$$

avec **signal**, valeur d'absorbance ou de fluorescence enregistrée en présence de l'échantillon et **témoin négatif**, puits ne contenant que le substrat et l'enzyme.

Ensuite, les valeurs d'inhibitions obtenues sont représentées en fonction du logarithme népérien de la concentration finale de l'échantillon testé. Une régression linéaire permet d'obtenir la relation suivante :

% inhibition = 
$$a * ln(\acute{e}chantillon) + b$$

où a et b sont respectivement la pente et l'ordonnée à l'origine.

La valeur de l'IC<sub>50</sub> est ensuite déterminée par la relation linéaire suivante :

$$IC_{50} = exp^{\frac{50-b}{a}}$$

Pour les deux expériences, le témoin positif de l'inhibition de l'activité DPP-IV est le tripeptide Ile-Pro-Ile (IPI) ou diprotine A.

#### 4.7.3 Mesure par spectrophotométrie

Le potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV est mesuré en triplicatas dans une plaque 96 puits par spectrophotométrie. Les échantillons testés (digestats, fractions peptidiques ou peptides synthétiques) sont dilués avec du tampon Tris-HCl pH 8,0 0,1 M aux concentrations désirées. Une solution enzymatique de DPP-IV porcine est préparée dans le tampon Tris-HCl à la concentration de 0,018 U.mL<sup>-1</sup> ainsi qu'une solution de substrat Gly-Pro-pNA à 1 mM également dans le tampon Tris-HCl. Dans chaque puits, 25  $\mu$ L des échantillons dilués sont pré-incubés avec 75  $\mu$ L de tampon réactionnel et 25  $\mu$ L de la solution enzymatique à 37°C pendant 5 min. Un témoin négatif constitué de 100  $\mu$ L de tampon réactionnel et de 25  $\mu$ L de la solution enzymatique est incubé à 37°C pendant 5 min ainsi qu'un témoin d'autolyse du substrat constitué soit de 125  $\mu$ L de tampon réactionnel (pour le témoin négatif) soit de 75  $\mu$ L de la solution de substrat Gly-Pro-pNA sont distribués dans tous les puits. La plaque est ensuite incubée pendant 1 h à 37°C sous agitation modérée. L'absorbance est lue à  $\lambda$  = 405 nm toutes les 2 min par un spectrophotomètre ELx808 Absorbance Reader (BioTek Instruments Inc., Etats-Unis). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont calculées comme décrit précédemment (4.7.2).

#### 4.7.4 Mesure par fluorimétrie

#### 4.7.4.1 Test d'inhibition de l'activité DPP-IV avec l'enzyme purifiée

Le potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV des digestats, fractions peptidiques et peptides synthétiques a également été mesuré en utilisant un substrat fluorescent, le Gly-Pro-AMC. Le tampon utilisé pour la préparation des solutions enzymatiques, de substrat et des dilutions des échantillons testés est un tampon phosphate (0,01 M, pH 7,4). Ce dernier est plus adapté aux conditions cellulaires que le tampon Tris-HCl dont le protocole est décrit dans le paragraphe suivant (4.7.4.2). Il est ici utilisé pour pouvoir comparer la source enzymatique utilisée. Une solution enzymatique de DPP-IV porcine est réalisée à la concentration de 0,018 U.mL<sup>-1</sup> ainsi qu'une solution de substrat à 1 mM. Dans une plaque 96 puits opaque, 25  $\mu$ L des échantillons dilués sont pré-incubés avec 75  $\mu$ L de tampon phosphate (0,01 M, pH 7,4) et 25  $\mu$ L de la solution enzymatique à 37°C pendant 5 min. Des témoins d'autolyse du substrat en présence ou non des échantillons testés sont également réalisés (25  $\mu$ L de l'échantillon testé et 100  $\mu$ L de tampon phosphate ou 125  $\mu$ L de tampon phosphate) et pré-incubés. La solution de substrat est ensuite distribuée dans tous les puits à hauteur de 50  $\mu$ L par puits. La fluorescence est enregistrée toutes les 2 min pendant 1 h par un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco,
Monaco) équipée d'un bain-marie thermostaté à  $37^{\circ}$ C. Le voltage est fixé à 250 V. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont de 360 nm et de 438 nm respectivement. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont calculées comme décrit précédemment (4.7.2).

#### 4.7.4.2 Test d'inhibition in situ de l'activité DPP-IV sur cellules Caco-2

Les cellules Caco-2 sont ensemencées dans des plaques 96 puits opaques à une densité de 20 000 cellules par puits (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, Etats-Unis). Le test d'inhibition de l'activité DPP-IV est réalisé lorsque les cellules sont à confluence, soit environ 4 jours après l'ensemencement. Le substrat fluorescent Gly-Pro-AMC est préparé à une concentration de 1 mM dans du tampon phosphate (0,01 M, pH 7,4) ainsi que les digestats, fractions peptidiques et peptides synthétiques aux concentrations voulues. Tous les réactifs sont pré-incubés à 37°C avant utilisation. Les puits sont tout d'abord rincés avec 100  $\mu$ L de tampon phosphate pré-incubé à 37°C. Puis un volume de 75  $\mu$ L de tampon phosphate est déposé dans tous les puits suivi par un ajout de 25  $\mu$ L de l'échantillon testé ou 25  $\mu$ L de tampon phosphate (témoin négatif). La plaque est pré-incubée pendant 5 min à 37°C avant l'ajout de 50  $\mu$ L de la solution de substrat dans tous les puits. La lecture de la fluorescence est réalisée dans les mêmes conditions que décrites dans le paragraphe précédent (4.7.4.1). Le calcul des valeurs d'IC<sub>50</sub> est réalisé comme décrit précédemment (4.7.2).

#### 4.8 <u>Passage d'une barrière de cellules Caco-2, modèle de la barrière intestinale</u>

#### 4.8.1 Protocole de l'expérience de passage de barrière de cellules Caco-2

L'objectif est d'utiliser un modèle de barrière intestinale pour étudier le passage de peptides provenant des digestats d'hémoglobine bovine ou de peptides synthétiques. Les expériences de passage de barrière de cellules Caco-2 ont été menées en collaboration avec le Pr. Sophie Lestavel et le Dr. Véronique Touche de l'UMR 1011 INSERM. La lignée cellulaire utilisée est la lignée Caco-2 TC7 dont les conditions de culture ont été décrites au paragraphe 4.3.2. Pour obtenir un modèle de barrière intestinale, les cellules Caco-2 TC7 sont cultivées sur des inserts afin de constituer une monocouche cellulaire. Les solutions dites de transport sont les solutions contenant les molécules d'intérêt (ici les fractions peptidiques ou les peptides) reprises avec un milieu de transport étant un milieu HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) ou un milieu DMEM et dont le passage de barrière cellulaire est étudié. L'étude est menée sur une plaque de 6 puits. Des inserts d'une surface de 4,2 cm<sup>2</sup> sont ensemencés à une densité de 60 000 cellules par cm<sup>2</sup>. Une culture symétrique est menée pendant une semaine : du milieu

de culture complet est changé tous les jours dans les compartiments apicaux et basolatéraux. Puis une culture asymétrique est menée pendant deux semaines avec changement de milieu quotidien dans les deux compartiments (le compartiment apical recevant du milieu de culture sans SVF alors que le compartiment basolatéral recevant du milieu de culture complet). Le jour de l'expérience, les puits sont rincés avec un tampon phosphate PBS (0,01 M, pH 7,4) dans les compartiments apicaux et basolatéraux. Les solutions de transport sont mises à équilibrer à 37°C. Un volume de 2,5 mL du milieu de transport de l'expérience est d'abord placé en partie basolatérale du puits. Puis un volume de 1 mL de la solution à tester ou du milieu de transport (puits contrôle) est ajouté dans le compartiment apical du puits. Les plaques sont incubées pendant 2 h à 37°C, 10 % de CO<sub>2</sub>. Des prélèvements de 100  $\mu$ L ont été réalisés dans les compartiments apicaux et basolatéraux au bout de 5, 15, 30, 60 et 120 min d'incubation. À la fin de la cinétique de passage, l'intégralité des surnageants apicaux et basolatéraux est collectée. Tous les prélèvements sont centrifugés 5 min à 10 000 g à 4°C, les surnageants sont collectés et congelés à -20°C.

#### 4.8.2 Estimation de la perméabilité apparente de la barrière cellulaire

#### 4.8.2.1 Principe de l'expérience

La perméabilité apparente de la barrière cellulaire Caco-2 est estimée grâce à la *Lucifer Yellow* (LY). La LY est un colorant fluorescent hydrophile passant une barrière cellulaire par voie paracellulaire. Dans le cadre de cette expérience, la LY est ajoutée dans les solutions de transport déposées en pôle apical à une concentration finale de 100  $\mu$ M. La perméabilité apparente est calculée grâce à la formule ci-dessous :

$$Japp = \frac{dQ}{dt} \times \frac{V}{A * C_0}$$

avec dQ/dt le taux de perméabilité déterminé par la pente de la régression linéaire de la concentration en LY dans le surnageant basolatéral en fonction du temps, V le volume basolatéral, A l'aire de l'insert et C<sub>0</sub> la concentration initiale déposée de LY

La valeur de  $J_{app} = 1.10^{-6}$  cm.s<sup>-1</sup> a été adoptée comme valeur seuil car elle est fréquemment rencontrée dans la littérature comme étant la valeur maximale indiquant un maintien de l'intégrité de la barrière cellulaire.

### 4.8.2.2 Protocole d'estimation de la perméabilité apparente d'une barrière cellulaire Caco-2

Les concentrations de LY au cours du temps dans les compartiments apicaux et basolatéraux sont déterminées par spectrofluorimétrie. Dans une plaque 96 puits opaque, un volume de 50  $\mu$ L de l'échantillon à mesurer (surnageant, gamme étalon) est déposé. Des gammes de concentrations de LY sont tout d'abord réalisées en triplicatas en utilisant les solutions déposées dans les compartiments apicaux (avec ou sans peptides) à des concentrations allant de 0,1 à 100  $\mu$ M. Les dilutions sont faites avec la solution de transport de l'expérience considérée. Les surnageants récoltés durant la cinétique de passage sont dilués au 1/50<sup>e</sup> pour les compartiments apicaux avec la solution de transport et sans dilution pour les compartiments basolatéraux pour la mesure. La lecture de la plaque est réalisée à l'aide d'un spectrofluorimètre lecteur de microplaques Xenius XC (Safas Monaco, Monaco) réglé à un voltage de 200 V et à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 485 et 530 nm respectivement. À partir des gammes de LY, la concentration en LY est calculée dans tous les compartiments des puits contrôle et des puits contenant les peptides. Les concentrations obtenues de LY dans les compartiments basolatéraux sont représentées en fonction du temps pour chaque condition et la pente de la régression linéaire obtenue représente la valeur dQ/dt.

### 4.8.3 Identification des séquences peptidiques dans les surnageants par spectrométrie de masse en mode tandem

#### 4.8.3.1 Analyse LC-MS-MS des surnageants apicaux et basolatéraux des expériences de passage de la barrière de cellules Caco-2

Les surnageants apicaux et basolatéraux de passage de barrière Caco-2 sont analysés par spectrométrie de masse en mode tandem couplée à une séparation chromatographique sur phase inverse et sur une colonne HILIC. Le volume d'injection est de 20  $\mu$ L pour les échantillons apicaux et la solution initiale peptidique et de 50  $\mu$ L pour les échantillons basolatéraux. Les conditions chromatographiques utilisées pour chaque colonne sont récapitulées dans le *Tableau 4*. Les paramètres MS et MS-MS sont identiques à ceux décrits au paragraphe 4.8.3.

Colonna	Principe	Dábit	Solvente	Cradient	Cycle
Colonne	séparatif	Debit	Solvants	Graulent	d'injection
Kromasil C <sub>18</sub> 100x2,1 mm, 3,5 μm, équipée avec une pré-colonne (AIT France, Houilles, France)	Phase inverse	200 µL.min <sup>-</sup> 1	A : 99,9 % d'eau ultrapure, 0,1 % d'acide formique B : 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique	<ul> <li>10 min à 0 %B puis trois plateaux</li> <li>successifs de 10 min à</li> <li>2,5 % B, 5 % B et 10 % B suivi par un</li> <li>plateau maintenu à 70 % B pendant 5 min</li> </ul>	60 min
HILIC 100 Å, 2,6u,150x3,0 mm, équipée d'une pré-colonne (Phenomenex, Le Pecq, France)	Phase normale	400 μL.min <sup>-</sup> 1	A : 3 % d'eau ultrapure, 97 % d'acétonitrile, 5 mM de formiate d'ammonium, pH 4,5 B : 40 % d'eau ultrapure, 60 % d'acétonitrile, 5 mM de formiate d'ammonium, pH 4,5.	Gradient linéaire de 5 % B à 100 % B en 60 min suivi par un plateau de 5 min à 100 % B	85 min

**Tableau 4** : Conditions chromatographiques utilisées pour l'analyse LC-MS-MS des surnageants du passage de barrière Caco-2

Pour la sélection des séquences peptidiques candidates à la synthèse, les surnageants basolatéraux ainsi que la solution initiale ont été analysés par spectrométrie de masse en mode SIM (*Selected Ion Monitoring*). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne HILIC dans des conditions identiques à celles décrites ci-dessus (*Tableau 4*). Le volume d'injection est de 50  $\mu$ L pour les échantillons basolatéraux et de 20  $\mu$ L pour la solution peptidique initiale. Les conditions MS et MS-MS sont identiques à celles renseignées au paragraphe 4.8.3.1.

### 4.8.3.2 Analyse MRM des surnageants apicaux et basolatéraux provenant de l'expérience de passage de la barrière de cellules Caco-2

La quantification d'un peptide précis dans les surnageants apicaux et basolatéraux est réalisée par spectrométrie de masse en mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) couplée à la chromatographie liquide. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne

Kromasil C<sub>18</sub> (100x2,1 mm, 3,5  $\mu$ m) équipée d'une pré-colonne (AIT France, Houilles, France). Le volume d'injection des échantillons basolatéraux est de 50  $\mu$ L et celui des échantillons apicaux de 20  $\mu$ L dilués au 1/100<sup>e</sup> avec la solution de transport (HBSS, 10 mM Hepes). L'élution est réalisée à un débit de 200  $\mu$ L.min<sup>-1</sup> avec comme solvant A un mélange 99,9 % d'eau ultrapure, 0,1 % d'acide formique et comme solvant B un mélange de 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique. La colonne est équilibrée 2 min à 5 % B puis un gradient linéaire de 5 % B à 50 % B est réalisé en 2 min. Le cycle d'injection complet est de 7 min en prenant en compte le temps d'équilibration de la colonne. L'analyse MRM est réalisée dans les conditions suivantes. L'énergie appliquée dans la cellule de collision est de 50 ± 20 eV et la tension de désolvatation, de 100 V. Une gamme de calibration du peptide est réalisée en triplicata à partir de la solution initiale du peptide synthétique utilisée pour l'expérience de passage. Les dilutions sont réalisées avec de l'eau ultrapure et les concentrations testées sont comprises entre 0,001 et 10 pmol. $\mu$ L<sup>-1</sup>.

#### 4.8.3.3 Traitement des données de spectrométrie de masse

Toutes les données MS-MS obtenues par le spectromètre de masse QTrap sont traitées par le logiciel de protéomique Peaks Studio Version 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada). Le logiciel est programmé pour que l'identité des séquences peptidiques soit recherchée parmi les deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  a de l'hémoglobine bovine (UniProtKB : P01966 et P02070 respectivement). L'erreur de tolérance de masse est fixée à 0,6 Da pour les ions précurseurs et fragments avec une recherche monoisotopique. Aucune enzyme n'est programmée pour la digestion *in silico* et le nombre de clivages manqués est fixé à 100. Les critères d'acceptation des séquences peptidiques identifiées sont fixés à un score -10logP supérieur ou égal à 15 et un score ALC (*Average Local Confidence*) supérieur ou égal à 50 %. La charge des ions varie de 1 à 3. Toutes les séquences identifiées par recherche en base de données ou recherche *de novo* sont prises en compte.

#### 5 Traitement statistique des données

Les données sont représentées en moyenne  $(n=3) \pm$  écart type. Les analyses de variance (ANOVA) à un ou deux facteurs ainsi que l'analyse de la covariance (ANCOVA) sont réalisées par le logiciel XLSTAT Pro software (version 2016 1.01, Addinsoft, Brooklyn, NY, Etats Unis). La valeur de la *p value*, c'est-à-dire la probabilité que la différence observée soit

due au hasard de l'échantillonnage, est fixée à 0,05. Dans le cas où p < 0,05, les analyses ANOVA et ANCOVA sont suivis par un test *post hoc* de Tukey.

## Résultats

# 1 Digestion gastro-intestinale de l'hémoglobine bovine : modèles *in vitro* et caractérisations analytiques des peptidomes générés

#### 1.1 Introduction

L'enjeu de cette première partie est de mettre en place un modèle de digestion GI in *vitro* appliqué à une protéine modèle, puis de caractériser l'ensemble des populations peptidiques (ou peptidomes) obtenues par différentes stratégies analytiques. Cette caractérisation analytique a abouti à la conception de cartographies peptidiques visant à représenter le devenir de la protéine lors de la digestion et à réaliser l'élaboration d'une base de données de peptides, outil fondamental dans le cadre de la recherche de peptides bioactifs. Dans un second temps, la conception d'une matrice alimentaire et une étude de digestion *in vitro* dynamique ont été réalisées afin de valider le modèle utilisé et de se rapprocher des conditions physiologiques de la digestion humaine.

#### 1.2 Description du modèle de digestion *in vitro* statique

Le modèle de digestion a été décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes (paragraphe 2.3). Il simule les trois grandes étapes de digestion dans le tractus GI, à savoir la bouche, l'estomac et l'intestin. Un schéma récapitulatif du modèle a été réalisé (*Figure 35*).



Figure 35: Modèle de digestion statique in vitro de l'hémoglobine bovine

Chaque phase de digestion est caractérisée par un fluide simulé représentatif du pH et du contenu enzymatique de l'organe simulé. La bile a été exclue des fluides intestinaux en raison de son pouvoir détergent potentiellement nocif pour les cellules intestinales utilisées dans le cadre de l'étude des activités biologiques des digestats. De plus, l'absence de lipides dans la matière première modèle ne nécessite pas l'ajout de bile. Connaissant la quantité protéique introduite dans le réacteur, toutes les concentrations des digestats ont été calculées en poids sec/volume. Elles ont été néanmoins vérifiées par un dosage à l'acide bicinchoninique (BCA).

#### 1.3 Démarche analytique adoptée

L'objectif de cette partie de l'étude est de mettre en œuvre une démarche analytique spécifique pour caractériser le peptidome, c'est-à-dire l'ensemble de la population peptidique présente dans les digestats gastriques et intestinaux. Les conditions d'hydrolyse de la digestion GI sont à l'origine d'une population peptidique diversifiée en termes de taille et de composition en acides aminés. Afin d'identifier un nombre maximum de peptides au sein d'un digestat, plusieurs techniques analytiques ont été couplées afin de répondre à deux objectifs :

- Vérifier la reproductibilité des populations peptidiques des digestats générés à chaque digestion GI *in vitro* par une méthode rapide et fiable.
- Caractériser exhaustivement les populations peptidiques présentes dans chaque digestat en identifiant le plus grand nombre de peptides.

Dans ce but, il a été décidé d'utiliser des techniques de chromatographies en phase inverse (RP-HPLC) et d'exclusion stérique (SEC) couplées à la détection UV pour la séparation des peptides. Pour l'identification des séquences peptidiques, des techniques de spectrométrie de masse en mode tandem ont été utilisées comme l'ionisation/désorption laser assistée par matrice (MALDI) et l'ionisation par électrospray (ESI) en basse et haute résolution. La démarche adoptée est résumée dans la figure ci-dessous (*Figure 36*):



Figure 36 : Démarche analytique adoptée pour l'analyse du peptidome

La partie gauche de la *Figure 36* représente la stratégie adoptée pour une analyse visant à estimer la reproductibilité et la qualité de chaque digestion GI réalisée. L'objectif est d'obtenir une empreinte caractéristique de la population peptidique générée à un temps donné de la digestion qui servira d'outil de contrôle de la reproductibilité des expériences. L'association de profils UV issus des séparations par RP-HPLC et SEC des digestats et de leurs spectres MS a permis d'obtenir une empreinte caractéristique de chaque phase de la digestion. En revanche, l'identification précise des séquences peptidiques nécessite l'utilisation de la spectrométrie de masse en mode tandem, illustrée dans la partie droite de la *Figure 36*. Dans le cas d'analyses d'échantillons complexes comme des digestats protéiques, une séparation préliminaire en amont de la MS-MS est essentielle et peut être réalisée soit *off line*, par exemple en fractionnant préalablement l'échantillon par RP-HPLC, soit *on line* en couplant une séparation chromatographique avant l'introduction dans le spectromètre de masse. Face à la diversité peptidique contenue dans les digestats, l'utilisation d'une sonde haute résolution est nécessaire pour permettre une identification exhaustive des peptidomes.

#### 1.4 Contrôle de la qualité des digestats gastriques et intestinaux d'hémoglobine bovine

#### **1.4.1** Analyses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Les profils peptidiques des digestats gastriques et intestinaux finaux (120 min de chaque phase) sont présentés ci-dessous (*Figure 37*).



**Figure 37**: Profils de séparation SEC des digestats gastriques et intestinaux 120 min Trait plein : digestat agstrique. Trait pointillé : digestat intestinal. La séparation a été réalisée avec une colonne Superdex Peptides 10/300 GL en appliquant une élution isocratique d'un mélange 30 % d'acétonitrile, 69,9 % d'eau ultrapure, 0,1 % de TFA pendant 60 min à un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. La détection est réalisée à 215 nm. La relation de régression linéaire existant entre le Log du poids moléculaire des standards et leur coefficient de diffusion *K* a été utilisée pour calculer le poids moléculaire apparent.

Les profils obtenus couvrent une large gamme de masse en dessous de 10 kDa. Les poids moléculaires apparents de la population peptidique gastrique sont compris entre 0,5 kDa et 10 kDa avec une majorité supérieure à 1kDa. Les peptides contenus dans le digestat intestinal possèdent des poids moléculaires apparents compris entre 0,1 kDa et 10 kDa avec une majorité inférieure à 1 kDa. L'action de la pepsine a créé un peptidome complexe s'étendant sur une large gamme de poids moléculaires. L'action enzymatique de la pancréatine a engendré une baisse du poids moléculaire apparent moyen de la population peptidique intestinale dont la majorité des peptides possède un poids moléculaire apparent inférieure à 1 kDa.

#### 1.4.2 Analyses des digestats par chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC)

La séparation des échantillons salivaires, gastriques et intestinaux par RP-HPLC a permis de confirmer et de préciser les tendances observées pour les résultats obtenus par SEC. L'analyse de la phase salivaire a montré l'apparition de trois pics à différents temps de rétention (*Figure 38*).



Figure 38: Profil de séparation RP-HPLC de la phase salivaire

La séparation est réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient 0-70 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

Ces trois pics correspondent à plusieurs parties de la protéine : la chaîne  $\alpha$  (t<sub>R</sub> = 66 min), la chaîne  $\beta$  (t<sub>R</sub> = 75 min) et l'hème (t<sub>R</sub> = 78 min). Ainsi, lors de la phase salivaire, aucune dégradation des chaînes peptidiques n'a été observée. Après deux heures de phase gastrique, aucune quantité mesurable des chaînes d'hémoglobine n'a été détectée aux temps de rétention caractéristiques, seul l'hème a persisté (*Figure 39*A).



#### Figure 39: Profils de séparation RP-HPLC des digestats de la phase gastrique.

**A :** digestat gastrique 120 min et **B** : zoom sur les profils 30 min (bleu) et 120 min (bleu foncé) du digestat gastrique.La séparation est réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient 0-70 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

Une multitude de pics a été éluée à des temps de rétention antérieurs à ceux des chaînes de l'hémoglobine bovine. Tous les profils chromatographiques des digestats gastriques (collectés à 30, 60, 90 et 120 min) ont présenté des temps de rétention globalement identiques (entre  $t_R$  = 30 min et  $t_R$  = 60 min) mais une fluctuation des aires des pics a été observée au fur et à mesure de la progression de la digestion gastrique. Comme observé sur le chromatogramme *Figure 39B*, les aires des pics caractérisés par des temps de rétention tardifs ( $t_R$  = 50-60 min) ont diminué tout au long de la phase gastrique alors que l'aire des pics élués plus tôt ( $t_R$  = 20-30 min) a progressivement augmenté.

L'ajout de la pancréatine lors du passage à la phase intestinale a conduit à la production d'une nouvelle population peptidique caractérisée par des pics élués à des temps de rétention relativement plus courts que ceux des profils gastriques (*Figure 40* A).



**Figure 40** : Profils de séparation RP-HPLC des digestats de la phase intestinale. A : digestat intestinal 120 min et **B** : zoom sur les profils 30 min (vert kaki) et 120 min (vert) de la phase intestinale. La séparation est réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient 0-70 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

Entre  $t_R = 5$  min et  $t_R = 20$  min, de nouveaux pics, absents des profils gastriques, sont apparus bien que d'intensité inférieure à ceux élués entre  $t_R = 20$  min et  $t_R = 50$  min. Les profils des différents échantillons intestinaux obtenus par RP-HPLC ont également été comparés et ont montré des similitudes en termes de temps de rétention. L'analyse des profils obtenus à 30 et 120 min de phase intestinale a permis de mettre en évidence une fluctuation de l'aire des pics (*Figure 40B*), toutefois moins marquée que celle observée pour les digestats gastriques. Toutes les analyses chromatographiques présentées ci-dessus ont été répétées en triplicatas pour chaque digestion GI *in vitro* et ont montré des profils comparables en termes de temps de rétention, de hauteur et d'aire des pics. Ces résultats mettent en évidence la bonne reproductibilité du procédé statique et permettent de valider ce modèle de digestion de l'hémoglobine bovine.

#### 1.4.3 Analyse MALDI-MS-MS du digestat gastrique 120 min

Afin d'obtenir une première empreinte des masses moléculaires des peptides générés en phase gastrique, une analyse MALDI-MS-MS a été réalisée sur les digestats gastriques obtenus après 120 min de digestion (n = 3). Un total de 45 séquences peptidiques distinctes, communes aux trois digestats, ont été identifiées dont 19 proviennent de la chaîne  $\alpha$  et 26 de la chaîne  $\beta$ . Plus des trois quarts des séquences sont identifiées dans chaque digestat analysé, attestant d'une certaine reproductibilité de l'expérience de digestion. Les séquences communes aux trois digestats présentent un poids moléculaire compris entre 900 et 2300 Da. Elles ont été cartographiées grâce à l'outil qui a été plus décrit au paragraphe 1.5.2.



**Figure 41**: Cartographies peptidiques du digestat gastrique 120 min établies par MALDI-MS-MS A : chaîne  $\alpha$  et **B** : chaîne  $\beta$ . La cartographie peptidique est composée des barres grises représentant chaque séquence peptidique. Le bandeau supérieur consitue la carte de chaleur composée des fréquences d'apparition A des acides aminés de la chaîne protéique. Le code couleur va de blanc (A=0) à rouge (A > 0,3).

Les peptides ont été majoritairement générés dans la partie centrale de la chaîne  $\alpha$  (*Figure* 41A). La partie centrale ainsi que l'extrémité C-terminal de la chaîne  $\beta$  ont généré la majorité

des peptides (*Figure 41B*). La liste des séquences est répertoriée dans l'annexe 1. L'analyse MALDI-MS-MS a été également menée sur les digestats intestinaux. A cause d'une abondance de poids moléculaire se confondant avec les ions de la matrice d'ionisation, les résultats obtenus n'ont pas permis de tirer d'informations claires sur la nature des séquences peptidiques. Ils n'ont donc pas été présentés.

#### 1.5 Etablissement de cartographies peptidiques des digestats gastriques et intestinaux finaux

L'approche par analyse rapide exposée ci-dessus a permis de caractériser chaque phase de la digestion de l'hémoglobine bovine par une empreinte UV et MALDI et de confirmer la bonne reproductibilité des expériences menées. Cependant, cette approche n'a pu aboutir à une caractérisation exhaustive des séquences peptidiques contenues dans chaque digestat, en raison de la grande diversité des populations peptidiques présentes. Pour accéder à cette information, la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS-MS) a été choisie. L'objectif de cette étape est d'identifier un maximum de séquences à partir de chaque peptidome et de les cartographier en fonction de la position des séquences sur la chaîne protéique native et de leur occurrence de détection par spectrométrie de masse. Dans un premier temps, une analyse en spectrométrie de masse approfondie a été menée afin d'aboutir à une identification la plus fine possible de chaque peptidome en utilisant des systèmes LC-MS-MS de basse (LR) et haute résolution (HR). A partir des séquences peptidiques identifiées, des critères de sélection ont été définis pour la conception des cartes peptidiques et des cartes de chaleur (heatmaps). Les séquences peptidiques ont été sélectionnées selon leur nombre de Peptide Spectrum Match (PSM) et leur valeur de faux positifs ou FDR (False Discovery Rate). Le PSM est l'association entre un spectre MS-MS et une séquence. Il se peut qu'elle soit fausse pour diverses raisons (spectre de faible qualité, peptides absents de la base de données). Par conséquent, la probabilité que l'association peptide-spectre soit correcte est définie par un score. Afin d'améliorer la qualité de l'identification des séquences, une valeur seuil peut être définie pour ne garder que les PSM au meilleur score. Ici, les séquences ayant un PSM ou égal à 5 ont été sélectionnées. Le FDR ou faux positifs est défini comme étant le rapport entre le nombre de faux PSM et le nombre total de PSM au-dessus de la valeur seuil, il doit donc être le plus faible possible. Pour le tri des séquences, un FDR strictement inférieur à 0,2 % a été choisi. Les cartes élaborées ont pour objectif de mieux visualiser les régions de chaque chaîne peptidique identifiées de manière récurrentes et la fréquence d'identification d'une séquence d'acides aminés traduisant la résistance de ces séquences à la digestion GI. Dans cette partie, il a été choisi de cartographier uniquement les digestats finaux des phases gastriques et intestinales de la digestion de l'hémoglobine bovine. Le mode d'élaboration des cartes est décrit au paragraphe 3.2.5 du chapitre Matériels et Méthodes.

#### 1.5.1 Identification des peptidomes gastriques et intestinaux par LC-MS-MS.

Une première approche couplant chromatographie liquide en phase inverse et spectrométrie de masse en tandem en basse résolution (LR) a été utilisée afin de pouvoir estimer l'abondance et la diversité peptidique au sein de chaque peptidome. Les protocoles employés sont décrits au paragraphe 3.2.4.1 du chapitre Matériels et Méthodes.

#### 1.5.1.1 Analyse LC-LR-ESI-MS-MS des peptidomes gastriques et intestinaux

Les digestats gastrique et intestinaux ont été séparés sur une colonne en phase inverse couplée à un triple quadrupôle. Les données ont été ensuite traitées avec le logiciel Peaks 7 en recherchant les séquences parmi les deux chaînes peptidiques de l'hémoglobine bovine (UniProt P01966 et P02070). La recherche des modifications post-traductionnelles et des mutations a également été prise en compte grâce à l'algorithme Spider du logiciel. L'élution des peptides détectés a été représenté sous forme de carte tridimensionnelle *Figure 42* grâce au logiciel Peaks 7 (temps de rétention en fonction du rapport m/z et de l'intensité du signal MS codé en gris)





A : digestat gastrique 120 min et B : digestat intestinal 120 min. L'intensité du courant ionique de chaque ion moléculaire est représentée par un code couleur allant de gris clair (nulle) à noir (maximale). La séparation a été réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient linéaire de 0-70 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique pendant 80 min.

Pour les deux digestats, une élution continue des ions moléculaires tout au long du gradient (entre  $t_R = 5$  min et  $t_R = 65$  min) met en évidence le large profil d'hydrophobie des molécules. La plupart des ions moléculaires détectés dans les deux digestats possèdent un rapport *m/z* compris entre 150 et 1000. Les nombres de spectres MS et MS-MS détectés ont respectivement atteint 2930/2372 pour le digestat gastrique et 2856/2451 pour le digestat intestinal. En revanche, le nombre de PSM a démontré être largement inférieur au nombre total de spectres MS-MS : il est de 52 pour le digestat gastrique et de 86 pour le digestat intestinal. Pour le digestat gastrique, 17 séquences peptidiques uniques ont été attribuées à au moins un spectre et pour le digestat intestinal, 26 séquences.

Au sein du digestat gastrique, 10 séquences peptidiques ont été identifiées comme provenant de la chaîne  $\alpha$  et 7 séquences provenant de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine, soit au total 17 séquences peptidiques uniques. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ont atteint des recouvrements de séquence respectifs de 28 et 16 %. La répartition des séquences au niveau des chaînes a été représentée dans la *Figure 43*.

#### Chaîne α



### *Figure 43*: Cartographies peptidiques des chaînes $\alpha$ et $\beta$ du digestat gastrique obtenues par LC-LR-ESI-MS-MS

Une séquence identifiée par une recherche en base de données (UniProt P01966 et P02070) est représentée en bleu alors qu'une identification *de novo* est représentée en gris clair.

La liste complète des séquences peptidiques est consignée dans l'annexe 2. Peu de séquences peptidiques ont été générées au niveau des extrémités N- et C-terminal des deux chaînes protéiques. Plusieurs séquences partagent un enchaînement commun d'acides aminés comme HLDDL (chaîne  $\alpha$ ) ou VVYPW (chaîne  $\beta$ ) formant ainsi une famille peptidique.

Pour le digestat intestinal, 17 séquences ont été identifiées sur la chaîne  $\alpha$  et 14 séquences sur la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine, soit au total 26 séquences peptidiques uniques. Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ont atteint des recouvrements de séquence respectifs de 35 et 31 %. La répartition des séquences au niveau des chaînes a été représentée dans la *Figure 44*.



*Figure 44* : Cartographies peptidiques des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du digestat intestinal obtenues par LC-LR-ESI-MS-MS

Une séquence identifiée par une recherche en base de données (UniProt P01966 et P02070) est représentée en bleu alors qu'une identification *de novo* est représentée en gris clair

La liste complète des séquences peptidiques est consignée dans l'annexe 3. De même qu'observé à la *Figure 43*, plusieurs séquences peptidiques partagent un même enchaînement d'acides aminés comme YGAEA. Elles proviennent de différentes régions des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , principalement localisées sur la première moitié de chaîne côté N-terminal.

#### 1.5.1.2 Analyse LC-HR-ESI-MS-MS des peptidomes gastriques et intestinaux

Les digestats gastriques et intestinaux ont été analysés par nanoLC en phase inverse couplée à un spectromètre de masse haute résolution Orbitrap Elite (protocole décrit au paragraphe 3.2.4.2 du chapitre Matériels et Méthodes). Les données générées en MS et MS-MS ont été également traitées par le logiciel Peaks 7, et la base de données utilisée pour l'identification des peptides correspond au protéome entier *Bos taurus* (UniProt). Les profils tridimensionnels du temps de rétention des ions moléculaires élués en fonction du rapport m/z et de l'intensité du signal MS ont été représentés *Figure 45*.



*Figure 45 : Profils tridimensionnels (temps de rétention en fonction de m/z et de l'intensité du signal MS) des données LC-HR-ESI-MS-MS* 

Pour les deux digestats, une élution constante a été observée tout au long du gradient. Les nombres de spectres MS et MS-MS ont atteint respectivement 13492/56329 pour le digestat gastrique et 16032/46529 pour le digestat intestinal. A la suite de ces analyses, 3884 séquences ont été identifiées dans le digestat gastrique et 1503 dans le digestat intestinal. Une valeur de faux positifs (FDR) inférieure ou égale à 0.2 a été appliquée pour éliminer les identifications peptidiques incertaines et sélectionner les séquences peptidiques identifiées sans ambiguïté dans chaque digestat : 855 peptides ont été sélectionnés dans le digestat gastrique et de 449 peptides dans le digestat intestinal. Au sein des peptidomes gastrique et intestinal, les peptides proviennent de 12 protéines identifiées appartenant à Bos taurus dont 8 communes aux deux peptidomes (HBA, HBB, HBBF, CAH2, PRDX2, BLVRB, ALBU, SODC). Quatre protéines ont été identifiées à partir des fragments peptidiques présents uniquement dans le peptidome gastrique (HBE4, UBC, CATA, DDAH2) et quatre autres protéines uniquement à partir de ceux présents au sein du peptidome intestinal (PEPA, CATA, PNPH, GSTP1). Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine sont les sources protéiques ayant généré plus de 81 % des peptides identifiés dans les digestats gastrique et intestinal.

Pour le digestat gastrique, 768 séquences peptidiques uniques provenant de l'hémoglobine bovine (chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ ) ont été identifiées. Elles sont réparties en 370 séquences provenant de la chaîne  $\alpha$  et 398 séquences provenant de la chaîne  $\beta$ . Un recouvrement de 100 % des deux chaînes protéiques a été atteint (*Figure 46*).

**A** : digestats gastrique 120 min et **B** : digestat intestinal 120 min. L'intensité du courant ionique de chaque ion moléculaire est représentée par un code couleur allant de gris clair (nulle) à noir (maximale). La séparation a été réalisée sur une colonne capillaire en appliquant un gradient linéaire d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique (de 5 % à 30 % d'acétonitrile pendant 120 min puis de 30 % à 90 % d'acétonitrile pendant 20 min) à un débit de 250 nL.min<sup>-1</sup>.



**Figure 46**: Cartographies peptidiques des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du digestat gastrique obtenues à partir des analyses LC-HR-ESI-MS-MS Une séquence identifiée par une recherche en base de données (UniProt P01966 et P02070) est représentée en bleu.

Pour chaque chaîne, trois ou quatre régions principales ont été hydrolysées et ont généré des familles peptidiques partageant un enchaînement commun d'acides aminés.

Pour le digestat intestinal, 554 séquences peptidiques uniques dont 235 séquences provenant de la chaîne  $\alpha$  et 319 de la chaîne  $\beta$  ont été identifiées. Un recouvrement de 100 % des deux chaînes protéiques a été atteint (*Figure 47*).

#### Chaîne $\alpha$





Une séquence identifiée par une recherche en base de données (UniProt P01966 et P02070) est représentée en bleu. Le point rouge correspond à une déamidation (modification post-traductionnelle).

De même que pour le peptidome gastrique, seules trois ou quatre régions de chaque chaîne ont généré la majorité de la population peptidique formant ainsi des « familles » peptidiques partageant un enchaînement commun d'acides aminés.

### 1.5.1.3 Comparaison du nombre de séquences identifiées au sein des peptidomes gastriques et intestinaux

A l'issu des analyses LC-MS-MS, un tableau comparatif du nombre de séquences identifiées provenant des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine a été dressé (*Tableau 5*).

Tableau 5:	Compare	ison du i	nombre d	e séquences	uniques	identifiées	dans	les peptidomes	s gastriques
et intestina	ux par LC	C-MS-MS	de haute	résolution (I	HR) et de	e basse réso	olution	1 (LR)	

Protéine	Peptidome gastrique		Peptidome intestina	
Résolution	HR	LR	HR	LR
HBA	370	18	235	27
HBB	398	13	319	27

Il apparait de manière évidente que l'approche basse résolution n'est pas adaptée pour une démarche d'identification la plus exhaustive possible des peptidomes. Le nombre de séquences identifiées par haute résolution dans le peptidome gastrique est au moins 20 fois supérieur à celui obtenu par basse résolution. Parallèlement, le nombre de séquences identifiées par haute résolution dans le peptidome intestinal est au moins 10 fois supérieur à celui obtenu par basse résolution. La comparaison des séquences peptidiques obtenues et de leur provenance montre que les séquences identifiées en basse résolution ont été également identifiées en haute résolution.

### **1.5.2** Etablissement des cartes de chaleur associées aux cartographies des peptidomes gastrique et intestinal

Comme présenté dans la partie Matériels et Méthodes (paragraphe 3.2.5), un outil de cartographie a été conçu sous Excel permettant de 1) visualiser la répartition des séquences peptidiques sur les chaînes de l'hémoglobine bovine et 2) connaitre pour chaque acide aminé et par chaîne protéique, la fréquence d'apparition rapportée au nombre total de séquences peptidiques identifiées. Les motifs sont considérés comme récurrents si chaque acide aminé composant le dit motif a une fréquence d'apparition *A* dans les séquences peptidiques identifiées par Peaks au moins supérieure à 0,15 (correspondant à un code couleur orange foncé sur la carte de chaleur). Les motifs ayant montré une fréquence d'apparition supérieure à 0,3 ont également été signalés (correspondant à une couleur rouge sur la carte de chaleur). Ceci a permis de mettre en avant les zones préférentielles d'hydrolyse des enzymes gastro-intestinales. Pour les deux peptidomes, la liste des peptides utilisés pour la cartographie a été réduite en ne prenant en compte que les séquences dont la valeur de PSM était supérieure ou égal à 5.

#### 1.5.2.1 Cartographie et carte de chaleur du peptidome gastrique

A partir des 855 séquences peptidiques du peptidome gastrique, 405 ont été sélectionnées pour l'établissement de la carte de chaleur. Elles permettant toujours un recouvrement de 100

% des deux chaînes. Elles sont réparties entre 203 séquences provenant de la chaîne  $\alpha$  et 202 séquences provenant de la chaîne  $\beta$ . Les cartographies peptidiques ainsi que les cartes de chaleur associées des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ont été représentées dans la *Figure 48 A et B*.



**Figure 48**: Cartographies peptidiques et cartes de chaleur des peptidomes gastriques et intestinaux. A : 120 min phase gastrique chaîne  $\alpha$ , **B** : 120 min phase gastrique chaîne  $\beta$ , **C** : 120 min phase intestinale chaîne  $\alpha$  et **D** : 120 min phase intestinale chaîne  $\beta$ . La cartographie peptidique est composée des barres grises représentant chaque séquence peptidique. Le bandeau supérieur consitue la carte de chaleur composée des fréquences d'apparition A des acides aminés de la chaîne protéique. Le code couleur va de blanc (A=0) à rouge (A > 0,3).

Les cartographies des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  montrent des tendances similaires en termes de distribution peptidique et de site de coupure : une grande partie des liaisons peptidiques a été hydrolysée au moins une fois. La pepsine n'a pas clivé aléatoirement chaque chaîne : la fréquence d'apparition de chaque acide aminé est plus importante dans certaines régions de la chaîne protéique révélant ainsi l'existence de motifs d'acides aminés récurrents et conservés

tout au long de la digestion gastrique. Ces motifs sont identifiables par leur couleur orange foncé à rouge (A > 0,15) sur la Figure 14 et sont recensés dans le *Tableau 6*.

		Peptidome gastrique		Peptidome intestinal			
	Position	Séquence	A	Position	Séquence	A	
	6-23	SAADKGNVKAAWGKVG GHAAE	>0,15	41-55	TYFPHFDLSHGSAQV	>0,15	
Chaîne α	41-80	TYFPHFDLSHGSAQVKGH GAKVAAALTKAVEHLDD	>0,15	71-79	EHLDDLPGA	>0,15	
	54-67	QVKGHGAKVAAALT	>0,3	110-120	ASHLPSDFTPA	>0,15	
Chaîne B	12-40	AFWGKVKVDEVGGEALG RLLVVYPWTQRF	>0,15	3-38	TAEEKAAVTAFWGKVKV DEVGGEALGRLLVVYPWT Q	>0,15	
Channe p	51-82	DA VMNNPKVKAHGKKV LDSFSNGMKHLDDLKG	>0,15	96-120	HVDPENFKLLGNVLVVVL ARNFGKE	>0,15	
	59-69	VKAHGKKVLDS	>0,3	103-110	KLLGNVLV	>0,3	

**Tableau 6** : Liste des motifs d'acides aminés récurrents issus des cartes de chaleur des peptidomes gastriques et intestinaux avec A fréquence d'apparition du motif.

Dans l'ensemble, plus des deux tiers de la population peptidique gastrique ont été générés au niveau des 80 résidus d'acides aminés localisés côté N-terminal. Pour chaque chaîne, un premier motif récurrent est localisé en position N-terminal comportant entre 20 et 30 résidus d'acides aminés ( $\alpha$  6-23 et  $\beta$  12-40). Pour les deux chaînes, un second motif récurrent se distingue dans la première moitié de la séquence ( $\alpha$  41-80 et  $\beta$  51-82) comportant lui-même un motif plus court et de plus haute fréquence d'apparition (A > 0,3 pour  $\alpha$  54-67 et  $\beta$  59-69).

La composition en acides aminés des motifs à haute fréquence d'apparition a été calculée : le motif  $\alpha$  54-67 est essentiellement constitué d'alanine (12,5 %), leucine (12,5 %), glycine et histidine (10 % chacun) alors que le motif  $\beta$  59-69 est composé de lysine (18,8 %), aspartate (12,5 %) et d'asparagine (9,4 %). Les motifs récurrents sont majoritairement positionnés au niveau d'hélices  $\alpha$  sur les deux chaînes protéiques sauf pour le motif  $\alpha$  45-47 situé sur un feuillet  $\beta$ .

#### 1.5.2.2 Cartographie et carte de chaleur du peptidome intestinal

De la même manière, les cartographies peptidiques des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que les cartes de chaleur du peptidome intestinal ont été établies avec les séquences peptidiques ayant correspondu à au moins 5 spectres MS-MS, soit 253 peptides dont 120 proviennent de la chaîne  $\alpha$  et 133 de la chaîne  $\beta$ . Elles ont été représentées *Figure 48C* et *D*. Comme

précédemment constaté pour le peptidome gastrique, les cartes de chaleur mettent en évidence des motifs récurrents indiquant ainsi des zones de résistance au clivage des enzymes. Trois motifs distincts ( $\alpha$  41-55,  $\alpha$  71-79 et  $\alpha$  110-120) ont été identifiés au niveau de la chaîne  $\alpha$  et reportés dans le *Tableau* 6. Dispersés tout le long de la chaîne protéique, ces motifs sont composés en moyenne de 10 acides aminés et situés majoritairement au niveau d'hélices  $\alpha$ . Pour la chaîne  $\beta$ , deux motifs récurrents ( $\beta$  3-38 et  $\beta$  96-120) ont été identifiés aux deux extrémités opposés de la chaîne protéique et comportent en moyenne 30 acides aminés Seul un motif à très haute fréquence d'apparition a été observé (A > 0,3 pour  $\beta$  103-110) situé au niveau C-terminal de la chaîne  $\beta$ .

## 1.5.2.3 Séquences peptidiques strictement communes aux peptidomes gastrique et intestinal

Les deux listes de séquences des peptidomes gastrique et intestinal obtenues après 120 min de chaque phase digestive ont été comparées. Quatre-vingts séquences peptidiques communes ont été rigoureusement identifiées, 48 provenant de la chaîne  $\alpha$  et 32 de la chaîne  $\beta$ . Ces séquences ont donc été générées en phase gastrique et n'ont pas été dégradées sous l'action des enzymes intestinales. Ces peptides ont un poids moléculaire compris entre 750 Da et 4500 Da avec un poids moléculaire moyen autour de 1700 Da. Les gammes de poids moléculaires ne sont pas différentes de celles précédemment observées pour l'ensemble des peptidomes gastrique et intestinal. Cela signifie que 1) ces peptides ne sont ni plus courts ni plus grands que les autres peptides identifiés et que 2) des peptides composés de plus de 10 acides aminés ont résisté à la digestion GI. Les cartographies des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ainsi que les cartes de chaleur associées ont été représentées à partir de la liste des peptides communs aux peptidomes gastriques et intestinaux (*Figure 49*).



*Figure 49*: Cartographies peptidiques et cartes de chaleur des peptides communs aux peptidomes gastriques et intestinaux.

(suite légende *Figure 49*) A : chaîne  $\alpha$  et B : chaîne  $\beta$  La cartographie peptidique est composée des barres grises représentant chaque séquence peptidique. Le bandeau supérieur consitue la carte de chaleur composée des fréquences d'apparition A des acides aminés de la chaîne protéique. Le code couleur va de blanc (A = 0) à rouge (A > 0,3).

Comme constaté précédemment, les séquences peptidiques communes n'ont pas été générées au niveau d'une zone en particulier mais tout au long des chaînes protéiques  $\alpha$  et  $\beta$ . L'ensemble des séquences communes a été reportée dans l'Annexe 4. A nouveau, des motifs récurrents ont pu être identifiés sur les deux chaînes et ont été mis en évidence par cette représentation graphique. Le point isoélectrique et l'index GRAVY caractérisant le comportement hydrophobe d'un peptide ont été calculés et regroupés dans l'annexe. La moitié de la population peptidique possède un indice GRAVY négatif témoignant d'un comportement hydrophile et l'autre moitié, un index positif témoignant ainsi d'un comportement hydrophobe. Toutefois, le calcul de cet indice n'a pris uniquement en compte les valeurs d'hydropathie des acides aminés organisés dans une chaîne linéaire polypeptidique mais s'est affranchi de facteurs pouvant influencer le comportement hydrophobe du peptide comme sa conformation tridimensionnelle. Les valeurs des points isoélectriques s'échelonnent entre 3,8 et 10 avec une valeur moyenne de 6,8. Parmi les séquences récurrentes, 9 motifs récurrents d'acides aminés ont été partagés par plusieurs séquences et indiqué en gras dans l'Annexe 4. Les motifs DLSHGSAQVKGHGAKVAA (α 47-67) partagé par 9 séquences peptidiques ou KLLGNV (β 103-108) partagé par 6 séquences peptidiques font entre autres partie des motifs récurrents partagés par les peptidomes gastrique et intestinal.

### 1.6 <u>Digestion GI statique *in vitro* de matrices alimentaires à base d'hémoglobine bovine et caractérisation analytique</u>

#### 1.6.1 Contexte

Cette première partie de l'étude a concerné jusqu'alors l'étude de la digestion GI *in vitro* d'une protéine alimentaire considérée comme modèle et la caractérisation des digestats générés. Toutefois, cette approche reste éloignée des conditions réelles de la digestion humaine d'un aliment : la ou les protéines peuvent interagir avec les autres macromolécules présentes dans la matrice alimentaire et être modifiée(s) par les procédés appliqués lors de son élaboration. Afin de complexifier notre modèle, il a donc été choisi de créer une matrice alimentaire avec pour seule source protéique l'hémoglobine bovine, de la digérer avec les

conditions GI statiques *in vitro* établies précédemment et de caractériser les digestats obtenus. L'objectif est de déterminer si la présence d'une matrice peut impacter la digestion GI *in vitro* de l'hémoglobine bovine et modifier les populations peptidiques obtenues. La caractérisation et la comparaison des digestats ont uniquement été réalisées par chromatographie liquide en phase inverse (RP-HPLC).

#### **1.6.2** Conception des matrices alimentaires

Une matrice alimentaire modèle caractérisée par les apports nutritionnels recommandés pour un repas a été réalisée en utilisant les macronutriments retrouvés fréquemment dans notre alimentation. La source glucidique utilisée est de l'amidon de blé, la source lipidique de l'huile de tournesol et la source de fibres un mélange équimolaire d'inuline (fibres solubles) et de méthylcellulose (fibres insolubles). Deux modes de chauffage ont été utilisés pour étudier leur influence sur la digestibilité de la matrice : le four à micro-ondes (chauffage par agitation des molécules d'eau) et le chauffage sur plaque chauffante (chauffage par gradient de diffusion), représentatifs des modes de cuisson classiquement utilisés dans les foyers ménagers ou dans des industries agro-alimentaires. L'homogénéisation de chaque matrice a été réalisée par pale rotative à 160 rpm. Plus d'une vingtaine de matrices ont été réalisées permettant ainsi d'optimiser les concentrations de chaque macronutriment. Les critères de choix ont été l'homogénéité et la texture de la matrice. Ainsi, les matrices aux textures trop liquides ou trop friables ont été écartées. Les matrices sélectionnées ont été digérées avec le modèle statique précédemment décrit.

L'influence de chaque macronutriment (lipide, glucide et fibres) sur la digestibilité de la matrice alimentaire a été étudiée et comparée à la digestion de la protéine modèle. Les digestats obtenus ont été analysés par RP-HPLC et les profils peptidiques ont été comparés avec ceux issus de la digestion de l'hémoglobine bovine. L'influence du mode de chauffage a également été étudiée. De manière générale, il est ressorti que la présence de lipide, glucide ou de fibres avec l'hémoglobine bovine n'a eu aucune influence sur les profils peptidiques générés en phase gastrique et intestinale. De même, le mode de cuisson de la matrice (plaque chauffage par micro-ondes) n'a eu aucune influence sur les profils peptidiques des digestats comparé à celui issu de la digestion de la protéine seule.

Les résultats présentés ici concernent la digestion de la matrice la plus aboutie de l'étude. Elle contient un taux de protéines de 13 % (p/p), un taux de glucides de 40 % (p/p), un taux de lipides de 15 % (p/p) et un taux de fibres de 5 % (p/p), le tout complété avec de l'eau

ultrapure. Sa cuisson a été réalisée sur plaque chauffante. Les profils peptidiques obtenus en phase gastrique et phase intestinale des digestions de la protéine seule et de la matrice complète sont présentés *Figure 50*.



*Figure 50: Profils de séparation RP-HPLC de digestats GI d'hémoglobine et de matrice* A : digestats gastriques 120 min et B : digestats intestinaux 120 min. Noir : hémoglobine bovine, bleu : hémoglobine bovine chauffée avec lipides, glucides et fibres. La séparation a été réalisée avec une colonne C18 en appliquant un gradient de 0-70 % d'un mélange de 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 0,6 mL.min-1.

Les chromatogrammes des digestats gastriques d'hémoglobine et de matrice ont montré une élution des pics comprise entre  $t_R = 30$  min et  $t_R = 60$  min (*Figure 50 A*) et entre  $t_R = 6$  min et  $t_R = 65$  min pour les deux digestats intestinaux (*Figure 50 B*). Le pic élué à  $t_R = 75$  min correspond à l'élution de l'hème. Les chromatogrammes issus des digestats de la matrice complète ou de l'hémoglobine sont relativement semblables en termes de profil et de temps de rétention. Les concentrations peptidiques des digestats issus de la digestion de la matrice complète et de l'hémoglobine ont été estimées par dosage BCA et les valeurs ont reportées dans le *Tableau* 7.

	Hémoglobine bovine	Matrice complète
Phase gastrique	$38,2 \pm 6,5 \text{ g.L}^{-1}$	$18,4 \pm 1,2 \text{ g.L}^{-1}$
Phase intestinale	$12,2 \pm 2,4 \text{ g.L}^{-1}$	$9,7 \pm 0,7 \text{ g.L}^{-1}$

 Tableau 7: Estimation de la concentration peptidique des digestats déterminées par dosage BCA

Ces résultats ont démontré une tendance à la baisse de la concentration peptidique dans les digestats de la matrice complète comparé à ceux de l'hémoglobine bovine. En phase gastrique, une baisse de plus de 50 % de la teneur en peptide a été constatée dans le digestat de la matrice comparé à celui de la protéine modèle. En phase intestinale, l'écart de concentration peptidique entre les deux digestats est plus réduit : la présence de la matrice a engendré une baisse d'environ 20 % de la teneur en peptide du digestat comparé à celui de la protéine.

En brève conclusion intermédiaire, l'élaboration de matrices alimentaires a permis d'étudier l'influence de plusieurs facteurs comme la présence de macronutriments ou le mode de cuisson sur les populations peptidiques générées par la digestion GI de l'hémoglobine bovine. Il a été observé que la présence d'une matrice complète contenant une source de lipides, de glucides et de fibres a essentiellement modifié la concentration protéique des digestats gastriques et intestinaux mais n'a pas significativement affecté les profils peptidiques détectés après RP-HPLC. Cette matrice a donc été utilisée pour la suite de l'expérience.

#### 1.7 <u>Validation du modèle d'étude par un modèle de digestion GI in vitro dynamique</u>

Jusqu'à présent, notre modèle de digestion GI *in vitro* statique a été appliqué à une protéine modèle (l'hémoglobine bovine) et à une matrice modèle complète. Dans un objectif de validation de ce modèle d'étude dans des conditions de digestion GI plus proches de celles de la digestion humaine, la protéine modèle et la matrice modèle ont été digérées dans un digesteur dynamique TIM représenté dans la photo ci-après (*Figure 51*).



Figure 51 : Photographie du digesteur TIM

Les prélèvements directs réalisés à 30, 120 et 240 min dans les compartiments gastrique, duodénal, jéjunal et iléal ainsi que les échantillons d'absorptions jéjunale et iléale ont été analysés par SEC et RP-HPLC dont les protocoles d'analyses sont décrits au paragraphe 3 du chapitre Matériels et Méthodes.

#### 1.7.1 Caractérisation par RP-HPLC des populations peptidiques générées

Les prélèvements réalisés dans l'estomac, le duodénum, le jéjunum et l'iléon après 30, 120 et 240 min de digestion ainsi que les absorptions jéjunales et iléales ont été analysés par RP-HPLC. Les digestions de la protéine seule et de la protéine en matrice ont été comparées grâce aux profils chromatographiques obtenus et aux aires sous la courbe (permettant une évaluation approximative de la concentration peptidique).

#### 1.7.1.1 Profils chromatographiques issus de la digestion dynamique in vitro de l'hémoglobine bovine

• Profils chromatographiques de la digestion dynamique « blanc »

Une digestion dynamique avec de l'eau (« blanc ») a été réalisée pour repérer les peptides provenant de l'autolyse des enzymes. Les digestats collectés à 30, 120 et 240 min de digestion ont été analysés par RP-HPLC (*Figure 52*).



*Figure 52* : *Profils RP-HPLC des digestats gastriques issus de la digestion dynamique « blanc »* Les digestats sont collectés à 30 min (courbe noire), à 120 min (courbe bleue) et 240 min (courbe verte). La séparation a été réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient de 0-70 % d'un mélange de 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

Aucun pic n'a été détecté sur les chromatogrammes des digestats du compartiment gastrique tout au long de la digestion. Les profils peptidiques des trois compartiments intestinaux ont montré la même tendance. Seuls les chromatogrammes du compartiment duodénal sont ici exposés *Figure 53*.



*Figure 53: Profils de séparation RP-HPLC des digestats duodénaux issus de la digestion dynamique « blanc »* 

Les digestats sont collectés à 30 min (courbe noire), à 120 min (courbe bleue) et 240 min (courbe verte). La séparation a été réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient de 0-70 % d'un mélange de 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

Les profils peptidiques du compartiment duodénal ont mis en évidence la présence de trois pics principaux élués aux temps de rétention  $t_R = 28$  min,  $t_R = 31,5$  min et  $t_R = 40$  min présents tout au long de la digestion (*Figure 53*). La présence de ces trois pics est également observée sur les profils peptidiques des compartiments jéjunal et iléal.

• Profils chromatographiques des prélèvements directs

Les chromatogrammes obtenus des prélèvements directs effectués dans les quatre compartiments de la digestion sont présentés *Figure 54*.



*Figure 54*: Profils de séparation RP-HPLC des prélèvements directs de la digestion dynamique de l'hémoglobine bovine.

Les prélèvements sont réalisés à **A**) 30 min, **B**) 120 min et **C**) 240 min de digestion. Pour tous les chromatogrammes, les mêmes codes couleur ont été suivis. Noir : solution initiale d'hémoglobine 2,6 % (p/v), bleu marine : estomac, vert : duodénum, turquoise : jéjunum, rose : iléon. La séparation a été réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient de 0-70 % d'un mélange de 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

Le profil obtenu pour la solution initiale d'hémoglobine a été superposé comme repère du temps de rétention de la protéine native (Figure 54). Les pics correspondant aux deux chaînes de la protéine sont élués aux temps de rétention  $t_R = 72$  min et  $t_R = 78$  min. Dès 30 min de digestion, la protéine n'a été que très partiellement hydrolysée au niveau de l'estomac, en témoigne l'élution majoritaire de pics au même temps de rétention que la protéine native (courbe bleu marine, Figure 54A). En revanche, l'apparition de pics d'intensité comparable a été observée dans les profils chromatographiques des compartiments duodénal et jéjunal entre les temps de rétention  $t_R = 24$  min et  $t_R = 56$  min (courbes verte et turquoise, *Figure 54A*). Bien que d'intensité plus faible, le profil du compartiment iléal est comparable aux profils des deux autres compartiments intestinaux en termes de temps de rétention et d'allure des pics (courbe rose, Figure 54A). Dès 30 min, l'hémoglobine a donc été plus hydrolysée dans les compartiments intestinaux que dans le compartiment gastrique, générant une population peptidique éluée à des temps de rétention inférieurs à ceux de la protéine native. La faible hydrolyse de la protéine dans le compartiment gastrique est probablement liée aux conditions de pH. En effet, le pH optimal de la pepsine se situe entre 1,8 et 4,4. Un relevé des variations de pH a montré que le pH a évolué de 6,6 à 5,1 dans le compartiment gastrique pendant les 30 premières min de digestion. En revanche, les conditions de pH intestinaux favorisent déjà l'hydrolyse par les enzymes pancréatiques : en 30 min, elles sont passées de de 6,4 à 6,3 dans le compartiment duodénal, de 7,2 à 6,7 dans le compartiment jéjunal et de 7,6 à 7,3 dans le compartiment iléal.

