



**UNIVERSITÉ DE LILLE – 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

**Sandy THEYSGEUR**

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE**

**Propriétés biologiques d'hydrolysats protéiques en relation  
avec la régulation du métabolisme énergétique**

---

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

Soutenance à huis clos le 8 juillet 2019, devant le jury présidé par Pr Nadia Everaert et  
composé de :

Mme Rozenn Ravallec	Professeur, Univ. Lille	Directrice de Thèse
M Benoit Cudennec	Maître de conférences (HDR), Univ. Lille	Co-encadrant
Mme Fabienne Guérard	Professeur, Univ. Brest	Rapporteuse
M John Van Camp	Professeur, Univ. Gand	Rapporteur
Mme Nadia Everaert	Professeur, Univ. Liège	Examinatrice
Mme Emira Mehinagic	Chercheur (HDR), Diana Pet Food	Examinatrice
Mme Anne Lepoudère	Ingénieur, Diana Pet Food	Invitée
Mme Isabelle Guiller	Directrice scientifique, Diana Pet Food	Invitée
M Pascal Dhulster	Professeur, Université de Lille	Invité



# Résumé

---

## Propriétés biologiques d'hydrolysats protéiques en relation avec la régulation du métabolisme énergétique

L'augmentation de la population mondiale, l'amélioration des niveaux de vie font que la demande en protéines animales devrait doubler d'ici à 2050. Ceci aura pour conséquence l'augmentation de la surface des terres agricoles entraînant des effets néfastes sur le climat et la biodiversité. Il est urgent de mieux qualifier les protéines agroalimentaires et d'en diversifier les sources pour pallier aux problèmes liés à la demande mondiale en protéines. Le marché du pet food, connaît également une croissance constante, du fait de l'augmentation de la population des chiens et chats, et d'une relation entre le maître et l'animal de plus en plus humanisée. Les conditions de vie s'en trouvent modifiées, ce qui génère souvent des troubles métaboliques chez le chat et le chien. La digestion gastro-intestinale des protéines a longtemps été considérée exclusivement pour son rôle de fourniture d'acides aminés ; néanmoins, de nombreux travaux ont mis en évidence l'implication de peptides bioactifs, générés au cours de la digestion, dans de nombreuses fonctions biologiques comme l'homéostasie énergétique. Ils modulent notamment la sécrétion des hormones intestinales telles que les cholécystokinines (CCK) et le Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) qui sont des signaux de régulation à court terme de la prise alimentaire. L'objectif principal de cette thèse a été de mesurer les effets sur la régulation de l'homéostasie énergétique de deux hydrolysats protéiques, issus d'un criblage préalable (une source poisson, PWF et une source carnée, XVP 15035), pour une application pet food. Dans un premier temps, un modèle de digestion gastro-intestinale *in vitro* simulant la digestion du chien a été mis au point. Une étude a ensuite été menée afin de caractériser le devenir des hydrolysats au cours de la digestion *in vitro* et de déterminer l'effet de ces digestats sur la régulation de la prise alimentaire à court terme, d'une part par leur capacité à réguler la sécrétion des CCK et du GLP-1 produits par les cellules entéroendocrines, et d'autre part, par leur pouvoir d'inhibition de l'activité de l'enzyme dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV) modulant l'activité du GLP-1. De nouveaux peptides bioactifs capables de stimuler la sécrétion des hormones intestinales et d'inhiber l'activité de la DPP-IV ont ensuite été identifiés grâce à des méthodes séparatives couplées à la spectrométrie de masse. Une étude *in vivo*, menée en parallèle chez le rat nourri en régime riche en graisse, a permis notamment de mettre en évidence l'effet inhibiteur de la prise alimentaire à court terme de l'hydrolysat PWF.

**Mots clés :** Hydrolysats protéiques ; digestion gastro-intestinale ; peptides bioactifs ; homéostasie énergétique ; prise alimentaire ; CCK ; GLP-1 ; DPP-IV.

# Abstract

---

## **Biological properties of protein hydrolysates in relation to the regulation of energy metabolism**

The increase in the world population and the improvement in living standards mean that the demand for animal protein is expected to double by 2050. This will result in an increase in the surface area of agricultural land, with negative effects on climate and biodiversity. There is an urgent need to better qualify agri-food proteins and diversify their sources to address the problems associated with global protein demand. The pet food market is also growing steadily, due to the increase in the population of dogs and cats, and an increasingly humanized relationship between the owner and the animal. As a result, living conditions have evolved, ultimately possibly leading to metabolic disorders in cats and dogs. Gastrointestinal digestion of proteins has long been considered exclusively for its role in providing amino acids; nevertheless, many studies have shown the involvement of protein-derived bioactive peptides, generated during digestion, in many biological functions such as energy homeostasis. They modulate the secretion of intestinal hormones such as cholecystokinins (CCK) and Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1), which are short-term signals involved in the regulation of food intake. The main objective of this thesis was to measure the effects on the regulation of energy homeostasis of two protein hydrolysates, resulting from prior screening (a fish source, PWF and a meat source, XVP 15035), intended for the pet food applications. As a first step, an *in vitro* gastrointestinal digestion model simulating dog digestion was developed. A study was then conducted to characterize the fate of hydrolysates during *in vitro* digestion and to determine the effect of these digestates on the regulation of short-term food intake, both by their ability to regulate the secretion of CCKs and GLP-1 produced by enteroendocrine cells, and by their ability to inhibit the activity of the enzyme dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV) modulating GLP-1 activity. Novel bioactive peptides able to stimulate the secretion of intestinal hormones and to inhibit the DPP-IV activity were then identified using separation methods coupled with mass spectrometry. An *in vivo* study, conducted in parallel in high-fat diet fed rats, revealed in particular the inhibitory effect of PWF hydrolysate on short term food intake.

**Key words:** Protein hydrolysates, gastrointestinal digestion, bioactive peptides, energy homeostasis, food intake, CCK, GLP-1, DPP-IV.

## Remerciements

---

Je tiens à remercier dans un premier temps les membres du jury d'avoir accepté d'examiner mon travail. Je tiens à remercier, en particulier, Pr John Van Camp et Pr Fabienne Guérard d'avoir acceptés d'être rapporteurs au sein de ce jury et Pr Nadia Everaert d'avoir été la présidente de ce jury.

Ce projet de thèse est une thèse CIFRE en collaboration entre l'Institut Charles Viollette (université de Lille) et l'entreprise Diana Pet Food (Elven, Morbihan). Beaucoup de personnes m'ont ainsi aidé, soutenu ou même d'avoir été simplement présent dans ce grand projet. Je souhaite donc remercier toutes ces personnes d'une manière générale d'avoir été présent au cours de ce projet.

Mes remerciements les plus profonds et sincères vont aux trois personnes à qui la réussite de ce projet revient majoritairement, c'est-à-dire le Dr Benoit Cudennec, Mme Anne Lepoudère et le Pr Rozenn Ravallec. Merci de votre confiance, de votre aide plus qu'utile, de votre soutien tout au long de ces années de travaux communs qui ont débuté une année avant le début de la thèse. C'est parce que je savais que Benoit et Rozenn formaient une excellente équipe, qui m'a poussé notamment à réaliser cette thèse. Merci de m'avoir aidé à avancer sur ce projet, merci pour votre complémentarité dans les idées, les hypothèses et autres qui ont pu être émis au cours de cette thèse. Je tiens également à te remercier Anne, pour toute cette confiance, cette liberté que tu nous a donné dans ce projet. Merci également pour ta positivité, pour l'entraide bien que les deux sites se trouvaient loin l'un de l'autre. Merci de m'avoir fait découvrir et aidé notamment pour le côté industriel du projet, qui est finalement un projet assez éloigné du monde industriel mais qui j'en suis sûre sera très utile dans vos réflexions proches et futures des différents projets en nutrition santé. Merci Benoit pour ton enthousiasme, merci pour toutes tes idées et d'avoir été très présent tout au long de ces années aussi bien professionnellement qu'en dehors du travail. Je souhaiterais de même remercier Rozenn pour ces mêmes raisons, tu as toujours les mots pour remonter le moral dans les moments les plus durs. Merci d'être comme tu es (comme une maman, et on t'apprécie tous pour cela !), de voir le positif dans n'importe quelle situation. Merci pour tes idées qui peuvent être contraires mais tellement complémentaires à celles de Benoit qui m'ont permis de m'aider dans ces travaux. Je garde en mémoire de superbes souvenirs tels que la manip rat qui a été très épuisante mais tellement enrichissante dans les travaux.

Je remercie également le Pr Pascal Dhulster pour m'avoir accueilli dans son laboratoire depuis le stage de fin d'année de master 2. Merci de faire en sorte que tous les projets se déroulent au mieux avec de bons équipements qui enrichissent au fur et à mesure le laboratoire. Je remercie également Mme Isabelle Guiller pour toute sa gentillesse, ses conseils dès la première rencontre et tout au long de ces années. Un grand merci pour m'avoir suivi et de toute la confiance que tu m'as donné dans ce gros projet.

De plus, je souhaite remercier les Drs Christophe Flahaut et Barbara Deracinois pour l'aide précieuse que vous avez apporté pour la partie spectrométrie de masse mais également pour vos conseils et toute l'aide que vous avez pu apporter sur mon projet mais également sur tous les projets du laboratoire. C'est grâce à vous et notamment Barbara que l'identification des peptides dans des solutions complexes avance et se développe. Je souhaiterais en plus remercier Barbara pour son soutien professionnellement mais aussi personnellement, je suis plus que chanceuse d'avoir fait ta connaissance ainsi que de ta petite famille et notamment de « ma meilleure amie pour la vie », ta petite Ambre. Vous m'avez tellement apporté de joie au cours de ces dernières années.

Je tiens également à remercier le Pr Jean Lesage pour les manips de RIA mais également pour toute l'aide apportée pour la manip finale avec les rats. Merci également à Lucie Maroussez, doctorante dans ce laboratoire pour tes conseils sur certaines manips mais également pour la manip rat.

Je remercie également toutes les autres personnes qui nous ont aidés pour la manip avec les rats. Le personnel de l'animalerie à l'IUT A, Mme Michèle Bastide, Mme Zineb Benkoussa et Mme Estelle Denhez, mes responsables (Rozenn, Benoit et Anne), mes collègues Alexandre Bricout, Camille Dugardin et Cécile Soltane. Mais également Matthieu Duban pour toute la partie biologie moléculaire des échantillons rats. Sans vous je n'aurais jamais pu réussir cette manip ainsi que toutes les analyses réalisées sur les tissus.

Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire ProBioGEM de m'avoir accompagné, soutenu, aidé et d'avoir fait que la vie au laboratoire soit agréable et amusante. Merci à Corinne pour l'entretien du laboratoire, pour les petites magouilles à chaque problème, pour les conseils et toutes les discussions qui ont pu durer des heures au lieu de quelques minutes. Merci d'être présente au laboratoire, tu es quelqu'un d'indispensable. Je souhaite dire un énorme merci à tous les collègues postdocs, docteurs, futurs docteurs et ingénieurs que j'ai pu côtoyer tout au long de ces quatre années au laboratoire et qui pour certains sont devenus de

véritables amis. Alors merci à Juliette, Rémi, Kalim, Yannath, Dorothée, Rezak, Adrien mais surtout à Cyril, Elodie, Alice et Alexandre Be. Merci aux nouveaux doctorants Léa et Mouna pour leur gentillesse et leur soutien en fin de thèse. Je souhaite également remercier l'équipe Déino Maxime, Mickaël, Marjorie mais surtout Yannick, Louis et Paul pour toutes vos blagues, vos distractions au moment de la rédaction. En fin je remercie du plus profond du cœur Justine, Camille, Alex, Barbara. Ma Ju, ça a été une longue histoire, on se connaît depuis le master et on s'est décidée ensemble de continuer en thèse au point que l'on nous confondait. Toutes ces années passées avec toi, le partage, les conseils qu'on a pu échanger ont été très importants pour moi. Merci d'avoir été présente, de m'avoir soutenue. Tu es une personne merveilleuse, sensible et tellement gentille, sur qui on peut toujours compter. Camille, tu as été pour moi un gros soutien depuis ton arrivée au laboratoire, j'ai adoré nos petites chamailleries au moment de la rédaction, ça va énormément me manquer. Reste surtout comme tu es avec ton côté stressé mais qui te permet d'être perfectionniste dans la préparation des manipulations et dans le travail. Merci de m'avoir transmis dans un peu de cette rigueur bien utile dans nos enchaînements de kits RIA. J'ai été très chanceuse d'avoir fait ta connaissance. Mon cher Alex, un énorme merci à toi d'avoir été présent, pour ton aide et tes conseils. A nos heures sups avec comme récompense la pizza au bureau et à nos samedis matins studieux au laboratoire. Merci à vous de faire partie de mon cercle d'ami.

De même, je remercie toutes les équipes de Diana Pet Food de m'avoir bien intégrée dans l'entreprise. Je me souviendrais de mes premiers pas à SPF, j'ai eu le ressenti d'y être depuis des années tellement l'accueil, la sympathie par les collègues été génial. Je souhaite tout particulièrement remercier l'équipe Vivae pour toute cette entraide au sein de l'équipe, de l'accueil à chaque déplacement dans l'entreprise. Merci à vous et j'espère vous avoir bien fait profiter des petits restos offerts pour se retrouver tous ensemble. Merci à Claire pour toute la partie hydrolysats et analyses, mais surtout pour ces soirées apéros. Merci à Delphine pour tes conseils, ton recul et ta gentillesse. Merci à Cloé et Fernando pour votre sympathie et vos conseils.

Pour terminer je souhaite également remercier toute ma famille et surtout mes parents qui ne savaient pas trop ce que je faisais pendant toutes ces années mais qui m'ont toujours soutenu comme ils le pouvaient. Je remercie également mon frère et mes sœurs mais surtout ma sœur Tiffany d'avoir été là et de m'avoir aidé comme tu le pouvais. Je remercie aussi toutes mes tantes pour le soutien et des délires du samedi après-midi qui me permettaient de me changer les idées pendant quelques heures.

## Abréviations

---

AAFCO	Association of American Feed Control Officials
ACN	Acétonitrile
AF	Acide formique
AHA	Aire antérieure hypothalamique
AP	Aera Postrema
ARC	Noyau arqué
AgRP	Agouti Related Peptide
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPs	Proteine antimicrobienne
BSA	Bovine Sérum Albumine
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CART	Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript
CaSR	Récepteur sensible au calcium
CCK	Cholécystokinines
CCK-8	Cell Count Kit-8
CCK-R	Récepteur cholécystokinine
CD	Cellules dendritiques
CD36	Clusters de différenciation 36
CEEs	Cellules entéroendocrines
Cl <sup>-</sup>	Chlore
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
DDA	Analyse Donnée Dépendante
DMEM	Milieu Dulbecco's Modified Eagle's
DMH	Noyau hypothalamique dorsomédian
DMX	Noyau moteur dorsal du vague
DBI	Diazepan-Binding Inhibitor
DPP-IV	Enzyme Dipeptidyl Peptidase IV
DT2	Diabète de type 2
ECA	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
EDTA	Acide Ethylene Diamine Tetraacetique
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FATP	Protéines de transport des acides gras
FDR	Taux de faux positifs
GI	Gastro-intestinal
GIP	Polypeptide Insulinotrope dépendant du glucose
GIPR	Récepteur du GIP
GLP-1	Glucagon-Like Peptide 1
GLP-2	Glucagon-Like Peptide 2
GLUT	Co-transporteur Na <sup>+</sup> /glucose
Gly-Pro-AMC	Substrat Glycine-Proline-7-amino-4-méthylcourmarine
Gly-Pro-Pna	Substrat glycine-Proline-p-Nitroaniline
GRP	Gastrin-Releasing Peptide
GRPP	Glicentin-related polypeptide
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bicarbonate
HHBSS	Hepes-Hank's Balanced Salt Solution
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HOMA	Homeostasis Model Assessment
I <sup>125</sup>	Iode 125
IC <sub>50</sub>	Concentration minimale pour inhiber de 50% l'activité d'une enzyme
IP	Interverting hormone
K <sup>+</sup>	Potassium
LCRF	Luminal CCK-Releasing Factor

LHA	Aire hypothalamique latérale
LY	Lucifer Yellow
MAP kinase	Mitogen-activated protein kinase
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MP	Matière première de l'hydrolysat
Na <sup>+</sup>	Sodium
NaHCO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	Bicarbonate de sodium
Papp	Perméabilité apparente
PAT	Protéine Animale Transformée
PBS	Tampon phosphate
PC	Prohormone Convertase
PHA	Aire hypothalamique postérieure
PKA	Protéine kinase A
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
PVN	Noyau paraventriculaire
Na <sup>+</sup>	Sodium
NHE3	Echangeur H <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1 protein
NPY	Neuropeptide Y
NRC	National Research Council
NTS	Noyau du Tractus Solitaire
ObR	Récepteur de la leptine
POMC	Pro-OpioMélandoCortine
PC1	Prohormone convertase
PFA	ParaFormAldehyde
PKA	Phosphokinase A
PO	Noyau pré-optique
POT	Transporteurs proton-oligopptides
PP	Polypeptide-fold
PTR	Transporteurs de peptide
PYY	Peptide Tyrosine-Tyrosine
QSAR	Relation quantitative structure à activité
Rapport m/z	Rapport masse/charge
RCPG	Récepteur couplé à la protéine G
RT-PCR	Retro Transcription-Polymerase Chain Réaction
RT-qPCR	PCR quantitative en temps réel
SHIME	Simulatore of Human Intestinal Microbial Ecosystem
SNC	Système Nerveux Central
SVF	Sérum de veau fœtal
T1R	Récepteur du goût 1
TEER	Résistance Electrique Trans-Epithéliale
TFA	Acide Trifluoroacétique
TFF3	Trefoil Factor 3
TIM	TNO Gastro-Intestinal Model
TRP	Transient Receptor Potential
VMH	Aire hypothalamique ventromédian
ZO	Zonula Occludens

# Sommaire

---

<i>Résumé</i>	1
<i>Abstract</i>	2
<i>Abréviations</i>	6
<i>Sommaire</i>	8
<i>Liste des figures</i>	16
<i>Liste des tableaux</i>	19
<i>Introduction générale et objectifs</i>	17
<i>Synthèse bibliographique</i>	21
<b>I. Domestication des animaux de compagnie et développement du marché du pet food</b>	<b>22</b>
I.1. Données historiques sur la domestication des chiens et des chats	22
I.2. Conséquences de la domestication sur le comportement alimentaire	24
I.3. Histoire du pet food	25
I.4. Le marché du pet food aujourd'hui	26
I.5. Pet food et bien-être animal	27
I.6. Conclusion	27
<b>II. Troubles du métabolisme chez les animaux de compagnie</b>	<b>28</b>
II.1. Le développement de l'obésité	28
II.1.1. Causes de l'obésité et facteurs de prédisposition	29
II.1.2. Conséquences métaboliques et physiologiques	29
II.2. Le diabète de type 2	30
II.2.1. Le développement du diabète de type II chez les animaux de compagnie	30
II.3. Nutraceutiques et aliments fonctionnels	31
II.4. Conclusion	32
<b>III. Valorisation des coproduits agroalimentaires</b>	<b>33</b>
III.1. Généralités	33
III.2. Les différentes sources de coproduits	33
III.3. Valorisation des coproduits dans l'industrie du pet food	35
III.4. Valorisation des coproduits protéiques par hydrolyse	36
III.4.1. Principales applications des hydrolysats	36
III.4.2. L'hydrolyse des protéines	36

III.4.3. Hydrolyse par voie enzymatique _____	37
III.4.4. Utilisation des hydrolysats protéiques dans l'industrie du pet food _____	39
III.5. Conclusion _____	40
<b>IV. Le tractus oro-gastro-intestinal : exemple de celui de l'Homme _____</b>	<b>40</b>
IV.1. Présentation anatomique de l'appareil digestif _____	40
IV.2. Organisation structurale du tractus gastro-intestinal _____	42
IV.3. Fonctions du tractus oro-gastro-intestinal de l'Homme et particularités chez le chien et le chat _____	43
IV.3.1. La cavité buccale _____	43
IV.3.2. L'estomac _____	45
IV.3.3. L'intestin grêle _____	46
IV.3.3.1. Anatomie macroscopique de l'intestin grêle _____	46
IV.3.3.2. Anatomie microscopique de l'intestin grêle _____	47
IV.3.3.3. Les sécrétions pancréatiques _____	49
IV.3.3.4. Les sécrétions biliaires _____	50
IV.3.4. Le côlon _____	50
IV.4. Absorption intestinale des macronutriments _____	51
IV.4.1. Absorption des glucides _____	51
IV.4.2. Absorption des lipides _____	52
IV.4.3. Absorption intestinale des acides aminés libres et des peptides _____	52
IV.5. Modélisations <i>in vitro</i> de l'appareil digestif et de l'absorption au niveau de la barrière intestinale _____	56
IV.5.1. Les modèles <i>in vitro</i> de digestion GI _____	56
IV.5.2. Les modèles <i>in vitro</i> d'absorption intestinale _____	58
IV.6. Conclusion _____	59
<b>V. Homéostasie énergétique et régulation de la prise alimentaire _____</b>	<b>59</b>
V.1. Les signaux de la régulation à court terme de l'homéostasie énergétique _____	64
V.1.1. La distension gastrique _____	64
V.1.2. Les sécrétions hormonales du tractus GI et du pancréas _____	64
V.1.2.1. Généralités sur les cellules entéroendocrines _____	64
V.1.2.2. Les CCK _____	67
V.1.2.3. La famille des incrétines _____	69
V.1.3. La DPP-IV _____	73
V.2. Les signaux de la régulation à long terme de l'homéostasie énergétique _____	74
V.2.1. La leptine _____	74
V.2.2. L'insuline _____	75

V.3. Conclusion	76
<b>VI. Peptides bioactifs issus de protéines alimentaires et régulation de l'homéostasie énergétique</b>	<b>76</b>
VI.1. Généralités sur les peptides bioactifs	76
VI.2. Digestion GI des protéines alimentaires et régulation de l'homéostasie énergétique	78
VI.2.1. Peptides bioactifs et régulation de la sécrétion des CCK	79
VI.2.2. Peptides bioactifs et régulation de la sécrétion du GLP-1	82
VI.2.3. Peptides bioactifs et régulation de l'activité de la DPP-IV	87
VI.3. Conclusion	90
<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>92</b>
<b>I. Présentation des produits de l'étude</b>	<b>93</b>
I.1. Hydrolysat PWF et sa matière première	93
I.2. Hydrolysat XVP 15035 et sa matière première	93
<b>II. Simulation de la digestion gastro-intestinale des hydrolysats et de leurs matières premières</b>	<b>94</b>
II.1. Matériels	94
II.2. Modèle de digestion statique <i>in vitro</i>	94
<b>III. Caractérisation de la population peptidique des hydrolysats</b>	<b>96</b>
III.1. Méthode de mise en évidence des peptides bioactifs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique	96
III.1.1. Matériels	96
III.1.2. Préparation des échantillons pour le test d'activités biologiques	96
III.1.2.1. Effet des enzymes gastro-intestinales sur la population peptidique (profils SEC)	97
III.1.2.2. Protocole expérimental du fractionnement SEC-FPLC	97
III.1.2.3. Protocole expérimental de fractionnement RP-HPLC (semi préparatif)	98
III.1.3. Méthodes générales de culture cellulaire	99
III.1.3.1. La lignée STC-1	99
III.1.3.2. La lignée Caco-2	100
III.1.4. Test de cytotoxicité	100
III.1.5. Etude de la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales CCK et GLP-1	101
III.1.5.1. Protocole du test de contact des échantillons avec les cellules STC-1	101
III.1.5.2. Dosage des hormones intestinales CCK et GLP-1	102

III.1.6. Identification des séquences peptidiques impliquées dans la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales par spectrométrie de masse _____	103
III.1.6.1. Analyse LC-MSMS des sous fractions HPLC _____	103
III.1.6.2. Traitement des données de spectrométrie de masse _____	104
III.2. Méthode de mise en évidence des peptides bioactifs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique : inhibition de l'activité enzymatique de la DPP-IV _____	104
III.2.1. Test d'inhibition de l'activité DPP-IV _____	104
III.2.1.1. Test d'inhibition de l'activité DPP-IV avec l'enzyme purifiée _____	104
III.2.1.2. Test d'inhibition in situ de l'activité DPP-IV sur les cellules Caco-2 ____	106
III.2.2. Passage d'une barrière de cellules Caco-2, modèle de la barrière intestinale _	106
III.2.2.1. Protocole de l'expérience de passage de la barrière de cellules Caco-2 _	106
III.2.2.2. Estimation de la perméabilité apparente de la barrière cellulaire _____	107
III.2.2.3. Estimation de l'intégrité de la barrière cellulaire _____	108
III.2.3. Identification des séquences peptidiques dans les surnageants par spectrométrie de masse _____	109
<b>IV. Etude <i>in vivo</i> de l'effet satiétogène d'un hydrolysat protéique _____</b>	<b>109</b>
IV.1. Matériel _____	110
IV.2. Animaux et groupes expérimentaux _____	110
IV.3. Evaluation des effets des solutions testées sur la prise alimentaire et sur la prise de poids des rats _____	111
IV.3.1. Première phase d'expérimentation _____	111
IV.3.1.1. Protocole expérimental _____	111
IV.3.1.2. Consommation et prise de poids _____	112
IV.3.2. Deuxième phase de l'expérimentation _____	112
IV.3.2.1. Protocole expérimental _____	112
IV.3.2.2. Consommation et prise de poids _____	113
IV.3.2.3. Points limites de l'expérimentation animale _____	113
IV.3.2.4. Protocole de l'OGTT _____	113
IV.3.3. Troisième phase de l'expérimentation _____	114
IV.4. Potentiel de l'hydrolysat dans la modulation de certaines hormones impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique _____	115
IV.4.1. Dosage des CCK plasmatiques _____	115
IV.4.2. Dosage des autres hormones circulantes _____	116
IV.4.3. Mesure de l'activité de la DPP-IV plasmatique _____	116
IV.5. Etude de la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique _____	117

IV.5.1. Extraction et rétro-transcription des ARN _____	117
IV.5.2. PCR quantitative en temps réel (rt-qPCR) _____	118
<b>V. Traitement statistique des données _____</b>	<b>119</b>
<b>Résultats _____</b>	<b>118</b>
<b>I. Digestion gastro-intestinale simulée <i>in vitro</i> des hydrolysats protéiques et de leurs matières premières _____</b>	<b>119</b>
I.1. Introduction _____	119
I.2. Evolution de la population peptidique au cours de la digestion _____	120
<b>II. Mise en évidence des groupes peptidiques, issus de la digestion GI des hydrolysats protéiques, impliqués dans les activités biologiques en rapport avec l'homéostasie énergétique _____</b>	<b>122</b>
II.1. Introduction _____	122
II.2. Caractérisation des activités biologiques des digestats des hydrolysats protéiques et de leurs matières premières _____	122
II.2.1. Effet des hydrolysats protéiques sur la viabilité des cellules _____	122
II.2.2. Effet des digestats sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) par les cellules STC-1 _____	123
II.2.3. Effets des digestats sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV _____	127
II.3. Fractionnement des digestats intestinaux et potentiels bioactifs _____	131
II.3.1. Plan de fractionnement des digestats intestinaux _____	131
II.3.2. Effets des différentes fractions obtenues par SEC sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales _____	132
II.3.3. Fractionnement HPLC et potentiels bioactifs sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales _____	134
II.3.4. Plan de sous-fractionnement des fractions SEC sélectionnées par RP-HPLC _____	135
II.3.5. Effet des sous-fractions sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales _____	137
II.4. Conclusion _____	138
<b>III. Identification et caractérisation des peptides responsables des activités biologiques étudiées _____</b>	<b>141</b>
III.1. Introduction _____	141
III.2. Identification des séquences impliquées dans la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales _____	141
III.2.1. Démarche adoptée _____	141

III.2.2. Identification par LC-MS/MS des séquences peptidiques de la sous-fraction FE de la fraction F2 du digestat intestinal PWF _____	141
III.2.3. Identification des séquences peptidiques dans la sous-fraction HPLC FF de la fraction F2-3 du digestat intestinal XVP15035 _____	142
III.2.4. Etude du potentiel bioactif des peptides synthétiques à stimuler la sécrétion des hormones intestinales _____	143
III.2.4.1. Stimulation de la sécrétion de CCK _____	143
III.3. Etude du passage des digestats intestinaux au travers d'une monocouche de cellules Caco-2 et identification des peptides inhibant l'activité de la DPP-IV _____	145
III.3.1.1. Identification des séquences peptidiques passant la barrière de cellules Caco-2 _____	146
III.3.1.2. Effet des digestats intestinaux sur l'inhibition de l'activité DPP-IV au cours du passage au travers de la barrière intestinale _____	148
III.3.2. Sélection des peptides au sein de la liste des peptides identifiés passant la barrière de cellules Caco-2 _____	150
III.3.3. Etude du potentiel bioactif des peptides synthétiques à inhiber l'activité de la DPP-IV _____	151
III.4. Conclusion _____	152
<b>IV. Etude <i>in vivo</i> de l'effet de l'hydrolysate protéique PWF sur l'homéostasie énergétique</b> _____	<b>155</b>
IV.1. Introduction _____	155
IV.2. Analyse statistique des résultats par modèle mixte _____	156
IV.3. Effet de l'hydrolysate PWF et de sa matière première sur un modèle d'étude de rat en croissance _____	156
IV.3.1. Effet de l'hydrolysate et de sa matière première sur la prise alimentaire _____	157
IV.3.2. Effet de l'hydrolysate et de sa matière première sur le poids _____	159
IV.4. Conclusion _____	160
IV.5. Effet de l'hydrolysate PWF sur un modèle d'étude de rat adulte en régime riche en matières grasses _____	160
IV.5.1. Effet de l'hydrolysate PWF sur la prise alimentaire _____	160
IV.5.2. Effet de l'hydrolysate sur le poids _____	163
IV.6. Dosage des hormones circulantes et étude d'autres marqueurs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique _____	164
IV.6.1. Effet de l'hydrolysate PWF après un mois du régime HF vs régime standard _____	164
IV.6.2. Effet de l'hydrolysate PWF après deux mois du régime HF sur certains marqueurs de la régulation de l'homéostasie énergétique. _____	166

IV.7. Effet de l'hydrolysate sur la régulation de l'expression des gènes codant certains marqueurs de la régulation de l'homéostasie énergétique _____	169
IV.7.1. Mesure de l'expression des gènes étudiés le long de l'intestin _____	170
IV.7.2. Mesure de l'expression des gènes des neurotransmetteurs exprimés dans l'hypothalamus _____	171
IV.8. Effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'homéostasie glucidique _____	173
IV.8.1. Résultats des tests de tolérance au glucose par voie orale (OGTT) _____	173
IV.8.1.1. OGTT avant la mise en place du régime riche en matières grasses _____	173
IV.8.1.2. OGTT après 44 jours de régime riche en matières grasses _____	175
IV.8.2. Scores de la résistance à l'insuline (HOMA-IR) et du fonctionnement des cellules $\beta$ -pancréatiques (HOMA- $\beta$ ) _____	177
IV.9. Conclusion sur l'effet du régime HF et de HP sur l'homéostasie énergétique _____	178
<b>V. Conclusion _____</b>	<b>178</b>
<b><i>Discussion</i> _____</b>	<b>180</b>
<b>I. Simulation de la digestion gastro-intestinale des hydrolysats protéiques et de leurs matières premières _____</b>	<b>181</b>
<b>II. Mise en évidence des fractions peptidiques impliquées dans les activités biologiques en rapport avec l'homéostasie énergétique _____</b>	<b>183</b>
II.1. Caractérisation des activités biologiques impliquées dans la régulation des hormones intestinales _____	184
II.1.1. Effets des digestats et des fractions sur la sécrétion des hormones intestinales CCK et GLP-1 _____	184
II.1.2. Effet des digestats sur l'inhibition de l'activité de l'enzyme DPP-IV _____	187
II.2. Identification et caractérisation des peptides responsables des activités biologiques étudiées _____	188
II.2.1. Identification et sélection des séquences peptidiques des sous-fractions et surnageants basolatéraux _____	188
II.2.2. Mise en évidence de nouveaux peptides stimulant la sécrétion des hormones intestinales _____	191
II.2.3. Suivi du passage des peptides issus des digestats intestinaux au travers de la barrière intestinale simulée <i>in vitro</i> _____	193
II.2.3.1. Mise en évidence des séquences peptidiques passant au travers de la monocouche de cellules Caco-2 _____	193
II.2.4. Devenir du potentiel inhibiteur de l'activité de l'enzyme DPP-IV suite au passage au travers du modèle de barrière _____	195

II.2.4.1. Mise en évidence des peptides inhibant l'activité de la DPP-IV _____	195
<b>III. Etude de l'effet de l'hydrolysate protéique PWF sur la régulation de l'homéostasie énergétique chez le rat _____</b>	<b>197</b>
III.1. Effet de PWF sur la prise alimentaire et le poids de rats au cours de la première phase d'expérimentation _____	197
III.2. Effet de PWF sur la régulation de l'homéostasie énergétique des rats au cours des deuxième et troisième phases d'expérimentation _____	199
III.2.1. Effet de PWF sur la prise alimentaire et le poids de rats _____	200
III.2.2. Effet de PWF sur certains marqueurs plasmatiques _____	201
III.3. Mesure du potentiel de PWF à réguler l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique _____	205
<b><i>Conclusions et perspectives</i> _____</b>	<b>208</b>
<b>I. Conclusions _____</b>	<b>209</b>
<b>II. Perspectives _____</b>	<b>210</b>
II.1. Simulation de la digestion gastro-intestinale des hydrolysats protéiques et de leurs matières premières _____	210
II.2. Peptides issus des protéines agroalimentaires et régulation de l'homéostasie énergétique _____	211
<b><i>Références bibliographiques</i> _____</b>	<b>218</b>

## Liste des figures

---

Figure 1. Domestication des animaux. _____	22
Figure 2. Caractéristiques omnivores du chien. _____	25
Figure 3. Conséquences de l'obésité. _____	30
Figure 4. Parties du poisson valorisées comme coproduits. _____	34
Figure 5. Exemple de procédé d'hydrolyse des matières premières pour l'obtention des hydrolysats protéiques. _____	37
Figure 6. Schéma montrant la génération des peptides bioactifs à partir de l'hydrolyse des protéines alimentaires. _____	38
Figure 7. L'appareil digestif humain. _____	41
Figure 8. Schéma de l'organisation anatomique et histologique du tube digestif. _____	42
Figure 9. Représentation des glandes salivaires. _____	44
Figure 10. Illustration schématique des différents types de cellules épithéliales intestinales. _____	47
Figure 11. Les différents niveaux d'organisation de la barrière intestinale. _____	48
Figure 12. Voies de transport cellulaires des acides aminés libres (AA) et des oligopeptides au niveau de la barrière épithéliale. _____	54
Figure 13. Structure moléculaire de la jonction intercellulaire des cellules épithéliales de l'intestin. _____	55
Figure 14. Cascade de la satiété, associée aux réponses cognitives et physiologiques. _____	60
Figure 15. Schéma des principaux signaux agissant sur les centres majeurs de régulation de l'homéostasie énergétique. _____	61
Figure 16. Schéma représentant les neurones impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. _____	62
Figure 17. Les principales populations de cellules entéroendocrines et les hormones sécrétées présentes au niveau du tractus gastro-intestinal. _____	65
Figure 18. Le tractus GI et ses sécrétions hormonales impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique. _____	67
Figure 19. Séquence en acides aminés des principales formes moléculaires des CCK. _____	68
Figure 20. Les produits issus du clivage du proglucagon. _____	71
Figure 21. Les différentes actions du GLP-1 sur les organes. _____	72
Figure 22. Représentation de le DPP-IV transmembranaire. _____	74
Figure 23. Évolution du nombre de publications scientifiques sur le thème des peptides bioactifs de 1998 à 2018. _____	77
Figure 24. Voies de signalisation activées par les peptides et les acides aminés impliquées dans la sécrétion et la synthèse de CCK. _____	80
Figure 25. Voies de signalisation activées par les acides aminés libres et les peptides dans la synthèse et la sécrétion de GLP-1. _____	84
Figure 26. Représentation schématique du modèle de digestion gastro-intestinal in vitro statique mis en place pour l'étude. _____	95

Figure 27. Montage expérimental de la simulation de la digestion GI in vitro statique des hydrolysats et de leurs matières premières. _____	96
Figure 28. Cellules STC-1 cultivées en flasque T75 (MO X20). _____	99
Figure 29. Cellules Caco-2 cultivées en flasque T75 (MO X40). _____	100
Figure 30. Schéma du modèle de barrière intestinale. _____	107
Figure 31. Schéma du protocole expérimental de la première phase d'expérimentation. _____	111
Figure 32. Schéma du protocole expérimental de la deuxième phase d'expérimentation. _____	112
Figure 33. Schéma du protocole expérimental de la troisième phase d'expérimentation. _____	115
Figure 34. Identification des différentes phases à la suite de l'extraction d'ARN au chloroforme. _____	117
Figure 35. Modèle de digestion statique in vitro. _____	119
Figure 36. Profils SEC de la population peptidique au cours de la digestion GI des hydrolysats et de leurs matières premières. _____	120
Figure 37. Effet des échantillons bouche et des digestats gastriques et intestinaux sur la sécrétion des hormones CCK et GLP-1 par les cellules STC-1. _____	124
Figure 38. Effet des échantillons bouche et des digestats gastriques et intestinaux sur la sécrétion des hormones CCK et GLP-1 par les cellules STC-1. _____	126
Figure 39. Inhibition de l'activité de la DPP-IV in situ (cellules Caco-2) par les hydrolysats et leurs matières premières au cours de la digestion GI. _____	129
Figure 40. Profils peptidiques obtenus par SEC des digestats intestinaux des hydrolysats. _____	131
Figure 41. Effets du digestat intestinal des hydrolysats et de ses fractions obtenues par SEC sur la sécrétion de CCK et de GLP-1 par les cellules STC-1. _____	132
Figure 42. Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour les fractions SEC du digestat intestinal de PWF. _____	134
Figure 43. Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour les fractions SEC du digestat intestinal de XVP 15035. _____	135
Figure 44. Profils de séparation RP-HPLC des fractions SEC sélectionnées. _____	136
Figure 45. Effets des sous-fractions issues des fractions SEC et de la fraction SEC du digestat intestinal des hydrolysats sur la sécrétion des hormones intestinales par les cellules STC-1. _____	137
Figure 46. Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour les différentes étapes de fractionnement du digestat intestinal de PWF. _____	139
Figure 47. Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour les différentes étapes de fractionnement du digestat intestinal de XVP 15035. _____	140
Figure 48. Effet des peptides synthétiques sur la sécrétion de CCK par les cellules STC-1. _____	144
Figure 49. Modèle de barrière de cellules Caco-2 différenciées utilisé pour l'étude du passage des peptides. _____	145
Figure 50. Mesure de l'inhibition de l'activité de la DPP-IV au cours du passage de la barrière intestinale. _____	150
Figure 51. Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour l'identification des peptides bioactifs stimulant la sécrétion des hormones intestinales présents dans le digestat intestinal de PWF. _____	152
Figure 52. Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour l'identification des peptides bioactifs stimulant la sécrétion des hormones intestinales présents dans le digestat intestinal de XVP 15035. _____	153
Figure 53. Schéma récapitulatif des résultats obtenus lors de l'expérience de passage de la barrière intestinale pour le digestat intestinal. _____	154

Figure 54. Schéma récapitulatif des résultats obtenus lors de l'expérience de passage de la barrière intestinale pour le digestat intestinal de XVP 15035.	155
Figure 55. Effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de la prise alimentaire.	157
Figure 56. Effet de l'hydrolysate PWF sur le poids des animaux.	159
Figure 57. Effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de la prise alimentaire.	161
Figure 58. Effet de l'hydrolysate PWF sur le poids des animaux.	163
Figure 59. Schéma du protocole expérimental de la deuxième phase d'expérimentation.	164
Figure 60. Impact du régime alimentaire et de l'hydrolysate sur les concentrations plasmatiques des hormones intervenant dans la régulation de l'homéostasie énergétique.	165
Figure 61. Schéma du protocole expérimental de la troisième phase d'expérimentation.	166
Figure 62. Effet de l'hydrolysate PWF sur certains marqueurs de la régulation à court terme de l'homéostasie énergétique.	167
Figure 63. Effet de l'hydrolysate PWF sur certains marqueurs de la régulation de l'homéostasie énergétique à long terme.	168
Figure 64. Effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'expression des gènes codant les CCK et le GIP au niveau du duodénum et du jéjunum et des gènes codant le proglucagon et la DPP-IV au niveau de l'iléon.	170
Figure 65. Effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'expression des gènes codant les neurotransmetteurs exprimés dans l'hypothalamus.	172
Figure 66. Test de tolérance au glucose avant la mise en place du régime riche en matières grasses (J-4).	174
Figure 67. Test de tolérance au glucose après 44 jours de régime riche en matières grasses.	175
Figure 68. Effet du régime riche en matières grasses sur la résistance à l'insuline et la fonctionnalité des cellules $\beta$ -pancréatiques.	177
Figure 69. Schéma récapitulatif des étapes de fractionnement réalisées sur les digestats intestinaux des hydrolysats PWF et XVP 15035.	186
Figure 70. Voies de transport cellulaires des acides aminés libres (AA) et des oligopeptides au niveau de la barrière épithéliale.	194
Figure 71. Schéma du protocole expérimental de la première phase d'expérimentation.	197
Figure 72. Schéma du protocole expérimental de la deuxième phase d'expérimentation.	199
Figure 73. Voies de signalisation activées par les peptides et les acides aminés impliquées dans la sécrétion et la synthèse de CCK.	214

## Liste des tableaux

---

Tableau 1. Peptides identifiés montrant une augmentation de la sécrétion de CCK. _____	82
Tableau 2. Peptides identifiés, à ce jour, et provoquant une augmentation de la sécrétion de GLP-1. _____	86
Tableau 3. Liste non exhaustive des peptides identifiés pour inhiber l'activité de la DPP-IV. _____	89
Tableau 4. Composition de l'hydrolysat PWF et de sa matière première. _____	93
Tableau 5. Composition de l'hydrolysat XVP 15035 et de sa matière première. _____	94
Tableau 6. Caractéristiques des fractionnements FPLC réalisé pour chaque hydrolysats. _____	98
Tableau 7. Caractéristiques des sous-fractionnements HPLC réalisés pour chaque hydrolysats. _____	99
Tableau 8. Caractéristiques énergétiques des aliments utilisés au cours des deux phases d'expérimentation. _____	111
Tableau 9. Administration des traitements. _____	112
Tableau 10. Administration des traitements. _____	113
Tableau 11. Séquences des amorces utilisées pour la quantification de l'expression des gènes cibles. _____	118
Tableau 12. Répartition par classe de taille de la population peptidique des deux hydrolysats et de leurs matières premières en fonction des compartiments du tractus GI. _____	121
Tableau 13. Pourcentage de viabilité des cellules Caco-2 et des cellules STC-1. _____	123
Tableau 14. Concentrations inhibitrices des échantillons au cours de la digestion GI induisant 50% d'inhibition ( $IC_{50}$ ) de l'activité de la DPP-IV. _____	128
Tableau 15. Concentrations induisant 50% d'inhibition ( $IC_{50}$ ) de l'activité de la DPP-IV purifiée et in situ. _____	130
Tableau 16. Séquences peptidiques de la sous-fraction FE sélectionnées pour la synthèse chimique. _____	142
Tableau 17. Séquences peptidiques de la sous-fraction FF sélectionnées pour la synthèse chimique. _____	143
Tableau 18. Conditions expérimentales appliquées au passage de la barrière intestinale simulée in vitro des digestats intestinaux des hydrolysats PWF et XVP 15035. _____	145
Tableau 19. Coefficients de perméabilité apparente ( $P_{app}$ ) de la monocouche de cellules Caco-2 en présence du contrôle ou des digestats intestinaux testés à une concentration de 4 g.L <sup>-1</sup> . _____	146
Tableau 20. Nombre de séquences peptidiques identifiées par LC-MS/MS couplé au logiciel PEAKS. _____	147
Tableau 21. Mesure de la résistance transépithéliale (TEER) de la monocouche de cellules Caco-2 en présence du contrôle ou des digestats intestinaux à 4 g.L <sup>-1</sup> . _____	148
Tableau 22. Coefficients de perméabilité apparente ( $P_{app}$ ) de la monocouche de cellules Caco-2 en présence du contrôle ou des digestats intestinaux testés à une concentration de 8 g.L <sup>-1</sup> . _____	149
Tableau 23. Séquences peptidiques issues du passage de la barrière intestinale sélectionnées pour la synthèse chimique. _____	151
Tableau 24. Concentrations inhibitrices induisant 50% d'inhibition de l'activité DPP-IV ( $IC_{50}$ ) des peptides synthétisés. _____	151
Tableau 25. P values obtenues pour l'effet groupe sur 24h par modèles mixtes. _____	158
Tableau 26. Synthèse des p values obtenues pour l'effet groupe sur la période jour (7H30-17h30), nuit (17h30-7h30) et sur 24h issues des modèles mixtes sur la prise alimentaire. _____	162
Tableau 27. Peptides identifiés montrant une augmentation de la sécrétion de CCK. _____	192

# Introduction générale et objectifs

---

La population mondiale devrait atteindre 10 milliards de personnes en 2050 (United Nations 2017), et par conséquent accroître fortement la demande en protéines alimentaires. Si l'on considère les secteurs de l'alimentation humaine et animale, la croissance du besoin protéique mondial devrait atteindre 40% d'ici 2030, ce qui représente une augmentation annuelle de 7%. Pour pallier à cette demande croissante et limiter son impact sur l'environnement, il est urgent de mieux caractériser les protéines alimentaires et d'en diversifier les sources. De manière concomitante, le marché du pet food connaît une expansion continue, tout en exigeant des ingrédients de plus en plus qualitatifs, voire « humanisés », c'est-à-dire aux caractéristiques proches de ceux utilisés dans l'alimentation humaine. Dans ce contexte global, la valorisation des coproduits protéiques est aujourd'hui un enjeu sociétal, économique et environnemental considérable.

Parallèlement à l'augmentation des niveaux de vie, un nombre croissant de pays fait face ces dernières années à une augmentation de l'obésité et des pathologies associées telles que le diabète de type 2 ou les maladies cardiovasculaires. Le taux d'obésité mondial a ainsi plus que triplé depuis 1975 et le nombre de personnes diabétiques est passé de 108 millions en 1980 à 422 millions en 2014. Le mode de vie sédentaire, en partie responsable de ce phénomène chez l'Homme, a des répercussions similaires chez les animaux de compagnie, souvent aggravées par un faible contrôle nutritionnel de la part des maîtres. En conséquence, le chien et le chat souffrent eux aussi de surpoids, d'obésité et des pathologies qui en découlent. La formulation d'aliments plus équilibrés et le développement d'actifs représentent donc un enjeu essentiel pour prévenir et limiter l'expansion des maladies associées à l'obésité. Au-delà des considérations nutritionnelles, la compréhension des effets biologiques des protéines et de leurs peptides est devenue clé pour résoudre les enjeux santé liés au surpoids et à l'obésité. En effet, l'ingestion des protéines alimentaires ou de leurs hydrolysats a des effets sur la régulation de l'homéostasie énergétique via l'action de peptides bioactifs. Ce système de régulation, permettant le maintien d'un équilibre entre l'apport et la dépense énergétique a pour but ultime d'assurer une masse corporelle stable. Cet équilibre est maintenu grâce à un dialogue permanent entre le tractus gastro-intestinal et le cerveau impliquant des signaux chimiques et mécaniques. La digestion gastro-intestinale joue un rôle central puisqu'elle est à l'origine des molécules alimentaires capables d'interagir avec les entérocytes qui constituent la barrière intestinale. Au contact de certains nutriments, les cellules entéroendocrines (CEEs) qui représentent 1% des entérocytes, vont sécréter des hormones (telles que les CCK et le GLP-1) qui vont agir en tant que signaux périphériques empruntant la circulation sanguine ou

activant les voies nerveuses afférentes pour stimuler certaines régions du cerveau et conduire à l'arrêt de la prise alimentaire. Outre son rôle dans la régulation de la prise alimentaire, le GLP-1 est une hormone incrétine qui agit sur la fonctionnalité des îlots pancréatiques en stimulant la sécrétion d'insuline et en diminuant la sécrétion du glucagon. Cependant, il est rapidement inactivé par l'action de la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV). La sécrétion de ces hormones est fortement stimulée par les peptides générés au cours de la digestion des protéines et constitue la première étape de la régulation de la prise alimentaire à court terme. A l'heure actuelle, peu de séquences peptidiques ont été identifiées pour leur activité stimulatrice de la sécrétion des hormones intestinales et les mécanismes impliqués dans ce « sensing » intestinal demeurent mal connus.

La recherche de nouvelles sources protéiques et l'identification des peptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique sont donc un axe de recherche important dans la lutte contre l'obésité et les pathologies associées. Aujourd'hui, peu de travaux ont été réalisés chez les animaux de compagnie.

Un des objectifs de ce travail de thèse a été de valider le potentiel de l'hydrolyse de coproduits protéiques dans la génération de populations peptidiques pouvant être impliquées dans la régulation de la prise alimentaire. Les objectifs de ce travail ont également concerné l'identification des peptides bioactifs. Une étude préliminaire, réalisée avant le début de la thèse a permis de sélectionner deux hydrolysats obtenus à partir de poisson (PWF) et de viande (XVP 15035). Ils ont été sélectionnés pour leur potentiel à stimuler *in vitro* la sécrétion des hormones intestinales GLP-1 et CCK et à inhiber l'activité de la DPP-IV. Les travaux réalisés au cours de ce travail de thèse peuvent être divisés en quatre grandes parties. La première partie a été consacrée à l'étude du potentiel des deux hydrolysats à stimuler la sécrétion de CCK et de GLP-1 et à inhiber l'activité de la DPP-IV au cours de la digestion GI. La deuxième partie de la thèse a été consacrée aux fractionnements des deux digestats intestinaux et à la sélection des fractions montrant le meilleur potentiel sur ces activités. La population peptidique des fractions bioactives a été identifiée et a permis la sélection de quelques peptides pour lesquels le potentiel à stimuler la sécrétion des hormones intestinales ou à inhiber l'activité de la DPP-IV a été mesuré dans une troisième partie. Enfin, dans une dernière partie, une étude *in vivo* chez le rat a été menée afin d'étudier le potentiel de l'hydrolysat PWF à agir dans la régulation du métabolisme énergétique.

Ce manuscrit débute par une synthèse bibliographique qui présente les connaissances et les avancées scientifiques obtenues jusqu'à aujourd'hui sur la digestion gastro-intestinale, sur la génération et l'identification des peptides bioactifs issus du clivage des protéines ainsi que sur les mécanismes d'action de ces peptides bioactifs sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales et sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV. Dans une seconde partie, les méthodes ainsi que les matériels utilisés ont été décrits. La troisième partie présente les résultats obtenus tout au long de ce travail. Une partie de ces résultats est consacrée aux essais *in vitro* qui portent sur la sécrétion des hormones intestinales et sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV. Une autre partie présente les résultats obtenus au cours de l'étude *in vivo* chez le rat. Les résultats ont ensuite été discutés et comparés aux données de la littérature. Enfin, une dernière partie reprend les résultats et hypothèses principaux et présente les perspectives de ce travail.

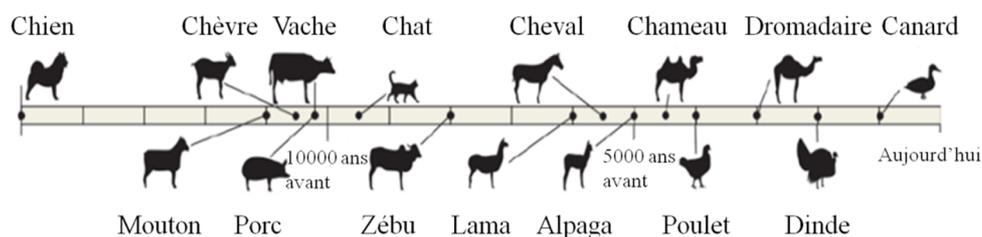
# Synthèse bibliographique

---

## **I. Domestication des animaux de compagnie et développement du marché du pet food**

### **I.1. Données historiques sur la domestication des chiens et des chats**

Depuis des milliards d'années, l'Homme a domestiqué différentes espèces animales (*Figure 1*). La domestication est un processus qui a été créé par l'Homme et qui implique le soin pour une espèce animale ainsi que des changements dans son matériel génétique sur plusieurs générations (avec notamment des phénomènes d'hybridation pour la sélection des animaux). En effet, la domestication est un processus influencé par les interactions sociales entre les personnes et les animaux. Celui-ci résulte en un changement des caractéristiques comportementales, morphologiques et physiologiques (Young 1985, Martins 2018). En domestiquant les animaux, l'Homme a une influence beaucoup plus forte sur les animaux avec notamment un contrôle sur leur reproduction, leur nourriture mais également sur leur mise à mort. Le but de cette domestication est de subvenir aux besoins de l'Homme comme source de nourriture ou pour leur utilité dans les travaux agricoles, la chasse, le transport... (Martins 2018).



**Figure 1.** Domestication des animaux.

D'après l'article de D.E. MacHugh (MacHugh et al. 2016).

Les meilleurs amis de l'Homme, les plus populaires de nos jours, sont les chiens et les chats considérés comme un membre de la famille. Dans une étude datant de 2011, 63,2% des propriétaires d'animaux de compagnie ont considéré leurs animaux comme un membre de leur famille et un tiers de ces personnes ont considéré leur animal comme leur compagnon (Deng and Swanson 2015a). Cela n'a pas toujours été le cas, en effet les chiens et les chats ont d'abord été domestiqués pour les travaux qu'ils pouvaient réaliser pour l'Homme. Les chiens ont été une aide à la chasse, utilisés comme défenseurs du territoire. Ils ont pu servir au transport de biens et de personnes (en tirant les charrettes) mais également comme source de nourriture et de fourrure (Case 2008 ; Perri and Widga 2018). Les chats ont principalement été utilisés pour éliminer les nuisibles dans les fermes (Faure and Kitchener 2009).

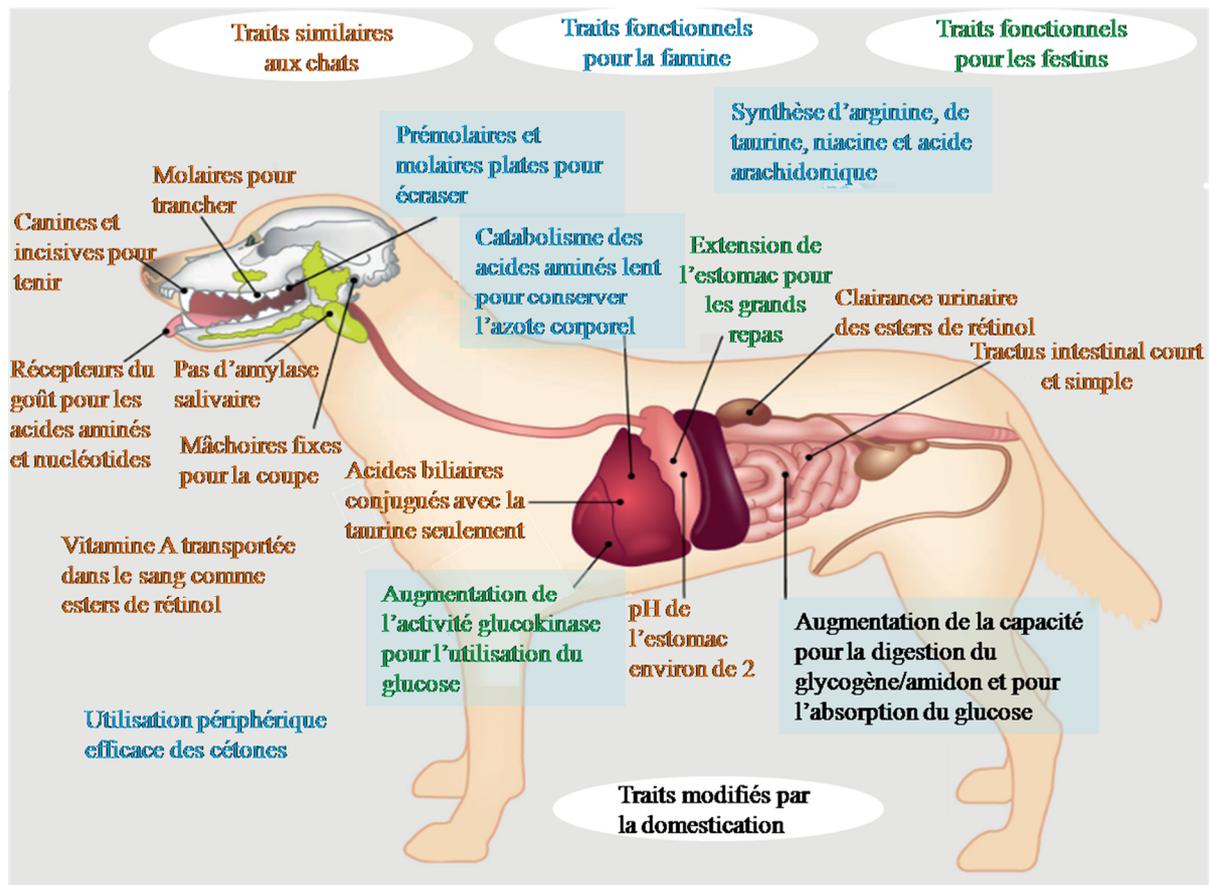
Il est souvent reconnu que la domestication du chien (*Canis lupus familiaris*) a eu lieu il y a environ 16 000 ans (**Figure 1**) à partir des ancêtres du loup gris (*Canis lupus*). Au début de la domestication, les chiens, tout comme les chats, n'ont pas été domestiqués tel que le terme « domestication » le définit. En effet, il s'agit plutôt d'une adaptation du loup sauvage et du chat sauvage à l'Homme ou d'un apprivoisement de ces animaux. Au début de la domestication du chien, il s'agissait d'une relation d'aide et de cohabitation (Martins 2018) et certaines études montrent une première domestication durant l'ère paléolithique il y a plus de 40 000 ans (Camarós et al. 2015; Germonpré et al. 2009). Les chiens auraient d'abord été domestiqués en Asie de l'Est et en Europe (Perri and Widga 2018) et cette domestication serait apparue au moment où l'Homme est passé de chasseur-cueilleur à chasseur-fermier (Case 2008). Le rapprochement entre les chiens et l'Homme a dû avoir des avantages que ce soit pour l'Homme ou pour le loup. Il est pensé que l'Homme et le loup étaient en compétition pour la chasse donc ce rapprochement a pu permettre aux loups d'avoir de la nourriture en continu. Etant donné que les loups sont des espèces très hiérarchiques, il est supposé que l'Homme est devenu l'alpha pour prendre le contrôle sur cette espèce (Martins 2018).