Après 120 min de digestion, une population peptidique éluée entre les temps de rétention  $t_R = 30$  min et  $t_R = 65$  min a été observée dans la phase gastrique, témoignant d'une hydrolyse plus avancée qu'à 30 min de digestion (courbe bleu marine, *Figure 54B*). Les populations peptidiques dans les trois compartiments intestinaux ont été éluées aux mêmes temps de rétention que celles obtenues après 30 min de digestion (courbes verte, turquoise et rose, *Figure 54B*). Aucun pic n'a été détecté au-delà de  $t_R = 70$  min ce qui témoigne de la dégradation complète de l'hémoglobine bovine. Ceci est en partie corrélable aux conditions pH du compartiment gastrique : le pH a évolué de 5,1 à 1,6. Dans les autres compartiments, les valeurs de pH se sont stabilisées à 6,2 dans le duodénum, 6,7 dans le jéjunum et 7,2 dans l'iléon, conditions favorables à l'activité des enzymes pancréatiques.

Après 240 min de digestion, des pics de très faible intensité apparaissent dans le compartiment gastrique, témoignant d'une faible concentration peptidique (*Figure 54C*) : la poche gastrique est quasiment vide à ce stade de la digestion (courbe bleu marine). Les temps

de rétention des pics présents sur les profils intestinaux ne sont pas différents de ceux observés précédemment. Enfin, les trois pics identifiés dans la digestion « blanc » aux temps de rétention  $t_R = 28$  min,  $t_R = 31,5$  min et  $t_R = 40$  min sont également présents au niveau des profils des digestats duodénaux, jéjunaux et iléaux à partir de 120 min de digestion (*Figure 54 B* et *C*).

La comparaison des aires sous la courbe des chromatogrammes présentés *Figure 54* a été utilisée pour estimer l'évolution de la concentration peptidique au cours du temps et par compartiment (*Figure 55*).





L'abondance peptidique est estimée par l'aire sous la courbe de chaque chromatogramme obtenu par RP-HPLC. Les prélèvements sont réalisés à 30 min (noir), 120 min (gris clair) et 240 min (gris foncé) de digestion.

L'estimation de l'abondance peptidique dans chaque compartiment au cours du temps permet de suivre la progression du chyme dans le TIM. Ainsi, au bout de 30 min de digestion (barres noires), la plus forte abondance peptidique estimée a été mesurée dans l'estomac suivie de celle mesurée dans le duodénum. Les valeurs obtenues pour les compartiments jéjunal et iléal sont à ce stade de la digestion encore très faibles. Après 120 min de digestion (barres gris clair), les valeurs d'abondance peptidique sont équivalentes dans les compartiments gastrique, duodénal et jéjunal, et plus de deux fois supérieures à celle mesurée dans le compartiment iléal. Enfin, après 240 min (barres gris foncé), les plus fortes abondances peptidiques ont été mesurées dans le duodénum, jéjunum et iléon et la valeur d'abondance peptidique gastrique est environ dix fois inférieure à celle des autres compartiments. La diminution globale de la concentration peptidique au cours de la digestion s'explique par les phénomènes d'absorption jéjunale et iléale et de dilution liée à l'ajout des fluides intestinaux.

#### • Profils chromatographiques des absorptions jéjunales et iléales

Les échantillons issus des absorptions jéjunale et iléale (dialysats concentrés) ont été également analysés par RP-HPLC dans les mêmes conditions que les prélèvements. Pour rappel, les échantillons nommés « absorption » proviennent des compartiments du TIM positionnés en aval des fibres de dialyse dont le seuil de coupure est de 10-12 kDa, ce dispositif mimant de manière approximative l'absorption intestinale. Les chromatogrammes obtenus sont présentés *Figure 56*.



*Figure 56: Profils de séparation RP-HPLC des échantillons d'absorption jéjunale et iléale.* 

**A** : absorptions jéjunales collectées entre 0-1 h (noir), 1-2 h (bleu marine), 2-3h (vert) et 3-5h (turquoise) et **B** : absorptions iléales collectées entre 0-1 h (noir), 1-3 h (bleu marine) et 3-5 h (vert) de digestion dynamique *in vitro* d'hémoglobine.La séparation a été réalisée avec une colonne C<sub>18</sub> en appliquant un gradient de 0-70 % d'un mélange de 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

Ainsi, les peptides contenus dans les échantillons des absorptions jéjunales collectés au cours de la digestion ont été élués entre les temps de rétention  $t_R = 5$  min et  $t_R = 70$  min. Les intensités des chromatogrammes obtenus aux différents temps de digestion sont comparables. Les temps de rétention des pics sont également comparables à ceux des prélèvements intestinaux (*Figure 54*). Les peptides contenus dans les échantillons des absorptions iléales ont été élués entre  $t_R = 5$  min et  $t_R = 50$  min tout au long de la digestion, soit à des temps plus courts que ceux observés pour les pics des absorptions jéjunales. Une plus faible abondance de pics a été remarquée sur les chromatogrammes des échantillons iléaux que sur ceux des échantillons jéjunaux. Une comparaison des aires sous la courbe des profils issus des absorptions jéjunales et iléales a été réalisée (*Figure 57*).





J : Absorption jéjunale, barres gris clair et I : absortion iléale, gris foncé. L'abondance peptidique est estimée par l'intégration des aires sous la courbe du chromatogramme obtenu par RP-HPLC pour chaque échantillon.

L'absorption jéjunale a eu majoritairement lieu pendant les 3 premières heures de la digestion, avec un pic observable entre 1 h et 2 h de digestion. Ces résultats sont corrélables à ceux obtenus pour les prélèvements directs où l'abondance peptidique jéjunale a atteint son maximum au bout de 2 h de digestion (*Figure 55*). Les valeurs d'abondance peptidique iléales sont entre 4 et 10 fois moins importantes que celles des populations jéjunales. Le maximum en termes de concentration peptidique iléale absorbée a été atteint entre 1 et 3 h de digestion.
## 1.7.1.2 Profils chromatographiques issus de la digestion dynamique in vitro de la matrice à base d'hémoglobine bovine

Les analyses réalisées sur les prélèvements directs et les absorptions de la digestion dynamique de la matrice complète à base d'hémoglobine bovine ont également été menées.

• Profils chromatographiques des prélèvements directs de la digestion dynamique *in vitro* de la matrice à base d'hémoglobine bovine

Les chromatogrammes des prélèvements des différents compartiments ont été regroupés par temps de digestion *Figure 58*.



*Figure 58*: *Profils de séparation RP-HPLC des prélèvements directs de la digestion dynamique de la matrice à base d'hémoglobine bovine* 

Les prélèvements sont réalisés à A) 30 min, B) 120 min et C) 240 min de digestion.Pour tous les chromatogrammes, les mêmes codes couleur ont été suivis. Noir : solution initiale d'hémoglobine 2,6 % (p/v), bleu marine : estomac, vert : duodénum, turquoise : jéjunum, rose : iléon. La séparation a été réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient de 0-70 % d'un mélange de 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

Le profil de la solution initiale d'hémoglobine a été placé sur les trois spectres de la Figure 58 comme repère des temps de rétention de la protéine native. Au bout de 30 min de digestion, la protéine a été très peu hydrolysée dans le compartiment gastrique (courbe bleu marine, Figure 58A). En revanche, des pics d'intensité comparable sont apparus entre les temps de rétention  $t_R = 20$  min et  $t_R = 60$  min dans les compartiments duodénal (courbe verte, Figure 58A) et jéjunal (courbe turquoise, Figure 58A). Aucun peptide n'a été élué dans le profil du digestat de la matrice provenant du compartiment iléal pendant les 30 premières minutes de la digestion (courbe rose, Figure 58A). Après 120 min de digestion, les peptides du digestat gastrique sont élués entre  $t_R = 30$  min et  $t_R = 65$  min (courbe bleu marine *Figure* 58 B), témoignant d'une hydrolyse plus avancée de la protéine. Les profils peptidiques des compartiments duodénaux et jéjunaux apparaissent similaires à ceux observés à 30 min de digestion (courbes verte et turquoise, Figure 58B). Le profil peptidique du compartiment iléal a montré les mêmes caractéristiques que les profils des deux autres compartiments intestinaux mais avec des intensités de pics inférieures (courbe rose, Figure 58 B). Après 240 min de digestion, des pics de très faible intensité apparaissent dans le compartiment gastrique. Les temps de rétention des pics présents sur les profils des trois compartiments intestinaux ne sont pas différents de ceux observés dans les profils des digestats de l'hémoglobine (courbes verte, turquoise et rose, *Figure 58C*). Enfin, les trois pics caractérisés lors de la digestion « blanc » ont été observés dans les digestats des trois compartiments intestinaux dès 30 min de digestion aux mêmes temps de rétention (Figure 56).

Tous les chromatogrammes ont été intégrés et les aires calculées ont été comparées pour estimer l'évolution de la concentration peptidique par compartiment et par temps de digestion (*Figure 59*).



**Figure 59**: Evolution de l'abondance peptidique dans chaque compartiment durant la digestion dynamique de la matrice à base d'hémoglobine L'abondance peptidique est estimée par l'aire sous la courbe de chaque chromatogramme obtenu par RP-HPLC. Les prélèvements sont réalisés à 30 min (noir), 120 min (gris clair) et 240 min (gris foncé) de digestion

Au bout de 30 min de digestion, les plus fortes abondances peptidiques ont été mesurées dans les compartiments gastrique et duodénal (barres noires, *Figure 59*). Les valeurs maximales d'abondance peptidique ont été mesurées dans le compartiment duodénal après 120 min (barres gris clair, *Figure 59*) et dans le compartiment jéjunal après 240 min de digestion (barres gris foncé, *Figure 59*). Dans chaque compartiment, les valeurs d'abondance peptidique ont évolué de manière différente. Elles ont constamment augmenté dans le compartiment iléal, augmentant d'un facteur 10 entre 30 min et 240 min de digestion. Une augmentation significative de l'abondance peptidique a été mesurée entre 30 min et 120 min de digestion dans le compartiment jéjunal. Dans le compartiment duodénal, les valeurs d'abondance peptidique sont plutôt équivalentes tout au long de la digestion.

• Profils chromatographiques des absorptions jéjunales et iléales de la digestion dynamique *in vitro* de la matrice à base d'hémoglobine bovine

Les échantillons issus des absorptions jéjunales et iléales ont été analysés par RP-HPLC dans les mêmes conditions que les prélèvements. Dans un premier temps, les profils obtenus des échantillons d'absorption jéjunale et iléale collectés au cours de la digestion dynamique de la matrice ont été représentés *Figure 60*.



*Figure 60*: *Profils de séparation RP-HPLC des absorptions jéjunales et iléales de la digestion dynamique de la matrice à base d'hémoglobine bovine.* 

A : absorptions jéjunales collectées entre 0-1h (noir), 1-2h (bleu marine), 2-3h (vert) et 3-5h (turquoise) et des **B** : absorptions iléales collectées entre 0-1h (noir), 1-3h (bleu marine) et 3-5h (vert) de digestion dynamique de la matrice à base d'hémoglobine bovine. La séparation a été réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient de 0-70 % d'un mélange de 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

Les quatre échantillons récoltés pendant l'absorption jéjunale après 1, 2, 3 et 5 h de digestion ont montré des profils chromatographiques similaires : les pics sont élués entre  $t_R = 20$  min et  $t_R = 60$  min et les intensités sont comparables. Les plus fortes intensités ont été observées entre 1-2 h et 2-3 h de digestion (courbes bleu marine et verte, *Figure 60A*). Les trois échantillons récoltés pendant l'absorption iléale entre 1-3 h et 3-5 h de digestion ont montré également des profils chromatographiques très comparables. Le profil provenant de l'échantillon collecté après une heure de digestion (courbe noire, *Figure 60B*) a montré une intensité largement inférieure à ceux provenant des échantillons collectés après 3 h et 5 h de digestion (courbes bleu marine et verte, *Figure 60B*).

Les chromatogrammes présentés ci-dessus ont été intégrés afin d'estimer l'évolution de l'abondance peptidique lors des phénomènes d'absorption jéjunale et iléale (*Figure 61*).





Les plus faibles concentrations de peptides absorbes ont été mesurées durant la première heure de digestion au niveau du jéjunum et de l'iléon. L'absorption a été maximale entre 1 h et 3 h de digestion dans les deux compartiments. Les valeurs d'abondance peptidiques iléales sont environ 3 fois moins importantes que celles des populations jéjunales.

### 1.7.1.3 Comparaison des profils chromatographiques des digestats d'hémoglobine bovine à ceux de la matrice

La comparaison des profils chromatographiques obtenus pour la digestion dynamique de l'hémoglobine seule et de ceux obtenus pour la matrice a révélé très peu de différences en termes de profil peptidique, de temps de rétention et d'aires sous la courbe, quels que soient le compartiment ou le temps de digestion considérés. De même, l'évolution des populations

peptidiques des absorptions jéjunales et iléales de la digestion dynamique de la matrice a présenté peu de différences avec celle observée lors de la digestion dynamique de l'hémoglobine seule. Cependant, une différence notable a été remarquée au niveau du compartiment iléal après 30 min de digestion : l'aire des pics représentant la population peptidique iléale de la digestion de la matrice était très faible comparée à celle issue de la digestion de la protéine seule, aussi bien pour les prélèvements directs que pour les absorptions. Cette observation est à corréler avec le fait que, lors de l'expérience, il a été observé que le chyme généré lors de la digestion de la matrice n'avait pas encore atteint le compartiment iléal après 30 min de digestion.

## 1.7.2 Caractérisation des populations peptidiques générées au cours des digestions GI dynamique *in vitro* par SEC

La distribution des poids moléculaires apparents des peptides contenus dans les prélèvements directs des digestions dynamiques de l'hémoglobine bovine et de la matrice a été évaluée par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Les résultats montrent que l'évolution de la distribution des poids moléculaires des peptides, contenus dans les digestats obtenus au cours des digestions de la protéine seule ou de la matrice, sont semblables et ce quel que soit le compartiment considéré. En conséquence, seuls les profils obtenus pour les digestats issus de la digestion de la matrice à base d'hémoglobine apparaissent *Figure 62*.



*Figure 62* : *Profils chromatographiques obtenus par SEC des prélèvements directs obtenus lors de la digestion dynamique de la matrice* 

A) 30 min, B) 120 min et C) 240 min de digestion dynamique in vitro de la matrice à base d'hémoglobine bovine dans les compartiments gastrique (bordeaux), duodénal (orange), jéjunal (vert clair) et iléal (vert foncé). La séparation a été réalisée avec une colonne Superdex peptides 10/300 GL en appliquant une élution isocratique d'un mélange 30 % d'acétonitrile, 69,9 % d'eau ultrapure, 0,1 % de TFA à un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> pendant 60 min.

Pour rappel, l'hémoglobine bovine est constituée de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  dont les poids moléculaires avoisinent 15 kDa chacune. Après 30 min de digestion, les peptides du digestat gastrique ont des poids moléculaire apparent supérieur à 10 kDa (courbe marron, *Figure 62A*), alors que

ceux provenant des digestats duodénaux et jéjunaux, des poids moléculaires apparents inférieurs à 10 kDa (courbes orange et vert clair, Figure 62A). Un signal très faible a été détecté pour le digestat iléal démontrant une très faible abondance peptidique à ce temps de la digestion (courbe vert foncé, *Figure 62A*). L'intégration des profils chromatographiques a montré une concentration peptidique maximale dans les compartiments duodénaux et gastriques après 30 min de digestion. Après 120 min de digestion, la majeure partie des peptides du digestat gastrique est caractérisée par des poids moléculaires apparents compris entre 1 et 10 kDa (courbe marron, *Figure 62B*). Les profils des digestats intestinaux collectés après 120 min de digestion contiennent des peptides de poids moléculaires apparents compris entre 160 et 1000 Da. De plus, les profils peptidiques des digestats duodénal et jéjunal sont très similaires en termes d'aire sous la courbe et d'allure (Figure 62B). Enfin, après 240 min de digestion, un signal plus faible a été enregistré pour le digestat gastrique avec une population peptidique dont les poids moléculaires apparents sont toujours supérieurs à 1 kDa (courbe marron, Figure 62C). Les trois digestats intestinaux possèdent des profils très comparables en termes de poids moléculaire apparent (entre 160 et 1000 Da) et d'allure générale. L'abondance peptidique des compartiments duodénal, jéjunal et iléal est nettement supérieure à celle du compartiment gastrique (courbes orange, vert clair et vert foncé, Figure 62C).

Tout au long de la digestion, les profils peptidiques des quatre compartiments montrent des populations peptidiques couvrant les mêmes gammes de poids moléculaires apparents, à savoir comprises entre 1 et 10 kDa dans l'estomac et entre 160 et 1000 Da pour le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Les profils peptidiques des compartiments duodénaux, jéjunaux et iléaux ont montré des allures semblables quel que soit le temps de digestion. Seule l'abondance peptidique a varié au cours du procédé, montrant ainsi la progression du chyme dans le digesteur, à savoir majoritairement concentré dans l'estomac et le duodénum après 120 min et progressant vers les parties distales de l'intestin après 240 min de digestion. Ces résultats corroborent les conclusions tirées suite aux analyses présentées dans la partie précédente (1.7.1).

# 1.7.3 Identification des séquences peptidiques générées au cours des digestions dynamiques de l'hémoglobine et de la matrice à base d'hémoglobine

L'identification des séquences peptidiques des échantillons d'absorption jéjunale des digestions d'hémoglobine et de la matrice a été réalisée par LC-MS-MS couplée au traitement

de données par le logiciel Peaks. Seuls les peptides provenant de la digestion de l'hémoglobine bovine ont été ici recherchés. Les objectifs de ce travail sont 1) étudier l'influence de la présence de la matrice sur la génération des séquences peptidiques suite à une digestion dynamique et 2) comparer les séquences identifiées dans les échantillons d'absorption avec celles du peptidome intestinal. L'identification a été réalisée sur les échantillons récoltés entre 2 et 3 h et 3 et 5 h d'absorption jéjunale. Les raisons principales du choix de ces échantillons sont :

- Le jéjunum représente la zone principale de l'absorption intestinale et les conditions expérimentales de ce compartiment se rapprochent le plus des conditions intestinales du modèle statique
- Avant 2 heures de digestion, la progression du chyme est encore majoritairement localisée dans le compartiemetn gastrique et duodénal

# 1.7.3.1 Influence de la matrice et du temps de digestion sur la génération des séquences peptidiques

L'ensemble des séquences peptidiques identifiées dans les échantillons d'absorption jéjunale des deux digestions a été récapitulé dans l'annexe 5. Ces séquences ont été comparées en fonction de leur temps de prélèvement au sein d'une même digestion puis en fonction de la source protéique digérée. La comparaison des séquences peptidiques est récapitulée dans le *Tableau 8*.

**Tableau 8**: Comparaison des séquences peptidiques identifiées par LC-MS-MS et identifiées par PEAKS dans les échantillons d'absorption jéjunale des digestions dynamiques de l'hémoglobine et de la matrice à base d'hémoglobine

Absorption	Digestion (nb peptides)		Nb peptides
jéjunale	Protéine seule	Matrice	communs
2-3h	70	80	55
3-5h	44	47	31
Peptides communs	35	39	

• Comparaison du nombre de séquences en fonction du temps de digestion

Pour les deux digestions, un plus grand nombre de séquences ont été identifiées entre 2 et 3 h de digestion qu'entre 3 et 5 h. Au total, 35 séquences peptidiques communes ont donc été identifiées entre les temps de digestion 2-3 et 3-5 h pour la digestion de l'hémoglobine, et 39

séquences pour la digestion de la matrice. Ceci représente dans les deux cas la moitié de la population peptidique des échantillons de l'absorption 2-3 h, et plus des trois quarts de la population peptidique de l'absorption 3-5 h. En conclusion, quelle que soit la source protéique digérée, la majorité des séquences identifiées entre 3-5 h de digestion a été également identifié dans les populations peptidiques générées entre 2-3 h de digestion. Enfin, la population peptidique a peu évolué en termes de séquences après 3 h de digestion.

• Comparaison du nombre de séquences obtenues entre les digestions réalisées à partir de l'hémoglobine et de la matrice

Le nombre de séquences générées lors des digestions de la protéine seule et de la matrice a également été comparé. Le nombre de peptides identifiés suite à la digestion de la matrice est très comparable à celui issu de la digestion de l'hémoglobine, ceci quel que soit le temps de digestion : 80 séquences provenant de la matrice contre 70 provenant de l'hémoglobine à 2-3 h de digestion et 47 séquences provenant de la matrice contre 44 séquences provenant de l'hémoglobine à 3-5 h. Au final, 55 et 31 séquences communes aux digestions de l'hémoglobine et de la matrice ont été respectivement identifiées au temps 2-3 et 3-5 h de digestion.

### 1.7.3.2 Comparaison des séquences peptidiques identifiées dans les échantillons d'absorption jéjunale avec celles du peptidome intestinal du modèle in vitro statique

Dans une démarche de validation du modèle *in vitro* statique de digestion, la liste peptidique obtenue par digestion dynamique et absorption (1.7.3.1) a été comparée à la liste du peptidome intestinal généré par la digestion *in vitro* statique de l'hémoglobine bovine (1.5.2). L'objectif est de savoir si les séquences peptidiques « absorbées » dans le modèle dynamique ont été identifiées dans le peptidome intestinal du modèle statique.

Seules 8 séquences ont été identifiées en commun entre la population peptidique des absorptions jéjunales et le peptidome intestinal généré par digestion statique. Les séquences TYFPH et LRVDPV ont été identifiées dans tous les peptidomes dynamiques quels que soient le substrat et le temps de digestion. Les séquences SHLPSDF et LVVYPWT ont été identifiées uniquement pour le temps de digestion 2-3 h quel que soit le substrat d'hydrolyse. Les séquences LVVYPW, LLVVYPWT, HLDDLPGAL et ASHLPSDFTPA, identifiées suite à la digestion dynamique de l'hémoglobine entre 2-3 h, ont été également retrouvées intactes dans le peptidome intestinal statique. Les cartographies peptidiques et les cartes de chaleur de

la population peptidique identifiée dans les échantillons d'absorption jéjunale, tout temps de prélèvement confondu, sont présentées *Figure 63*.



**Figure 63** : Cartographies peptidiques et cartes de chaleur du peptidome de l'absorption jéjunale entre 2 et 5 h de digestion dynamique de l'hémoglobine bovine. A : chaîne  $\alpha$ , B : chaîne  $\beta$ . La cartographie peptidique est composée des barres grises représentant chaque séquence peptidique. Le bandeau supérieur consitue la carte de chaleur composée des fréquences d'apparition A des acides aminés de la chaîne protéique. Le code couleur va de blanc (A=0) à rouge (A > 0,3).

De manière générale, les peptides identifiés dans les échantillons d'absorption jéjunale sont plus courts que ceux identifiés dans le peptidome intestinal provenant de la digestion statique. De manière très intéressante, les motifs les plus récurrents (en rouge sur la carte de chaleur) sont similaires à ceux identifiés dans le peptidome intestinal *Figure 48*. Trois motifs de forte récurrence ont été identifiés (au sein de la population peptidique de l'absorption jéjunale) sur la chaîne  $\alpha$ : le motif  $\alpha$  47-54, inclus dans le motif  $\alpha$  41-55 du peptidome intestinal et les motifs  $\alpha$  72-80 et  $\alpha$  110-120, également remarqués dans le peptidome intestinal. Au niveau de la chaîne  $\beta$ , les motifs  $\beta$  17-27 et  $\beta$  31-37 ont été identifiéspour leur forte récurrence, tous deux inclus dans le motif  $\beta$  3-38 du peptidome intestinal. Pour une comparaison plus fiable, la réalisation des cartographies des peptidomes des trois compartiments intestinaux serait nécessaire afin de les comparer à celle du compartiment intestinal issu de la digestion statique.

#### 1.8 Discussion

L'objectif principal de cette première partie des résultats vise à exposer les stratégies analytiques développées pour caractériser l'ensemble des populations peptidiques obtenues par la digestion GI *in vitro* d'une protéine modèle. Cette démarche de caractérisation avait pour but d'établir une base de données des séquences peptidiques, support essentiel à une étude de recherche de peptides bioactifs, et de cartographier les populations peptidiques générées dans les différents compartiments simulés lors de la digestion GI *in vitro* statique. Le modèle d'étude a également été complexifié en concevant une matrice alimentaire modèle à base d'hémoglobine bovine et en utilisant un modèle de digestion *in vitro* dynamique afin de se rapprocher des conditions de digestion humaine d'un aliment et de valider notre modèle d'étude.

### **1.8.1** Digestion de l'hémoglobine bovine en conditions GI *in vitro* statiques et dynamiques

L'hémoglobine bovine a montré une capacité à être digérée intéressante dans des conditions d'hydrolyse gastro-intestinales in vitro statiques. Dès 30 min de digestion gastrique, l'action de la pepsine a dégradé la protéine native en une population peptidique variée en termes d'hydrophobie. Les poids moléculaires apparents des peptides contenus dans les digestats gastriques couvrent une large gamme de poids moléculaire en dessous de 10 000 Da. Au bout de deux heures de digestion gastrique, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine ont totalement disparues. Ces résultats issus de différentes techniques séparatives analytiques (SEC et RP-HPLC) mettent en évidence la génération d'une population peptidique complexe en termes de poids moléculaire et de propriétés physico-chimiques. Ceci pourrait être lié en particulier à une bonne affinité de l'enzyme pour son substrat. En effet, la pepsine porcine utilisée ici présente un clivage préférentiel pour les résidus hydrophobes, préférentiellement aromatiques, localisés en position P1 et P'1 (Hamuro et al., 2008). Or, les acides aminés majoritaires composant l'hémoglobine bovine sont des acides aminés possédant une chaîne latérale apolaire comme la leucine, l'alanine ou une chaîne latérale aromatique comme le tryptophane ou la tyrosine. Lors de notre étude en modèle de digestion statique, l'action de la pepsine s'est révélée être légèrement spécifique comme en témoigne l'identification de motifs récurrents d'acides aminés localisés à des régions particulières des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Les peptides présents dans le digestat gastrique ont été partiellement dégradés sous l'action des enzymes pancréatiques, ceci ayant été confirmé par le décalage des temps de rétention des pics des profils générés par RP-HPLC. De même, le profil du digestat intestinal obtenu par SEC couvre une gamme de poids moléculaire apparent légèrement plus basse que celle du digestat gastrique, avec une majorité des poids moléculaires apparents en dessous de 1 000 Da. Ces résultats montrent une baisse générale de la taille des peptides, allant dans le sens

d'une action protéolytique des enzymes sur la population peptidique gastrique et la génération de séquences peptidiques intestinales plus courtes. Ceci est en accord avec les résultats d'autres études qui se sont focalisées sur la digestion de la viande (Bauchart et al., 2007) : les peptides gastriques ont été soit hydrolysés en acides aminés libres, soit en peptides à la séquence plus courte. Ici, la plupart des séquences peptidiques identifiées en phase gastrique et caractérisées par un poids moléculaire supérieur à 3 000 Da n'ont pas été retrouvées en phase intestinale.

La capacité à être digérée de l'hémoglobine bovine a également été confirmée par les expériences de digestion GI in vitro dynamique mais avec une cinétique de digestion différente de celle observée en mode statique. D'après les profils UV issus des analyses RP-HPLC et SEC, la protéine reste peu hydrolysée en phase gastrique au terme de 30 min de digestion. Le pH du compartiment gastrique a été mesuré autour de 5 durant les 30 premières min, expliquant ainsi la faible activité protéolytique de la pepsine et par conséquent, une faible digestion de la protéine. En revanche, après 120 min, le pH du compartiment gastrique a atteint la valeur de 2,3, valeur optimale pour l'activité de la pepsine, se traduisant sur les chromatogrammes par l'apparition de pics élués plus tôt que ceux des chaînes de la protéine native (profil UV RP-HPLC). Comparativement, dans les compartiments duodénal, jéjunal et iléal, les valeurs de pH sont optimales pour l'activité des enzymes intestinales dès les 30 premières minutes de digestion (compris entre 6 et 7,2). Les chromatogrammes des compartiments intestinaux obtenus par RP-HPLC en témoignent par la présence de pics globalement tous élués entre les mêmes temps de rétention et ceci dès 30 min de digestion. De plus, ces temps de rétention sont inférieurs à ceux du profil gastrique obtenu après 2 h de digestion, confirmant ainsi l'apparition de peptides a priori plus hydrophiles (et donc potentiellement plus petits) que ceux générés en phase gastrique. Ceci est confirmé par les profils UV obtenus par SEC qui montrent que les poids moléculaires apparents des peptides présents au niveau des compartiments intestinaux sont inférieurs à ceux des peptides gastriques. La protéine, très peu digérée par la pepsine après 30 min, arrive donc quasiment intacte dans le compartiment duodénal et génère des peptides sous l'action des enzymes intestinales. Les profils chromatographiques intestinaux obtenus à 30, 120 et 240 min de digestion n'ont pas montré de différence en termes de temps de rétention ou de poids moléculaire apparent, laissant suggérer l'apparition de populations semblables en termes de propriétés physico-chimiques. Ceci reste à confirmer par spectrométrie de masse. L'action de la pepsine n'a pas ou peu conditionné la génération des peptides en phase intestinale.

L'empreinte des populations peptidiques intestinales est donc majoritairement définie par l'action des enzymes intestinales et remet en question l'intérêt de la phase gastrique dans le processus de digestion des protéines. Le modèle de digestion in vitro dynamique a donc confirmé la génération de populations peptidiques à priori différentes entre le compartiment gastrique et les compartiments intestinaux, allant dans le sens d'une diminution globale du poids moléculaire des peptides générés. La digestion dynamique a également permis d'observer une évolution de la concentration peptidique au cours du temps dans l'ensemble du système : la concentration maximale peptidique a été d'abord mesurée dans l'estomac en début de digestion, puis dans le duodénum après 2 h de digestion et enfin dans le jéjunum après 4 h, mimant le déplacement du bol alimentaire. De même, la quantité de peptides absorbés a été maximale entre 1 et 3 h de digestion au niveau du jéjunum et entre 3 et 5 heures au niveau de l'iléon, reflétant ainsi l'absorption séquentielle au cours de la digestion. Grâce à sa compartimentation, le digesteur dynamique a reproduit des conditions de digestion plus proches des conditions physiologiques (Torres-Escribano et al., 2011). Ces résultats permettent de valider en partie l'utilisation du modèle statique de par le fait que les profils chromatographiques obtenus en digestion dynamique partagent un certain degré de similarité avec ceux établis pour les digestats obtenus en conditions statiques. Les profils obtenus par SEC des compartiments gastrique et intestinaux du modèle dynamique ont montré des poids moléculaires apparents du même ordre de grandeur que ceux identifiés dans les digestats du modèle statique. De même, les profils obtenus par RP-HPLC des digestats gastriques ont montré des allures similaires pour les digestats gastriques des modèles statique et dynamique. Bien que la comparaison entre les compartiments intestinaux des deux modèles soit difficile à établir, des différences entre les profils des digestats générés ont tout de même été observées.

Une première étape d'identification des séquences du modèle dynamique a permis d'établir une comparaison préliminaire avec le peptidome du modèle statique. Il a été choisi de se focaliser sur l'identification des séquences des échantillons d'absorption jéjunale et de les comparer à celles du digestat intestinal du modèle statique. Le modèle dynamique, par sa plus grande complexité, génère un nombre plus important d'échantillons intestinaux que le modèle statique (prélèvements directs, absorption) rendant les comparaisons délicates. De plus, trois zones de pH distinctes sont représentées dans le modèle dynamique (6 pour le duodénum, 6,8 pour le jéjunum et 7,2 pour l'iléon) alors que le modèle statique ne simule qu'un compromis avec des valeurs de pH comprises entre 7 et 7,5. Le phénomène d'absorption est simulé grâce à des fibres de dialyse dont le seuil de coupure se situe aux alentours de 10 kDa. Au vu des profils de poids moléculaires apparents, les peptides des compartiments intestinaux ont des poids moléculaires inférieurs au seuil de coupure et ne doivent donc pas être retenus par les fibres de dialyse. En somme, la population peptidique des échantillons d'absorption doit être très semblable à celle des compartiments intestinaux. Ceci a été remarqué par la très forte similitude des profils chromatographiques entre prélèvement direct et absorption. Toutes les séquences identifiées dans l'absorption intestinale ont des poids moléculaires inférieurs à 1000 Da alors que la plupart des séquences du peptidome intestinal statique présentent un poids moléculaire supérieur à 1000 Da. De même, la population peptidique de l'absorption jéjunale est moins diversifiée : une centaine de séquences uniques ont été identifiées contre plus de 500 dans le digestat intestinal du modèle statique. Au final, seulement 8 séquences issues de la digestion dynamique de l'hémoglobine ont été retrouvées dans la liste des séquences du peptidome intestinal du modèle statique. Ce faible nombre est en partie lié à la faible résolution du spectromètre utilisé. Les échantilons de l'absorption jéjunale ont été identifiés à l'aide d'un triple quadrupôle alors que le peptidome intestinal obtenu avec le modèle statique a été caractérisé avec une technologie Orbitrap. De plus, tous les peptides en dessous de 500 Da ont été écartés du processus d'identification par le logiciel de protéomique pour des raisons qui ont été discutées au paragraphe 1.8.3, limitant la comparaison entre les deux listes peptidiques.

### **1.8.2** Cartographies des peptidomes gastriques et intestinaux et mise en évidence de motifs récurrents

Tout au long de la séquence des deux chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine, les séquences du peptidome gastrique ainsi que les motifs récurrents ont été identifiés mais sans lien évident avec la conformation tridimensionnelle chaîne de la protéine : les zones couvertes par les motifs récurrents ne sont pas spécialement localisées au niveau d'hélice  $\alpha$  ou de feuillet  $\beta$ . La première moitié de la chaîne protéique du côté N-terminal a généré plus de deux tiers des séquences peptidiques du peptidome gastrique. Ceci n'a pas été corrélé avec une spécificité de conformation ou de répartition des résidus d'acides aminés hydrophobes des deux chaînes. L'ajout de la pancréatine (composée d'un cocktail de trypsine, chymotrypsine, élastases et carboxypeptidases) a étendu le degré d'hydrolyse des digestats produits dans l'estomac, modélisant ainsi le passage du chyme dans le duodénum entrant en contact avec les enzymes intestinales. Les analyses MS-MS montrent qu'environ un tiers de la population peptidique gastrique a disparu au niveau intestinal. Le peptidome intestinal est composé d'une grande diversité de séquences avec la présence de motifs récurrents, certains ayant été précédemment

identifiés au niveau du peptidome gastrique, comme les motifs  $\alpha$  41-54,  $\alpha$  71-79 et  $\beta$ 3-38, mais également des nouvelles séquences générées. Les extrémités C-terminal des deux chaînes protéiques, bien que composées d'acides aminés différents, ont été à l'origine de l'apparition d'un plus grand nombre de séquences aussi bien au niveau intestinal qu'au niveau gastrique, générant ainsi de nouveaux motifs récurrents comme  $\alpha$  110-120 et  $\beta$  103-110. Les motifs récurrents du peptidome gastrique, comme  $\alpha$  54-67 et  $\beta$  59-69, ont une fréquence d'apparition plus faible sur les cartes de chaleur du peptidome intestinal. Ces observations soutiennent donc l'idée que l'action des enzymes intestinales a significativement modifié la population peptidique générée au niveau du compartiment gastrique. Elles illustrent l'une des principales différences entre l'étude protéomique et l'étude peptidomique : un cocktail de trypsine et de chymotrypsine a moins de spécificité qu'une trypsine de haute pureté (Panchaud et al., 2012). En effet, les motifs récurrents identifiés lors de cette étude sont localisés dans des zones très variées des deux chaînes protéiques et aucune corrélation évidente n'a été mise en évidence entre les résidus d'acides aminés présents dans les motifs et les spécificités de clivage connues des enzymes utilisées.

La présence de séquences peptidiques communes aux peptidomes gastrique et intestinal ainsi que les motifs récurrents identifiés a soulevé la question de la signification de ces séquences spécifiques. Au final, 80 séquences peptidiques ont été identifiées en commun entre les peptidomes gastrique et intestinaux, représentant ainsi environ 25 % du peptidome gastrique et 34 % du peptidome intestinal. De manière intéressante, les séquences et motifs strictement identiques présents dans les deux peptidomes contiennent des acides aminés qui pourraient être des sites potentiels de clivage pour la trypsine et la pepsine (lysine, arginine pour la trypsine ou leucine entre autres pour la pepsine). Par ailleurs, aucun lien évident n'a été observé entre le point isolélectrique ou l'indice d'hydropathie et la résistance de ces séquences peptidiques à l'attaque des enzymes gastro-intestinales. Un des facteurs pouvant influer sur cette résistance pourrait être la conformation des peptides. Bien que cette hypothèse soit encore actuellement très débattue, plusieurs études ont prouvé par différentes techniques spectroscopiques (Résonance Magnétique Nucléaire, dichroïsme circulaire ou infrarouge) qu'une chaîne linéaire de quelques acides aminés pouvait acquérir spontanément un début de conformation (coude ou hélice) en milieu aqueux (Dyson and Wright, 1991). Des peptides de synthèse définis à partir de zones protéiques exhibant des structures tridimensionnelles particulières ont adopté spontanément en solution aqueuse des structures secondaires très semblables aux zones natives et se sont avérés stables thermodynamiquement

(Kim and Baldwin, 1990). Ici, les séquences communes entre les deux peptidomes sont majoritairement localisées au niveau de zones des chaînes protéiques organisées en hélices  $\alpha$ . Ces séquences pourraient donc, dans le digestat, adopter un début de conformation secondaire une fois libérées par action enzymatique ce qui pourraient les rendre résistantes à l'activité enzymatique.

Dans une démarche de validation du modèle statique, une digestion dynamique de l'hémoglobine bovine a été réalisée. Les séquences des échantillons d'absorption jéjunale ont été identifiées par LC-MS-MS et cartographiées. De manière très intéressante, il est ressorti que les motifs récurrents étaient localisés au niveau des mêmes régions des deux chaînes que ceux du peptidome intestinal. Parmi eux, trois motifs sont identiques à ceux du peptidome intestinal ( $\alpha$  72-80,  $\alpha$  110-120 et  $\beta$  32-37) et deux autres sont inclus dans des motifs récurrents plus longs ( $\alpha$  41-55 inclus dans  $\alpha$  47-57,  $\beta$  17-27 partiellement inclus dans  $\beta$  19-25). Seuls les motifs récurrents  $\beta$  70-80,  $\beta$  96-114 et  $\beta$  130-141 du peptidome intestinal n'ont pas été mis en évidence par les cartes de chaleur des échantillons des absorptions jéjunales. La protéine a donc été digérée d'une manière assez semblable entre les deux modèles : les chaînes ont été hydrolysées au niveau des mêmes régions mais des petides plus courts ont été a priori libérés dans le modèle dynamique. Les mêmes motifs récurrents ont été retrouvés dans les deux populations issues des modèles de digestion. Une élaboration des cartes de chaleur des peptidomes complets des échantillons de la digestion dynamique confirmerait cette hypothèse.

La résistance aux enzymes digestives est un prérequis essentiel pour qu'un peptide ou à une molécule puisse exercer son activité biologique. Dans cette optique, la question de la potentielle bioactivité des séquences identifiées comme résistantes aux enzymes gastrointestinales a été ici envisagée. Des tests d'activité biologique et des approches *in silico* permettent d'évaluer les potentiels en tant que peptides bioactifs et leur biodisponibilité dans le tractus GI (Saavedra et al., 2013). D'un autre côté, il doit être également envisagé que la résistance aux conditions GI peut aussi aboutir à une l'action toxique ou allergène d'une molécule, comme c'est le cas pour certains peptides issus de la  $\beta$  lactoglobuline. En effet, cette protéine possède une très bonne stabilité à l'action de la pepsine dans l'estomac de par la présence d'un tonneau  $\beta$  sur la chaîne protéique où sont enfouis de nombreux sites de clivage (Picariello et al., 2010). Dans le cadre de notre étude, la confrontation de notre base de données de peptides issus des peptidomes gastriques et intestinaux avec des bases de données de peptides bioactifs comme BIOPEP ou des bases de données comme celle existante au laboratoire (construite à partir des travaux antérieurs sur l'hémoglobine bovine), nous ont permis d'isoler quelques séquences peptidiques connues pour leurs activités biologiques. Ainsi, des séquences appartenant à la famille des hémorphines comme  $\beta$  31-37 LVVYPWT,  $\beta$ 32-40 VVYPWTQRF ou  $\beta$  31-40 LVVYPWTQRF partageaient toutes le motif LLVVYWT connu pour ses activités opioïdes et anti-hypertensives (Zhao et al., 1997). La deuxième partie de notre étude s'est focalisé sur la mise en évidence de peptides actifs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. A ce niveau de l'étude, aucun peptide connu n'avait été recensé dans la littérature pour ce type d'activité.

En conclusion, l'élaboration de cartographies peptidiques et de cartes de chaleur a été un outil essentiel pour mettre en avant la distribution des séquences peptidiques dans les compartiments du tractus GI ainsi que pour mettre en évidence des motifs récurrents partagés par de nombreuses séquences. Ce travail a également permis d'identifier les populations peptidiques générées au niveau gastrique et conservées au niveau intestinal. De manière très intéressante, cette approche permet ainsi d'identifier les séquences et motifs conservés qui ont été partiellement retrouvés dans des échantillons intestinaux de digestiondynamique de l'hémoglobine.

### **1.8.3** Avantages et limites de l'approche peptidomique appliquée à la digestion GI de l'hémoglobine bovine

Une étude peptidomique a pour vocation de caractériser de manière exhaustive un ensemble de peptides. Dans notre étude, cette approche a été appliquée à un ensemble de peptides issus de la digestion GI *in vitro* d'une protéine agroalimentaire, l'hémoglobine bovine, en choisissant comme technologie principale la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Des approches au pouvoir résolutif différent couplées à un traitement bioinformatique pour l'identification des séquences ont été utilisées et les résultats obtenus ont été comparés en termes de nombre de séquences identifiées, de recouvrement de séquence et de cartographies peptidiques. Comme attendu, la technologie de haute résolution a apporté une réponse bien plus précise que celle de basse résolution : les peptidomes gastriques et intestinaux obtenus par haute résolution contiennent respectivement 20 et 10 fois plus de peptides que ceux obtenus par basse résolution. La technologie haute résolution a également permis d'identifier d'autres protéines présentes dans la poudre d'hémoglobine bovine utilisée, qui pourraient également être des sources de peptides bioactifs même si leur proportion reste très faible face à celle de l'hémoglobine bovine. La technologie LC-HR-ESI-MS-MS s'est

donc imposée comme une méthode de choix dans un objectif d'identification exhaustive de tous les peptides présents dans les peptidomes gastriques et intestinaux. Au final, plus de 1 000 séquences uniques ont été identifiées, tout peptidome confondu. La technologie MS-MS combinée à des outils de traitement de données et de logiciels bioinformatiques performants s'est imposée comme une stratégie analytique de choix dans le cadre de la recherche de peptides bioactifs (Saavedra et al., 2013; Li-Chan, 2015). Cette stratégie tire sa force de sa capacité à fournir, avec un certain degré de précision selon les appareils utilisés, la masse moléculaire et les informations structurales d'une molécule inconnue (Baggerman et al., 2004) et est actuellement reconnue comme l'une des plus performantes et précises dans le cadre de la caractérisation d'un peptidome (Lahrichi et al., 2013; Picariello et al., 2013b). Les progrès de la bioinformatique et l'augmentation de la taille et de l'exactitude des bases de données ont permis d'améliorer la performance du traitement des données générées par spectrométrie de masse et ont rendu la bioinformatique indispensable dans cette stratégie de caractérisation exhaustive d'un mélange complexe.

Toutefois, cette étude a également mis en avant les nombreuses limites auxquelles la plupart des travaux de recherche, dans le domaine de la peptidomique appliquée à l'agro-alimentaire, se sont également confrontés. Les peptides constitués d'un nombre important d'acides aminés sont plus facilement identifiables grâce à un plus grand nombre d'ions fragments, facilitant ainsi l'identification des séquences. Les plus petits peptides peuvent mener à des identifications ambiguës de par le nombre trop faible d'ions fragments et par conséquent de spectres de fragmentation moins informatifs (Paizs and Suhai, 2005). Dès lors, les ions moléculaires de rapport m/z inférieur à 500 Da ont été exclus du procédé d'identification par le logiciel bioinformatique. L'hétérogénéité des peptides de masse moléculaire inférieure à 500 Da n'est donc pas répertoriée dans ce travail de caractérisation des peptidomes gastriques intestinaux. Pour pallier ce manque d'information, de nouvelles approches et complémentaires ont été proposées comme l'utilisation d'un modèle de prédiction des temps de rétention appliqué aux di- et tri-peptides (Le Maux et al., 2015a) ou d'approches bioinformatiques visant à cribler les peptides par similitudes moléculaires avec une base de donnée puis par modélisation de l'interaction entre le peptide d'intérêt potentiel et le récepteur spécifique (Panchaud et al., 2012). L'utilisation d'autres techniques de fragmentation associées aux outils bio-informatiques pourrait également apporter une solution dans l'identification des peptides de bas poids moléculaire par séquençage de novo (Hayakawa et al., 2013). Outre le problème lié à la longueur de la séquence peptidique, les peptides

structurellement proches (peptides isomériques) ont apporté une difficulté supplémentaire à l'analyse. Partageant des propriétés physico-chimiques proches (poids moléculaire, poids isoélectrique, propriétés hydrophobes), leur co-élution a engendré une co-fragmentation lors de la fragmentation en masse pour un même temps de rétention, pouvant ainsi perturber l'identification de la séquence peptidique conduite par le logiciel bioinformatique. Ce phénomène a également été observé pour les peptides partageant un noyau d'acides aminés principal et différent de deux ou trois acides aminés aux extrémités N ou C terminal (ex :TAEEKA, TAEEKAVT, TAEEKAVTA de la chaîne  $\beta$ ). Suite à ces observations il apparait que le rôle joué par l'étape de séparation préliminaire, assurée ici par des techniques de chromatographie liquide, est crucial. Un couplage de techniques chromatographiques, dont la nature des interactions avec les analytes serait différente, pourrait apporter une solution intéressante afin d'augmenter le nombre de peptides identifiés (Wang et al., 2010; García-Cañas et al., 2014). Enfin, une des limites récurrente des analyses peptidomiques est la quantification. Elle reste très difficile à établir en raison de l'effet de suppression d'ionisation qui peut survenir dans les sources d'ions des spectromètres de masse lors de l'analyse d'un mélange peptidique. Cet effet, surtout lié aux sources d'ionisation type électrospray (ESI), peut masquer la présence de certains peptides et ainsi sous-estimer le nombre de séquences présentes (Picariello et al., 2013c). A l'inverse, certains peptides peuvent être dotés d'excellentes propriétés d'ionisation et dès lors apparaitre comme très abondants alors qu'en réalité ils sont présents en faible quantité. Par conséquent, corréler le signal ionique avec l'abondance des ions au sein d'un mélange reste délicat. Une quantification des peptides les plus abondants au sein d'un hydrolysat apporterait une information intéressante, notamment pour la recherche de peptides bioactifs.

## **1.8.4** Elaboration de matrices alimentaires : effet sur la digestion de l'hémoglobine bovine en conditions statiques et dynamiques

Le dernier aspect abordé dans cette partie de l'étude concerne l'élaboration d'une matrice alimentaire incluant la protéine modèle de l'étude. Ces dernières années, la digestion GI des protéines alimentaires a été l'objet d'une recherche croissante, motivée entre autres par le pouvoir satiétogène, les propriétés fonctionnelles et le pouvoir allergène de ces dernières (Mackie and Macierzanka, 2010). La protéine étant rarement consommée seule, elle est souvent en interaction avec d'autres macronutriments et soumise à des procédés thermiques et mécaniques aboutissant à la formation d'une matrice alimentaire riche en interactions (ex : réaction de Maillard entre les résidus d'acides aminés et les sucres réducteurs). Le tractus GI va soumettre l'aliment à une série de transformations mécaniques, enzymatiques et biochimiques aboutissant à la déstructuration de la matrice et à la libération des nutriments au sein des fluides GI (Turgeon and Rioux, 2011). Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'étudier l'influence d'une matrice sur la libération des peptides de l'hémoglobine lors d'une digestion statique ou dynamique. L'outil choisi ici pour comparer les différents digestats est le profil UV obtenu par RP-HPLC. Il a été choisi pour des raisons pratiques et économiques. Bien entendu, il ne donne qu'une information partielle sur les populations peptidiques générées, mais s'est avéré être néanmoins assez résolutif pour identifier des différences majeures. Deux facteurs ont été étudiés : la présence de macronutriments et le mode de cuisson.

Le chauffage préalable de l'hémoglobine n'a pas affecté les profils peptidiques des digestats obtenus. L'ajout progressif de lipides, glucides et de fibres a eu très peu d'impact sur les temps de rétention des pics (données non montrées). En revanche, la présence de la matrice a engendré une diminution de la concentration peptidique dans les digestats gastriques et intestinaux comparé à celles des digestats issus de la digestion de l'hémoglobine seule. La mauvaise dissolution de la matrice amylacée en phase salivaire et gastrique, visible à l'œil nu, probablement liée à l'absence d'enzymes à activité amylolytique a influencé la libération de l'hémoglobine en solution et donc la concentration peptidique finale. L'ajout de la pancréatine contenant des enzymes intestinales telles que des amylases et des lipases a significativement amélioré la déstructuration de la matrice, rendant la protéine plus accessible aux enzymes protéolytiques. D'un point de vue chromatographique, l'impact de la matrice sur les profils peptidiques (temps de rétention et allure du chromatogramme) reste modéré. Il semblerait donc que des populations peptidiques soient semblables à celles observées dans les digestats d'hémoglobine seule, et aient été générées à l'issu de la digestion GI de la matrice d'hémoglobine en conditions statiques. L'identification exhaustive des séquences peptidiques permettrait de valider ou non cette hypothèse. La présence d'une matrice alimentaire complexe n'a pas eu d'influence significative sur la digestion de l'hémoglobine bovine. Elle a toutefois ralenti sa libération dans les fluides simulés, comme précédemment observé. Par conséquent, les concentrations en peptides des digestats gastriques et intestinaux sont inférieures à celles des digestats d'hémoglobine seule. L'étude réalisée avec la protéine seule aurait donc tendance à surestimer les concentrations peptidiques générées.

La comparaison entre la digestion de la protéine seule et de la matrice a également été réalisée avec le modèle dynamique. Comparé à la digestion dynamique de l'hémoglobine seule, la

présence de la matrice a eu une influence significative sur 1) la progression du chyme de l'estomac vers l'iléon dans la première heure de digestion et 2) les concentrations peptidiques mesurées dans l'estomac, le duodénum et l'iléon et dans les absorptions jéjunales au cours des deux premières heures de digestion. Ainsi, après 30 min de digestion dynamique de l'hémoglobine seule, des premières pulsations ont déjà transféré le chyme de l'estomac vers les trois compartiments intestinaux, ce qui est confirmé par les analyses RP-HPLC et SEC du prélèvement iléal. Lors de la digestion de la matrice modèle, le chyme n'a pas encore atteint l'iléon à 30 min de digestion (confirmé par les analyses RP-HPLC et SEC) probablement dû au fait de la plus forte viscosité du chyme en présence de glucides et de fibres. Bien que la viscosité de la matrice n'ait été mesurée dans cette expérience, la présence de glucides et de fibres solubles et insolubles est connue pour augmenter la viscosité (Guillon and Champ, 2000; Singh et al., 2010). De plus, il est désormais admis que la viscosité de la matrice influence largement la vidange gastrique (Bornhorst and Singh, 2014; Moxon et al., 2016), ce qui a été ici remarqué. En revanche, ce retard n'a pas affecté sur le long terme les quantités peptidiques absorbées au niveau du jéjunum et de l'iléon, ni les concentrations peptidiques après 2 h de digestion dans tous les compartiments. Ainsi, les valeurs obtenues ne diffèrent pas de celles mesurées lors de la digestion de la protéine seule. L'action des enzymes intestinales, la présence de bile ainsi que les contractions mécaniques des membranes des compartiments ont été assez efficaces pour déstructurer la matrice. L'utilisation d'un modèle dynamique employé à la digestion d'une matrice modèle a donc permis de mieux mimer les conditions de la digestion humaine, à savoir une libération séquentielle du chyme de l'estomac vers l'intestin, une compartimentation de trois zones intestinales, une déstructuration progressive de la matrice et une absorption continue des peptides libérés au niveau du jéjunum et de l'iléon. D'un point de vue chromatographique, la seule différence majeure ici observée avec la digestion dynamique de la protéine seule concerne la concentration en peptides des compartiments, des prélèvements et des absorptions. Il est à noter néanmoins que les procédés appliqués à l'élaboration de la matrice ainsi que la faible diversité des macronutriments utilisés ne reflètent pas intégralement la complexité de certains aliments issus de l'industrie agro-alimentaire (ex : aliments obtenus par extrusion ou atomisation) ou de produits naturels protéiques (ex : structure fibreuse de la viande). Le modèle de matrice et les procédés utilisés devront donc être complexifiés par la suite afin de reproduire le plus fidèlement possible les conditions réelles de digestion d'un aliment.

L'identification des peptides issus du modèle dynamique a permis d'avoir une première idée des différences entre la digestion de la protéine et de la matrice en termes de nature de séquences générées. Il a été choisi ici de comparer les séquences des échantillons d'absorption jéjunale après 2 h de digestion. Elles représenteraient les séquences potentiellement absorbées par l'intestin et qui pourraient exercer une activité. L'identification des séquences a révélé des poids moléculaires compris entre 300 et 1100 Da quel que soit le substrat digéré (hémoglobine ou matrice). La liste des peptides issus de la digestion de la matrice et « absorbés » présente 40 % de divergence avec celle obtenue pour la protéine modèle, renforçant ainsi l'hypothèse évoquée d'une plus faible accessibilité de la protéine dans la matrice. La présence de la matrice a donc un effet modéré mais remarqué sur le nombre et la nature des séquences peptidiques générées. A nouveau, une identification complète des différents compartiments permettra de confirmer cette hypothèse.

#### 1.9 <u>Conclusion</u>

La première partie de l'étude s'est focalisée sur la caractérisation analytique des digestats obtenus par digestion GI in vitro statique de l'hémoglobine bovine, protéine modèle choisie pour cette étude. Afin de se rapprocher des conditions de digestion GI humaines et de valider notre système d'étude, une matrice alimentaire modèle à base d'hémoglobine bovine a été conçue et un modèle de digestion in vitro dynamique a été utilisé. La mise en place de la démarche analytique a été effectuée sur les digestats générés par le modèle statique, et ce, afin de répondre à deux objectifs distincts : 1) vérifier la reproductibilité de la digestion GI in vitro de l'hémoglobine bovine et obtenir une empreinte caractéristique de chaque étape de la digestion pour ensuite 2) identifier exhaustivement les séquences peptidiques présentes au niveau des peptidomes gastriques et intestinaux et les représenter sous formes de cartographies. Les techniques de chromatographie liquide (RP-HPLC, SEC) couplées à la détection UV et associées à des analyses MALDI-MS ont été des outils fiables de validation de la reproductibilité. Elles ont également permis d'identifier une population peptidique très complexe en termes de poids moléculaire et de propriétés physico-chimiques au sein des compartiments gastrique et intestinal. Le deuxième objectif n'a été atteint que grâce à l'utilisation de technologies avancées de spectrométrie de masse en mode tandem couplées à des outils bioinformatiques. La supériorité de la technologie haute résolution a été démontrée pour l'identification exhaustive des séquences peptidiques et les cartographies des peptidomes gastriques et intestinaux ont été établies. La comparaison des séquences générées et des cartes de chaleur ont mis en évidence les régions des chaînes protéiques natives plus fréquemment hydrolysées que d'autres et, à l'inverse, des zones conservées dont les motifs d'acides aminés ont été partagés par un très grand nombre de séquences. Presqu'un quart des séquences peptidiques identifiées dans le peptidome gastrique a été retrouvé dans le peptidome intestinal. Cette résistance à l'action des enzymes intestinales n'a, pour le moment, pas pu être liée aux propriétés physico-chimiques des séquences concernées mais elle pourrait être un déterminant essentiel de l'activité biologique des peptides. Enfin, la conception d'une matrice alimentaire à base d'hémoglobine bovine a complexifié le modèle utilisé et a orienté l'étude vers des conditions plus physiologiques de digestion d'un aliment. Elle semble avoir un effet plus marqué sur la solubilisation de la protéine en solution que sur les profils peptidiques générés. L'utilisation d'un modèle de digestion dynamique a permis de générer des peptidomes gastriques et intestinaux chacun caractérisé par leur empreinte et qui ont présenté des similitudes avec les peptidomes du modèle statique. En revanche, le modèle dynamique de digestion a permis de simuler une libération peptidique séquentielle du chyme vers l'intestin et l'absorption intestinale, montrant ainsi les limites d'un modèle statique et très certainement une plus grande similitude avec les conditions physiologiques de la digestion. Une caractérisation des séquences générées par le modèle dynamique a été initiée et mériterait d'être approfondie par une caractérisation analytique plus poussée et l'identification des séquences peptidiques des quatre compartiments par spectrométrie de masse.

2 Mise en évidence des groupes peptidiques, issus de la digestion GI de l'hémoglobine bovine, impliqués dans les activités biologiques en rapport avec l'homéostasie énergétique

#### 2.1 Introduction

Au-delà de son aspect nutritionnel, la digestion des protéines alimentaires a démontré être à l'origine de nombreux peptides pouvant interagir avec l'environnement GI et exercer plusieurs actions bénéfiques pour la santé. Parmi ces activités biologiques, celles en relation avec la régulation de l'homéostasie énergétique prennent de plus en plus d'importance dans un contexte où les pathologies liées au déséquilibre alimentaire sont en pleine expansion au niveau mondial telles que le syndrome d'obésité et les maladies associées (hypertension artérielle et diabète de type 2 entre autres). Le pouvoir satiétogène des protéines alimentaires a été partiellement élucidé, notamment grâce à la découverte de leur potentiel stimulateur de la sécrétion d'hormones à action anoréxigène. Le premier objectif de cette deuxième partie a été d'identifier l'activité biologique potentielle des digestats d'hémoglobine bovine générés avec le modèle de digestion GI statique *in vitro*. Les activités biologiques étudiées ont été la stimulation de la sécrétion des CCK et du GLP-1 et l'inhibition de la DPP-IV. Le deuxième objectif a été de purifier les digestats sélectionnés afin d'isoler des fractions peptidiques bioactives et de les tester, *in vitro*, dans les conditions les plus proches possibles des conditions physiologiques.

#### 2.2 Caractérisation des activités biologiques des digestats d'hémoglobine bovine

## 2.2.1 Effet des digestats sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales produites par les cellules STC-1

Les cellules STC-1 ont été incubées avec tous les prélèvements gastriques et intestinaux réalisés au cours de la digestion de l'hémoglobine bovine. Les concentrations de CCK et de GLP-1 mesurées dans les surnageants sont représentées dans la *Figure 64*.