Bien que la domestication du chien soit évidente par l'observation des différentes races de chiens qui existent (nombreuses modifications génétiques aujourd'hui), la domestication du chat, du point de vue génétique est moins évidente. En effet le génome du chat a été moins impacté que celui du chien car les chats apprivoisés ont toujours été en contact avec les chats sauvages, ce qui a induit peu de modifications génétiques. De plus, il est pensé que le chat était « parfait » dès le début de l'apprivoisement (animal non dangereux, aucun apprentissage à réaliser pour la chasse des rongeurs...). Les principales modifications génétiques ont été mises en évidence sur des gènes impliqués dans le développement de certaines structures du cerveau. Ces mutations observées seraient associées à des changements de comportements (Martins 2018). Contrairement aux chiens, les chats (*Felis catus*) ont été apprivoisés plus récemment, il y a moins de 10 000 ans (**Figure 1**) (Faure and Kitchener 2009). Quand la domestication du chat a commencé, le chien était déjà totalement domestiqué (Young 1985). La domestication des chats correspondrait au moment où l'Homme a commencé à construire des maisons, des fermes et des installations agricoles (Driscoll et al. 2009). Parmi les différentes espèces de félidés qui ont pu être domptées, seule *Felis silvestris* a été domestiquée (Faure and Kitchener 2009). Il est pensé que le chat n'a réellement été domestiqué qu'à partir du XIX<sup>e</sup> siècle avec l'urbanisation et seulement dans des contextes

citadins. De plus, contrairement aux chats sauvages qui sont très solitaires, les chats domestiqués acceptent également les autres chats (Martins 2018).

## **I.2. Conséquences de la domestication sur le comportement alimentaire**

La domestication, ainsi que le développement du marché du pet food ont induit une modification du métabolisme des animaux de compagnie. Ainsi, comme le loup, le chien est par nature un carnivore. Cependant cette classification est discutée de nos jours avec certains scientifiques qui considèrent toujours les chiens comme des carnivores et d'autres qui les considèrent comme des omnivores (Hendriks 2013). En effet, le loup est capable d'adapter son métabolisme et ainsi consommer autres choses que des protéines afin de survivre aux périodes de famine. De plus, les chiens peuvent être classés comme des omnivores par les auteurs qui se basent sur des différences physiologiques et métaboliques avec les chats (Bosch et al. 2015). La figure suivante présente les traits communs avec le chat, les traits fonctionnels pour la famine, ceux fonctionnels quand la présence de nourriture est suffisante et ceux qui ont été modifiés avec la domestication (*Figure 2*).



**Figure 2.** Caractéristiques omnivores du chien.

Différents traits caractéristiques des omnivores sont présentés dans les carrés bleus transparents reflétant le style de vie typique en famine ou en festin de son ancêtre le loup. D'autres traits caractéristiques communs aux chats (carnivores) sont présentés en orange et les traits modifiés par la domestication sont présentés en noir. Image modifiée d'après (Bosch et al. 2015).

Contrairement aux chiens, les chats domestiques tout comme leurs ancêtres sont des carnivores stricts, induisant des conséquences sur leurs besoins nutritionnels avec notamment des besoins en acides aminés élevés et des particularités métaboliques principalement sur le métabolisme glucidique. Ainsi, la consommation des aliments commerciaux et notamment les croquettes riches en glucides pourraient favoriser le développement du surpoids mais également du diabète chez les chats (Salaun et al. 2017; Verbrugghe and Bakovic 2013; Verbrugghe and Hesta 2017a)

### I.3. Histoire du pet food

Les chiens et les chats se sont, pendant longtemps, nourris des rongeurs et autres petits nuisibles présents dans les fermes, mais également des déchets alimentaires des humains. Ce n'est qu'en 1860 que le premier aliment pour chien, sous la forme d'un biscuit, fut développé et commercialisé par James Spratt. Presque 100 ans plus tard, en 1950, la société James Spratt

est devenue une part de General Mills, racheté en 1960 par Spillers Dog Food Company. Cette société est depuis les années 1990 une branche de Nestlé, connu aujourd'hui sous le nom de Nestlé Purina PetCare. A partir des années 1900, d'autres fabricants d'aliments pour animaux de compagnie ont fait leur apparition. FH Bennett a développé des biscuits pour chien en 1907 à New York et en 1922, les frères Chappel ont développé la première conserve d'aliment pour chien. En 1925, Samuel et Clarence Gaines ont commencé à vendre un nouvel aliment pour chien ou « repas » et dans les années 1930 de nombreuses nouvelles marques d'aliments pour chien ont émergé sur le marché. Pendant la seconde guerre mondiale, l'aliment sec pour chien a commencé à dominer le marché du pet food parce que l'étain qui était utilisé pour les boîtes de conserve de nourriture pour animaux de compagnie était détourné pour la guerre. En 1946, les aliments secs pour animaux de compagnie représentaient 85% du marché du pet food aux Etats Unis. En 1957, Purina Dog Chow devient disponible et General Foods a développé Gaines Burger, le premier aliment pour chien semi-humide. Hills Science Diet™ devient la première ligne de production pour des aliments adaptés aux différentes étapes de la vie des animaux de compagnie en 1968 (Hill 2010).

#### **I.4. Le marché du pet food aujourd'hui**

Entre 2007 et 2017, des données ont montré une augmentation constante de la population mondiale des chiens (17%) et des chats (14%) soit 381 millions de chiens et 289 millions de chats (Euromonitor International 2017). En parallèle, le marché du pet food, c'est-à-dire l'alimentation pour animaux de compagnie, continue de se développer et progresse rapidement (Bontempo 2005). En effet, les ventes en alimentation animale sont également en augmentation, atteignant au niveau mondial 131,7 milliards d'euro en 2014 (Tobie et al. 2015).

La plupart des aliments fabriqués pour les animaux de compagnie sont formulés pour répondre à des objectifs nutritionnels spécifiques afin de soutenir la croissance, l'entretien ou la gestation et la lactation selon les recommandations de l'AAFCO (Association of American Feed Control Officials) (Zicker 2008), de la FEDIAF (Fédération Européenne de l'Industrie des Aliments pour Animaux Familiers, FEDIAF 2019) mais également des exigences nutritionnelles des chiens et des chats décrites dans le NRC (National Research Council 2006). Cependant, aujourd'hui, les propriétaires d'animaux de compagnie réclament des produits de haute qualité pour leurs animaux et dépensent de plus en plus d'argent pour que leurs animaux bénéficient d'une longue vie en bonne santé. De ce fait, des études ont été

conduites afin d'une part de développer les connaissances sur la nutrition des animaux de compagnie mais également pour développer de nouvelles stratégies afin d'augmenter la qualité des aliments et d'améliorer l'état de santé de l'animal via son régime alimentaire (Bontempo 2005). Pour répondre à la demande, les industries du pet food sont constamment innovantes et développent de nouveaux produits/formules. Par exemple, en 2013-2014, plus de 10 000 nouveaux produits (friandises, aliments secs et humides) ont été lancés sur le marché mondial (Tobie et al. 2015). Aujourd'hui, une large gamme de produits complets et équilibrés est disponible sur le marché. Différents types de produits existent : des produits secs, des produits semi-humides et des produits humides. Ces produits permettent d'améliorer la santé, la longévité et le bien-être des chiens et des chats. Une autre gamme de produits, les aliments thérapeutiques pour des maladies spécifiques, a été développée et commercialisée. Ces aliments ciblent le déclin cognitif lié à l'âge, le contrôle du poids et du glucose sanguin, les maladies chroniques des reins, les maladies gastro-intestinales, *etc* (Deng and Swanson 2015a). Aujourd'hui, les industries du pet food doivent trouver un compromis entre la qualité nutritionnelle et l'appétence du produit, en particulier pour les aliments dit bénéfiques pour la santé comme pour la gestion de l'obésité ou du diabète (Tobie et al. 2015).

### **I.5. Pet food et bien-être animal**

Comme évoqué précédemment, depuis un certain nombre d'années, les animaux de compagnie sont considérés comme un membre de la famille à part entière. La tendance à l'humanisation des animaux de compagnie a contribué à l'importance croissante accordée à leur santé et à leur longévité. Le concept de l'humanisation a été décrit par Foote (Foot and Mus 2006) comme l'attribution d'une gamme complète de caractéristiques humaines aux animaux, y compris le comportement, les pensées, la personnalité, l'apparence, la compréhension mutuelle et la communication. Une conséquence de l'achat par les propriétaires d'aliments commerciaux complets et équilibrés, de plus en plus élaborés sur le plan nutritionnel, a contribué à une durée de vie significativement plus longue et plus saine pour leurs animaux de compagnie (Deng and Swanson 2015a). Cependant, certains propriétaires ne respectent pas les quantités recommandées pour leur animal et utilisent l'alimentation comme récompense, ce qui peut conduire à des déséquilibres alimentaires.

### **I.6. Conclusion**

La domestication des animaux de compagnie et l'augmentation de leur importance dans la vie des propriétaires, dû à un processus d'humanisation, a conduit à l'amélioration de

leur qualité de vie grâce à l'augmentation des soins vétérinaires ou l'apport d'aliments de meilleures qualités. Néanmoins, les apports nutritionnels n'étant pas toujours strictement contrôlés (notamment en termes d'apport calorique), l'utilisation de l'alimentation comme récompense ainsi que le manque d'exercice ont créé chez ces animaux, une augmentation de la prévalence du surpoids et de l'obésité conduisant à certaines maladies comme les troubles du métabolisme.

## **II. Troubles du métabolisme chez les animaux de compagnie**

Le chien et le chat, comme tous les mammifères, possèdent un système de régulation permettant un apport énergétique équilibré par rapport à la dépense énergétique, ce qui permet de maintenir un poids de forme quasiment constant dans le temps. Le système nerveux central permet la régulation de l'homéostasie énergétique (balance entre la prise alimentaire et la dépense énergétique, définie dans la section V) avec une stimulation de la prise alimentaire quand les quantités d'énergie disponibles diminuent et inversement une réduction puis un arrêt de la prise alimentaire lorsque les quantités d'énergie disponibles augmentent. Ce phénomène est régulé à l'aide de différents signaux (sanguins, nerveux) émis au niveau périphérique. Un dérèglement chronique de cette balance énergétique induit une prise de poids, et à terme le développement de troubles métaboliques. Au cours de la thèse, les travaux de recherche ont été axés sur deux troubles du métabolisme, l'obésité et le diabète de type 2 (TD2).

### **II.1. Le développement de l'obésité**

L'obésité est une maladie liée à la nutrition menant à une réduction de la durée de vie et de la qualité de vie. Elle est définie comme une accumulation excessive de masse grasse conduisant à une détérioration de la santé ou des fonctions corporelles (German 2006; Laflamme 2011 ; Öhlund et al. 2017; Öhlund et al. 2018). C'est le résultat d'une consommation excessive d'énergie ou d'une utilisation inadéquate de l'énergie, ce qui cause un état de balance énergétique positive.

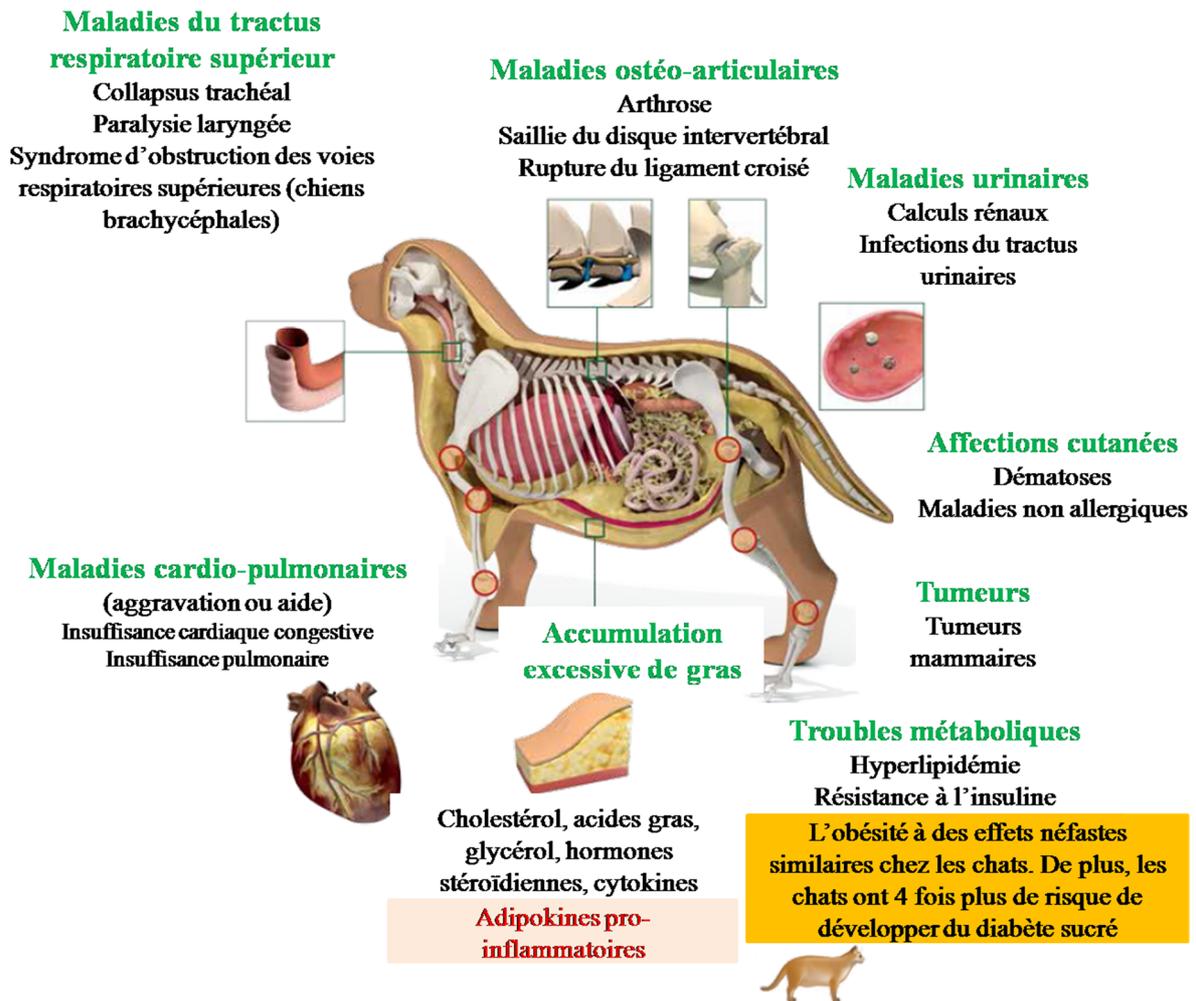
Comme pour l'Homme, l'obésité est considérée comme un problème de santé majeur chez le chien et le chat. La prévalence du surpoids et de l'obésité chez les chiens a été estimée en 2017 entre 19,7 et 59,3% selon les races (Chandler et al. 2017) tandis que la prévalence du surpoids et de l'obésité chez les chats était estimée entre 7 et 63% selon les races (Öhlund et al. 2018).

### II.1.1. Causes de l'obésité et facteurs de prédisposition

Certains facteurs de prédisposition à l'obésité des animaux de compagnie ont été établis par des études récentes. Les facteurs liés à l'animal sont : la stérilisation, la race, la génétique, l'âge et la santé (sarcopénie et maladies concomitantes). Le risque génétique pour la maladie est plus élevé pour certains chiens (Labradors et Golden Retrievers) et certaines races félines (Manx et Shorthair domestiques). Les chiens femelles stérilisés d'âge mûr et les chats mâles stérilisés d'âge mûr sont plus souvent touchés par le surpoids et l'obésité. Le risque d'obésité lié à la stérilisation est causé par la combinaison d'une diminution du besoin énergétique après la stérilisation avec une augmentation de la consommation alimentaire. Le risque d'obésité est donc lié à la diminution journalière d'activité physique chez les chiens et une activité limitée ou sans activité extérieure chez les chats, mais aussi la relation entre l'animal et le propriétaire qui influence l'alimentation et sa gestion (suralimentation, friandises données excessivement, non suivi des recommandations alimentaires), aux habitudes de consultation vétérinaire, à l'âge des propriétaires ainsi qu'à leur statut socio-économique (Chandler et al. 2017; Lund et al. 2006; Muñoz-Prieto et al. 2018).

### II.1.2. Conséquences métaboliques et physiologiques

Le trouble du métabolisme, qui devient de plus en plus alarmant chez les animaux de compagnie et qui est toujours un problème de santé majeur chez l'Homme regroupe notamment l'obésité et ses conséquences tels que le TD2 (Öhlund et al. 2017). En 2016, 650 millions de personnes adultes étaient déclarés obèses et 422 millions de personnes adultes étaient diabétiques en 2014 dans le monde (OMS 2016; OMS 2018). L'obésité est la maladie nutritionnelle la plus commune chez les animaux de compagnie, elle conduit à une réduction de la qualité de vie (German et al. 2011), au développement d'autres maladies (German 2006) voire une réduction de l'espérance de vie comme cela a été démontré chez le chien (Kealy et al. 2002). L'obésité est associée au développement de maladies cardio-pulmonaires, orthopédiques, endocrines et oncologiques aussi bien chez l'Homme que chez les animaux mais également des problèmes de peau et le développement du diabète de type 2 (DT2) (**Figure 3**) (Muñoz-Prieto et al. 2018; Verbrugge and Hesta 2017b).



**Figure 3.** Conséquences de l'obésité.

Image modifiée de (German et al. 2011; Kealy et al. 2002; Öhlund et al. 2018; Royal Canin)

Le tissu adipeux produit des hormones telles que la leptine, ainsi que des cytokines, notamment inflammatoires. L'obésité se caractérise donc non seulement par des modifications hormonales, mais aussi par une inflammation chronique, une augmentation du stress oxydatif et des troubles métaboliques tels que la résistance à l'insuline.

## II.2. Le diabète de type 2

### II.2.1. Le développement du diabète de type 2 chez les animaux de compagnie

Le diabète est un grave problème de santé pour toutes les espèces et peut être classé selon les mécanismes physiopathologiques de type 1, qui se caractérise par la perte ou la destruction des cellules  $\beta$  pancréatiques productrices d'insuline, ou de type 2, qui se caractérise par la résistance à l'insuline et un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques (Chandler et al. 2017). Le DT2 peut être l'une des conséquences de l'obésité chez les animaux

de compagnie. En effet, l'obésité couplé à l'absence d'activité physique contribuent principalement à la résistance à l'insuline associée au diabète de type 2 chez les chats (Öhlund et al. 2018).

Presque tous les chiens diabétiques développent un diabète de type 1 et sont insulino-dépendants au moment du diagnostic. Le taux de diagnostic du DT2 chez les chiens est d'environ 0,6%. De nombreuses races (Terrier Australien, Samoyèdes, Schnauzers miniature et le Caniche toy et miniature) ont plus de risques de développer un DT2, indiquant plutôt un facteur génétique. Etant donné que le diabète chez les chiens est causé par un manque de production d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques, l'obésité n'est donc pas le premier facteur de risque dans le développement du DT2. Cependant, l'obésité chez les chiens diminue la sensibilité à l'insuline (Chandler et al. 2017).

Le DT2 représente plus de 80% des cas de diabète chez le chat. Des facteurs de risque communs tels que l'obésité, l'âge et la sédentarité existent entre le DT2 chez les chats et l'Homme ainsi que des caractéristiques physiopathologiques similaires, y compris le dépôt d'amyloïdes dans les îlots de Langerhans (Nelson and Reusch 2014). Les autres facteurs de risque associés à l'augmentation du DT2 chez les chats sont le genre mâle, la stérilisation, le confinement intérieur et le traitement avec certains médicaments (Öhlund et al. 2017). Les chats les plus affectés ont plus de 8 ans et plus généralement entre 10 et 12 ans quand ils développent du diabète. Il s'agit aussi de la tranche d'âge dans laquelle les chats deviennent obèses. Il a été montré chez deux races de chat (le Shorthair et le Burmese) qu'un polymorphisme du gène du récepteur à la mélanocortine 4, associé à la régulation de la balance énergétique et de l'appétit, est corrélé au développement du DT2 chez les chats en surpoids, ce qui pourrait confirmer un facteur génétique. Au début de la maladie les chats compensent tout d'abord la résistance à l'insuline et ne montrent pas de concentration en glucose sanguin élevé. Eventuellement, chez quelques chats, le fonctionnement des cellules  $\beta$  pancréatiques s'altère et les chats montrent alors tous les symptômes du DT2 (Chandler et al. 2017).

### **II.3. Nutraceutiques et aliments fonctionnels**

Le rôle principal de tout régime alimentaire est de fournir assez de nutriments pour répondre aux besoins métaboliques tout en donnant aux consommateurs une sensation de bien-être. Ainsi, l'importance du rôle de l'alimentation sur la santé des animaux se reflète dans le marché des aliments pour animaux de compagnie. En effet, il a été montré que ce

marché suivait souvent celui de l'alimentation humaine. Aujourd'hui, le marché de l'alimentation humaine met l'accent sur les aliments fonctionnels et les compléments alimentaires bénéfiques pour la santé. En 2017, le marché des produits pour la santé des animaux de compagnie (produit Healthcare et compléments alimentaires) représentait 5,2 milliards de dollars. Depuis plusieurs années, les connaissances acquises supportent l'hypothèse que, en plus de répondre aux besoins nutritionnels, le régime alimentaire peut moduler différentes fonctions dans l'organisme et peut jouer des rôles bénéfiques ou non dans certaines maladies. Ces régimes alimentaires sont constitués de substances bioactives qui sont définies comme des composés alimentaires pouvant affecter les processus biologiques et avoir un impact sur la fonction ou la condition du corps et finalement sur la santé (Möller et al. 2008). Ainsi, le développement d'aliments « nutraceutiques » et d'« aliments fonctionnels » dans le régime alimentaire permet la limitation de la prise de médicaments (Bontempo 2005). Le terme de « nutraceutique » se réfère à un complément alimentaire qui permet de délivrer, sous une forme concentrée, un agent censé être bioactif obtenu à partir d'un aliment. Il est présenté dans une matrice non alimentaire et utilisé dans le but d'améliorer la santé. L'agent bioactif est présent à des doses supérieures à celles qui pourraient être fournies par l'alimentation. Les nutraceutiques sont vendus sous forme de comprimé, de poudre ou de boisson. Alors qu'un aliment fonctionnel est défini comme des constituants alimentaires ou un aliment entier, dont la consommation peut avoir des avantages pour la santé qui dépassent les propriétés nutritionnelles de base des aliments. Parmi les composés fonctionnels, il y a les pro- et prébiotiques, les fibres solubles, les antioxydants, les vitamines, les minéraux, quelques protéines, les peptides et acides aminés (Gul et al. 2016).

#### **II.4. Conclusion**

Comme pour l'Homme, la lutte contre l'obésité permet une amélioration de la santé et du bien-être des animaux de compagnie, ainsi qu'une diminution du risque de développer des troubles tels que le diabète de type 2. L'augmentation de l'obésité chez les animaux de compagnie et des maladies concomitantes a permis le développement d'alimentations ciblant les différents troubles du métabolisme. De plus, des alternatives aux médicaments sont aujourd'hui développées pour lutter contre ces maladies et ainsi éviter les effets secondaires que peuvent induire ces traitements.

Pour les animaux de compagnie, la fabrication des ingrédients utilisés dans la formulation de l'alimentation est réalisée à partir de coproduits provenant notamment de l'industrie agro-

alimentaire. Les tendances actuelles obligent les industries du pet food à une augmentation de la transparence dans le choix des matières premières utilisées, ainsi qu'une augmentation de la recherche pour le développement d'ingrédients à visée nutrition/santé.

### **III. Valorisation des coproduits agroalimentaires**

#### **III.1. Généralités**

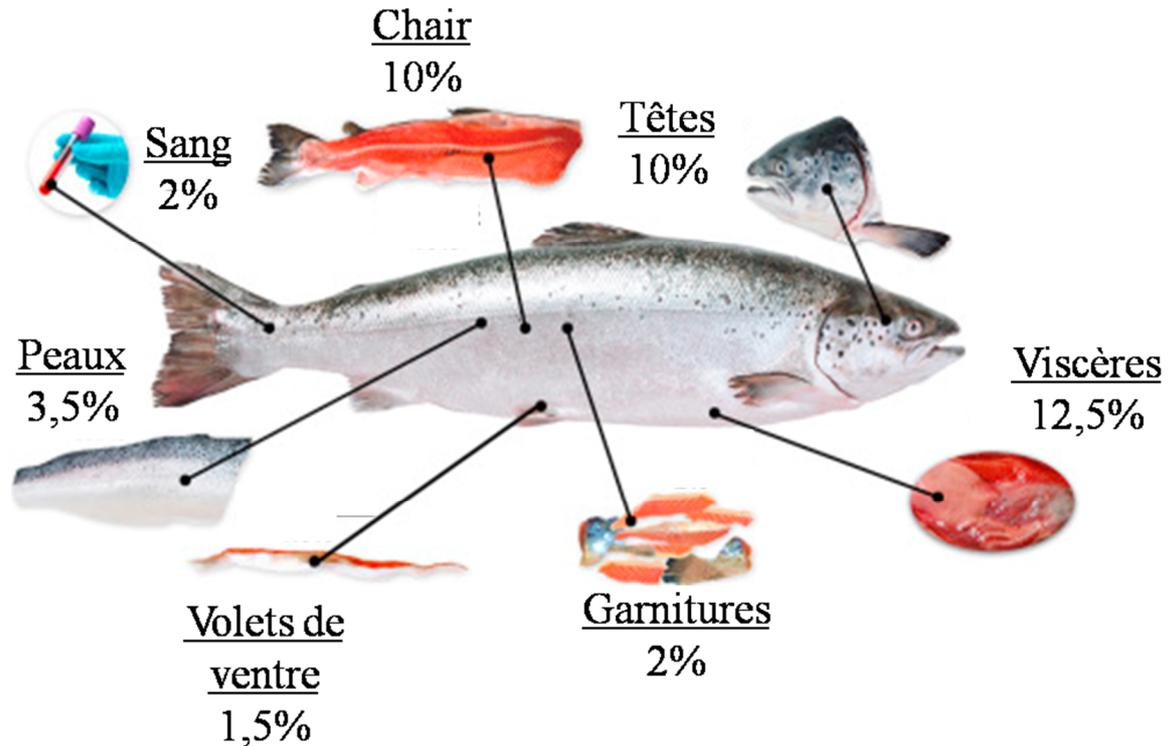
Dans un objectif écologique, économique et sociétal, le gaspillage alimentaire est depuis plusieurs décennies très critiqué. Ce gaspillage alimentaire provient notamment des ménages, de la grande distribution mais également des industries alimentaires. L'industrie agroalimentaire, qui a pour objectif de fabriquer des denrées alimentaires pour l'alimentation humaine, génère également de ce fait des produits non utilisés. Ces produits, appelés autrefois déchets industriels, sont aujourd'hui valorisés et ont été renommés sous-produits ou coproduits. Il y a deux types de coproduits, ceux générés lors de la première transformation d'une matière première afin d'extraire les constituants les plus nobles et ceux issus des transformations suivantes. Les coproduits de la première transformation sont majoritairement valorisés en alimentation humaine (Chapoutot et al. 2018).

En France, le volume de coproduits issus des principales industries agroalimentaires a été estimé à 12,1 millions de tonnes de matière sèche en 2016 dans une enquête réalisée par Réséda (réseau de partenaires des filières de production animale). Parmi ces 12 millions de tonnes, l'industrie de la viande et de la transformation des produits de la pêche et de l'aquaculture génèrent 8% de coproduits (Réséda 2017). L'alimentation animale valorise 76% du tonnage de ces coproduits et 15% sont utilisés dans d'autres industries (alimentation humaine, biocarburants, cosmétique), 6% sont valorisés par l'agronomie (épandage, fertilisation, compostage) et 3% destinés à des valorisations énergétiques (méthanisation, combustion) (Chapoutot et al. 2018).

#### **III.2. Les différentes sources de coproduits**

Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés à deux types de coproduits : un coproduit de poisson et un coproduit d'origine carnée.

Les coproduits issus du poisson peuvent être constitués de la tête, de la peau, des viscères, des chutes de filetage et des arêtes (*Figure 4*).



**Figure 4.** Parties du poisson valorisées comme coproduits.

Image modifiée d'après (Stevens et al. 2018)

Ces coproduits sont générés par le mareyage, la conserverie, le traiteur et ne sont habituellement pas consommés par l'Homme (Réséda 2017). Ils sont issus de toutes espèces et notamment le saumon, le thon, le merlan bleu, le tilapia, etc.

L'industrie de la viande produit de grands volumes de coproduits comme le sang, les os, les parures de viande, la peau, les tissus adipeux, les cornes, les sabots, les pieds, le crâne ou encore les viscères (Toldrá et al. 2016). Ces coproduits sont générés par les abattoirs, les transformateurs, les grossistes et les usines d'équarrissage (Jayathilakan et al. 2012). Les proportions d'animaux d'équarrissage valorisés représentent respectivement 34%, 42% et 25% pour le porc, le bœuf et la volaille (EFPRA 2016). Certaines parties des carcasses peuvent être considérées comme des coproduits ou à l'inverse comme des aliments d'intérêt selon les pays et les traditions : c'est le cas pour le sang, le foie, les poumons, le cœur, les reins, le cerveau, la rate et les tripes. Cela s'explique par les propriétés nutritionnelles intéressantes de ces coproduits, par la présence d'acides aminés essentiels, de minéraux ou de vitamines. Leur valorisation représente donc une grande opportunité pour l'industrie de la viande tant en alimentation humaine qu'animale et notamment pour le pet food (Toldrá et al. 2016).

### III.3. Valorisation des coproduits dans l'industrie du pet food

L'industrie du pet food utilise les coproduits de l'industrie agroalimentaire comme matières premières pour la fabrication d'aliments pour animaux de compagnie, sous forme de croquettes, pâtées ou friandises. Pour cela, les coproduits animaux doivent appartenir à la catégorie 3, telle que régie par le règlement européen (CE) n° 1069/2009. Ces produits sont issus d'animaux abattus en abattoir, sains, et déclarés comme propres à la consommation humaine, ainsi que de poissons traités en conserverie et atelier de filetage. Le processus de transformation des coproduits de catégorie 3 donne lieu à deux types de produits de qualité, recherchés par de nombreux industriels : la graisse, ou corps gras animal ; décantée, puis centrifugée ou filtrée et la protéine animale transformée (PAT) ; issue du broyage de la fraction protéique du coproduit. L'utilisation des graisses et PAT comme matières premières pour la fabrication de pet food est une illustration parfaite d'approvisionnement durable, un des piliers de l'économie circulaire.

En 2016, l'industrie du pet food a valorisé environ 360 000 tonnes de coproduits d'animaux terrestres et 25 000 tonnes de poissons. De plus, ce secteur a permis de valoriser 276 000 tonnes des protéines animales transformées, utilisées pour satisfaire les besoins protéiques des chiens et chats. Ainsi, l'industrie du pet food est la première voie de valorisation des coproduits provenant d'animaux (Réséda 2017). Pour le poisson, selon l'espèce, entre 40 et 60% du poids de l'animal est destiné à l'alimentation humaine. Ainsi, la matière première est constituée d'une grande part de coproduits qui seront valorisés sous forme de farine et d'huiles de poissons (52%), d'hydrolysats protéiques destinés à l'alimentation animale (21%) et également de hachis congelés pour l'alimentation des animaux domestiques (21%).

Une petite part des coproduits peut être utilisée pour développer des ingrédients à plus forte valeur marchande (arômes, émulsifiants) ou des ingrédients alimentaires avec des effets positifs sur l'organisme (nutraceutiques) (Le Floc'h et al. 2011). Les hydrolysats protéiques obtenus à partir des coproduits animaux peuvent notamment permettre de générer des extraits avec des propriétés fonctionnelles ou des peptides bioactifs (Toldrá et al. 2016; Toldrá et al. 2018), grâce à une ou plusieurs étapes d'hydrolyse de la matière première, et éventuellement grâce à des étapes de séparation des molécules d'intérêt.

Au cours de la thèse, les travaux menés ont été axés sur les protéines et donc la suite de cette synthèse développera l'hydrolyse des coproduit protéiques ainsi que le devenir des protéines au cours de l'hydrolyse et le développement du potentiel bioactif des hydrolysats.

### III.4. Valorisation des coproduits protéiques par hydrolyse

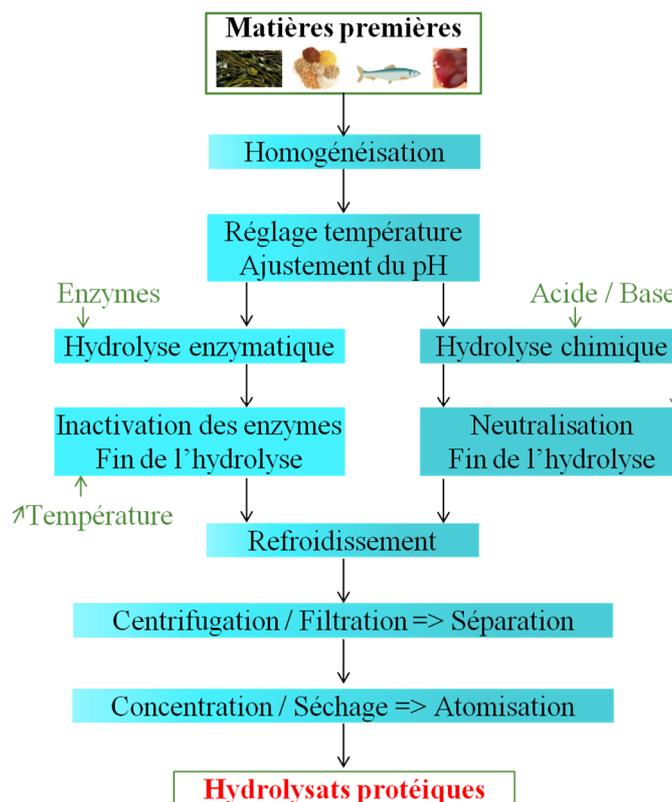
Les protéines possèdent des propriétés nutritionnelles, fonctionnelles et biologiques qui sont fréquemment modifiées par les technologies utilisées dans les procédés alimentaires. Les principales causes de modification des protéines lors du procédé sont les changements de pH tels que l'acidification ; les traitements chimiques tels que l'acylation, la glycosylation et la phosphorylation ; les traitements thermiques et la fermentation. Ces modifications peuvent permettre d'améliorer la texture finale ou, les caractéristiques organoleptiques, la stabilité du produit, ou la génération de peptides bioactifs. Cependant, les modifications des protéines peuvent également avoir quelques aspects négatifs comme notamment l'apparition de fragments protéiques allergènes (Toldrá et al. 2018).

#### III.4.1. Principales applications des hydrolysats

Les hydrolysats protéiques peuvent être utilisés en alimentation animale pour leurs propriétés aromatiques, fonctionnelles ou nutritionnelles. L'hydrolyse des protéines permet de générer des peptides de petite taille et des acides aminés jouant un rôle important dans la saveur du produit. Les propriétés fonctionnelles recherchées sont la solubilité, les capacités moussantes et émulsifiantes, ainsi que le pouvoir de rétention de l'eau et des matières grasses. Ces propriétés fonctionnelles sont induites par l'hydrolyse qui augmente le nombre de peptides de faible poids moléculaire, le nombre de groupes ionisables et l'exposition de groupes hydrophobes. De plus, les hydrolysats protéiques peuvent être ajoutés en tant que compléments protéiques dans l'alimentation animale.

#### III.4.2. L'hydrolyse des protéines

L'hydrolyse des protéines (protéolyse), qui consiste à couper les liaisons peptidiques, permet d'obtenir des hydrolysats protéiques (assemblage de polypeptides, peptides et acides aminés libres) par hydrolyse enzymatique ou par hydrolyse chimique (*Figure 5*).



**Figure 5.** Exemple de procédé d'hydrolyse des matières premières pour l'obtention des hydrolysats protéiques.

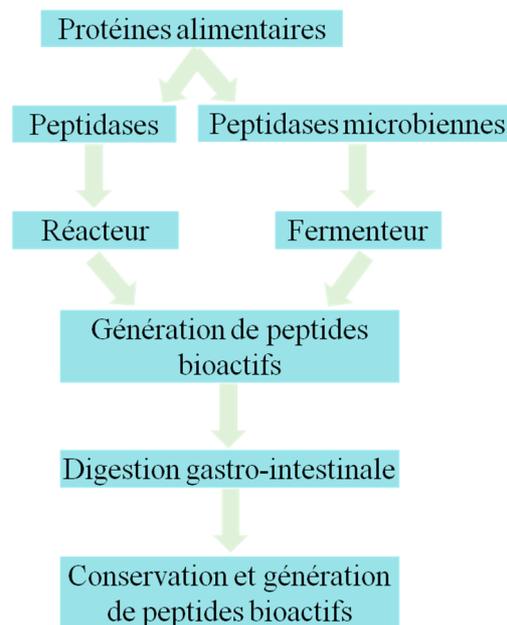
Les matières premières peuvent être hydrolysées par voie enzymatique ou par voie chimique. Après homogénéisation et ajustement de la température et du pH d'hydrolyse, les matières premières peuvent être hydrolysées par des enzymes endogènes (autolysats) et/ou par des enzymes industrielles, ou encore par une hydrolyse aléatoire par ajout d'acide ou de base (hydrolyse chimique). A la fin de l'hydrolyse, les hydrolysats protéiques sont refroidis, subissent une séparation par centrifugation ou filtration, afin de récupérer la partie protéique de l'hydrolysat, puis concentrés et/ou séchés par atomisation. D'après IFREMER, Bibliomer 2010.

Une étape de broyage de la matière première peut être réalisée avant le début de l'hydrolyse enzymatique ou chimique. Les différences principales entre l'hydrolyse enzymatique et l'hydrolyse chimique sont d'une part l'utilisation d'enzymes pour l'hydrolyse enzymatique et d'un acide ou d'une base pour l'hydrolyse chimique et d'autre part, une augmentation de la température pour inactiver les enzymes ajoutées pour l'hydrolyse enzymatique.

### III.4.3. Hydrolyse par voie enzymatique

L'hydrolyse enzymatique est notamment utilisée pour l'obtention de peptides bioactifs dans la fabrication des ingrédients. Les peptides bioactifs sont encryptés dans la séquence protéique parente et deviennent bioactifs une fois libérés. Ainsi, l'hydrolyse des protéines alimentaires par des enzymes endogènes, exogènes ou microbiennes est nécessaire pour la

libération de ces peptides (Toldrá et al. 2018) (**Figure 6**). Un chapitre (VI) est dédié aux peptides bioactifs plus loin dans cette introduction bibliographique.



**Figure 6.** Schéma montrant la génération des peptides bioactifs à partir de l'hydrolyse des protéines alimentaires.

La génération de peptides bioactifs issus des protéines par hydrolyse enzymatique peut être réalisée dans un réacteur avec des peptidases ou par fermentation par des peptidases microbiennes. Les peptides bioactifs générés au cours de l'hydrolyse doivent résister à la digestion gastro-intestinale (digestion GI) pour conserver leur bioactivité. De plus, la digestion GI peut générer de nouveaux peptides bioactifs. Modifié d'après (Toldrá et al. 2018).

La protéolyse peut débuter avec l'activité des enzymes endogènes dès que les produits animaux ou végétaux sont prélevés, puis continuer au cours du processus de transformation sous l'action des peptidases endogènes (enzymes digestives par exemple) et/ou exogènes (peptidases commerciales). Ainsi, les conditions de stockage des matières premières, leur fraîcheur, ainsi que les parties prélevées (plus ou moins riches en enzymes endogènes) sont importantes pour la bonne reproductibilité des hydrolyses.

Des enzymes ou des microorganismes commerciaux sont utilisés pour libérer les peptides bioactifs (Ryder et al. 2016). Les enzymes commerciales utilisées pour hydrolyser les protéines alimentaires proviennent de différentes origines telles que végétales (papaine, bromélaïne), animales (pepsine, trypsine, chymotrypsine mais principalement de microorganismes (*Bacillus*, *Aspergillus*, *Streptomyces*...). L'hydrolyse est réalisée dans un réacteur suivie par des étapes de séparation/purification. Les peptidases commerciales sont généralement en mélange et sont sélectionnées selon leur activité (Toldrá et al. 2018) :

- Alcalase 2.4 L (Endopeptidase, 3.4.21.62 ; 3.4.21.19 ; 3.4.24.-), Maxazyme NNP DS (3.4.24.28), Flavourzyme 1000 L (3.4.23.6 ; 3.4.11.- ; 3.4.14.- ; 3.4.24.- ; 3.4.24.39 ; 3.4.21.63 ; 3.4.16.- ; 3.4.16.6 ; 3.4.23.18 ; 3.4.14.5) et Protease AN (3.3.14.- ; 3.4.21.63 ; 3.4.24.- ; 3.4.11.- ; 3.3.23.18 ; 3.4.24.39 ; 3.4.16.6 ; 3.4.14.5 ; 3.4.16.-): activité exopeptidase, libération d'acides aminés libres. L'activité exopeptidase peut être attribuée aux aminopeptidases et carboxypeptidases.
- Biopraxe SP-20FG (3.4.21.62 ; 3.4.21.19 ; 3.4.24.- ; 3.4.21.-), Collupulin 200 L (3.4.22.6 ; 3.4.22.6), Corolase 2TS (3.4.24.27 ; 3.4.24.-), Promod 439 L (3.4.21.62), Proteinase T (3.4.24.27) et Protin SD-AY10 (3.4.21.62) : activité endopeptidase.

Les peptidases permettent de générer des hydrolysats plus ou moins hydrolysés selon l'objectif d'utilisation de l'ingrédient ; une hydrolyse séquentielle (enchaînement de plusieurs hydrolyses) est parfois réalisée pour générer les peptides bioactifs d'intérêt. Pour cela, les endopeptidases sont généralement utilisées en premier, suivi de l'ajout des exopeptidases. Par exemple, dans un contexte de développement d'un ingrédient hypoallergénique, plusieurs peptidases peuvent être utilisées afin de ne générer que des peptides de petite taille et des acides aminés libres.

Cependant, pour que ces peptides exercent leur bioactivité, ils doivent résister à la digestion gastro-intestinale (GI) et par ce processus, l'action des enzymes gastriques, intestinales et pancréatiques permet également la génération des peptides bioactifs (Capriotti et al. 2015; Caron et al. 2017a; Pepe et al. 2016).

#### III.4.4. Utilisation des hydrolysats protéiques dans l'industrie du pet food

Pendant longtemps, au même titre que l'industrie alimentaire humaine, l'industrie du pet food a cherché à développer une gamme d'aliments pour animaux de compagnie dans le seul but de leur apporter les nutriments nécessaires à leur développement. Mais récemment, comme pour l'alimentation humaine, la tendance est au développement d'une alimentation de meilleure qualité permettant, au-delà du simple fait de nourrir les animaux, de promouvoir leur santé. Ainsi, la recherche d'une meilleure formulation mais aussi le développement d'ingrédients bénéfiques pour la santé ont mené les industriels du pet food à développer une gamme de produits spécifiques (croissance, vieillissement, problèmes rénaux, stérilisation, maintien du poids, santé digestive...) (Deng and Swanson 2015a). La création de ces ingrédients passe aussi par le développement d'hydrolysats protéiques. Ces hydrolysats protéiques, qui peuvent être plus riches en protéines que les farines animales classiquement

utilisées dans l'alimentation animale, possèdent une haute qualité nutritive et une meilleure digestibilité car les fragments protéiques ont généralement des poids moléculaires inférieurs à 10 kDa. Ils peuvent également être moins allergènes que la protéine native (Di Cerbo et al. 2014).

Les premières utilisations des hydrolysats protéiques remontent à un peu plus de vingt ans dans le cadre du développement d'une alimentation spécialisée hypoallergénique. Les hydrolysats protéiques peuvent être utilisés dans les cas de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, les entérites aiguës, dans la prévention de l'hypersensibilité alimentaire ou encore dans l'insuffisance pancréatique exocrine (Cave et al. 2006).

### **III.5. Conclusion**

De nos jours, la valorisation des coproduits de l'industrie agroalimentaire devient un enjeu crucial dans un contexte où la demande mondiale en protéine est en constante augmentation et induit une utilisation accrue de la ressource protéique.

Les coproduits de l'agroalimentaire sont valorisés dans l'industrie du pet food pour la formulation d'aliments de prévention ou de lutte contre les troubles du métabolisme. Cela permet de créer de nouvelles opportunités d'innovations à forte valeur ajoutée si elles sont accompagnées d'une démonstration d'efficacité *in vivo* et d'une clarification des modes d'action des molécules bioactives. En ce qui concerne les peptides bioactifs, cela nécessite notamment que les séquences bioactives libérées au cours du processus d'hydrolyse résistent aux conditions de la digestion GI.

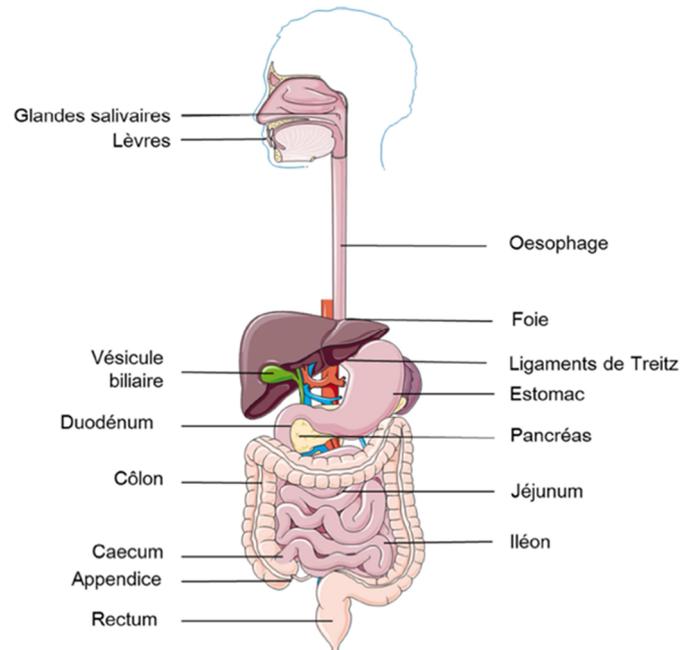
## **IV. Le tractus oro-gastro-intestinal : exemple de celui de l'Homme**

La digestion des aliments a pour but de fournir les nutriments dans leur forme la plus simple afin qu'ils soient absorbés et utilisés par l'organisme. Pour cela, les aliments vont être soumis à différentes actions :

- Mécanique par la mastication et les contractions musculaires.
- Chimique par les enzymes au niveau gastrique et intestinal.
- Microbienne par les bactéries colonisant le tractus digestif.

### **IV.1. Présentation anatomique de l'appareil digestif**

Chez tous les mammifères, l'appareil digestif est composé du tube digestif ou tractus gastro-intestinal (GI) et des organes digestifs accessoires (glandes salivaires, pancréas exocrine, foie et la vésicule biliaire) (*Figure 7*).



*Figure 7. L'appareil digestif humain.*  
Image modifiée d'après Servier Medical Art.

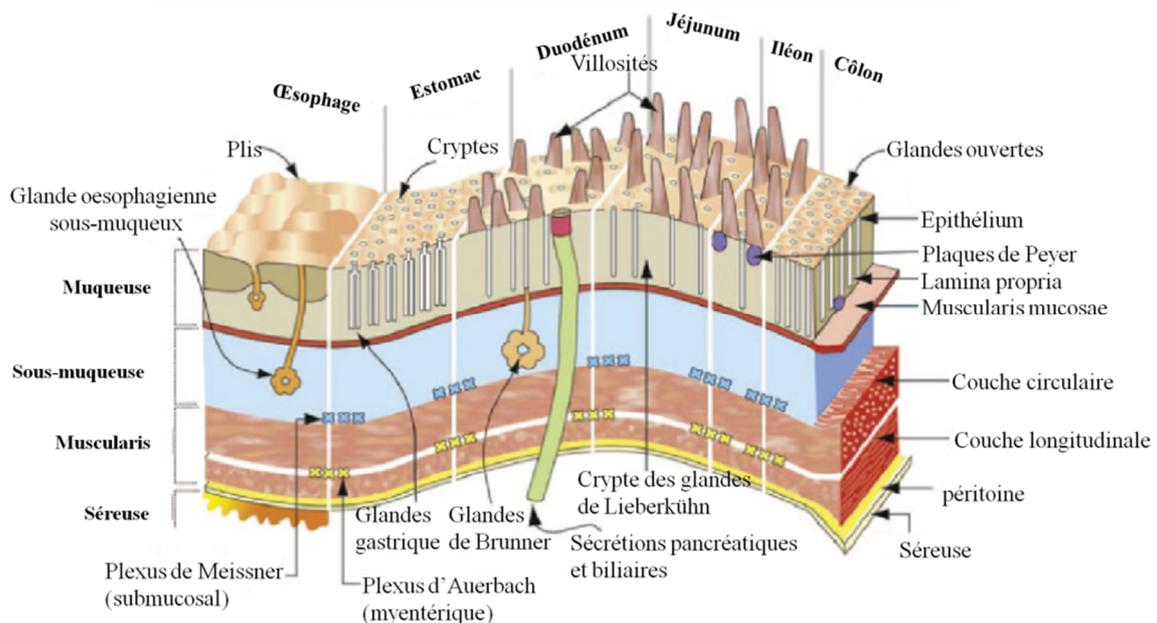
Ces organes accessoires sont situés à l'extérieur du tractus GI et déversent leurs sécrétions par les canaux excréteurs situés dans la lumière intestinale. Ainsi le tractus GI peut être considéré comme un tube s'étendant de la cavité buccale au rectum (Gelberg 2014).

L'estomac est la partie la plus dilatée du tube digestif, et communique avec l'œsophage par l'orifice cardiaque et avec le duodénum par le pylore. Il se divise en trois parties : le fundus, le corps et l'antrum. L'intestin grêle commence à la fin du pylore. Il se divise en trois segments distincts : le duodénum au niveau proximal, le jéjunum et l'iléon avec une moyenne de 4 à 6 m de longueur (Cheng et al. 2010). Le côlon, séparé de l'intestin grêle par le caecum, se divise également en trois segments : le colon ascendant, le colon transverse et le colon descendant et se termine par le rectum.

**Particularités chez le chien et le chat :** La longueur de l'intestin pour un chien mesurant 0,75 m est d'environ 4,5 m. Pour un chat mesurant 0,5 m, la longueur de l'intestin est d'environ 2,1 m (National Research Council 2006). Le chat étant un carnivore strict, son tractus intestinal est donc relativement court et simple (Grandjean and Butterwick 2009).

#### IV.2. Organisation structurelle du tractus gastro-intestinal

La paroi du tractus GI constitue une barrière entre le milieu extérieur et le milieu intérieur de l'organisme. L'intégrité de cette barrière doit être constamment maintenue. En effet, les conditions acides de l'estomac ou encore les populations microbiennes 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 paroi de l'œsophage et du tractus GI est représentée dans la *Figure 8*.



**Figure 8.** Schéma de l'organisation anatomique et histologique du tube digestif. Modifié d'après (Gelberg 2014).

L'organisation structurelle du tractus GI de la lumière au côté basolatéral, est constituée de la muqueuse, de la sous-muqueuse, de la musculaire et de la séreuse. La muqueuse est constituée d'un épithélium superficiel, de la *lamina propria* et de la musculaire-muqueuse. La *lamina propria* est constituée de tissu conjonctif, du système vasculaire sanguin et

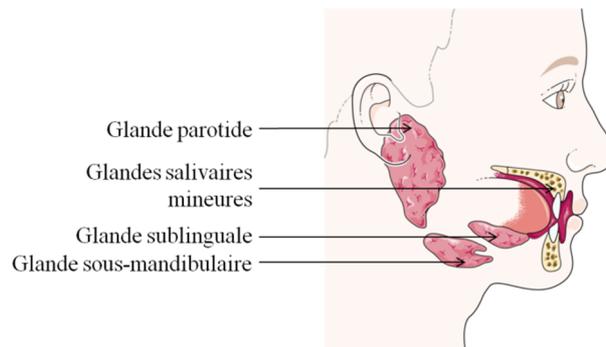
lymphatique. La musculaire-muqueuse est composée de cellules musculaires lisses qui ont pour fonction principale de modifier la forme et la surface de la couche de cellules épithéliales en réponse à la distension de la paroi. La sous-muqueuse est constituée de collagène, d'élastine, de glandes sécrétrices, et de la majorité des vaisseaux sanguins. La motilité du tractus GI est réalisée par les couches de muscle lisse longitudinal et circulaire, situées entre la sous-muqueuse et la séreuse. Deux plexus nerveux (le plexus sous-muqueux et le plexus myentérique) constituent le système nerveux intrinsèque du tractus GI. Le plexus sous-muqueux (ou plexus de Meissner) lie la sous-muqueuse avec le muscle lisse circulaire et régule l'épithélium de recouvrement. Le plexus myentérique lie les couches musculaires circulaires et longitudinales et régule leur contraction. La séreuse est une fine membrane constituée d'une couche de cellules sécrétant du fluide séreux. Les sécrétions séreuses servent à réduire les frictions des mouvements musculaires du tractus GI (Gelberg 2014; Ødegaard et al. 2012).

### **IV.3. Fonctions du tractus oro-gastro-intestinal de l'Homme et particularités chez le chien et le chat**

Les principales fonctions du tractus GI sont la digestion des aliments en nutriments qui constituent l'apport énergétique de l'organisme, l'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes, la protection contre les pathogènes externes et l'excrétion. Ces fonctions sont réalisées par des organes, exerçant des rôles distincts, répartis de la bouche à l'anus. L'estomac et l'intestin grêle sont responsables principalement de la digestion et de l'absorption, un processus regroupant à la fois des mécanismes physiques et chimiques. Le gros intestin ou côlon est principalement concerné par la dessiccation et le compactage des déchets, avec le stockage dans le côlon sigmoïde et l'élimination par le rectum (Cheng et al. 2010).

#### **IV.3.1. La cavité buccale**

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 un liquide corporel complexe composé d'environ 99% d'eau, de substances inorganiques et organiques et d'une grande variété des protéines telles que les enzymes, le mucus et les glycoprotéines. La salive est sécrétée par quatre paires de glandes salivaires : les glandes parotides, les glandes sous-mandibulaires, les glandes sublinguales et des glandes salivaires mineures (**Figure 9**) (Ngamchuea et al. 2018).



**Figure 9.** Représentation des glandes salivaires.  
Image modifiée d'après Servier Medical Art.

La quantité de salive sécrétée est augmentée par la vue, l'odeur et même la pensée et l'évocation de la nourriture, ainsi que la mastication (Furness et al. 2013). La salive a six fonctions principales : la lubrification ainsi que la protection par l'action tampon et le maintien de l'intégrité des dents, l'activité antimicrobienne et le transport des molécules du goût et la digestion. La lubrification et la protection permettent de préserver les tissus de la cavité buccale contre les agents irritants. Les effets de la lubrification contribuent également à la mastication, à la déglutition et à la vocalisation. Les composés lubrifiants principaux de la salive sont les mucines. L'action tampon de la salive est réalisée par trois composés majeurs : le bicarbonate, le phosphate et les protéines. La capacité tampon permet à la salive de maintenir un pH relativement constant (pH entre 6,7-7,3). La salive permet également le transport des substances du goût aux récepteurs du goût et la protection de ces récepteurs (Ngamchuea et al. 2018). Les enzymes présentes dans la salive sont notamment l'amylase, première étape de la digestion des glucides et la lipase, première étape la digestion des lipides. D'autres enzymes sécrétées dans la salive ont des activités antimicrobiennes (lactoperoxydase, lysozyme) (Ngamchuea et al. 2018; Pedersen et al. 2002). La quantité de salive produite ainsi que sa composition dépendent du type d'aliment ingéré et de sa teneur en humidité. La composition de la salive varie en fonction du flux salivaire mais également en fonction des glandes (Carpenter 2013).

La salive permet ainsi la formation du bol alimentaire par son pouvoir lubrifiant et le début de la digestion des glucides et des lipides puis le transport de ce bol alimentaire dans l'œsophage.

**Particularités chez le chien et le chat :** Chez le chien et le chat, le pH de la salive est d'environ 7,5. De plus, la salive ne contient pas d' $\alpha$ -amylase. Outre les rôles précédemment cités, la salive du chien joue également un rôle important dans la régulation de la température corporelle (diminution de la température interne par évaporation) (National Research Council 2006).

#### IV.3.2. L'estomac

La nourriture passe de la cavité buccale jusque dans l'estomac par l'œsophage. Il s'agit d'un tube court constitué de muscles striés et de cellules productrices de mucus (Gelberg 2014). La nourriture avance dans l'œsophage à l'aide des ondes péristaltiques. Les rôles principaux de l'estomac sont de stocker temporairement le bol alimentaire provenant de la cavité buccale, de commencer la digestion et de contrôler la vitesse de sortie du chyme dans l'intestin grêle (O'Connor and O'Moráin 2014). Pour cela, l'estomac est divisé anatomiquement en cinq parties distinctes : le cardia, le fundus (partie supérieure à l'orifice œsophagien), le corps, l'antrum (partie la plus distale) et le pylore. Le sphincter pylorique relie l'antrum au duodénum (Cheng et al. 2010).

Le bol alimentaire va être transformé en chyme sous l'action des sécrétions gastriques et enzymatiques couplées à une action mécanique de brassage principalement assurée par l'antrum. La digestion des protéines commence dans cet organe. L'acide chlorhydrique, sécrété au niveau des cellules pariétales est stimulé par la gastrine produites par les cellules G (présentée dans le paragraphe V.1.2.1) de la muqueuse antrale en présence d'oligopeptides et du *Gastrin-Releasing Peptide* (GRP). De plus, un contrôle nerveux parasympathique impliquant l'acétylcholine participe également à la sécrétion d'acide (O'Connor and O'Moráin 2014; Sherwood 2006). Afin de ne pas endommager la muqueuse gastrique, la somatostatine et les prostaglandines inhibent respectivement la sécrétion de gastrine et d'acide chlorhydrique. Le pH gastrique se situe entre 1 et 5, mais celui-ci varie en fonction de l'individu et de son état de jeûne. L'acidité gastrique favorise l'activation du pepsinogène (précurseur de la pepsine), assure la dénaturation des protéines alimentaires facilitant leur hydrolyse par la pepsine et joue un rôle antimicrobien (O'Connor and O'Moráin 2014). La pepsine, résultat de l'autocatalyse du pepsinogène, initie la digestion des protéines et génère une population d'oligopeptides.

La vidange gastrique est le processus par lequel le chyme est déversé dans l'intestin grêle à une vitesse et sous une forme qui optimisent l'absorption intestinale des nutriments. La quantité de chyme est le principal facteur influençant la force de contraction de l'antré. Les contractions péristaltiques de l'antré 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 intra-gastriques (gastrine, réflexe vagal) et de facteurs duodénaux (réflexe entéro-gastrique, hormones intestinales) (Goyal et al. 2019).