*Figure 64*: *Effet du prélèvement salivaire et des digestats gastriques et intestinaux sur la sécrétion des hormones CCK et GP-1 actif par les cellules STC-1.* 

**A** : CCK et **B** : GLP-1 actif. Le contrôle est composé d'un tampon Hepes pH 7,4. Les différents échantillons ont été incubés à 1,3 % (p/v) pendant 2 h. Les moyennes (n = 3) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

Concernant les concentrations de CCK mesurées, des valeurs non significativement différentes ont été obtenues après traitement des cellules STC-1 avec le contrôle, la salive et les digestats gastriques 60 et 120 min et sont respectivement de  $33,6 \pm 1,1$  pM,  $47,2 \pm 1,3$  pM,  $51,0 \pm 3,1$  pM et  $43,4 \pm 0,8$  pM (*Figure 64A*). Par contre, le traitement avec les quatre digestats intestinaux a augmenté significativement la concentration de CCK sécrétées, atteignant des valeurs allant de  $119,1 \pm 9,4$  pM pour le digestat intestinal 30 min à  $135,1 \pm 4,3$  pM pour le digestat intestinal 120 min. De même, aucune différence significative n'a été observée entre les concentrations de GLP-1 mesurées après traitement des cellules STC-1 avec la salive, les digestats gastriques 60 min et 120 min avec respectivement des valeurs de 243,7 \pm 28,0 pM,  $245,4 \pm 27,0$  pM et  $308,4 \pm 19,4$  pM (*Figure 64B*). En revanche, ces

valeurs sont significativement supérieures à celle du contrôle ( $62,1 \pm 5,2$  pM). L'incubation avec les quatre digestats intestinaux a induit des concentrations de GLP-1 allant de 575,3 ± 3,0 pM (digestat intestinal 30 min) à 583,4 ± 60,0 pM (digestat intestinal 120 min), soit pour tous les digestats intestinaux, une augmentation significative de la production de GLP-1 plus de 6 fois supérieure au contrôle. Seul le digestat intestinal 90 min a induit une réponse plus faible en GLP-1 (420,1 ± 31,4 pM) que les autres digestats intestinaux et n'a montré aucune différence significative avec les effets des digestats gastriques et du prélèvement salivaire.

Parmi tous les prélèvements de la digestion GI *in vitro* d'hémoglobine bovine, les digestats intestinaux sont les meilleurs stimulateurs de la sécrétion des CCK et de GLP-1 par les cellules STC-1.

#### 2.2.2 Effet des digestats sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV

Les valeurs d'inhibition obtenues pour les prélèvements gastriques et intestinaux sont représentées dans la *Figure 65*. Un contrôle positif d'inhibition a été réalisé à chaque test avec la diprotine A, inhibiteur spécifique de l'activité de la DPP-IV.



*Figure 65: Inhibition de l'activité de la DPP-IV par les digestats gastriques et intestinaux* Les digestats ont été testés à une concentration finale de 1 mg.mL<sup>-1</sup> (p/v). Les moyennes  $\pm$  écart type (n = 3) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0,05).

Le pourcentage d'inhibition de l'activité de la DPP-IV a augmenté progressivement tout au long de la digestion passant de 22,6  $\pm$  1,7 % pour le digestat gastrique 30 min à 49,8  $\pm$  3,8 % pour le digestat gastrique 120 min. Au cours de la phase intestinale le pourcentage d'inhibition de l'enzyme est passé de 59,1  $\pm$  0,9 % en présence du digestat récolté après 210 min de digestion (soit 90 min de phase intestinale) à 60,2  $\pm$  1,7 % en présence du digestat récolté après 240 min de digestion (soit 120 min de phase intestinale). Ces valeurs sont significativement plus hautes que celles obtenues pour les digestats gastriques et intestinaux 30 min et 60 min. En revanche, toutes ces valeurs sont significativement plus basses que celle obtenue en présence de la diprotine A testée à la concentration finale de 0,014 g.L<sup>-1</sup> (72,7  $\pm$  2,6 %). Ainsi la digestion *in vitro* de l'hémoglobine bovine génère des peptides dont le potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV augmente au fur et à mesure de la digestion. Les meilleurs potentiels inhibiteurs ont été observés pour les digestats intestinaux testés à une concentration finale de 1 g.L<sup>-1</sup>.

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des digestats et de la diprotine A ont été comparées et reportées dans le *Tableau 9*.

Digestats et inhibiteur spécifique	IC <sub>50</sub>	% inhibition de l'activité DPP-IV
Digestat gastrique 30min	$3,40 \pm 0,24^{e}$	22,6 ± 1,7
Digestat gastrique 60min	$1,87 \pm 0,18^{b,c,d}$	37,3 ± 2,9
Digestat gastrique 90min	$1,92 \pm 0,19^{b,c,d}$	36,4 ± 2,8
Digestat gastrique 120min	$1,05 \pm 0,24^{a,b}$	49,8 ± 3,8
Digestat intestinal 30min	$1,41 \pm 0,37^{a,b}$	$43,5 \pm 0,2$
Digestat intestinal 60min	$1,09 \pm 0,17^{a,b}$	$52,2 \pm 1,6$
Digestat intestinal 90min	$0,76 \pm 0,06^{a}$	60,1 ± 5,3
Digestat intestinal 120min	$0,74 \pm 0,02^{a}$	59,1 ± 0,9
Diprotine A	$0,0015 \pm 0,0003^{\text{f}}$	72,7 ± 2,6

**Tableau 9**: Concentrations inhibitrices induisant 50% d'inhibition ( $IC_{50}$ ) des digestats d'hémoglobine bovine et de la diprotine A.

Les moyennes (n = 3) des valeurs d'IC<sub>50</sub> sont exprimées en mg.mL<sup>-1</sup> poids sec. Les pourcentages d'inhibition de l'activité de la DPP-IV sont déterminés pour une concentration finale de 1 g.L<sup>-1</sup> poids sec et 0,014 g.L<sup>-1</sup> de diprotine A. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

En accordance avec ce qui a été précédemment remarqué, plus la digestion de l'hémoglobine bovine progresse, plus les valeurs d'IC<sub>50</sub> des digestats baissent. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ont ainsi diminué de 3,40 ± 0,24 mg.mL<sup>-1</sup> (digestat gastrique 30 min) à 1,05 ± 0,24 mg.mL<sup>-1</sup> (digestat gastrique 120 min) alors que pour la phase intestinale, elles ont seulement baissé de 1,41 ± 0,37 mg.mL<sup>-1</sup> (digestat intestinal 30 min) à 0,74 ± 0,02 mg.mL<sup>-1</sup> (digestat intestinal 120 min). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> rapportées pour les digestats d'hémoglobine bovine sont toutefois entre 500 et 2000 fois supérieures à celle de la diprotine A (inhibiteur de référence).

Au terme de cette première étape d'analyse, il a été démontré que les digestats gastriques et intestinaux stimulaient la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) sur une lignée de cellules entéroendocrines et inhibaient l'activité de la DPP-IV. De manière générale, les digestats intestinaux possèdent un potentiel bioactif supérieur à ceux des digestats gastriques et de la protéine non digérée. La suite de l'étude s'est donc focalisée sur le digestat intestinal obtenu après 120 min de digestion *in vitro*.

### 2.2.3 Effet du digestat intestinal 120 min sur l'expression des gènes codant pour les hormones CCK et GLP-1

L'effet du digestat intestinal 120 min sur l'expression des gènes codant pour les hormones intestinales chez la cellule STC-1 a été étudié (protocole au paragraphe 1364.6 du chapitre Matériels et Méthodes). Les amorces ont été spécifiquement conçues pour cibler la région d'ARNm du proglucagon (PG), gène codant pour le précurseur du GLP-1. L'expression du gène codant pour la prohormone convertase 1 (PC1), enzyme assurant le clivage protéolytique du PG en GLP-1, a également été étudiée en présence du digestat. Les résultats sont présentés ci-après (*Figure 66*).



*Figure 66*: *Effet de du digestat intestinal 120 min (I120min) sur l'expression des gènes codant pour les hormones CCK, PG et la PC-1.* 

Les quantités relatives d'ARNm transcrits des gènes codant pour les CCK (**A**), le PG (**B**) et la PC-1 (**C**) ont été déterminés par rt-qPCR après un traitement de 24 h des cellules STC-1 avec le contrôle (DMEM), le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) ou le digestat intestinal 120 min (I120) testé à 0,35 et 0,7 % (p/v). Les résultats sont exprimés en pourcentages moyens par rapport au contrôle  $\pm$  écart type (n = 3) et comparés par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey. Pour le même graphique, les moyennes ne partageant pas une lettre identique sont statistiquement différentes (p < 0,05).

Les quantités relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour les CCK ont augmenté d'un facteur 2 par rapport au contrôle lors d'un traitement avec le digestat testé à 0,35 % et d'un facteur d'environ 3,4 en présence du digestat testé à 0,7 % (*Figure 66 A*). Les quantités relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour le PG ont augmenté d'un facteur 7,2 par rapport au contrôle, en présence du digestat testé à 0,7 % (*Figure 66 B*). Les quantités relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour la PC1 n'ont pas été affectées de manière significative par le traitement avec le digestat (*Figure 66 C*). Le PMA, dont l'action sur l'augmentation des quantités d'ARNm transcrits du gène codant pour le PG dans les cellules

pancréatiques a été démontrée (Drucker et al., 1987), n'a eu aucun effet sur le niveau de transcription des gènes codant pour les hormones.

#### 2.3 Fractionnement du digestat intestinal et potentiels bioactifs

#### 2.3.1 Plan de fractionnement du digestat intestinal 120 min

Dans le but d'identifier les peptides impliqués dans les activités biologiques observées, une première étape de fractionnement a été appliquée au digestat intestinal 120 min par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à une détection UV à 215 nm. Quatre fractions ont été définies et notées de A à D (*Figure 67*).



*Figure 67*: *Profil de distribution des poids moléculaires du digestat intestinal 120 min. obtenu par SEC.* 

La séparation a été menée avec une colonne HiLoad 16/600 Superdex prep 30 grade en appliquant une élution isocratique d'un mélange de 29,9 % d'acétonitrile, 69,9 % d'eau ultrapure, 0,1 % de TFA à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La relation de régression linéaire existant entre le Log du poids moléculaire des standards utilisés et leur volume d'élution a été utilisée pour calculer le poids moléculaire apparent. La détection UV est réalisée à 215 nm.

La fraction B contient la plus grande proportion de peptides en poids sec, après sèchage et pesée de la fraction, suivie par la fraction C, la fraction D puis la fraction A. Une analyse LC-MS a été menée sur les quatre fractions afin de vérifier la gamme de masse des populations peptidiques dans chacune des fractions. Les quatre fractions re-suspendues dans du tampon Hepes à 0,4 % (p/v) ont été injectées à hauteur de  $20 \mu$ L et séparées sur phase inverse avec un gradient linéaire de 0 à 60 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique pendant 60 min. Les profils tridimensionnels présentés dans la *Figure 68* représentent le

rapport m/z de chaque ion moléculaire en fonction du temps de rétention et de l'intensité du courant ionique.



Figure 68: Profils tridimensionnels des analyses LC-MS des fractions SEC

A) fraction B, B) fraction C et C) fraction D du digestat intestinal. Pour chaque figure, le rapport m/z d'un ion moléculaire est représenté en fonction de son temps de rétention et de son intensité. Le code couleur de ce dernier va du blanc (intensité ionique nulle) à rouge (intensité ionique maximale). La séparation a été menée sur colonne C18 avec un gradient linéaire de 0 à 60 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1% d'acide formique pendant 60 min.

Ces profils tridimensionnels permettent de visualiser dans chaque fraction l'abondance et les masses des ions moléculaires, ici représentés sous forme de points bleu marine. La charge des ions a été vérifiée manuellement pour tous les profils afin de connaitre le poids moléculaire de chaque ion. La fraction B contient une abondance de molécules dont les poids moléculaires semblent couvrir une large gamme de masse allant de 200 à 1200 Da, principalement élués lors des premières 40 min du gradient (*Figure 68A*). La fraction C contient des molécules de poids moléculaire majoritairement compris entre 300 et 800 Da (*Figure 68B*) avec une abondance a priori plus faible que la fraction B. La fraction D contient des molécules aux poids moléculaires globalement inférieures à 600 Da (*Figure 68C*) et présente la plus faible abondance des trois fractions.

### 2.3.2 Effets des différentes fractions obtenues par SEC sur la stimulation de la sécrétion des CCK et la régulation de l'expression de leur gène

#### 2.3.2.1 Effet des fractions SEC sur la stimulation de la sécrétion des CCK

Les cellules STC-1 ont été mises en contact avec le digestat intestinal 120 min et les fractions obtenues par SEC du digestat intestinal 120 min Les résultats sont présentés *Figure 69*.



*Figure 69: Effets du digestat intestinal 120 min et des 4 fractions du digestat obtenus par SEC sur la sécrétion des CCK par les cellules STC-1.* 

Le contrôle est composé d'un tampon Hepes pH 7,4. Le digestat intestinal 120 min (I120min) est testé à 0,5 % et 1 % (p/v). Les fractions SEC sont reprises dans le tampon Hepes et testées à la concentration de 1 % (p/v). Les différents traitements sont incubés 2 h au contact des cellules.

(suite légende *Figure 69*) Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

Ils montrent tout d'abord que les digestats et les différentes fractions stimulent significativement la sécrétion des CCK comparé au contrôle. Ainsi, les valeurs des concentrations en CCK mesurées dans les surnageants après contact avec les fractions A et B, testées à une concentration de 1 % (p/v), ont atteint respectivement 177,4  $\pm$  61,2 pM et de 72,7  $\pm$  12,3 pM. Aucune différence significative n'a été observée entre les fractions A et B et le digestat intestinal testé aux deux concentrations. En revanche, les fractions C et D testées à 1 % (p/v) ont fortement stimulé la sécrétion des CCK avec des concentrations respectives de 1323,2  $\pm$  187,6 pM et 1192,5  $\pm$  132,2 pM. Ces valeurs sont environ 8 fois plus importantes que celle obtenue avec le digestat intestinal testé à 1 % et 170 fois plus importantes que celle du contrôle.

#### 2.3.2.2 Effet des fractions SEC sur l'expression du gène codant pour les CCK

Les fractions A, B, C et D ont été mises en contact avec les cellules STC-1 à trois concentrations différentes et les quantités relatives d'ARNm transcrits ont été exprimées en pourcentage par rapport au contrôle (*Figure 70*).



*Figure 70*: *Effet des fractions du digestat intestinal 120 min sur l'expression du gène codant pour les CCK dans la cellule STC-1* 

(suite légende *Figure 70*) Le contrôle est composé d'un milieu DMEM sans SVF. Les quatre fractions sont reprises dans la solution contrôle et testées à 0,1, 0,2 et 0,4 % (p/v). Les quantités relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour les CCK sont déterminées par rt-qPCR après un contact de 24 h entre les digestats, fractions ou contrôle et les cellules STC-1. Les résultats sont reportés en pourcentages moyens par rapport au contrôle  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs sont significativement non différentes suite à un traitement statistique par ANOVA deux facteurs (p = 0,809).

L'analyse de la variance à deux facteurs (fraction et concentration) n'a montré aucun effet significatif des fractions et/ou de leur concentration sur les quantités moyennes relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour les CCK (p = 0,809). Les fractions ont induit une augmentation des quantités relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour les CCK d'un facteur allant de 3 à 9 selon les concentrations par rapport au contrôle. Un effet dose est observé pour les concentrations testées des fractions C et D sur les quantités relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour les CCK. Les plus fortes concentrations des fractions C et D ont induit des niveaux de transcriptions 10 fois supérieurs à celui induit par le contrôle.

Une analyse de la variance à un facteur a été réalisée sur les valeurs des quantités relatives d'ARNm transcrits en présence des fractions testées à la plus forte concentration (0,4 %) suivie d'un test de Tukey. Seule la fraction C a induit une augmentation significative des quantités relatives d'ARNm transcrits comparé au contrôle et aux autres fractions testées (p < 0,05).

# 2.3.3 Effets des fractions obtenues par SEC sur la sécrétion de GLP-1 et l'expression du gène codant pour le proglucagon

#### 2.3.3.1 Effet des fractions obtenues par SEC sur la sécrétion du GLP-1

Les concentrations de GLP-1 actif secrétées par les cellules STC-1 avec le digestat intestinal 120 min et les fractions sont représentées dans la *Figure 71*.



*Figure 71*: *Effets du digestat intestinal 120 min et des 4 fractions obtenues par SEC sur la sécrétion de GLP-1 actif par les cellules STC-1.* 

Le contrôle est composé d'un tampon Hepes pH 7,4. Le digestat intestinal 120 min (I120min) est testé à 0,5 % et 1 % (p/v). Les fractions SEC sont reprises dans le tampon Hepes et testées à la concentration de 1 % (p/v). Les différents traitements sont incubés 2 h au contact des cellules. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

En premier lieu, les résultats montrent que les digestats et les différentes fractions stimulent significativement la sécrétion de GLP-1 comparés au contrôle. Les fractions A, B et C ont stimulé la sécrétion de GLP-1 avec des concentrations mesurées dans les surnageants respectivement de 730,9  $\pm$  42,6 pM, 658,7  $\pm$  32,9 pM et 672,0  $\pm$  36,8 pM. Ces valeurs ne sont statistiquement différentes ni entre elles, ni avec la concentration de GLP-1 obtenue en réponse au digestat intestinal 1 % (804,3  $\pm$  52,0 pM). Le contact avec la fraction D et le digestat 0,5 % a conduit à l'obtention de concentrations de GLP-1 plus faibles (respectivement de 310,4  $\pm$  32,9 pM et de 221,7  $\pm$  30,0 pM). Les concentrations de GLP-1 plus faibles (le digestat 1 % ont été plus de 23 fois supérieures à celle mesurée pour le contrôle (29,4  $\pm$  6,0 pM).
# 2.3.3.2 Effet des fractions obtenues par SEC sur l'expression du gène codant pour le proglucagon

Les fractions A, B, C et D ont été mises en contact avec les cellules STC-1 à trois concentrations différentes. Les quantités d'ARNm transcrits du gène codant pour le PG (proglucagon) ont été exprimées en pourcentage par rapport au contrôle (*Figure 72*).



*Figure 72*: *Effet des fractions du digestat intestinal 120 min sur l'expression du gène codant pour le PG (proglucagon) dans la cellule STC-1.* 

Le contrôle est composé d'un milieu DMEM sans SVF. Les quatre fractions sont reprises dans la solution contrôle et testées à 0,1, 0,2 et 0,4 % (p/v).Les quantités relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour le PG sont déterminées par rt-qPCR après un contact de 24 h entre les digestats, fractions ou contrôle (DMEM) et les cellules STC-1. Les résultats ont été reportés en pourcentages moyens par rapport au contrôle  $\pm$  écart type (n = 3) et comparés par une ANOVA deux facteurs (p = 0,796).

L'analyse de la variance à deux facteurs (fraction et concentration) n'a montré aucun effet significatif des fractions et/ou de leur concentration sur les quantités moyennes relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour le PG par rapport au contrôle (p = 0,796). Un effet dose a été observé avec les trois concentrations des fractions C et D sur les quantités moyennes relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour le PG. Cependant, la très forte variabilité des données obtenues pour chaque fraction n'a pu permettre de déterminer une tendance claire par rapport aux résultats observés.

Une analyse de la variance à un facteur a été réalisée sur les quantités relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour le PG en réponse au contrôle et aux fractions testées à 0,4 % (p/v). Il a ainsi été mis en évidence que les fractions A, C et D induisaient des quantités relatives d'ARNm transcrits du gène codant pour le PG 6 à 8 fois supérieures à celles induites par le contrôle en moyenne (p < 0,05, test de Tukey).

# 2.3.4 Effet des fractions obtenues par SEC sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV

Le potentiel inhibiteur de la DPP-IV des fractions A, B, C et D du digestat intestinal 120 min (paragraphe 2.3.1) a été étudié (*Figure 73*).



*Figure 73:* Effet des fractions SEC du digestat sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV Chaque fraction est testée à une concentration finale de 0,86 mg.mL<sup>-1</sup>poids sec. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

Les résultats montrent que les fractions B et C exercent les plus forts potentiels d'inhibition de l'activité de la DPPIV avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 57,4 ± 0,4 et 60,0 ± 1,9 % pour une concentration finale de 0,86 mg.mL<sup>-1</sup> poids sec. Ces effets sont environ deux fois supérieurs à ceux mesurés pour les fractions A (32,9 ± 2,6 %) et D (30,6 ± 4,6 %). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des quatre fractions ont été calculées et reportées dans le *Tableau 10*.

Fractions et inhibiteur spécifique	IC <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )
Fraction A	$2.03 \pm 0.22^{a}$
Fraction B	$0.59 \pm 0.02^{b}$
Fraction C	$0.53 \pm 0.06^{b}$
Fraction D	$2.23 \pm 0.27^{a}$
Diprotine A	$0.0015 \pm 0.0003^{\circ}$

**Tableau 10**: Concentrations inhibitrices induisant 50 % d'inhibition de l'activité de la DPP-IV ( $IC_{50}$ ) des fractions issues du digestat intestinal.

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des fractions B et C sont presque 4 fois plus faibles que celles des fractions A et D. Cependant, ces valeurs restent plus de 300 fois supérieures à celle de l'inhibiteur de référence, la diprotine A.

Au regard des résultats obtenus, les deux fractions B et C possèdent à la fois un bon potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 et un bon potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV. Compte tenu du fait que l'activité de la DPP-IV conditionne l'action du GLP-1, il a été décidé de se focaliser sur ces deux fractions, en les regroupant (FBC), pour la recherche de séquences bioactives.

### 2.4 <u>Fractionnement des fractions B et C et potentiels bioactifs sur la stimulation de la</u> sécrétion de GLP-1 et l'inhibition de la DPP-IV

Compte-tenu de l'abondance peptidique de ces deux fractions, une étape supplémentaire de fractionnement a été réalisée. Une étape de séparation par chromatographie liquide a donc été appliquée aux fractions B et C regroupées et renommées FBC. L'étude du potentiel bioactif des fractions FC et FD sur la stimulation de la sécrétion des CCK a été reportée et discutée au paragraphe 3.2.

### 2.4.1 Plan de sous-fractionnement de la fraction BC par RP-HPLC

La fraction BC a été séparée par RP-HPLC en mode semi-préparatif (Figure 74).



Figure 74 : Profil de séparation RP-HPLC de la fraction FBC.

La séparation d'une injection de 13,5 mg de la fraction FBC a été réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient linéaire 0-70 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA en 80 min à un débit de 1,8 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

A partir du chromatogramme obtenu par détection UV à 215 nm, 11 sous-fractions (notés FBC-X avec X numéro de la sous-fraction) ont été collectées manuellement, séchées par *speed vacuum* et reprises dans le tampon adéquat pour le test de contact avec les cellules STC-1 ou pour le test d'inhibition de la DPP-IV.

### 2.4.2 Effet des sous-fractions FBC sur la stimulation de la sécrétion de GLP-1

Chaque sous-fraction a été testée à une concentration de 0,2 % (p/v). Les résultats obtenus sont présentés *Figure 75*.



*Figure 75 : Effets des sous-fractions issues de FBC et de la fraction FBC sur la sécrétion de GP-1 actif par les cellules STC-1.* 

Le contrôle est composé d'un tampon Hepes pH 7,4. Les fractions sont reprises avec le tampon Hepes et testées à la concentration finale de 0,2 % (p/v). Les échantillons sont mis à incuber 2 h avec les cellules. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

La plus forte stimulation de la sécrétion de GLP-1 a été obtenue avec la sous-fraction FBC-4 (550,9  $\pm$  102,8 pM, p < 0,05). Le contact avec les deux sous-fractions FBC-3 et FBC-5 a permis d'atteindre des concentrations respectives de 386,8  $\pm$  18,7 pM et 351,2  $\pm$  37,0 pM. Ces trois valeurs sont significativement supérieures à celles induites par le contrôle (131,3  $\pm$  33,7 pM) et la fraction BC (15,8  $\pm$  7,7 pM). Les trois sous-fractions FBC-3, FBC-4 et FBC-5 ont provoqué une augmentation de la sécrétion de GLP-1 d'un facteur supérieur à 20 par rapport à la fraction d'origine.

#### 2.4.3 Effet des sous-fractions FBC sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV

Les 11 sous-fractions obtenues à partir de la fraction BC (*Figure 74*) ont toutes été testées pour leur potentiel inhibiteur de la DPP-IV à une concentration finale de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup> poids sec. Les résultats sont présentés *Figure 76*.



**Figure 76**: Effet des sous-fractions de la fraction FBC obtenues par RP-HPLC en mode semi préparatif sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV

Chaque sous-fraction est reprise dans un tampon Tris-HCl pH 8 et testée à la concentration finale de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup> poids sec. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

Les deux sous-fractions FBC-3 et FBC-9 ont inhibé l'activité de la DPP-IV de  $62,1 \pm 0,9$  % et  $59,2 \pm 2,1$  %, valeurs significativement supérieures à celles mesurées en présence des autres sous-fractions. Ces valeurs sont 1,5 fois plus importantes que celle induite par la fraction native FBC (p < 0,05, test de Tukey). Les sous-fractions FBC-1, 8 et 11 ont inhibé dans une moindre mesure l'activité de la DPP-IV avec des pourcentages d'inhibition mesurés de respectivement  $26,1 \pm 0,8$  %,  $30,3 \pm 0,5$  % et  $21,2 \pm 3,9$  % contre  $39,9 \pm 0,7$  % pour la fraction BC. L'ensemble des valeurs d'IC<sub>50</sub> est récapitulé dans le *Tableau 11*.

Sous-fraction	$IC_{50}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	Sous-fraction	$IC_{50}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )
FBC-1	$8,89 \pm 1,40^{a}$	FBC-7	$0,94 \pm 0,07$ <sup>e,f</sup>
FBC-2	$0,75 \pm 0,11$ f	FBC-8	$1,86 \pm 0,12$ <sup>b</sup>
FBC-3	$0,31 \pm 0,02^{\text{h}}$	FBC-9	$0,38 \pm 0,04^{\text{h}}$
FBC-4	$0,60 \pm 0,02$ <sup>g</sup>	FBC-10	$1,03 \pm 0,09^{c,d}$
FBC-5	$1,30 \pm 0,08$ <sup>c</sup>	FBC-11	$0,98 \pm 0,09$ <sup>c,d</sup>
FBC-6	$0,88 \pm 0,07^{\rm d,e}$		

*Tableau 11* : Valeurs des IC<sub>50</sub> des sous-fractions de la fraction BC inhibant l'activité de la DPP-IV.

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

Au terme de cette étape du travail, la sous-fraction FBC-3 semble posséder le potentiel d'inhibition de la DPP-IV le plus prometteur et un des meilleurs potentiels stimulateurs de la sécrétion de GLP-1. La sous-fraction FBC-3 combine ainsi deux activités biologiques qui sont physiologiquement liées. La suite de l'étude s'est donc focalisée sur cette sous-fraction et sur l'identification de sa population peptidique.

#### 2.5 <u>Utilisation de la cellule Caco-2 comme modèle de la barrière intestinale</u>

Plusieurs facteurs comme la présence d'enzymes au niveau de la barrière intestinale n'ont pas été pris en compte lors des tests précédemment décrits et peuvent compromettre le potentiel biologique des digestats et fractions. Afin de tester ces facteurs sur la biodisponibilité des peptides, il a été décidé de travailler avec un modèle cellulaire de la barrière intestinale, la lignée cellulaire Caco-2. L'utilisation de ce modèle a comme objectifs principaux de : 1) modéliser une absorption peptidique avec une monocouche de cellules et 2) évaluer le potentiel inhibiteur des digestats ou fractions identifiées sur l'activité de la DPP-IV exprimée par les cellules Caco-2.

### 2.5.1 Etude du passage de la sous-fraction FBC-3 au travers d'une monocouche de cellules Caco-2

A partir d'un digestat intestinal d'hémoglobine bovine, la sous-fraction FBC-3 a été isolée pour son potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 et inhibiteur de l'activité de la DPP-IV *in vitro*. L'activité des peptides de cette sous-fraction s'exercerait aussi bien dans le lumen intestinal qu'au niveau basolatéral de la barrière. Afin d'appréhender le devenir de cette sous-fraction dans des conditions physiologiques, la barrière intestinale a été modélisée par une monocouche de cellules Caco-2 différenciées dans le but d'étudier la cinétique de passage des peptides contenus dans FBC-3. Les objectifs de cette expérience sont principalement d'identifier les peptides provenant de la sous-fraction FBC-3 capables de passer intacts la barrière puis de déterminer l'influence du passage de la barrière sur les propriétés bioactives des peptides dits « résistants ». Les protocoles utilisés sont décrits au paragraphe 4.8 du chapitre Matériels et Méthodes.

### 2.5.1.1 Modèle de barrière Caco-2 utilisé

Afin de modéliser la barrière intestinale, des cellules Caco-2/TC7 ont été cultivées sur des inserts pendant 3 semaines créant ainsi une monocouche cellulaire différenciée séparant les pôles apical et basal (*Figure 77*).



**Figure 77:** Modèle de barrière de cellules Caco-2 différenciées utilisé pour l'étude du passage des peptides

La fraction FBC-3 est reprise dans le milieu de transport contenant 100  $\mu$ M de Lucifer Yellow (LY) et est déposée dans le pôle apical. Du milieu de transport est déposé dans le pôle basolatéral. Le volume basolatéral est 2,5 fois supérieur à celui du pôle apical. Les prélèvements sont réalisés pendant une cinétique de 2 h d'incubation dans les deux pôles.

Deux expériences de passage ont été menées au cours de cette étude dont les conditions expérimentales sont récapitulées dans le *Tableau 12*.

**Tableau 12**: Conditions expérimentales du passage d'une barrière de cellules Caco-2 de la sousfraction FBC-3

	Expérience 1	Expérience 2	
Objectif	Optimiser la concentration de la	Confirmer le passage de la sous-fraction FBC-3	
fraction peptidique FBC-3		à la concentration optimisée	
Concentrations	$4, 2, 1, 0, 5, \text{et } 0, 25, \text{g } \text{L}^{-1}(\text{p/y})$	$4 \text{ g I}^{-1}(\mathbf{p}/\mathbf{y})$	
<b>FBC-3</b>		+ g.L (b))	
Test de la LY	Non	Oui, 100 µM par puits (apical)	

### 2.5.1.2 Stratégie analytique adoptée

Le premier objectif de l'expérience de passage de la barrière de cellules Caco-2 a été d'identifier les peptides provenant de la sous-fraction FBC-3 capables de passer intacts dans le compartiment basolatéral. Il a été choisi de suivre et d'identifier les peptides impliqués par LC-MS-MS. Les premières analyses MS-MS des échantillons de la première expérience de passage ont mis en évidence certaines difficultés analytiques comme une très faible concentration peptidique dans les surnageants basolatéraux quasiment non détectable par UV, la présence de peptides « contaminants » issus de la dégradation de la population peptidique par les enzymes des cellules, ou le faible volume des échantillons. Par conséquent, afin de pouvoir identifier le maximum de séquences provenant des compartiments basolatéraux et apicaux, une stratégie analytique a été adoptée. Elle vise à utiliser deux techniques chromatographiques complémentaires avant l'analyse par le spectromètre de masse : une séparation sur phase inverse et une séparation en mode HILIC. Comme représenté Figure 74, la sous-fraction FBC-3 a été éluée à des pourcentages d'acétonitrile inférieurs à 15 % sur phase inverse témoignant d'un caractère plus « hydrophile » de la sous-fraction par rapport à la majorité des autres sous-fractions. L'analyse s'est essentiellement focalisée sur l'identification des séquences communes entre la solution mise en contact des cellules et les prélèvements apicaux et basolatéraux correspondants. Elle n'a pas cherché à réaliser une identification exhaustive de toutes les séquences peptidiques présentes dans les deux compartiments, même si de nouvelles séquences générées au cours de l'expérience pourraient se révéler intéressantes d'un point de vue biologique. De même, les échantillons collectés à la fin de la cinétique (2 h) ont été préférentiellement analysés par rapport aux autres prélèvements de la cinétique de passage.

### 2.5.1.3 Etude préliminaire : optimisation de la concentration de la sousfraction FBC-3

Une première expérience de passage a été réalisée en testant la sous-fraction FBC-3 à des concentrations de 4, 2, 1, 0,5 et 0,25 g.L<sup>-1</sup> dans le compartiment apical. Les surnageants apicaux et basolatéraux, après 2 h de contact, ainsi que les solutions initiales FBC-3 appliquées ont été analysés par LC-MS-MS.Les profils tridimensionnels des surnageants basolatéraux des conditions 4 g.L<sup>-1</sup> et 2 g.L<sup>-1</sup> ainsi que ceux des solutions initiales FBC-3 testées aux mêmes concentrations ont été représentés **Figure 78**. Les surnageants apicaux ont montré des profils très semblables à ceux des solutions initiales et ne sont ici pas présentés.



Temps de rétention (min)

(suite de la *Figure 78*).



*Figure 78:* Profils tridimensionnels des solutions initiales FBC-3 (avant contact avec les cellules) et des surnageants basolatéraux d'un modèle de barrière Caco-2 établis par LC-MS-MS. A) solution initiale FBC-3 4 g.L<sup>-1</sup>, **B**) solution initiale FBC-3 2 g.L<sup>-1</sup>, **C**) surnageant basolatéral de la condition FBC-3 4 g.L<sup>-1</sup> et **D**) surnageant basolatéral de la condition FBC-3 2 g.L<sup>-1</sup>. Les surnageants basolatéraux ont été récoltés après 2 h d'incubation de la solution FBC-3 en pôle apical.Pour chaque figure, le rapport *m*/z d'un ion moléculaire est réprésenté en fonction de son temps de rétention et de son intensité. Le code couleur de l'intensité va du blanc (intensité ionique nulle) à rouge (intensité ionique maximale). La séparation LC est réalisée avec une colonne C<sub>18</sub> à un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup> en appliquant trois plateaux successifs à 2,5, 5 et 10 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique maintenus pendant 10 min chacun.

L'ensemble des ions moléculaires détectés dans la solution FBC-3 (4 g.L<sup>-1</sup>) a été élué entre les temps de rétention  $t_R = 5$  min et  $t_R = 45$  min, représentés par les tâches violette. L'analyse de

la solution initiale FBC-3 à 2 g.L<sup>-1</sup> a montré une intensité et une abondance des ions inférieures à celles observées pour l'analyse de la solution à 4 g.L<sup>-1</sup> (

Figure 78Figure 78B). Sur les Figure 78 C et D, très peu d'ions moléculaires ont été détectés entre  $t_R = 5$  min et  $t_R = 45$  min dans les deux surnageants basolatéraux, voire même aucun dans le surnageant basolatéral de la condition à 2 g.L<sup>-1</sup>(*Figure 78D*). Ces analyses ont très clairement montré une très faible abondance d'ions moléculaires (donc potentiellement de peptides) dans les surnageants basolatéraux pour des concentrations testées inférieures à 4 g.L<sup>-1</sup>. Le traitement de données par le logiciel Peaks a permis d'identifier dans un premier temps 41 séquences peptidiques dans la solution initiale FBC-3 contre 10 séquences peptidiques dans le compartiment basolatéral après 2 h de contact et pour une concentration apicale testée de 4 g.L<sup>-1</sup>. Pour tous les surnageants basolatéraux dont la concentration apicale était inférieure à 4 g.L-1, aucune séquence peptidique n'a été détectée même après 2 h de contact. Le suivi de la cinétique de passage des peptides dans les deux compartiments a été réalisé pour la condition FBC-3 à 4 g.L<sup>-1</sup> et fourni en annexe 6. Dès 15 min de contact, 5 séquences peptidiques ont été détectées dans le surnageant basolatéral et ont été attribués à la solution FBC-3. Malheureusement une grande majorité des séquences peptidiques issues de la sous fraction FBC-3 n'a pas été retrouvée dans les surnageants basolatéraux bien que certaines aient été détectées dans le compartiment apical comme LTAEEKA ou ALSDK. Quelques séquences, non identifiées dans la solution FBC-3 initiale, ont été identifiées dans les compartiments apicaux (VDPEN, DDLKGT, AAVTA) et basolatéraux (SLDK, DLHAH). Ces séquences proviennent très probablement de la dégradation de séquences peptidiques plus longues, présentes dans la solution initiale, mais qui sont a priori largement minoritaires devant les séquences provenant de FBC-3. A la suite de cette première expérience de passage, il a été décidé de travailler avec une concentration de la sous-fraction FBC-3 de 4 g.L<sup>-1</sup> pour faciliter la détection et l'identification des séquences. Le suivi cinétique de la population peptidique des compartiments apicaux et basolatéraux n'a pas apporté beaucoup d'information quant à la concentration de chaque peptide en solution. Au regard de l'ensemble de ces résultats, il a été décidé de se focaliser sur l'identification des populations peptidiques dans les compartiments apicaux et basolatéraux après de 2 h de contact.

# 2.5.1.4 Identification des séquences peptidiques passant intactes la barrière de cellules Caco-2 et provenant de la sous-fraction FBC-3

Suite aux résultats obtenus au paragraphe précédent, la deuxième expérience de passage a été réalisée en utilisant une solution de FBC-3 à 4 g.L<sup>-1</sup>. La stratégie analytique évoquée au paragraphe 2.5.1.2 a été appliquée aux échantillons récoltés.

#### a. Test de l'intégrité de la barrière cellulaire Caco-2

Le Lucifer Yellow (LY), composé hydrosoluble fluorescent passant par voie paracellulaire, a été utilisé pour vérifier l'intégrité de la barrière cellulaire au cours des expériences de passage de la sous-fraction FBC-3. Une solution de LY (100  $\mu$ M) a été préparée avec ou sans la solution FBC-3 et a été incubée dans le compartiment apical des puits. Le coefficient de perméabilité cellulaire a été calculé en présence du contrôle et de la solution de FBC-3 à 4 g.L<sup>-1</sup>. Ce test a été mené sur un puit par triplicata, donnant ainsi une tendance. L'ensemble des valeurs obtenues est présenté dans le *Tableau 13*.

**Tableau 13:** Coefficients de perméabilité apparente  $(P_{app})$  de la monocouche de cellules Caco-2 en présence du contrôle ou de la solution FBC-3 4 g.L<sup>-1</sup>

	$P_{app}$ (cm.s <sup>-1</sup> )
Contrôle	$4,17.10^{-6}$
<b>FBC-3 4 g.L</b> <sup>-1</sup>	5,95.10-6
FBC-3/contrôle	1,43

La solution FBC-3 a été reprise avec le milieu de transport (HBSS, 10 mM Hepes). Le contrôle est composé du milieu de transport utilisé. D'après la littérature, la valeur seuil de  $P_{app}$  témoignant d'une intégrité suffisante de la barrière cellulaire est de  $1.10^{-6}$  cm.s<sup>-1</sup>.

Les valeurs de perméabilité apparente  $P_{app}$  calculées dans les deux conditions (contrôle et FBC-3) sont plus de 4 fois supérieures à la valeur seuil indiquant l'altération de l'intégrité de la barrière. Une augmentation de  $P_{app}$  d'un facteur 1,43 a été calculée pour les puits incubés avec FBC-3. Les analyses LC-MS-MS présentées *Figure 78* ont montré l'existence d'une nette différence entre l'abondance des populations peptidique de la solution initiale et du pôle basolatéral, laissant supposer une concentration peptidique apicale nettement supérieure à celle du compartiment basolatéral. La barrière cellulaire semble avoir joué son rôle de filtre vis-à-vis du passage peptidique. Ces résultats seraient à confirmer en utilisant la mesure de la résistance transépithéliale (*TEER*).

#### b. Identification exhaustive des peptides de la solution initiale FBC-3

Une approche fondée sur la complémentarité de deux techniques chromatographiques a été mise en place pour identifier un nombre maximum de séquences peptidiques uniques dans les échantillons. Elle repose sur l'utilisation d'une colonne phase inverse (RP-HPLC) et une colonne HILIC en amont de l'analyse par le spectromètre de masse. Les conditions d'analyse ont toutes été reportées au paragraphe 4.8.3 dans le chapitre Matériels et Méthodes. Au total, 159 séquences peptidiques uniques ont été identifiées dans la solution initiale FBC-3 se répartissant entre 85 séquences identifiées par la technique «HILIC » et 120 séquences identifiées par la technique «HILIC » et 120 séquences identifiées par la technique «RP ». Entre les deux listes, 46 séquences exactes ont été trouvées en commun soit environ 29 % de la liste peptidique totale. En termes de provenance, 102 séquences proviennent de la chaîne  $\alpha$  et 57 de la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine. Leurs poids moléculaires sont compris entre de 300 à 1400 Da avec un poids moyen situé autour de 700 Da. Tout comme observé lors de l'établissement des cartographies (1.5.2), plusieurs séquences peptidiques partagent un même enchaînement d'acides aminés comme DLSHG, ADKGNV, FDLSHGSAQ ou TAEE. La liste complète des séquences est placée en Annexe 7.

c. Identification des peptides dans les surnageants du modèle de monocouche de cellules Caco-2

L'analyse des séquences peptidiques de l'expérience de passage de la barrière de Caco-2 a ciblé les puits ayant reçu une solution FBC-3 à 4 g.L<sup>-1</sup> et incubés pendant 2 h comme justifié au paragraphe 2.5.1.3. Le nombre de séquences identifiées par compartiment est récapitulé dans le *Tableau 14*.

	Nombre de séquences uniques	
	Apical	Basolatéral
HILIC	29	24
RP	36	31
Séquences communes HILIC/RP	8	3
Total	73	58
Séq. Communes Apical/Basolatéral		24
Séq. Apicales communes à FBC-3	48 (30,2 %)	
Séq. Basolatérales communes à FBC-3	24 (15,1 %)	

 Tableau 14: Nombre de séquences peptidiques identifiées par HILIC/RPLC-MS-MS couplé au logiciel

 Peaks.

Comme représenté dans le Tableau 14, 73 séquences ont été identifiées dans le compartiment apical contre 58 dans le compartiment basolatéral. La population peptidique apicale est supérieure à la population peptidique basolatérale. La comparaison des listes peptidiques, établies grâce à la séparation RP ou HILIC, a montré un très faible nombre de séquences communes au sein de chaque compartiment (apical/basolatéral). Ainsi, parmi 34 séquences identifiées dans le compartiment basolatéral, seulement 8 ont été identifiées par les deux méthodes chromatographiques. Un nombre de 24 séquences communes a été identifié entre les populations peptidiques des pôles apicaux et basolatéraux, représentant 32,9 % de la population peptidique apicale. Autrement dit, plus de la moitié des séquences apicales n'a pas été retrouvée dans le compartiment basolatéral. Le nombre de séquences apicales communes à la solution FBC-3 ne représente que 30,2 % de la population peptidique de départ. Au bout de 2 h de contact avec la monocouche cellulaire, les deux tiers des séquences de la sous-fraction FBC-3 n'ont donc pas été retrouvées intactes et elles ont généré de nouveaux motifs peptidiques. La population basolatérale est composée de 24 séquences provenant de FBC-3, soit moins de la moitié de sa population. Ces séquences dites « résistantes » ne représentent que 15,1 % de la population peptidique de la solution FBC-3. Autrement dit, environ 85 % des séquences identifiées dans la sous-fraction FBC-3 ne passent pas de manière intègre la barrière de cellules Caco-2. Deux tableaux récapitulatifs des séquences identifiées dans cette étude ont été placés en annexes. L'annexe 8 compare les séquences détectées dans les compartiments apicaux et basolatéraux ainsi que les techniques chromatographiques associées à leur identification. L'annexe 9 répertorie toutes les séquences détectées dans le compartiment basolatéral, notamment les 24 séquences résistantes, et précise leur appartenance à la sous-fraction FBC-3 ainsi que les techniques chromatographiques associées à leur identification.

Enfin, la liste des séquences résistantes a été comparée à la liste de peptides identifiés dans les échantillons d'absorption jéjunale de la digestion dynamique de l'hémoglobine (analyses décrites au paragraphe 1.7.3.2 et liste reportée en annexe 5). Les critères de passage des peptides au travers d'une monocouche cellulaire diffèrent de ceux imposés par l'absorption intestinale dans le modèle dynamique, mimée par une dialyse. A ce titre, cette comparaison ne peut prédire le passage des peptides des échantillons d'absorption jéjunale sur un modèle de barrière intestinale. Ainsi, neuf séquences communes à la liste de séquences résistantes ont été retrouvées dans ces échantillons : VAAA, LTAEEK, MNNPK, YGAE, DLSHGSAQ, YGAEA, VDPVN, HVDPEN et VVAG. Au final, environ 30 % de la liste des séquences

« résistantes » ont été retrouvés dans les échantillons d'absorption de la digestion dynamique de l'hémoglobine bovine.

 d. Synthèse des résultats de passage de la monocouche de cellules Caco-2

À travers l'ensemble des résultats obtenus, plusieurs résultats marquants sont à mettre en exergue:

- La fraction FBC-3 étudiée pour ses activités biologiques contient une très grande diversité de séquences peptidiques à la composition en acides aminés variée. Au total, 159 séquences uniques ont été identifiées.
- Une approche analytique LC-MS-MS couplant deux techniques chromatographiques a été mise en place pour identifier un nombre maximum de séquences peptidiques compte-tenu de la diversité peptidique observée dans la solution initiale FBC-3. Les techniques chromatographiques RP et HILIC ont été utilisées en amont de la spectrométrie de masse en mode tandem. De manière générale, moins de 15 % de similitude a été observé entre deux listes peptidiques d'un même échantillon (solution apicale, basolatérale) issues des deux techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse en mode tandem, mettant en avant la complémentarité des deux techniques.
- Après deux heures d'incubation au contact d'une monocouche de cellules Caco-2 différentiées, le nombre de séquences peptidiques uniques identifiées dans le compartiment apical a diminué de plus de 40 % par rapport à la population peptidique de départ. Le nombre de séquences identifiées dans le compartiment basolatéral nommées « résistantes » représente moins de 15 % en moyenne du nombre de séquences identifiées dans la sous-fraction FBC-3. Malgré l'absence de confirmation de l'intégrité de la barrière cellulaire, les analyses menées sur les surnageants ont démontré que la barrière cellulaire n'a laissé passer qu'une faible proportion de la population peptidique initiale.

### 2.5.1.5 Effet des surnageants issus du passage de la barrière de cellules Caco-2 sur l'inhibition de la DPP-IV

La sous-fraction FBC-3 a été sélectionnée car elle contient à la fois des peptides inhibiteurs de l'activité de la DPP-IV et stimulateurs de la sécrétion de GLP-1. L'influence d'un contact

prolongé avec une barrière cellulaire sur la population peptidique a été étudiée et démontrée. La question du maintien des activités biologiques dans les surnageants apicaux et basolatéraux s'est donc posée. Il a été choisi de ne tester que l'activité inhibitrice de la DPP-IV en raison des faibles quantités disponibles.

Un volume de 1 mL des surnageants basolatéraux de l'expérience de passage a été lyophilisé puis repris dans 70 µL de tampon Tris/HCl pH 8. Les surnageants apicaux ont été quant à eux dilués à quatre concentrations différentes avec le tampon ainsi que la solution initiale FBC-3 utilisée pour l'expérience de passage. Un échantillon du milieu de transport utilisé dans chaque expérience a également été lyophilisé et testé comme témoin. Un contrôle positif d'inhibition a été réalisé avec la diprotine A (données non montrées). Au terme du test, les absorbances obtenues pour les surnageants lyophilisés ont été corrigées avec celles des témoins négatifs réalisés (milieux de transport lyophilisés dans les mêmes conditions). Les pourcentages d'inhibition de l'activité de la DPP-IV obtenus sont présentés *Figure 79*.



*Figure 79*: Inhibition de l'activité de la DPP-IV par les surnageants apicaux et basolatéraux issus des expériences de passage de barrière Caco-2 de la sous-fraction FBC-3. Les valeurs sont représentées pour n = 1.

Les peptides présents dans les surnageants apicaux de l'expérience de passage ont inhibé l'activité de la DPP-IV avec un effet dose dépendant. Les pourcentages d'inhibition calculés sont très similaires à ceux obtenus en présence de différentes concentrations de FBC-3. En effet, le surnageant apical non dilué a inhibé de 22,1 % l'activité de la DPP-IV alors que la

solution initiale FBC-3 à 4 g.L-1 l'a inhibé de 23,2 %. Le surnageant basolatéral a également provoqué une inhibition de l'activité de la DPP-IV à hauteur de 8,5 %. La faible quantité de surnageant basolatéral disponible n'a pas permis de quantifier sa population peptidique.

### 2.5.2 Utilisation de cellules Caco-2 in situ comme source d'enzymes DPP-IV

L'objectif principal de cette expérience est d'améliorer le test enzymatique d'inhibition de la DPP-IV en utilisant des cellules Caco-2 *in situ* comme source enzymatique afin de se rapprocher des conditions physiologiques intestinales. Un test enzymatique *in vitro* avec les cellules Caco-2 non différenciées a été mis en place et comparé au test enzymatique avec l'enzyme porcine purifiée (protocoles décrits au paragraphe 4.7.4.2 du chapitre Matériels et Méthodes).

# 2.5.2.1 Caractérisation de l'activité DPP-IV des cellules Caco-2 non différenciées in situ

L'expression du gène codant pour la DPP-IV a été confirmée chez les cellules Caco-2 non différenciées cultivées en routine par PCR quantitative en temps réel. Le nombre de cycles seuil Ct a été mesuré à différents passages et comparés avec des cellules différenciées cultivées sur inserts (*Figure 80*).



*Figure 80*: *Expression du gène codant pour la DPP-IV chez les cellules Caco-2* 

L'expression du gène codant pour la DPP-IV a été évaluée par rt-qPCR pour différents passages de cellules Caco-2 non différenciées (barres noires). Le Ct normalisé correspond au rapport Ct DPP-IV/ Ct PpiA (gène de référence). L'expression du gène codant pour la DPP-IV de cellules Caco-2 différenciées cultivées sur inserts à différents passages a été ajoutée comme comparative (barres blanches).

Il est admis que des cellules Caco-2 différenciées expriment la DPP-IV (Darmoul et al., 1992). Ici, les quantités relatives d'ARNm des cellules Caco-2 non différenciées ont été comparées à celles de cellules cultivées sur insert et différenciées. Le nombre de Ct normalisés du gène codant pour la DPP-IV des cellules non différenciées n'a montré aucune différence avec celui de cellules différenciées. De plus le nombre de Ct est resté stable entre les passages 8 et 46. Ainsi, les cellules Caco-2 non différenciées utilisées pour le test expriment donc bien la DPP-IV. Un substrat fluorescent spécifique de la DPP-IV (Gly-Pro-AMC) a été choisi afin de cibler le plus spécifiquement possible la DPP-IV pour le test enzymatique. Les tests de viabilité cellulaire ont démontré la non-toxicité de ce substrat pour les cellules (résultats non montrés). Afin de caractériser l'activité DPP-IV des cellules Caco-2 *in situ*, une gamme de concentration d'Ile-Pro-Ile (inhibiteur spécifique) a été réalisée. Elle a également été réalisée dans les mêmes conditions avec la DPP-IV purifiée d'origine porcine. Les résultats obtenus sont présentés *Figure 81*.



Figure 81: Inhibition de l'activité de la DPP-IV par Ile-Pro-Ile (IPI) sur enzyme purifiée et sur cellules Caco-2.

Cercle noir : enzyme purifiée, cercle blanc : cellules Caco-2 *in situ*. Les données sont exprimées en moyennes (n = 3) ± écart type. Les régressions linéaires du % inhibition en fonction de Ln (concentration finale Ile-Pro-Ile) ont été déterminées pour le test avec l'enzyme purifiée (y =  $21,5x+144,3, R^2 = 0.988$ ) et pour le test avec les cellules Caco-2 (y =  $19,9x+133,4, R^2 = 0.980$ ).

La plus forte concentration d'Ile-Pro-Ile testée a engendré une inhibition de  $83,0 \pm 0,9$  % de l'activité de la DPP-IV des cellules Caco-2 contre  $90,4 \pm 0,6$  % de l'activité de l'enzyme

purifiée. Les autres concentrations d'Ile-Pro-Ile testées n'ont montré aucune différence significative entre les pourcentages d'inhibition obtenues par les deux méthodes. La comparaison des pentes n'a montré aucune différence significative (p = 0,120, analyse ANCOVA). Les valeurs des IC<sub>50</sub> de Ile-Pro-Ile ont été calculées pour les deux méthodes enzymatiques : elle a atteint une valeur de 5,34 ± 0,17 mg.L<sup>-1</sup> avec l'enzyme porcine purifiée, valeur significativement inférieure (test de Tukey, p < 0,05) à celle obtenue avec les cellules Caco-2 (14,9 ± 0,1 mg.L<sup>-1</sup>).

### 2.5.2.2 Effet des digestats gastriques et intestinaux sur l'activité DPP-IV des cellules Caco-2 in situ

Précédemment, les digestats gastriques et intestinaux obtenus par digestion GI statique ont été caractérisés pour leur potentiel inhibiteur de la DPP-IV porcine purifiée (2.2.2). Lors de cette expérience, les potentiels inhibiteurs des digestats gastriques et intestinaux 120 min ont été évalués sur des cellules Caco-2 non différenciées *in situ*. Comme précédemment exposé *Figure 81*, la comparaison avec les résultats obtenus avec l'enzyme purifiée dans les mêmes conditions expérimentales a été réalisée. Les résultats sont présentés *Figure 82*.



*Figure 82*: Inhibition de l'activité DPP-IV de l'enzyme purifiée et des cellules Caco-2 in situ par les digestats d'hémoglobine bovine (modèle statique).

**A** : digestat gastrique 120 min et **B** : digestat intestinal 120 min. Les données sont exprimées en moyennes (n = 3) ± écart type. Les régressions linéaires du % inhibition en fonction de Ln (concentration finale Ile-Pro-Ile) ont été déterminées : pour le digestat gastrique (A), y = 28,7x +  $30,1(R^2 = 0,998)$  avec l'enzyme purifiée et y = 11,1x + 20,7 ( $R^2 = 0,994$ ) avec les cellules Caco-2. Pour le digestat intestinal (B), y = 23,3x + 38,8 ( $R^2 = 0,997$ ) avec l'enzyme purifiée et y = 10,2x + 14,4 avec les cellules Caco-2 ( $R^2 = 0,903$ ).

Les peptides présents dans les digestats gastriques et intestinaux ont inhibé l'activité DPP-IV de façon dose dépendante dans les deux modèles enzymatiques. Les niveaux d'inhibition sont cependant plus importants sur l'enzyme purifiée que dans les cellules Caco-2. Les pentes des droites de régression (*Figure 82*) calculées avec l'enzyme purifiée sont significativement supérieures à celles calculées avec les cellules Caco-2 (ANCOVA, p < 0,05) et ceci, pour les digestats gastrique et intestinal. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> du digestat gastrique 120 min ont atteint

 $1,89 \pm 0,16 \text{ mg.mL}^{-1}$  avec l'enzyme purifiée et  $7,95 \pm 3,51 \text{ mg.mL}^{-1}$  avec les cellules Caco-2. De même, les valeurs d'IC<sub>50</sub> du digestat intestinal 120 min ont atteint une valeur de  $1,62 \pm 0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$  avec l'enzyme purifiée et de  $16,02 \pm 5,53 \text{ mg.mL}^{-1}$  avec les cellules Caco-2. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des digestats obtenues avec l'enzyme purifiée sont significativement inférieures à celles obtenues avec les cellules Caco-2 (p < 0,05, test de Tukey). L'ensemble des valeurs obtenues est récapitulé dans le *Tableau 15*.

**Tableau 15**: Valeurs des  $IC_{50}$  des digestats et de Ile-Pro-Ile obtenues par test enzymatique utilisant soit l'enzyme purifiée soit les cellules Caco-2.

	DPP-IV purifiée	Cellules Caco-2
Ile-Pro-Ile	$5,34 \pm 0,17$	$14,91 \pm 0,12$
Digestat gastrique 120 min	$1,83 \pm 0,16$	$7,95 \pm 3,51$
Digestat intestinal 120 min	$1,62 \pm 0,04$	$16,02 \pm 5,53$

Le substrat utilisé est le Gly-Pro-AMC. Les valeurs d' $IC_{50}$  values sont exprimées en mg.mL<sup>-1</sup> (poids sec pour les digestats)

Ce test a donc démontré que des cellules vivantes pouvaient être utilisées comme outil de dosage enzymatique. Ici l'activité DPP-IV des cellules a été mise en évidence en vérifiant l'expression de l'enzyme et en utilisant un substrat spécifique de son activité. Le test a donc permis d'étudier, dans des conditions se rapprochant des conditions physiologiques intestinales, le potentiel d'inhibition de la DPP-IV des digestats protéiques. La comparaison avec le test enzymatique « classique » utilisant la DPP-IV porcine purifiée a montré un net effet des cellules sur le potentiel inhibiteur des digestats.

### 2.6 Discussion

La première partie de cette étude s'est attachée à établir un modèle de digestion GI *in vitro* d'une protéine modèle, de réaliser les cartographies exhaustives des populations peptidiques générées dans les compartiments gastriques et intestinaux, de valider les résultats obtenus par un modèle de digestion dynamique sur la protéine modèle et sur une matrice alimentaire. La deuxième partie de l'étude a été principalement dédiée à la recherche de peptides bioactifs en ciblant des activités biologiques en relation avec la régulation de l'homéostasie énergétique, à savoir la sécrétion de certaines hormones intestinales et l'inhibition de l'activité de la DPP-IV. Pour cela, l'approche principale a consisté à sélectionner le digestat intestinal généré après 4 h de digestion, à le fractionner par des outils chromatographiques, à tester les activités biologiques des fractions générées, et enfin à sélectionner les plus actives afin de caractériser

les populations peptidiques présentes. Cependant, des facteurs pouvant limiter la biodisponibilité des peptides en conditions physiologiques n'ont pas été simulés au cours de ces tests et pourraient conduire à une surestimation du potentiel bioactif identifié. C'est pourquoi il a été choisi de travailler avec un modèle cellulaire très largement adopté pour modéliser la barrière épithéliale intestinale, la lignée cellulaire Caco-2, afin de pouvoir se rapprocher des conditions intestinales. Le modèle a été utilisé pour 1) simuler le passage des peptides d'une sous-fraction peptidique au travers d'une barrière intestinale et 2) estimer le potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV en présence d'un environnement enzymatique plus complexe. La simulation du passage au travers d'une barrière de cellules Caco-2 différenciées n'a été réalisée que pour une fraction peptidique, FBC-3, dans cette partie de l'étude. Cette sous-fraction, issue de deux fractionnements chromatographiques successifs du digestat intestinal, s'est distinguée par son double potentiel biologique, à savoir la stimulation de la sécrétion de GLP-1 et l'inhibition de l'activité de la DPP-IV. L'utilisation de cellules Caco-2 non différenciées comme sources de DPP-IV a conduit à l'élaboration d'un outil in vitro permettant d'estimer le potentiel inhibiteur des digestats et des fractions peptidiques dans des conditions expérimentales plus complexes et plus proches de l'environnement intestinal.

## 2.6.1 Caractérisation des groupes peptidiques impliqués dans la sécrétion des hormones intestinales et l'inhibition de l'activité de la DPP-IV

Les molécules stimulant la sécrétion des hormones CCK et GLP-1 ou inhibant l'activité de l'enzyme DPP-IV constituent actuellement une des stratégies pharmaceutiques la plus prometteuse dans le cadre de la lutte contre l'obésité et le diabète de type 2 (Drucker and Nauck, 2006). La supériorité du pouvoir satiétogène des protéines alimentaires par rapport aux autres macronutriments a été démontrée mais les mécanismes physiologiques associés ne sont que partiellement élucidés à l'heure actuelle (Duraffourd et al., 2012). Dans cette étude, il a été choisi de suivre le potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 et des CCK et le potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV des digestats provenant de la digestion GI *in vitro* de l'hémoglobine bovine.

# 2.6.1.1 Effet des digestats et fractions sur la sécrétion des hormones intestinales CCK et GLP-1

Il est connu dans la littérature que le contact d'hydrolysats protéiques avec les cellules STC-1 stimulent la sécrétion des hormones CCK et GLP-1 (Cordier-Bussat et al., 1998; Geraedts et

al., 2011). Lors de cette étude, les digestats intestinaux d'hémoglobine bovine ont montré leur supériorité à augmenter les niveaux de sécrétion des CCK et du GLP-1 par les cellules STC-1. Aucune différence significative n'a été observée entre la protéine intacte (salive) et partiellement hydrolysée en conditions gastriques en termes de stimulation des concentrations hormonales sécrétées. Des études précédentes ont démontré qu'un mélange d'acides aminés libres n'avait pas provoqué d'augmentation significative de la sécrétion des CCK comparée à celle provoquée par le digestat protéique, démontrant ainsi un « effet peptide » (Cordier-Bussat et al., 1997; Cudennec et al., 2012). Ici, le rôle clé des enzymes intestinales a donc ainsi été mis en évidence, au-delà de ce simple effet peptide. Elles ont modifié la population peptidique générée en phase gastrique en continuant son hydrolyse, générant ainsi de nouvelles séquences au potentiel biologique plus important.

La première étape de fractionnement a permis d'identifier les fractions peptidiques d'un poids moléculaire inférieur à 1000 Da comme ayant le meilleur potentiel stimulateur de la sécrétion des CCK. Ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude précédente utilisant des peptones, composés d'oligopeptides d'un poids moléculaire majoritairement inférieur ou égal à 1200 Da (Cordier-Bussat et al., 1997), afin de représenter le contenu protéique présent dans le lumen intestinal. Ici, comparées au digestat intestinal et testées à la même concentration, les deux fractions FC et FD ont montré la plus forte capacité à stimuler la sécrétion des CCK. En ce qui concerne la sécrétion de GLP-1, la première étape de fractionnement a mené à des conclusions moins tranchées. Trois fractions du digestat intestinal contiennent des peptides au potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 non significativement différent de ceux du digestat intestinal. Contrairement à ce qui a été observé pour les CCK, la séparation par exclusion stérique n'a pas discriminée de manière suffisante les populations peptidiques responsables de cette activité.

A partir des deux fractions B et C, une dizaine de sous-fractions a été générée par RP-HPLC et la majorité d'entre elles a stimulé la sécrétion de GLP-1 sous sa forme active. Si deux sous-fractions (FBC-3 et FBC-4) se sont particulièrement distinguées, elles ne contiennent probablement pas toutes les séquences peptidiques responsables de la stimulation de la sécrétion de GLP-1. L'effet globalement observé pourrait être d'abord attribué à un effet « peptide », puis être plus spécifiquement lié à la présence de certains motifs peptidiques, pouvant expliquer les différences de potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 au sein des différentes sous-fractions.

Afin d'étudier l'action des digestats et fractions sur l'expression des gènes codant pour les CCK et le PG, précurseur du GLP-1, un contact prolongé du digestat intestinal avec les cellules STC-1 a conduit à une augmentation des quantités relatives d'ARNm transcrits des deux gènes, ce qui corrobore les effets observés sur la stimulation de la sécrétion des hormones. Sachant que le GLP-1 résulte d'un processus post-traductionnel du gène codant pour le PG impliquant la proconvertase 1 (PC1) au niveau intestinal, l'effet du digestat intestinal sur l'expression du gène codant pour la PC1 a été étudié. L'absence d'effet sur l'expression de la PC-1 démontre que l'augmentation de la concentration de GLP-1 sécretée serait liée à une action directe du digestat sur l'expression du gène, non corrélée à une augmentation de l'expression de PC-1. Cette relation entre sécrétion hormonale et expression du gène associé a déjà été mise en évidence. Bentouimou et al. ont observé lors d'études menées avec des rats et des humains une corrélation entre sécrétion des CCK, augmentation des quantités d'ARNm et induction de la transcription suite à l'ingestion d'un repas (Bentouimou et al., 1995). Le fait que des digestats protéiques puissent stimuler à la fois la sécrétion des CCK et l'expression du gène associé a déjà été démontré dans une étude in vivo chez le rat (Liddle et al., 1988) et sur de l'intestin de rat isolé (Cordier-Bussat et al., 1998). Ces études n'ont pu conclure sur l'effet direct des digestats protéiques sur l'expression des gènes. Le travail de Cordier-Bussat et al. sur les cellules STC-1 suggère un rôle direct des nutriments (dans leur cas les peptones) dans les phénomènes de sécrétion des hormones CCK et GLP-1 et d'expression des gènes associés. Ils ont montré que l'augmentation des quantités d'ARNm transcrits (Northern Blot) était partiellement liée à une augmentation de la transcription et de l'activité du promoteur. .Dans ce travail de thèse, un digestat intestinal d'hémoglobine bovine possède un potentiel stimulateur de la sécrétion des CCK et du GLP-1 particulièrement intéressant et une capacité à augmenter les quantités relatives d'ARNm transcrits des gènes associés dans la cellule STC-1. Toutefois, la mesure de l'expression des gènes a été réalisée par PCR quantitative et ne permet pas d'exclure le fait que l'augmentation des ARN<sub>m</sub> transcrits des gènes pourrait avoir lieu à un niveau post-traductionnel. Replacé dans un contexte physiologique, l'augmentation des quantités d'ARNm observée après un contact prolongé avec le digestat intestinal pourrait avoir un effet à long terme sur les quantités hormonales sécrétées. Ainsi, ce digestat pourrait à la fois stimuler une sécrétion immédiate des CCK et de GLP-1 au niveau des cellules entéroendocrines et induire une augmentation de la synthèse de ces hormones en modulant l'expression des gènes associés. Le PMA n'a eu aucun effet significatif sur l'expression des gènes codant pour les CCK et le PG dans la cellule STC-1, cette molécule étant connue pour stimuler la sécrétion des deux hormones en activant la voie de la protéine kinase C (PKC). L'implication de l'AMP cyclique et des protéines kinases calcium dépendantes dans les voies de transcription des gènes codant pour les CCK et le PG a déjà été mise en évidence dans la cellule STC-1 (Gevrey et al., 2002). Il faut également souligner que l'activation de la transcription des gènes par un hydrolysat protéique est souvent dépendante du type cellulaire : Gevrey et al. ont démontré l'effet régulateur des hydrolysats protéiques uniquement sur les cellules STC-1 (Gevrey et al., 2004). Dans le cas présent, l'effet du digestat intestinal d'hémoglobine bovine sur l'expression des gènes codant pour les CCK et le PG serait a priori spécifique des cellules intestinales et non dépendant de la voie PKC mais cela reste à confirmer. Une étude sur cellules intestinales humaines menée par Reimer et al. a mis en évidence un effet stimulateur d'une peptone de viande sur la sécrétion de GLP-1 sans démontrer une augmentation des quantités d'ARNm transcrits du gène codant pour le PG (Reimer, 2006). Au cours de ce travail, l'étude des effets des fractions peptidiques sur l'expression des gènes n'a pas mené à des conclusions permettant de les corréler aux tendances observées pour la sécrétion des CCK et du GLP-1. Ainsi, toutes les fractions ont induit une augmentation de la quantité relative d'ARNm transcrits des deux gènes comparée au contrôle. Un effet dose dépendant a été constaté pour les fractions FC et FD sur l'expression des gènes codant pour les CCK et le PG. La fraction FC a stimulé une augmentation des concentrations des CCK et du GLP-1 sécrétées de manière significative. En revanche la fraction FD n'a pas exercé d'effet significatif sur la stimulation de la sécrétion de GLP-1. La corrélation entre expression des gènes et stimulation de la sécrétion hormonale par les fractions peptidiques est donc apparue moins aisée à mettre en évidence, comparée à celle observée avec le digestat total. Ainsi, au sein d'une même fraction, certains peptides pourraient agir sur la stimulation de la sécrétion des CCK et de GLP-1 alors que d'autres agiraient plus spécifiquement sur la modulation de l'expression des gènes.

# 2.6.1.2 Effet des digestats et fractions sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV

Le GLP-1 joue un rôle fondamental dans la régulation de la prise alimentaire et dans l'homéostasie du glucose mais son efficacité est considérablement altérée par la DPP-IV qui, après clivage, le rend inactif. Les peptides présents dans les digestats d'hémoglobine bovine, générés par digestion GI *in vitro*, possèdent des propriétés inhibitrices de l'activité de la DPP-IV. Plus l'hydrolyse de la protéine progresse au cours de la digestion, plus le potentiel inhibiteur des peptides augmente. Ainsi, l'ajout des enzymes intestinales a prolongé

l'hydrolyse peptidique gastrique, augmentant le potentiel inhibiteur de la DPP-IV des digestats. Au regard de la littérature, l'hémoglobine bovine pourrait être considérée comme une source protéique d'intérêt au regard de son potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV : les valeurs des  $IC_{50}$  des digestats sont comprises entre 0,74 mg.mL<sup>-1</sup> (digestat intestinal 120 min) et 3,40 mg.mL<sup>-1</sup> (digestat gastrique 30 min). Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec des hydrolysats de protéines végétales (Nongonierma and FitzGerald, 2015), de son de riz (Hatanaka et al., 2012) ou bien d'hydrolysats de caséines dont la plupart des IC<sub>50</sub> mesurées sont comprises entre 0,3 et 1 mg.mL<sup>-1</sup> (Boots, 2006). Une des raison à l'origine du potentiel inhibiteur mesuré pourrait être la forte abondance d'alanine dans les chaînes de l'hémoglobine bovine, comparée aux autres résidus d'acides aminés. En effet, les peptides inhibiteurs de l'activité de la DPP-IV possèdent très fréquemment un résidu de proline ou d'alanine en avant-dernière position côté N-terminal (Power et al., 2014). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> calculées pour les digestats sont restées néanmoins plus de 10 fois supérieures à celles mesurées par Lacroix et Li-Chan pour des hydrolysats d'isolats de protéines du lactosérum ou d'a-lactalbumine, obtenus par hydrolyse pepsique et atteignant des valeurs respectives de  $0,075 \pm 0,006 \text{ mg.mL}^{-1}$  et  $0,036 \pm 0,002 \text{ mg.mL}^{-1}$  (Lacroix and Li-Chan, 2014). Ainsi, le potentiel inhibiteur de la DPP-IV dépend non seulement de la source protéique hydrolysée mais aussi des conditions d'hydrolyse permettant de générer les peptides bioactifs comme la température, l'enzyme et le temps d'hydrolyse (Alice B Nongonierma et al., 2016). La première étape de fractionnement du digestat final a fait ressortir deux fractions avec un bon potentiel d'inhibition de la DPP-IV. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ne sont toutefois pas significativement plus basses que celle du digestat total. Une séparation par exclusion stérique n'a donc pas abouti à une amélioration de l'activité inhibitrice des fractions, ceci ayant également été observé par Lacroix et Li-Chan pour les fractions provenant des hydrolysats d'isolats de protéines de lactosérum (Lacroix and Li-Chan, 2014). Deux sous-fractions obtenues après la deuxième étape de fractionnement se sont distinguées par un potentiel inhibiteur supérieur à l'ensemble des sous-fractions (FBC-3 et FBC-9). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> ne sont que deux fois inférieures à celle de la fraction BC native. Les deux étapes de fractionnement n'ont pas réussi à concentrer efficacement les peptides inhibiteurs de la DPP-IV et seraient à optimiser. Une étude de fractionnement par ultrafiltration d'un hydrolysat de protéines de lactosérum a abouti à l'obtention de fractions au potentiel inhibiteur significativement supérieur à celui de l'hydrolysat initial (Nongonierma and FitzGerald, 2013d). Toutefois, la valeur d'IC<sub>50</sub> de la meilleure fraction (WPH 2 kDa permeate, IC<sub>50</sub> =  $0.48 \pm 0.01 \text{ mg.mL}^{-1}$  poids sec) n'est que 2.8 fois inférieure à celle de l'hydrolysat initial

(WPH,  $IC_{50} = 1,33 \pm 0,17 \text{ mg.mL}^{-1}$  poids sec). Bien que le procédé séparatif employé pour le fractionnement de l'hydrolysat soit différent, les fractions générées ont montré des valeurs d' $IC_{50}$  comparables à celles obtenues au cours de ce travail. Nongonierma *et al.* ont conclu que l'activité inhibitrice d'un peptide est plus liée à sa composition et à sa structure qu'à son poids moléculaire, conclusion partagée par d'autres auteurs (Li-Chan et al., 2012b). Silveira *et al.* ont réussi à isoler en une étape de fractionnement chromatographique (RP-HPLC) deux fractions à partir d'un hydrolysat de concentrât de protéines de lactosérum avec des valeurs d' $IC_{50}$  respectives de 367,3 µg.mL<sup>-1</sup> et 86,0 µg.mL<sup>-1</sup> (Silveira et al., 2013). Comme évoqué précédemment, les outils chromatographiques et/ou les plans de fractionnement seraient à optimiser afin de pouvoir réduire de manière significative l'abondance peptidique par fraction. Cela permettrait ainsi d'identifier plus facilement et plus rapidement le(s) séquence(s) peptidiques au potentiel bioactif recherché.

## 2.6.2 Suivi du devenir d'une fraction peptidique bioactive lors du passage d'une barrière de cellules Caco-2

La lignée cellulaire Caco-2 a été reconnue depuis de nombreuses années comme un modèle fiable pour étudier le transport ou la toxicité de molécules pharmaceutiques, ainsi que le transport d'oligopeptides (Meunier et al., 1995; Shimizu et al., 1997; Sambuy et al., 2005). Ces cellules expriment plusieurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des entérocytes et possèdent une variété de peptidases membranaires naturellement exprimées au niveau du pôle apical des entérocytes (Howell et al., 1992). Elles ont également la capacité de s'organiser en couches cellulaires permettant la modélisation d'une barrière physico-chimique (Artursson et al., 2001). Dans le cadre de ce projet, la lignée cellulaire Caco-2 a été utilisée avec deux objectifs: 1) étudier le passage d'une fraction peptidique à travers une barrière de cellules Caco-2 et 2) utiliser la cellule comme source d'enzymes en particulier la DPP-IV.

## 2.6.2.1 Mise en évidence de séquences peptidiques passant intactes la barrière de cellules Caco-2

Plusieurs peptides ou fractions peptidiques ont été identifiés comme passant intacts la barrière intestinale simulée *in vitro* par une monocouche de cellules Caco-2 différenciées. Le suivi des peptides dans une expérience de passage de barrière Caco-2 est le plus souvent réalisé par spectrométrie de masse en mode tandem ou bien par chromatographie liquide couplée à de la détection UV. Ainsi, le peptide Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg, isolé à partir d'un hydrolysat trypsique de  $\beta$ -lactoglobuline, pour ses propriétés inhibitrices de l'enzyme de conversion de

l'angiotensine (ECA), possède la capacité de passer intact au travers d'une barrière de cellules Caco-2, bien que de très faibles concentrations aient été détectées dans le compartiment basolatéral. De plus, le peptide a conservé son potentiel inhibiteur après le passage (Vermeirssen et al., 2002). De même, l'étude récente du transport du peptide TNGIIR, inhibiteur de l'ECA, au travers d'une barrière de cellules Caco-2 a mis en évidence un mode de transport a priori paracellulaire via les jonctions serrées (Ding et al., 2016). Plusieurs peptides opioïdes dérivés de caséines sont passés intacts au travers d'une barrière de cellules Caco-2 à des concentrations qui seraient a priori suffisantes pour exercer un effet notable in vivo (Sienkiewicz-Szłapka et al., 2009). Afin de se replacer dans des conditions plus physiologiques, l'étape de la digestion in vitro de la source protéique est parfois simulée en amont du processus de transport : Rubio et al. ont simulé la digestion GI in vitro de plusieurs légumineuses purifiées et ont ensuite étudié l'absorption des acides aminés sur un modèle de cellules Caco-2 en comparaison avec les acides aminés de la caséine (Rubio and Seiquer, 2002). Ils ont ainsi démontré que le transport des acides aminés provenant des légumineuses était plus lent que celui des acides aminés provenant de la caséine, résultats en corrélation avec des observations réalisées in vivo chez le rat. Megias et al. ont montré que le peptide inhibiteur de l'ECA, FVNPQAGS, provenant d'une digestion GI in vitro de protéines de tournesol, était en mesure de passer intact au travers d'une barrière de cellules Caco-2 (Megías et al., 2009). De la même manière, le peptide CKYVCTCKMS, issu de la digestion GI in vitro de « Mozarella di Bufala Campana DOP », s'est distingué par ses propriétés antihémolytiques et anti-oxydantes et a montré une bonne résistance aux exopeptidases de la bordure en brosse d'une barrière de cellules Caco-2 (Tenore et al., 2015). La concentration du peptide, mesurée dans le compartiment basolatéral au terme de l'étude, représentait environ 10 % de la concentration apicale.

Le test de passage de barrière de cellules Caco-2 mis en place dans cette étude a permis de suivre le transport d'une fraction peptidique provenant d'un digestat d'hémoglobine bovine et isolée pour ses activités biologiques. Un contact prolongé entre des peptides et une couche cellulaire peut engendrer des modifications de la population peptidique (dégradation partielle ou totale des séquences) et, par conséquent, pourrait diminuer voire annihiler le potentiel bioactif mis en évidence *in vitro*. Ici, le choix a été fait de s'intéresser à la sous-fraction FBC-3 combinant deux activités potentiellement complémentaires, l'une inhibitrice de l'activité de la DPP-IV et l'autre stimulatrice de la sécrétion de GLP-1. L'étude du passage de cette fraction au travers de la barrière intestinale a donc permis la création d'un modèle d'étude

intégré prolongeant l'étape de digestion de la fraction peptidique en simulant d'une part son hydrolyse par les enzymes de la bordure en brosse, et d'autre part le passage au travers de la barrière intestinale. Les objectifs de l'étude de cette fraction « modèle » visaient principalement à identifier les séquences passant intactes la barrière puis à étudier le maintien des activités biologiques de la fraction après passage. Les différentes expériences menées ont montré qu'environ un tiers des séquences provenant de FBC-3 ont été identifiées dans les surnageants apicaux. Dès la mise en contact avec la couche cellulaire, la fraction peptidique a donc subi d'importantes modifications : les séquences ont été a priori, soit clivées, soit métabolisées par les cellules. Elles ont parallèlement joué le rôle de filtre et permis un passage sélectif des séquences peptidiques : entre 20 et 30 % de la population apicale a été identifiée dans le compartiment basolatéral. Parmi ces séquences, à peine 15 % d'entre elles sont communes avec la fraction peptidique initiale. L'activité cellulaire a véritablement impacté la composition de la population peptidique FBC-3 aussi bien en termes de séquences que de concentration, comme l'ont révélé les profils tridimensionnels des surnageants basolatéraux. Même si la concentration peptidique n'a pas été mesurée par un dosage biochimique précis, elle a été estimée comme ayant été très peu diminuée dans le compartiment apical au terme des 2 h d'expérience. En revanche la concentration peptidique dans le compartiment basolatéral a été estimée à une valeur inférieure à 10 % de la concentration apicale. Enfin, le contact prolongé d'une population peptidique avec une monocouche cellulaire dans les conditions expérimentales de l'étude a pu influencer son intégrité. Ainsi, les échantillons peptidiques tendent à augmenter le coefficient de perméabilité apparente et pourraient, à plus forte concentration, compromettre l'intégrité de la barrière cellulaire. Certaines protéines sont connues pour augmenter la perméabilité de la barrière intestinale : les gliadines, un des facteurs responsables de la maladie cœliaque, favorisent l'ouverture des jonction serrées en agissant au niveau des zonulines (Fasano, 2012). Certains peptides sont reconnus pour augmenter la perméabilité de la barrière intestinale afin de favoriser l'absorption de molécules pharmaceutiques (Sánchez-Navarro et al., 2016). Compte-tenu de la diversité de séquences peptidiques présentes au niveau apical, le phénomène de transport observé lors de l'étude de passage pourrait résulter à la fois d'un transport actif ou passif de certaines séquences et d'une action collaborative des peptides apicaux augmentant légèrement la perméabilité cellulaire.

# 2.6.2.2 Devenir du potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV des populations peptidiques suite au passage au travers du modèle de barrière

En termes d'activité biologique, seule l'activité inhibitrice de la DPP-IV a été étudiée. De manière générale, elle a été retrouvée dans l'ensemble des surnageants apicaux et basolatéraux. Les pourcentages d'inhibition des surnageants apicaux ont atteint des valeurs équivalentes à ceux mesurés pour la fraction initiale aux mêmes dilutions. Cette observation vient soutenir l'hypothèse que la population peptidique apicale a été plus modifiée au niveau de ses séquences que de sa concentration. Une activité inhibitrice a été retrouvée dans les surnageants basolatéraux. Cependant, la mesure réalisée est uniquement qualitative et ne peut être corrélée à la concentration peptidique (l'échantillon basolatéral utilisé ayant été plus de 15 fois concentré par rapport aux échantillons apicaux et initiaux). Au vu de la propension démontrée et discutée dans le paragraphe précédent des cellules à modifier la population peptidique de la fraction testée, il semblerait envisageable que ce ne soient pas exclusivement les mêmes peptides qui sont impliqués dans le phénomène d'inhibition de l'activité DPP-IV par la fraction initiale et par les surnageants apicaux et basolatéraux. Dans nos conditions expérimentales, le passage au travers d'une barrière cellulaire a donc affecté partiellement l'activité biologique de la fraction peptidique, principalement dans le compartiment basolatéral. Picariello et al. ont également observé une modulation du potentiel allergène d'hydrolysats protéiques suite au passage à travers d'une barrière Caco-2. Ils ont suivi le passage d'hydrolysats de caséine et protéines du lactosérum obtenus par digestion GI in vitro (Picariello et al., 2013a) en relation avec l'allergie infantile au lait de vache. Ils ont testé les capacités de liaison des surnageants avec l'immunoglobuline E (IgE) et ont mis en évidence que les échantillons basolatéraux avaient une affinité réduite pour les IgE, comparée aux apicaux. La monocouche de cellules Caco-2 apparait donc comme une barrière dynamique interagissant avec son environnement et pouvant notamment, grâce à son équipement enzymatique, modifier des populations peptidiques et par conséquent influencer leurs activités biologiques. Bien que ne prenant évidemment pas en compte toutes les caractéristiques anatomiques, physiologiques et environnementales de la barrière intestinale, l'utilisation du modèle Caco-2 pour l'étude du passage des peptides s'est avéré être un outil de choix pour cibler, parmi un nombre considérable de séquences, celles qui présenteraient un potentiel d'activité biologique in vivo.

# 2.6.2.3 Stratégies analytiques pour le suivi des peptides au cours des expériences de passage in vitro de la barrière intestinale.

Le suivi du passage de séquences peptidiques à travers une barrière de cellules Caco-2 a fait l'objet d'une étude analytique principalement centrée sur la spectrométrie de masse en mode tandem couplée à la chromatographie liquide. Cette stratégie, communément utilisée dans le domaine de la peptidomique, a été appliquée à la caractérisation de digestats peptidiques. L'hydrolyse d'une protéine alimentaire génère une population peptidique complexe en termes de propriétés physico-chimiques, liée à la grande diversité de longueur et de composition en acides aminés des chaînes peptidiques. Comme discuté dans la partie 1.8, ces caractéristiques amènent de nombreux défis technologiques pour la spectrométrie de masse, dans une démarche d'identification des séquences : plusieurs séquences peuvent avoir le même poids moléculaire mais être de composition différente, le phénomène de suppression d'ionisation peut masquer une partie de la population peptidique ou encore l'identification des di et tripeptides est rendue difficile par le faible nombre de fragments générés par MS-MS. Face à ces limites, de nouvelles approches ont été mises en place afin de pouvoir caractériser au mieux ces digestats. Plusieurs techniques chromatographiques complémentaires peuvent être couplées comme la phase inverse (RP) ou l'HILIC, stratégie qui a été ici adoptée, permettant d'améliorer la précision de l'identification des peptides, notamment pour les plus petits (Harscoat-Schiavo et al., 2012; Le Maux et al., 2015c). Pour identifier les peptides bioactifs de petite taille (moins de 5 résidus d'acides aminés) au sein d'un hydrolysat de protéines de lait, O'Keeffe et FitzGerald ont réalisé un travail en amont de caractérisation par LC-MS-MS d'une collection de peptides synthétiques de petite taille, prédits in silico comme étant libérés à partir des sources protéiques étudiées et des conditions d'hydrolyse sélectionnées. Les méthodes mises en place ont ensuite été appliquées aux hydrolysats de protéines laitières pour y identifier les peptides de petite taille (O'Keeffe and FitzGerald, 2015). Enfin, l'utilisation de modèles de prédiction des temps de rétention des peptides couplée à une analyse LC-MS-MS a amélioré la fiabilité de l'identification de peptides à bas poids moléculaires au sein d'hydrolysats de protéine de lait (Le Maux et al., 2015a) ou de protéines de colza (Schweizer et al., 2007). Cette méthode est particulièrement adaptée pour l'identification de séquences homologues et vise à long terme à démontrer une corrélation entre l'activité biologique et les propriétés hydrophiles/hydrophobes d'une séquence peptidique. Lors de notre étude, le couplage des deux techniques chromatographiques complémentaires a réellement prouvé son intérêt par le faible nombre de séquences communes entre les listes peptidiques établies par RP-HPLC-MS-MS ou HILIC-MS-MS (à peine 15 % de séquences communes entre les deux listes établies, tout surnageant confondu). Cependant, une limite importante de cette stratégie concerne le fait qu'aucun peptide de moins de 4 acides aminés n'a pu être identifié dans les surnageants, alors que le processus de digestion GI de protéines alimentaires génère des di et des tripeptides pouvant potentiellement franchir la barrière intestinale (Morifuji et al., 2010).

Enfin, l'un des aspects non élucidés dans cette étude concerne la quantification des peptides. L'étude a été menée d'un point de vue qualitatif et ne rend pas compte de la concentration de chaque peptide dans les surnageants : la même importance a donc été attribuée à un peptide présent à l'état de trace ou à un autre présent à de plus fortes concentrations. L'identification des séquences au sein d'un mélange peptidique par spectrométrie de masse en mode tandem se heurte au phénomène de suppression d'ionisation : l'ionisation simultanée de plusieurs peptides peut engendrer une diminution voire une disparition du signal d'un ou plusieurs peptides si leur capacité à s'ioniser est plus faible que les autres présents en solution. Par conséquent, aucune corrélation ne peut être établie entre l'intensité du signal et la concentration du peptide et aucune information sur la concentration peptidique ne peut être avancée (Picariello et al., 2013a). Bien qu'une approximation de la faible abondance des peptides dans les surnageants basolatéraux ait été faite en se fondant sur les chromatogrammes UV ou les profils tridimensionnels suite aux analyses LC-MS, des méthodes seraient à développer afin de déterminer de manière plus précise la concentration de chaque molécule en solution.

# 2.6.3 Etude du potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV : développement d'un nouveau modèle *in situ*

Dans les domaines de recherche s'intéressant aux peptides bioactifs, il existe un manque crucial de modèles *in vitro* reproduisant les conditions physiologiques pouvant influencer la biodisponibilité des peptides. Comme précédemment discuté, l'incubation d'une population peptidique avec des cellules Caco-2 peut engendrer des modifications notables de la population peptidique : la présence de peptidases transmembranaires ou la métabolisation par les cellules sont les principaux facteurs pouvant dégrader les séquences et, par conséquent, moduler leur potentiel bioactif. La conception d'un test enzymatique faisant intervenir les cellules Caco-2 vivantes a donc été envisagée pour évaluer le potentiel inhibiteur de la DPP-IV dans des conditions plus proches de l'environnement intestinal. Cette nouvelle approche pourrait permettre d'appréhender de manière plus fiable et réaliste les interactions entre les

peptides bioactifs et l'environnement intestinal, et ce, comparé à une étude classique in vitro (Patil et al., 2015). Ferruza et al. ont mesuré plusieurs activités enzymatiques sur des cellules Caco-2 différenciées cultivées sur des inserts et ont souligné la fiabilité et l'efficacité d'un test enzymatique mené avec des cellules intestinales vivantes (Ferruzza et al., 2012). Les cellules utilisées dans cette nouvelle méthode enzymatique sont non différenciées et l'expression du gène codant pour la DPP-IV a été confirmée. Les quantités relatives d'Arm transcrits du gène codant pour la DPP-IV dans les cellules non différenciées ne changent pas au fil des passages et sont tout à fait comparables à celles mesurées dans des cellules différenciées, connues pour exprimer la DPP-IV (Darmoul et al., 1992; Howell et al., 1992). L'avantage d'utiliser des cellules non différenciées est principalement de concevoir un outil rapide pour le criblage d'inhibiteurs de l'activité DPP-IV. Afin de cibler spécifiquement l'activité de cette enzyme, un substrat spécifique a été utilisé et les essais ont d'abord été menés avec un inhibiteur spécifique. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus en conditions classiques (enzyme purifiée d'origine porcine). Engel et al. démontrent que les enzymes DPP-IV porcines et humaines partagent 88 % d'homologie de séquence (Engel et al., 2003). Les résidus d'acides aminés Tyr662, Tyr666, Phe357 et Arg125, présents au niveau du site catalytique, ont été retrouvés dans les deux séquences (Nongonierma et al., 2014). Ce fort degré de similitude et la conservation de certains résidus d'acides aminés au niveau du site catalytique ont permis de valider la comparaison effectuée entre une enzyme d'origine porcine (DPP-IV purifiée) et une enzyme d'origine humaine (cellule Caco-2) apportant ainsi une valeur ajoutée à cet outil. L'incubation d'un substrat préférentiel de la DPP-IV avec les cellules Caco-2 a mené à une augmentation dose dépendante de la fluorescence reflétant l'hydrolyse du substrat. L'ajout d'un inhibiteur spécifique Ile-Pro-Ile de la DPP-IV a très fortement diminué l'hydrolyse du substrat de manière dose dépendante. L'activité DPP-IV de l'enzyme purifiée et des cellules Caco-2 vivantes a été inhibée de façon similaire par l'ajout du tripeptide Ile-Pro-Ile. Grâce au calcul des pentes de la régression linéaire reliant le pourcentage d'inhibition et le Ln de la concentration de l'inhibiteur, aucune différence significative n'a été constatée entre les deux tests enzymatiques. Ainsi, le substrat Gly-Pro-AMC a été majoritairement hydrolysé par la DPP-IV exprimée par les cellules Caco-2, confirmant une spécificité du modèle Caco-2 in situ.

Les digestats de l'hémoglobine bovine possèdent un potentiel inhibiteur de la DPP-IV, mis en évidence lors d'un test enzymatique utilisant la DPP-IV purifiée (paragraphe 2.2.2). Cette activité biologique a également été mesurée avec l'outil enzymatique Caco-2 *in situ* et ensuite

comparés aux résultats obtenus lors du test enzymatique utilisant l'enzyme purifiée. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues avec l'outil Caco-2 sont 4 fois supérieures à celles obtenues avec l'enzyme purifiée pour le digestat gastrique et presque 10 fois supérieure pour le digestat intestinal. Lors de ce test, la mise en contact avec les cellules Caco-2 a significativement affecté le potentiel inhibiteur des deux digestats, sans pour autant le supprimer totalement. Au contact des cellules et de nombreuses peptidases qu'elles expriment, la spécificité des peptides pour la DPP-IV est fortement affectée. Aucune information n'est connue sur la nature des séquences présentes après contact avec les cellules et ne permet pas, à l'heure actuelle, de conclure quant au fait que les mêmes populations peptidiques seraient impliquées dans les effets inhibiteurs observés sur l'enzyme et sur les cellules. Ces résultats illustrent le fait qu'un test classique in vitro fondé sur l'étude de l'activité d'une enzyme purifiée peut surestimer le potentiel bioactif des peptides. Les différences observées entre test in vitro et in situ ne sont toutefois pas aussi importantes en termes de potentiel inhibiteur que celles attendues. Ainsi, l'utilisation des cellules Caco-2 vivantes comme outil enzymatique a permis d'évaluer la capacité des digestats protéiques à inhiber l'activité de la DPP-IV dans des conditions plus complexes qu'un simple test enzymatique in vitro, se rapprochant des conditions intestinales.

#### 2.7 Conclusion

L'objectif de cette deuxième partie a été d'identifier, à partir d'un digestat intestinal d'hémoglobine bovine généré dans des conditions *in vitro*, les séquences ou les groupes peptidiques impliqués dans certaines activités biologiques ciblées en relation avec l'homéostasie énergétique. En couplant tests d'activités *in vitro* et méthodes analytiques, des éléments de réponse ont pu être apportés :

- Les digestats générés dans le compartiment intestinal ont un meilleur potentiel bioactif sur la sécrétion des CCK et du GLP-1 et sur l'inhibition de l'activité DPP-IV que ceux générés dans le compartiment gastrique ou que la protéine native. Ces résultats mettent en avant le rôle central des enzymes intestinales dans la potentialisation des activités biologiques étudiées.
- Une augmentation dose dépendante de l'expression des gènes codant pour les CCK et le PG a été observée sous l'effet du digestat intestinal.

- Des fractions contenant des peptides de bas poids moléculaire (< 500 Da) ont été identifiées comme étant impliquées dans la stimulation de la sécrétion des CCK par les cellules STC-1.
- Une fraction combinant à la fois potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV et potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 par les cellules STC-1 a été isolée. La caractérisation de son contenu peptidique a permis d'identifier plus de 150 motifs uniques.
- Le passage de la sous-fraction FBC-3 au travers d'une monocouche différenciée de cellules Caco-2, mimant la barrière intestinale, a significativement modifié la population peptidique. Moins d'un tiers des peptides provenant de FBC-3 ont été identifiés dans le compartiment apical et moins de 15 % des motifs peptidiques de cette fraction bioactive ont passé de manière intacte la barrière cellulaire. Cependant, le potentiel inhibiteur de la DPP-IV du surnageant apical n'a pas été modifié et le surnageant basolatéral a également montré une activité inhibitrice de la DPP-IV.
- Un nouvel outil enzymatique a été mis en place, utilisant des cellules Caco-2 non différenciées comme source d'enzyme DPP-IV afin de pouvoir mimer des conditions se rapprochant de l'environnement cellulaire intestinal, non prises en compte lors d'un test enzymatique *in vitro* classique.
### 3 Identification et caractérisation des peptides responsables des activités biologiques étudiées et étude de leurs modes d'action

#### 3.1 Introduction

La troisième et dernière partie de cette étude s'est focalisée sur l'identification des séquences peptidiques impliquées dans les activités biologiques étudiées. Les résultats obtenus au terme de la partie précédente ont permis d'isoler des fractions actives et d'identifier des groupes peptidiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. La démarche adoptée jusqu'à ce stade de l'étude a été récapitulée *Figure 83*.



Figure 83: Démarche de fractionnements du digestat intestinal pour la recherche de peptides bioactifs

Les flèches en trait plein représentent les actions réalisées à cette étape des résultats, les flèches en pointillé, celles envisagées pour la suite des expériences.

Concernant l'activité stimulatrice des CCK, deux fractions SEC ont été isolées pour leur potentiel. La recherche de fractions bioactives sur l'inhibition de la DPP-IV et la stimulation de la sécrétion de GLP-1 a été menée de front et a conduit à la sélection de la sous-fraction FBC-3. Suite à une étude du passage *in vitro* de la barrière intestinale des peptides contenus dans cette sous-fraction, le travail s'est concentré sur les séquences capables de traverser intactes la monocouche cellulaire.

#### 3.2.1 Démarche adoptée

Afin de mieux isoler les séquences ou groupes peptidiques impliqués dans la sécrétion des CCK, une étape supplémentaire de fractionnement a été réalisée sur les deux fractions FC et FD. Compte-tenu de l'abondance peptidique de chaque fraction illustrée par les profils tridimensionnels obtenus par LC-MS (2.3.2), une étape de séparation par RP-HPLC en mode semi-préparatif a été appliquée aux fractions FC et FD. Pour chaque fraction, la même démarche a été suivie: la fraction a été sous-fractionnée par RP-HPLC en mode semi-préparatif, les sous-fractions ont été manuellement récoltées et leur potentiel stimulateur de la sécrétion des CCK a été évalué dans les cellules STC-1. Enfin, les séquences peptidiques présentes dans les deux sous-fractions exerçant la meilleure activité biologique ont été identifiées par LC-MS.

## **3.2.2** Sous-fractionnement de la fraction FC et identification des sous-fractions stimulatrices de la sécrétion des CCK

A partir du chromatogramme de la fraction FC par RP-HPLC en mode semi-préparatif, six sous-fractions (notés FC-X avec X numéro de la sous-fraction) ont été collectées manuellement selon le plan de fractionnement présenté *Figure 84*.



Figure 84 : Profil de séparation RP-HPLC en mode semi-préparatif de de la fraction FC.

(suite légende *Figure 84*) La séparation d'une injection de 7 mg de la fraction C a été réalisée avec une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient linéaire 0-70 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 1,8 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV est réalisée à 215 nm.

Les moyennes des concentrations de CCK secrétées par les cellules STC-1 suite à 2 h de contact avec les sous-fractions FC sont présentées *Figure 85*.



*Figure 85*: *Effets de la fraction FC et de ses sous-fractions sur la stimulation de la sécrétion des CCK par les cellules STC-1.* 

Le contrôle est composé d'un tampon Hepes pH 7,4. Les fractions sont reprises avec le tampon Hepes et sont testées à la concentration finale de 0,2 % (p/v). Les cellules sont incubées 2 h avec les différents traitements. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

Seule la sous-fraction FC-6 s'est distinguée de manière significative (p < 0,05, test de Tukey) par rapport au contrôle et à la fraction native FC. Ainsi, les valeurs des concentrations de CCK mesurées pour la sous-fraction FC-6, la fraction FC et le contrôle sont respectivement de 107,8 ± 7,8 pM, 67,4 ± 0,58 pM et 39 ,2 ± 0,4 pM. Concernant la sous-fraction FC-4, après 2 h de contact avec les cellules STC-1, la concentration moyenne des CCK mesurée dans les surnageants est de 82,2 ± 4,2 pM, valeur significativement deux fois supérieure à celle mesurée en réponse au contrôle (p < 0,05, test de Tukey) mais non différente de la concentration mesurée en réponse au contact avec la fraction C (environ 1,5 fois supérieure à la réponse de la fraction FC). Toutes les autres sous-fractions (FC-1, 2, 3 et 5) ont conduit à

l'obtention de concentrations de CCK non significativement différentes de celles obtenues en réponse au contrôle et à la fraction FC. Au regard de ces résultats, l'identification des séquences peptidiques a été réalisée uniquement pour les sous-fractions FC-4 et FC-6.

### 3.2.3 Identification des séquences peptidiques des sous-fractions FC-4 et FC-6 par LC-MS-MS

Les sous-fractions FC-4 et FC-6 ont été analysées par LC-MS-MS couplée à la détection UV à 280 nm et les séquences peptidiques ont été identifiées. Les chromatogrammes des sous-fractions FC-4 et FC-6 sont présentés *Figure 86A* et *B*.



*Figure 86: Profils de séparation RP-HPLC des sous-fractions FC-4 et FC-6* **A** : FC-4, **B** : FC-6.La séparation a été menée sur une colonne  $C_{18}$  en appliquant trois plateaux de 10 min à 5, 10 et 15 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique, à un débit de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>. La détection est réalisée à 280 nm.

Les profils ont mis en avant la possible présence d'acides aminés libres ou de séquences peptidiques contenant des résidus aromatiques avec, a priori, une plus grande diversité peptidique au sein de la sous-fraction FC-6. Au total, 20 séquences uniques ont été identifiées dans la sous-fraction FC-4 et 46 dans la fraction FC-6. Les poids moléculaires des peptides identifiés sont majoritairement compris entre 350 et 1200 Da. Les séquences ont été répertoriées dans le *Tableau 16*.

Sous-fraction	Séquence	Poids moléculaire (Da)	m/z	t <sub>R</sub> (min)	Identifié par	Protéine
FC-4	VLSA	388.2	389.2	14.5	de novo	P02070 HBB_BOVIN
FC-4	LLGN	415.2	416.2	18.48	de novo	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	VDPV	428.2	429.2	17.52	de novo	P02070 HBB_BOVIN
FC-4	K.VVAGV.A	443.3	444.3	21.42	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-4	VVYP	476.3	477.2	29.21	de novo	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	K.VVAGVA.N	514.3	515.3	20.65	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-4	E.YGAE(+14.02)A.L	523.2	524.2	16.16	PEAKS PTM	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	S.DFT(-18.01)PA.V	531.2	532.2	25.27	PEAKS PTM	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	S.DFTPA.V	549.2	550.3	25.15	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	L.SFPTT.K	551.3	552.3	26.62	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	S.FSNGM.K	554.2	555.2	14.83	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-4	YFPH	562.3	563.2	14.22	de novo	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	L.DDLPGA.L	586.3	587.2	25.48	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	L.QADFQ.K	607.3	608.3	10.60	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-4	N.VLVVVL.A	640.5	640.3	26.85	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-4	V.GGHAAEY.G	703.3	352.4	50.18	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	K.LRVDPVN.F	811.5	406.7	28.88	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	F.DLSHGSAQV.K	912.4	457.3	21.57	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	H.FDLSHGSAQ.V	960.4	481.2	28.41	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-4	K.VKVDEVGGEA.L	1001.5	501.8	22.56	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	K.LLGNV.L	514.3	515.4	23.67	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	L.LGNVL.V	514.3	515.3	24.63	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	K.LLGNV(+14.02).L	528.3	529.3	35.98	PEAKS PTM	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	D.FTPAV.H	533.3	534.3	22.1	SPIDER	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	F.ES(-18.01)FGD.L	535.2	536.1	34.65	PEAKS PTM	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	E.SFGDL.S	537.2	538.2	31.94	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	K.FLANV.S	562.3	563.3	30.84	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	F.LSFPT.T	563.3	564.4	34.15	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	K.VLDSF.S	579.3	580.3	29.28	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	L.LVVYP.W	589.3	590.3	31.7	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	K.EFTPV.L	591.3	592.6	23.28	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	V.LQADF.Q	592.3	593.2	24.62	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	K.EFTPV(+14.02).L	605.3	606.3	36.29	PEAKS PTM	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	K.LLGNVL.V	627.4	628.3	41.78	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	F.ES(-18.01)FGDL.S	648.3	649.2	45.79	PEAKS PTM	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	L.SELSDL.H	662.3	663.3	27.15	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	L.VVYPW.T	662.3	663.3	44.53	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	V.VYPWT.Q	664.3	665.3	37.15	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	F.LSFPTT.K	664.3	665.5	34.41	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	F.ESFGDL.S	666.3	667.4	36.06	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	L.SE(+14.02)LSDL.H	676.3	677.3	38.17	PEAKS PTM	P01966 HBA_BOVIN

 Tableau 16: Liste des séquences peptidiques identifiées dans les sous-fractions FC-4 et FC-6

FC-6	L.SELSDL(+14.02).H	676.3	677.3	39.81	PEAKS PTM	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	L.VVYPW(+14.02).T	676.4	677.3	46.86	PEAKS PTM	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	K.TYFPH(+14.02).F	677.3	678.3	20.62	PEAKS PTM	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	L.VVYPW(+15.99).T	678.3	679.3	37.01	PEAKS PTM	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	F.LSFPTT(+14.02).K	678.4	679.3	38.6	PEAKS PTM	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	F.ESFGDL(+14.02).S	680.3	681.3	42.72	PEAKS PTM	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	L.VVYPW(+31.99).T	694.3	695.3	21.36	PEAKS PTM	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	K.LRVDPV.N	697.4	349.8	20.3	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	L.ANVSTVL.T	702.4	703.3	25.63	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	R.LLVVYP.W	702.4	703.4	45.89	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	L.V(+71.04)VYPW.T	733.4	734.3	46.4	PEAKS PTM	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	L.VVYPWT.Q	763.4	764.5	41.34	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	L.LVVYPW.T	775.4	776.4	46.84	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	V.VYPWTQ.R	792.4	793.3	36.79	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	A.SHLPSDF.T	801.4	401.7	21.59	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	K.TYFPHF.D	810.4	406.1	39.18	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	H.LDDLPGAL.S	812.4	813.4	40.85	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	L.ASHLPSDF.T	872.4	437.2	22.29	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	L.VVYPWTQ.R	891.4	446.7	39.34	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	K.HLDDLKGT.F	897.5	449.7	11.22	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	R.NFGKEFTPV.L	1037.5	519.7	32.35	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FC-6	H.FDLSHGSAQV.K	1059.5	530.7	24.05	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	L.ASHLPSDFTPA.V	1141.5	571.8	24.06	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	L.ASHLPSDFTPAV.H	1240.6	621.2	36.66	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FC-6	K.AVEHLDDLPGAL.S	1248.6	625.3	40.03	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN

Les séquences ont été identifiées à partir d'une analyse LC-MS-MS de chaque fraction. La recherche des séquences provenant des chaînes  $\alpha$  (P01966|HBA\_BOVIN) et  $\beta$  (P02070|HBB\_BOVIN) a été identifiée en base de données (PEAKS DB), en prenant en compte les modifications post-traductionnelles (PEAKS PTM) de *de novo*.

Après analyse de la composition des séquences peptidiques, il est apparu qu'une certaine partie d'entre elles était caractérisée par la présence d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés aromatiques comme la phénylalanine (F), la tyrosine (Y) ou le tryptophane (W). Pour les deux listes de séquences peptidiques, les séquences contenant au moins un résidu d'acide aminé aromatique représentent plus de la moitié des peptides de chaque sous-fraction. Certaines séquences possédant des résidus d'acides aminés aromatiques ont été clairement identifiées : pour la séparation de la sous-fraction FC-4, les séquences QADFQ ( $t_R = 10,60$  min), YFPH ( $t_R = 14,22$  min), FSNGM ( $t_R = 14,83$  min) et YGAEA ( $t_R = 16,16$  min) correspondent, entre autres, aux trois pics intenses sur la *Figure 86A*. En ce qui concerne la séparation de la sousfraction FC-6, les pics enregistrés à 280 nm entre  $t_R = 35$  min et  $t_R = 50$  min (*Figure 86B*) correspondent entre autres aux séquences VYPWTQ ( $t_R = 36,79$  min), VYPWT ( $t_R = 37,15$  min), TYFPHF ( $t_R = 39,18$  min), VVYPWT ( $t_R = 41,34$  min), LVVYPW ( $t_R = 46,84$  min), VVYPW ( $t_R = 46,86$  min).

## 3.2.4 Sous-fractionnement de la fraction FD et identification des sous-fractions impliquées dans la stimulation de la sécrétion des CCK

L'analyse menée pour la fraction FC a également été appliquée pour la fraction FD. De même que pour la fraction FC, une séparation supplémentaire par RP-HPLC a été réalisée. Un plan de fractionnement a été défini en fonction du chromatogramme obtenu (*Figure 87*).



**Figure 87** : Profil de séparation RP-HPLC en mode semi-préparatif de la fraction FD. La séparation d'une injection de 6;7 mg de la fraction FD a été menée sur une colonne  $C_{18}$  en appliquant un gradient linéaire 0-70 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % de TFA pendant 80 min à un débit de 1,8 mL.min<sup>-1</sup>. La détection est réalisée à 215 nm.

Plusieurs injections successives ont été effectuées, les 5 sous-fractions notées FD-X (X numéro de la sous-fraction) ont été récoltées manuellement. Les concentrations de CCK mesurées dans les *s*urnageants suite à 2 h de contact entre les cellules STC-1 et les sous-fractions de FD ainsi que la fraction native FD testées à 0,2 % (p/v) ont été représentées dans la *Figure 88*.



*Figure 88*: *Effets des sous-fractions issues de la fraction FD sur la stimulation de la sécrétion des CCK par les cellules STC-1.* 

Le contrôle est composé d'un tampon Hepes pH 7,4. Les fractions sont reprises dans le tampon Hepes et testées à la concentration finale de 0,2 % (p/v). Les cellules sont incubées 2 h avec les différents traitements. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type (n=3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA un facteur suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

Les sous-fractions FD-1, FD-2, FD-4 ont conduit à la sécrétion de niveaux de CCK non significativement différents de ceux mesurés en réponse à la fraction FD native et au contrôle. Les sous-fractions FD-3 et FD-5 se sont distinguées par leur effet stimulateur significatif sur la sécrétion de CCK comparé à la fraction native FD : elles ont stimulé la sécrétion des CCK jusque des niveaux atteignant 157,  $7 \pm 26,2$  pM (FD-3) et 127,5  $\pm 17,8$  pM (FD-5) soit des augmentations respectives d'un facteur 5 et d'un facteur 4 par rapport à la fraction native FD (30,9  $\pm 1,3$  pM). Au regard de ces résultats, les sous-fractions FD-3 et FD-5 ont été sélectionnées pour l'identification des séquences peptidiques.

### 3.2.5 Identification des séquences des sous-fractions FD-3 et FD-5 par LC-MS-MS

Les séquences des sous-fractions FD-3 et FD-5 ont été identifiées par LC-MS-MS et les spectres MS-MS ont traitées avec le logiciel Peaks 7.0. Les spectres UV enregistrés à 280 nm sont présentés *Figure 89*.



*Figure 89: Profils de séparation RP-HPLC des sous-fractions FD-3 et FD-5* **A** : FD-3 et **B** : FD-5 La séparation a été menée avec une colonne C18 en appliquant trois plateaux de 10 min à 5, 10 et 15 % d'un mélange 99,9 % d'acétonitrile, 0,1 % d'acide formique à un débit de 0,2 mL.min-1. La détection est réalisée à 280 nm.

Au total, 10 séquences peptidiques uniques ont été identifiées dans la sous-fraction FD-3 et 22 séquences uniques dans la sous-fraction FD-5 (*Tableau 17*).

**Tableau 17** : Liste des séquences peptidiques identifiées dans les sous-fractions FD-3 et FD-5 par LC-MS-MS et Peaks7.0

Sous-fraction	Séquence	Poids moléculaire (Da)	m/z	$t_{R}\left( min ight)$	Identifié par	Protéine
FD-3	F	165.2	166.0	10.4	de novo	P01966&P02070
FD-3	LR, RL	287.4	288.0	15.3	de novo	P01966&P02070
FD-3	WGK	389.5	390.2	14.4	de novo	P01966&P02070
FD-3	NFGK	464.5	465.2	12.3	de novo	P02070 HBB_BOVIN
FD-3	LANVS	502.3	503.2	20.8	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-3	SDLHA	541.2	542.2	16.0	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-3	GDLSTAD	677.3	678.2	20.7	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FD-3	AVMNNPK	772.4	387.2	16.5	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FD-3	SHGSAQVK	812.4	407.2	20.6	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-3	SAADKGNVK	888.5	445.2	20.9	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	FF	312.1	313.1	12.9	de novo	P02070 HBB_BOVIN
FD-5	VAAAL	443.3	444.3	28.3	de novo	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	FTPV	462.2	463.2	33.0	de novo	P02070 HBB_BOVIN
FD-5	LLGNV	514.3	515.3	39.4	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FD-5	FFES	528.2	529.2	36.2	de novo	P02070 HBB_BOVIN
FD-5	FESF	528.2	529.2	46.0	de novo	P02070 HBB_BOVIN
FD-5	YFPH	562.3	563.2	24.0	de novo	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	LSFPT	563.3	564.3	46.7	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN

FD-5	AVEHL	567.3	568.3	21.1	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	EFTPV	591.3	592.4	38.9	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FD-5	SELSDL	662.3	663.3	43.0	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	VVYPW	662.3	663.5	47.0	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FD-5	TYFPH	663.3	664.3	28.7	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	LSFPTT	664.3	665.4	47.0	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	LRVDPV	697.4	349.7	36.7	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	LRVDPVN	811.5	406.7	31.4	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	HLDDLKGT	897.5	449.7	21.2	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN
FD-5	FDLSHGSAQV	1059.5	530.7	40.6	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	SHLPSDFTPA	1070.5	536.2	39.9	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	AVEHLDDLPGA	1135.6	568.7	42.6	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	ASHLPSDFTPA	1141.5	571.7	40.9	PEAKS DB	P01966 HBA_BOVIN
FD-5	VKVDEVGGEALG	1171.6	586.8	38.3	PEAKS DB	P02070 HBB_BOVIN

Les séquences ont été identifiées à partir d'une analyse LC-MS-MS de chaque fraction. La recherche des séquences provenant des chaînes  $\alpha$  (P01966|HBA\_BOVIN) et  $\beta$  (P02070|HBB\_BOVIN) a été identifiée en base de données (PEAKS DB), en prenant en compte les modifications post-traductionnelles (PEAKS PTM) de *de novo*.

De même que précédemment observé pour les peptides issus des sous-fractions FC-4 et FC-6, de nombreuses séquences peptidiques comportent des résidus d'acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine (F), le tryptophane (W) et la tyrosine (Y). Les spectres UV enregistrés à 280 nm ont confirmé la présence de séquences peptidiques contenant un ou plusieurs résidus d'acides aminés aromatiques. Pour la sous-fraction FD-3, l'élution des pics observés entre  $t_R = 5$  min et  $t_R = 20$  min correspond entre autres à l'acide aminé F ( $t_R = 10,4$  min) et aux séquences NFGK ( $t_R = 12,3$  min) et WGK ( $t_R = 14,4$  min). Pour la sous-fraction FD-5, deux groupes distincts ont été élués, un premier entre  $t_R = 15$  min et  $t_R = 30$  min suivi d'un deuxième élué entre  $t_R = 35$  min et  $t_R = 46$  min. De même, quelques séquences contenant des résidus d'acides aminés aromatiques ont été identifiées et correspondent à l'élution des pics contenant les séquences FF ( $t_R = 12,9$  min), TYFPH ( $t_R = 28,7$  min), FFES ( $t_R = 36,2$  min) ou LSFPTT et VVYPW (co-élués à  $t_R = 47$  min). Parmi les séquences identifiées et présentées dans le *Tableau 17*, et notamment pour la sous-fraction FD-5, plus de la moitié d'entre elles contiennent au moins un résidu d'acide aminé aromatique.

Au final, deux étapes de fractionnement chromatographique couplées à des tests de stimulation de la sécrétion des CCK et une analyse LC-MS-MS ont permis de mettre en avant 4 groupes peptidiques capables de stimuler la sécrétion des CCK et contenant des peptides de poids moléculaire compris entre 500 et 1000 Da. Une propriété récurrente au sein des séquences identifiées est la présence d'acides aminés aromatiques, point abordé dans la partie discussion.

## 3.2.6 Etude de la stimulation de la sécrétion des CCK en présence de l'inhibiteur du récepteur CaSR

Le but de cette expérience est de mettre en évidence si le récepteur CaSR est potentiellement impliqué dans la stimulation de la sécrétion des CCK par FD-3 et FD-5 et par la fraction native FD. Les résultats sont présentés *Figure 90*.



*Figure 90*: *Effet d'un inhibiteur de CaSR sur la sécrétion des CCK par les cellules STC-1 en présence des fractions FD-3, FD-5 et FD* 

L'effet des fractions est testé en absence (barres noires) ou présence (barres grises) de l'inhibiteur de CaSR, NPS2143. Le contrôle est constitué d'un tampon Hepes 20 mM. Les fractions sont préparées avec le tampon Hepes et testées à la concentration finale 1 g.L<sup>-1</sup> (p/v). La solution de NPS2143 est préparé dans le tampon Hepes à une concentration finale de 25  $\mu$ M. Les cellules sont pré-traitées 15 min avec la solution de NPS2143 avant le contact avec les fractions pendant 2 h. Les résultats sont exprimés en moyennes ± écart type (n=3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA deux facteurs suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

En absence de l'inhibiteur de CaSR, la sous-fraction FD-5 ainsi que la fraction FD ont stimulé la sécrétion des CCK à des concentrations mesurées supérieures à celle mesurée en réponse au contrôle(en accord avec ce qui a été démontré en début de partie). En présence de l'inhibiteur, la concentration des CCK secrétées par les cellules STC-1 a baissé en présence de la fraction FD et de la sous-fraction FD-5. La concentration des CCK mesurée en réponse à la fraction FD est passée de  $50,2 \pm 10,5$  pM à  $18,6 \pm 0,86$  pM en présence de l'inhibiteur. Pour la sous-fraction FD-5, la concentration des CCK est passée de  $74,3 \pm 9,3$  pM à  $48,3 \pm 1,1$  pM. La

présence de l'inhibiteur n'a eu aucun effet significatif sur la sécrétion des CCK en absence de fractions peptidiques (contrôle) ou en présence de la sous-fraction FD-3.

### 3.3 <u>Sélection de peptides au sein de la liste des peptides passant intacts la barrière de</u> cellules Caco-2 pour l'étude des activités DPP-IV/GLP-1

Suite à l'expérience de passage de barrière Caco-2 de la sous-fraction FBC-3, repérée pour sa double activité GLP-1/DPP-IV, une liste d'une trentaine de peptides « résistants » a été établie (2.5). L'objectif est de sélectionner une dizaine de séquences à partir de cette liste et de tester leurs potentiels bioactifs envers la sécrétion de GLP-1 et l'inhibition de la DPP-IV. Cette sélection a été réalisée en analysant les surnageants basolatéraux de l'expérience de passage de la monocouche de cellules Caco-2 ainsi que la solution initiale de la fraction FBC-3 par LC-MS-MS en mode SIM (*Selected Ion Monitoring*). L'objectif est de cibler précisément les séquences de la liste choisie présentée dans le *Tableau 18*.

Tableau 18: Liste des peptides et leurs rapports m/z pour l'analyse SIM

Protéine	Séquence	Poids moléculaire (Da)	m/z
P01966 HBA_BOVIN	VAAA	330.19	331.2
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNV	602.3024	603.28
P01966 HBA_BOVIN	ANVST	490.2387	491.26
P02070 HBB_BOVIN	KAAVT	488.2958	489.32
P02070 HBB_BOVIN	LTAEEK	689.3596	345.72
P02070 HBB_BOVIN	MNNPK	602.2846	603.34
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNV	760.3715	761.34
P01966 HBA_BOVIN	YGAE	438.175	439.16
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNVK	730.3973	366.22
P01966 HBA_BOVIN	DLSHGSAQ	813.3617	814.44
P01966 HBA_BOVIN	SDLHAH	678.3085	679.26
P01966 HBA_BOVIN	YGAEA	509.2122	510.2
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNVKA	959.5035	480.7502
P01966 HBA_BOVIN	SDLHAHK	806.4035	404.22
P01966 HBA_BOVIN	VDPVN	542.27	543.2911
P01966 HBA_BOVIN	VGGHAAE	639.2976	640.32
P01966 HBA_BOVIN	AADKGNV	673.3395	674.3242
P02070 HBB_BOVIN	AGVANA	501.2547	502.2263
P01966 HBA_BOVIN	DLSHG	527.2339	528.2211
P02070 HBB_BOVIN	HVDPEN	709.3031	710.3817
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNVK	888.4664	889.4408

P01966 HBA_BOVIN	SDLH	470.2125	471.2164
P01966 HBA_BOVIN	VGGHAA	510.255	511.26
P01966 HBA_BOVIN	AADKGNVK	801.4344	401.7191
P01966 HBA_BOVIN	AVEH	454.2176	455.2139
P01966 HBA_BOVIN	DKGNVK	659.3602	330.691
P02070 HBB_BOVIN	NNPKVKAH	906.5035	454.2651
P01966 HBA_BOVIN	TKAVEH	683.3602	342.6895
P02070 HBB_BOVIN	VTAFW	622.3115	623.0399
P02070 HBB_BOVIN	AGVA	316.1747	317.139
P02070 HBB_BOVIN	VVAG	344.206	345.1816

La recherche des séquences provenant des chaînes  $\alpha$  (HBA) et  $\beta$  (HBB) est réalisée par le logiciel Peaks.

L'analyse des spectres générés doit permettre de sélectionner une liste de peptides destinés à être synthétisés. Cette sélection s'est fondée sur deux critères : la présence du peptide dans tous les surnageants basolatéraux et son abondance relative, estimée par l'intensité du courant ionique de l'ion moléculaire correspondant. Au final, 11 séquences ont été sélectionnées pour la synthèse peptidique et pour l'étude de leurs activités biologiques en lien avec la stimulation de la sécrétion de GLP-1 et l'inhibition de l'activité DPP-IV (*Tableau 19*Tableau 17).