#### IV.3.3. L'intestin grêle

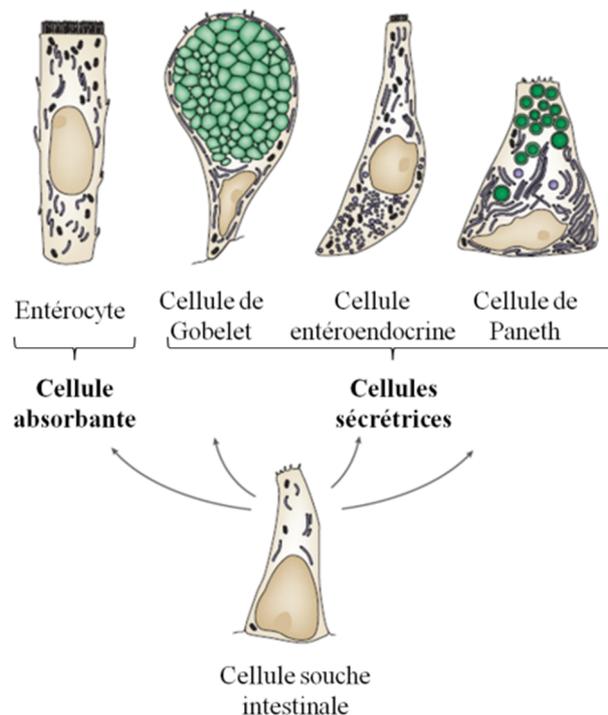
##### IV.3.3.1. *Anatomie macroscopique de l'intestin grêle*

Constitué de trois segments successifs (duodénum, jéjunum et iléon représentés dans la **Figure 7**), l'intestin grêle constitue le siège principal de l'absorption des nutriments. Les contractions péristaltiques de l'estomac expulsent le chyme dans le duodénum qui se mélange au suc duodéal et aux sécrétions pancréatiques et biliaires. Le duodénum mesure environ 30 cm de long chez l'Homme et est le siège principal de l'absorption passive de l'eau et des électrolytes. Le jéjunum est le lieu de l'absorption des glucides, des lipides ainsi que des protéides et il mesure entre 3 et 4 m de long chez l'Homme. D'une longueur de 1 m, l'iléon est quant à lui plutôt consacré aux absorptions spécifiques comme la réabsorption des sels biliaires (Sherwood 2006). La progression du chyme le long de l'intestin est assurée d'une part par le mécanisme de segmentation, c'est-à-dire une alternance entre des contractions annulaires du muscle lisse et des relâchements. Ceci permet un brassage optimal du chyme. A la fin de l'absorption du repas, le complexe moteur migrant, qui est constitué d'ondes péristaltiques allant du duodénum jusqu'à l'extrémité de l'iléon, assure le nettoyage de l'intestin en évacuant les restes vers le côlon (Kumral and Zfass 2018).

**Particularités chez le chien et le chat :** Les chats ne possèdent pas de complexe moteur migrant mais un complexe transitoire de migration (migrating spike complex) (Washabau and Day 2012). Ce complexe est caractérisé par une explosion intense de pics transitoires qui migrent de l'estomac jusqu'au colon. Il s'agit en quelque sorte d'un complexe moteur migrant mais le complexe transitoire de migration est beaucoup moins puissant (De Vos 1993).

#### IV.3.3.2. Anatomie microscopique de l'intestin grêle

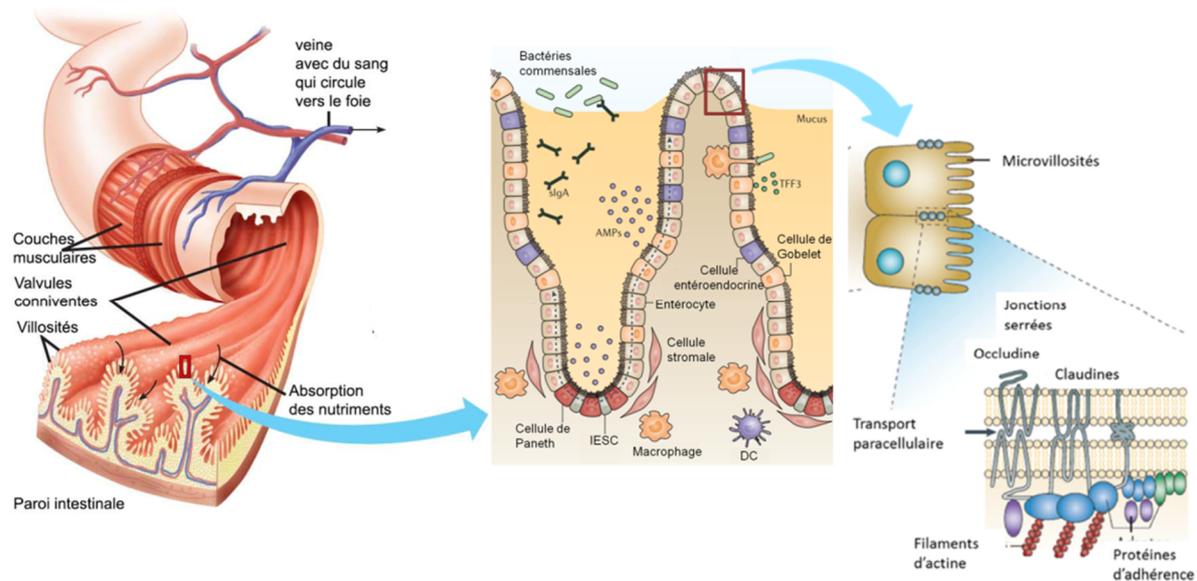
Les cellules épithéliales de la muqueuse assurent des fonctions digestives, sécrétrices et absorbatives, de barrière aux pathogènes ainsi que de surveillance immunitaire. Pour réaliser ces différentes fonctions, l'épithélium intestinal est constitué d'une variété de cellules. Il existe quatre grands types de cellules épithéliales : les entérocytes, les cellules entéroendocrines (CEEs), les cellules calciformes (cellules de Gobelet) et les cellules de Paneth (**Figure 10**) (Verhoeckx et al. 2016).



**Figure 10.** Illustration schématique des différents types de cellules épithéliales intestinales. Image modifiée d'après (Gelberg 2014).

D'une manière générale, les cellules épithéliales sont caractérisées par une morphologie bien définie (cubique, prismatique ou pavimenteuse), le développement d'interactions intercellulaires et une polarité cellulaire marquée. Les entérocytes assurent le transport des nutriments (acides gras, acides aminés et des oligosaccharides) grâce à la multitude de transporteurs présents sur leur pôle apical (Janssen and Depoortere 2013). Les CEEs sécrètent des hormones intestinales impliquées notamment dans l'homéostasie énergétique. Les cellules calciformes ou de Gobelet, présentes entre les entérocytes, produisent le mucus intestinal servant à lubrifier et à protéger la muqueuse intestinale. Les cellules de Paneth, sécrètent des enzymes à activité antimicrobienne (Furness et al. 2013).

Le tractus intestinal est une grande interface entre l'environnement et le corps. Cette interface se compose en une couche épithéliale formant des cryptes et des villosités (bordure en brosse) permettant ainsi d'augmenter la surface de l'intestin (**Figure 11**) (Verhoeckx et al. 2016). Les différentes cellules de l'épithélium intestinal proviennent toutes de cellules souches présentes dans les cryptes. Les cellules souches ont des microvillosités qui sont petites, espacées et ont de faibles aptitudes digestives et absorbatives. Elles prolifèrent et migrent pour remplacer les cellules absorbantes (Gelberg 2014).



**Figure 11.** Les différents niveaux d'organisation de la barrière intestinale.

CD : cellules dendritiques ; AMPs : protéine antimicrobienne ; TFF3 : trefoil factor 3. Image modifiée d'après (Peterson and Artis 2014; Viswanathan et al. 2009)

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'épithélium joue un rôle crucial en tant que barrière semi-perméable très dynamique et sélective qui sépare les contenus intestinaux et les pathogènes du reste du corps et contrôle l'absorption des nutriments, des fluides et des solutés. L'interaction intercellulaire est assurée par les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées (Janssen and Depoortere 2013). Le rôle de protection de l'épithélium intestinal contre les pathogènes externes est assuré par le système immunitaire qui est représenté par les cellules T présentes sous trois formes : des agrégations lymphoïdes nommés plaques de Peyer, des follicules lymphoïdes dispersés dans le tissu conjonctif et des lymphocytes intraépithéliaux (Furness et al. 2013).

#### IV.3.3.3. *Les sécrétions pancréatiques*

Le pancréas exocrine sécrète une solution alcaline riche en ions bicarbonates ( $\text{HCO}_3^-$ ) permettant de neutraliser le chyme acide et d'inactiver la pepsine ; il permet un pH optimal pour l'activité des enzymes digestives dans le duodénum. La production des ions  $\text{HCO}_3^-$ , sécrétés par les canaux excréteurs du pancréas, est stimulée par la sécrétine, elle-même sécrétée par le duodénum en réponse à un environnement acide (Lee et al. 2012). Les enzymes pancréatiques sont constituées d'un mélange de protéases, lipases, amylases et nucléases. Le pancréas exocrine est la source majeure de protéases pour la digestion des protéines ingérées. Les protéases sont synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives (zymogènes) et comprennent trois formes de trypsine : le chymotrypsinogène A et B ; la proélastase, la procarboxypeptidase A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> et B<sub>2</sub> mais également d'autres protéases. 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, les chymotrypsines et l'élastase sont des endopeptidases de la famille des protéases à sérine. L'autre classe majeure de protéases est constituée des metalloprotéinases qui comprennent les carboxypeptidases. La trypsine clive préférentiellement les résidus d'arginine ou de lysine au niveau de la partie C-terminale. La chymotrypsine clive préférentiellement les liaisons peptidiques adjacentes à des résidus d'acides aminés hydrophobes tels que la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine. L'élastase est 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 carboxypeptidases sont quant à elles des exopeptidases qui hydrolysent préférentiellement les liaisons peptidiques du côté C-terminal. La carboxypeptidase A clive le dernier acide aminé de la séquence peptidique quand celui-ci est un acide aminé aromatique (phénylalanine, tyrosine, tryptophane), neutre (alanine, asparagine, cystéine, leucine par exemple) ou acide (acide aspartique, acide glutamique) et la carboxypeptidase B agit en complémentarité de la carboxypeptidase A en clivant les acides aminés basiques (arginine, histidine). Les autres enzymes, sécrétées par le pancréas exocrine, telles que l'amylase, la lipase pancréatique et la phospholipase poursuivent la digestion des lipides et des glucides (Whitcomb and Lowe 2007). Les enzymes pancréatiques sont synthétisées au niveau de l'acinus du pancréas exocrine.

#### IV.3.3.4. *Les sécrétions biliaires*

La bile est déversée au niveau du duodénum par le canal cholédoque et est contrôlée par le sphincter d'Oddi. Celui-ci empêche la libération de la bile dans le duodénum entre les repas. La bile est une sécrétion aqueuse complexe issue des hépatocytes et modifiée par les systèmes de transport sécrétoires et absorbants présents dans l'épithélium du canal biliaire. Elle entre ensuite dans la vésicule biliaire où elle est concentrée ou est directement déversée dans la lumière intestinale. La bile est composée à 95% d'eau dans laquelle sont dissouts un certain nombre de composés tels que les sels biliaires, le phospholipide bilirubine, le cholestérol, des acides aminés, des enzymes et des vitamines. Les sels biliaires sont les solutés majoritaires de la bile ayant pour rôle d'émulsifier les matières grasses alimentaires et de faciliter l'absorption intestinale (Boyer 2013). Ils confèrent à la bile sa principale fonction : les propriétés émulsifiantes des sels biliaires permettent d'incorporer les lipides hydrolysés en acides gras libres et en 2-monoacylglycérols dans des micelles stabilisées par les sels biliaires (Dosch et al. 2019). La bile joue également un rôle de protection contre les infections (Boyer 2013). 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).

#### IV.3.4. Le côlon

Le côlon, également appelé gros intestin, est constitué du caecum (séparant l'intestin grêle du côlon), du côlon (côlon ascendant, transversal et descendant) et du rectum. Le côlon absorbe l'eau, les sels et le reliquat qui n'a pas été absorbé par le côlon participera en partie à la formation des fèces. Le rôle principal du côlon est de stocker temporairement les selles. Lors de l'arrivée des 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. La majorité de la flore bactérienne appartient aux familles phylogénétiques des Firmicutes, des Bacteroidetes et des Proteobacteria (Yadav et al. 2017). Le rôle principal de cette flore microbienne est de dégrader les résidus alimentaires non digérés dans l'intestin grêle. 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 chaîne courte, de phénols, d'indoles, d'amines biogènes et de composés sulfurés (Scott et al. 2012). 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). La digestion des résidus alimentaires non digérés par le microbiote produit de nombreux métabolites qui influencent la santé et le métabolisme de l'homme (Ramakrishna 2013).

**Particularités chez le chien et le chat :** La majorité de la flore bactérienne colonisant le côlon du chien et du chat appartient aux familles des Firmicutes, des Bacteroidetes et des Proteobacteria (comme pour l'Homme) mais également des Fusobacteria (Deng and Swanson 2015b; Kim et al. 2017).

#### IV.4. Absorption intestinale des macronutriments

La digestion permet de réduire les aliments ingérés en éléments de plus petite taille grâce à l'hydrolyse réalisée par les enzymes digestives dans la lumière gastro-intestinale. Le rôle principal de l'intestin est de digérer les aliments et d'absorber les nutriments qui seront ensuite transportés dans les différents tissus et organes via la circulation sanguine. Pour cela, l'intestin est formé d'un épithélium hautement spécialisé, permettant la médiation de l'absorption des nutriments, des électrolytes, des minéraux, des vitamines et de l'eau. Les nutriments peuvent être absorbés par de nombreux processus. Certains de ces processus peuvent être actifs et donc nécessiter de l'énergie alors que d'autres sont passifs. L'absorption implique le transfert de nutriments digérés de la lumière intestinale jusque dans le système sanguin ou le système lymphatique afin d'être métabolisés et/ou directement utilisés dans le corps.

##### IV.4.1. Absorption des glucides

Les glucides complexes atteignant l'intestin grêle doivent être hydrolysés en monosaccharides comme le glucose ou le galactose dans le but d'être absorbés par les cellules intestinales, principalement au niveau du duodénum. La voie classique de l'absorption du glucose passe par la membrane de la bordure en brosse, dont le principal transporteur est GLUT1 (co-transporteur  $\text{Na}^+$ /glucose). L'activité de GLUT1 et donc de l'absorption intestinale du glucose est régulée par un échangeur  $\text{H}^+$ / $\text{Na}^+$  (NHE3) qui utilise un gradient  $\text{Na}^+$  créé par l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pour extraire des ions  $\text{H}^+$  contre le gradient électrochimique (transport actif). L'absorption du glucose peut également être augmentée par d'autres transporteurs tels que GLUT2 (Chen et al. 2016). Le fructose, quant à lui, est

spécifiquement et passivement transporté par le transporteur GLUT5 (Ferraris et al. 2018). Les glucides sont ensuite libérés à proximité des capillaires sanguins par diffusion facilitée via le transporteur GLUT2.

#### IV.4.2. Absorption des lipides

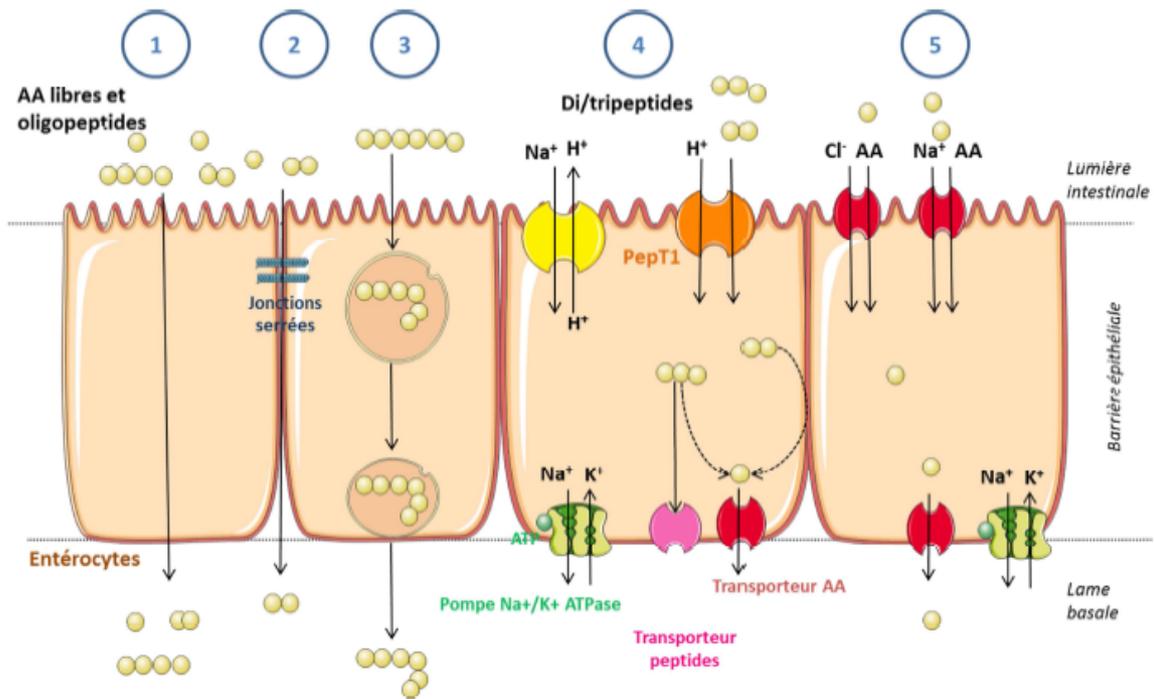
Les lipides alimentaires majoritaires sont les triglycérides, les phospholipides, et les esters de cholestérol. Afin d'être hydrolysés, ces lipides sont émulsifiés par des sels biliaires. Les produits de digestion des lipides sont des acides gras libres et des monoacylglycérols pour les triglycérides, des acides gras libres et des lysophospholipides pour les phospholipides, des acides gras libres et du cholestérol libre pour les esters de cholestérol. Les lipides hydrolysés sont incorporés dans des micelles majoritairement absorbées par les entérocytes du duodénum et du jéjunum. Les acides gras libres sont absorbés par les entérocytes par diffusion quand les concentrations en acides gras dans la lumière sont supérieures aux concentrations à l'intérieur des cellules. Cependant, des mécanismes d'absorption par l'intermédiaire de protéines peuvent être impliqués dans l'absorption des monosaccharides et des acides gras libres notamment quand les concentrations extracellulaires en acides gras libres sont faibles. Les protéines impliquées comprennent des clusters de différenciation 36 (CD36) et des protéines de transport des acides gras (FATP). Une fois dans la cellule, les acides gras libres sont transportés vers divers organites, pour d'autres traitements par des protéines se liant aux acides gras libres. Le transport du cholestérol se fait principalement par le transporteur protéique NPC1L1 (Niemann-Pick C1-like 1 protein). La liaison du cholestérol avec le domaine N-terminal de NPC1L1 expose le domaine C-terminal de celle-ci qui interagit avec la protéine endocytaire Numb pour faciliter le recrutement de clathrine (permet la formation des vésicules). Ces microdomaines sont ensuite internalisés et distribués aux autres organites (Hussain 2015; Yamanashi et al. 2017).

#### IV.4.3. Absorption intestinale des acides aminés libres et des peptides

L'apport protéique chez l'Homme a deux origines : une origine exogène que sont les aliments ingérés 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 (Daniel and Zietek 2015). Dans l'estomac, les protéines alimentaires sont clivées par la pepsine, au niveau des liaisons peptidiques, résultant en un mélange de fragments de protéines intermédiaires, de peptides et d'acides aminés. Ce mélange est ensuite clivé par les enzymes pancréatiques (trypsine, chymotrypsine, élastase, carboxypeptidase) au niveau du

duodénum, ce qui permet la libération d'oligopeptides et d'acides aminés. Les peptidases de la bordure en brosse continuent de cliver les fragments peptidiques qui ont résistés à la digestion gastrique et pancréatique (Kiela et al. 2016). Au niveau de la bordure en brosse, neuf peptidases sont présentes : 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. Ces enzymes sont toutes présentes sur l'ensemble de l'intestin grêle mais leur activité enzymatique varie selon leur localisation. La dégradation des peptides est ensuite finalisée par l'action des enzymes cytosoliques après absorption par les entérocytes (Hooton et al. 2015)

De nombreux systèmes sont responsables de l'absorption des protéines à travers la membrane de la bordure en brosse. Les systèmes de transporteurs d'acides aminés sont composés de co-transporteurs acides aminés/ $\text{Na}^+$  (sodium),  $\text{K}^+$  (potassium) et  $\text{Cl}^-$  (Chlore) localisés au niveau du pôle apical. Les di- et tri-peptides sont efficacement absorbés dans l'intestin grêle. Ce processus est indirectement  $\text{Na}^+$ -dépendant, comme vu précédemment pour l'activité de NHE3 afin de générer le gradient de proton pour le co-transport  $\text{H}^+$ /peptides. Les peptides de quatre acides aminés ou plus sont faiblement absorbés par des mécanismes non dépendant d'un transporteur (Kiela et al. 2016). L'ensemble des modes de transport des peptides sont présentés dans la **Figure 12**.



**Figure 12.** Voies de transport cellulaires des acides aminés libres (AA) et des oligopeptides au niveau de la barrière épithéliale.

1) diffusion passive, 2) passage parcellulaire, 3) endocytose, 4) transport actif des di- et tri-peptides par PepT1 et 5) transport actif des acides aminés libres (Caron 2016).

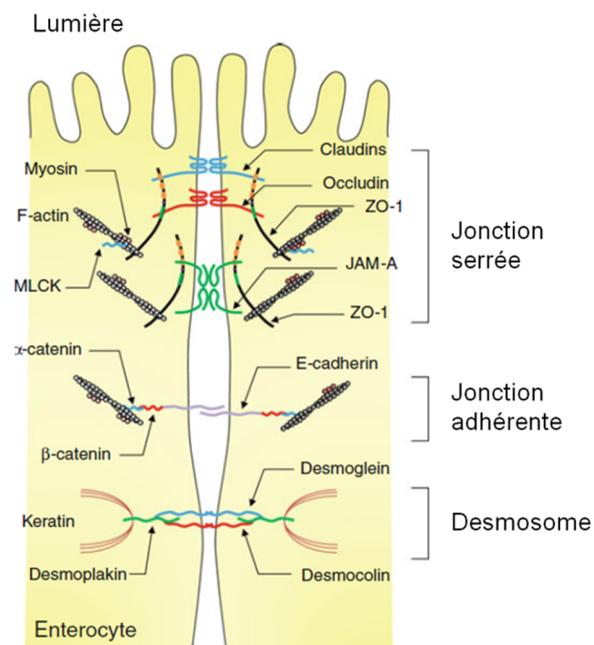
Le premier mode de transport transcellulaire mis en évidence est un transport actif de protons assuré par le transporteur PepT1. Il fait partie de la famille des transporteurs proton-oligopeptides (POT) ou de *peptide transporters* (PTR). Il comporte douze domaines transmembranaires dont les deux extrémités N- et C-terminal sont localisées dans le cytoplasme et un grand domaine extracellulaire qui est hautement conservé entre les mammifères (Wang et al. 2017). Le transporteur PepT1 a une large gamme de substrats, comprenant plus de quatre cents dipeptides différents et huit mille tri-peptides, avec une structure, un poids moléculaire, une charge, une polarité, une conformation stéréochimique et mésomérique de la liaison peptidique différents, issus de la digestion des protéines alimentaires ou des protéines du corps. Cependant, PepT1 ne transporte pas les acides aminés et les tétra-peptides (Daniel and Zietek 2015). La conformation serait probablement le critère modulant le transport des peptides. En effet, les dimensions de la cavité extracellulaire étant d'environ  $16 \times 8 \times 8 \text{ \AA}$  et les dimensions de la cavité centrale d'environ  $13 \times 12 \times 11 \text{ \AA}$ , ces cavités seraient efficaces pour fixer les di- et tri-peptides, mais pas les acides aminés seuls ou les tétra-peptides (Wang et al. 2017). La plupart des peptides entrant dans la cellule sont rapidement hydrolysés dans le cytosol, suivi par l'exportation des acides aminés libres par différents transporteurs d'acides aminés basolatéraux (Daniel and Zietek 2015). L'expression

du gène PepT1 est régulée à la fois par les concentrations en acides aminés libres et en oligopeptides mais également par différentes hormones telles que l'insuline, la leptine, les hormones de croissance et l'hormone thyroïdienne (Wang et al. 2017).

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 de transport transcellulaire est l'endocytose. Ce transport est plus répandu pour les peptides de plus grande taille et fait intervenir une interaction spécifique localisée des peptides avec la membrane cellulaire. Les peptides sont transportés par des vésicules migrant du pôle apical vers le pôle basolatéral où elles fusionnent avec la membrane pour libérer les peptides par exocytose (Wang et al. 2018a).

Les peptides peuvent passer la barrière intestinale également via le transport paracellulaire. Ce mode de transport est dépendant de la taille et des propriétés hydrophiles des peptides. Ce transport est contrôlé par les jonctions serrées des entérocytes (Wang et al. 2018a) **Figure 13**.



**Figure 13.** Structure moléculaire de la jonction intercellulaire des cellules épithéliales de l'intestin. ZO : zonula occludens. Image modifié d'après (Suzuki 2013).

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 jonction complexe : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les desmosomes. Les jonctions serrées sont des jonctions adhésives complexes qui scellent en grande partie l'espace intercellulaire et sont constituées de

protéines transmembranaires (claudines, occludines), de protéines membranaires périphériques (ZO-1 et 2) et de protéines régulatrices. Les jonctions adhérentes se situent en dessous des jonctions serrées pour le maintien de l'intégrité. Avec les desmosomes, les jonctions adhérentes garantissent des liens adhésifs forts. Les jonctions serrées et les jonctions adhérentes sont liées par un anneau péri-jonctionnel d'actine et de myosine qui permet la régulation des jonctions par le cytosquelette (Wang et al. 2018a). Les jonctions serrées fonctionnent comme une barrière semi-perméable et conditionnent le passage des ions et des solutés dans l'espace intercellulaire.

#### **IV.5. Modélisations *in vitro* de l'appareil digestif et de l'absorption au niveau de la barrière intestinale**

##### **IV.5.1. Les modèles *in vitro* de digestion GI**

Le tractus GI est une interface dynamique entre le milieu extérieur et le milieu intérieur de l'organisme. En plus de son rôle digestif pour fournir les nutriments nécessaires à la survie de l'individu, le tractus GI est également le site d'absorption de molécules pharmacologiques, de polluants ou de contamination par des pathogènes. La réalisation des études *in vivo* et des essais cliniques font face à de nombreux problèmes éthiques, techniques et financiers. Afin de pallier à ces problèmes, des systèmes *in vitro* se sont ainsi développés et cherchent à reproduire le plus fidèlement possible les conditions GI. Ils sont utilisés dans différents domaines comme la nutrition, la toxicologie, la pharmacologie et la microbiologie (Guerra et al. 2012). Comme présenté dans cette partie, l'appareil digestif est constitué de différents organes qui jouent un rôle particulier dans la digestion des aliments et se caractérisent par des conditions mécaniques et biochimiques particulières. Dans les modèles de digestion *in vitro*, les trois principaux organes le plus souvent représentés sont la bouche, l'estomac et l'intestin grêle simulés indépendamment ou successivement. Les modèles de digestion GI *in vitro* cherchent à reproduire ces conditions par l'utilisation séquentielle des enzymes digestives, un maintien du pH approprié, un temps de transit proche de celui d'un repas, une action mécanique du tube digestif et enfin des processus d'absorption intestinale et de fermentation bactérienne (Venema et al. 2009). Plusieurs modèles *in vitro* ont émergé et se distinguent entre eux par le nombre de compartiments (mono- ou pluri-compartimenté) et la modélisation de la motilité GI (statique ou dynamique). Les deux modèles utilisent souvent les mêmes sources enzymatiques (amylase, pepsine, enzymes intestinales et autres) et les mêmes électrolytes pour simuler les sécrétions GI. Cependant, le modèle dynamique se

distingue par la simulation des procédés mécaniques ayant lieu dans le tube digestif ainsi que la simulation des cinétiques de modification des conditions physico-chimiques ayant lieu *in vivo*. Le modèle dynamique peut également mimer certains paramètres gastro-intestinaux tels que les conditions physico-chimiques particulières dépendantes 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) (Kalantzi et al. 2006). Les modèles de digestion GI dynamique développés sont le TIM (TNO Gastro-Intestinal Model) et le SHIME (Simulatore of Human Intestinal Microbial Ecosystem). Le TIM est à ce jour le modèle de digestion GI le plus abouti qui associe action mécanique et pluri-compartmentation. Le SHIME, quant à lui, c'est le seul système à modéliser le tube digestif de l'estomac au côlon de manière continue. Cependant, celui-ci se focalise principalement sur les interactions entre les aliments ingérés et le microbiote intestinal.

Bien que simplistes, les modèles statiques mono-compartmentés sont les plus utilisés d'une part pour leur simplicité de mise en œuvre et d'autre part pour leur rapidité. En effet, ces modèles ne prennent pas en compte les procédés mécaniques digestifs, la progression du chyme dans le tractus ou encore le changement de débit des sécrétions digestives. Ces modèles consistent à simuler dans un réacteur thermostaté les conditions physico-chimiques présentes dans les différentes étapes de la digestion GI par ajout des enzymes, la variation du pH et du temps de résidence. Une agitation continue est maintenue grâce à un barreau aimanté ou une pale d'agitation. Ces modèles sont essentiellement utilisés pour l'étude de la biodisponibilité de métabolites secondaires des végétaux ou des contaminants (Versantvoort et al. 2005) ou encore, pour la digestion des macronutriments (Kopf-bolanz et al. 2012). Bien souvent les modèles de digestion statiques diffèrent entre eux par les ratios enzymes/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 consensus international a permis de mettre en place un protocole de digestion GI *in vitro* statique mono-compartmenté qui vise à harmoniser les conditions de digestion GI se fondant sur des données physiologiques. L'utilisation d'un tel protocole a pour but de générer des données comparables (Minekus et al. 2014). Encore aujourd'hui, aucun modèle ne remplace l'étude *in vivo*, mais récemment le développement de tissus en 3D dérivant de cellules souches pluripotentes du tube digestif, est devenu un nouvel outil de recherche. Ces tissus 3D sont essentiellement limités à des fins médicales dans le domaine des maladies digestives ou dans l'étude des interactions entre le microbiote et les tissus intestinaux (Dedhia et al. 2016).