Tableau 19: Liste des peptides résistants sélectionnés pour la synthèse peptidique

Séquence	Poids moléculaire (Da)
VAAA	330,4
ADKGNV	602,7
SDLHAH	678,7
YGAE	438,4
HVDPEN	709,7
ANVST	490,5
KAAVT	488,5
DLSHGSAQ	813,8
ADKGNVK	730,8
SAADKGNV	760,8
TKAVEH	683,8

L'origine de ces peptides au niveau des chaînes peptidiques, et tout particulièrement l'appartenance à des motifs récurrents du peptidome intestinal (*Tableau 6*) a été étudiée. Le

peptide DLSHGSAQ appartient au motif récurrent  $\alpha$  41-55. Les peptides KAAVT et HVDPEN se situent dans les motifs récurrents respectifs  $\beta$  3-38 et  $\beta$  96-120. Aucune séquence ne fait partie des séquences strictement communes entre les peptidomes gastrique et intestinal mises en avant au paragraphe 1.5.2.3.

### 3.4 <u>Etude du potentiel bioactif des peptides synthétiques à inhiber la DPP-IV et à stimuler</u> la sécrétion de GLP-1

## 3.4.1 Etude du potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV des peptides synthétiques

Le potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV a été testé pour les 11 séquences peptidiques avec le test enzymatique *in vitro*. Sur les 11 séquences, une seule inhibe significativement l'activité de la DPP-IV, la séquence VAAA. Son IC<sub>50</sub> est de 141,3  $\pm$  14,3 mM. Pour rappel, l'IC<sub>50</sub> de IPI, inhibiteur spécifique de la DPP-IV, déterminée dans nos conditions expérimentales, est de 4,4  $\pm$  0,08  $\mu$ M. Le peptide IPI est connue pour exercer une mode d'inhibition compétitif sur l'activité de la DPP-IV. Le mode d'inhibition du peptide VAAA a été déterminé par la représentation de Lineweaver et Burk présentée *Figure 91*.



*Figure 91: Représentation de Lineweaver et Burk pour l'inhibition de l'activité de la DPP-IV par le peptide VAAA.* 

Cercles blancs : absence de VAAA, cercles noirs : présence de VAAA. Vi représente la vitesse initiale, S la concentration en substrat (Gly-Pro-pNA). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écart type (n = 3).

L'incubation avec le peptide n'a pas significativement modifié la valeur du  $V_{max}$  de l'enzyme  $(0,0040 \pm 0,0002 \text{ mM.min}^{-1})$  qui atteint  $0,0035 \pm 0,0001 \text{ mM.min}^{-1}$  en présence de VAAA. En revanche, une augmentation significative de la valeur du  $K_{app}$  de la DPP-IV est observée en présence de VAAA. Dans nos conditions expérimentales, sa valeur est égale à  $0,250 \pm 0,011$  mM. En présence du peptide VAAA, elle a été mesurée à  $2,1 \pm 0,8$  mM. Par conséquent, le peptide VAAA semble avoir un mode d'inhibition compétitif.

## **3.4.2** Etude du potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV du peptide VAAA en présence d'autres peptides synthétiques

Le peptide VAAA testé seul a démontré son potentiel inhibiteur de la DPP-IV dans les conditions d'un test enzymatique utilisant la DPP-IV purifiée. Le but de l'expérience menée ici est d'évaluer le potentiel inhibiteur du peptide VAAA en présence d'autres peptides, afin de mettre en évidence des effets synergiques. Les 10 autres séquences synthétisées suite au passage de la sous-fraction FBC-3 au travers de la barrière Caco-2 ont été utilisées pour constituer un mélange peptidique équimolaire à la concentration finale de 0,086 mM. Comme démontré précédemment, ces séquences, testées seules, n'ont montré aucun effet inhibiteur sur l'activité de la DPP-IV. Les résultats sont présentés *Figure 92* 



*Figure 92*:*Inhibition de l'activité de la DPP-IV par le peptide VAAA en présence d'un mélange équimolaire de peptides synthétiques* 

(suite légende **Figure 92**). L'effet du peptide VAAA sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV est testé seul (cercles noirs) ou en présence d'un mélange équimolaire (concentration finale de 0,086 mM) des 10 autres peptides synthétiques (cercles blancs).

Les régressions linéaires entre le pourcentage d'inhibition et le ln de la concentration finale (Cf) du peptide VAAA sont de : y = 21,2x + 92,4 (R<sup>2</sup> = 0,998) pour le peptide VAAA seul et de y = 19,6x + 95,6 (R<sup>2</sup> = 0,996) pour le peptide VAAA en mélange avec les autres 10 peptides.

Les pentes des régressions linéaires, représentant le mode d'action de l'inhibiteur, ont été comparées par une analyse de la covariance. L'analyse des résultats n'a montré aucune différence significative entre les pentes des régressions linéaires du peptide VAAA, seul ou en mélange (p = 0,081, analyse des différences entre les pentes avec un intervalle de confiance à 95 %)), A partir des régressions linéaires l'IC<sub>50</sub> du peptide VAAA en présence des autres peptides a été déterminée et comparée à celle du peptide VAAA seul (3.4.1). L'IC<sub>50</sub> du peptide VAAA en mélange est de 97,7 ± 2,3 µM, valeur significativement inférieure à celle du peptide VAAA seul, 141,3 ± 14,3 µM (p < 0,05, test de Student). Le potentiel inhibiteur du mélange peptidique équimolaire sans VAAA a été étudié. Testé à la concentration finale de 0,086 mM, il a exercé une inhibition de 19, 6 ± 2,9 % de l'activité de la DPP-IV. A cette même concentration, le peptide VAAA inhibe d'environ 30 % l'activité de la DPP-IV et d'environ 40 % en présence du mélange peptidique équimolaire.

## 3.4.3 Etude du potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV du peptide VAAA avec le modèle Caco-2 *in situ*

Le potentiel inhibiteur du peptide VAAA a également été testé sur les cellules vivantes Caco-2 *in situ* en utilisant le protocole décrit au paragraphe 2.5.2. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> des peptides IPI et VAAA sont présentées dans le *Tableau 20*.

IC <sub>50</sub> (μM)				
IPI VAAA				
DPP-IV purifiée	$15,6\pm0,1$	$454,5 \pm 3,2$		
Caco-2 in situ	$43,1 \pm 2,6$	$665,8 \pm 10,1$		

 

 Tableau 20: Valeurs d'IC<sub>50</sub> de l'activité DPP-IV des peptides IPI et VAAA avec le substrat Gly-Pro-AMC

Les valeurs d'IC50 sont exprimées en µM. Le substrat utilisé est le Gly-Pro-AMC.

Pour les deux peptides, les valeurs d' $IC_{50}$  obtenues avec les cellules Caco-2 *in situ* sont supérieures à celles obtenues avec la DPP-IV purifiée. En conditions Caco-2 *in situ*, les valeurs d' $IC_{50}$  sont respectivement 1,5 et 2,8 fois supérieures à celles obtenues avec l'enzyme purifiée pour les peptides IPI et VAAA. Le peptide IPI reste dans les deux cas un meilleur inhibiteur de l'activité DPP-IV que le peptide VAAA. Les valeurs d' $IC_{50}$  obtenues pour le peptide IPI sont respectivement 15 et 29 fois plus faibles en présence de l'enzyme purifiée et en présence des cellules Caco-2 que les valeurs obtenues pour le peptide VAAA. Malgré cela, le peptide VAAA a démontré sa capacité à inhiber l'activité DPP-IV des cellules Caco-2.

## 3.4.4 Etude du passage du peptide VAAA au travers de la monocouche de cellules Caco-2

Le peptide VAAA a prouvé être un inhibiteur de l'activité DPP-IV en conditions enzymatiques classiques comme sur cellules Caco-2 vivantes. Il a été identifié comme provenant d'une fraction peptidique bioactive (FBC-3) et comme passant intact, *in vitro*, la monocouche de cellules Caco-2 au sein du mélange FBC-3. Ici, le transport du peptide synthétique VAAA au travers d'une monocouche de cellules Caco-2 a été suivi pendant les 2 h de contact. L'évolution de sa concentration dans les compartiments apicaux et basolatéraux a été déterminée par dosage MRM (protocole décrit au paragraphe 4.8.3.2 du chapitre Matériels et Méthodes). Le peptide a été solubilisé dans une solution de transport (HBSS, 10 mM Hepes) et testé à la concentration de 1 mM. Des prélèvements ont été réalisés à 5, 15, 30, 60 et 120 min d'incubation. L'intégrité de la barrière de cellules Caco-2 a été évaluée en parallèle par le passage de la Lucifer Yellow (LY).

### 3.4.4.1 Effet du peptide VAAA sur l'intégrité de la barrière de cellules Caco-2

Une concentration de 100  $\mu$ M de LY a été déposée au niveau du pôle apical des barrières cellulaires dans tous les puits en présence ou non du peptide (puits contrôle). Les coefficients de perméabilité apparente ont atteint des valeurs de 2,63.10<sup>-7</sup> ± 9,73.10<sup>-8</sup> cm.s<sup>-1</sup> pour le puits contenant le peptide VAAA et de 8,65.10<sup>-8</sup> ± 4,64.10<sup>-8</sup> cm.s<sup>-1</sup> pour le puits « contrôle » (solution de transport seule). Le contact avec la solution peptidique pendant 2 h a donc augmenté la perméabilité de la barrière cellulaire. Toutefois, ces deux valeurs restent en dessous de la valeur seuil admise de 10<sup>-6</sup> cm.s<sup>-1</sup> attestant ainsi de la conservation de l'intégrité de la barrière pendant l'expérience de passage du peptide VAAA.

#### 3.4.4.2 Evolution des concentrations apicale et basale du peptide VAAA

Les concentrations du peptide VAAA ont été mesurées par MRM. Un spectre de fragmentation du peptide a été préalablement réalisé pour choisir les transitions à suivre (*Figure 93*).



*Figure 93 : Spectre de fragmentation du peptide VAAA* Les fragments y sont indiqués en rouge alors que les fragments b sont indiqués en bleu.

Le peptide VAAA a un rapport *m/z* de 331,2 et les transitions 72 (y<sub>4</sub>), 171,3 (b<sub>2</sub>) et 143,1 (y<sub>2</sub>) ont été suivies. Une corrélation linéaire a été observée entre l'aire du pic et la concentration peptidique testée ( $R^2 = 0,997$ ). Pour l'analyse LC-MS-MS, les surnageants apicaux ont été dilués au 1/100<sup>e</sup> pour les temps de prélèvement de 5, 15 et 30 min et au 1/10<sup>e</sup> pour les temps de prélèvement de 60 et 120 min. Les surnageants basolatéraux ont été analysés sans dilution. L'évolution de la concentration du peptide VAAA lors de l'expérience de passage de la barrière Caco-2 a été représenté *Figure 94*.



**Figure 94**: Évolution de la concentration du peptide VAAA dans les compartiments apicaux et basolatéraux du modèle de barrière de cellules Caco-2. Cercle noir : concentration apicale, cercle blanc : concentration basolatérale de VAAA. Les concentrations ont été déterminées par rapport à une courbe d'étalonnage réalisée par MRM. Les valeurs sont représentées en moyennes  $\pm$  écart type (n=3).

Dès 5 min d'incubation, la concentration peptidique au pôle apical a diminué de 58 % par rapport à la concentration de la solution initiale de VAAA, atteignant une valeur de 582,5 ± 32,8 pmol. $\mu$ L<sup>-1</sup>. Après 1 h d'incubation, la concentration du peptide VAAA est de 47,1 ± 8,7 pmol. $\mu$ L<sup>-1</sup> soit 4,7% de la concentration de la solution de départ. Après 2 h de contact, aucune trace du peptide VAAA n'a été détectée dans le compartiment apical (point confondu avec le point basolatéral 2 h en blanc sur la Figure 94). Durant les 2 h d'incubation, aucune trace du pepitde VAAA n'a été détectée de manière significative dans le compartiment basolatéral. La stabilité du peptide VAAA dans la solution de transport a été vérifiée : la solution peptidique a été incubée 2 h dans les mêmes conditions expérimentales et la concentration peptidique a été déterminée aux mêmes temps de prélèvement par MRM. Aucune variation de la concentration n'a été observée au cours du temps et a ainsi confirmé la stabilité du peptide en solution (données non montrées). Le peptide VAAA n'a donc pas franchi intact la barrière de cellules Caco-2 et a démontré une très faible stabilité au contact des cellules. Le temps de demi-vie du peptide a été calculé à partir de la courbe obtenue en modélisant une équation exponentielle décroissante entre la concentration peptidique et le temps d'incubation (y =  $770, 1.e^{-0,0623x}, R^2 = 0,972$ ) et est estimé à t = 6,9 min.

## 3.4.5 Etude du potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1 des peptides synthétiques

#### 3.4.5.1 Effets des peptides synthétiques sur la sécrétion de GLP-1

La capacité à stimuler la sécrétion de GLP-1 par la lignée STC-1 a été étudié pour les 11 peptides synthétiques. Les résultats sont représentés *Figure 95*.



**Figure 95**: Effet des peptides synthétiques sur la sécrétion de GLP-1 par les cellules STC-1 Les peptides sont testés à des concentrations de 0,1 mM (barres noires) et 1 mM (barres grises). Le contrôle est composé d'un tampon Hepes 20 mM pH 7,4. Les solutions peptidiques sont préparées dans le tampon Hepes. Les cellules sont incubées pendant 2 h avec les différents traitements. Les valeurs données sont les moyennes  $\pm$  écart-type (n = 3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA deux facteurs suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

Testé à la plus faible concentration (0,1 mM), seul le peptide TKAVEH a conduit à l'obtention d'une concentration de GLP-1 significativement supérieure à celle du contrôle et des autres peptides testés (test de Tukey, p < 0,05). En effet, la concentration de GLP-1 mesurée en réponse au peptide TKAVEH est de 774,8 ± 40,7 pM alors qu'elle est de 78,1 ± 12,3 pM pour le contrôle. Pour les autres peptides les valeurs des concentrations en GLP-1 obtenues s'échelonnent de 78,1 ±12,3 pM pour HVDPEN à 167,2 ± 6,5 pM pour DLSHGSAQ, soit au moins 4,8 fois plus faibles que la valeur obtenue pour TKAVEH. En revanche, testés à une concentration de 1 mM, les peptides KAAVT, YGAE et ANVST provoquent la plus forte sécrétion de GLP-1, les concentrations atteignant des valeurs

respectives de  $1264,2 \pm 128,6$  pM,  $1214,2 \pm 110,1$  pM et  $882,6 \pm 64,3$  pM, soit entre 24 et 32 fois plus importantes que celle obtenue pour le contrôle. A cette concentration, le peptide TKAVEH n'a pas eu un effet significativement différent de celui observé pour le contrôle sur la stimulation de la sécrétion de GLP-1. Les peptides VAAA, ADKGNV, SDLHAH, HVDPEN, ADKGNVK et SAADKGNV n'ont pas stimulé la sécrétion de GLP-1.

Afin de confirmer le potentiel des peptides TKAVEH, DLSHGSAQ, KAAVT et YGAE, le test de contact avec les cellules STC-1 a été réalisé avec trois concentrations de chaque peptide. Les concentrations du peptide TKAVEH sont 10 fois inférieures aux autres compte tenu des résultats précédents. Les résultats du test de sécrétion sont présentés *Figure 96*.



*Figure 96*: *Effet des peptides TKAVEH, ANVST, DLSHGSAQ, YGAE et KAAVT sur la stimulation de la sécrétion de GLP-1 par les cellules STC-1.* 

Le peptide TKAVEH est testé à des concentrations 10 fois inférieures que les autres. Les concentrations testées sont de 0,25 mM ou 0,025 mM (barres noires), 0,5mM ou 0,05 mM (barres gris clair) et 1 mM ou 0,1 mM (barres gris foncé). Les solutions peptidiques sont préparées dans un tampon Hepes 20 mM pH 7,4. Le contrôle est composé d'un tampon Hepes pH 7,4. Les cellules sont incubées 2 h avec les différents traitements. Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  écart type (n = 3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA deux facteurs suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

Les peptides ANVST, KAAVT, YGAE et TKAVEH ont confirmé leur capacité à stimuler la sécrétion du GLP-1 à la plus haute concentration testée (0,1 mM pour TKAVEH, 1 mM pour

les autres) : les concentrations de GLP-1 mesurées ont atteint des valeurs respectives de 1375,9  $\pm$  121,6 pM, 1192,4  $\pm$  369,7 pM, 719,8  $\pm$  189,1 pM et 1256,7  $\pm$  196,2 pM sans être significativement différentes les unes des autres. Ces valeurs sont au moins 10 fois supérieures à celle induite par le contrôle. Un effet dose a été observé pour les peptides KAAVT, TKAVEH et YGAE. En revanche le peptide DLSHGSAQ n'a pas eu un effet significativement différent du contrôle sur la stimulation de la sécrétion de GLP-1, quelle que soit la concentration testée. Le peptide ANVST a conduit à des concentrations de GLP-1 comprises entre 1077,1  $\pm$  167,5 pM et 1375,9  $\pm$  121,6 pM, non significativement différentes entres elles, mais toutes environ 10 fois supérieures à la valeur obtenue pour le contrôle (Test de Tukey, p < 0,05).

### 3.4.5.2 Effet d'un inhibiteur du transporteur PepT1 sur la sécrétion de GLP-1 en présence des peptides synthétiques

Le but de cette expérience a été de mettre en évidence si le transporteur peptidique PepT1 était impliqué dans les mécanismes de stimulation de la sécrétion de GLP-1 en présence des séquences peptidiques ANVST, TKAVEK et KAAVT. Les cellules STC-1 ont subi un prétraitement de 15 min avec un inhibiteur de PepT1 (4-AMBA 10 mM) préparé dans du tampon Hepes. Les solutions peptidiques ont été préparées dans un tampon Hepes 20 mM pH 7,4 à la concentration de 0,1 mM pour le peptide TKAVEH et de 1 mM pour les peptides KAAVT et ANVST. Les résultats obtenus sont présentés *Figure 97*.



*Figure 97*: *Effet d'un inhibiteur de PepT1 sur la sécrétion de GLP-1 par les cellules STC-1 en présence des peptides TKAVEH, ANVST et KAAVT* 

L'effet des peptides est testé en absence (barres noires) ou présence (barres grises) de l'inhibiteur de PepT1, 4-AMBA. Le contrôle est constitué d'un tampon Hepes 20 mM pH 7,4. Les solutions peptidiques sont préparées avec le tampon Hepes et testées à la concentration finale de 1 mM pour ANVST et KAAVT et de 0,1 mM pour TKAVEH. La solution de 4-AMBA est préparée dans le tampon Hepes à une concentration finale de 10 mM. Les cellules sont pré-traitées 15 min avec la solution de 4-AMBA avant le contact avec les peptides pendant 2 h. Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type (n=3). Les valeurs ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par une ANOVA deux facteurs suivie d'un test de Tukey (p < 0.05).

En absence de l'inhibiteur de PepT1, les peptides ANVST et KAAVT ont conduit à la sécrétion de GLP-1 à des niveaux respectifs, 9,7 et 5,9 fois supérieurs au contrôle. En présence de l'inhibiteur, les concentrations en GLP-1 obtenues sont significativement inférieures à celles obtenues sans l'inhibiteur pour les peptides ANVST et KAAVT (test de Tukey, p < 0,05). Ainsi, les valeurs des concentrations de GLP-1 obtenues pour ces deux peptides sont respectivement de 109,0 ± 16,3 et 66,0 ± 0,64 pM en l'absence de l'inhibiteur et de 22,1 ± 2,1 et 7,52 ± 2,6 pM en présence de l'inhibiteur. Le traitement avec l'inhibiteur n'a eu aucun effet significatif sur les puits traités avec le contrôle ou avec le peptide TKAVEH.

#### 3.5 Discussion

Les travaux de recherche de cette troisième et dernière partie ont porté sur l'étude des modes d'action des fractions peptidiques isolées sur la sécrétion des CCK et de GLP-1 et l'inhibition

de la DPP-IV. Pour cela, certaines séquences peptidiques ont été synthétisées. Au niveau cellulaire, les résultats obtenus ont permis le début de l'identification de certaines voies de signalisation impliquées. Il est important de préciser que les travaux concernant l'implication de récepteurs dans la sécrétion des hormones intestinales n'en sont qu'à leurs prémices et nécessiteraient d'être répétés et optimisés.

#### 3.5.1 Mise en évidence d'un nouveau peptide inhibiteur de la DPP-IV

A partir d'un digestat intestinal d'hémoglobine bovine, généré dans des conditions *in vitro*, la sous-fraction FBC-3 a été isolée pour ses activités biologiques sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV et la stimulation de la sécrétion du GLP-1. Les expériences mimant le passage de cette fraction au travers de la barrière intestinale ont mené à la sélection de 11 séquences peptidiques résistantes, ce qui représente moins de 10 % des séquences peptidiques de la population totale de FBC-3. Parmi ces séquences, une seule a inhibé l'activité de la DPP-IV et trois à quatre séquences ont montré avoir une capacité intéressante à stimuler la sécrétion de GLP-1 par les cellules STC-1.

Les protéines alimentaires sont des sources intéressantes de peptides inhibiteurs de l'activité de la DPP-IV. Cette capacité des peptides à inhiber l'activité de la DPP-IV a souvent été associée à la nature et la position de certains acides aminés au sein de la séquence, même si bon nombre de ces peptides inhibiteurs ne vérifie pas ces critères établis (Lacroix and Li-Chan, 2012a). La présence d'un résidu de proline en position P1 en N-terminal est un des critères les plus recherchés, illustré par les deux meilleurs inhibiteurs peptidiques Ile-Pro-Ile et Val-Pro-Leu (Umezawa et al., 1984). Un positionnement en C-terminal du résidu de proline est également un critère de potentiel inhibiteur de la DPP-IV (Hatanaka et al., 2012). En effet, de nombreuses séquences possédant un résidu de proline en C-terminal ont été recensées pour leur capacité à inhiber la DPP-IV, provenant majoritairement des protéines de lait (Uenishi et al., 2012a ; Nongonierma and FitzGerald, 2013b, 2014a). L'utilisation de modèles de prédiction, tel que le modèle QSAR, permet de comparer un grand nombre de séquences inhibitrices identifiées expérimentalement et d'établir de nouvelles corrélations structurefonction. Ainsi, Nongonierma et Fitzgerald ont démontré par modèle QSAR un lien entre résidu hydrophobe et activité inhibitrice de la DPP-IV. En s'appuyant sur une banque de données de séquences peptidiques inhibitrices issues de protéines de lait, la présence d'acides aminés hydrophobes en position N-terminal tels que la leucine, l'isoleucine, le tryptophane ou la phénylalanine a été identifiée comme un critère favorisant le potentiel inhibiteur d'un peptide (Nongonierma and FitzGerald, 2016c). Parmi les 11 séquences choisies, seul le peptide VAAA s'est avéré être un inhibiteur de la DPP-IV avec un mode d'inhibition compétitif. Présent au niveau de la chaîne  $\alpha$  entre les résidus 62 et 65, il ne provient pas d'un motif récurrent mis en évidence lors de la partie 1. Le dipeptide VA a précédemment été identifié comme un inhibiteur compétitif de l'activité de la DPP-IV avec une valeur d'IC<sub>50</sub> de 168,24 ± 7,96 µM (Nongonierma and FitzGerald, 2013e) alors que celle déterminée ici pour VAAA est de 141,3 ± 14,3 µM. La forte similarité entre ces deux peptides en termes de séquence, de potentiel inhibiteur et de mode d'action a donc posé la question de l'existence d'un déterminant minimal conditionnant le potentiel bioactif. La présence d'un résidu d'alanine en position P1 en N-terminal est un des critères de substrat préférentiel de la DPP-IV que remplit le peptide VAAA. En revanche, certaines séquences testées telles que KAAVT, présentant également ce critère, n'ont démontré expérimentalement aucun potentiel inhibiteur de la DPP-IV. L'interaction enzyme-peptide ne semble pas entièrement reposer sur la présence d'un résidu précis mais sur la composition et la structure globales du peptide. Ici, il est supposable que la chaîne aliphatique du peptide VAAA favorise sa stabilisation dans le site de fixation S1 qui possède des propriétés hydrophobes (Thoma et al., 2003). Les peptides d'origine alimentaire au potentiel prometteur recensés (outre Ile-Pro-Ile) présentent des valeurs d'IC<sub>50</sub> fréquemment comprises entre 30 et 200 µM (Lacroix and Li-Chan, 2014; Power et al., 2014; Jao et al., 2015), valeurs parmi lesquelles l'IC<sub>50</sub> du peptide VAAA s'inscrit parfaitement. De plus, ce peptide a été isolé à partir d'une digestion GI d'hémoglobine bovine suivie par le passage d'une barrière cellulaire simulant le processus d'absorption intestinale. Cette démarche originale a permis une sélection de candidats potentiels à l'inhibition de l'activité de la DPP-IV en reproduisant les différents paramètres pouvant affecter sa biodisponibilité.

Le peptide VAAA a été placé dans plusieurs conditions proches de celles intestinales et l'influence sur son potentiel inhibiteur a été étudiée. Il a tout d'abord exercé son potentiel inhibiteur de l'activité DPP-IV au contact de cellules Caco-2 *in situ*, bien qu'inférieur à celui mesuré en présence de l'enzyme purifiée. L'action de ce peptide a été modulée par l'environnement cellulaire créé par le modèlé *in situ*. Les résultats du test de passage de barrière Caco-2 du peptide synthétique seul ont montré sa rapide dégradation ou métabolisation dans le compartiment apical. Bien qu'initialement identifié comme peptide résistant, il est à supposer que ce sont les peptides présents qui ont favorisé son passage dans le compartiment basolatéral, comme évoqué dans la discussion précédente (2.6.2.1). Plusieurs

facteurs peuvent influencer l'absorption des peptides et des protéines en agissant sur l'ouverture des jonctions serrées comme la viscosité du mucus ou la fluidité membranaire. La co-administration de molécules amphiphiles de bas poids moléculaire a amélioré l'absorption intestinale des peptides mais également des hormones de croissance, de la calcitonine ou de l'insuline, effets qui ont été démontrés lors d'études in vivo (Choonara et al., 2014). Sachant que la présence de la sous-fraction FBC-3 a modifié le coefficient de perméabilité membranaire de la barrière de cellules Caco-2, les séquences peptidiques ont pu favoriser le passage et la survie non seulement du peptide VAAA mais également d'autres peptides. Ces expériences illustrent clairement le fait que l'environnement, et en particulier la présence de certaines séquences, peut significativement influencer la bioactivité et la biodisponibilité d'un peptide. Une population peptidique a été recréée à partir des peptides synthétiques qui, testés seuls, n'ont démontré aucun potentiel inhibiteur. Le mélange de VAAA avec cette population a exercé une inhibition plus importante que le peptide VAAA seul et que le mélange peptidique sans VAAA. Une des hypothèses avancées serait l'existence d'interactions intermoléculaires entre le peptide VAAA et d'autres séquences de nature physico-chimiques semblables aboutissant à la formation d'un pharmacophore, c'est-à-dire un ensemble d'atomes responsable de l'activité biologique de la molécule formée, terme plus généralement employé dans le cadre des interactions ligand-récepteur (Meduru et al., 2016b). La chaîne aliphatique créée par l'enchaînement de résidus d'alanine confère au peptide un caractère plutôt hydrophobe et cette dernière pourrait potentiellement interagir avec des séquences comme KAAVT ou ANVST (index GRAVY de 0,64 et 0,2 respectivement) par des interactions hydrophobes. Les autres peptides pourraient également inhiber ou se fixer sur l'enzyme de manière non spécifique et ainsi améliorer ainsi le potentiel inhibiteur du peptide VAAA. Cette remarque s'applique également d'un point de vue général à l'ensemble des peptides. Les dix peptides synthétiques n'ont montré aucun potentiel inhibiteur testés indépendamment mais leur mélange a montré induire une inhibition non négligeable de l'activité DPP-IV. Le potentiel bioactif d'un mélange peptidique n'est donc peut-être pas uniquement lié aux spécificités structurales de séquences particulières mais peut résulter d'une multitude d'interactions peptide-peptide et/ou peptide-cible qui mériteraient d'être mieux caractérisées.

Dans l'ensemble, ces résultats mettent en avant le fait que les études menées avec des peptides synthétiques isolés d'un digestat protéique sous-estiment les interactions possibles entre la barrière intestinale et son environnement luminal. Ces dernières pourraient être à l'origine des différences observées entre les activités biologiques prédites et observées dans

les études cliniques. Les propriétés anti-diabétiques des hydrolysats de protéines alimentaires chez l'homme n'ont pas pour le moment été associées à une inhibition *in vivo* de l'activité de l'enzyme DPP-IV (Alice B Nongonierma et al., 2016).

## 3.5.2 Mise en évidence de nouvelles séquences et des récepteurs impliqués dans la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales

La digestion GI des protéines libère un mélange complexe d'oligopeptides et d'acides aminés libres qui vont, par différentes actions, engendrer une baisse de la prise alimentaire et générer le sentiment de satiété. La stimulation de la sécrétion des hormones intestinales, notamment CCK et GLP-1, est l'une des actions provoquées par le contenu protéique luminal lorsqu'il est détecté par les cellules entéroendocrines (CEE). Ces cellules sont en contact avec le lumen et représentent le premier niveau de détection et d'intégration de l'information nutritionnelle intestinale. La présence de récepteurs transmembranaires au niveau du pôle apical leur confèrent cette propriété de chimiodétecteur, leur permettant de « sentir » la valeur nutritionnelle du chyme transitant dans l'intestin (Sternini et al., 2008; Janssen and Depoortere, 2013; Rønnestad et al., 2014). Si les récepteurs impliqués dans la détection des acides gras libres ou des glucides ont été à ce jour mieux caractérisés (Reimann et al., 2012), beaucoup d'incertitudes planent autour des récepteurs et voies de signalisation activées par les peptides et acides aminés libres. C'est dans ce contexte que cette partie du travail s'est intéressée aux séquences peptidiques impliquées dans la sécrétion des CCK et du GLP-1 ainsi qu'aux récepteurs potentiellement activés.

## 3.5.2.1 Mise en évidence des peptides et des récepteurs potentiellement impliqués dans la sécrétion des CCK

A partir des fractions isolées pour leurs potentiels bioactifs, la deuxième étape du fractionnement a permis de réduire la taille de la population peptidique et de pouvoir mieux identifier les peptides. A ce jour, quelques séquences peptidiques sont connues dans la littérature pour leur implication dans la stimulation de la sécrétion des CCK. On peut notamment citer le fragment  $\beta$  51-63 riche en résidus d'arginine et issu de la  $\beta$ -conglycine, qui a montré réduire la prise alimentaire chez des rats, corrélée à une augmentation de la sécrétion des CCK (Nishi et al., 2003b). L'action stimulatrice de la sécrétion des CCK de ce fragment a également été démontré dans la cellule STC-1 comme activant le *Calcium Sensing Receptor* (CaSR) (Nakajima et al., 2010). Plusieurs études ont montré que le CasR serait sensible aux acides aminés aromatiques (Conigrave et al., 2000; Wellendorph and Bräuner-Osborne, 2009)

et son activation mènerait à une stimulation de la sécrétion des CCK via une augmentation du calcium intracellulaire (Ballinger and Clark, 1994; Mangel et al., 1995; Wang et al., 2011a). L'étude des peptides provenant du digestat intestinal d'hémoglobine bovine et impliqués dans la stimulation de la sécrétion des CCK n'a pas conduit à l'identification précise de séquences peptidiques bioactives. En revanche, plusieurs sous-fractions ont été isolées pour leur potentiel stimulateur de la sécrétion des CCK par les cellules STC-1. Outre le faible poids moléculaire des séquences identifiées dans ces sous-fractions (majoritairement inférieur à 600 Da), une certaine occurrence des résidus d'acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine (F), le tryptophane (W) ou la tyrosine (Y) a été remarquée dans les séquences identifiées. Les acides aminés aromatiques ne représentent que 8,6 % du contenu total des deux chaînes composant l'hémoglobine bovine. Les populations peptidiques des sousfractions FD-3 et FD-5 contiennent respectivement 6 % et 12 % d'acides aminés aromatiques au sein de leurs séquences et plus d'une séquence sur 2 possède au moins un résidu d'acide aminé aromatique. Des séquences appartenant à la famille des hémorphines et partageant le motif VVYPW ont été identifiées dans la sous-fraction FC-6. Le potentiel stimulateur des acides aminés aromatiques libres a été démontré comme étant couplé à une mobilisation intracellulaire de calcium. C'est notamment le cas pour la phénylalanine (Hira et al., 2008) et le tryptophane (Wang et al., 2011b). Parallèlement, la présence d'un antagoniste du CaSR diminue le potentiel stimulateur de la sécrétion des CCK de divers hydrolysats protéiques. Mais dans cette étude, aucune information n'est donnée sur la composition en acides aminés des séquences peptidiques constituant ces hydrolysats (Nakajima et al., 2012).

A notre connaissance, aucune séquence peptidique comportant des résidus d'acides aminés aromatiques n'a été identifiée pour son effet stimulateur de la sécrétion des CCK. De nombreux travaux ont été réalisés sur les mécanismes impliqués dans cette sécrétion en réponse aux acides aminés libres. Il a été supposé que CaSR agirait comme un détecteur d'acides aminés qui, en réponse, déclencherait une augmentation de calcium intracellulaire activant les voies de signalisation impliquées dans la sécrétion des CCK (Reimann et al., 2012). La présence d'un inhibiteur de CaSR a divisé par 2 la concentration de CCK sécrétée par les cellules STC-1 en présence de deux fractions peptidiques FD et FD-5. Ce récepteur pourrait donc être partiellement impliqué dans les voies de signalisation induite par les peptides présents dans les fractions FD et FD-5. En revanche, la présence de l'inhibiteur n'a pas totalement supprimé la réponse hormonale, ce qui laisse sous-entendre l'implication de plusieurs voies de signalisation dans la sécrétion, induite par les peptides, des CCK. S'il est

prouvé que le récepteur CaSR est bien exprimé par différentes lignées cellulaires dont la lignée STC-1, les voies impliquées suite à son activation pourraient diverger selon le type cellulaire : l'étude de Wang et al. a montré l'implication d'un canal Ca<sup>2+</sup> de type L dans les cellules STC-1 qui n'a pas été observé dans des cellules intestinales primaires de souris (Wang et al., 2011a). Bien que l'effet final soit comparable, la différence des voies d'activation au sein d'un même modèle (ici murin) démontre une fois de plus la limite des modèles actuellement utilisés, dont l'utilisation et l'interprétation des résultats peuvent mener à une sur- ou sous-estimation du potentiel bioactif des peptides identifiés en conditions in vitro. Le transporteur PepT1 a également été suggéré comme acteur indirect impliqué dans la sécrétion des CCK induite par un hydrolysat protéique dans les cellules STC-1 (Liou et al., 2011). Dans le cadre de notre étude, l'utilisation d'un inhibiteur de PepT1 en présence des sous-fractions FD n'a pas donné des résultats exploitables et serait à répéter. La synthèse de certaines séquences peptidiques, ici identifiées et contenant un ou plusieurs résidus d'acides aminés aromatiques, serait utile pour étudier de manière plus approfondie les relations structure-fonction entre la composition en acides aminés et le potentiel stimulateur de la sécrétion des CCK.

## 3.5.2.2 Mise en évidence des peptides et des récepteurs potentiellement impliqués dans la stimulation de la sécrétion du GLP-1

Quatre séquences se sont distinguées pour leur capacité à stimuler la sécrétion de GLP-1 dans les cellules STC-1, à savoir TKAVEH, ANVST, KAAVT et YGAE. Parmi ces séquences, seule KAAVT a été identifiée dans un motif récurrent du peptidome intestinal. Très peu d'études ont reporté les relations existantes entre des peptides spécifiques et la sécrétion de GLP-1. A ce jour, un tétrapeptide à base de résidu de glycine a été identifié comme pouvant induire une augmentation spécifique de calcium intracellulaire dans la cellule entéroendocrine NCI-H716, aboutissant à une augmentation de la sécrétion de GLP-1 (Le Nevé and Daniel, 2011). Des traitements avec quatre peptides Leu-Gly-Gly, Gly-Leu, Gly-Phe et le peptide non hydrolysable Gly-Sar augmentent d'un facteur 1,4 les concentrations de GLP-1 sécrétées par rapport au contrôle dans des cultures primaires intestinales de souris (Diakogiannaki et al., 2013). Cet effet est toutefois largement négligeable face à l'action stimulatrice des peptones observée dans la même étude et augmentant d'un facteur 10 la sécrétion hormonale. La plupart des études se focalisent sur l'effet des acides aminés libres et des peptones sur la stimulation de la sécrétion de GLP-1. Jusqu'à présent, la L-glutamine a montré la meilleure capacité à stimuler *in vitro* la sécrétion de GLP-1 associée à une dépolarisation membranaire

et une augmentation de calcium intracellulaire dans la cellule GLUTag (Reimann et al., 2004; Tolhurst et al., 2011). Cependant, une ingestion de L-glutamine encapsulée par des sujets sains humains n'a engendré aucune augmentation significative des niveaux circulants de GLP-1 (Meek et al., 2016b). Par contre, l'ingestion de L-glutamine par des sujets atteints de diabète de type 2 a permis d'augmenter les niveaux circulants de GLP-1 et a été aussi efficace qu'une ingestion protéique pour rétablir la première phase de sécrétion de l'insuline (Samocha-Bonet et al., 2015). La L-ornithine, un acide aminé basique, a été décrit comme étant capable de stimuler une augmentation de calcium intracellulaire dans les cellules GLUTag, action corrélée à une sécrétion de GLP-1 impliquant le récepteur GPRC6A, membre de la famille C des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) (Oya et al., 2013). De manière générale, les acides aminés libres basiques (L-Arginine ou L-Lysine) sont connus pour être des ligands préférentiels du récepteur GPRC6A (Wellendorph and Bräuner-Osborne, 2009). Les acides aminés L-phénylalanine, L-alanine et L-glutamine ont été également caractérisés pour leur effet stimulateur de la sécrétion de GLP-1 dans des cultures cellulaires d'intestin grêle murin (Pais et al., 2016). Lors de cette étude, les auteurs ont étudié plusieurs peptones, provenant de sources protéiques différentes, pour leurs capacités à stimuler la sécrétion de GLP-1. Ils ont prouvé que l'effet stimulateur observé sur la sécrétion de GLP-1 par les cellules primaires L était associé à une entrée de calcium extracellulaire par des canaux calciques voltage dépendant. Ils soulignent également le fait qu'un mélange peptidique complexe peut activer plusieurs voies de signalisation impliquées dans la sécrétion de GLP-1. Diakogiannaki et al. ont noté l'implication du récepteur CaSR et du transporteur PepT1 dans la détection des peptones au niveau des cellules primaires L, action corrélée à l'augmentation de la concentration de GLP-1 sécrétée (Diakogiannaki et al., 2013). Le transporteur peptidique PepT1 pourrait donc intervenir dans les mécanismes de sécrétion des hormones mais de manière indirecte (Matsumura et al., 2005; Liou et al., 2011). Au cours de ces travaux de thèse, la présence d'un inhibiteur de PepT1 a induit un effet significatif sur la sécrétion hormonale. En présence des peptides bioactifs KAAVT et ANVST et de l'inhibiteur de PepT1, les concentrations de GLP-1 mesurées ont été divisées par plus de 4, atteignant des valeurs non significativement différentes de celle du contrôle. Le transporteur PepT1 serait donc également potentiellement impliqué dans l'activation de la stimulation de la sécrétion hormonale. Les expériences menées n'ont toutefois pas permis de préciser une implication indirecte ou non.

La mise en évidence et l'étude des voies de signalisation impliquées dans la sécrétion du GLP-1 activée par les acides aminés libres et les oligopeptides n'en sont qu'à leurs prémices. Néanmoins, un débat controversé existe toujours à propos de l'importance du rôle joué par les protéines et les acides aminés dans la stimulation de la sécrétion du GLP-1 (Diakogiannaki et al., 2012) probablement renforcé par le manque de résultats pertinents des études cliniques, et les fortes différences observées entre les différentes lignées cellulaires utilisées. Avant ce travail, aucun motif peptidique n'avait été identifié comme responsable de la stimulation de la sécrétion de GLP-1. Les motifs identifiés ici présentent des caractéristiques particulières. Ainsi, KAAVT et TKAVEH possèdent un résidu de lysine localisé au niveau N-terminal de la chaîne peptidique. Les trois séquences KAAVT, TKAVEH et ANVST possèdent toutes un résidu de thréonine localisé à une extrémité N- ou C-terminal. Ces mêmes séquences ainsi que YGAE possèdent toutes un résidu d'alanine. TKAVEH possède également un résidu d'histidine et la L-histidine a été reconnue comme activant des voies de signalisation des récepteurs GLP-1R et CaSR impliqués dans la sécrétion d'insuline glucose dépendante en réponse à une ingestion de repas enrichis en protéines (Leech and Habener, 2003). De même, l'acides aminés libre L-asparagine présent dans la séquence ANVST a montré un effet stimulateur de la sécrétion de GLP-1 au niveau d'intestins grêles isolés de rat, effet supprimé en absence de calcium extracellulaire (Mace et al., 2012). Etant donné le potentiel individuel des acides aminés libres L-lysine et L-asparagine sur la sécrétion de GLP-1 par différentes lignées cellulaires, ils pourraient hypothétiquement conserver leur activité au sein d'une séquence peptidique et leur position au niveau de la chaîne pourrait les rendre plus ou moins accessibles au récepteur impliqué. D'autres peptides testés contiennent également des résidus d'asparagine, d'histidine ou de lysine comme ADKGNV ou HVDPEN mais n'ont pas montré un potentiel de sécrétion du GLP-1. La synthèse de motifs peptidiques plus courts incrémentés progressivement par les côtés N- ou/et C-terminal serait essentielle pour mettre en évidence le déterminant minimal potentiellement impliqué dans la stimulation de la sécrétion de GLP-1. Des études d'arrimage moléculaire entre les récepteurs impliqués et les séquences sélectionnées permettraient de mieux comprendre la nature des interactions de type ligand-récepteur impliquées dans la stimulation de la sécrétion hormonale.

### 3.6 Conclusion

La troisième et dernière partie de ce projet a cherché à préciser l'origine des activités biologiques observées dans le digestat ou les fractions peptidiques. Parmi les séquences isolées de la sous-fraction FBC-3, présentant une double activité biologique (inhibiteur de

l'activité de la DPP-IV/stimulateur de la sécrétion de GLP-1), un peptide a montré un fort potentiel inhibiteur de la DPP-IV et quatre autres un fort potentiel stimulateur de la sécrétion de GLP-1. Parmi les 11 peptides synthétisés, aucun ne semble posséder les deux activités biologiques. A notre connaissance, ces séquences ne sont pas recensées dans la littérature. Le peptide VAAA possède un motif (VA) déjà identifié pour ces propriétés inhibitrices de l'activité de la DPP-IV avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> et un mode d'inhibition très proches de ceux obtenus. Les séquences ou fractions peptidiques impliquées dans la sécrétion des CCK et du GLP-1 possèdent des résidus d'acides aminés qui, testés en tant qu'acides aminés libres, ont montré des propriétés stimulatrices de la sécrétion des hormones et dont les voies de signalisation sont partiellement connues. La synthèse de plusieurs motifs peptidiques, possédant les acides aminés ciblés, en faisant varier leur position dans la chaîne, pourrait permettre d'élucider l'origine de l'activité biologique. Des expériences préliminaires avec un inhibiteur du récepteur CaSR ont laissé sous-entendre que ce récepteur serait impliqué dans la sécrétion des CCK stimulée par la fraction FD et sa sous-fraction FD-5. De même, le transporteur PepT1 pourrait être impliqué dans la sécrétion de GLP-1 stimulée par les peptides KAAVT et ANVST. Ces résultats vont dans le sens de certaines études menées sur la lignée cellulaire STC-1. L'implication directe ou non de ces récepteurs serait à mettre en évidence par des expériences complémentaires plus approfondies. Le couplage avec une approche in silico permettrait d'élucider les relations structure-fonction des peptides bioactifs avec les récepteurs impliqués. Les profondes divergences existant entre les voies de signalisation identifiées chez différentes lignées cellulaires soulignent la nécessité de compléter ces résultats par des études in vivo pour valider et mieux comprendre les modes d'actions de ces fractions ou séquences peptidiques qui conduisent à la sécrétion des hormones intestinales. Enfin, parmi ces cinq séquences bioactives, aucune ne fait partie de la liste des séquences communes entre les peptidomes gastrique et intestinal, dont une certaine activité biologique a été hypothétisée. L'une d'entre elles (KAAVT) provient d'un motif récurrent du peptidome intestinal, motifs partagés par un grand nombre de peptides libérés pendant la digestion.

# **Conclusions et perspectives**

Les aliments ingérés quotidiennement jouent plus qu'un simple rôle nutritif pour notre organisme. Leur dégradation au cours de la digestion conduit à la libération d'un mélange complexe de molécules nutritives et non nutritives capables d'interagir avec l'environnement intestinal et de conduire à l'activation des voies de signalisation pour assurer un équilibre entre prise alimentaire et dépense énergétique. Ainsi, de nombreuses études ont porté sur la compréhension du rôle joué par le tractus GI dans la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, ce que l'on nomme aujourd'hui l'axe intestin-cerveau concerne toutes les voies de communication permanentes établies entre le cerveau et l'intestin, qui renseigne ce dernier sur l'approvisionnement nutritionnel de l'organisme. La barrière intestinale représente avant tout une barrière physique entre les milieux intérieur et extérieur assurant le transport des nutriments et protégeant le milieu intérieur des éventuels pathogènes. Les interactions qu'elle entretient avec le contenu luminal sont à l'origine de nombreux signaux de nature mécanique ou hormonale intervenant notamment dans la régulation à court terme de la balance énergétique. En ce sens, la barrière intestinale constitue l'un des premiers niveaux d'intégration de l'information luminale vers le cerveau. Les protéines alimentaires ont démontré leur capacité à participer à la régulation de cette balance énergétique, en agissant notamment sur les systèmes de régulation de la prise alimentaire ou sur l'amélioration de la régulation de la glycémie dans le cadre du diabète de type 2. Si les mécanismes sous-jacents impliqués commencent à être élucidés, beaucoup de questions restent encore en suspens sur le mode d'action des peptides alimentaires dans ces boucles de régulation. L'objectif principal de ce projet de recherche a été de comprendre comment le processus de digestion GI d'une protéine alimentaire pouvait être à l'origine de peptides potentiellement modulateurs de la régulation de l'homéostasie énergétique. Pour ce faire, ce travail s'est particulièrement intéressé à l'implication de ces peptides dans la modulation de la sécrétion et de l'activité des hormones intestinales CCK et GLP-1. Compte tenu des travaux antérieurs sur les peptides bioactifs menés au sein du laboratoire, l'hémoglobine bovine a été choisie comme protéine alimentaire modèle. Les digestats générés in vitro ont été caractérisés par leurs potentiels bioactifs intéressants envers les activités ciblées. Au terme des étapes de purification, plusieurs séquences peptidiques ont été identifiées comme étant impliquées dans les activités biologiques et de nouvelles hypothèses sur les mécanismes à l'origine de leur bioactivité ont été émises. Une validation du modèle de digestion a été initiée par l'utilisation d'un modèle de digestion dynamique in vitro et par la conception d'une matrice alimentaire visant à reproduire des conditions plus proches de la digestion GI humaine d'un aliment.

#### 1 Modélisation de la digestion GI

La modélisation de la digestion GI est une alternative pratique et peu coûteuse aux expériences in vivo permettant d'appréhender le devenir d'un aliment au cours de sa digestion et de pouvoir étudier ses propriétés fonctionnelles et biologiques. De nombreuses études s'intéressent d'abord à générer les peptides bioactifs à partir des protéines alimentaires par une hydrolyse enzymatique contrôlée puis à simuler une digestion GI in vitro pour évaluer la stabilité de l'activité biologique. Dans le cadre de notre étude, le procédé de digestion GI de l'hémoglobine bovine et sa capacité à générer des mélanges de peptides bioactifs pouvant être impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique ont été étudiés. Le modèle de digestion statique tend à reproduire le plus fidèlement possible les conditions de digestion humaine dans un dispositif pratique et simple d'utilisation mais possède certaines limites. La première concerne l'étape finale de digestion par les enzymes de la bordure en brosse qui n'est pas simulée dans notre protocole (ainsi que dans la majorité des protocoles utilisés) alors que certains auteurs ont souligné l'importance de cette étape en mettant en avant l'impact de ces enzymes sur la population peptidique (Picariello et al., 2010). Ainsi, les enzymes de la bordure en brosse assurent la dernière étape d'hydrolyse des oligopeptides réduisant drastiquement leur taille et optimisant ainsi leur transport au travers de la barrière intestinale. Une autre limite concerne la simulation de la phase intestinale. Le modèle utilisé n'a simulé qu'un seul compartiment intestinal dont les conditions sont censées représenter une moyenne des trois segments intestinaux (duodénum, jéjunum, iléon), présentant eux mêmes des conditions de pH et de temps de transit différents. De plus, les valeurs de pH et les temps de transit varient en fonction du sujet et de son état physiologique (état pré ou postprandial). Par conséquent, des valeurs consensuelles sont fréquemment utilisées dans les protocoles in vitro. La troisième limite du modèle concerne la quantité d'enzymes apportée lors de la digestion. Les concentrations enzymatiques divergent fortement d'un protocole à un autre, pouvant mener à l'obtention de populations peptidiques différentes. Par exemple, le protocole mis en place par le consensus scientifique du COST Infogest suggère un apport de pancréatine plus de 100 fois supérieur à celui utilisé dans ce travail (Minekus et al., 2014). Des expériences préliminaires menées avec ce protocole consensuel ont abouti à des profils chromatographiques intestinaux assez différents de ceux obtenus lors de notre étude. L'utilisation d'une digestion témoin (sans protéines), réalisée dans les conditions décrites par Minekus et al. (2014) a notamment démontré un apport non négligeable de peptides

provenant de la digestion des enzymes et protéines pancréatiques, non observé avec notre protocole et vraisemblablement en partie à l'origine des différences observées entre les profils peptidiques. Bien que les peptides endogènes libérés par digestion GI fassent partie intégrante de l'apport protéique journalier, leur présence rend plus difficile la caractérisation des peptides bioactifs issus de la digestion GI de la protéine ciblée.

Le modèle dynamique nous a apporté des éléments de réponse quant à la validation du modèle statique. En effet, l'utilisation du TIM permet de reproduire plusieurs évènements physiologiques de la digestion, non simulés avec un modèle statique, comme la progression séquentielle du chyme, l'évolution temporelle du pH, la variation de la concentration enzymatique et le phénomène d'absorption. Cependant, les profils peptidiques générés par digestion dynamique d'une protéine modèle comme l'hémoglobine bovine, ont montré de fortes similarités, en termes de poids moléculaires et de propriétés d'hydrophobie, avec ceux établis après utilisation du modèle statique. L'identification des peptides présents dans l'échantillon d'absorption jéjunale a révélé la présence de peptides de poids moléculaire majoritairement inférieurs à 1000 Da dont une dizaine également identifiés dans le peptidome intestinal du modèle statique. Appliquée à une matrice alimentaire, la digestion dynamique a démontré avoir une influence plus importante sur la cinétique de libération des peptides que sur leurs propriétés physico-chimiques. La digestion de la matrice n'a pas remis en question la caractérisation des populations peptidiques issues de l'hémoglobine avec le modèle de digestion statique. Néanmoins, une identification totale des séquences peptidiques serait toutefois à envisager pour caractériser les peptidomes complets et obtenir leur évolution dans chaque compartiment afin comparer les séquences obtenues. Une complexification de la matrice avec des procédés de transformation plus poussés (température, pression) aurait probablement une influence plus prononcée sur la nature des interactions entre la protéine et la matrice, et par conséquent, sur sa digestion GI. La validation du modèle statique passe également par l'étude des activités biologiques des digestats obtenus avec le modèle dynamique et devra être réalisée.

L'établissement de cartographies peptidiques et de cartes de chaleur a permis d'obtenir une empreinte visuelle de l'évolution de la dégradation de la protéine au cours des phases gastrique et intestinale de la digestion. L'hémoglobine, contrairement à d'autres protéines comme la  $\beta$ -lactoglobuline d'origine bovine (Inglingstad et al., 2010), a présenté peu de résistance face à l'action des enzymes GI. Les cartes de chaleur ont mis en évidence la conservation de certains motifs d'acides aminés au sein de plusieurs séquences, nommés ici
motifs récurrents. Ces derniers mettent ainsi en avant la spécificité d'action des enzymes GI lors de la digestion d'une protéine et contribuent à générer une empreinte caractéristique de la digestion GI de l'hémoglobine. L'origine des motifs récurrents pourrait être liée à leur confirmation tridimensionnelle au sein de la chaîne protéique mais ceci reste à confirmer. La carte de chaleur de la population jéjunale issue de la digestion dynamique a presenté de fortes similarités avec la carte de chaleur du peptidome intestinal. Ceci apporte ainsi un élément de réponse supplémentaire quant à la validation du protocole de digestion statique.

#### 2 Techniques analytiques appliquées à la caractérisation des peptides

Plusieurs techniques analytiques ont été utilisées au cours de ce projet afin de caractériser les peptidomes résultant de la digestion GI de l'hémoglobine. La chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en mode tandem ont joué un rôle central dans cette étude mais ont également révélé toutes les difficultés liées à la caractérisation d'une population peptidique complexe. La démarche adoptée ici est courante dans le domaine de la peptidomique : les étapes de fractionnement s'enchaînent pour aboutir à quelques fractions bioactives composées de peptides dont les séquences sont identifiées par spectrométrie de masse en mode tandem. La bioactivité est ensuite validée par la synthèse des motifs peptidiques. Cette démarche, souvent longue, coûteuse en solvant et à faible rendement, ne s'est pas toujours révélée particulièrement sélective. Dans le cas présent, les fractions isolées contiennent encore plus d'une trentaine de séquences peptidiques uniques et auraient nécessité une étape de fractionnement supplémentaire afin d'isoler au mieux les peptides responsables de l'activité biologique ciblée. De manière générale, les hydrolysats bioactifs contiennent une abondance de peptides de bas poids moléculaire que les techniques analytiques actuellement utilisées ne sont pas toujours en mesure de séparer et de caractériser. La chromatographie d'exclusion stérique a assuré une séparation assez grossière des peptides en dessous de 1000 Da et ne peut, à ce titre, constituer qu'une étape préliminaire de séparation dans une démarche de caractérisation d'un hydrolysat complexe. Lors de notre étude, le fractionnement de la SEC aurait pu être amélioré en augmentant le nombre de fractions récoltées. Mais cela aurait eu pour conséquence limitante l'obtention d'une plus faible quantité de matière par fraction récoltée. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles technologies, en particulier de nouvelles phases stationnaires, spécialement conçues pour la séparation des petites molécules au sein d'un mélange complexe. L'utilisation de la séparation en phase inverse a été une méthode pratique et rapide pour caractériser les profils peptidiques, contrôler leur répétabilité

et assurer une nouvelle étape de fractionnement. En revanche, l'optimisation des conditions de séparation n'a pas permis d'isoler efficacement tous les peptides, compte tenu de la complexité des échantillons analysés. Le couplage de techniques chromatographiques complémentaires telles que la phase inverse et la phase HILIC s'est révélé efficace pour caractériser des échantillons à faible abondance peptidique lors des expériences de passage *in vitro* de la barrière intestinale. Cette approche a permis d'augmenter considérablement le nombre de séquences identifiées et d'obtenir une meilleure caractérisation des peptides capables de passer au travers de la barrière intestinale reproduite par une monocouche de cellules. La combinaison de plusieurs techniques séparatives fondées sur différentes propriétés physico-chimiques de séparation (charge, hydrophobie) constituerait donc une approche plus efficace pour l'identification d'un peptidome complexe et permettrait de surmonter les limites de chaque technique analytique. L'utilisation d'autres techniques séparatives telles que l'électrophorèse capillaire ou la chromatographie en fluide supercritique pourrait également apporter de nouvelles informations sur la caractérisation des peptidomes (Tognarelli et al., 2009 ; Ibáñez et al., 2013).

La spectrométrie de masse en mode tandem a été la technique utilisée dans ce projet pour identifier les séquences peptidiques et a été couplée à la bioinformatique pour le traitement des données. Technique analytique actuellement très répandue dans le domaine de l'agroalimentaire, sa démocratisation a permis d'augmenter considérablement la compréhension du devenir de l'aliment au cours de sa digestion GI et cela grâce à sa forte résolution, sa sensibilité et sa facilité d'utilisation. Elle permet d'avoir accès aux données qualitatives et quantitatives d'un échantillon mais ses capacités peuvent se trouver limiter en cas d'analyses de matrices complexes. L'efficacité des techniques séparatives conditionne fortement la qualité de l'identification des peptides par spectrométrie de masse en mode tandem. En effet, l'analyse de mélanges peptidiques peut se trouver limitée par le phénomène de suppression d'ionisation, lié à la co-élution de peptides, ce qui donne une sous-estimation de l'abondance de la population analysée. De plus, la résolution du spectromètre utilisé est confrontée à la forte complexité des échantillons et à un nombre de données considérable à traiter dans un temps très court. Ces limites ont été parfaitement illustrées au cours de notre étude. Bien qu'en utilisant une technologie de haute résolution, la caractérisation du peptidome intestinal a évincé la majeure partie des peptides en dessous de 700 Da. Suite à plusieurs étapes de fractionnement de ce digestat intestinal, de nombreuses séquences entre 300 et 700 Da ont pourtant été identifiées dans le cadre de recherche de peptides bioactifs suite à des analyses

avec une technologie MS-MS de plus faible résolution. La préparation de l'échantillon conditionne fortement la qualité de l'analyse et ne peut se limiter à la présence d'une étape séparative en amont de la spectrométrie de masse. Elle devra donc être améliorée dans une démarche de caractérisation du peptidome. Malgré l'excellente performance de la spectrométrie de masse, une caractérisation qualitative et quantitative exhaustive d'un peptidome reste encore inaboutie, et ce, malgré des développements constants. Au-delà des contraintes techniques, l'utilisation de la bio-informatique, incontournable pour traiter le nombre considérable de spectres générés, présente elle aussi ses propres limites. Les logiciels de protéomique sont généralement utilisés par défaut pour l'identification des séquences peptidiques et nécessiteraient de profondes améliorations pour s'adapter aux spécificités des peptides, comme la petite taille des séquences et l'obtention de spectres de fragmentation moins informatifs. La majorité des séquences en dessous de 400 Da n'a pas été identifiée par la recherche dans les bases de données, cela étant dû à la limite d'identification du logiciel de protéomique. Bien qu'une multitude de séquences ait été identifiée au cours de ces travaux, aucune quantification n'a pu être réalisée. La quantification aurait constitué un avantage majeur à mettre en lien avec les activités biologiques. En conclusion, la spectrométrie de masse offre de multiples avantages pour la compréhension du peptidome GI mais son utilisation doit se faire judicieusement en y associant de nouvelles stratégies analytiques et bioinformatiques pour aboutir à une caractérisation quantitative et qualitative des peptidomes

Au-delà des contraintes liées à chaque technique analytique employée, l'introduction d'un étalon interne n'a pas été réalisée dans le cadre de notre démarche expérimentale. Le dosage par étalonnage interne repose sur l'ajout d'une molécule connue, l'étalon interne, à une quantité connue dans les échantillons et qui sert de référence pendant l'analyse. Le dosage se fait de façon relative par rapport à cette molécule et permet de s'affranchir des variations des paramètres expérimentaux (instrument, utilisateur, etc..). L'étalon interne doit répondre à des critères précis comme avoir les mêmes propriétés physico-chimiques que les analytes, ne pas être présent dans l'échantillon à analyser et être facilement distinguable des analytes. Au vu de la complexité peptidique des digestats étudiés en termes de séquence et de poids moléculaire, le véritable problème a principalement reposé sur la définition même de ce potentiel étalon interne, à savoir comment définir une séquence peptidique qui reflèterait les caractéristiques de plusieurs centaines d'autres tout en s'en distinguant. Une telle démarche aurait permis de mesurer plus fidèlement la reproductibilité des expériences de digestion et

d'analyses. Le développement d'un tel standard serait également un atout à envisager pour la suite de ce travail.

#### 3 Peptides alimentaires et régulation de l'homéostasie énergétique

Au cours de ce travail, les digestats de l'hémoglobine bovine ont été caractérisés in vitro pour leur capacité à stimuler la sécrétion des CCK et du GLP-1 ainsi qu'à inhiber l'activité de la DPP-IV, et ce, de manière comparable aux hydrolysats obtenus à partir d'autres sources protéiques animales recensés dans la littérature. Replacée dans un contexte physiologique, la digestion de l'hémoglobine pourrait tout à fait participer aux mécanismes de régulation de l'homéostasie énergétique. La phase intestinale a, pour les trois activités étudiées, augmenté significativement le potentiel bioactif des digestats. La comparaison des concentrations des CCK et du GLP-1 mesurées après contact des cellules avec la protéine non hydrolysée (salive) et le digestat gastrique, n'a montré aucune différence significative. L'action des enzymes intestinales a potentialisé la population peptidique générée en phase gastrique. Une expérience préliminaire ne simulant que la phase intestinale de la digestion de l'hémoglobine a produit des digestats capables de stimuler la sécrétion des hormones étudiées à des niveaux comparables mais différents de ceux obtenus dans des conditions classiques (estomac puis intestin). Les profils chromatographiques de ce type de digestat indiquaient clairement une dégradation de la protéine native mais différaient de ceux obtenus classiquement. L'ensemble de ces résultats montrent que la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales n'est pas uniquement imputable à un effet « peptide » mais résulte de la nature des séquences peptidiques. Au final, ces résultats posent à la fois la question de l'intérêt de la phase gastrique de la digestion des protéines alimentaires et la question de la capacité des enzymes intestinales, à partir de peptides ou de protéines, à générer des peptides bioactifs. Il serait intéressant d'approfondir l'étude de ces digestats intestinaux dont les résultats pourraient permettre d'expliquer partiellement les causes de l'augmentation de la sécrétion d'hormones intestinales dont le GLP-1 observée chez des sujets obèses à la suite d'une opération de gastric bypass (Meek et al., 2016a). La problématique de ce travail de thèse a donc été d'identifier les peptides responsables des activités biologiques étudiées. Actuellement, très peu de séquences peptidiques ont été caractérisées pour leurs potentiels stimulateurs de la sécrétion des CCK et du GLP-1. Dans cette étude, quatre peptides (synthétisés au terme de la purification) provenant du digestat intestinal et demeurant intactes après le passage d'une barrière de cellules Caco-2, ont été capables de stimuler la sécrétion du GLP-1. Leurs

séquences partagent des résidus d'acides aminés communs, qui, testés en tant qu'acides aminés libres, ont également démontré in vitro un potentiel stimulateur du GLP-1. La même tendance a été observée pour les séquences stimulatrices de la sécrétion des CCK : la plupart possèdent des résidus d'acides aminés aromatiques qui sont connus pour stimuler in vitro la sécrétion de ces hormones. Pour ces fractions, la prochaine étape consistera à synthétiser les séquences identifiées et à étudier leur potentiel stimulateur de la sécrétion des CCK. La stabilité de ces peptides pourra également être évaluée sur un modèle de monocouche de cellules Caco-2. Enfin, un seul peptide capable de traverser la barrière intestinale et d'inhiber fortement l'activité de la DPP-IV a été identifié. Ramené aux cartographies peptidiques et aux cartes de chaleur, une seule séquence provient d'un motif récurrent du peptidome intestinal. Elle est donc potentiellement présente dans un grand nombre de peptides sous forme de crypte et pourrait être libérée lors du contact avec la barrière intestinale. Au cours de ce travail, l'observation de séquences communes entre les peptidomes gastrique et intestinal avait mené à l'hypothèse d'une activité biologique qui n'a pas été confirmé pour le moment. Etant donné la multitude d'activités biologiques attribuées aux peptides, il se peut que ces séquences exercent un potentiel bioactif mais dans un cadre différent que celui de la régulation de l'homéostasie énergétique.

La sécrétion des hormones intestinales en réponse à des oligopeptides semblerait impliquer des récepteurs appartenant, pour la plupart, à la famille des RCPG. Cette famille de récepteurs est notamment devenue une des cibles thérapeutiques du diabète de type 2 en impliquant, entre autres, les récepteurs aux incrétines (Reimann et Gribble, 2015), mettant ainsi en exergue le rôle central qu'ils occupent dans la régulation de la sécrétion hormonale et donc de l'homéostasie énergétique. L'activation de ces récepteurs passerait par des interactions entre le récepteur et l'oligopeptide dont la nature n'a pas été encore spécifiquement étudiée. De plus, plusieurs voies parallèles semblent être impliquées comme celles utilisant le transporteur PepT1 ou des canaux voltage dépendant qui pourraient être activées simultanément par plusieurs oligopeptides, rendant l'identification des peptides bioactifs plus complexes. Des analyses d'arrimage moléculaire entre les récepteurs et les peptides identifiés pourraient permettre de préciser la nature des interactions peptide-récepteur et de mieux comprendre le déterminant de l'activité biologique. Enfin, il est également probable que le stimulus ne provienne pas d'une mais de plusieurs séquences activant simultanément différentes voies aboutissant de manière synergique à l'activité biologique. Il a été remarqué dans plusieurs études comme dans la nôtre, que l'utilisation de différents inhibiteurs de récepteurs en

présence des peptides testés n'a jamais complètement supprimé la réponse hormonale. Plusieurs voies de signalisation seraient donc activées par les peptides et sont encore à l'heure actuelle assez peu caractérisées. Au-delà de leur action directe sur la sécrétion des hormones, les peptides bioactifs pourraient également influencer leur synthèse en modulant l'expression des gènes et/ou interagir directement avec les récepteurs des hormones intestinales en jouant le rôle d'agoniste, provoquant les effets satiétogènes associés. D'autres voies impliquées dans la régulation de la prise alimentaire comme les récepteurs opioïdes ou d'autres hormones intestinales comme le peptide YY n'ont pas été explorées au cours de ces travaux, leur étude aurait pu apporter des informations complémentaires très intéressantes. Notre étude ne s'est finalement limitée qu'à une petite partie des voies de signalisation potentielles ne prenant en compte qu'un seul paramètre à la fois; les résultats obtenus mériteraient bien sûr d'être confirmés par une étude *in vivo*.

Seul une séquence peptidique (VAAA) issue du digestat intestinal de l'hémoglobine bovine a démontré in vitro sa capacité à inhiber l'activité de la DPP-IV. Identifiée comme étant résistante, au sein d'une fraction bioactive, au passage d'une monocouche de cellules Caco-2, elle a montré être rapidement dégradée, déposée seule au contact du même modèle cellulaire, et dans ce cas ne pas franchir intacte la barrière. La présence d'autres peptides peut moduler la perméabilité de la barrière cellulaire, ce qui a été remarqué lors de l'expérience de passage d'une fraction peptidique au travers de la monocouche de cellules Caco-2, et favoriser le passage du peptide VAAA ainsi que d'autres. De même, un mélange équimolaire avec d'autres peptides synthétiques a positivement influencé son potentiel inhibiteur de la DPP-IV. Ces résultats ont mis en évidence que l'activité biologique d'un peptide pouvait être modulée par son environnement. En tant que molécules biochimiques, les peptides sont capables d'interagir entre eux ou avec les molécules environnantes par des liaisons non covalentes. Hypothétiquement, il pourrait être envisagé que les peptides non identifiés comme étant bioactifs, mais présents en solution, puissent tout de même interagir avec l'enzyme à des sites différents du site actif et ainsi améliorer l'action du peptide inhibiteur. De même, des interactions inter-peptide pourraient mener à la formation d'un complexe moléculaire qui pourrait lui-même exercer une action inhibitrice de l'enzyme. Ainsi, l'activité inhibitrice de la DPP-IV, et plus généralement d'une enzyme, ne serait pas seulement déterminée par quelques séquences mais plutôt par un ensemble d'interactions complexes peptide-enzyme et même peptide-peptide.

D'un point de vue général, l'origine de l'activité biologique d'un peptide ne demeure encore que partiellement définie. Si plusieurs déterminants de la structure peptidique ont été actuellement caractérisés pour certaines activités biologiques, un grand nombre de séquences ne correspondent pas toujours à ces critères. D'autres activités biologiques comme le potentiel stimulateur de la sécrétion des CCK et du GLP-1 n'ont toujours pas été corrélées avec les propriétés physico-chimiques de la chaîne peptidique car les récepteurs associés dans l'activation des voies de signalisation ne sont pas encore pleinement identifiés. Enfin, les activités biologiques observées restent à être confirmer par des études *in vivo* qui peuvent souvent mener à des résultats contradictoires de ceux démontrés *in vitro*. Il faut également considérer que les peptides libérés lors de la digestion n'agissent probablement pas de manière isolée mais que les effets observés résultent d'une multitude d'actions exercées à différents niveaux du tractus GI, rendant ainsi l'interprétation plus délicate.

### 4 Perspectives

La digestion statique *in vitro* de la protéine modèle ayant été bien caractérisée, l'étude de la digestion dynamique devra se poursuivre en établissant les cartographies peptidiques des différents compartiments au cours du temps. Une utilisation intégrée et plus poussée des outils analytiques, statistiques et bioinformatiques devra être réalisée afin d'améliorer la représentation et l'interprétation des peptidomes, ce qui permettra d'obtenir une empreinte plus aboutie de l'évolution de la digestion de la protéine. L'étude des potentiels bioactifs des prélèvements de la digestion dynamique serait à mener et à comparer avec les résultats obtenus au cours de ces travaux. Idéalement, ce travail devrait être finalisé par une digestion *in vivo* en utilisant, par exemple, le modèle mini porc canulé. Il permettrait de suivre l'évolution de la digestion de l'évolution de la digestion evec les mêmes stratégies analytiques que celles employées dans cette thèse et de la comparer avec celle observée en modèle statique.

L'utilisation d'approches *in silico* apporterait de nouvelles informations intéressantes sur les relations structure-fonction des peptides identifiés, qui serait à corréler avec les activités biologiques recherchées. Elle permettrait d'améliorer la compréhension des facteurs déterminants pour l'activité biologique d'une séquence peptidique. Cette démarche pourrait être appliquée dans le cadre de la caractérisation des peptides stimulant les sécrétions hormonales, en visant spécifiquement les RCPG connus et le transporteur PepT1. Un travail plus approfondi sur l'implication de ces récepteurs serait à mener en relation avec les séquences peptidiques identifiées, étant donné que très peu de connaissances existent sur les

interactions peptide-récepteur en lien avec la sécrétion des CCK et du GLP-1. La synthèse peptidique d'autres motifs issus des différentes fractions bioactives permettrait de continuer le travail de recherche de nouveaux peptides bioactifs et d'incrémenter les banques existantes. Concernant l'activité DPP-IV, il serait intéressant d'approfondir le fait que des peptides, qui n'inhibent pas la DPP-IV, peuvent exercer, une fois mélangés, un potentiel inhibiteur. La nature des interactions mises en jeu serait à déterminer. Enfin, les activités biologiques des digestats des matrices protéiques seraient à déterminer et permettraient de prendre en compte la présence d'autres macronutriments potentiellement impliqués dans la stimulation de la sécrétion des CCK et du GLP-1. L'influence de la bile devra également être étudiée.

Afin d'appréhender le rôle des peptides dans la régulation de l'homéostasie énergétique et leur devenir lors de l'absorption intestinale, deux modèles cellulaires distincts ont été utilisés au cours de ces travaux. Cependant, les phénomènes étudiés sont tous les deux localisés au niveau de la barrière intestinale dans des conditions physiologiques. Il serait alors intéressant de concevoir un seul modèle cellulaire plus complexe qui simulerait plusieurs paramètres caractéristiques de la barrière intestinale qui influencent à la fois le transport des peptides et leurs interactions avec les CEE. Ceci pourrait être atteint en développant des modèles de coculture de cellules épithéliales et entéroendocrines en essayant de respecter les proportions cellulaires physiologiques, en incorporant des cellules sécrétrices de mucus (telle que la lignée HT29-MTX) et enfin, en modélisant le microbiote intestinal par la reproduction d'une flore microbienne. Le microbiote a récemment démontré être impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, certaines souches de Lactobacilles présentent une action modulatrice de la sécrétion des CCK et du GLP-1 par les cellules STC-1 (Belguesmia et al., 2016). Ce type de modèle aboutirait à un modèle bien plus représentatif de la barrière intestinale qu'une simple monocouche cellulaire. Couplé avec un procédé de digestion GI in vitro en amont, il formerait un véritable système intégré pour l'étude des rôles des peptides générés au cours de la digestion GI dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

Enfin, un travail similaire pourrait être mené avec d'autres sources protéiques, notamment d'origine végétale, afin de comparer les digestions en termes de peptidomes et d'activités biologiques, et donc de pouvoir *in fine* réussir à caractériser une protéine alimentaire pour son potentiel santé.

# **Références bibliographiques**

- Adibi, S., 1997. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: Biology and function. Gastroenterology 113, 332–340. doi:10.1016/S0016-5085(97)70112-4
- Agyei, D., Danquah, M.K., 2011. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. Biotechnol. Adv. 29, 272–277. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.001
- Ahmadieh, H., Azar, S.T., 2014. The role of incretin-based therapies in prediabetes: A review. Prim. Care Diabetes. doi:10.1016/j.pcd.2014.02.005
- Alpert, A.J., 1990. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. J. Chromatogr. A 499, 177–196. doi:10.1016/S0021-9673(00)96972-3
- Anand, B.K., Brobeck, J.R., 1951. Hypothalamic Control of Food Intake in Rats and Cats. Yale J. Biol. Med. 24, 123–140.
- Artursson, P., Palm, K., Luthman, K., 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport1. Adv. Drug Deliv. Rev., Special issue dedicated to Dr. Eric Tomlinson, Advanced Drug Delivery Reviews, A Selection of the Most Highly Cited Articles, 1991-1998 46, 27–43. doi:10.1016/S0169-409X(00)00128-9
- Baggerman, G., Verleyen, P., Clynen, E., Huybrechts, J., De Loof, A., Schoofs, L., 2004. Peptidomics. J. Chromatogr. B, Peptide Separation and Analysis 803, 3–16. doi:10.1016/j.jchromb.2003.07.019
- Bai, J.P.F., 1994. Distribution of Brush-Border Peptidases Along the Rat Intestine. Pharm. Res. 11.
- Ballinger, A.B., Clark, M.L., 1994. Cholecystokinin and satiety. Gastroenterology 107, 1913– 1914.
- Barbé, F., Le Feunteun, S., Rémond, D., Ménard, O., Jardin, J., Henry, G., Laroche, B., Dupont, D., 2014. Tracking the in vivo release of bioactive peptides in the gut during digestion: Mass spectrometry peptidomic characterization of effluents collected in the gut of dairy matrix fed mini-pigs. Food Res. Int., Special issue on 3rd Foodomics Conference: Foodomics a new comprehensive approach to food and nutrition. 63, Part B, 147–156. doi:10.1016/j.foodres.2014.02.015
- Batterham, R.L., Bloom, S.R., 2003. The gut hormone peptide YY regulates appetite. Ann. N. Y. Acad. Sci. 994, 162–168.
- Batterham, R.L., Cohen, M.A., Ellis, S.M., Le Roux, C.W., Withers, D.J., Frost, G.S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2003. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. N. Engl. J. Med. 349, 941–948. doi:10.1056/NEJMoa030204
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., Cone, R.D., Bloom, S.R., 2004. Physiology: Does gut hormone PYY3–36 decrease food intake in rodents? (reply). Nature 430. doi:10.1038/nature02666
- Batterham, R.L., Cummings, D.E., 2016. Mechanisms of Diabetes Improvement Following Bariatric/Metabolic Surgery. Diabetes Care 39, 893–901. doi:10.2337/dc16-0145
- Bauchart, C., Morzel, M., Chambon, C., Mirand, P.P., Reynès, C., Buffière, C., Rémond, D., 2007. Peptides reproducibly released by in vivo digestion of beef meat and trout flesh in pigs. Br. J. Nutr. 98, 1187–1195. doi:10.1017/S0007114507761810
- Bauer, P.V., Hamr, S.C., Duca, F.A., 2015. Regulation of energy balance by a gut-brain axis and involvement of the gut microbiota. Cell. Mol. Life Sci. 73, 737–755. doi:10.1007/s00018-015-2083-z
- Beck, I.T., 1973. The role of pancreatic enzymes in digestion. Am. J. Clin. Nutr. 26, 311–325.
- Béduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F., Lamprecht, A., 2014. A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable

permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. Eur. J. Pharm. Biopharm. 87, 290–298. doi:10.1016/j.ejpb.2014.03.017

- Belguesmia, Y., Domenger, D., Caron, J., Dhulster, P., Ravallec, R., Drider, D., Cudennec, B., 2016. Novel probiotic evidence of lactobacilli on immunomodulation and regulation of satiety hormones release in intestinal cells. J. Funct. Foods 24, 276–286. doi:10.1016/j.jff.2016.04.014
- Belitz, H.-D., Grosch, W., Schieberle, P., 2009. Amino acids, Peptides, Proteins, in: Food Chemistry. Springer, pp. 8–92.
- Bellinger, L.L., Bernardis, L.L., 2002. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. Physiol. Behav. 76, 431–442.
- Bensaïd, A., Tomé, D., Gietzen, D., Even, P., Morens, C., Gausseres, N., Fromentin, G., 2002. Protein is more potent than carbohydrate fro reducing appetite in rats. Physiol. Behav. 75, 577–582.
- Bentouimou, N., Leray, V., Zerbib, F., Blottière, H.M., Galmiche, J.P., Bruley des Varannes, S., 1995. [Expression of the gene of cholecystokinin. Demonstration from duodenal biopsies in man]. Gastroentérologie Clin. Biol. 19, 659–663.
- Berglund, M.M., Hipskind, P.A., Gehlert, D.R., 2003. Recent Developments in Our Understanding of the Physiological Role of PP-Fold Peptide Receptor Subtypes. Exp. Biol. Med. 228, 217–244.
- Berthoud, H.-R., 2008. The vagus nerve, food intake and obesity. Regul. Pept., Neuroendocrinology regulation of food intake 149, 15–25. doi:10.1016/j.regpep.2007.08.024
- Biemann, K., 1988. Contributions of mass spectrometry to peptide and protein structure. Biomed. Environ. Mass Spectrom. 16, 99–111.
- Boots, J.W.P., 2006. Protein hydrolysate enriched in peptides inhibiting dpp-iv and their use.
- Bordoni, A., Laghi, L., Babini, E., Di Nunzio, M., Picone, G., Ciampa, A., Valli, V., Danesi, F., Capozzi, F., 2014. The foodomics approach for the evaluation of protein bioaccessibility in processed meat upon in vitro digestion. ELECTROPHORESIS 35, 1607–1614. doi:10.1002/elps.201300579
- Bornhorst, G.M., Singh, R.P., 2014. Gastric Digestion In Vivo and In Vitro: How the Structural Aspects of Food Influence the Digestion Process. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 5, 111–132. doi:10.1146/annurev-food-030713-092346
- Bourlieu, C., Ménard, O., Bouzerzour, K., Mandalari, G., Macierzanka, A., Mackie, A.R., Dupont, D., 2014. Specificity of Infant Digestive Conditions: Some Clues for Developing Relevant In Vitro Models. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 54, 1427–1457. doi:10.1080/10408398.2011.640757
- Bray, G.A., 2000. Afferent signals regulating food intake. Proc. Nutr. Soc. 59, 373–384. doi:10.1017/S0029665100000422
- Brennan, I.M., Luscombe-Marsh, N.D., Seimon, R.V., Otto, B., Horowitz, M., Wishart, J.M., Feinle-Bisset, C., 2012. Effects of fat, protein, and carbohydrate and protein load on appetite, plasma cholecystokinin, peptide YY, and ghrelin, and energy intake in lean and obese men. AJP Gastrointest. Liver Physiol. 303, G129–G140. doi:10.1152/ajpgi.00478.2011
- Brubaker, P.L., Anini, Y., 2003. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. Can. J. Physiol. Pharmacol. 81, 1005–1012. doi:10.1139/y03-107
- Burcelin, R., Thorens, B., European Club for the study of GLP-1 (EuCSGLP-1), 2013. Incretins: what is known, new and controversial in 2013? Diabetes Metab. 39, 89–93. doi:10.1016/j.diabet.2013.02.005

- Capriotti, A.L., Caruso, G., Cavaliere, C., Samperi, R., Ventura, S., Zenezini Chiozzi, R., Laganà, A., 2015. Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. J. Food Compos. Anal. 44, 205–213. doi:10.1016/j.jfca.2015.08.007
- Caspary, W.F., 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. Am J Clin Nutr 55, 2998–3085.
- Chaudhri, O.B., Wynne, K., Bloom, S.R., 2008. Can Gut Hormones Control Appetite and Prevent Obesity? Diabetes Care 31, S284–S289. doi:10.2337/dc08-s269
- Choi, S., Lee, M., Shiu, A.L., Yo, S.J., Aponte, G.W., 2007a. Identification of a protein hydrolysate responsive G protein-coupled receptor in enterocytes. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 292, G98–G112. doi:10.1152/ajpgi.00295.2006
- Choi, S., Lee, M., Shiu, A.L., Yo, S.J., Halldén, G., Aponte, G.W., 2007b. GPR93 activation by protein hydrolysate induces CCK transcription and secretion in STC-1 cells. Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol. 292, G1366–G1375. doi:10.1152/ajpgi.00516.2006
- Choonara, B.F., Choonara, Y.E., Kumar, P., Bijukumar, D., du Toit, L.C., Pillay, V., 2014. A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. Biotechnol. Adv. 32, 1269–1282. doi:10.1016/j.biotechadv.2014.07.006
- Chung, K.-M., Cheng, J.-H., Suen, C.-S., Huang, C.-H., Tsai, C.-H., Huang, L.-H., Chen, Y.-R., Wang, A.H.-J., Jiaang, W.-T., Hwang, M.-J., Chen, X., 2010. The dimeric transmembrane domain of prolyl dipeptidase DPP-IV contributes to its quaternary structure and enzymatic activities. Protein Sci. 19, 1627–1638. doi:10.1002/pro.443
- Cifuentes, A., 2009. Food analysis and Foodomics. J. Chromatogr. A, Advanced Separation Methods in Food Analysis 1216, 7109. doi:10.1016/j.chroma.2009.09.018
- Cohen, M., Fruitier-Arnaudin, I., Piot, J.M., 2004. Hemorphins: substrates and/or inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: Hemorphins N-terminus sequence influence on the interaction between hemorphins and DPPIV. Biochimie 86, 31–37. doi:10.1016/j.biochi.2003.11.001
- Conigrave, A.D., Hampson, D.R., 2010. Broad-spectrum amino acid-sensing class C Gprotein coupled receptors: Molecular mechanisms, physiological significance and options for drug development. Pharmacol. Ther. 127, 252–260. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.04.007
- Conigrave, A.D., Mun, H.-C., Brennan, S.C., 2007. Physiological significance of L-amino acid sensing by extracellular Ca2+-sensing receptors. Biochem. Soc. Trans. 35, 1195–1198. doi:10.1042/BST0351195
- Conigrave, A.D., Quinn, S.J., Brown, E.M., 2000. I-Amino acid sensing by the extracellular Ca2+-sensing receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 4814–4819. doi:10.1073/pnas.97.9.4814
- Cordier-Bussat, M., Bernard, C., Haouche, S., Roche, C., Abello, J., Chayvialle, J.-A., Cuber, J.-C., 1997. Peptones Stimulate Cholecystokinin Secretion and Gene Transcription in the Intestinal Cell Line STC-1. Endocrinology 138, 1137–1144. doi:10.1210/endo.138.3.5023
- Cordier-Bussat, M., Bernard, C., Levenez, F., Klages, N., Laser-Ritz, B., Philippe, J., Chayvialle, J.A., Cuber, J.C., 1998. Peptones stimulate both the secretion of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 and the transcription of the proglucagon gene. Diabetes 47, 1038–1045.
- Cristino, L., Becker, T., Di Marzo, V., 2014. Endocannabinoids and energy homeostasis: An update. BioFactors 40, 389–397. doi:10.1002/biof.1168

- Cudennec, B., Balti, R., Ravallec, R., Caron, J., Bougatef, A., Dhulster, P., Nedjar, N., 2015. In vitro evidence for gut hormone stimulation release and dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of protein hydrolysate obtained from cuttlefish (Sepia officinalis) viscera. Food Res. Int. 78, 238–245. doi:10.1016/j.foodres.2015.10.003
- Cudennec, B., Fouchereau-Peron, M., Ferry, F., Duclos, E., Ravallec, R., 2012. In vitro and in vivo evidence for a satiating effect of fish protein hydrolysate obtained from blue whiting (Micromesistius poutassou) muscle. J. Funct. Foods 4, 271–277. doi:10.1016/j.jff.2011.12.003
- Cudennec, B., Ravallec-Plé, R., Courois, E., Fouchereau-Peron, M., 2008. Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. Food Chem. 111, 970–975. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.016
- Cummings, D.E., Overduin, J., 2007. Gastrointestinal regulation of food intake. J. Clin. Invest. 117, 13–23. doi:10.1172/JCI30227
- Dallas, D.C., Guerrero, A., Parker, E.A., Robinson, R.C., Gan, J., German, J.B., Barile, D., Lebrilla, C.B., 2015. Current peptidomics: Applications, purification, identification, quantification, and functional analysis. Proteomics 15, 1026–1038. doi:10.1002/pmic.201400310
- Daniel, H., 2004. Molecular and Integrative Physiology of Intestinal Peptide Transport. Annu. Rev. Physiol. 66, 361–384. doi:10.1146/annurev.physiol.66.032102.144149
- Darcel, N.P., Liou, A.P., Tomé, D., Raybould, H.E., 2005. Activation of Vagal Afferents in the Rat Duodenum by Protein Digests Requires PepT1. J. Nutr. 135, 1491–1495.
- Darmoul, D., Lacasa, M., Baricault, L., Marguet, D., Sapin, C., Trotot, P., Barbat, A., Trugnan, G., 1992. Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocytelike colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. Cloning of the complete human coding sequence and changes of dipeptidyl peptidase IV mRNA levels during cell differentiation. J. Biol. Chem. 267, 4824–4833.
- Dave, L.A., Hayes, M., Mora, L., Montoya, C.A., Moughan, P.J., Rutherfurd, S.M., 2016a. Gastrointestinal Endogenous Protein-Derived Bioactive Peptides: An in Vitro Study of Their Gut Modulatory Potential. Int. J. Mol. Sci. 17, 482. doi:10.3390/ijms17040482
- Dave, L.A., Hayes, M., Moughan, P.J., Rutherfurd, S.M., 2016b. Novel Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory and Antioxidant Peptides Derived from Human Gastrointestinal Endogenous Proteins. Int. J. Pept. Res. Ther. 22, 355–369. doi:10.1007/s10989-016-9515-y
- de Lartigue, G., Dimaline, R., Varro, A., Raybould, H., de la Serre, C.B., Dockray, G.J., 2010. Cocaine and amphetamine regulated transcript mediates the actions of cholecystokinin on rat vagal afferent neurons. Gastroenterology 138, 1479–1490. doi:10.1053/j.gastro.2009.10.034
- de Souza Rocha, T., Hernandez, L.M.R., Chang, Y.K., de Mejía, E.G., 2014. Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (Vigna unguiculata) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV. Food Res. Int. 64, 799–809. doi:10.1016/j.foodres.2014.08.016
- De Vadder, F., Gautier-Stein, A., Mithieux, G., 2013a. Satiety and the role of μ-opioid receptors in the portal vein. Curr. Opin. Pharmacol., Gastrointestinal Endocrine and metabolic diseases 13, 959–963. doi:10.1016/j.coph.2013.09.003
- De Vadder, F., Gautier-Stein, A., Mithieux, G., 2013b. [Opioid receptors associated with portal vein regulate a gut-brain neural circuitry limiting food intake]. Médecine Sci. MS 29, 31–33. doi:10.1051/medsci/2013291010
- Dedhia, P.H., Bertaux-Skeirik, N., Zavros, Y., Spence, J.R., 2016. Organoid Models of Human Gastrointestinal Development and Disease. Gastroenterology 150, 1098–1112. doi:10.1053/j.gastro.2015.12.042

- Denis, S., Sayd, T., Georges, A., Chambon, C., Chalancon, S., Santé-Lhoutellier, V., Blanquet-Diot, S., 2016. Digestion of cooked meat proteins is slightly affected by age as assessed using the dynamic gastrointestinal TIM model and mass spectrometry. Food Funct. 7, 2682–2691. doi:10.1039/C6FO00120C
- Diakogiannaki, E., Gribble, F.M., Reimann, F., 2012. Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. Physiol. Behav., Proceedings from the 2011 meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior (SSIB) 106, 387–393. doi:10.1016/j.physbeh.2011.12.001
- Diakogiannaki, E., Pais, R., Tolhurst, G., Parker, H.E., Horscroft, J., Rauscher, B., Zietek, T., Daniel, H., Gribble, F.M., Reimann, F., 2013. Oligopeptides stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in mice through proton-coupled uptake and the calcium-sensing receptor. Diabetologia 56, 2688–2696. doi:10.1007/s00125-013-3037-3
- Diepvens, K., Häberer, D., Westerterp-Plantenga, M., 2008. Different proteins and biopeptides differently affect satiety and anorexigenic/orexigenic hormones in healthy humans. Int. J. Obes. 2005 32, 510–518. doi:10.1038/sj.ijo.0803758
- Ding, L., Wang, L., Yu, Z., Zhang, T., Liu, J., 2016. Digestion and absorption of an egg white ACE-inhibitory peptide in human intestinal Caco-2 cell monolayers. Int. J. Food Sci. Nutr. 67, 111–116. doi:10.3109/09637486.2016.1144722
- Dockray, G.J., 2010. How the gut sends signals in response to food. Int. Dairy J., US/Ireland Functional Foods Conference Dietary Optimization of Gut Function and the Microbiota 20, 226–230. doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.013
- Dockray, G.J., 2009. Cholecystokinin and gut-brain signalling. Regul. Pept. 155, 6-10. doi:10.1016/j.regpep.2009.03.015
- Dougkas, A., Östman, E., 2016. Protein-Enriched Liquid Preloads Varying in Macronutrient Content Modulate Appetite and Appetite-Regulating Hormones in Healthy Adults. J. Nutr. 146, 637–645. doi:10.3945/jn.115.217224
- Drucker, D.J., 2006. The biology of incretin hormones. Cell Metab. 3, 153–165. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.004
- Drucker, D.J., 2003. Enhancing Incretin Action for the Treatment of Type 2 Diabetes. Diabetes Care 26, 2929–2940. doi:10.2337/diacare.26.10.2929
- Drucker, D.J., Nauck, M.A., 2006. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. The Lancet 368, 1696–1705. doi:10.1016/S0140-6736(06)69705-5
- Drucker, D.J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W.L., Habener, J.F., 1987. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 3434–3438.
- Dupont, D., Mandalari, G., Molle, D., Jardin, J., Léonil, J., Faulks, R.M., Wickham, M.S.J., Mills, E.N.C., Mackie, A.R., 2010. Comparative resistance of food proteins to adult and infant in vitro digestion models. Mol. Nutr. Food Res. 54, 767–780. doi:10.1002/mnfr.200900142
- Duraffourd, C., De Vadder, F., Goncalves, D., Delaere, F., Penhoat, A., Brusset, B., Rajas, F., Chassard, D., Duchampt, A., Stefanutti, A., Gautier-Stein, A., Mithieux, G., 2012.
  Mu-Opioid Receptors and Dietary Protein Stimulate a Gut-Brain Neural Circuitry Limiting Food Intake. Cell 150, 377–388. doi:10.1016/j.cell.2012.05.039
- Dyson, H.J., Wright, P.E., 1991. Defining Solution Conformations of Small Linear Peptides. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 20, 519–538. doi:10.1146/annurev.bb.20.060191.002511
- Dziuba, J., Iwaniak, A., Minkiewicz, P., 2003. Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides. Polimery 48, 50–53.

- Egerod, K.L., Engelstoft, M.S., Grunddal, K.V., Nøhr, M.K., Secher, A., Sakata, I., Pedersen, J., Windeløv, J.A., Füchtbauer, E.-M., Olsen, J., Sundler, F., Christensen, J.P., Wierup, N., Olsen, J.V., Holst, J.J., Zigman, J.M., Poulsen, S.S., Schwartz, T.W., 2012. A Major Lineage of Enteroendocrine Cells Coexpress CCK, Secretin, GIP, GLP-1, PYY, and Neurotensin but Not Somatostatin. Endocrinology 153, 5782–5795. doi:10.1210/en.2012-1595
- Ekmekcioglu, C., 2002. A physiological approach for preparing and conducting intestinal bioavailibility studies using experimental systems. Food Chem. 76, 225–230.
- Elliott, R.M., Morgan, L.M., Tredger, J.A., Deacon, S., Wright, J., Marks, V., 1993. Glucagon-like peptide-1(7–36)amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. J. Endocrinol. 138, 159–166. doi:10.1677/joe.0.1380159
- Enders, G., 2015. Le charme discret de l'intestin: tout sur un organe mal aimé, Éditions Actes Sud. ed.
- Engel, M., Hoffmann, T., Manhart, S., Heiser, U., Chambre, S., Huber, R., Demuth, H.-U., Bode, W., 2006. Rigidity and Flexibility of Dipeptidyl Peptidase IV: Crystal Structures of and Docking Experiments with DPIV. J. Mol. Biol. 355, 768–783. doi:10.1016/j.jmb.2005.11.014
- Engel, M., Hoffmann, T., Wagner, L., Wermann, M., Heiser, U., Kiefersauer, R., Huber, R., Bode, W., Demuth, H.-U., Brandstetter, H., 2003. The crystal structure of dipeptidyl peptidase IV (CD26) reveals its functional regulation and enzymatic mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. 100, 5063–5068. doi:10.1073/pnas.0230620100
- Erdmann, K., Cheung, B.W.Y., Schröder, H., 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. J. Nutr. Biochem. 19, 643–654. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.11.010
- Erondu, N., Gantz, I., Musser, B., Suryawanshi, S., Mallick, M., Addy, C., Cote, J., Bray, G., Fujioka, K., Bays, H., Hollander, P., Sanabria-Bohórquez, S.M., Eng, W., Långström, B., Hargreaves, R.J., Burns, H.D., Kanatani, A., Fukami, T., MacNeil, D.J., Gottesdiener, K.M., Amatruda, J.M., Kaufman, K.D., Heymsfield, S.B., 2006. Neuropeptide Y5 receptor antagonism does not induce clinically meaningful weight in overweight and obese adults. Cell Metab. 4, 275-282. loss doi:10.1016/j.cmet.2006.08.002
- Escudero, E., Sentandreu, M.A., Arihara, K., Toldrá, F., 2010a. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Generated from in Vitro Gastrointestinal Digestion of Pork Meat. J. Agric. Food Chem. 58, 2895–2901. doi:10.1021/jf904204n
- Escudero, E., Sentandreu, M.Á., Toldrá, F., 2010b. Characterization of Peptides Released by in Vitro Digestion of Pork Meat. J. Agric. Food Chem. 58, 5160–5165. doi:10.1021/jf904535m
- Ezcurra, M., Reimann, F., Gribble, F.M., Emery, E., 2013. Molecular mechanisms of incretin hormone secretion. Curr. Opin. Pharmacol., Gastrointestinal • Endocrine and metabolic diseases 13, 922–927. doi:10.1016/j.coph.2013.08.013
- Fasano, A., 2012. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1258, 25–33. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06538.x
- Ferranti, P., Nitride, C., Nicolai, M.A., Mamone, G., Picariello, G., Bordoni, A., Valli, V., Di Nunzio, M., Babini, E., Marcolini, E., Capozzi, F., 2014. In vitro digestion of Bresaola proteins and release of potential bioactive peptides. Food Res. Int. 63, 157–169. doi:10.1016/j.foodres.2014.02.008
- Ferruzza, S., Rossi, C., Scarino, M.L., Sambuy, Y., 2012. A protocol for in situ enzyme assays to assess the differentiation of human intestinal Caco-2 cells. Toxicol. In Vitro, The LIINTOP project: Optimisation of liver and intestine in vitro models for

pharmacokinetics and pharmacodynamics studies 26, 1247–1251. doi:10.1016/j.tiv.2011.11.007

- Fichtenbaum, A., Schmid, R., Mitulović, G., 2016. Direct injection of HILIC fractions on the reversed phase trap column improves protein identification rates for salivary proteins. Electrophoresis. doi:10.1002/elps.201600222
- Field, B.C.T., Wren, A.M., Cooke, D., Bloom, P.S.R., 2012. Gut Hormones as Potential New Targets for Appetite Regulation and the Treatment of Obesity. Drugs 68, 147–163. doi:10.2165/00003495-200868020-00002
- Figlewicz, D.P., 2003. Adiposity signals and food reward: expanding the CNS roles of insulin and leptin. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 284, R882-892. doi:10.1152/ajpregu.00602.2002
- Finan, B., Clemmensen, C., Müller, T.D., 2015. Emerging opportunities for the treatment of metabolic diseases: Glucagon-like peptide-1 based multi-agonists. Mol. Cell. Endocrinol., Endocrine control of energy homeostasis 418, Part 1, 42–54. doi:10.1016/j.mce.2015.07.003
- Foltz, M., Ansems, P., Schwarz, J., Tasker, M.C., Lourbakos, A., Gerhardt, C.C., 2008. Protein Hydrolysates Induce CCK Release from Enteroendocrine Cells and Act as Partial Agonists of the CCK1 Receptor. J. Agric. Food Chem. 56, 837–843. doi:10.1021/jf072611h
- Foster, M.T., Song, C.K., Bartness, T.J., 2010. Hypothalamic Paraventricular Nucleus Lesion Involvement in the Sympathetic Control of Lipid Mobilization. Obes. Silver Spring Md 18, 682–689. doi:10.1038/oby.2009.345
- Froetschel, M.A., Azain, M.J., Edwards, G.L., Barb, C.R., Amos, H.E., 2001. Opioid and cholecystokinin antagonists alleviate gastric inhibition of food intake by premeal loads of casein in meal-fed rats. J. Nutr. 131, 3270–3276.
- Furlund, C.B., Ulleberg, E.K., Devold, T.G., Flengsrud, R., Jacobsen, M., Sekse, C., Holm, H., Vegarud, G.E., 2013. Identification of lactoferrin peptides generated by digestion with human gastrointestinal enzymes. J. Dairy Sci. 96, 75–88. doi:10.3168/jds.2012-5946
- Furness, J.B., Rivera, L.R., Cho, H.-J., Bravo, D.M., Callaghan, B., 2013. The gut as a sensory organ. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 1010, 729–740. doi:10.1038/nrgastro.2013.180
- Gardner, M.L.G., 1988. Gastrointestinal Absorption of Intact Proteins. Annu. Rev. Nutr. 8, 329–350. doi:10.1146/annurev.nu.08.070188.001553
- Gass, J., Harmit, V., Hofmann, A.F., Gray, G.M., Khosla, C., 2007. The enhancement of dietary protein digestion by conjugated bile acids. Gastroenterology 133, 16–23.
- Gault, V.A., O'Harte, F.P.M., Flatt, P.R., 2003. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP): anti-diabetic and anti-obesity potential? Neuropeptides 37, 253–263. doi:10.1016/j.npep.2003.09.002
- Geraedts, M.C.P., Troost, F.J., Fischer, M.A.J.G., Edens, L., Saris, W.H.M., 2011. Direct induction of CCK and GLP-1 release from murine endocrine cells by intact dietary proteins. Mol. Nutr. Food Res. 55, 476–484. doi:10.1002/mnfr.201000142
- Gevrey, J.-C., Cordier-Bussat, M., Némoz-Gaillard, E., Chayvialle, J.-A., Abello, J., 2002. Co-requirement of Cyclic AMP- and Calcium-dependent Protein Kinases for Transcriptional Activation of Cholecystokinin Gene by Protein Hydrolysates. J. Biol. Chem. 277, 22407–22413.
- Gevrey, J.-C., Malapel, M., Philippe, J., Mithieux, G., Chayvialle, J.-A., Abello, J., Cordier-Bussat, M., 2004. Protein hydrolysates stimulate proglucagon gene transcription in intestinal endocrine cells via two elements related to cyclic AMP response element. Diabetologia 47, 926–936. doi:10.1007/s00125-004-1380-0

- Glahn, R., 2009. The use of Caco-2 cells in defining nutrient bioavailibility, in: Designing Functional Foods. Woodhead Publishing, pp. 340–357.
- Graaf, C. de, Blom, W.A., Smeets, P.A., Stafleu, A., Hendriks, H.F., 2004. Biomarkers of satiation and satiety. Am. J. Clin. Nutr. 79, 946–961.
- Graves, P.R., Haystead, T.A.J., 2002. Molecular Biologist's Guide to Proteomics. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66, 39–63. doi:10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002
- Groschwitz, K.R., Hogan, S.P., 2009. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. J. Allergy Clin. Immunol. 124, 3–20. doi:10.1016/j.jaci.2009.05.038
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Alric, M., 2012. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. Trends Biotechnol. 30.
- Guillausseau, P.-J., Meas, T., Virally, M., Laloi-Michelin, M., Médeau, V., Kevorkian, J.-P., 2008. Abnormalities in insulin secretion in type 2 diabetes mellitus. Diabetes Metab., Incretins: a new approach 34, Supplement 2, S43–S48. doi:10.1016/S1262-3636(08)73394-9
- Guillon, F., Champ, M., 2000. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. Food Res. Int. 33, 233–245. doi:10.1016/S0963-9969(00)00038-7
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., 2013. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. Ther. Adv. Gastroenterol. 6, 295–308. doi:10.1177/1756283X13482996
- Guo, L., Harnedy, P.A., Zhang, L., Li, B., Zhang, Z., Hou, H., Zhao, X., FitzGerald, R.J., 2015. In vitro assessment of the multifunctional bioactive potential of Alaska pollock skin collagen following simulated gastrointestinal digestion. J. Sci. Food Agric. 95, 1514–1520. doi:10.1002/jsfa.6854
- Hall, W.L., Millward, D.J., Long, S.J., Morgan, L.M., 2003. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. Br. J. Nutr. 89, 239–248. doi:10.1079/BJN2002760
- Hameed, S., Dhillo, W.S., Bloom, S.R., 2009. Gut hormones and appetite control. Oral Dis. 15, 18–26. doi:10.1111/j.1601-0825.2008.01492.x
- Hamuro, Y., Coales, S.J., Molnar, K.S., Tuske, S.J., Morrow, J.A., 2008. Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 1041–1046. doi:10.1002/rcm.3467
- Harnedy, P.A., O'Keeffe, M.B., FitzGerald, R.J., 2015. Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga Palmaria palmata. Food Chem. 172, 400–406. doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.083
- Harscoat-Schiavo, C., Nioi, C., Ronat-Heit, E., Paris, C., Vanderesse, R., Fournier, F., Marc, I., 2012. Hydrophilic properties as a new contribution for computer-aided identification of short peptides in complex mixtures. Anal. Bioanal. Chem. 403, 1939– 1949. doi:10.1007/s00216-012-5987-6
- Hartmann, R., Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. Curr. Opin. Biotechnol., Plant biotechnology / Food biotechnology 18, 163–169. doi:10.1016/j.copbio.2007.01.013
- Hatanaka, T., Inoue, Y., Arima, J., Kumagai, Y., Usuki, H., Kawakami, K., Kimura, M., Mukaihara, T., 2012. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. Food Chem. 134, 797–802. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.183
- Hayakawa, E., Menschaert, G., De Bock, P.-J., Luyten, W., Gevaert, K., Baggerman, G., Schoofs, L., 2013. Improving the identification rate of endogenous peptides using

electron transfer dissociation and collision-induced dissociation. J. Proteome Res. 12, 5410–5421. doi:10.1021/pr400446z

- Hayes, M.R., Covasa, M., 2005. CCK and 5-HT act synergistically to suppress food intake through simultaneous activation of CCK-1 and 5-HT3 receptors. Peptides 26, 2322–2330. doi:10.1016/j.peptides.2005.03.045
- Hedley, A.A., Ogden, C.L., Johnson, C.L., Carroll, M.D., Curtin, L.R., Flegal, K.M., 2004. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. JAMA 291, 2847–2850. doi:10.1001/jama.291.23.2847
- Hégarat, L.L., Huet, S., Fessard, V., 2012. A co-culture system of human intestinal Caco-2 cells and lymphoblastoid TK6 cells for investigating the genotoxicity of oral compounds. Mutagenesis 27, 631–636. doi:10.1093/mutage/ges028
- Heijboer, A.C., Frans, A., Lomecky, M., Blankenstein, M.A., 2011. Analysis of glucagon-like peptide 1; what to measure? Clin. Chim. Acta 412, 1191–1194. doi:10.1016/j.cca.2011.03.010
- Herrmann, C., Göke, R., Richter, G., Fehmann, H.C., Arnold, R., Göke, B., 1995. Glucagonlike peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. Digestion 56, 117–126.
- Hira, T., Mochida, T., Miyashita, K., Hara, H., 2009. GLP-1 secretion is enhanced directly in the ileum but indirectly in the duodenum by a newly identified potent stimulator, zein hydrolysate, in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 663–671.
- Hira, T., Nakajima, S., Eto, Y., Hara, H., 2008. Calcium-sensing receptor mediates phenylalanine-induced cholecystokinin secretion in enteroendocrine STC-1 cells. FEBS J. 275, 4620–4626. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06604.x
- Horner, K., Drummond, E., Brennan, L., 2016. Bioavailability of milk protein-derived bioactive peptides: a glycaemic management perspective. Nutr. Res. Rev. 29, 91–101. doi:10.1017/S0954422416000032
- Howell, S., Kenny, A.J., Turner, A.J., 1992. A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. Biochem. J. 284, 595–601.
- Hsieh, C.H., Wang, T.Y., Hung, C.C., Chen, M.C., Hsu, K.C., 2015. Improvement of glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats by Atlantic salmon skin gelatin hydrolysate as the dipeptidyl-peptidase IV inhibitor. Food Funct. 6, 1887– 1892. doi:10.1039/c5fo00124b
- Huang, S.-L., Hung, C.-C., Jao, C.-L., Tung, Y.-S., Hsu, K.-C., 2014. Porcine skin gelatin hydrolysate as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. J. Funct. Foods 11, 235–242. doi:10.1016/j.jff.2014.09.010
- Huang, S.-L., Jao, C.-L., Ho, K.-P., Hsu, K.-C., 2012. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. Peptides 35, 114–121. doi:10.1016/j.peptides.2012.03.006
- Huda, M.S.B., Wilding, J.P.H., Pinkney, J.H., 2006. Gut peptides and the regulation of appetite. Obes. Rev. 7, 163–182. doi:10.1111/j.1467-789X.2006.00245.x
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Burn, P., Lee, F., 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. Cell 88, 131–141.
- Hutchison, A.T., Feinle-Bisset, C., Fitzgerald, P.C.E., Standfield, S., Horowitz, M., Clifton, P.M., Luscombe-Marsh, N.D., 2015. Comparative effects of intraduodenal whey protein hydrolysate on antropyloroduodenal motility, gut hormones, glycemia, appetite, and energy intake in lean and obese men. Am. J. Clin. Nutr. 102, 1323–1331. doi:10.3945/ajcn.115.114538

- Ibáñez, C., Simó, C., García-Cañas, V., Cifuentes, A., Castro-Puyana, M., 2013. Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresismass spectrometry in Foodomics: A review. Anal. Chim. Acta 802, 1–13. doi:10.1016/j.aca.2013.07.042
- Idris, I., Donnelly, R., 2007. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitors: a major new class of oral antidiabetic drug. Diabetes Obes. Metab. 9, 153–165. doi:10.1111/j.1463-1326.2007.00705.x
- Inglingstad, R.A., Devold, T.G., Eriksen, E.K., Holm, H., Jacobsen, M., Liland, K.H., Rukke, E.O., Vegarud, G.E., 2010. Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. Dairy Sci. Technol. 90, 549–563. doi:10.1051/dst/2010018
- Irwin, N., Flatt, P.R., 2013. Enteroendocrine hormone mimetics for the treatment of obesity and diabetes. Curr. Opin. Pharmacol., Gastrointestinal • Endocrine and metabolic diseases 13, 989–995. doi:10.1016/j.coph.2013.09.009
- Irwin, N., Frizelle, P., Montgomery, I.A., Moffett, R.C., O'Harte, F.P.M., Flatt, P.R., 2012. Beneficial effects of the novel cholecystokinin agonist (pGlu-Gln)-CCK-8 in mouse models of obesity/diabetes. Diabetologia 55, 2747–2758. doi:10.1007/s00125-012-2654-6
- Ishikawa, Y., Hira, T., Inoue, D., Harada, Y., Hashimoto, H., Fujii, M., Kadowaki, M., Hara, H., 2015. Rice protein hydrolysates stimulate GLP-1 secretion, reduce GLP-1 degradation, and lower the glycemic response in rats. Food Funct. 6, 2525–2534. doi:10.1039/C4FO01054J
- Jakubowicz, D., Froy, O., 2013. Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and Type 2 diabetes. J. Nutr. Biochem. 24, 1–5. doi:10.1016/j.jnutbio.2012.07.008
- Janssen, P., Pottel, H., Vos, R., Tack, J., 2011. Endogenously released opioids mediate mealinduced gastric relaxation via peripheral mu-opioid receptors. Aliment. Pharmacol. Ther. 33, 607–614. doi:10.1111/j.1365-2036.2010.04557.x
- Janssen, S., Depoortere, I., 2013. Nutrient sensing in the gut: new roads to therapeutics? Trends Endocrinol. Metab., Special Issue: Neuroendocrine control of appetite 24, 92– 100. doi:10.1016/j.tem.2012.11.006
- Jao, C.-L., Hung, C.-C., Tung, Y.-S., Lin, P.-Y., Chen, M.-C., Hsu, K.-C., 2015. The development of bioactive peptides from dietary proteins as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the management of type 2 diabetes. BioMedicine 5. doi:10.7603/s40681-015-0014-9
- Javier Moreno, F., 2007. Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allerginicity. Biomed. Pharmacother. 61, 50–60.
- Javier Moreno, F., Mellon, F.A., Wickham, M.S.J., Bottrill, A.R., Clare Mills, E.N., 2005. Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. FEBS J. 272, 341–352.
- Jefferson, J.J., Leung, C.L., Liem, R.K.H., 2004. Plakins: Goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 542–553. doi:10.1038/nrm1425
- Jiang, C., Han, S., Chen, T., Chen, J., 2012. 3D-QSAR and docking studies of arylmethylamine-based DPP IV inhibitors. Acta Pharm. Sin. B, Diabetes and Obesity 2, 411–420. doi:10.1016/j.apsb.2012.06.007
- Jin, Y., Yu, Y., Qi, Y., Wang, F., Yan, J., Zou, H., 2016. Peptide profiling and the bioactivity character of yogurt in the simulated gastrointestinal digestion. J. Proteomics 141, 24– 46. doi:10.1016/j.jprot.2016.04.010

- João, A.L., Reis, F., Fernandes, R., 2016. The incretin system ABCs in obesity and diabetes novel therapeutic strategies for weight loss and beyond. Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes. 17, 553–572. doi:10.1111/obr.12421
- Kalantzi, L., Goumas, K., Kalioras, V., Abrahamsson, B., Dressman, J.B., Reppas, C., 2006. Characterization of the Human Upper Gastrointestinal Contents Under Conditions Simulating Bioavailibility/Bioequivalence Studies. Pharm. Res. 23, 165–176.
- Kanatani, A., Mashiko, S., Murai, N., Sugimoto, N., Ito, J., Fukuroda, T., Fukami, T., Morin, N., MacNeil, D.J., Van der Ploeg, L.H.T., Saga, Y., Nishimura, S., Ihara, M., 2000.
  Role of the Y1 Receptor in the Regulation of Neuropeptide Y-Mediated Feeding: Comparison of Wild-Type, Y1 Receptor-Deficient, and Y5 Receptor-Deficient Mice. Endocrinology 141, 1011–1016. doi:10.1210/endo.141.3.7387
- Kazanjian, K.K., Towfigh, S., McFadden, D.W., 2003. Peptide YY exhibits a mitogenic effect on pancreatic cells while improving acute pancreatitis in vitro. J. Surg. Res. 114, 95– 99. doi:10.1016/S0022-4804(03)00218-X
- Keesey, R.E., Powley, T.L., 2008. BODY ENERGY HOMEOSTASIS. Appetite 51, 442–445. doi:10.1016/j.appet.2008.06.009
- Kiela, P.R., Ghishan, F.K., 2016. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 30, 145–159. doi:10.1016/j.bpg.2016.02.007
- Kim, P.S., Baldwin, R.L., 1990. Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins. Annu. Rev. Biochem. 59, 631–660. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.003215
- Kitts, D., Weiler, K., 2003. Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. Curr. Pharm. Des. 9, 1309–1323. doi:10.2174/1381612033454883
- Klok, M.D., Jakobsdottir, S., Drent, M.L., 2007. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. Obes. Rev. 8, 21–34. doi:10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x
- Koch, M., Varela, L., Kim, J.G., Kim, J.D., Hernández-Nuño, F., Simonds, S.E., Castorena, C.M., Vianna, C.R., Elmquist, J.K., Morozov, Y.M., Rakic, P., Bechmann, I., Cowley, M.A., Szigeti-Buck, K., Dietrich, M.O., Gao, X.-B., Diano, S., Horvath, T.L., 2015. Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. Nature 519, 45–50. doi:10.1038/nature14260
- Könner, A.C., Klöckener, T., Brüning, J.C., 2009. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: Targeting the arcuate nucleus and beyond. Physiol. Behav., Proceedings from the 2008 Meeting of the Society for the Study of Ingestive BehaviorSSIB 2008Proceedings from the 2008 Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior 97, 632–638. doi:10.1016/j.physbeh.2009.03.027
- Kopf-Bolanz, K.A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R., Egger, L., 2014. Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. Int. Dairy J. 35, 130–138. doi:10.1016/j.idairyj.2013.10.012
- Kopf-Bolanz, K.A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R., Egger, L., 2012. Validation of an In Vitro Digestive System for Studying Macronutrient Decomposition in Humans. J. Nutr. 142, 245–250. doi:10.3945/jn.111.148635
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. Int. Dairy J., 4th NIZO Dairy Conference - Prospects for Health, Well-being and Safety 4th NIZO Dairy Conference - Prospects for Health, Well-being and Safety 16, 945–960. doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.012
- La Barre, J., 1932. Sur les possibilités d'un traitement du diabète par l'incrétine. Bull Acad R Med Belg 12:, 620–634.

- Lacroix, I.M.E., Li-Chan, E.C.Y., 2014. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. Peptides 54, 39–48. doi:10.1016/j.peptides.2014.01.002
- Lacroix, I.M.E., Li-Chan, E.C.Y., 2013. Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and  $\alpha$ -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. J. Agric. Food Chem. 61, 7500–7506. doi:10.1021/jf401000s
- Lacroix, I.M.E., Li-Chan, E.C.Y., 2012a. Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. J. Funct. Foods 4, 403–422. doi:10.1016/j.jff.2012.01.008
- Lacroix, I.M.E., Li-Chan, E.C.Y., 2012b. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. Int. Dairy J. 25, 97–102. doi:10.1016/j.idairyj.2012.01.003
- Lahrichi, S.L., Affolter, M., Zolezzi, I.S., Panchaud, A., 2013. Food Peptidomics: Large scale analysis of small bioactive peptides — A pilot study. J. Proteomics, Special Issue: New Horizons and Applications for Proteomics [EuPA 2012] 88, 83–91. doi:10.1016/j.jprot.2013.02.018
- Lairon, D., 2009. Digestion and absorption of lipids, in: Designing Functional Foods. pp. 66–89.
- Larsen, P.J., Vrang, N., Petersen, P.C., Kristensen, P., 2000. Chronic intracerebroventricular administration of recombinant CART(42-89) peptide inhibits and causes weight loss in lean and obese Zucker (fa/fa) rats. Obes. Res. 8, 590–596. doi:10.1038/oby.2000.76
- Latorre, R., Sternini, C., De Giorgio, R., Greenwood-Van Meerveld, B., 2016. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. Neurogastroenterol. Motil. 28, 620–630. doi:10.1111/nmo.12754
- Layman, D.K., Boileau, R.A., Erickson, D.J., Painter, J.E., Shiue, H., Sather, C., Christou, D.D., 2003. A reduced ratio of dietary carbohydrate to protein improves body composition and blood lipid profiles during weight loss in adult women. J. Nutr. 133, 411–417.
- Le Maux, S., Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2015a. Improved short peptide identification using HILIC–MS/MS: Retention time prediction model based on the impact of amino acid position in the peptide sequence. Food Chem. 173, 847–854. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.104
- Le Maux, S., Nongonierma, A.B., Murray, B., Kelly, P.M., FitzGerald, R.J., 2015b. Identification of short peptide sequences in the nanofiltration permeate of a bioactive whey protein hydrolysate. Food Res. Int. 77, Part 3, 534–539. doi:10.1016/j.foodres.2015.09.012
- Le Maux, S., Nongonierma, A.B., Murray, B., Kelly, P.M., FitzGerald, R.J., 2015c. Identification of short peptide sequences in the nanofiltration permeate of a bioactive whey protein hydrolysate. Food Res. Int. 77, Part 3, 534–539. doi:10.1016/j.foodres.2015.09.012
- Le Nevé, B., Daniel, H., 2011. Selected tetrapeptides lead to a GLP-1 release from the human enteroendocrine cell line NCI-H716. Regul. Pept. 167, 14–20. doi:10.1016/j.regpep.2010.10.010
- Leech, C.A., Habener, J.F., 2003. Regulation of Glucagon-Like Peptide-1 Receptor and Calcium-Sensing Receptor Signaling by 1-Histidine. Endocrinology 144, 4851–4858. doi:10.1210/en.2003-0498
- Lejeune, M.P., Westerterp, K.R., Adam, T.C., Luscombe-Marsh, N.D., Westerterp-Plantenga, M.S., 2006. Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber. Am. J. Clin. Nutr. 83, 89–94.