Cependant, ces outils pourraient potentiellement être étendus à la modélisation de la digestion GI *in vitro*.

#### IV.5.2. Les modèles *in vitro* d'absorption intestinale

La barrière intestinale est aujourd'hui reconnue comme une interaction dynamique avec le contenu luminal, même si pendant longtemps le rôle du tractus GI semblait se limiter à la génération de nutriments, par la digestion des aliments et à un rôle de barrière physique entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. La barrière intestinale permet de prolonger la digestion des nutriments et notamment des protéines et est le lieu de transport des nutriments vers la circulation sanguine. De plus, elle communique avec le système immunitaire. Son rôle a été mis en évidence notamment au cours d'études de pharmacocinétique qui visent à suivre le devenir d'une molécule pharmacologique durant l'absorption intestinale (Artursson et al. 2001). Les modèles cellulaires de barrière intestinale *in vitro* sont des outils fiables, rapides et peu coûteux. De plus, ces modèles ont permis d'augmenter les connaissances sur les mécanismes d'absorption cellulaire et d'établir des stratégies pharmaceutiques pour la conception de nouvelles molécules (Pauletti et al. 1996). Etant donné que 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 physiologiques. A l'heure actuelle, les deux lignées les plus utilisées sont les lignées Caco-2 et HT-29-MTX. La lignée Caco-2 est capable de se différencier spontanément en culture *in vitro* et d'avoir des caractéristiques morphologiques très proches de celles d'un entérocyte, c'est-à-dire 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 (Sambuy et al. 2005). Les modèles de cellules Caco-2 ont été utilisés depuis les années 90 pour étudier l'absorption de nutriments ou de minéraux provenant de la digestion GI *in vitro* d'aliments. Cependant, ce modèle présente quelques limites avec notamment l'absence de production de mucus. Comme les cellules Caco-2, la lignée cellulaire HT29-MTX présente également des similarités avec les cellules épithéliales telles que la polarité, l'organisation en une monocouche intègre par la présence de jonctions serrées, la présence de microvillosités en apical et exprime plusieurs enzymes de la bordure en brosse. Cependant, cette lignée présente des activités enzymatiques et une résistance transépithéliale (caractérisant l'intégrité de la barrière cellulaire) plus faibles que la lignée Caco-2. Cette lignée s'est distinguée comme étant un bon modèle d'étude des mécanismes moléculaires de la différenciation cellulaire intestinale mais également grâce à sa

capacité à produire de la mucine après une exposition séquentielle au métotrexate. Aujourd'hui, le développement de co-culture de ces deux lignées cellulaires (Béduneau et al. 2014) ou avec d'autres cellules comme les cellules lymphoblastoïdes (Le Hégarat et al. 2012) a permis d'améliorer les modèles de barrière épithéliale en prenant en compte un nombre croissant de paramètres physiologiques influençant l'absorption intestinale.

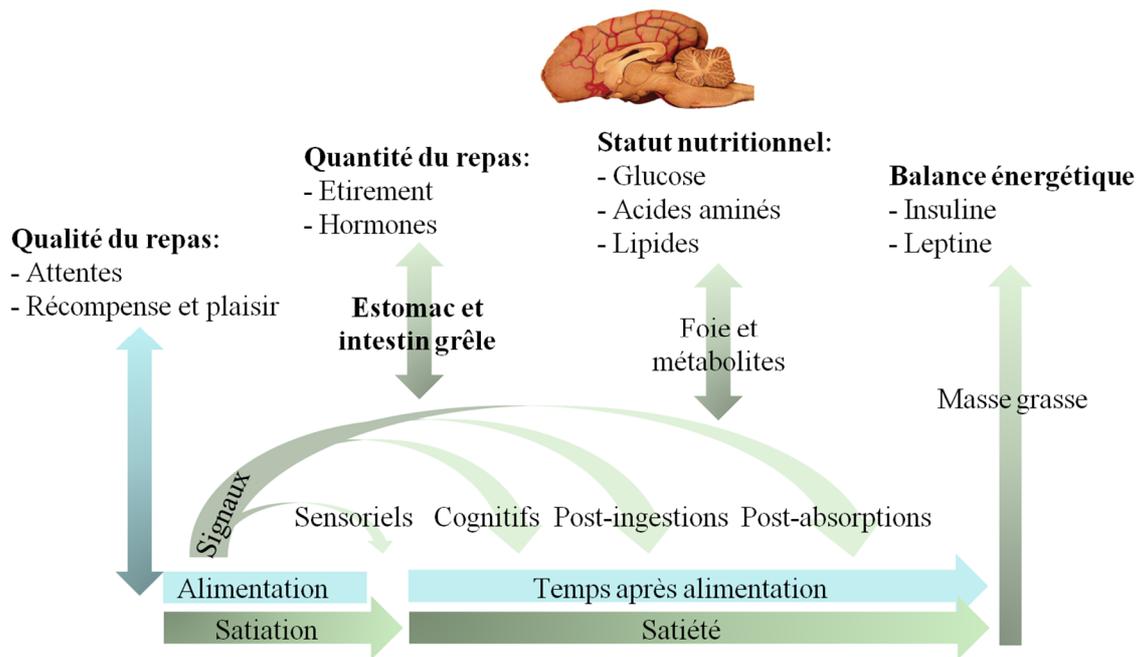
#### **IV.6. Conclusion**

Le tractus oro-gastro-intestinal est un système complexe permettant de détruire les structures complexes des aliments par la mastication, et ainsi de déstructurer les matrices alimentaires. Cette déstructuration rend les différents nutriments plus accessibles aux enzymes sécrétées tout au long du tractus GI et permet une absorption optimale des nutriments. Les modélisations *in vitro* de la digestion et de l'absorption ont permis d'améliorer notre compréhension des phénomènes associés. Ainsi, les avancées actuelles de l'étude de la digestion GI des protéines alimentaires ont d'une part démontré que leur devenir ne résidait pas uniquement dans la production d'acides aminés libres comme source d'azote mais également dans la génération de peptides résistant aux conditions drastiques du tube digestif. Certains de ces peptides exercent des activités biologiques variées et en particulier sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

#### **V. Homéostasie énergétique et régulation de la prise alimentaire**

Se nourrir est l'un des comportements les plus importants pour tous les êtres. La prise alimentaire constitue l'un des paramètres de l'équation énergétique. Selon cette équation, afin que le poids de l'individu reste stable, l'apport alimentaire, c'est-à-dire l'apport énergétique, doit être égal à la dépense énergétique sur de longs intervalles. La dépense énergétique totale est constituée de la dépense énergétique liée au métabolisme et de la dépense énergétique liée à l'exercice. Si cette équation n'est pas équilibrée, le poids corporel va augmenter ou diminuer (de Jonge et al. 2012). Ainsi, l'une des principales tâches du système nerveux central (SNC) est la survie de l'individu en maintenant celui-ci dans un état nutritionnel stable. Pour cela, le SNC régule le métabolisme énergétique sous la forme d'un système homéostatique avec le cerveau agissant comme coordinateur central (Bauer et al. 2015). L'homéostasie correspond à la capacité d'un système à maintenir l'équilibre de son milieu intérieur, quelles que soient les contraintes externes. A l'échelle d'un organisme, il s'agit de l'ensemble des paramètres devant rester constants ou s'adapter à des besoins spécifiques, comme la température corporelle, la glycémie, la pression sanguine ou le rythme cardiaque

(Broberger 2005). Cette notion d'homéostasie a été définie pour la première fois par Claude Bernard dans les années 1850 (Bernard 1878; Gross 1998; Wasserstein 1996). L'homéostasie énergétique permet au cerveau de maintenir un poids stable la majorité du temps chez la plupart des animaux. Pour cela, le poids et la balance énergétique sont contrôlés chez les animaux vertébrés par le SNC à l'aide du développement d'un circuit interconnecté méticuleux entre l'apport alimentaire et la satiété (Farias et al. 2017). Le schéma présenté ci-après résume la régulation de la prise alimentaire à court terme (**Figure 14**).

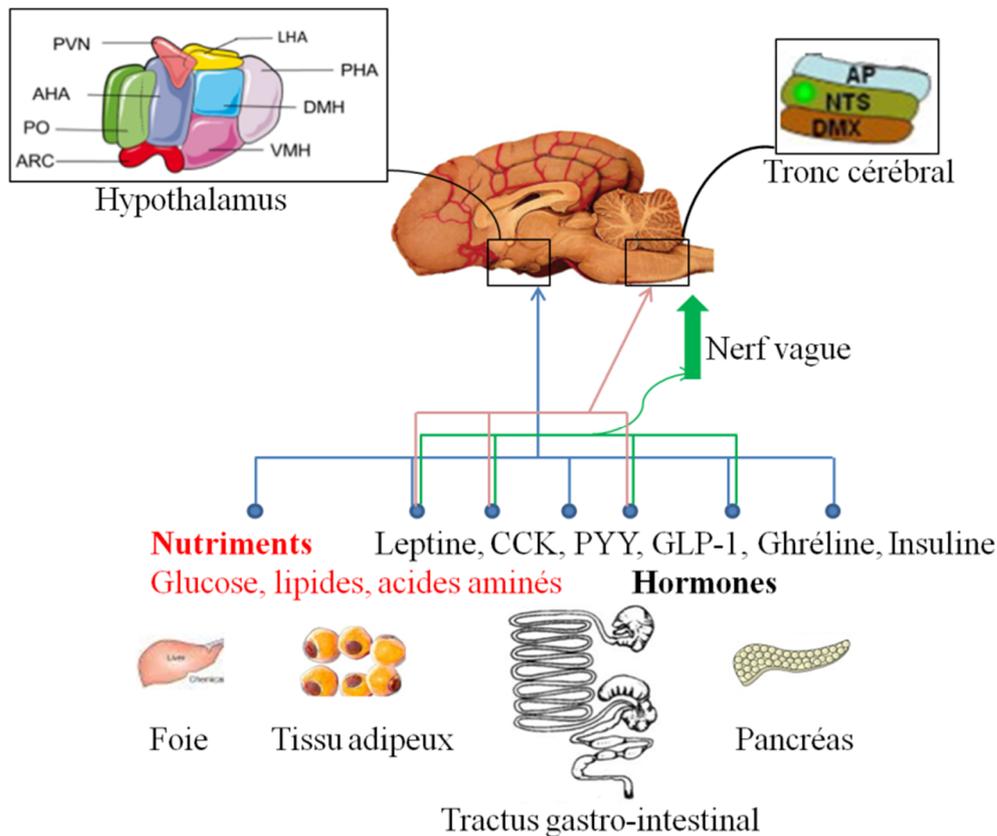


**Figure 14.** Cascade de la satiété, associée aux réponses cognitives et physiologiques.

Le concept général de la « satiété » est composé d'aspects sensoriels, cognitifs, post-ingestifs et post-absorptifs. Ce concept peut se diviser en deux fonctions distinctes : le processus de satiété qui induit la fin du repas et le processus de satiété qui consiste à inhiber la prise alimentaire par la diminution de la sensation de faim après un repas et/ou augmenter la sensation de plénitude et d'augmenter l'intervalle entre deux repas et/ou de diminuer la fréquence des repas. La satiété résulte principalement de signaux neuronaux et hormonaux alors que la satiété peut résulter davantage des processus métaboliques post-absorptifs et de leurs métabolites apparaissant entre les repas. Image modifiée d'après (Blundell et al. 2010)

L'apport alimentaire induit une sensation de satiété (satisfaction) puis un état de satiété par des signaux sensoriels, cognitifs, post-ingestifs et post-absorptifs. Ces signaux se traduisent notamment par l'augmentation de la taille de l'estomac, la présence de glucose, de lipides ou d'acides aminés circulants mais également par la libération de différentes hormones. Ainsi la première étape dans le maintien de cette homéostasie consiste, pour le cerveau, à se renseigner sur le statut métabolique de l'organisme. Pour cela, des signaux hormonaux provenant des organes périphériques, tels que le tissu adipeux, le pancréas, le foie, le tractus

GI, renseignent sur la disponibilité et la demande en énergie métabolique (**Figure 15**) (Farias et al. 2017).

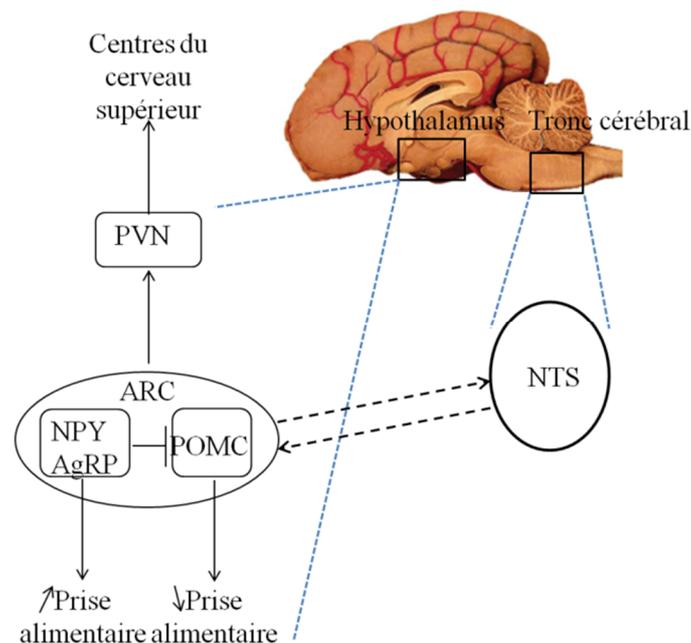


**Figure 15.** Schéma des principaux signaux agissant sur les centres majeurs de régulation de l'homéostasie énergétique.

ARC : noyau arqué, PVN : noyau paraventriculaire ; LHA : aire hypothalamique latérale ; PHA : aire hypothalamique postérieure ; DMH : noyau hypothalamique dorsomédian, VMH : noyau hypothalamique ventromédian ; PO : noyau pré-optique ; AHA : aire antérieure hypothalamique ; NTS : noyau du tractus solitaire ; DMX : noyau moteur dorsal du vague ; AP : aire postrema. Le foie libère du glucose et des acides aminés ; le tissu adipeux stocke les lipides pour libérer des acides gras et sécrète de la leptine ; le tractus gastro-intestinal sécrète les hormones CCK (cholécystokinine), PYY (peptide tyrosine-tyrosine), GLP-1 (glucagon like-peptide 1), ghréline ; le pancréas produit l'insuline.

Les hormones impliquées dans la transmission du statut métabolique et dans le contrôle de la prise alimentaire peuvent exercer une action orexigène (la ghréline) ou une action anorexigène (CCK, PYY, GLP-1...) (Zanchi et al. 2017). La plupart des signaux agissant sur la prise alimentaire sont appelés des signaux de satiété. D'autres signaux tels que la leptine et l'insuline sont des signaux d'adiposité et les facteurs tels que l'apprentissage, les habitudes, le stress et les émotions sont des signaux effecteurs. Ces deux dernières catégories de signaux influencent également la prise alimentaire (Abdalla 2017). Ces signaux sont relayés par les neurones dans l'hypothalamus. Un premier groupe de neurones exprime le neuropeptide Y (NPY) et le deuxième groupe de neurones exprime le neuropeptide précurseur

proopiomélanocortine (POMC) (**Figure 16**). Ainsi, les signaux activant les neurones NPY ou stimulant la libération du peptide entraînent une augmentation de la prise alimentaire et une diminution de la dépense énergétique. Inversement, les signaux qui activent les neurones POMC induisent une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique (Roh and Kim 2016).



**Figure 16.** Schéma représentant les neurones impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

Les deux centres du système nerveux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire sont le noyau arqué (ARC) et le noyau du tractus solitaire (NTS). Ces deux centres reçoivent les signaux de la périphérie et communiquent pour induire la prise alimentaire si le neuropeptide Y (NPY) est stimulé, ou pour la diminuer, si le neuropeptide précurseur proopiomélanocortine (POMC) est stimulé. Image modifiée d'après (Zanchi et al. 2017).

Le maintien de l'homéostasie énergétique est également réalisé à l'aide du tronc cérébral (**Figure 16**). Cette partie du cerveau relaie les informations se rapportant au bilan énergétique, reçues via les nerfs crâniens et en particulier les informations du nerf vague qui transporte l'information provenant des organes digestifs jusque dans le cerveau. Pour cela, des afférences vagales excitent les neurones dans le noyau du tractus solitaire (NTS) (**Figure 15**). De plus, des projections à partir de l'hypothalamus et du tronc cérébral se propagent davantage dans le cerveau pour engager d'autres régions cérébrales dans l'initiation et l'organisation de l'apport alimentaire. Ainsi, les récepteurs de ces signaux sont principalement exprimés sur ces deux ensembles de neurones bien distincts situés dans le noyau arqué (ARC) de l'hypothalamus (Abdalla 2017). La stimulation de la prise alimentaire semble être traduite

principalement par les récepteurs post-synaptiques NPY Y1. Cependant, il a été montré par des études *in vivo* que les actions synergiques des différents sous-types de récepteurs NPY participent à produire des effets orexigènes (McCrea et al. 2000). Le neurotransmetteur POMC est un long précurseur protéique à partir duquel sont générées plusieurs hormones peptidiques. Les effets centraux de la mélanocortine sont obtenus par la médiation des récepteurs mélanocortines 3 et 4 (MC3R et MC4R). Les interactions entre les différentes populations de l'ARC permettent aux neurones NPY de contrôler l'activité des cellules POMC par deux mécanismes (Abdalla 2017) :

- Les neurones NPY co-expriment l'Agouti Related Peptide (AgRP), un antagoniste de la mélanocortine endogène. Ainsi au niveau de l'axone terminal, l'action mélanocortique peut être bloquée par la libération simultanée d'AgRP.
- Au niveau cellulaire, les neurones POMC sont innervés par des terminaisons NPY-Ergiques et expriment le récepteur Y1, par lequel NPY provoque une puissante hyperpolarisation membranaire.

Pour résumer, comme dans tout système homéostatique, le cerveau possède trois voies distinctes d'effecteur à activer pour ajuster la variable contrôlée, c'est-à-dire le poids :

- Le comportement, c'est-à-dire l'apport alimentaire
- Le système endocrinien
- Le système nerveux autonome

Ces trois systèmes sont engagés en aval de l'ARC et du NTS pour fournir une réponse synchronisée aux fluctuations de bilan énergétique. Le premier effecteur contrôle l'apport alimentaire volontaire et les deux autres effecteurs régulent la dépense énergétique. Le tractus GI est équipé d'une multitude de récepteurs sensoriels. Ainsi, les informations relatives au goût, à la texture des aliments et celles relatives au stress mécanique suivant leur ingestion (distension du tractus GI) sont rapportées au cerveau pour fournir une description directe de l'état alimentaire. Elles sont principalement acheminées au niveau du NTS via les afférences du nerf vague, ce qui induit la satiété et la terminaison du repas (**Figure 15**). Ces afférences vagues sont très sensibles aux signaux gastro-intestinaux, tels que la distension gastrique, la présence de nutriments présents dans le tractus GI, ainsi que les peptides produits par les cellules endocrines de la paroi intestinale. D'autres stimuli jouent un rôle sur la prise alimentaire telle que la vue et l'odeur de la nourriture. La régulation de l'homéostasie énergétique est ainsi réalisée selon deux axes bien distincts mais liés entre eux : une

régulation à court terme réalisée par la régulation de la prise alimentaire via notamment les signaux de satiété et une régulation à long terme réalisée principalement via les signaux d'adiposité tels que la leptine et l'insuline.

## **V.1. Les signaux de la régulation à court terme de l'homéostasie énergétique**

### **V.1.1. La distension gastrique**

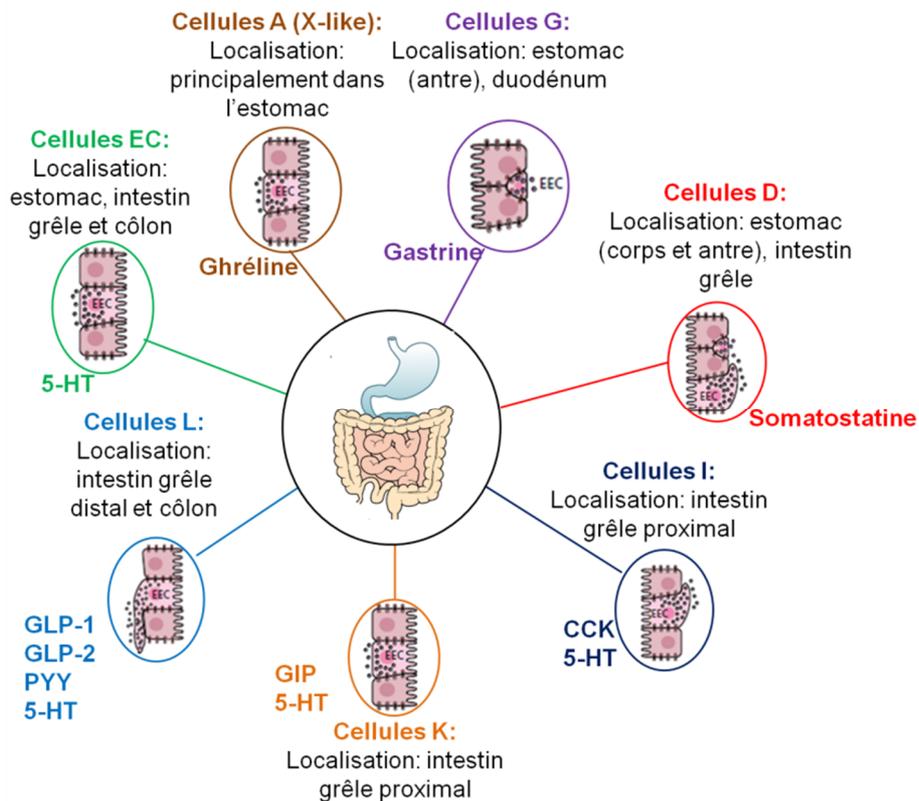
C'est dans les années 1910 que Carlson et l'équipe de Cannon et Washburn (Cannon and Washburn 1912; Carlson 1916) ont établi que la distension gastrique jouait un rôle important dans l'initiation du signal de satiété. Ceci a ensuite été montré par l'équipe de Janowitz et Grossman en 1949 qui a induit une distension de l'estomac chez le chien à l'aide d'un ballon qui a ensuite conduit à une inhibition de la prise alimentaire (Janowitz and Grossman 1949). Ainsi, la distension de l'estomac et l'activation subséquente des mécanorécepteurs gastriques est l'un des mécanismes induisant la terminaison du repas. Ces mécanorécepteurs transportent un signal tout au long du nerf vague qui influence l'initiation et la terminaison du repas en communiquant l'état digestif au NTS, qui ensuite relaie le signal aux autres aires du cerveau, dont l'hypothalamus, impliqués dans l'alimentation. Ensuite la signalisation orexigénique basée sur l'effet cumulatif des entrées cérébrales et intestinales est activée ou inhibée. Cela mène à la sensation de faim ou de plénitude dans le corps, et à une modification de la prise alimentaire (Cummings and Overduin 2007; Janssen et al. 2011). Il apparaît évident que la satiété induite par la distension gastrique peut aussi être régulée par les hormones intestinales. En effet, l'effet de satiété induite par la distension gastrique est renforcé par les cholécystokinines (CCK). Il a également été montré que la distension gastrique activait les neurones exprimant le Glucagon Like-Peptide 1 (GLP-1) dans le NTS, suggérant un rôle du GLP-1 dans la signalisation de l'appétit induite par la distension gastrique (Janssen et al. 2011).

### **V.1.2. Les sécrétions hormonales du tractus GI et du pancréas**

#### *V.1.2.1. Généralités sur les cellules entéroendocrines*

Le tractus gastro-intestinal est l'un des organes endocrines le plus important du fait de la présence des CEEs. Elles sont parsemées parmi les entérocytes tout au long de l'épithélium du tractus GI et ne représentent qu'environ 1% de toute la population cellulaire intestinale (Santos-Hernández et al. 2018a). Une douzaine de CEEs différentes ont été décrites à ce jour,

sécrétant plus d'une vingtaine d'hormones gastro-intestinales (Sam et al. 2012; Sternini et al. 2008) (*Figure 17*).



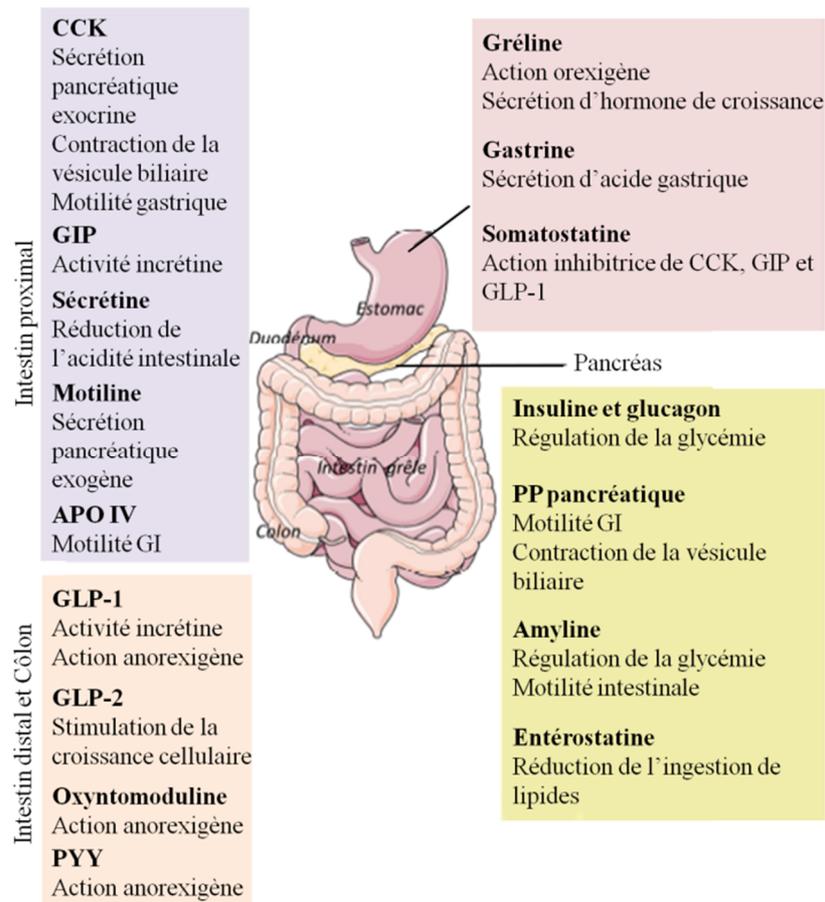
**Figure 17.** Les principales populations de cellules entéroendocrines et les hormones sécrétées présentes au niveau du tractus gastro-intestinal.

Image modifiée de (Latorre et al. 2016).

Les différentes cellules endocrines sont réparties dans des proportions différentes tout au long du tractus intestinal. Par exemple, les cellules L sécrétant le GLP-1 et le PYY sont présentes dans des quantités très faibles au niveau du duodénum, en revanche, la densité de ces cellules augmente au niveau de l'iléon et elles sont également présentes au niveau du colon et du rectum (Nauck and Meier 2018). Selon leur morphologie et leur localisation dans la muqueuse gastrique et intestinale, ces cellules se retrouvent sous deux formes : les cellules de type ouvert ou *open type* dont le prolongement apical sous forme de microvillosités est en contact direct avec la lumière intestinale et les cellules de type fermé ou *close type*, enfouies plus profondément dans la muqueuse à proximité de la membrane basale. Ces deux types cellulaires sécrètent et stockent 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; Santos-Hernández et al. 2018a).

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 CEEs dans le mécanisme de chimiodétection (*chemiosensing*) intervenant dans le processus de régulation de l'homéostasie énergétique (Furness et al. 2013). A l'heure actuelle, ce sont principalement des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui ont été mis en évidence dans la sécrétion des hormones GI. Ainsi, les récepteurs à l'amertume T1R1/T1R3 sont 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 FFAR4 sont sensibles au L-glutamate et le récepteur du goût sucré T1R2/T1R3 est sensible aux monosaccharides et aux acides aminés D sucrés comme les édulcorants (Gribble et al. 2016; Han et al. 2019; Xie et al. 2018). 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 (VI.2.1 et VI.2.2).

La **Figure 18** présente les principales hormones, impliquées dans la digestion GI et la régulation de l'homéostasie énergétique, sécrétées par les CEEs tout au long du tractus GI.



**Figure 18.** Le tractus GI et ses sécrétions hormonales impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

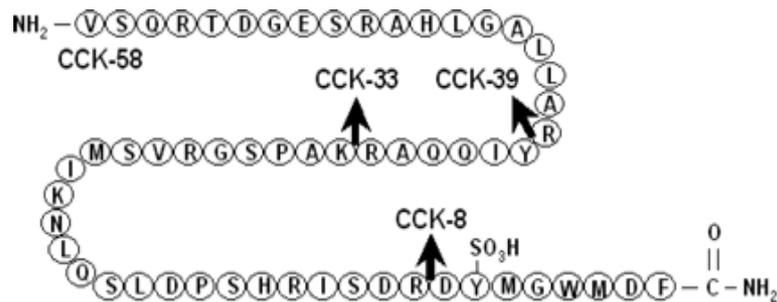
CCK : Cholécystokinines ; GIP : Glucose-dependent Insulinotropic Peptide ; GLP-1 et -2 : Glucagon-Like Peptides ; PYY : Peptide YY ; PP : Polypeptide-fold (Caron 2016).