- Li-Chan, E.C., 2015. Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. Curr. Opin. Food Sci., Food Chemistry and Biochemistry Food Bioprocessing 1, 28–37. doi:10.1016/j.cofs.2014.09.005
- Li-Chan, E.C.Y., Hunag, S.-L., Jao, C.-L., Ho, K.-P., Hsu, K.-C., 2012a. Peptides derived from atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. J. Agric. Food Chem. 60, 973–978. doi:10.1021/jf204720q
- Li-Chan, E.C.Y., Hunag, S.-L., Jao, C.-L., Ho, K.-P., Hsu, K.-C., 2012b. Peptides Derived from Atlantic Salmon Skin Gelatin as Dipeptidyl-peptidase IV Inhibitors. J. Agric. Food Chem. 60, 973–978. doi:10.1021/jf204720q
- Liddle, R.A., 1997. Cholecystokinin Cells. Annu. Rev. Physiol. 59, 221–242. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.221
- Liddle, R.A., Carter, J.D., McDonald, A.R., 1988. Dietary regulation of rat intestinal cholecystokinin gene expression. J. Clin. Invest. 81, 2015–2019. doi:10.1172/JCI113552
- Liddle, R.A., Green, G.M., Conrad, C.K., Williams, J.A., 1986. Proteins but not amino acids, carbohydrates, or fats stimulate cholecystokinin secretion in the rat. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 251, G243–G248.
- Lim, G.E., Brubaker, P.L., 2006. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell The View From Within. Diabetes 55, S70–S77. doi:10.2337/db06-S020
- Liou, A.P., Chavez, D.I., Espero, E., Hao, S., Wank, S.A., Raybould, H.E., 2011. Protein hydrolysate-induced cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells is indirectly mediated by the intestinal oligopeptide transporter PepT1. Am. J. Physiol. -Gastrointest. Liver Physiol. 300, G895–G902. doi:10.1152/ajpgi.00521.2010
- Liu, H., Wang, P., Wang, F., 2011. [An experimental study on intestinal epithelial barrier dysfunction induced by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha]. Zhonghua Shao Shang Za Zhi Zhonghua Shaoshang Zazhi Chin. J. Burns 27, 145–149.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods San Diego Calif 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lorey, S., Stöckel-Maschek, A., Faust, J., Brandt, W., Stiebitz, B., Gorrell, M.D., Kähne, T., Mrestani-Klaus, C., Wrenger, S., Reinhold, D., Ansorge, S., Neubert, K., 2003. Different modes of dipeptidyl peptidase IV (CD26) inhibition by oligopeptides derived from the N-terminus of HIV-1 Tat indicate at least two inhibitor binding sites. Eur. J. Biochem. 270, 2147–2156. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03568.x
- Ma, J., Stevens, J.E., Cukier, K., Maddox, A.F., Wishart, J.M., Jones, K.L., Clifton, P.M., Horowitz, M., Rayner, C.K., 2009. Effects of a Protein Preload on Gastric Emptying, Glycemia, and Gut Hormones After a Carbohydrate Meal in Diet-Controlled Type 2 Diabetes. Diabetes Care 32, 1600–1602. doi:10.2337/dc09-0723
- Mace, O.J., Schindler, M., Patel, S., 2012. The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. J. Physiol. 590, 2917– 2936. doi:10.1113/jphysiol.2011.223800
- Mackie, A., Macierzanka, A., 2010. Colloidal aspects of protein digestion. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 15, 102–108. doi:10.1016/j.cocis.2009.11.005
- Maldonado-Valderrama, J., Wilde, P., Macierzanka, A., Mackie, A., 2011. The role of bile salts in digestion. Adv. Colloid Interface Sci., Food Colloids 2010 On the Road from Interfaces to Consumers 165, 36–46. doi:10.1016/j.cis.2010.12.002
- Maljaars, P.W.J., Peters, H.P.F., Mela, D.J., Masclee, A.A.M., 2008. Ileal brake: A sensible food target for appetite control. A review. Physiol. Behav. 95, 271–281. doi:10.1016/j.physbeh.2008.07.018

- Mamone, G., Picariello, G., Caira, S., Addeo, F., Ferranti, P., 2009. Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques. J. Chromatogr. A, Advanced Separation Methods in Food Analysis 1216, 7130–7142. doi:10.1016/j.chroma.2009.07.052
- Mandalari, G., Adel-Patient, K., Barkholt, V., Baro, C., Bennett, L., Bublin, M., Gaier, S., Graser, G., Ladics, G.S., Mierzejewska, D., Vassilopoulou, E., Vissers, Y.M., Zuidmeer, L., Rigby, N.M., Salt, L.J., Defernez, M., Mulholland, F., Mackie, A.R., Wickham, M.S.J., Mills, E.N.C., 2009. In vitro digestibility of beta-casein and beta-lactoglobulin under simulated human gastric and duodenal conditions: a multi-laboratory evaluation. Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP 55, 372–381. doi:10.1016/j.yrtph.2009.08.010
- Mangel, A.W., Prpic, V., Wong, H., Basavappa, S., Hurst, L.J., Scott, L., Garman, R.L., Hayes, J.S., Sharara, A.I., Snow, N.D., Et, A., 1995. Phenylalanine-stimulated secretion of cholecystokinin is calcium dependent. Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol. 268, G90–G94.
- Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., 2015. HT29 Cell Line, in: The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health. Springer, pp. 113–124.
- Martos, G., Contreras, P., Molina, E., López-Fandiño, R., 2010. Egg white ovalbumin digestion mimicking physiological conditions. J. Agric. Food Chem. 58, 5640–5648.
- Matsumura, K., Miki, T., Jhomori, T., Gonoi, T., Seino, S., 2005. Possible role of PEPT1 in gastrointestinal hormone secretion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 1028–1032. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.259
- Matthews, D.M., 1971. Protein absorption. J Clin Path 5, 2-40.
- Meduru, H., Wang, Y.-T., Tsai, J.J.P., Chen, Y.-C., 2016a. Finding a Potential Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) Inhibitor for Type-2 Diabetes Treatment Based on Molecular Docking, Pharmacophore Generation, and Molecular Dynamics Simulation. Int. J. Mol. Sci. 17, 920. doi:10.3390/ijms17060920
- Meduru, H., Wang, Y.-T., Tsai, J.J.P., Chen, Y.-C., 2016b. Finding a Potential Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP-4) Inhibitor for Type-2 Diabetes Treatment Based on Molecular Docking, Pharmacophore Generation, and Molecular Dynamics Simulation. Int. J. Mol. Sci. 17, 920. doi:10.3390/ijms17060920
- Meek, C.L., Lewis, H.B., Reimann, F., Gribble, F.M., Park, A.J., 2016a. The effect of bariatric surgery on gastrointestinal and pancreatic peptide hormones. Peptides 77, 28– 37. doi:10.1016/j.peptides.2015.08.013
- Meek, C.L., Lewis, H.B., Vergese, B., Park, A., Reimann, F., Gribble, F., 2016b. The effect of encapsulated glutamine on gut peptide secretion in human volunteers. Peptides, Peptidergic gut-brain mechanisms in hunger and satiety – the Full4Health project 77, 38–46. doi:10.1016/j.peptides.2015.10.008
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. del M., Alaiz, M., Girón-Calle, J., Millán, F., Vioque, J., 2009. Stability of sunflower protein hydrolysates in simulated gastric and intestinal fluids and Caco-2 cell extracts. LWT - Food Sci. Technol. 42, 1496–1500. doi:10.1016/j.lwt.2009.04.008
- Mentlein, R., 1999. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. Regul. Pept. 85, 9–24. doi:10.1016/S0167-0115(99)00089-0
- Meunier, V., Bourrié, M., Berger, Y., Fabre, G., 1995. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. Cell Biol. Toxicol. 11, 187–194. doi:10.1007/BF00756522
- Millington, G.W., 2007. The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour. Nutr. Metab. 4, 18. doi:10.1186/1743-7075-4-18

- Minekus, M., 2015. The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM), in: The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health. Springer, pp. 37–46.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Feunteun, S.L., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D.J., Ménard, O., Recio, I., Santos, C.N., Singh, R.P., Vegarud, G.E., Wickham, M.S.J., Weitschies, W., Brodkorb, A., 2014. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. Food Funct. 5, 1113– 1124. doi:10.1039/C3FO60702J
- Minekus, M., Smeets-Peeters, M., Bernalier, A., Marol-Bonnin, S., Havenaar, R., Marteau, P., Alric, M., Fonty, G., Huis in't Veld, J.H., 1999. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53, 108–114.
- Minkiewicz, P., Dziuba, J., Darewicz, M., Iwaniak, A., Dziuba, M., Nałeçz, D., 2008. Food Peptidomics. Food Technol. Biotechnol. 46, 1–10.
- Mithieux, G., 2014a. Crosstalk between gastrointestinal neurons and the brain in the control of food intake. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 739–744. doi:10.1016/j.beem.2014.03.004
- Mithieux, G., 2014b. Nutropioids regulate gut-brain circuitry controlling food intake. Front. Horm. Res. 42, 155–162. doi:10.1159/000358344
- Mithieux, G., 2014. Metabolic effects of portal vein sensing. Diabetes Obes. Metab. 16, 56–60. doi:10.1111/dom.12338
- Mithieux, G., Misery, P., Magnan, C., Pillot, B., Gautier-Stein, A., Bernard, C., Rajas, F., Zitoun, C., 2005. Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. Cell Metab. 2, 321–329. doi:10.1016/j.cmet.2005.09.010
- Mochida, T., Hira, T., Hara, H., 2010a. The Corn Protein, Zein Hydrolysate, Administered into the Ileum Attenuates Hyperglycemia via Its Dual Action on Glucagon-Like Peptide-1 Secretion and Dipeptidyl Peptidase-IV Activity in Rats. Endocrinology 151, 3095–3104. doi:10.1210/en.2009-1510
- Mochida, T., Hira, T., Hara, H., 2010b. The corn protein, zein hydrolysate, administered into the ileum attenuates hyperglycemia via its dual action on glucagon-like peptide-1 secretion and dipeptidyl peptidase-IV activity in rats. Endocrinology 151, 3095–3104. doi:10.1210/en.2009-1510
- Möller, N.P., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N., Schrezenmeir, J., 2008. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. Eur. J. Nutr. 47, 171–182. doi:10.1007/s00394-008-0710-2
- Moran, T.H., Dailey, M.J., 2009. Gut Peptides: Targets for Antiobesity Drug Development? Endocrinology 150, 2526–2530. doi:10.1210/en.2009-0003
- Morifuji, M., Ishizaka, M., Baba, S., Fukuda, K., Matsumoto, H., Koga, J., Kanegae, M., Higuchi, M., 2010. Comparison of Different Sources and Degrees of Hydrolysis of Dietary Protein: Effect on Plasma Amino Acids, Dipeptides, and Insulin Responses in Human Subjects. J. Agric. Food Chem. 58, 8788–8797. doi:10.1021/jf101912n
- Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., Schwartz, M.W., 2006. Central nervous system control of food intake and body weight. Nature 443, 289–295. doi:10.1038/nature05026
- Morton, G.J., Schwartz, M.W., 2001. The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes. 25 Suppl 5, S56-62. doi:10.1038/sj.ijo.0801915

- Moughan, P.J., 2009. Digestion and absorption of proteins and peptides, in: Designing Functional Foods. Woodhead Publishing, pp. 148–167.
- Moughan, P.J., Rutherfurd, S.M., Montoya, C.A., Dave, L.A., 2014. Food-derived bioactive peptides a new paradigm. Nutr. Res. Rev. 27, 16–20. doi:10.1017/S0954422413000206
- Moxon, T.E., Gouseti, O., Bakalis, S., 2016. In silico modelling of mass transfer & absorption in the human gut. J. Food Eng. 176, 110–120. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.10.019
- Murphy, K.G., Bloom, S.R., 2006. Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. Nature 444, 854–859. doi:10.1038/nature05484
- Nakajima, S., Hira, T., Eto, Y., Asano, K., Hara, H., 2010. Soybean β51–63 peptide stimulates cholecystokinin secretion via a calcium-sensing receptor in enteroendocrine STC-1 cells. Regul. Pept. 159, 148–155. doi:10.1016/j.regpep.2009.11.007
- Nakajima, S., Hira, T., Hara, H., 2012. Calcium-sensing receptor mediates dietary peptideinduced CCK secretion in enteroendocrine STC-1 cells. Mol. Nutr. Food Res. 56, 753–760. doi:10.1002/mnfr.201100666
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., Matsukura, S., 2001. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature 409, 194–198. doi:10.1038/35051587
- Neary, M.T., Batterham, R.L., 2009. Gut hormones: Implications for the treatment of obesity. Pharmacol. Ther. 124, 44–56. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.06.005
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E.Y., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., Guillochon, D., 2008. Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides. Peptides 29, 969–977. doi:10.1016/j.peptides.2008.01.011
- Némoz-Gaillard, E., Bernard, C., Abello, J., Cordier-Bussat, M., Chayvialle, J.-A., Cuber, J.-C., 1998. Regulation of Cholecystokinin Secretion by Peptones and Peptidomimetic Antibiotics in STC-1 Cells. Endocrinology 139, 932–938. doi:10.1210/endo.139.3.5802
- Nishi, T., Hara, H., Asano, K., Tomita, F., 2003a. The Soybean β-Conglycinin β 51–63 Fragment Suppresses Appetite by Stimulating Cholecystokinin Release in Rats. J. Nutr. 133, 2537–2542.
- Nishi, T., Hara, H., Hira, T., Tomita, F., 2001. Dietary Protein Peptic Hydrolysates Stimulate Cholecystokinin Release via Direct Sensing by Rat Intestinal Mucosal Cells. Exp. Biol. Med. 226, 1031–1036.
- Nishi, T., Hara, H., Tomita, F., 2003b. Soybean β-Conglycinin Peptone Suppresses Food Intake and Gastric Emptying by Increasing Plasma Cholecystokinin Levels in Rats. J. Nutr. 133, 352–357.
- Nobile, V., Duclos, E., Michelotti, A., Bizzaro, G., Negro, M., Soisson, F., 2016. Supplementation with a fish protein hydrolysate (Micromesistius poutassou): effects on body weight, body composition, and CCK/GLP-1 secretion. Food Nutr. Res. 60, 29857.
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2016a. Prospects for the management of type 2 diabetes using food protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. Curr. Opin. Food Sci. 8, 19–24. doi:10.1016/j.cofs.2016.01.007
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2016b. Strategies for the discovery, identification and validation of milk protein-derived bioactive peptides. Trends Food Sci. Technol. 50, 26–43. doi:10.1016/j.tifs.2016.01.022
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2016c. Structure activity relationship modelling of milk protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. Peptides 79, 1–7. doi:10.1016/j.peptides.2016.03.005

- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2015. Investigation of the Potential of Hemp, Pea, Rice and Soy Protein Hydrolysates as a Source of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides. Food Dig. Res. Curr. Opin. 1–11. doi:10.1007/s13228-015-0039-2
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2014. An in silico model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. Food Chem. 165, 489–498. doi:10.1016/j.foodchem.2014.05.090
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2013a. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. J. Funct. Foods 5, 1909–1917. doi:10.1016/j.jff.2013.09.012
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2013b. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by tryptophan containing dipeptides. Food Funct. 4, 1843–1849. doi:10.1039/C3FO60262A
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2013c. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: Influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food-drug interaction. Int. Dairy J. 32, 33–39. doi:10.1016/j.idairyj.2013.03.005
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2013d. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: Influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food-drug interaction. Int. Dairy J. 32, 33–39. doi:10.1016/j.idairyj.2013.03.005
- Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2013e. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. Peptides 39, 157–163. doi:10.1016/j.peptides.2012.11.016
- Nongonierma, A.B., Le Maux, S., Hamayon, J., FitzGerald, R.J., 2016. Strategies for the release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides in an enzymatic hydrolyzate of α-lactalbumin. Food Funct. 7, 3437–3443. doi:10.1039/c6fo00239k
- Nongonierma, A.B., Maux, S.L., Esteveny, C., FitzGerald, R.J., 2016. Response surface methodology applied to the generation of casein hydrolysates with antioxidant and dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties. J. Sci. Food Agric. n/a-n/a. doi:10.1002/jsfa.7834
- Nongonierma, A.B., Mooney, C., Shields, D.C., FitzGerald, R.J., 2014. In silico approaches to predict the potential of milk protein-derived peptides as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors. Peptides 57, 43–51. doi:10.1016/j.peptides.2014.04.018
- Nongonierma, A.B., Mooney, C., Shields, D.C., FitzGerald, R.J., 2013. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV and xanthine oxidase by amino acids and dipeptides. Food Chem. 141, 644–653. doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.115
- Norgren, R., Smith, G.P., 1988. Central distribution of subdiaphragmatic vagal branches in the rat. J. Comp. Neurol. 273, 207–223. doi:10.1002/cne.902730206
- Nyemb, K., Guérin-Dubiard, C., Dupont, D., Jardin, J., Rutherfurd, S.M., Nau, F., 2014. The extent of ovalbumin in vitro digestion and the nature of generated peptides are modulated by the morphology of protein aggregates. Food Chem. 157, 429–438. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.048
- Ochiai, M., Kuroda, T., Matsuo, T., 2014. Increased muscular triglyceride content and hyperglycemia in Goto-Kakizaki rat are decreased by egg white hydrolysate. Int. J. Food Sci. Nutr. 65, 495–501. doi:10.3109/09637486.2013.879288
- O'Keeffe, M.B., FitzGerald, R.J., 2015. Identification of short peptide sequences in complex milk protein hydrolysates. Food Chem. 184, 140–146. doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.077

- Overduin, J., Gibbs, J., Cummings, D.E., Reeve Jr., J.R., 2014. CCK-58 elicits both satiety and satiation in rats while CCK-8 elicits only satiation. Peptides 54, 71–80. doi:10.1016/j.peptides.2014.01.008
- Oya, M., Kitaguchi, T., Pais, R., Reimann, F., Gribble, F., Tsuboi, T., 2013. The G Proteincoupled Receptor Family C Group 6 Subtype A (GPRC6A) Receptor Is Involved in Amino Acid-induced Glucagon-like Peptide-1 Secretion from GLUTag Cells. J. Biol. Chem. 288, 4513–4521. doi:10.1074/jbc.M112.402677
- Pais, R., Gribble, F.M., Reimann, F., 2016. Signalling pathways involved in the detection of peptones by murine small intestinal enteroendocrine L-cells. Peptides, Peptidergic gutbrain mechanisms in hunger and satiety – the Full4Health project 77, 9–15. doi:10.1016/j.peptides.2015.07.019
- Paizs, B., Suhai, S., 2005. Fragmentation pathways of protonated peptides. Mass Spectrom. Rev. 24, 508–548. doi:10.1002/mas.20024
- Panchaud, A., Affolter, M., Kussmann, M., 2012. Mass spectrometry for nutritional peptidomics: How to analyze food bioactives and their health effects. J. Proteomics, Understanding genome regulation and genetic diversity by mass spectrometry 75, 3546–3559. doi:10.1016/j.jprot.2011.12.022
- Pang, G., Xie, J., Chen, Q., Hu, Z., 2012. How functional foods play critical roles in human health. Food Sci. Hum. Wellness 1, 26–60. doi:10.1016/j.fshw.2012.10.001
- Patil, P., Mandal, S., Tomar, S.K., Anand, S., 2015. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. Eur. J. Nutr. 54, 863–880. doi:10.1007/s00394-015-0974-2
- Pauletti, G.M., Gangwar, S., Knipp, G.T., Nerurkar, M.M., Okumu, F.W., Tamura, K., Siahaan, T.J., Borchardt, R.T., 1996. Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs. J. Controlled Release, Fifth International Symposium on Delivery and Targeting of Pesticides, Proteins and Genes 41, 3–17. doi:10.1016/0168-3659(96)01352-1
- Perry, B., Wang, Y., 2012. Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones. Nutr. Diabetes 2, e26. doi:10.1038/nutd.2011.21
- Pfluger, P.T., Schriever, S.C., Tschöp, M.H., 2012. Nutropioids, Hedonism in the Gut? Cell Metab. 16, 137–139. doi:10.1016/j.cmet.2012.07.011
- Phillips, R.J., Powley, T.L., 2000. Tension and stretch receptors in gastrointestinal smooth muscle: re-evaluating vagal mechanoreceptor electrophysiology. Brain Res. Brain Res. Rev. 34, 1–26.
- Phillips, R.J., Powley, T.L., 1998. Gastric volume detection after selective vagotomies in rats. Am. J. Physiol. 274, R1626-1638.
- Phillips, R.J., Powley, T.L., 1996. Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake. Am. J. Physiol. 271, R766-769.
- Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O., Mamone, G., Caira, S., Di Luccia, A., Monica, S., Addeo, F., 2010. Peptides surviving the simulated gastrointestinal digestion of milk proteins: Biological and toxicological implications. J. Chromatogr. B 878, 295–308. doi:10.1016/j.jchromb.2009.11.033
- Picariello, G., Iacomino, G., Mamone, G., Ferranti, P., Fierro, O., Gianfrani, C., Di Luccia, A., Addeo, F., 2013a. Transport across Caco-2 monolayers of peptides arising from in vitro digestion of bovine milk proteins. Food Chem. 139, 203–212. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.063
- Picariello, G., Mamone, G., Nitride, C., Addeo, F., Ferranti, P., 2013b. Protein digestomics: Integrated platforms to study food-protein digestion and derived functional and active peptides. TrAC Trends Anal. Chem., Modern Food Analysis and Foodomics 52, 120– 134. doi:10.1016/j.trac.2013.08.001

- Picariello, G., Mamone, G., Nitride, C., Addeo, F., Ferranti, P., 2013c. Protein digestomics: Integrated platforms to study food-protein digestion and derived functional and active peptides. TrAC Trends Anal. Chem., Modern Food Analysis and Foodomics 52, 120– 134. doi:10.1016/j.trac.2013.08.001
- Pocai, A., 2014. Action and therapeutic potential of oxyntomodulin. Mol. Metab., Metabolic Syndrome: Removing Road Blocks to Therapy 3, 241–251. doi:10.1016/j.molmet.2013.12.001
- Power, O., Nongonierma, A.B., Jakeman, P., FitzGerald, R.J., 2014. Food protein hydrolysates as a source of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides for the management of type 2 diabetes. Proc. Nutr. Soc. 73, 34–46. doi:10.1017/S0029665113003601
- Power-Grant, O., Bruen, C., Brennan, L., Giblin, L., Jakeman, P., FitzGerald, R.J., 2015. In vitro bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed whey protein: targeting the enteroinsular axis. Food Funct. 6, 972–980. doi:10.1039/c4fo00983e
- Powley, T.L., Phillips, R.J., 2004. Gastric satiation is volumetric, intestinal satiation is nutritive. Physiol. Behav. 82, 69–74. doi:10.1016/j.physbeh.2004.04.037
- Pupovac, J., Anderson, G.H., 2002. Dietary peptides induce satiety via cholecystokinin-A and peripheral opioid receptors in rats. J. Nutr. 132, 2775–2780.
- Rasoamanana, R., Darcel, N., Fromentin, G., Tomé, D., 2012. Nutrient sensing and signalling by the gut. Proc. Nutr. Soc. 71, 446–455. doi:10.1017/S0029665112000110
- Raybould, H.E., 2010. Gut chemosensing: Interactions between gut endocrine cells and visceral afferents. Auton. Neurosci., Visceral Afferents 153, 41–46. doi:10.1016/j.autneu.2009.07.007
- Raybould, H.E., Zittel, T.T., Holzer, H.H., Lloyd, K.C., Meyer, J.H., 1994. Gastroduodenal sensory mechanisms and CCK in inhibition of gastric emptying in response to a meal. Dig. Dis. Sci. 39, 41S–43S.
- Rehfeld, J.F., 1981. Cholecystokinin as satiety signal. Int. J. Obes. 5, 465–469.
- Reidelberger, R.D., Castellanos, D.A., Hulce, M., 2003a. Effects of peripheral CCK receptor blockade on food intake in rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 285, R429-437. doi:10.1152/ajpregu.00176.2003
- Reidelberger, R.D., Heimann, D., Kelsey, L., Hulce, M., 2003b. Effects of peripheral CCK receptor blockade on feeding responses to duodenal nutrient infusions in rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 284, R389-398. doi:10.1152/ajpregu.00529.2002
- Reidelberger, R.D., Kelsey, L., Heimann, D., Hulce, M., 2003c. Effects of peripheral CCK receptor blockade on gastric emptying in rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 284, R66-75. doi:10.1152/ajpregu.00484.2002
- Reijnders, D., Goossens, G.H., Hermes, G.D.A., Neis, E.P.J.G., van der Beek, C.M., Most, J., Holst, J.J., Lenaerts, K., Kootte, R.S., Nieuwdorp, M., Groen, A.K., Olde Damink, S.W.M., Boekschoten, M.V., Smidt, H., Zoetendal, E.G., Dejong, C.H.C., Blaak, E.E., 2016. Effects of Gut Microbiota Manipulation by Antibiotics on Host Metabolism in Obese Humans: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. Cell Metab. 24, 341. doi:10.1016/j.cmet.2016.07.008
- Reimann, F., Gribble, F.M., 2015. G protein-coupled receptors as new therapeutic targets for type 2 diabetes. Diabetologia 59, 229–233. doi:10.1007/s00125-015-3825-z
- Reimann, F., Tolhurst, G., Gribble, F.M., 2012. G-Protein-Coupled Receptors in Intestinal Chemosensation. Cell Metab. 15, 421–431. doi:10.1016/j.cmet.2011.12.019
- Reimann, F., Williams, L., Xavier, G. da S., Rutter, G.A., Gribble, F.M., 2004. Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells. Diabetologia 47, 1592–1601. doi:10.1007/s00125-004-1498-0

- Reimer, R.A., 2006. Meat hydrolysate and essential amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion, in the human NCI-H716 enteroendocrine cell line, is regulated by extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. J. Endocrinol. 191, 159–170. doi:10.1677/joe.1.06557
- Reimer, R.A., Darimont, C., Gremlich, S., Nicolas-Métral, V., Rüegg, U.T., Macé, K., 2001. A Human Cellular Model for Studying the Regulation of Glucagon-Like Peptide-1 Secretion. Endocrinology 142, 4522–4528. doi:10.1210/endo.142.10.8415
- Rindi, G., Grant, S.G., Yiangou, Y., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Bautch, V.L., Solcia, E., Polak, J.M., 1990. Development of neuroendocrine tumors in the gastrointestinal tract of transgenic mice. Heterogeneity of hormone expression. Am. J. Pathol. 136, 1349– 1363.
- Ripken, D., van der Wielen, N., van der Meulen, J., Schuurman, T., Witkamp, R.F., Hendriks, H.F.J., Koopmans, S.J., 2015. Cholecystokinin regulates satiation independently of the abdominal vagal nerve in a pig model of total subdiaphragmatic vagotomy. Physiol. Behav. 139, 167–176. doi:10.1016/j.physbeh.2014.11.031
- Ritter, R.C., 2004. Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. Physiol. Behav., Reviews on Ingestive Science 81, 249–273. doi:10.1016/j.physbeh.2004.02.012
- Roepstorff, P., Fohlman, J., 1984. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. Biomed. Mass Spectrom. 11, 601. doi:10.1002/bms.1200111109
- Roh, E., Song, D.K., Kim, M.-S., 2016. Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. Exp. Mol. Med. 48, e216. doi:10.1038/emm.2016.4
- Rønnestad, I., Akiba, Y., Kaji, I., Kaunitz, J.D., 2014. Duodenal luminal nutrient sensing. Curr. Opin. Pharmacol., Gastrointestinal • Endocrine and metabolic diseases 19, 67– 75. doi:10.1016/j.coph.2014.07.010
- Rubio, L.A., Seiquer, I., 2002. Transport of Amino Acids from in Vitro Digested Legume Proteins or Casein in Caco-2 Cell Cultures. J. Agric. Food Chem. 50, 5202–5206. doi:10.1021/jf0201778
- Ryan, J.T., Ross, R.P., Bolton, D., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., 2011. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. Nutrients 3, 765–791. doi:10.3390/nu3090765
- Saavedra, L., Hebert, E.M., Minahk, C., Ferranti, P., 2013. An overview of "omic" analytical methods applied in bioactive peptide studies. Food Res. Int. 54, 925–934. doi:10.1016/j.foodres.2013.02.034
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stammati, A., Zucco, F., 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culturerelated factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell Biol. Toxicol. 21, 1–26. doi:10.1007/s10565-005-0085-6
- Samocha-Bonet, D., Chisholm, D.J., Holst, J.J., Greenfield, J.R., 2015. l-Glutamine and Whole Protein Restore First-Phase Insulin Response and Increase Glucagon-Like Peptide-1 in Type 2 Diabetes Patients. Nutrients 7, 2101–2108. doi:10.3390/nu7042101
- Sánchez-Navarro, M., Garcia, J., Giralt, E., Teixidó, M., 2016. Using peptides to increase transport across the intestinal barrier. Adv. Drug Deliv. Rev. doi:10.1016/j.addr.2016.04.031
- Sánchez-Rivera, L., Martínez-Maqueda, D., Cruz-Huerta, E., Miralles, B., Recio, I., 2014.
  Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides.
  Food Res. Int., Special issue on 3rd Foodomics Conference: Foodomics a new comprehensive approach to food and nutrition. 63, Part B, 170–181. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.069

- Sánchez-Rivera, L., Ménard, O., Recio, I., Dupont, D., 2015. Peptide mapping during dynamic gastric digestion of heated and unheated skimmed milk powder. Food Res. Int., FOOD BIOACTIVE COMPOUNDS: QUALITY CONTROL AND BIOACTIVITY 77, Part 2, 132–139. doi:10.1016/j.foodres.2015.08.001
- Scarpellini, E., Campanale, M., Leone, D., Purchiaroni, F., Vitale, G., Lauritano, E.C., Gasbarrini, A., 2010. Gut microbiota and obesity. Intern. Emerg. Med. 5 Suppl 1, S53-56. doi:10.1007/s11739-010-0450-1
- Schrader, M., Schulz-Knappe, P., Fricker, L.D., 2014. Historical perspective of peptidomics. EuPA Open Proteomics 3, 171–182. doi:10.1016/j.euprot.2014.02.014
- Schweizer, M., Chevalot, I., Blanchard, F., Fournier, F., Harscoat-Schiavo, C., Vanderesse,
   R., Marc, I., 2007. Prediction of short peptides composition by RP-HPLC coupled to
   ESI mass spectrometry. Food Chem. 105, 1606–1613.
   doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.067
- Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H., 2013. The influence of diet on the gut microbiota. Pharmacol. Res. 69, 52–60. doi:10.1016/j.phrs.2012.10.020
- Sharara, A.I., Bouras, E.P., Misukonis, M.A., Liddle, R.A., 1993. Evidence for indirect dietary regulation of cholecystokinin release in rats. Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol. 265, G107–G112.
- Sharma, S., Singh, R., Rana, S., 2011. Bioactive peptides: a review. Int J BIOatomation 15, 223–250.
- Sherwood, 2006. Physiologie humaine, 2e édition. ed. De boeck & Larcier.
- Shi, G., Leray, V., Scarpignato, C., Bentouimou, N., Bruley des Varannes, S., Cherbut, C., Galmiche, J.P., 1997. Specific adaptation of gastric emptying to diets with differing protein content in the rat: is endogenous cholecystokinin implicated? Gut 41, 612– 618.
- Shimizu, M., Tsunogai, M., Arai, S., 1997. Transepithelial Transport of Oligopeptides in the Human Intestinal Cell, Caco-2. Peptides 18, 681–687. doi:10.1016/S0196-9781(97)00002-8
- Sienkiewicz-Szłapka, E., Jarmołowska, B., Krawczuk, S., Kostyra, E., Kostyra, H., Bielikowicz, K., 2009. Transport of bovine milk-derived opioid peptides across a Caco-2 monolayer. Int. Dairy J. 19, 252–257. doi:10.1016/j.idairyj.2008.10.007
- Silveira, S.T., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., Hernández-Ledesma, B., 2013. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides generated by tryptic hydrolysis of a whey protein concentrate rich in β-lactoglobulin. Food Chem. 141, 1072–1077. doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.056
- Sinclair, E.M., Drucker, D.J., 2005. Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential. Physiol. Bethesda Md 20, 357–365. doi:10.1152/physiol.00030.2005
- Singh, J., Dartois, A., Kaur, L., 2010. Starch digestibility in food matrix: a review. Trends Food Sci. Technol. 21, 168–180. doi:10.1016/j.tifs.2009.12.001
- Sobrino Crespo, C., Perianes Cachero, A., Puebla Jiménez, L., Barrios, V., Arilla Ferreiro, E., 2014. Peptides and food intake. Diabetes 5, 58. doi:10.3389/fendo.2014.00058
- Staljanssens, D., Azari, E.K., Christiaens, O., Beaufays, J., Lins, L., Van Camp, J., Smagghe, G., 2011. The CCK(-like) receptor in the animal kingdom: Functions, evolution and structures. Peptides, Invertebrate Neuropeptides XI 32, 607–619. doi:10.1016/j.peptides.2010.11.025
- Staljanssens, D., Van Camp, J., Billiet, A., De Meyer, T., Al Shukor, N., De Vos, W.H., Smagghe, G., 2012. Screening of soy and milk protein hydrolysates for their ability to activate the CCK1 receptor. Peptides, Invertebrate Neuropeptides XII 34, 226–231. doi:10.1016/j.peptides.2011.11.019

- Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., Leibowitz, S.F., 1986. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. Peptides 7, 1189–1192.
- Stapels, M.D., Barofsky, D.F., 2004. Complementary use of MALDI and ESI for the HPLC-MS/MS analysis of DNA-binding proteins. Anal. Chem. 76, 5423–5430. doi:10.1021/ac030427z
- Sternini, C., Anselmi, L., Rozengurt, E., 2008. Enteroendocrine cells: a site of "taste" in gastrointestinal chemosensing. Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes. 15, 73–78. doi:10.1097/MED.0b013e3282f43a73
- Stringer, D.M., Taylor, C.G., Appah, P., Blewett, H., Zahradka, P., 2013. Consumption of buckwheat modulates the post-prandial response of selected gastrointestinal satiety hormones in individuals with type 2 diabetes mellitus. Metabolism. 62, 1021–1031. doi:10.1016/j.metabol.2013.01.021
- Sufian, M., Hira, T., Miyashita, K., Nishi, T., Asano, K., Hara, H., 2006. Pork Peptone Stimulates Cholecystokinin Secretion from Enteroendocrine Cells and Suppresses Appetite in Rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70, 1869–1874. doi:10.1271/bbb.60046
- Tenore, G.C., Ritieni, A., Campiglia, P., Stiuso, P., Di Maro, S., Sommella, E., Pepe, G., D'Urso, E., Novellino, E., 2015. Antioxidant peptides from "Mozzarella di Bufala Campana DOP" after simulated gastrointestinal digestion: In vitro intestinal protection, bioavailability, and anti-haemolytic capacity. J. Funct. Foods 15, 365–375. doi:10.1016/j.jff.2015.03.048
- Thamotharan, M., Bawani, S., Zhou, X., Abidi, S., 1999. Hormonal regulation of oligopeptide transporter Pept-1 in a human intestinal cell line. Am J Physiol Cell Physiol 276, 821–826.
- Thoma, R., Löffler, B., Stihle, M., Huber, W., Ruf, A., Hennig, M., 2003. Structural Basis of Proline-Specific Exopeptidase Activity as Observed in Human Dipeptidyl Peptidase-IV. Structure 11, 947–959. doi:10.1016/S0969-2126(03)00160-6
- Tognarelli, D., Tsukamoto, A., Caldwell, J., Caldwell, W., 2009. Rapid peptide separation by supercritical fluid chromatography. Bioanalysis 2, 5–7. doi:10.4155/bio.09.165
- Tolhurst, G., Reimann, F., Gribble, F.M., 2009. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. J. Physiol. 587, 27–32. doi:10.1113/jphysiol.2008.164012
- Tolhurst, G., Zheng, Y., Parker, H.E., Habib, A.M., Reimann, F., Gribble, F.M., 2011. Glutamine Triggers and Potentiates Glucagon-Like Peptide-1 Secretion by Raising Cytosolic Ca2+ and cAMP. Endocrinology 152, 405–413. doi:10.1210/en.2010-0956
- Torres-Escribano, S., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Calatayud, M., Barrios, L., Vélez, D., Alric, M., Montoro, R., 2011. Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials Fucus sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). Sci. Total Environ. 409, 604–611. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.10.021
- Troke, R.C., Tan, T.M., Bloom, S.R., 2014. The future role of gut hormones in the treatment of obesity. Ther. Adv. Chronic Dis. 5, 4–14. doi:10.1177/2040622313506730
- Tschöp, M.H., Finan, B., Clemmensen, C., Gelfanov, V., Perez-Tilve, D., Müller, T.D., DiMarchi, R.D., 2016. Unimolecular Polypharmacy for Treatment of Diabetes and Obesity. Cell Metab. 24, 51–62. doi:10.1016/j.cmet.2016.06.021
- Turgeon, S.L., Rioux, L.-E., 2011. Food matrix impact on macronutrients nutritional properties. Food Hydrocoll., 25 years of Advances in Food Hydrocolloid Research 25, 1915–1924. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.02.026

- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., Gordon, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 444, 1027–131. doi:10.1038/nature05414
- Uchida, M., Ohshiba, Y., Mogami, O., 2011. Novel Dipeptidyl Peptidase-4–Inhibiting Peptide Derived From <I>β</I>-Lactoglobulin. J. Pharmacol. Sci. 117, 63–66. doi:10.1254/jphs.11089SC
- Udenigwe, C.C., 2014. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. Trends Food Sci. Technol. 36, 137–143. doi:10.1016/j.tifs.2014.02.004
- Uenishi, H., Kabuki, T., Seto, Y., Serizawa, A., Nakajima, H., 2012. Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. Int. Dairy J. 22, 24–30. doi:10.1016/j.idairyj.2011.08.002
- Umezawa, H., Aoyagi, T., Ogawa, K., Naganawa, H., Hamada, M., Takeuchi, T., 1984. Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria. J. Antibiot. (Tokyo) 37, 422–425.
- Valassi, E., Scacchi, M., Cavagnini, F., 2008. Neuroendocrine control of food intake. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 18, 158–168. doi:10.1016/j.numecd.2007.06.004
- van Boxtel, E.L., van den Broek, L.A.M., Koppelman, S.J., Gruppen, H., 2008. Legumin allergens from peanuts and soybeans: effects of denaturation and aggregation on allergenicity. Mol. Nutr. Food Res. 52, 674–682. doi:10.1002/mnfr.200700299
- van der Bilt, A., 2009. Oral physiology, mastication and food perception, in: Designing Functional Foods. pp. 3–29.
- van der Klaauw, A.A., Keogh, J.M., Henning, E., Trowse, V.M., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A., Farooqi, I.S., 2013. High protein intake stimulates postprandial GLP1 and PYY release. Obes. Silver Spring Md 21, 1602–1607. doi:10.1002/oby.20154
- Vásquez-Villanueva, R., Marina, M.L., García, M.C., 2016. Identification by hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry of peptides with antioxidant capacity in food residues. J. Chromatogr. A 1428, 185–192. doi:10.1016/j.chroma.2015.07.032
- Velarde-Salcedo, A.J., Barrera-Pacheco, A., Lara-González, S., Montero-Morán, G.M., Díaz-Gois, A., González de Mejia, E., Barba de la Rosa, A.P., 2013. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (Amaranthus hypochondriacus L.) proteins. Food Chem. 136, 758–764. doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.032
- Venema, K., Havenaar, R., Minekus, M., 2009. Improving in vitro simulation of the stomach and intestines, in: Designing Functional Foods. Woodhead Publishing, pp. 314–334.
- Vermeirssen, V., Deplancke, B., Tappenden, K.A., Camp, J.V., Gaskins, H.R., Verstraete, W., 2002. Intestinal Transport of the Lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg through a Caco-2 Bbe Monolayer. J. Pept. Sci. 8, 95–100. doi:10.1002/psc.371
- Versantvoort, C.H.M., Oomen, A.G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., 2005. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. Food Chem. Toxicol. 43, 31–40. doi:10.1016/j.fct.2004.08.007
- Vicentic, A., Jones, D.C., 2007. The CART (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) system in appetite and drug addiction. J. Pharmacol. Exp. Ther. 320, 499–506. doi:10.1124/jpet.105.091512
- Vítek, L., Haluzík, M., 2016. The role of bile acids in metabolic regulation. J. Endocrinol. 228, R85–R96. doi:10.1530/JOE-15-0469

- Wada, Y., Lönnerdal, B., 2015. Bioactive peptides released by in vitro digestion of standard and hydrolyzed infant formulas. Peptides 73, 101–105. doi:10.1016/j.peptides.2015.09.005
- Wang, J., Zhang, Y., Xiang, F., Zhang, Z., Li, L., 2010. Combining capillary electrophoresis matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and stable isotopic labeling techniques for comparative crustacean peptidomics. J. Chromatogr. A 1217, 4463–4470. doi:10.1016/j.chroma.2010.02.084
- Wang, Y., Chandra, R., Samsa, L.A., Gooch, B., Fee, B.E., Cook, J.M., Vigna, S.R., Grant, A.O., Liddle, R.A., 2011a. Amino acids stimulate cholecystokinin release through the Ca2+-sensing receptor. Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol. 300, G528– G537. doi:10.1152/ajpgi.00387.2010
- Wang, Y., Chandra, R., Samsa, L.A., Gooch, B., Fee, B.E., Cook, J.M., Vigna, S.R., Grant, A.O., Liddle, R.A., 2011b. Amino acids stimulate cholecystokinin release through the Ca2+-sensing receptor. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 300, G528-537. doi:10.1152/ajpgi.00387.2010
- Wang, Y., Landheer, S., van Gilst, W.H., van Amerongen, A., Hammes, H.-P., Henning, R.H., Deelman, L.E., Buikema, H., 2012. Attenuation of renovascular damage in Zucker diabetic fatty rat by NWT-03, an egg protein hydrolysate with ACE- and DPP4-inhibitory Activity. PloS One 7, e46781. doi:10.1371/journal.pone.0046781
- Wang, Y., Prpic, V., Green, G.M., Reeve, J.R., Liddle, R.A., 2002. Luminal CCK-releasing factor stimulates CCK release from human intestinal endocrine and STC-1 cells. Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol. 282, G16–G22.
- Waterson, M.J., Horvath, T.L., 2015. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. Cell Metab. 22, 962–970. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.026
- Webb, K.E., 1990. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review. J. Anim. Sci. 68, 3011–3022.
- Wellendorph, P., Bräuner-Osborne, H., 2009. Molecular basis for amino acid sensing by family C G-protein-coupled receptors. Br. J. Pharmacol. 156, 869–884. doi:10.1111/j.1476-5381.2008.00078.x
- Wen, S., Zhou, G., Li, L., Xu, X., Yu, X., Bai, Y., Li, C., 2015. Effect of Cooking on in Vitro Digestion of Pork Proteins: A Peptidomic Perspective. J. Agric. Food Chem. 63, 250– 261. doi:10.1021/jf505323g
- Westerterp-Plantenga, M.S., 2008. Protein intake and energy balance. Regul. Pept., Neuroendocrinology regulation of food intake 149, 67–69. doi:10.1016/j.regpep.2007.08.026
- Westerterp-Plantenga, M.S., Lemmens, S.G., Westerterp, K.R., 2012. Dietary protein its role in satiety, energetics, weight loss and health. Br. J. Nutr. 108, S105–S112. doi:10.1017/S0007114512002589
- Wickham, M., Faulks, R., Mills, C., 2009. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. Mo Nutr Food Res 53, 952–958.
- Wilde, P.J., 2009. Eating for Life: Designing Foods for Appetite Control. J. Diabetes Sci. Technol. 3, 366–370.
- Williams, G., Harrold, J.A., Cutler, D.J., 2000. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. Proc. Nutr. Soc. 59, 385–396. doi:10.1017/S0029665100000434
- Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D., Schwartz, M.W., 1998. Signals That Regulate Food Intake and Energy Homeostasis. Science 280, 1378–1383. doi:10.1126/science.280.5368.1378

- Wren, A.M., Bloom, S.R., 2007. Gut Hormones and Appetite Control. Gastroenterology 132, 2116–2130. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.048
- Wu, Q., Boyle, M.P., Palmiter, R.D., 2009. Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. Cell 137, 1225–1234. doi:10.1016/j.cell.2009.04.022
- Yoshida, H., Tsunoda, Y., Owyang, C., 1999. Diazepam-binding inhibitor33-50 elicits Ca2+ oscillation and CCK secretion in STC-1 cells via L-type Ca2+ channels. Am. J. Physiol. 276, G694-702.
- Yoshida, T., 2004. Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography: a review. J. Biochem. Biophys. Methods, Instrumentation 60, 265–280. doi:10.1016/j.jbbm.2004.01.006
- Yousefinejad, S., Hemmateenejad, B., 2015. Chemometrics tools in QSAR/QSPR studies: A historical perspective. Chemom. Intell. Lab. Syst. 149, Part B, 177–204. doi:10.1016/j.chemolab.2015.06.016
- Zhao, Q., Garreau, I., Sannier, F., Piot, J.M., 1997. Opioid peptides derived from hemoglobin: Hemorphins. Pept. Sci. 43, 75–98. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(1997)43:2<75::AID-BIP2>3.0.CO;2-X

## **Production scientifique**

## **Production scientifique**

## PUBLICATIONS

**Caron J.**, Cudennec B, Domenger D., Belguesmia Y., Flahaut C, Kouach M., Goossens J.-F, Dhulster P. and, Ravallec R., Identification of peptide sequences released from protein GI digestion in gut hormone secretion (In press, corrected proof, Food Research International).

Belguesmia Y., Domenger D., **Caron J.**, Dhulster P., Ravallec R., Drider D., and Cudennec B., (2016) Novel probiotic evidence of lactobacilli on immunomodulation and regulation of satiety hormones release in intestinal cells, Journal of Functional Foods, 24, 276-286

**Caron J.**, Chataigné G., Gimeno J.-P., Duhal N.; Goossens J.-F., Dhuster P., Cudennec B., Ravallec R. and Flahaut C. (2016) Food peptidomics of in vitro gastrointestinal digestions of partially-purified bovine haemoglobin: low resolution versus high resolution LC-MS/MS analyses, Electrophoresis 2016, *37*, 1814–1822.

**Caron J.**, Domenger D., Belguesmia Y., Kouach M., Lesage J., Goossens J.-F., Dhulster P., Ravallec R. and Cudennec B. (2015) Protein digestion and energy homeostasis: how generated peptides may impact intestinal hormones? Food Research International 88 (2016) 310–318.

Cudennec B., Balti R. Ravallec R., **Caron J**., Dhulster P. and Nedjar N.(2015) *In vitro* evidence for gut hormones stimulation and dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of protein hydrolysate obtained from cuttlefish (*Sepia officinalis*) viscera, Journal of Functional Foods, 78, 238-245.

### PRESENTATIONS ORALES

**Caron J,** Domenger D., Belguesmia Y., Flahaut C., Kouach M., Touche V., Lestabel S., Ravallec R, Goossens J.-F.. Cudennec B. and Dhulster P. *Dietary protein gastrointestinal digestion: release of new resistant peptides involved in energy homeostasis*, 18<sup>th</sup> IUFOST 21-25 August 2016, Dublin, Ireland.

B. Cudennec, J. Caron, Y. Belguesmia, D. Domenger, C. Flahaut, M. Kouach, J. Lesage, V. Touche, S. Lestavel, J.F. Goossens, P. Dhulster, R. Ravallec. *Peptides from protein digestion are able to modulate GLP-1 secretion, cross intestinal barrier and inhibit DPP-IV activity.* RegPep 2016, International Regulatory Peptide Society. 12-14 July 2016. Rouen, France.

**Caron J.**, Flahaut C., Dhulster P., Ravallec R. and Cudennec B., *Fate of bioactive peptides released from dietary protein gastrointestinal digestion*, Youth Research Meeting SFR Condorcet, 19-20 January 2016, Reims, France.
Ravallec R., **Caron J.**, Flahaut C., Domenger D., Belguesmia Y., Drider D., Dhulster P. and Cudennec B. *Health benefit of the bioactive peptides generated by the gastrointestinal digestion of proteins*. 3rd International Conference on Food Structure, Digestion and Health – 28-30 October 2015, Wellington, New Zealand.

Christophe Flahaut, **Juliette Caron**, Dorothée Domenger, Mostafa Kouach, Véronique Touche, Sophie Lestavel, Jean-François Goossens, Pascal Dhulster, Rozenn Ravallec et Benoit Cudennec. *Devenir des protéines dans un système modèle de digestion simulée assisté par spectrométrie de masse*. Adebiotech, colloque Proteinov, Octobre 2015, Romainville, France

Flahaut C., **Caron J**, Domenger D., Kouach M., Touche V., Lestavel S., Goossens J.-F., Dhuslter P., Ravallec R. and Cudennec B. *Foodomics: bovine haemoglobin peptides resistant to the gastrointestinal-digestion able to cross a Caco-2 cell monolayer*. 7th French Congress of mass spectrometry (SMAP), 15-18 September 2015, Ajaccio, France

**Caron J**, Domenger D., Belguesmia Y., Flahaut C., Kouach M., Ravallec R., Dhulster P., Goossens J.-F. and. Cudennec B. *Gastrointestinal digestion and energetic metabolism: how generated peptides may impact intestinal hormones?* 4<sup>th</sup> INFOGEST Conference,15-17 March 2015, Naples, Italy

## POSTERS

Flahaut C, **Caron J**, Cudennec B, Chataigné G, Ravallec R, and Dhulster P. *Interest of the high resolution nanoLC-mass spectrometry in the systematic characterization of peptide complex mixture issued from in vitro gastro-intestinal digestion of bovine haemoglobin.* 4th International Conference on Food Digestion- COST Action FA1005 Infogest, March 17-19 2015, Naples, Italy.

**Caron J.**, Flahaut C, Cudennec B., Kouach M., Chataigné G., Ravallec R., Goossens J.-F. and Dhulster P. *Peptidome analysis after in vitro digestion: what strategy to follow?* 14<sup>th</sup> French Congress of mass spectrometry (SMAP-SFSM) 30 June-02 July 2014, Lyon, France (P099).

Flahaut C, **Caron J.**, Cudennec B., Mazure B., Kouach M., Chataigné G., Ravallec R., Goossens J.-F. and Dhulster P. *How to combine numerous MS and MS/MS data for the search (under Biotools 3.2) of peptides from a known protein.* 14<sup>th</sup> French Congress of mass spectrometry (SMAP-SFSM) 30 June-02 July 2014, Lyon, France (P011).

**Caron J.**, Cudennec B., Flahaut C, Kouach M., Chataigné G., Ravallec R., Goossens J.-F. and Dhulster P *Characterization of haemoglobin derived peptides following an in vitro simulated digestion*, 3rd International Conference on Food Digestion, COST Action FA1005 Infogest, 11-13 March 2014, Wageningen, The Netherlands.

## Annexes

Annexe 1 : Liste des séquences peptidiques identifiées dans le digestat gastrique 120 min de l'hémoglobine bovine par analyse MALDI-MS-MS. La recherche en base de données par le logiciel BioTools a utilisé les entrées P01966 (chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine) et P02070 (chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine). Position : position de la séquence sur la chaine protéique. HbA : chaîne  $\alpha$ , HbB : chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine.

Chaîne protéique	Séquence	Position	m/z	Poids moléculaire (Da)
HbA	VLTSKYR	136 - 142	866.5	865.5
HbA	KLLSHSLL	100 - 107	910.6	909.6
HbA	VKAAWGKVGGH	11 - 21	1151.6	1150.6
HbA	HKLRVDPVNF	90 - 99	1224.7	1223.7
HbA	PTTKTYFPHF	38 - 47	1238.8	1237.8
HbA	HAHKLRVDPVN	88 - 98	1285.9	1284.9
HbA	ALTKAVEHLDDL	66 - 77	1324.7	1323.7
HbA	ASHLPSDFTPAVH	111 - 123	1378.9	1377.9
HbA	HAHKLRVDPVNF	88 - 99	1433.0	1432.0
HbA	LSFPTTKTYFPHF	35 - 47	1586.1	1585.1
HbA	SDLHAHKLRVDPVN	85 - 98	1601.2	1600.1
HbA	ASHLPSDFTPAVHASL	111 - 126	1650.1	1649.1
HbA	DLSHGSAQVKGHGAKVAA	48 - 65	1733.1	1732.1
HbA	AALTKAVEHLDDLPGAL	65 - 81	1734.0	1733.0
HbA	SDLHAHKLRVDPVNF	85 - 99	1748.2	1747.2
HbA	DLSHGSAQVKGHGAKVAAA	48 - 66	1804.2	1803.2
HbA	VLSAADKGNVKAAWGKVG	02 - 19	1813.0	1812.0
HbA	DLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	48 - 67	1917.3	1916.3
HbA	HGAKVAAALTKAVEHLDDLP	59 - 78	2056.4	2055.4
HbB	HVDPENF	96 - 102	857.4	856.4
HbB	VGGEALGRL	22 - 30	871.5	870.5
HbB	FKLLGNVL	102 - 109	903.6	902.6
HbB	NALAHRYH	138 - 145	981.6	980.6
HbB	ARNFGKEFT	114 - 122	1069.7	1068.7
HbB	VANALAHRYH	136 - 145	1151.8	1150.8
HbB	VVYPWTQRF	32 - 40	1195.8	1194.8
HbB	GVANALAHRYH	135 - 145	1208.8	1207.8
HbB	LVVYPWTQRF	31 - 40	1308.9	1307.9
HbB	LHVDPENFKLL	95 - 105	1324.7	1323.7
HbB	VVYPWTQRFF	32 - 41	1342.7	1341.7
HbB	ARNFGKEFTPVL	114 - 125	1378.9	1377.9
HbB	WGKVKVDEVGGEAL	14 - 27	1487.0	1486.0

_					
	HbB	LARNFGKEFTPVL	113 - 125	1491.8	1490.8
	HbB	AVMNNPKVKAHGKKVL	52 - 67	1734.0	1733.0
	HbB	QKVVAGVANALAHRYH	130 - 145	1734.0	1733.0
	HbB	WGKVKVDEVGGEALGRL	14 - 30	1813.0	1812.0
	HbB	VMNNPKVKAHGKKVLDS	53 - 69	1865.3	1864.3
	HbB	LSTADAVMNNPKVKAHGK	47 - 64	1881.0	1880.0
	HbB	FQKVVAGVANALAHRYH	129 - 145	1881.0	1880.0
	HbB	AVMNNPKVKAHGKKVLDS	52 - 69	1936.3	1935.3
	HbB	ARNFGKEFTPVLQADFQKV	114 - 132	2195.1	2194.1
	HbB	NFGKEFTPVLQADFQKVVAG	116 - 135	2195.1	2194.1
	HbB	QADFQKVVAGVANALAHRYH	126 - 145	2195.1	2194.1
	HbB	VLDSFSNGMKHLDDLKGTFA	66 - 85	2195.1	2194.1
	HbB	STADAVMNNPKVKAHGKKVLDS	48 - 69	2310.2	2309.2

Annexe 2 : Liste des séquences peptidiques identifiées dans le digestat gastrique 120 min de l'hémoglobine bovine en mode basse résolution (LR-LC-ESI-MS-MS). L'identification des séquences a été réalisée par le logiciel Peaks 7.0. La recherche en base de données(PEAKS DB) a utilisé les entrées P01966 (chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine) et P02070 (chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine). Les modifications post-traductionnelles ont été identifiées (PEAKS PTM).

Protéine	Séquence	Poids moléculaire (Da)	m/z	$t_{R}(min)$	Début	Fin	Identifié par
P01966 HBA_BOVIN	L.SHGSA(98).Q	456.2	458.4	29.0	50	54	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	F.LANVS.T	502.3	503.3	25.4	130	134	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	E.YGAEA.L	509.2	510.4	23.9	25	29	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	V.GGHAAE.Y	540.2	541.5	18.2	19	24	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	R.VDPVN.F	542.3	543.5	24.1	94	98	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	F.LANVST.V	603.3	604.6	27.4	130	135	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	E.HLDDL.P	611.3	612.6	34.4	73	77	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	K.HLDDL.K	611.3	612.6	34.4	76	80	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	E.YGAEAL.E	622.3	624.7	35.4	25	30	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	L.SELSDL.H	662.3	663.6	39.0	82	87	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	F.LSFPTT.K	664.3	665.7	40.4	35	40	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	L.DDLPGAL.S	699.3	700.6	40.2	75	81	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	L.ANVSTVL.T	702.4	703.6	38.6	131	137	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	H.LDDLPGAL.S	812.4	813.7	44.8	74	81	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	E.HLDDLPGAL.S	949.5	950.8	44.7	73	81	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	V.LSAADKGNVK.A	1001.6	502.1	25.2	3	12	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	V.EHLDDLPGAL.S	1078.5	540.5	44.8	72	81	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	L.ASHLPSDFTPAVH.A	1377.7	690.3	38.0	111	123	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	A.LTKAVEHLDDLPGAL.S	1590.9	796.8	47.9	67	81	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	E.VGGEAL.G	544.3	545.5	32.0	22	27	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	E.FTPVL.Q	575.3	576.6	46.0	121	125	PEAKS DB

P02070 HBB_BOVIN	K.VLDSF.S	579.3	580.5	40.7	66	70	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	K.LLGNVL.V	627.4	628.5	47.2	104	109	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	L.VVYPW.T	662.3	663.6	48.5	32	36	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	F.ESFGDL.S	666.3	667.6	41.6	42	47	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	K.EFTPVL.Q	704.4	705.6	47.3	120	125	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	L.HVDPEN.F	709.3	710.6	19.4	96	101	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	F.KLLGNVL.V	755.5	756.8	46.8	103	109	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	L.VVYPWT.Q	763.4	764.7	45.8	32	37	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	F.FESFGDL.S	813.4	814.6	47.3	41	47	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	L.VVYPWTQ.R	891.4	892.7	43.6	32	38	PEAKS DB

Annexe 3 : Liste des séquences peptidiques identifiées dans le digestat intestinal final de l'hémoglobine bovine en mode basse résolution (LC-LR-ESI-MS-MS). L'identification des séquences a été réalisée par le logiciel Peaks 7.0. La recherche en base de données (PEAKS DB) a utilisé les entrées P01966 (chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine) et P02070 (chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine). Les modifications post-traductionnelles ont été identifiées (PEAKS PTM).

Protéine	Séquence	Poids moléculaire (Da)	m/z	t <sub>R</sub> (min)	Début	Fin	Identifié par
P01966 HBA_BOVIN	РА	186.1	186.9	94.1	120.0	121.0	de novo
P01966 HBA_BOVIN	VAAA	330.2	331.3	17.9	63.0	66.0	de novo
P01966 HBA_BOVIN	AAAL	344.2	173.2	88.8	64.0	66.0	de novo
P01966 HBA_BOVIN	VDPV	428.2	429.4	28.3	94.0	97.0	de novo
P01966 HBA_BOVIN	L.SHGSA.Q	457.2	457.6	29.0	50.0	54.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	L.ANVST.V	490.2	491.5	20.3	131.0	135.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	F.LANVS.T	502.3	503.5	25.4	130.0	134.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	E.YGAEA.L	509.2	510.5	23.9	25.0	29.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	R.VDPVN.F	542.3	543.5	24.0	94.0	98.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	F.LSFPT.T	563.3	565.6	41.1	35.0	39.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	L.DDLPGA.L	586.3	587.5	30.3	75.0	80.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	E.YGAEAL.E	622.3	623.6	35.6	25.0	30.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	L.SELSDL.H	662.3	663.6	38.9	82.0	87.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	K.TYFPH.F	663.3	664.5	33.8	42.0	46.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	F.LSFPTT.K	664.3	665.6	39.8	35.0	40.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	L.SHGS(-18.01)AQV.K	666.3	668.6	29.1	50.0	56.0	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	F.DLSHGS(-18.01)A.Q	667.3	668.6	29.1	48.0	54.0	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	K.LRVDPV.N	697.4	698.7	36.9	92.0	97.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	H.LDDLPGA.L	699.3	700.7	36.1	74.0	80.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	L.DDLPGAL.S	699.3	700.6	39.9	75.0	81.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	A.SHLPSDF.T	801.4	802.4	39.7	112.0	118.0	PEAKS DB

P01966 HBA_BOVIN	H.LDDLPGAL.S	812.4	813.7	44.6	74.0	81.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	E.HLDDLPGAL.S	949.5	950.8	45.4	73.0	81.0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	L.ASHLPSDFT(-18.01).P	955.4	956.7	38.4	111.0	119.0	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	G.KVGGHAAEYG(+14.02).A	1001.5	501.9	31.0	17.0	26.0	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	K.AVEHLDDLPGAL.S	1248.6	625.9	47.2	70.0	81.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	ML	262.1	263.2	29.6	2.0		de novo
P02070 HBB_BOVIN	E.VGGEA.L	431.2	432.4	18.8	22.0	26.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	K.AAVTA.F	431.2	432.4	23.2	8.0	12.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	K.VVAGV.A	443.3	444.5	30.5	132.0	136.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	QVDE	489.2	490.5	23.6	21.0		de novo
P02070 HBB_BOVIN	V.AGVANA.L	501.3	502.5	29.8	134.0	139.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	K.VVAGVA.N	514.3	515.6	29.0	132.0	137.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	E.VGGEAL.G	544.3	546.6	32.1	22.0	27.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	S.FSNGM.K	554.2	556.4	33.3	70.0	74.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	E.KAAVTA.F	559.3	560.6	22.1	7.0	12.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	K.EFTPV.L	591.3	592.6	37.5	120.0	124.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	E.HLDDL.P	611.3	612.6	34.6	73.0	77.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	K.HLDDL.K	611.3	612.6	34.6	76.0	80.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	K.LLGNVL.V	627.4	628.6	47.3	104.0	109.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	L.VVYPW.T	662.3	663.6	48.7	32.0	36.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	V.VYPWT.Q	664.3	666.7	44.2	33.0	37.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	F.ESFGDL.S	666.3	668.7	42.0	42.0	47.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	F.Q(-17.03)KVVAGV.A	682.4	683.7	34.0	130.0	136.0	PEAKS PTM
P02070 HBB_BOVIN	V.KVDEVGG.E	702.4	702.8	40.1	18.0	24.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	L.HVDPEN.F	709.3	710.6	19.7	96.0	101.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	F.Q(-17.03)KVVAGVA.N	753.4	754.7	32.5	130.0	137.0	PEAKS PTM

P02070 HBB_BOVIN	L.DSFSN(+.98)GM.K	757.3	758.3	32.7	68.0	74.0	PEAKS PTM
P02070 HBB_BOVIN	L.VVYPWT.Q	763.4	764.6	45.7	32.0	37.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	K.VDEVGGEA.L	774.3	775.6	26.2	19.0	26.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	L.LVVYPW.T	775.4	776.7	54.6	31.0	36.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	F.FESFGDL.S	813.4	814.6	47.7	41.0	47.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	L.LVVYPWT.Q	876.5	877.7	51.1	31.0	37.0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	L.VVYPWTQ.R	891.4	892.7	43.8	32.0	38.0	PEAKS DB

Chaîne	Séquence peptidique	Poids moléculaire (Da)	Début	Fin	Indice GRAVY	pI
HBA	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAE	2235,18	1	23	-0,065	8,48
	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEY	2398,24	1	24	-0,117	8,41
	VLSAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAE	2655,34	1	27	-0,181	6,73
	SAADKGNVKAAWGKVGGH	1751,91	3	20	-0,533	9,7
	SAADKGNVKAAWGKVGGHAAE	2023,02	3	23	-0,452	8,25
	SAADKGNVKAAWGKVGGHAAEY	2186,09	3	24	-0,491	8,18
	SAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAE	2443,19	3	27	-0,516	6,48
	SAADKGNVKAAWGKVGGHAAEYGAEAL	2627,31	3	29	-0,27	6,48
	LSFPTTKT	893,49	34	41	-0,225	8,75
	LSFPTTKTYFPHF	1584,80	34	46	-0,177	8,6
	PTTKTYFPHF	1237,61	37	46	-0,81	9,01
	TYFPHF	810,37	41	46	-0,2	6,4
	DLSHGSAQVKGHGAKVAA	1731,90	47	64	-0,256	8,61
	DLSHGSAQVKGHGAKVAAA	1802,94	47	65	-0,147	8,61
	DLSHGSAQVKGHGAKVAAAL	1916,02	47	66	0,05	8,61
	DLSHGSAQVKGHGAKVAAALT	2017,07	47	67	0,014	8,61
	DLSHGSAQVKGHGAKVAAALTK	2145,17	47	68	-0,164	9,7
	DLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKA	2216,20	47	69	-0,078	9,7
	DLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVE	2444,31	47	71	-0,044	8,51
	DLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHL	2694,46	47	73	-0,019	8,52
	DLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGAL	3375,79	47	80	-0,003	6,27
	DLSHGSAQVKGHGAKVAAALTKAVEHLDDLPGALSE	3591,86	47	82	-0,122	5,77

Annexe 4: Séquences peptidiques communes aux peptidomes gastriques et intestinaux issues des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine bovine. Les motifs d'acides aminés partagés par plusieurs séquences sont indiqués en gras. HBA : chaîne  $\alpha$ , HBB : chaîne  $\beta$ , pI : point isoélectrique.