Dans la suite du manuscrit, seules les hormones étudiées au cours de la thèse ont été décrites. Il s'agit des CCK, du GLP-1, du GIP pour la régulation à court terme de l'homéostasie énergétique et de l'insuline et de la leptine pour la régulation à long terme.

#### V.1.2.2. Les CCK

Les cholécystokinines sont une famille de peptides originellement découverte dans le tractus GI par Ivy et Oldberg en 1928. Cette équipe a montré que des extraits de fluide de la muqueuse de l'intestin supérieur stimulaient les sécrétions de la vésicule biliaire (Ivy and Oldberg 1928). Cependant, ce n'est qu'en 1973, que l'équipe de Gibbs a découvert l'effet des CCK sur la régulation de la prise alimentaire (Gibbs et al. 1973). Les CCK, initialement identifiées sous la forme d'un peptide de 33 acides aminés existent sous de nombreuses formes biologiquement actives dérivées d'un précurseur (la pré-pro-cholécystokinine) constitué de 115 acides aminés (Pathak et al. 2018). Les différentes formes moléculaires des

CCK (**Figure 19**) sont : CCK-63, CCK-58, CCK-39, CCK-33, CCK-12, CCK-8 et CCK-5. Les formes prédominantes dans le sérum sont CCK-58, CCK-33 et CCK-22 et la forme prédominante trouvée dans les neurones du SNC et les neurones du système nerveux entérique est la CCK-8 (Rehfeld 2017). Il a été montré par l'équipe d'Overduin que la CCK-58 exogène était capable de stimuler la satiété et la satiété chez le rat alors que la CCK-8 n'a montré que des effets sur la satiété, remettant alors en question le potentiel bioactif de CCK-8 (Overduin et al. 2014).



**Figure 19.** Séquence en acides aminés des principales formes moléculaires des CCK.

La partie C-terminale du peptide est commune à toutes les formes de CCK. Elle lui confère son activité biologique avec l'enchaînement des 7 acides aminés et surtout par la présence d'un groupement sulfate sur la tyrosine en position 7 à partir du C-terminal. Cette partie C-terminale est très conservée dans le règne animal. De plus, cette propriété structurale est également partagée avec la gastrine (Rehfeld 2017). En effet, ces deux hormones partagent cinq caractéristiques basiques : une homologie de séquence, certaines activités biologiques similaires, une hétérogénéité (différentes formes moléculaires), une ubiquité (synthétisée dans différents types cellulaires) et la prédominance de certaines formes dans différents tissus et cellules (Washabau and Day 2012).

Les CCK sont sécrétées par les cellules I principalement présentes au niveau du duodénum et du jéjunum (**Figure 17**) dont les principaux stimuli sont les lipides et les protéines. Les effets cellulaires des CCK sont véhiculés via deux types de récepteurs aux CCK : le CCK1-R 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 principalement exprimé au niveau du cerveau. Les CCK sulfatés se lient avec une très forte affinité au CCK1-R alors que le CCK2-R est moins spécifique et lie aussi les CCK non-sulfatés et la gastrine (Rehfeld 2017). La sécrétion de CCK apparaît rapidement après la prise alimentaire (Abdalla 2017). Les principaux effets directs des CCK sont la stimulation des

sécrétions pancréatiques, la contraction de la vésicule biliaire, le ralentissement de la vidange gastrique et la relaxation du sphincter d'Oddi. Ces actions sont principalement médiées par les nerfs afférents vagues exprimant le CCK1-R (Daly et al. 2013). 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 vagues, en réponse à la présence de nutriments et relayée au niveau du NTS (Reidelberger et al. 2003; Suzuki et al. 2011). Cependant, le CCK1-R cérébral pourrait également jouer un rôle 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 en lien avec 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 vagues 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, ainsi que la croissance de la muqueuse gastrique. Cette activation n'est à 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  $\beta$ -pancréatiques ainsi que comme agent anti-apoptotique (Irwin and Flatt 2013).

#### V.1.2.3. *La famille des incrétones*

Depuis plus d'une dizaine d'années, les hormones incrétones ont reçu beaucoup d'attention pour leur rôle important dans la physiologie de l'homéostasie du glucose et dans la physiopathologie du DT2 ainsi que dans d'autres perturbations métaboliques. L'effet incréte est défini comme la stimulation de la sécrétion des hormones dites incrétones telles que le Glucose-dependent Insulinotropic Peptide (GIP) et le Glucagon Like-Peptide 1 (GLP-1) par les cellules entéroendocrines de l'intestin (couplé à l'absorption du glucose). Les hormones incrétones stimulent la sécrétion d'insuline et modulent la sécrétion du glucagon, sont responsables de la biosynthèse de la pro-insuline et favorisent la néoglucogénèse. Trois types de signaux provenant de l'intestin stimulent la sécrétion de l'insuline par le pancréas endocrine : les substrats tels que le glucose, les hormones incrétones et les signaux neuronaux

transmis par le système nerveux autonome. Parmi ces trois signaux, les hormones incrétines participent à la plus importante contribution physiologique (Nauck and Meier 2018).

### *Le Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP)*

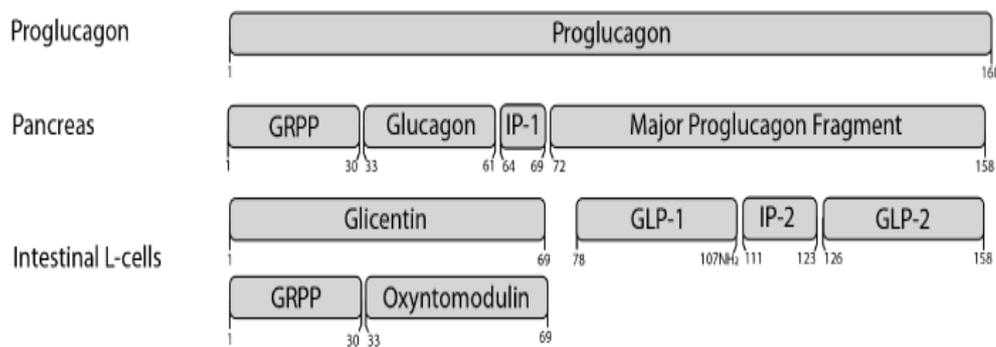
Le GIP a initialement été découvert pour son effet inhibiteur de la sécrétion de l'acide gastrique. C'est pourquoi, ce peptide a dans un premier temps été nommé Gastric Inhibitory Polypeptide. Ce n'est que plus tard, avec la découverte de sa fonction principale que ce peptide a été renommé Polypeptide Insulinotrope dépendant au Glucose. Le GIP est un peptide de 42 acides aminés sécrété par les cellules K de l'intestin grêle supérieur (duodénum et partie proximale du jéjunum) La sécrétion de GIP est principalement induite en réponse à l'ingestion de lipides et de glucides. Les concentrations de GIP circulants augmentent quelques minutes après l'ingestion avec un pic au bout d'une heure et diminuent sur plusieurs heures pour revenir au niveau basal (Plummer et al. 2019). L'action incrétine du GIP se fait via l'activation du récepteur GIP (GIPR) exprimé par les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Outre sa capacité à stimuler la sécrétion d'insuline, le GIP stimule la transcription du gène codant la pro-insuline. Le GIP exerce aussi des effets extra-pancréatiques jouant notamment un rôle sur la production de glucose hépatique ainsi qu'au niveau des adipocytes en augmentant la synthèse des acides gras et en stimulant le transport du glucose. En effet, le GIPR est également exprimé par les adipocytes, les cellules osseuses et le SNC, (Gault et al. 2003). Une fois sécrété, il est rapidement 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 (Sun et al. 2019).

**Particularités chez le chien et le chat :** Les cellules K chez le chat sont également présentes dans l'iléon de façon aussi abondante que dans les autres portions de l'intestin. Ces cellules peuvent aussi être trouvées dans le caecum et le côlon (Gilor et al. 2013).

Il a été montré chez le chat que le glucose n'est pas le principal stimulant de la sécrétion du GIP, contrairement à l'Homme après infusion de glucose. La sécrétion de GIP est en effet également stimulé par l'infusion de lipides et d'acides aminés (Mcmillan et al. 2016).

### Le Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1)

Le GLP-1 est un produit du proglucagon, lui-même clivé à partir de la prohormone préproglucagon. Le proglucagon est un peptide de 160 acides aminés qui est synthétisé au niveau des cellules  $\alpha$ -pancréatiques, dans les cellules L de l'iléon et du côlon et dans le SNC (Sekar et al. 2016). 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 (Abdalla 2017) (**Figure 20**).

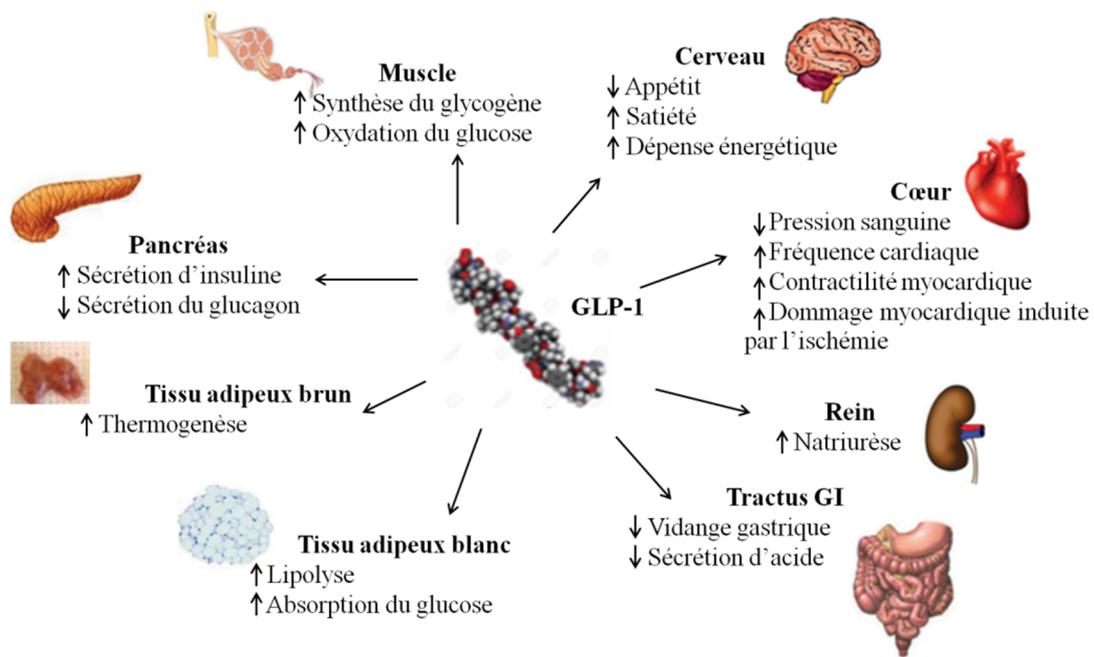


**Figure 20.** Les produits issus du clivage du proglucagon.

Le numéro correspond à l'acide aminé dont la liaison peptidique est clivée. GLP-1 et GLP-2 : Glucagon Like-Peptide 1 et 2 ; GRPP : glicentin-related polypeptides ; IP-1 et IP-2 : intervening peptides 1 et 2.

Le GLP-1 est un peptide de 36 ou 37 acides aminés, selon la présence ou non du résidu de glycine au niveau N-terminal. Afin que le GLP-1 soit actif, un second clivage est nécessaire au niveau N-terminal pour lui conférer ses propriétés biologiques. Les deux formes actives sont : le GLP-1<sub>(7-36)</sub> pourvu d'un groupement amide et le GLP-1<sub>(7-37)</sub>, nommées dans le manuscrit par le terme générique GLP-1. Ces deux formes sont dégradées sous l'action de la DPP-IV au niveau du résidu alanine en position P1 en N-terminal comme le GIP (Nauck and Meier 2018).

L'ingestion de nutriments, en particulier de glucides et de lipides, est le principal stimulus de la sécrétion de GLP-1. Les actions du GLP-1 sont réalisées via le récepteur GLP-1 (GLP-1R) qui est composé de 463 acides aminés et très largement distribué dans les organes périphériques (poumons, cœur, intestin, reins, îlots pancréatiques) ainsi que dans le SNC, notamment au niveau de l'hypothalamus. Comme le GIP, le GLP-1 exerce une action incrétine mais également, par la présence ubiquitaire de ses récepteurs, de nombreuses actions sur différents organes, dont plusieurs interviennent dans la régulation de la prise alimentaire. Ainsi le GLP-1 joue également un rôle anorexigène (**Figure 21**).



**Figure 21.** Les différentes actions du GLP-1 sur les organes.  
Image modifiée d'après (Sekar et al. 2016)

Au niveau de l'estomac, le GLP-1 induit un ralentissement de la vidange gastrique et stimule la sécrétion d'acide gastrique. De plus, le GLP-1 est considéré comme l'un des médiateurs clés dans le phénomène d'*iléal brake*, une boucle de régulation exercée par l'iléon en présence de nutriments qui conduit à l'inhibition de la motilité de l'intestin proximal et de ses sécrétions pendant la digestion (Maljaars et al. 2008). Au niveau pancréatique, le GLP-1 inhibe également la sécrétion du glucagon et favorise l'augmentation du nombre des cellules  $\beta$  pancréatiques en plus de stimuler la sécrétion d'insuline. De plus, il exerce des effets sur le système cardio-vasculaire, sur le foie (néoglucogénèse hépatique) et améliore la sensibilité à l'insuline des muscles (Burcelin and Thorens 2013). Il a été montré chez le rat que la sécrétion de GLP-1 peut augmenter par anticipation, environ une heure avant le repas. Ce pic de GLP-1 stimule probablement les cellules  $\beta$  pancréatiques pour produire l'insuline en préparation des nutriments qui vont être ingérés (Begg and Woods 2013). Selon le type de nutriment, la sécrétion de GLP-1 peut être bi-phasique avec une première augmentation de la concentration plasmatique de GLP-1 dans les 15 premières minutes de la digestion suivie d'une seconde augmentation 90-120 minutes après la prise alimentaire (Steinert et al. 2016). Le premier pic laisse suggérer l'implication d'une boucle proximo-distale où la détection des nutriments serait réalisée dans la partie supérieure de l'intestin et serait relayée à la partie distale par un contrôle neuronal et hormonal. Le GIP serait le principal médiateur de cette boucle en agissant sur les fibres cholinergiques du nerf vague. Le neuropeptide *gastrin*

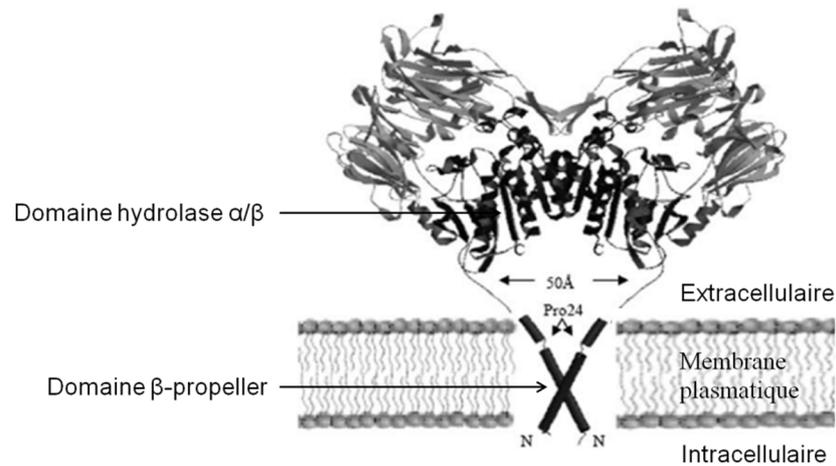
*releasing peptide* (GRP) serait également impliqué dans cette boucle de régulation (Lim and Brubaker 2006). Cependant, les CEEs exprimant le GLP-1 ont récemment été détectées dans l'intestin proximal donc le contact direct des nutriments pourraient également contribuer à la stimulation de la sécrétion du GLP-1 (Monteiro and Batterham 2017). Le deuxième pic survient suite au contact des nutriments avec les cellules L localisées dans l'iléon et le côlon. Comme précisé plus haut, le GLP-1 est clivé par l'enzyme DPP-IV induisant un temps de demi-vie entre 2 et 5 minutes. De plus, le GLP-1 est dégradé dans une moindre mesure par plusieurs aminopeptidases présentes au niveau du foie et des poumons (João et al. 2016).

**Particularités chez le chien et le chat :** Chez le chien, la plupart des cellules L sont localisées dans le jéjunum et dans l'iléon (Gilor et al. 2013).

### V.1.3. La DPP-IV

La DPP-IV, une protéase à sérine (exopeptidase), est constituée de 776 acides aminés (Hirakawa et al. 2015). Cette enzyme clive préférentiellement les dipeptides X-proline et plus rarement X-alanine à partir du N-terminal de nombreux substrats, tels que les hormones incrétines GLP-1 et GIP (Gallego et al. 2014). Pour cela, la proline doit se situer en avant dernière position de la chaîne d'acides aminés et une proline, hydroxyproline ou N-méthyl glycine ne doit pas se trouver en troisième position. De plus, la liaison entre les positions 1-2 et 2-3 de cette chaîne doit se trouver sous la forme trans (Lacroix and Li-Chan 2012).

La structure de l'enzyme DPP-IV est identique à celle de l'antigène de surface CD26 des leucocytes et à celle de l'adénosine déaminase complexé à la protéine 2. La DPP-IV est exprimée à la surface de nombreux tissus (la bordure en brosse de l'intestin, le foie, le rein...) mais également sous forme soluble dans le plasma, l'urine, le fluide amniotique (Augstein et al. 2015; Silveira et al. 2013). La forme transmembranaire de la DPP-IV 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) (**Figure 22**). Le site actif contient une région glycosylée, une région riche en résidus de cystéine et un domaine catalytique C-terminal (Mentlein 1999).



**Figure 22.** Représentation de la DPP-IV transmembranaire.

Le domaine β-propeller est représenté en noir dans la membrane plasmique et le domaine hydrolase α/β en gris du côté extracellulaire. Image modifiée de (Chung et al. 2010).

Elle est impliquée dans de multiples fonctions biologiques, qui ne sont à ce jour toujours pas totalement élucidées, telles que l'hydrolyse de certaines hormones, des chimiokines (cytokines chimiotactiques) et des neuropeptides, la liaison de l'adénosine déaminase et la co-stimulation des cellules T. De plus, il a été montré que la DPP-IV/CD26 est un marqueur des cellules souches cancéreuses sans doute impliquée dans la transformation maligne. La DPP-IV joue un rôle important au niveau du métabolisme glucidique. En effet, la DPP-IV dégrade les hormones incrétines (GLP-1, GIP) qui sont libérées par les cellules de l'intestin directement dans le système sanguin (Augstein et al. 2015). Pour agir rapidement, il a été montré que l'enzyme DPP-IV est très fortement exprimée sur les cellules endothéliales directement adjacentes aux cellules sécrétant les hormones incrétines dans le tractus gastro-intestinal (Jakubowicz and Froy 2013).

## V.2. Les signaux de la régulation à long terme de l'homéostasie énergétique

Bien que les signaux de satiété renseignent le cerveau sur la présence et la quantité d'énergie disponible au cours d'un repas, ces signaux à court terme ne sont pas suffisants. Une régulation à long terme, réalisée à l'aide de signaux d'adiposité (la leptine et l'insuline), informe également le SNC du stock d'énergie disponible.

### V.2.1. La leptine

La leptine a été découverte en 1994 par Friedman et ses collaborateurs (Zhang & al., 1994), mais ce n'est qu'une décennie plus tard que l'implication de la leptine dans la modulation de plusieurs aspects de l'homéostasie énergétique a été démontrée (Broberger

2005). La leptine est une protéine de 146 acides aminés principalement sécrétée par le tissu adipeux blanc mais également, en de plus faible quantité, par l'estomac, le placenta et le cœur. Le récepteur de la leptine (ObR) est fortement exprimé dans le cerveau au niveau de l'hypothalamus, ainsi que dans le placenta, l'estomac et le système vasculaire. Il existe cinq isoformes des récepteurs de la leptine : ObRa, ObRb, ObRc, ObRd et ObRe (Patel and Acharya 2018; Roujeau et al. 2014). La leptine est essentielle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Les concentrations circulantes de leptine sont proportionnelles à la masse grasse corporelle et reflètent ainsi le stock d'énergie disponible. Chez l'Homme comme chez d'autres mammifères, la leptine augmente la dépense énergétique et diminue la prise alimentaire. Chez les rongeurs, les administrations centrales ou périphériques ont montré une diminution de la prise alimentaire et du poids. De plus, au niveau central, la leptine peut influencer l'expression de différents neuropeptides orexigènes et anorexigènes (Perry and Wang 2012). Elle réalise son contrôle sur la prise alimentaire en agissant directement au niveau de l'hypothalamus. En effet, la leptine est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique et de se lier aux récepteurs ObRa et ObRb. Le récepteur ObRa permet son transport à travers la barrière hémato-encéphalique et ObRb permet de réguler le poids (Patel and Acharya 2018). Au niveau du NTS, la leptine agit de façon synergique avec le GLP-1 et la CCK pour diminuer la prise alimentaire (Chapelot and Charlot 2018).

### V.2.2. L'insuline

L'insuline est une protéine de 51 acides aminés constituée de deux polypeptides : une chaîne A constituée de 21 acides aminés et une chaîne B constituée de 30 acides aminés. L'insuline est produite dans les cellules  $\beta$  du pancréas exocrine sous la forme de préproinsuline (Patel and Acharya 2018). Cette hormone est surtout connue pour son rôle clé dans la régulation de la glycémie. Elle est sécrétée en réponse à une augmentation du glucose sanguin (par exemple après un repas) qu'elle stabilise en supprimant la production de glucose hépatique et en stimulant l'absorption et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques. Cependant, l'insuline est également un signal à long terme de la régulation de l'homéostasie énergétique : ses concentrations plasmatiques sont corrélées à la masse grasse corporelle et elle peut agir directement au niveau de l'hypothalamus en franchissant la barrière hémato-encéphalique (Könner et al. 2009).

### V.3. Conclusion

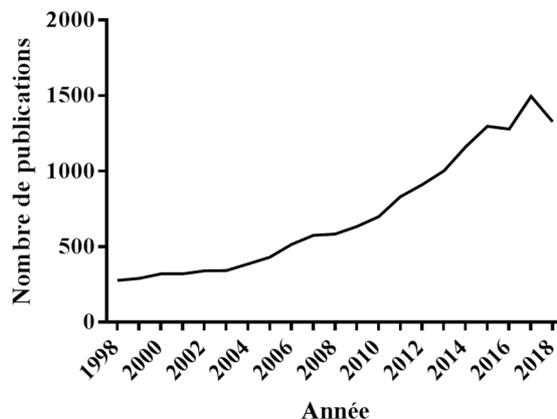
Deux axes de régulation permettent au SNC d'intégrer tout au long de la journée les signaux périphériques afin de maintenir un poids stable. Le premier axe constitue la régulation à court terme qui contrôle principalement la prise alimentaire via les hormones de la satiété. Le deuxième axe constitue la régulation à long terme qui contrôle l'apport calorique et informe le SNC de l'état énergétique du corps. Ces signaux à court et long terme sont essentiels pour que le SNC maintienne une balance énergétique stable. La présence de nutriments dans le tractus gastro-intestinal est un élément clé qui permet la sécrétion des signaux de satiété et ainsi le contrôle de la prise alimentaire. Parmi ces nutriments, les peptides issus de la digestion des protéines sont connus pour stimuler la sécrétion de ces différentes hormones de satiété.

## VI. Peptides bioactifs issus de protéines alimentaires et régulation de l'homéostasie énergétique

### VI.1. Généralités sur les peptides bioactifs

Depuis plusieurs années, le rôle des protéines alimentaires, quelle que soit leur origine, a largement été étudié et ces recherches ont démontré qu'elles peuvent être une source de peptides bioactifs. Les peptides bioactifs issus de l'alimentation sont des fragments spécifiques qui sont encryptés dans la séquence protéique parente à l'intérieure de laquelle ils sont inactifs. Les peptides deviennent biologiquement actifs une fois libérés par hydrolyse enzymatique par des enzymes exogènes, endogènes ou microbiennes (Toldrá et al. 2018; Wang et al. 2018a). Il a été montré que la taille des peptides bioactifs est généralement comprise entre 2 et 20 acides aminés mais certaines séquences bioactives contenant plus de 20 résidus d'acides aminés ont été identifiées (Ryan et al. 2011). Le profil de la population peptidique ainsi que son potentiel bioactif dépendent de la source protéique initiale mais également des conditions expérimentales (Nongonierma et al. 2016). Les peptides bioactifs peuvent exercer des fonctions physiologiques spécifiques pouvant améliorer la santé par des effets antidiabétiques, antihypertensifs, anti-inflammatoires ou encore antimicrobiens. Les études menées jusqu'à aujourd'hui, démontrent le potentiel des peptides issus de l'alimentation à agir avec des effets bénéfiques sur les différents biomarqueurs associés à la santé (Wang et al. 2018a). Les peptides peuvent soit, exercer une seule activité, soit être multifonctionnels. Leur activité est basée sur leur composition en acides aminés, sur la longueur de leur séquence et sur leur structure tridimensionnelle (Patil et al. 2015). Comme en

témoigne la figure suivante (**Figure 23**), le nombre de publications scientifiques sur les peptides bioactifs n'a cessé d'augmenter au cours des vingt dernières années.



**Figure 23.** Évolution du nombre de publications scientifiques sur le thème des peptides bioactifs de 1998 à 2018.

D'après Pubmed (NCBI).

Les peptides bioactifs représentent un réel potentiel commercial pour les marchés des aliments fonctionnels et des médicaments. En effet, la mise sur le marché d'une molécule pharmaceutique nécessite souvent un développement long et coûteux ; sans oublier que la prise de cette molécule s'accompagne fréquemment d'effets secondaires. Les peptides bioactifs issus de l'alimentation sont généralement mieux tolérés et surtout rapidement éliminés par l'organisme. Bien que leur temps de demi-vie soit court et qu'ils soient souvent instables, les peptides issus de protéines alimentaires représentent une opportunité pour le secteur pharmacologique (Agyei and Danquah 2011).

Aujourd'hui, plus de 3700 séquences peptidiques sont recensées dans la base de données BIOPEP couvrant une quarantaine d'activités biologiques. Les activités les plus représentées dans les banques de données des peptides bioactifs concernent l'inhibition de l'ECA, les activités antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires et opioïdes (Hartmann and Meisel 2007). Les séquences peptidiques recensées ont démontré leurs activités *in vitro* mais peu d'entre elles ont été testées *in vivo*. En effet, les études *in vivo* ont souvent été réalisées avec des hydrolysats protéiques complexes, mais le ou les peptide(s) impliqués dans les effets observés ne sont pas toujours identifiés (Möller et al. 2008). Le peptide bioactif qui est ingéré par voie orale ou libéré au cours de la digestion GI de la protéine, peut soit agir au niveau de la paroi intestinale ou éventuellement parfois traverser la barrière intestinale avant d'exercer son action sur l'organe cible. Si la digestion GI peut être simulée dans les essais *in vitro*, peu

d'études prennent en compte les peptidases de la bordure en brosse, ou les peptidases cytosoliques pouvant néanmoins compromettre l'intégrité du peptide.

## **VI.2. Digestion GI des protéines alimentaires et régulation de l'homéostasie énergétique**

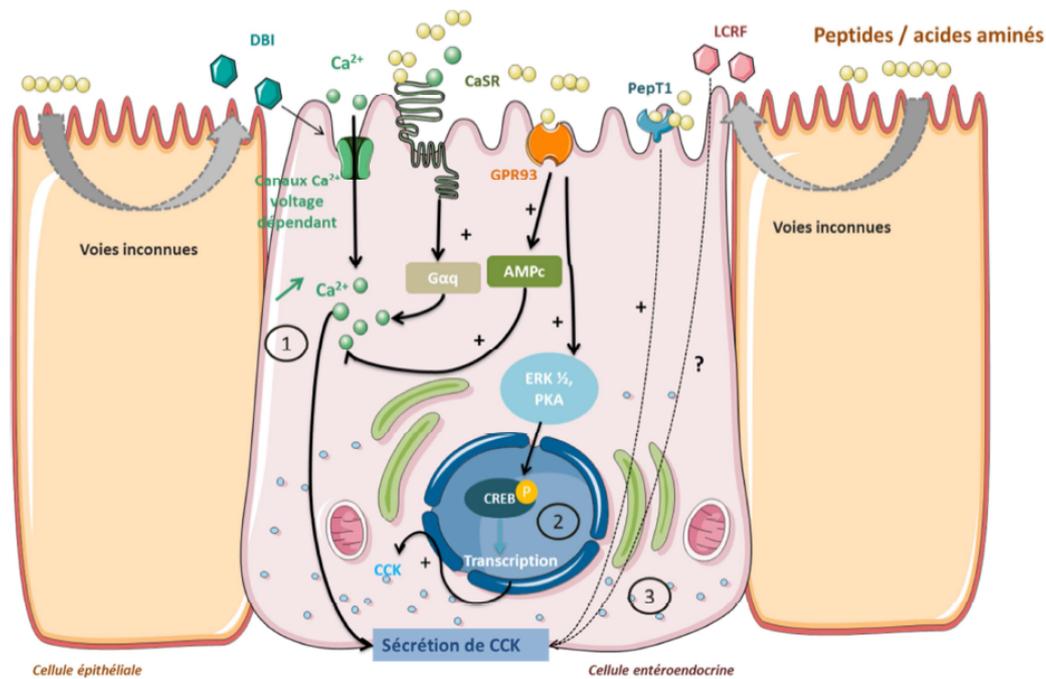
Aujourd'hui, il est reconnu que la présence des nutriments au niveau intestinal est importante pour l'homéostasie énergétique mais également glucidique. Depuis plusieurs années, les lipides, les oligosaccharides et les peptides bioactifs dérivant de l'alimentation, ont été identifiés comme des alternatives naturelles potentielles aux médicaments pour la gestion de certaines maladies. Les protéines augmentent non seulement la dépense énergétique mais diminuent également l'apport énergétique à travers des mécanismes qui influencent le contrôle de l'appétit. En effet, les produits de la digestion sont détectés par les cellules entéroendocrines situées tout au long de l'épithélium gastro-intestinal ce qui déclenche la sécrétion d'hormones intestinales en réponse à ces stimuli consécutifs au repas (Santos-Hernández et al. 2018b). Il est généralement admis que les protéines ont un pouvoir de satiété plus important que les glucides et les lipides mais l'origine de la protéine peut jouer un rôle dans cet effet de satiété (Bensaïd et al. 2002; Hall et al. 2003). L'un des aliments dont les protéines ont été le plus étudiés est le lait. Celui-ci augmente la satiété parmi d'autres effets (Jakubowicz and Froy 2013). Il a été montré que la majorité des fractions protéiques du lait, les caséines et les protéines du lactosérum, ont le potentiel d'exercer des effets différents sur la sécrétion des hormones gastro-intestinales et sur la régulation de la prise alimentaire. Ainsi, ces fractions peuvent jouer un rôle important dans le maintien de la masse corporelle et dans la prévention de l'obésité et du diabète (Chaudhari et al. 2017). De nombreuses autres études ont également montré le potentiel des protéines de différentes sources de viande, poisson, soja, blé, œuf, (Bruen et al. 2012; Caron et al. 2016; Cordier-bussat et al. 1997; Cudennec et al. 2012; Kato et al. 2016; Rafferty et al. 2011; Reimer 2006) sur la satiété. Cependant, les mécanismes d'action ne sont pas totalement élucidés. Comme précisé dans les paragraphes précédents, pour agir, les peptides bioactifs doivent être résistants aux enzymes GI et dans certains cas être capables de traverser la barrière intestinale pour exercer leurs bioactivités. Ceci est notamment le cas pour l'inhibition de l'activité DPP-IV.