ALTKAVEHL	980,57	65	73	0,456	6,79
ALTKAVEHLDDLPGAL	1661,90	65	80	0,281	4,54
LTKAVEHLDDLPGAL	1590,86	66	80	0,18	4,54
TKAVEHLDDLPGAL	1477,78	67	80	-0,079	4,53
TKAVEHLDDLPGALSE	1693,85	67	82	-0,338	4,31
AVEHLDDLPGAL	1248,64	69	80	0,292	4,02
AVEHLDDLPGALSEL	1577,79	69	83	0,2	3,91
VEHLDDLPGAL	1177,60	70	80	0,155	4,02
VEHLDDLPGALSE	1393,67	70	82	-0,2	3,91
HLDDLPGAL	949,49	72	80	0,111	4,2
HLDDLPGALSELSDL	1593,79	72	86	0	3,84
SDLHAHKLRVDPVN	1599,85	84	97	-0,707	6,66
SDLHAHKLRVDPVNF	1746,92	84	98	-0,473	6,66
HAHKLRVDPVNF	1431,77	87	98	-0,55	8,76
KLLSHSLL	909,56	99	106	0,812	8,76
LASHLPSD	838,42	109	116	-0,062	5,08
LASHLPSDFTPAVH	1490,75	109	122	0,2	5,97
ASHLPSDF	872,40	110	117	-0,188	5,08
ASHLPSDFT	973,45	110	118	-0,244	5,08
ASHLPSDFTPAVH	1377,67	110	122	-0,077	5,97
ASHLPSDFTPAVHA	1448,70	110	123	0,057	5,97
ASHLPSDFTPAVHASL	1648,82	110	125	0,237	5,97
ASHLPSDFTPAVHASLDK	1891,94	110	127	-0,2	5,98
ASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVL	2836,48	110	136	0,444	5,98
ASHLPSDFTPAVHASLDKFLANVSTVLTSK	3471,81	110	141	0,22	6,96
FTPAVHASL	941,50	117	125	0,9	6,74

HBB	MLTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEA	2735,38	1	26	0,062	4,58
	MLTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEAL	2848,47	1	27	0,2	4,58
	MLTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRL	3174,67	1	30	0,143	5
	LTAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRL	3043,63	2	30	0,083	5,01
	TAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRF	4220,24	3	40	0,029	5,99
	TAEEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFES	4583,39	3	43	-0,01	5,1
	WGKVKVDEVGGEAL	1485,78	14	27	-0,157	4,68
	WGKVKVDEVGGEALGRL	1811,99	14	30	-0,194	6,18
	LLVVYPWT	989,56	30	37	1,438	5,52
	LVVYPWT	876,47	31	37	1,1	5,52
	LVVYPWTQRF	1307,70	31	40	0,25	8,75
	VVYPWTQRF	1194,62	32	40	-0,144	8,72
	VVYPWTQRFFES	1557,76	32	43	-0,233	5,97
	STADAVMNNPKVKAHGKKVLDS	2309,22	48	69	-0,609	9,52
	STADAVMNNPKVKAHGKKVLDSFSNGMKHLDDLKGTF	4000,03	48	84	-0,597	9,3
	DAVMNNPKVKAHGKKVLDS	2050,10	51	69	-0,721	9,53
	AVMNNPKVKAHGKKVLDS	1935,07	52	69	-0,567	10
	AVMNNPKVKAHGKKVLDSFSNGMKHLDDLKGTF	3625,89	52	84	-0,573	9,7
	FSNGMKHLDDLKGTF	1708,82	70	84	-0,58	6,75
	SELHCDKL <b>HVDPEN</b>	1634,74	88	101	-1,136	4,72
	DKLHVDPENF	1212,58	93	102	-1,19	4,54
	LHVDPENFKLLGNVLVVVL	2117,22	95	113	1,037	5,32
	HVDPENFKLLGNVLVVVL	2004,14	96	113	0,883	5,32
	HVDPENFKLLGNVLVVVLARNFGKE	2806,55	96	120	0,188	6,76
	HVDPENFKLLGNVLVVVLARNFGKEFT	3054,67	96	122	0,252	6,76
	FKLLGNV	789,47	102	108	0,971	8,75

FKLLGNVL	902,56	102	109	1,325	8,75
FKLLGNVLV	1001,63	102	110	1,644	8,75
FKLLGNVLVVVL	1312,85	102	113	2,25	8,75
KLLGNVL	755,49	103	109	1,114	8,75
KLLGNVLV	854,56	103	110	1,5	8,75
ARNFGKEFTPVL	1377,74	114	125	-0,225	8,79

Annexe 5 : Liste des séquences peptidiques identifiées dans les échantillons d'absorption de la digestion dynamique de l'hémoglobine bovine par LC-ESI-MS-MS. L'identification des séquences a été réalisée par le logiciel Peaks 7.0. La recherche en base de données (PEAKS DB) a utilisé les entrées P01966 (chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine) et P02070 (chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine).

Protéine	Séquence	Poids moléculaire (Da)	ppm	m/z	$t_{R}$ (min)	Identifié par	Temps absorption
P01966 HBA_BOVIN	A.SHLPS.D	539.3	-230.7	540.2	21.52	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	A.SHLPSDF.T	801.4	-303.8	401.6	31.98	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	A.SHLPSDFTPA.V	1070.5	-169.2	536.2	33.08	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	AALT	374.2	-98.2	375.2	20.49	DE NOVO	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	E.HLDDLPGA.L	836.4	-223.4	837.2	31.27	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	E.HLDDLPGAL.S	949.5	-103.5	475.7	37.88	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	F.LANVS.T	502.3	-194.5	503.2	23.57	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	H.FDLSHGSA.Q	832.4	-217.9	833.2	29.98	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	HLDDL	498.2	-199.4	499.1	8.79	DE NOVO	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	K.AVEHL.D	567.3	-236.7	568.2	24.86	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	L.ASHLPSDFTPA.V	1141.5	-170.8	571.7	33.47	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	L.SELSDLH.A	799.4	-223.2	800.2	28.62	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	L.SHGSA.Q	457.2	-270.5	458.1	21.88	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	LSDL	446.2	-332.5	447.1	29.22	DE NOVO	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	M.FLSFPT.T	710.4	-225.4	711.2	43.79	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	N.VSTVLTSKY.R	996.5	-136.9	997.4	64.84	PEAKS DB	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	R.VDPVN.F	542.3	-236.1	543.1	22.59	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	AAVT	360.2	-145.3	361.2	9.08	DE NOVO	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	F.FESFGDL.S	813.4	-200.4	814.2	42.93	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	F.GDLSTAD.A	677.3	-253.1	678.1	23.45	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	H.VDPEN.F	572.2	-222.0	573.1	18.83	PEAKS DB	2-3h

P02070 HBB_BOVIN	K.AAVTA.F	431.2	-286.7	432.1	20.74	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	K.LHVDPE.N	708.3	-227.9	709.2	26.56	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	K.LHVDPEN.F	822.4	-230.1	823.2	26.31	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	K.LLGNV.L	514.3	-160.9	515.2	33.07	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	K.VDEVGGEALG.R	944.4	-218.6	945.2	31.65	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	K.VKVDEVGGEA.L	1001.5	-189.3	501.7	27.71	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	K.VVAGV.A	443.3	-302.3	444.1	27.09	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	L.LVVYPW.T	775.4	-212.8	776.3	46.47	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	L.LVVYPWT.Q	876.5	-205.9	877.3	44.84	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	L.QADFQ.K	607.3	-205.2	608.1	24.08	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	L.VVYPW.T	662.3	-247.9	663.2	41.98	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	M.LTAEEK.A	689.4	-225.5	690.2	24.71	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	MLTAEEK.A	820.4	-217.4	821.2	24.69	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	V.VYPWT.Q	664.3	-225.6	665.2	38.59	PEAKS DB	2-3h
P02070 HBB_BOVIN	VAGV	344.2	-289.7	345.1	23.82	DE NOVO	2-3h
P01966 HBA_BOVIN	E.HLDDL.P	611.3	-192.8	612.2	28.01	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	E.YGAEA.L	509.2	-198.4	510.1	22.58	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	F.DLSHGSA.Q	685.3	-218.7	686.2	21.95	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	F.DLSHGSAQ.V	813.4	-239.8	814.2	20.9	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	F.DLSHGSAQV.K	912.4	-221.0	913.2	27.34	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	F.LSFPT.T	563.3	-228.4	564.2	36.74	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	H.LDDLPGAL.S	812.4	-140.7	813.3	40.84	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	K.HLDDL.K	611.3	-192.8	612.2	28.01	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	K.LRVDPV.N	697.4	-230.2	349.6	30.32	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	K.TYFPH.F	663.3	-218.3	664.2	28.89	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.ASHLPS.D	610.3	-241.0	611.2	22.33	PEAKS DB	2-3h et 3-5h

P01966 HBA_BOVIN	L.ASHLPSD.F	725.3	-238.7	726.2	23.46	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.ASHLPSDF.T	872.4	-313.9	437.1	32.64	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.DDLPGA.L	586.3	-229.3	587.1	28.66	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.RVDPV.N	584.3	-235.3	585.2	23.58	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.SDLHA.H	541.2	-197.3	542.2	20.55	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	S.DFTPA.V	549.2	-258.5	550.1	28.49	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	TPAV	386.2	-191.9	387.1	24.27	DE NOVO	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	VAAA	330.2	122.1	331.2	9.25	DE NOVO	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	VDPV	428.2	-217.2	429.1	25	DE NOVO	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	AAVT	360.2	-195.4	361.1	9.03	DE NOVO	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	HLDD	498.2	-199.4	499.1	8.79	DE NOVO	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.EFTPV.L	591.3	151.7	592.4	32.73	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VDEVGGE.A	703.3	-222.4	704.2	24.05	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VDEVGGEA.L	774.3	-218.7	775.2	25.71	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VKVDEV.G	687.4	-225.7	688.2	26.99	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VKVDEVGGE.A	930.5	-193.9	931.3	27.17	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VKVDEVGGEALG.R	1171.6	-178.1	586.7	32.17	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VVAGVA.N	514.3	-199.9	515.2	26.47	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	L.HVDPEN.F	709.3	-212.8	710.2	18.51	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	L.LVVYP.W	589.3	-213.7	590.2	36.28	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	L.VVYPWT.Q	763.4	-194.9	764.2	40.67	PEAKS DB	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	VLDS	432.2	-152.4	433.2	21.53	DE NOVO	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	VVAGV	443.3	-302.3	444.1	27.09	DE NOVO	2-3h et 3-5h
P02070 HBB_BOVIN	VVYP	476.3	-198.3	477.2	29.78	DE NOVO	2-3h et 3-5h
P01966 HBA_BOVIN	A.AALTKAVE.H	801.5	1155.8	803.4	77.32	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	E.HLDDL.P	611.3	-175.8	612.2	27.4	PEAKS DB	3-5h

P01966 HBA_BOVIN	E.YGAEA.L	509.2	-223.6	510.1	21.7	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	F.DLSHGSA.Q	685.3	-187.4	686.2	20.63	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	F.DLSHGSAQ.V	813.4	-267.5	407.6	19.79	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	F.DLSHGSAQV.K	912.4	-174.1	913.3	26.39	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	F.LSFPT.T	563.3	-162.1	564.2	36.82	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	H.LDDLPGAL.S	812.4	-164.9	813.3	40.78	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	K.HLDDL.K	611.3	-175.8	612.2	27.4	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	K.LRVDPV.N	697.4	-124.0	349.7	30.27	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	K.TYFPH.F	663.3	-157.6	664.2	28.51	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.ASHLPS.D	610.3	-177.1	611.2	21.26	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.ASHLPSD.F	725.3	-211.9	726.2	22.09	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.ASHLPSDF.T	872.4	-180.1	873.3	32.57	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.DDLPGA.L	586.3	-177.9	587.2	27.91	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.RVDPV.N	584.3	-149.3	585.2	22.51	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	L.SDLHA.H	541.2	-234.2	542.1	19.72	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	LANV	415.2	-169.4	416.2	25.01	DE NOVO	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	S.DFTPA.V	549.2	-223.6	550.1	27.75	PEAKS DB	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	SDLH	470.2	-163.4	471.1	7.77	DE NOVO	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	TPAV	386.2	-286.0	387.1	23.15	DE NOVO	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	VAAA	330.2	-124.7	331.2	10.68	DE NOVO	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	VDPV	428.2	-203.3	429.1	24	DE NOVO	3-5h
P01966 HBA_BOVIN	YGAE	438.2	-289.3	439.1	19.44	DE NOVO	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	AAVT	360.2	-343.3	361.1	10.46	DE NOVO	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	EFTPV	591.3	-199.0	592.2	32.47	DE NOVO	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	HLDD	498.2	-201.6	499.1	9.53	DE NOVO	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.EFTPV.L	591.3	-207.8	592.2	32.9	PEAKS DB	3-5h

P02070 HBB_BOVIN	K.VDEVGGE.A	703.3	-189.4	704.2	22.74	PEAKS DB	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VDEVGGEA.L	774.3	-170.1	775.2	24.26	PEAKS DB	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VKVDEV.G	687.4	-180.9	688.3	26.02	PEAKS DB	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VKVDEVGGE.A	930.5	-265.0	931.2	25.81	PEAKS DB	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VKVDEVGGEALG.R	1171.6	-216.9	586.7	32.28	PEAKS DB	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	K.VVAGVA.N	514.3	-156.2	515.2	25.45	PEAKS DB	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	KAAV	387.2	-119.6	388.2	5.73	DE NOVO	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	L.HVDPEN.F	709.3	-183.8	710.2	16.9	PEAKS DB	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	L.LVVYP.W	589.3	-179.7	590.2	36.23	PEAKS DB	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	L.VVYPWT.Q	763.4	-175.3	764.3	40.64	PEAKS DB	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	S.FSNGM.K	554.2	-311.0	555.1	26.33	PEAKS DB	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	SELH	484.2	-154.2	485.2	11.63	DE NOVO	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	VLDS	432.2	-201.8	433.1	20.28	DE NOVO	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	VVAGV	443.3	-177.9	444.2	26.25	DE NOVO	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	VVAGVA	514.3	-156.2	515.2	25.45	DE NOVO	3-5h
P02070 HBB_BOVIN	VVYP	476.3	-153.0	477.2	29.41	DE NOVO	3-5h

Annexe 5 : Liste des séquences peptidiques identifiées lors du passage de la solution FBC-3 4 g.L<sup>-1</sup> dans les compartiments apicaux et basolatéraux lors des deux heures de contact avec la monocouche de cellules Caco-2. L'analyse des surnageants a été réalisée par RPLC-MS-MS. L'identification des séquences a été réalisée par le logiciel Peaks 7.0 avec une recherche dans les bases de données P01966 (chaîne  $\alpha$ ) et P02070 (chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine).

Drotóino	Protóine Séquence Poids moléculaire (Da) m/z			Apical		I	Basolatér	al	Solution initiale	
Proteine	Sequence	Poids moleculaire (Da)	III/Z	15 min	30 min	120 min	15 min	30 min	120 min	FBC-3
P01966 HBA_BOVIN	VAAA	330.2	331.2	présent	présent	absent	absent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	YGAE	438.2	439.2	absent	absent	présent	absent	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	KAAVT	488.3	489.3	absent	absent	absent	présent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ANVST	490.2	491.3	présent	présent	absent	absent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	YGAEA	509.2	510.2	absent	présent	présent	absent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VDPVN	542.3	543.3	présent	présent	présent	absent	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	MNNPK	602.3	603.3	présent	absent	absent	présent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNV	602.3	603.3	absent	présent	présent	absent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VGGHAAE	639.3	640.3	présent	absent	présent	absent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SDLHAH	678.3	679.3	présent	absent	présent	présent	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LTAEEK	689.4	345.7	présent	présent	présent	présent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNVK	730.4	366.2	présent	absent	présent	absent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNV	760.4	761.3	présent	présent	présent	absent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SDLHAHK	806.4	404.2	présent	absent	présent	absent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSHGSAQ	813.4	814.4	présent	présent	présent	présent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNVKA	959.5	480.8	présent	absent	présent	absent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SLDK	461.2	462.2	absent	absent	présent	absent	absent	présent	absent
P01966 HBA_BOVIN	DLHAH	591.3	592.3	présent	absent	présent	absent	absent	présent	absent
P01966 HBA_BOVIN	SHGSA	457.2	458.2	absent	absent	présent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	TPAVH	523.3	524.3	présent	absent	absent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	NALAH	524.3	525.3	absent	présent	absent	absent	absent	absent	présent

P01966 HBA_BOVIN	DLSHG	527.2	528.3	absent	présent	présent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DKGNV	531.3	532.3	présent	absent	absent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ASLDK	532.3	533.3	présent	présent	absent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AVMNN	547.2	548.2	présent	absent	absent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	KAAVTA	559.3	560.3	présent	présent	absent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LTAEE	561.3	562.2	présent	absent	présent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	NNPKV	570.3	571.3	absent	absent	présent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	TAEEK	576.3	577.3	présent	présent	présent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SHGSAQ	585.3	586.3	absent	présent	absent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	TAEEKA	647.3	648.3	présent	présent	absent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AADKGNV	673.3	674.3	présent	présent	présent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSHGSA	685.3	686.3	présent	présent	présent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SHGSAQ(+.98)V	685.3	343.7	absent	absent	présent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	EKAAVTA	688.4	689.3	présent	présent	présent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VMNNPK	701.4	702.4	présent	présent	absent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	HVDPEN	709.3	710.3	absent	présent	présent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LTAEEKA	760.4	761.4	présent	présent	présent	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AVMNNPK	772.4	773.4	présent	présent	absent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AADKGNVK	801.4	401.7	présent	absent	présent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNVKA	801.4	802.4	présent	absent	présent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SHGSAQVK	812.4	407.2	absent	présent	absent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNVK	888.5	889.4	présent	absent	présent	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KFL	406.3	204.1	absent	absent	absent	absent	absent	présent	absent
P02070 HBB_BOVIN	AAVTA	431.2	432.6	présent	présent	présent	absent	absent	absent	absent
P02070 HBB_BOVIN	AGVANA	501.3	502.3	présent	absent	absent	absent	absent	absent	absent
P02070 HBB_BOVIN	VVAGVA	514.3	515.3	absent	absent	présent	absent	absent	absent	absent
P01966 HBA_BOVIN	SDLHA	541.2	542.2	absent	absent	présent	absent	absent	absent	absent
P02070 HBB_BOVIN	VDPEN	572.2	573.3	absent	présent	présent	absent	absent	absent	absent

P02070 HBB_BOVIN	VAGVANA	600.3	601.3	présent	absent	absent	absent	absent	absent	absent
P01966 HBA_BOVIN	LSAADK	603.3	302.7	absent	présent	absent	absent	absent	absent	absent
P02070 HBB_BOVIN	EKAAVT	617.3	618.3	absent	absent	présent	absent	absent	absent	absent
P02070 HBB_BOVIN	AVMNNP	644.3	645.3	absent	présent	présent	absent	absent	absent	absent
P02070 HBB_BOVIN	DDLKGT	647.3	648.3	présent	absent	absent	absent	absent	absent	absent
P02070 HBB_BOVIN	STADAVM(+15.99)	709.3	710.3	présent	absent	absent	absent	absent	absent	absent
P01966 HBA_BOVIN	HASLDKF	816.4	28.5	absent	absent	présent	absent	absent	absent	absent
P02070 HBB_BOVIN	VKVDEVGGEALG	1171.6	586.7	présent	absent	absent	absent	absent	absent	absent
P02070 HBB_BOVIN	LHCDKLHVDPEN	1418.7	710.4	présent	absent	absent	absent	absent	absent	absent

Annexe 7 : Liste des séquences peptidiques identifiées au sein de la sous-fraction FBC-3 par LC-MS-MS avec séparation chromatographique sur phase inverse (RP) ou sur HILIC. L'identification des séquences a été réalisée par le logiciel Peaks 7.0. La recherche en base de données (PEAKS DB) a utilisé les entrées P01966 (chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine) et P02070 (chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine). Les modifications post-traductionnelles ont également été recherchées (PEAKS PTM).

Technique chromatographique	Protéine	Séquence	Poids moléculaire (Da)	m/z	$t_{R}$ (min)	Identifié par
	P02070 HBB_BOVIN	AADKGNV	673,3	674,3	10,9	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	AADKGNVK	801,4	401,7	7,6	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	ADKGNV	602,3	603,3	6,3	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	ADKGNVK	730,4	731,4	6,6	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	ADKGNVKA	801,4	802,4	8,3	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	ANVST	490,2	491,2	17,1	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	ASLDK	532,3	533,3	15,0	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	AVEH	454,2	455,2	28,5	de novo
$\sim$	P01966 HBA_BOVIN	AVMNNPK	772,4	387,2	23,7	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	DKGNV	531,3	532,3	6,1	PEAKS DB
SM-	P01966 HBA_BOVIN	DKGNVK	659,4	660,3	6,6	PEAKS DB
ΓC	P01966 HBA_BOVIN	DLSHG	527,2	528,2	15,3	PEAKS DB
018	P01966 HBA_BOVIN	DLSHGSAQ	813,4	814,4	23,0	PEAKS DB
et (	P01966 HBA_BOVIN	DLSHGSAQV	912,4	457,2	21,6	PEAKS DB
[]IC	P01966 HBA_BOVIN	GGHAAE	540,2	541,2	12,8	PEAKS DB
田田田	P01966 HBA_BOVIN	HASLDKF	816,4	817,3	7,9	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	HVDPEN	709,3	710,3	16,8	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	K(sub T)PAVHASLDK	1064,6	533,3	29,4	PEAKS PTM
	P01966 HBA_BOVIN	KAAVT	488,3	489,3	7,9	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	KAVEH	582,3	583,3	45,4	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	LHCDKLHVDPEN	1418,7	710,3	28,2	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	LTAEEK	689,4	690,4	20,7	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	MNNPK	602,3	603,3	10,8	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	PAVH	422,2	423,2	38,3	de novo

	P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNV	760,4	761,4	18,0	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNVK	888,5	889,4	6,9	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNVKA	959,5	480,8	19,9	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	SDLHAH	678,3	679,3	8,0	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	SDLHAHK	806,4	807,4	5,4	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	SHGSAQ	585,3	586,2	25,2	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	SHGSAQVK	812,4	407,2	31,8	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	TAEE	448,2	449,2	24,4	de novo
	P02070 HBB_BOVIN	TAEEK	576,3	577,3	22,1	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	TAEEKA	647,3	648,4	5,6	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	TKAVE	546,3	547,3	6,1	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	TPAVH	523,3	524,3	18,8	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	VAAA	330,2	331,2	22,4	de novo
	P02070 HBB_BOVIN	VDPVN	542,3	543,3	16,0	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	VGGHAAE	639,3	640,3	11,2	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	VKAHGK	638,4	320,2	30,0	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	VLSA	388,2	389,2	19,4	de novo
	P02070 HBB_BOVIN	VLTSK	546,3	274,2	23,8	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	VMNNPK	701,4	702,4	20,0	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	VVAGVA	514,3	515,4	14,1	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	YGAE	438,2	439,2	22,0	de novo
	P02070 HBB_BOVIN	YGAEA	509,2	510,2	28,3	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN	AAEYGAE	709,3	710,3	32,5	PEAKS DB
	P01966 HBA_BOVIN	AALA(sub T)KAVEH	908,5	455,2	41,0	PEAKS PTM
MS	P01966 HBA_BOVIN	AEEKA	546,3	547,2	28,6	PEAKS DB
I-SI	P01966 HBA_BOVIN	AGVAN	430,2	431,3	17,1	PEAKS DB
C-N	P02070 HBB_BOVIN	AHGKKV	638,4	320,2	33,9	PEAKS DB
HILI	P01966 HBA_BOVIN	ALTK(+42,01)AVEH	909,5	455,2	17,7	PEAKS PTM
щ	P01966 HBA_BOVIN	AVHAS	483,2	242,1	7,1	PEAKS PTM
	P02070 HBB_BOVIN	AVMNN	547,2	274,2	32,9	PEAKS DB

P02070 HBB_BOVIN	AVTAFWGKV	977,5	489,7	36,9	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	DLSHGSA	685,3	686,3	26,7	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	EKAAVTA	688,4	689,4	24,9	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	FPHFDLSHG	1055,5	528,2	19,0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	G(+27,99)KVGGHAAE	852,4	427,2	10,7	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	GHGAKVA	638,4	320,7	18,3	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	GSAQV	460,2	461,2	17,3	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	HGSAQVK	725,4	363,1	46,1	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	HVDPENFK(+57,02)L	1154,6	578,3	23,2	PEAKS PTM
P02070 HBB_BOVIN	KAAV	387,2	388,2	38,3	de novo
P01966 HBA_BOVIN	KAAVTA	559,3	560,3	17,5	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	KVGGHAA	638,4	320,2	28,1	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	LLVTLASH	852,5	427,2	17,2	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	LSE(+28,03)LSDLH	940,5	471,2	29,3	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	LTAEE	561,3	562,3	29,6	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	LTAEEKA	760,4	761,4	28,3	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	LVTLASHL	852,5	427,2	17,2	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	NALAH	524,3	525,3	17,0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	NNPKV	570,3	571,3	19,1	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	NNPKVKAH	906,5	454,3	29,5	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	Q(sub T)PAVHASLDK	1064,6	533,3	32,3	SPIDER
P01966 HBA_BOVIN	QVKGHGAK	823,5	412,2	37,0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	SFSNGM	641,2	321,1	5,1	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	SHGSA	457,2	458,2	26,7	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	SHGSAQV	684,3	343,7	21,6	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	STADA	463,2	464,2	10,6	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	TKAVEH	683,4	342,7	27,1	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	TKAVEHLDDLPGAL	1477,8	740,4	41,2	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	VGGH	368,2	369,2	22,3	de novo
P02070 HBB_BOVIN	VLARN	571,3	573,2	28,6	PEAKS DB
•					

P02070 HBB_BOVIN	VVAGVAN	628,4	315,1	38,0	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	A(+42,01)QVKGHGAK	936,5	469,2	45,6	PEAKS PTM
P02070 HBB_BOVIN	AALSE	489,2	490,2	14,4	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	AAVT	360,2	361,2	9,6	de novo
P02070 HBB_BOVIN	AAVTA	431,2	433,2	23,5	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	AEEK	475,2	476,2	21,1	de novo
P02070 HBB_BOVIN	AGVA	316,2	317,2	8,4	de novo
P02070 HBB_BOVIN	AGVANA	501,3	502,2	24,2	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	ALAH	410,2	411,2	6,9	de novo
P02070 HBB_BOVIN	ANALA	458,2	459,3	15,3	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	ANVSTV	589,3	590,3	23,5	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	AQVK(+42,01)GHGAK	936,5	469,2	53,7	PEAKS PTM
P02070 HBB_BOVIN	ASHLPSDF	872,4	437,2	20,4	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	ASHLPSDFTPA	1141,5	571,9	21,4	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	ASHLPSDFTPAVH	1377,7	689,4	30,2	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	AVMNNPKV	871,5	436,8	22,1	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	AVTA	360,2	361,2	15,8	de novo
P01966 HBA_BOVIN	DAVMNNPKV	986,5	494,3	24,0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	DDLPGA	586,3	587,2	24,5	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	DFTPA	549,2	550,2	23,0	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	DKLHVDPEN	1065,5	533,8	31,4	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	DLSH	470,2	471,2	7,6	de novo
P01966 HBA_BOVIN	DLSHGS	614,3	615,3	15,7	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	EFTPV	591,3	592,4	22,9	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	ERMFLSFPT	1126,5	564,3	19,7	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	FDLSHGSAQ	960,4	481,3	22,1	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	FDLSHGSAQV	1059,5	530,9	21,1	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	FDLSHGSAQVK	1187,6	594,8	26,3	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	FPHFDLSHGSAQ	1341,6	671,8	26,4	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	FPHFDLSHGSAQV	1440,7	721,3	25,7	PEAKS DB
	P02070 HBB_BOVIN       P01966 HBA_BOVIN       P02070 HBB_BOVIN       P01966 HBA_BOVIN       P01966 HB	P02070 HBB_BOVINVVAGVANP01966 HBA_BOVINA(+42,01)QVKGHGAKP02070 HBB_BOVINAALSEP02070 HBB_BOVINAAVTAP02070 HBB_BOVINAAVTAP02070 HBB_BOVINAEEKP02070 HBB_BOVINAGVAP02070 HBB_BOVINAGVANAP02070 HBB_BOVINAGVANAP02070 HBB_BOVINAALAHP02070 HBB_BOVINANALAP01966 HBA_BOVINANVSTVP01966 HBA_BOVINAQVK(+42,01)GHGAKP02070 HBB_BOVINASHLPSDFP01966 HBA_BOVINASHLPSDFTPAP01966 HBA_BOVINASHLPSDFTPAP01966 HBA_BOVINAVTAP01966 HBA_BOVINAVTAP01966 HBA_BOVINDLPGAP01966 HBA_BOVINDLPGAP01966 HBA_BOVINDLSHP01966 HBA_BOVINDLSHP01966 HBA_BOVINEFTPVP01966 HBA_BOVINEFTPVP01966 HBA_BOVINFDLSHGSAQVP01966 HBA_BOVINFDLSHGSAQVP01966 HBA_BOVINFDLSHGSAQVKP01966 HBA_BOVINFDLSHGSAQVK	P02070[HBB_BOVIN     VVAGVAN     628,4       P01966[HBA_BOVIN     A(+42,01)QVKGHGAK     936,5       P02070[HBB_BOVIN     AALSE     489,2       P02070[HBB_BOVIN     AAVT     360,2       P02070[HBB_BOVIN     AAVTA     431,2       P02070[HBB_BOVIN     AAVTA     431,2       P02070[HBB_BOVIN     AEEK     475,2       P02070[HBB_BOVIN     AGVA     316,2       P02070[HBB_BOVIN     AGVANA     501,3       P02070[HBB_BOVIN     AGVANA     501,3       P02070[HBB_BOVIN     ALAH     410,2       P02070[HBB_BOVIN     ALAH     410,2       P02070[HBB_BOVIN     ANXLA     458,2       P01966[HBA_BOVIN     ANVSTV     589,3       P01966[HBA_BOVIN     AQVK(+42,01)GHGAK     936,5       P02070[HBB_BOVIN     ASHLPSDFTPA     1141,5       P01966[HBA_BOVIN     ASHLPSDFTPA     1141,5       P01966[HBA_BOVIN     AVTA     360,2       P01966[HBA_BOVIN     DAVMNNPKV     986,5       P01966[HBA_BOVIN     DAVMNNPKV     986,5 <t< td=""><td>P02070 HBB_BOVIN     VVAGVAN     628,4     315,1       P01966 HBA_BOVIN     A(+42,01)QVKGHGAK     936,5     469,2       P02070 HBB_BOVIN     AALSE     489,2     490,2       P02070 HBB_BOVIN     AAVT     360,2     361,2       P02070 HBB_BOVIN     AAVTA     431,2     433,2       P02070 HBB_BOVIN     AEEK     475,2     476,2       P02070 HBB_BOVIN     AGVA     316,2     317,2       P02070 HBB_BOVIN     AGVANA     501,3     502,2       P02070 HBB_BOVIN     ALAH     410,2     411,2       P02070 HBB_BOVIN     ALAH     458,2     459,3       P01966 HBA_BOVIN     ANVSTV     589,3     590,3       P01966 HBA_BOVIN     AVK(+42,01)GHGAK     936,5     469,2       P02070 HBB_BOVIN     ASHLPSDF     872,4     437,2       P01966 HBA_BOVIN     ASHLPSDFTPA     1141,5     571,9       P01966 HBA_BOVIN     AVMNPKV     871,5     436,8       P02070 HBB_BOVIN     AVMNNPKV     871,5     436,8       P02070 HBB_BOVIN</td><td>P02070 HBB_BOVIN     VVAGVAN     628,4     315,1     38,0       P01966 HBA_BOVIN     A(+42,01)QVKGHGAK     936,5     469,2     45,6       P02070 HBB_BOVIN     AALSE     489,2     490,2     14,4       P02070 HBB_BOVIN     AAVT     360,2     361,2     9,6       P02070 HBB_BOVIN     AAVT     431,2     433,2     23,5       P02070 HBB_BOVIN     AAEEK     475,2     476,2     21,1       P02070 HBB_BOVIN     AGVA     316,2     317,2     8,4       P02070 HBB_BOVIN     AGVA     501,3     502,2     24,2       P02070 HBB_BOVIN     ALAH     410,2     411,2     6,9       P02070 HBB_BOVIN     ALAH     410,2     411,2     6,9       P02070 HBB_BOVIN     ANVSTV     589,3     590,3     23,5       P01966 HBA_BOVIN     AVK(+42,01)GHGAK     936,5     469,2     53,7       P02070 HBB_BOVIN     ASHLPSDFTPA     1141,5     571,9     21,4       P01966 HBA_BOVIN     ASHLPSDFTPA     1141,5     571,9     21,4 </td></t<>	P02070 HBB_BOVIN     VVAGVAN     628,4     315,1       P01966 HBA_BOVIN     A(+42,01)QVKGHGAK     936,5     469,2       P02070 HBB_BOVIN     AALSE     489,2     490,2       P02070 HBB_BOVIN     AAVT     360,2     361,2       P02070 HBB_BOVIN     AAVTA     431,2     433,2       P02070 HBB_BOVIN     AEEK     475,2     476,2       P02070 HBB_BOVIN     AGVA     316,2     317,2       P02070 HBB_BOVIN     AGVANA     501,3     502,2       P02070 HBB_BOVIN     ALAH     410,2     411,2       P02070 HBB_BOVIN     ALAH     458,2     459,3       P01966 HBA_BOVIN     ANVSTV     589,3     590,3       P01966 HBA_BOVIN     AVK(+42,01)GHGAK     936,5     469,2       P02070 HBB_BOVIN     ASHLPSDF     872,4     437,2       P01966 HBA_BOVIN     ASHLPSDFTPA     1141,5     571,9       P01966 HBA_BOVIN     AVMNPKV     871,5     436,8       P02070 HBB_BOVIN     AVMNNPKV     871,5     436,8       P02070 HBB_BOVIN	P02070 HBB_BOVIN     VVAGVAN     628,4     315,1     38,0       P01966 HBA_BOVIN     A(+42,01)QVKGHGAK     936,5     469,2     45,6       P02070 HBB_BOVIN     AALSE     489,2     490,2     14,4       P02070 HBB_BOVIN     AAVT     360,2     361,2     9,6       P02070 HBB_BOVIN     AAVT     431,2     433,2     23,5       P02070 HBB_BOVIN     AAEEK     475,2     476,2     21,1       P02070 HBB_BOVIN     AGVA     316,2     317,2     8,4       P02070 HBB_BOVIN     AGVA     501,3     502,2     24,2       P02070 HBB_BOVIN     ALAH     410,2     411,2     6,9       P02070 HBB_BOVIN     ALAH     410,2     411,2     6,9       P02070 HBB_BOVIN     ANVSTV     589,3     590,3     23,5       P01966 HBA_BOVIN     AVK(+42,01)GHGAK     936,5     469,2     53,7       P02070 HBB_BOVIN     ASHLPSDFTPA     1141,5     571,9     21,4       P01966 HBA_BOVIN     ASHLPSDFTPA     1141,5     571,9     21,4

P02070 HBB_BOVIN	FSNGM(+15,99)	570,2	571,2	20,2	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	GAEAL	459,2	460,2	23,8	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	GGHAA	411,2	412,2	6,2	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	GHGAK	468,2	469,2	49,1	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	HGSAQ(+,98)VK(+42,01)GH	962,5	482,3	25,4	PEAKS PTM
P02070 HBB_BOVIN	HLDDLKG	796,4	399,2	29,3	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	HLDDLKGT	897,5	449,7	24,2	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	HLDDLKGTFAA	1186,6	594,3	19,5	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	HVDPENFK	984,5	493,2	26,0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	KAVEHL	695,4	348,7	25,5	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	KLLSH	596,4	299,2	41,8	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	KLRVDPV	825,5	413,7	44,9	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	KTYFPH	791,4	396,7	40,7	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	LLGNV	514,3	515,4	13,7	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	LRVDPV	697,4	349,7	17,9	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	LRVDPVN	811,5	406,7	28,1	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	LSAADKGNVK	1001,6	501,8	41,9	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	LSDLHAHK	919,5	460,7	38,6	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	LSFPTTKTYFPH	1437,7	720,3	34,1	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	LSTAD	505,2	506,2	22,3	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	LTAE	432,2	433,2	22,2	de novo
P02070 HBB_BOVIN	M(+15,99)KHLDDLKGT	1172,6	587,3	38,6	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	M(sub P)TTKTYFPH	1124,5	563,2	21,1	SPIDER
P01966 HBA_BOVIN	MLTAEEK	820,4	411,2	20,2	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	QVKGH	567,3	284,2	46,6	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	SDLH	470,2	471,2	5,6	de novo
P02070 HBB_BOVIN	SELHC(+47,98)DK	878,3	879,3	15,5	PEAKS PTM
P01966 HBA_BOVIN	SELSDLH	799,4	400,6	26,1	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	SELSDLHAHK	1135,6	568,8	31,3	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	SFPTT	551,3	552,2	14,7	PEAKS DB

P01966 HBA_BOVIN	SLDK	461,2	462,2	15,0	de novo
P01966 HBA_BOVIN	STADAVMNNPK	1146,5	574,2	25,1	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	VGGHAA	510,3	511,2	6,2	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	VHASLDK	768,4	385,2	25,7	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	VKAHG	510,3	510,3	25,5	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	VKVDEVGGEA	1001,5	501,8	21,0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	VKVDEVGGEALG	1171,6	586,8	21,0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	VLSAADK	702,4	352,2	20,9	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	VLSAADKGNV	972,5	487,3	21,8	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	VLSAADKGNVK	1100,6	551,3	27,0	PEAKS DB
P01966 HBA_BOVIN	VLSAADKGNVKA	1171,7	586,8	39,8	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	VVAG	344,2	345,2	15,4	de novo
P02070 HBB_BOVIN	VVAGV	443,3	444,4	13,8	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	VVAGVANALAHRYH	1476,8	739,4	45,4	PEAKS DB
P02070 HBB_BOVIN	VVYPW	662,3	663,3	11,3	PEAKS DB

Annexe 8 : Liste des séquences identifiées dans les compartiments apicaux et basolatéraux de l'expérience de passage de la monocouche de cellules Caco-2. La présence (bleu) ou l'absence (rose) de chaque séquence dans chaque compartiment a été reportée dans le tableau ainsi que la (les) technique(s) chromatographique(s) qui a (ont) permis de l'identifier. L'identification des séquences a été réalisée par LC-MS-MS et couplée au logiciel Peaks 7. La recherche en base de données a utilisé les entrées P01966 (chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine) et P02070 (chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine).

	Liste des peptides détec	Techniques chro	matographiques Compartiment		oartiments		
Protéine	Séquence	Poids moléculaire (Da)	m/z	C <sub>18</sub>	HILIC	apical	basolatéral
P01966 HBA_BOVIN	AADKGNV	673,3	674,3	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AADKGNVK	801,4	401,8	présent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNV	602,3	603,3	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNVK	730,4	731,4	présent	présent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AGVANA	501,3	502,2	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ALTK(+42,01)AVEH	909,5	455,3	absent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ANVST	490,2	491,3	absent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ASLDK	532,3	533,3	présent	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AVTA	360,2	361,2	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DKGNV	531,3	532,3	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DKGNVK	659,4	330,7	absent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSHG	527,2	528,2	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSHGSAQ	813,4	814,4	présent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	FPHFDLSHG	1055,5	528,3	absent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GGHAA	411,2	412,2	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GGHAAE	540,2	541,2	présent	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	HVDPEN	709,3	710,4	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	K(sub T)PAVHASLDK	1064,6	533,3	absent	présent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	KAAVT	488,3	489,3	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KAVEH	582,3	292,2	absent	présent	présent	présent

P01966 HBA_BOVIN	KVGGHAA	638,4	320,2	absent	présent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LHCDKLHVDPEN	1418,7	710,3		présent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LTAE	432,2	433,2	présent	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LTAEEK	689,4	345,7	présent	présent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	MNNPK	602,3	603,3	présent	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	NNPKVKAH	906,5	454,3		présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	PGALS	443,2	443,3		présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNV	760,4	381,2	présent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNVK	888,5	889,4	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SDLHAH	678,3	679,3	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SDLHAHK	806,4	807,4	présent	présent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	SELHC(+47,98)DK	878,3	879,3	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SHGSA	457,2	458,2	présent	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	TAEE	448,2	449,2		présent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	TAEEK	576,3	577,3	présent	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	TAEEKA	647,3	648,3	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	TKAVE	546,3	547,3	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	TKAVEH	683,4	342,7		présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	TPAVH	523,3	524,3	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VAAA	330,2	331,2	présent	présent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VDPEN	458,2	459,2	présent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VGGHAA	510,3	511,2	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VGGHAAE	639,3	640,3	présent	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VKAHG	510,3	511,3		présent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VKAHGK	638,4	320,2		présent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VMNNPK	701,4	702,4	présent	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VVAG	484,2	485,2	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	YGAE	470,2	471,2	présent	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	YGAEA	509,2	510,2	absent	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	A(+42,01)QVKGHGAK	936,5	469,2	absent	absent	présent	absent
-							

P01966 HBA_BOVIN	ALTKAV	601,4	302,2		présent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	DLHAH	591,3	592,2	présent	absent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	GAKVAAA(-,98)	585,4	293,1		présent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	GKVGGH	553,3	277,7		présent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	H(+15,99)GSAQVKGHG	992,5	497,3		présent	présent	
P02070 HBB_BOVIN	HVDP	466,2	467,2	présent	absent	présent	
P02070 HBB_BOVIN	HVDPE	595,3	596,3	présent	absent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	KAAWGK	659,4	660,3	présent	absent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	LSHGS	499,2	499,3	présent	absent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	PG(sub A)VHASLDK	922,5	462,3		présent	présent	
P02070 HBB_BOVIN	SELH	344,2	345,2	présent	absent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	SLDH	438,2	439,2	présent	absent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	T(-18,01)PAVH	505,3	252,9		présent	présent	
P02070 HBB_BOVIN	VDPE	458,2	459,2	présent	absent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	WGKVGGHA	810,4	811,4		présent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	AALA(sub T)KAVEH	908,5	455,2		absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AALSE	489,2	490,2		absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AALTKAVE	801,5	402,1		absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AAVT	360,2	361,2		absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AAVTA	431,2	433,2		absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNVKA	801,4	401,7		absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AEEK	475,2	476,2		absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AEEKA	546,3	547,2		absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AGVA	316,2	317,1		absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AGVAN	430,2	431,3		absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AHGKKV	638,4	320,2		absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	ALAH	410,2	411,2		absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	ANALA	458,2	459,3		absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ANVSTV	589,3	590,3		absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AQVK(+42,01)GHGAK	936,5	469,2	absent	absent	absent	présent

P02070 HBB_BOVIN	ASHLPSDF	872,4	437,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ASHLPSDFTPA	1141,5	571,9	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ASHLPSDFTPAVH	1377,7	689,4	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AVEH	454,2	455,2	absent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AVHAS	483,2	242,1	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AVMNN	547,2	548,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AVMNNPK	772,4	387,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AVMNNPKV	871,5	436,8	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AVTAF	507,3	255,2	absent	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AVTAFWGKV	977,5	489,7	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	D(+43,01)LHAH	634,3	634,8	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DAVMNNPKV	986,5	494,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DDLPGA	586,3	587,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DFTPA	549,2	550,2	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	DKLHVDPEN	1065,5	533,8	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSH	470,2	471,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSHGS	614,3	615,3	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	DLSHGSA	685,3	686,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSHGSAQV	912,4	457,2	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	EFTPV	591,3	592,4	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	EKAAVTA	688,4	689,4	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ERMFLSFPT	1126,5	564,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	FDLSHGSAQ	960,4	481,3	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	FDLSHGSAQV	1059,5	530,9	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	FDLSHGSAQVK	1187,6	594,8	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	FPHFDLSHGSAQ	1341,6	671,8	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	FPHFDLSHGSAQV	1440,7	721,3	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	FSNGM(+15,99)	570,2	571,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	G(+27,99)KVGGHAAE	852,4	427,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GAEAL	459,2	460,2	absent	absent	absent	présent

P01966 HBA_BOVIN	GHGAK	468,2	469,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GHGAKVA	638,4	320,7	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GSAQV	460,2	461,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HASLDKF	816,4	817,3	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	HCN(sub D)KLHVDPE	1190,6	596,2	absent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HGAKV	510,3	256,2	absent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HGSAQ(+,98)VK(+42,01)GH	962,5	482,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HGSAQVK	725,4	363,1	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	HLDDLKG	796,4	399,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HLDDLKGT	897,5	449,7	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HLDDLKGTFAA	1186,6	594,3	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	HRYH	611,3	306,6	absent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HVDPENFK	984,5	493,2	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	HVDPENFK(+57,02)L	1154,6	578,3	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	KAAV	387,2	388,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KAAVTA	559,3	560,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KAVEHL	695,4	348,7	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KGNVK	544,3	273,2	absent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KLLSH	596,4	299,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KLRVDPV	825,5	413,7	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KTYFPH	791,4	396,7	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KVGGHA	567,3	566,9	absent	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	KVKAHG	638,4	320,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	L(+27,99)SELSDLH	940,5	471,2	absent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LLGNV	514,3	515,4	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LLVTLASH	852,5	427,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LRVDPV	697,4	349,7	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LRVDPVN	811,5	406,7	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LSAADKGNVK	1001,6	501,8	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LSDLHAHK	919,5	460,7	absent	absent	absent	présent

P01966 HBA_BOVIN	LSE(+28,03)LSDLH	940,5	471,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LSFPTTKTYFPH	1437,7	720,3	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LSTAD	505,2	506,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LTAEE	561,3	562,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LTAEEKA	760,4	761,4	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LVTLASHL	852,5	427,2	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	M(+15,99)KHLDDLKGT	1172,6	587,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	M(sub P)TTKTYFPH	1124,5	563,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	MLTAEEK	820,4	411,2	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	NALAH	524,3	525,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	NNPKV	570,3	571,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	PAVH	422,2	423,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	Q(sub T)PAVHASLDK	1064,6	533,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	QVKGH	567,3	284,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	QVKGHGAK	823,5	412,2	absent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNVKA	959,5	480,8	absent	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SDLH	470,2	471,2	présent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SELSDLH	799,4	400,6	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SELSDLHAHK	1135,6	568,8	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SFPTT	551,3	552,2	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	SFSNGM	641,2	321,1	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SHGSAQ	585,3	586,2	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	SHGSAQV	684,3	343,7	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	SHGSAQVK	812,4	407,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SLDK	461,2	462,2	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	STADA	463,2	464,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	STADAVMNNPK	1146,5	574,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	TKAVEHLDDLPGAL	1477,8	740,4	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VDPVN	542,3	543,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VGGH	368,2	369,2	absent	absent	absent	présent

P02070 HBB_BOVIN	VHASLDK	768,4	385,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VKVDEVGGEA	1001,5	501,8	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VKVDEVGGEALG	1171,6	586,8	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VLARN	571,3	573,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VLSA	388,2	389,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VLSAADK	702,4	352,2	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VLSAADKGNV	972,5	487,3	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VLSAADKGNVK	1100,6	551,3	absent	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VLSAADKGNVKA	1171,7	586,8	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VLTSK	546,3	274,2	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VTAFW	622,3	623,0	absent	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VVAGV	443,3	444,4	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VVAGVA	514,3	515,3	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VVAGVAN	628,4	315,1	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VVAGVANALAHRYH	1476,8	739,4	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VVVLAR	655,4	329,0	absent	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VVYPW	662,3	663,3	absent	absent	absent	présent

Annexe 9: Liste des séquences identifiées au moins une fois dans le compartiment basolatéral de l'expérience de passage de la monocouche de cellules Caco-2. La présence (bleu) ou l'absence (rose) de chaque séquence dans chaque compartiment a été reportée dans le tableau ainsi que la (les) technique(s) chromatographique(s) qui a (ont) permis de l'identifier. L'identification des séquences a été réalisée par LC-MS-MS et couplée au logiciel Peaks 7. La recherche en base de données a utilisé les entrées P01966 (chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine bovine) et P02070 (chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine bovine)

Liste	Liste des peptides détectés dans le compartiment basolatéral     Protéine   Séquence   Poids moléculaire (Da)   m/z					FBC-3
Protéine	Séquence	Poids moléculaire (Da)	m/z	C <sub>18</sub>	HILIC	Liste finale
P01966 HBA_BOVIN	ANVST	490.2	491.3	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VAAA	330.2	331.2	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	YGAE	438.2	439.2	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNV	760.4	761.3	présent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNV	602.3	603.3	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	KAAVT	488.3	489.3	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LTAEEK	689.4	345.7	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	MNNPK	602.3	603.3	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNVK	730.4	366.2	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SDLHAH	678.3	679.3	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SDLHAHK	806.4	404.2	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSHGSAQ	813.4	814.4	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNVKA	959.5	480.8	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	YGAEA	509.2	510.2	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VDPVN	542.3	543.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VGGHAAE	639.3	640.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSHG	527.2	528.2	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	HVDPEN	709.3	710.4	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SDLH	470.2	471.2	présent	absent	présent

P01966 HBA_BOVIN	AADKGNV	673.3	674.3	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AGVANA	501.3	502.2	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LTAE	432.2	433.2	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SAADKGNVK	888.5	889.4	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	TKAVE	546.3	547.3	présent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VGGHAA	510.3	511.3	présent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AGVA	316.2	317.1	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VVAG	344.2	345.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AADKGNVK	801.4	401.7	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KVGGHAA	638.4	320.7	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LHCDKLHVDPEN	1418.7	710.3	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	TKAVEH	683.4	342.7	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DKGNVK	659.4	330.7	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KVGGHA	567.3	566.9	absent	présent	absent
P02070 HBB_BOVIN	AHGKKV	638.4	320.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VKAHGK	638.4	320.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	KVKAHG	638.4	320.2	absent	absent	absent
P01966 HBA_BOVIN	ADKGNVKA	801.4	401.7	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VDPEN	572.2	573.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AALTKAVE	801.5	402.1	absent	absent	absent
P01966 HBA_BOVIN	D(+43.01)LHAH	634.3	634.8	absent	absent	absent
P02070 HBB_BOVIN	NNPKVKAH	906.5	454.3	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AVEH	454.2	455.2	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KAVEH	582.3	292.1	absent	présent	présent
P01966 HBA_BOVIN	QVKGHGAK	823.5	412.2	absent	présent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AVTAF	507.3	255.2	absent	présent	absent
P02070 HBB_BOVIN	HCN(sub D)KLHVDPE	1190.6	596.2	absent	présent	absent
P02070 HBB_BOVIN	HRYH	611.3	306.6	absent	présent	absent
P01966 HBA_BOVIN	KGNVK	544.3	273.2	absent	présent	absent
------------------	-------------------	--------	-------	--------	---------	---------
P01966 HBA_BOVIN	L(+27.99)SELSDLH	940.5	471.2	absent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	PGALS	443.2	443.2	absent	présent	
P02070 HBB_BOVIN	VTAFW	622.3	623.0	absent	présent	
P01966 HBA_BOVIN	FPHFDLSHG	1055.5	528.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VVVLAR	655.4	329.0	absent	absent	
P01966 HBA_BOVIN	A(+42.01)QVKGHGAK	936.5	469.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AALA(sub T)KAVEH	908.5	455.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AALSE	489.2	490.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AAVT	360.2	361.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AAVTA	431.2	433.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AEEK	475.2	476.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AEEKA	546.3	547.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AGVAN	430.2	431.3	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	ALAH	410.2	411.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ALTK(+42.01)AVEH	909.5	455.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	ANALA	458.2	459.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ANVSTV	589.3	590.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AQVK(+42.01)GHGAK	936.5	469.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	ASHLPSDF	872.4	437.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ASHLPSDFTPA	1141.5	571.9	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ASHLPSDFTPAVH	1377.7	689.4	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	ASLDK	532.3	533.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AVHAS	483.2	242.1	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AVMNN	547.2	548.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AVMNNPK	772.4	387.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	AVMNNPKV	871.5	436.8	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	AVTA	360.2	361.2	absent	absent	présent

			1			
P02070 HBB_BOVIN	AVTAFWGKV	977.5	489.7	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DAVMNNPKV	986.5	494.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DDLPGA	586.3	587.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DFTPA	549.2	550.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DKGNV	531.3	532.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	DKLHVDPEN	1065.5	533.8	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSH	470.2	471.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSHGS	614.3	615.3	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	DLSHGSA	685.3	686.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	DLSHGSAQV	912.4	457.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	EFTPV	591.3	592.4	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	EKAAVTA	688.4	689.4	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	ERMFLSFPT	1126.5	564.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	FDLSHGSAQ	960.4	481.3	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	FDLSHGSAQV	1059.5	530.9	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	FDLSHGSAQVK	1187.6	594.8	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	FPHFDLSHGSAQ	1341.6	671.8	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	FPHFDLSHGSAQV	1440.7	721.3	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	FSNGM(+15.99)	570.2	571.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	G(+27.99)KVGGHAAE	852.4	427.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GAEAL	459.2	460.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GGHAA	411.2	412.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GGHAAE	540.2	541.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GHGAK	468.2	469.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GHGAKVA	638.4	320.7	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	GSAQV	460.2	461.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HASLDKF	816.4	817.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HGSAQ(+.98)VK(+42.01)GH	962.5	482.3	absent	absent	présent

P01966 HBA_BOVIN	HGSAQVK	725.4	363.1	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	HLDDLKG	796.4	399.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HLDDLKGT	897.5	449.7	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HLDDLKGTFAA	1186.6	594.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	HVDPENFK	984.5	493.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	HVDPENFK(+57.02)L	1154.6	578.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	K(sub T)PAVHASLDK	1064.6	533.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	K(sub T)PAVHASLDK	1064.6	533.3	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	KAAV	387.2	388.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KAAVTA	559.3	560.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KAVEHL	695.4	348.7	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KLLSH	596.4	299.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KLRVDPV	825.5	413.7	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	KTYFPH	791.4	396.7	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LLGNV	514.3	515.4	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LLVTLASH	852.5	427.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LRVDPV	697.4	349.7	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LRVDPVN	811.5	406.7	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LSAADKGNVK	1001.6	501.8	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LSDLHAHK	919.5	460.7	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LSE(+28.03)LSDLH	940.5	471.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LSFPTTKTYFPH	1437.7	720.3	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	LSTAD	505.2	506.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LTAEE	561.3	562.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LTAEEKA	760.4	761.4	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	LVTLASHL	852.5	427.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	M(+15.99)KHLDDLKGT	1172.6	587.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	M(sub P)TTKTYFPH	1124.5	563.2	absent	absent	présent

P01966 HBA_BOVIN	MLTAEEK	820.4	411.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	NALAH	524.3	525.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	NNPKV	570.3	571.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	PAVH	422.2	423.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	Q(sub T)PAVHASLDK	1064.6	533.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	QVKGH	567.3	284.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	SELHC(+47.98)DK	878.3	879.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SELSDLH	799.4	400.6	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SELSDLHAHK	1135.6	568.8	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SFPTT	551.3	552.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	SFSNGM	641.2	321.1	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SHGSA	457.2	458.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SHGSAQ	585.3	586.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	SHGSAQV	684.3	343.7	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	SHGSAQVK	812.4	407.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	SLDK	461.2	462.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	STADA	463.2	464.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	STADAVMNNPK	1146.5	574.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	TAEE	448.2	449.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	TAEEK	576.3	577.3	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	TAEEKA	647.3	324.7	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	TKAVEHLDDLPGAL	1477.8	740.4	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	TPAVH	523.3	524.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VGGH	368.2	369.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VHASLDK	768.4	385.2	absent	absent	présent
P02070 HBB_BOVIN	VKAHG	510.3	510.3	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VKVDEVGGEA	1001.5	501.8	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VKVDEVGGEALG	1171.6	586.8	absent	absent	présent

P02070 HBB_BOVIN	VLARN	571.3	573.2	absent	absent	présent
P01966 HBA_BOVIN	VLSA	388.2	389.2	absent		présent
P01966 HBA_BOVIN	VLSAADK	702.4	352.2	absent		présent
P01966 HBA_BOVIN	VLSAADKGNV	972.5	487.3	absent		présent
P02070 HBB_BOVIN	VLSAADKGNVK	1100.6	551.3	absent		présent
P01966 HBA_BOVIN	VLSAADKGNVKA	1171.7	586.8	absent		présent
P02070 HBB_BOVIN	VLTSK	546.3	274.2	absent		présent
P01966 HBA_BOVIN	VMNNPK	701.4	702.4	absent		présent
P02070 HBB_BOVIN	VVAGV	443.3	444.4	absent		présent
P02070 HBB_BOVIN	VVAGVA	514.3	515.3	absent		présent
P02070 HBB_BOVIN	VVAGVAN	628.4	315.1	absent		présent
P02070 HBB_BOVIN	VVAGVANALAHRYH	1476.8	739.4	absent		présent
P02070 HBB_BOVIN	VVYPW	662.3	663.3	absent		présent