### VI.2.1. Peptides bioactifs et régulation de la sécrétion des CCK

Comme présenté dans la partie V.1.2.2, les CCK représentent l'un des principaux signaux sécrétés en périphérie et permettant la régulation de l'homéostasie énergétique. Ainsi, il a été montré que les hydrolysats protéiques stimulaient la sécrétion de CCK et la transcription du gène dans les cellules entéroendocrines STC-1, alors que les protéines intactes ou les acides aminés libres induisaient seulement un effet modéré sur la sécrétion de CCK (Cudennec et al. 2008; Santos-Hernández et al. 2018b). La digestion GI est un déterminant clé de l'effet satiétogène des protéines. Différents travaux menés notamment sur les cellules STC-1 ont également montré que la sécrétion de CCK était stimulée par des hydrolysats issus de différentes sources protéiques animales (lait, poulet, poisson, bœuf, porc, blanc d'œuf) et végétales (soja, pois, blé) par rapport à un mélange d'acides aminés libres équivalent. En effet, le mélange des acides aminés représentant la composition d'hydrolysats de soja (Nishi et al. 2001), de crevettes, de merlan bleu (Cudennec et al. 2008; Cudennec et al. 2012) ou de peptones d'origine animale (Cordier-bussat et al. 1997) ont montré des effets significativement plus faibles sur la stimulation de la sécrétion de CCK que leurs hydrolysats respectifs. Ces résultats ont également été observés au cours d'une étude sur des rats, où l'ingestion de protéines de soja ou de caséines intactes a retardé la diminution de la prise alimentaire par rapport aux hydrolysats protéiques de ces mêmes matières, ce qui se justifie par la génération plus tardive des premiers peptides bioactifs par le processus de digestion GI des protéines natives (Santos-Hernández et al. 2018a). D'autres études *in vitro* ont également montré un meilleur potentiel des digestats intestinaux sur la stimulation de la sécrétion de CCK en comparaison des digestats gastriques de caséines et de lactosérum (Santos-Hernández 2018b), ou encore d'hémoglobine bovine (Caron et al. 2015). Ainsi, les résultats obtenus par les différentes équipes scientifiques montrent que non seulement la nature de la protéine peut influencer la sécrétion de CCK mais également le degré d'hydrolyse de la protéine. De plus, la structure peptidique est un déterminant clé dans la stimulation de la sécrétion de CCK, bien que remis en question par Garaedts (Geraedts et al. 2011), mettant en évidence le rôle central de la digestion GI dans la libération de peptides bioactifs à la suite de l'ingestion de protéines alimentaires.

Dans la lumière intestinale, les peptides libérés vont être au contact de la bordure en brosse et interagir avec les CEEs pour stimuler la sécrétion hormonale. Aujourd'hui, les connaissances concernant les modes d'action des peptides induisant la libération et/ou la synthèse de CCK

sont très limitées. La **Figure 24** présente les différentes voies de signalisation connues à ce jour pour stimuler la libération et la synthèse de CCK par les CEEs.



**Figure 24.** Voies de signalisation activées par les peptides et les acides aminés impliquées dans la sécrétion et la synthèse de CCK.

Les peptides présents dans la lumière intestinale peuvent activer la sécrétion de CCK par (1) une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire résultant d'une activation du CaSR ou de RPR93. Les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage dépendant permettent une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sous l'action des récepteurs CaSR et RPR93 ou d'une dépolarisation de membrane provoquée par le transport de dipeptides par PepT1. L'activation de RPR93 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 (Caron et al. 2017a).

L'interaction entre les peptides et la muqueuse intestinale est donc primordiale pour induire la sécrétion de CCK. En effet, deux études ont mis en évidence une forte affinité de liaison pour la bordure en brosse d'intestin de rat (évalué par résonance plasmonique de surface) d'un fragment de  $\beta$ -conglycinine de soja ( $\beta$ 51-63) (Nishi et al. 2003b) et d'un hydrolysate de porc (Sufian et al. 2006). Le fragment de  $\beta$ 51-63 a également permis d'induire une diminution de la prise alimentaire ainsi qu'une augmentation de la concentration plasmatique de CCK chez le rat (Nishi et al. 2003b). La sécrétion de CCK induite par les peptides alimentaires pourrait se faire de manière directe (au niveau des cellules I) ou indirectement au niveau de la muqueuse par la sécrétion des facteurs intermédiaires tels que le *Luminal CCK-Releasing Factor* (LCRF) qui est sécrété au niveau de la muqueuse intestinale en présence de nutriments dans la lumière intestinale. En effet, outre les CEEs, la muqueuse intestinale possède une

grande variété de cellules qui peuvent potentiellement interagir avec les peptides et ainsi provoquer indirectement la sécrétion des hormones (Nishi et al. 2003b). En 1998, la première voie de signalisation impliquée dans la sécrétion de CCK par les cellules STC-1 a été mise en évidence : la voie de signalisation de la protéine G, sensible à la toxine pertussis, a été activée par des hydrolysats d'albumine du blanc d'œuf. Cette sécrétion était corrélée à une entrée dans le cytosol de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage dépendant des cellules STC-1 (Némoz-Gaillard et al. 1998). Les canaux calciques de type L sont activés par le Diazepan-Binding Inhibitor (DBI). Cette molécule a été isolée de la muqueuse intestinale de rat et est connue pour induire la sécrétion de CCK (Liou et al. 2011; Yoshida et al. 1999). Puis en 2007, le récepteur GPR93, appartenant à la famille RCPG, a été identifié dans les cellules STC-1 (Choi et al. 2007a). L'activation de ce récepteur par les hydrolysats protéiques induit une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire de manière dose dépendante (Choi et al. 2007b). Un autre récepteur connu pour être impliqué dans la détection des peptides au niveau intestinal est le *Calcium Sensing Receptor* (CaSR). Il fait partie de la famille C des récepteurs RCPG et possède un domaine N-terminal Venus Fly Trap (VFT) du côté extracellulaire, riche en résidu cystéine, qui est essentiel pour la fixation des acides aminés basiques de type L (Conigrave and Hampson 2010). Il a été suggéré que la stimulation de la sécrétion de CCK via le récepteur CaSR est réalisé par les peptides de faibles poids moléculaires ( $< 1\ 000\ \text{Da}$ ) (Wang et al. 2002). Enfin, le récepteur hétérodimérique T1R1/T1R3 pourrait être impliqué dans la sécrétion de CCK et est essentiellement activé par les acides aminés libres (excepté le L-tryptophane) (Santos-Hernández et al. 2018b). Le transporteur spécifique aux di- et tri-peptides, PepT1, pourrait être impliqué de manière indirecte dans la sécrétion de CCK induite par les hydrolysats protéiques (Liou et al. 2011). En effet, il a été montré qu'une infusion duodénale de peptones de viande engendre une décharge de la fibre vagale afférente, annulée en présence d'un inhibiteur de PepT1 lorsqu'il est perfusé dans la muqueuse duodénale (Darcel et al. 2005). Pour cela, le transport des di- et tri-peptides par PepT1 pourrait initier la sécrétion de facteurs de signalisation dans la cellule I ce qui aboutirait à une sécrétion de CCK (Liou et al. 2011).

Aujourd'hui peu de peptides stimulant la sécrétion de CCK ont été identifiés, ils sont consignés dans le **Tableau 1**.

**Tableau 1.** Peptides identifiés montrant une augmentation de la sécrétion de CCK.

Peptides identifiés	Source	Référence
<b><math>\beta</math>-51-63</b>	$\beta$ -glonglycinine de soja	(Nishi, Hara, and Tomita 2003)
<b>FESF</b>	Hémoglobine bovine	(Caron et al. 2016)
<b>LSFPT</b>	Hémoglobine bovine	(Caron et al. 2016)
<b>YFPH</b>	Hémoglobine bovine	(Caron et al. 2016)
<b>ALPMH</b>	$\beta$ -lactoglobuline	(Tulipano et al. 2017)
<b>PHLMA</b>	$\alpha$ -lactoglobuline	(Tulipano et al. 2017)
<b>AAMPLW</b>	$\alpha$ -lactoglobuline	(Tulipano et al. 2017)
<b>DRVYIHPF</b>	$\alpha$ -lactoglobuline	(Tulipano et al. 2017)

Dans l'étude menée par Caron, la présence de résidus aromatiques dans la séquence des peptides issus de la digestion GI simulée, a été mise en avant comme une caractéristique structurelle pour les peptides dans l'induction de la sécrétion de CCK (Caron et al. 2016). De plus, il a été montré par Tulipano, que la longueur des fragments peptidiques dérivés de la protéine au cours de la digestion enzymatique jouerait un rôle dans la stimulation de la sécrétion de CCK. En effet, la séquence minimale, pour obtenir l'activité sur la sécrétion de CCK par les cellules STC-1, serait d'au moins cinq acides aminés (Tulipano et al. 2017). Santos-Hernández et son équipe ont pu confirmer ces deux découvertes avec des digestats gastro-intestinaux de caséines et de protéines de lactosérum de façon dose dépendante (Santos-Hernández et al. 2018b). En outre, le fragment de la  $\beta$ -conglycinine de soja ( $\beta$ 51-63), évoqué au début du chapitre pour ses effets sur la synthèse de CCK, est caractérisé par sa richesse en résidu arginine également à l'origine de la sécrétion de CCK (Nishi et al. 2001).

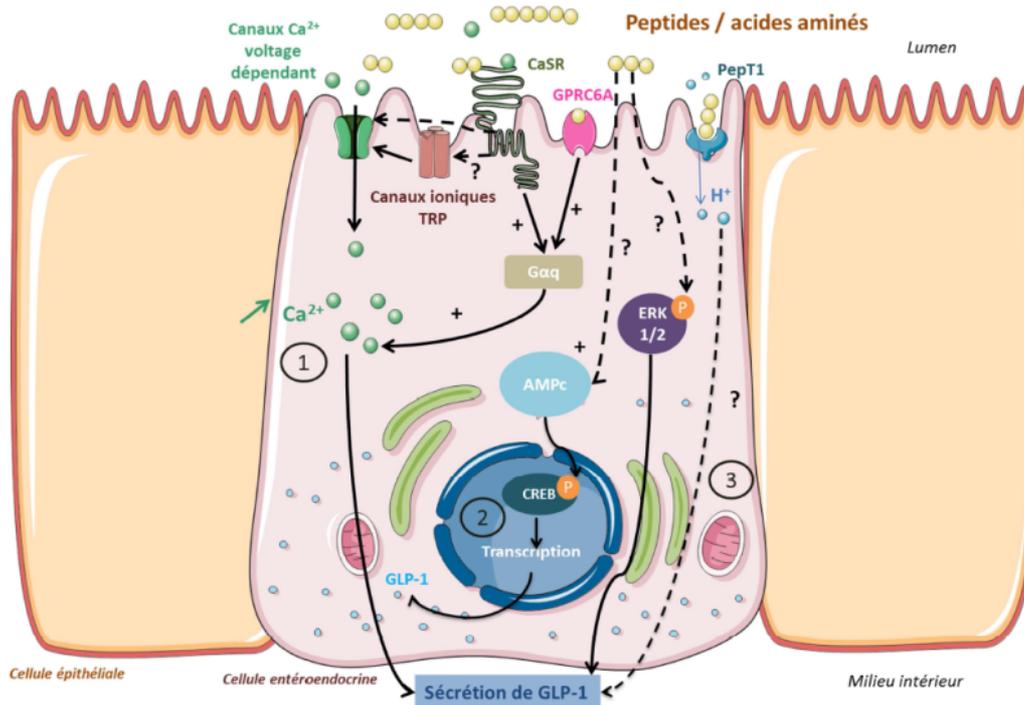
D'autre part, des études ont montré que les acides aminés libres aliphatiques (L, I), aromatiques (W, F), polaires (E) et l'arginine (R) stimulaient la sécrétion de CCK (Daly et al. 2013; Tian et al. 2019; Wang et al. 2018b; Wang et al. 2011).

#### VI.2.2. Peptides bioactifs et régulation de la sécrétion du GLP-1

Comme présenté dans la partie III.1.2.4.2, le GLP-1 joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique par ses propriétés anorexigènes et sa fonction incrétine. Ainsi, la sécrétion de GLP-1 est associée à une diminution de la prise alimentaire, une sensation de satiété et à une amélioration de la glycémie. Le GLP-1 est devenu une cible thérapeutique privilégiée dans la recherche et le développement de traitements contre les DT2 et contre les effets de l'obésité. Ainsi, dans le cas de chirurgies bariatriques, les concentrations circulantes élevées en GLP-1 qui suivent l'ingestion d'un repas seraient à l'origine de la perte de poids sur le long terme et de l'amélioration de la régulation de la glycémie. Cependant, l'origine de cette augmentation de GLP-1 reste inexplicée (Meek et al. 2016). Cet effet a été observé

suite à l'ingestion de différentes sources protéiques (Hutchison et al. 2015; Nobile et al. 2016). D'autre part, les protéines intactes d'œuf, de poisson, de pois ou les caséines augmentent significativement la sécrétion de GLP-1 *in vitro*; mais quelques résultats contradictoires ont été obtenus pour le lactosérum (Chen and Reimer 2009; Geraedts et al. 2011; Geraedts et al. 2012; Ripken et al. 2014). Les protéines de maïs, de viande et de blé stimulent également la sécrétion de GLP-1 *in vitro* et *in vivo* (Komatsu et al. 2019). Une étude rapporte qu'un régime riche en protéines augmente la satiété pendant 24h ainsi que la sécrétion de GLP-1 chez des femmes en bonne santé, et ce comparé, à un régime standard avec une quantité adéquate de protéines (Ojha 2018). Les hydrolysats protéiques de viandes, de lait, d'œuf, de poissons (Cordier-bussat et al. 1997; Cudennec et al. 2012; Geraedts et al. 2011; Pais et al. 2016; Reimer 2006), de pois (Geraedts et al. 2011), de blé (Kato et al. 2016), d'hémoglobine bovine (Caron et al. 2016), de caséines (Bruen et al. 2012; Chen and Reimer 2009; Gillespie and Green 2016; Rafferty et al. 2011), de saumon (Harnedy et al. 2018a) et de merlan bleu (Cudennec et al. 2012; Harnedy et al. 2018b) stimulent aussi la sécrétion de GLP-1 *in vitro*. De la même façon que pour la sécrétion de CCK, la sécrétion de GLP-1 est principalement induite par les hydrolysats protéiques, et moins efficacement par les protéines intactes et les acides aminés libres. Ce résultat a été démontré à la fois sur intestins isolés et perfusés de rats ainsi que sur les cellules entéroendocrines STC-1 (Santos-Hernández et al. 2018b). Une charge oro-gastrique d'hydrolysat de merlan bleu a induit chez le rat une diminution de la prise alimentaire à court terme, corrélée à une augmentation des concentrations plasmatiques de CCK et de GLP-1 (Cudennec et al. 2012). Les protéines alimentaires peuvent également améliorer la régulation de la glycémie en stimulant la sécrétion de GLP-1 et en inhibant l'activité de l'enzyme DPP-IV plasmatique (Diepvens et al. 2008; Hsieh et al. 2013; Ishikawa et al. 2015; Mochida et al. 2010). Les protéines de lactosérum génèrent des peptides bioactifs pouvant stimuler la sécrétion de GLP-1, inhiber l'activité de l'enzyme DPP-IV et stimuler la sécrétion d'insuline dans des cellules pancréatiques (Power-Grant et al. 2015). Cependant, le potentiel stimulateur des protéines pour la sécrétion de GLP-1 est plus faible que celui d'autres macronutriments comme les glucides ou les lipides (Elliott et al. 1993). De plus, l'augmentation des niveaux de GLP-1 plasmatique n'est pas toujours corrélée à un effet satiétogène (Van Der Klaauw et al. 2013). Ainsi, les effets satiétogènes induits par le GLP-1 semblent être liés à de nombreux paramètres tels que l'état physiologique ou les conditions expérimentales de l'étude (présence d'autres macronutriments, source protéique, intervalle entre administration de la pré-charge protéique et le prélèvement sanguin) (Dougkas and Östman 2016).

Cependant, le(s) mode(s) d'action des peptides stimulant la sécrétion du GLP-1 par les CEEs ne sont encore que partiellement élucidés et les propriétés physicochimiques telles que la longueur minimale et maximale des peptides ou leurs compositions en acides aminés demeurent mal connues (Komatsu et al. 2019). La **Figure 25** présente les différentes voies de signalisation connues à ce jour pour stimuler la libération et la synthèse du GLP-1 par les cellules entéroendocrines L.



**Figure 25.** Voies de signalisation activées par les acides aminés libres et les peptides dans la synthèse et la sécrétion de GLP-1.

Les acides aminés libres et les peptides présents au niveau de la lumière intestinale peuvent stimuler la sécrétion de GLP-1 en activant les récepteurs CaSR et GPRC6A (1). Ces derniers activent la sous-unité  $\alpha$  Gq déclenchant elle-même une voie de signalisation PLC et  $IP_3$  dépendante menant à une augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Cette dernière résulte également de l'activation des canaux  $Ca^{2+}$  voltage dépendant par les canaux TRP ou le CaSR. Les peptides peuvent favoriser la synthèse de 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 phosphorylation des ERK  $\frac{1}{2}$  ou l'entrée de protons couplée au transport des peptides par PepT1 (3) (Caron et al. 2017a).

La sécrétion de GLP-1 est déclenchée suite au contact des peptides avec les cellules L de l'iléon, ou par une activation des voies afférentes vagues au niveau du duodénum qui stimulent indirectement la sécrétion de GLP-1 dans les cellules L de l'intestin distal (Herrmann et al. 1994; Hira et al. 2009). Pour chercher à comprendre les mécanismes impliqués dans la détection des nutriments, des lignées cellulaires murines telles que les cellules STC-1, GLUTag ou des lignées cellulaires humaines comme les cellules NCI-H716

sont utilisées. Les acides aminés libres stimulent également la sécrétion de GLP-1, cependant, il a été montré que ce potentiel était plus faible que celui des peptides (Cordier-bussat et al. 1997; Cudennec et al. 2012). A l'heure actuelle, les mécanismes d'action des acides aminés libres pour stimuler la sécrétion de GLP-1 sont bien mieux caractérisés. Les récepteurs connus pour détecter les acides aminés et déclencher la sécrétion de GLP-1 appartiennent à la famille des récepteurs couplés à la protéine G. Les récepteurs identifiés qui potentiellement stimulent la libération et/ou la synthèse de GLP-1 et qui sont présents sur les cellules entéroendocrines L, sont le récepteur sensible au calcium (CaSR), le RPG93, le récepteur hétérodimérique T1R1/T1R3 et le récepteur couplé à la protéine G de la famille C du groupe 6 et du membre A (RPGC6A) (Amin et al. 2018). En effet, bien que des études chez des patients en bonne santé et atteints du diabète de type 2 (Meek et al. 2016) n'aient pas montré d'effet de l'acide aminé L-glutamine sur la stimulation de la sécrétion de GLP-1, il a été observé sur différentes lignées cellulaires (GLUTag, cellules intestinales primaires) que la L-glutamine déclenche la sécrétion de GLP-1 par une dépolarisation de la membrane et par l'activation de la voie métabolique impliquant la mobilisation du calcium intracellulaire. Cette voie métabolique induit une augmentation d'AMPC et de calcium intracellulaire dans les cellules primaires (Reimann et al. 2004; Tolhurst et al. 2011). La L-glutamine pourrait aussi interagir avec les voies orexigènes puisque l'ingestion de L-glutamine a souvent été suivie d'une augmentation de la prise alimentaire (Meek et al. 2016). D'autres acides aminés hydrophobes tels que L-phénylalanine, L-tryptophane ou encore L-asparagine ont montré un effet stimulateur de la sécrétion de GLP-1 dans des intestins isolés de rat. Il est supposé que cette stimulation a été induite par l'activation de CaSR puisque l'utilisation d'un antagoniste de CaSR a fortement altéré cette stimulation (Mace et al. 2012). Le récepteur RPGC6A est un récepteur sensible aux acides aminés basiques (L-lysine et L-arginine) et qui exhibent des groupements hydroxyl ou sulfuryl. Il a été montré que la liaison extracellulaire de L-ornithine avec RPGC6A déclenche la sécrétion de GLP-1 via l'activation d'une voie impliquant le calcium intracellulaire et l'inositol-tri-phosphate dans les cellules GLUTag (Oya et al. 2012). La L-Arg est l'un des acides aminés essentiels capable d'activer ces trois récepteurs sensibles aux acides aminés (Amin et al. 2018). La L-histidine active les voies de signalisation des récepteurs GLP-1R et CaSR impliquées dans la sécrétion d'insuline glucose-dépendante en réponse à des repas riche en protéines (Leech and Habener 2003). La L-asparagine augmente la libération de GLP-1 actif dans des intestins isolés de rat avec la nécessité du calcium extracellulaire (Mace et al. 2012).

Bien que les mécanismes d'action des peptides ne soient pas encore élucidés, il y a quelques éléments communs avec les voies activées par les acides aminés libres tels que l'augmentation du calcium intracellulaire. A l'heure actuelle, deux voies métaboliques ont été mises en évidence pour l'action des peptides dans les cellules L natives : l'activation de CaSR avec une variation du calcium intracellulaire et le transporteur PepT1 associé à une dépolarisation membranaire (Diakogiannaki et al. 2013). Les hydrolysats protéiques activent également d'autres transporteurs qui sont impliqués dans la régulation du calcium intracellulaire comme les canaux voltage dépendant de type Q ou les canaux ioniques TRP (Transient Receptor Potential). Ces transporteurs sont impliqués dans la sécrétion de GLP-1 par les cellules L natives murines (Pais et al. 2016). Une autre voie de signalisation intracellulaire a été caractérisée chez les cellules NCI-H716 et fait intervenir des métabolites de la famille des MAP kinases : la phosphorylation des ERK  $\frac{1}{2}$  activée par des hydrolysats de viande provoque la sécrétion de GLP-1 (Reimer 2006). Les hydrolysats protéiques ont également montré un potentiel dans la stimulation de la transcription du gène du proglucagon dans les lignées cellulaires STC-1 et GLUTag (Caron et al. 2015; Cordier-bussat et al. 1997) via l'augmentation d'AMP cyclique et la phosphorylation du facteur de transcription CREB (Gevrey et al. 2004).

Le **Tableau 2** présente les peptides qui ont été identifiés comme responsables de la stimulation de la sécrétion de GLP-1.

**Tableau 2.** Peptides identifiés, à ce jour, et provoquant une augmentation de la sécrétion de GLP-1.

Peptides identifiés	Source	Référence
<b>ASDKPYIL</b>	$\alpha$ -actinin-2	(Stagsted et al. 2018)
<b>KPYIL</b>	$\alpha$ -actinin-2	(Stagsted et al. 2018)
<b>GGGG</b>	Peptide synthétisé	(Le Nevé and Daniel 2011)
<b>AAAA</b>	Peptide synthétisé	(Le Nevé and Daniel 2011)
<b>GWGG</b>	Peptide synthétisé	(Le Nevé and Daniel 2011)
<b>KA AVT</b>	Hémoglobine bovine	(Caron et al. 2016)
<b>TKAVEH</b>	Hémoglobine bovine	(Caron et al. 2016)
<b>ANVST</b>	Hémoglobine bovine	(Caron et al. 2016)
<b>YGAE</b>	Hémoglobine bovine	(Caron et al. 2016)
<b>GPVRGPFPIIV</b>	Caséine	(Komatsu et al. 2019)
<b>LGG</b>	Peptide synthétisé	(Diakogiannaki et al. 2013)
<b>GF</b>	Peptide synthétisé	(Diakogiannaki et al. 2013)

A ce jour, peu de motifs peptidiques ont été caractérisés pour leur capacité à stimuler la sécrétion de GLP-1. Le premier peptide qui a été identifié par l'équipe de Le Nevé est un tétrapeptides de glycine (Le Nevé and Daniel 2011). A la suite de l'étude menée au laboratoire par Juliette Caron (Caron et al. 2016), quelques hypothèses ont été émises comme

la présence de résidu d'acide aminé basique (L-lysine) du côté N-terminal de la séquence peptidique, ainsi que la présence de l'acide aminé thréonine en C- ou N-terminal. La présence d'acide aminé histidine, alanine ou asparagine pourrait aussi jouer un rôle dans la stimulation de la sécrétion de GLP-1. La présence d'un résidu lysine en N-terminal a aussi été trouvée dans la séquence minimale (KPYIL) stimulant la sécrétion de GLP-1 par l'équipe de Stagsted (Stagsted et al. 2018). Cependant la position de ce résidu ne semble pas être obligatoirement en N-terminal puisque dans l'octapeptide ASDKPYIL, le résidu lysine se situe au milieu de la séquence peptidique. De plus en comparant les séquences stimulant la sécrétion de GLP-1 dans le **Tableau 2**, la présence d'un résidu glycine, histidine, alanine ou asparagine ne semble pas non plus nécessaire à la sécrétion de GLP-1.

### VI.2.3. Peptides bioactifs et régulation de l'activité de la DPP-IV

Bien que les différentes fonctions de l'enzyme DPP-IV ne soient pas totalement élucidées, cette enzyme est bien connue pour jouer un rôle dans le clivage des hormones incrétines telles que GLP-1 et GIP. Ainsi, l'inactivation de l'enzyme DPP-IV permet d'augmenter les niveaux plasmatiques de ces hormones et donc d'accroître indirectement leur activité sur les sites cibles (nerf vague, cellules pancréatiques...). Aujourd'hui, beaucoup de molécules inhibant l'activité de l'enzyme DPP-IV ont été créées chimiquement telles que la sitagliptin, la vildagliptin, la saxagliptin ou encore la linagliptin (Gallego et al. 2014). Cependant, ces inhibiteurs induisent également de nombreux effets secondaires. Avec les avancées scientifiques, sur la connaissance des protéines alimentaires et des peptides issus du clivage de ces protéines, ainsi que le potentiel de ces molécules à agir sur la santé, la recherche s'est concentrée sur l'exploration de nouvelles voies naturelles, provenant de l'alimentation, pour identifier les protéines et peptides agissant sur l'activité DPP-IV. La digestion GI est un procédé enzymatique naturel pouvant conduire à la libération des peptides inhibiteurs de la DPP-IV à partir des protéines alimentaires. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> (concentration minimale pour inhiber de 50% l'activité de l'enzyme DPP-IV) des digestats, tout comme celles des hydrolysats protéiques sont généralement comprise entre 1 et 5 mg.mL<sup>-1</sup>. En effet, différentes sources d'hydrolysats protéiques ont montré des valeurs d'IC<sub>50</sub> inférieure à 5 mg.mL<sup>-1</sup>: hydrolysats de viandes (Lima et al. 2019), du lait (Lacroix and Li-chan 2013; Mudgil et al. 2018; Nongonierma et al. 2018), de poisson (Huang et al. 2014; Wang et al. 2015), de végétaux (Mochida et al. 2010). Des valeurs d'IC<sub>50</sub> allant de 1 à 2 mg.mL<sup>-1</sup> ont été obtenues pour des digestats gastro-intestinaux d'hydrolysats de collagène de colin d'Alaska (*Theragra chacogramma*) et de collagène de saumon (*Salmo salar L*) (Guo et al. 2015). De

même que pour des digestats de protéines de chanvre, de pois, de riz et de soja (valeurs d'IC<sub>50</sub> comprises entre  $1,85 \pm 0,34$  et  $4,50 \pm 0,55$  mg.mL<sup>-1</sup>) (Nongonierma and FitzGerald 2015). D'autres digestats gastro-intestinaux de protéines de plante ont montré un bon potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV, avec notamment la digestion des graines de Niébé (*Vigna unguiculata*) germées ou non (meilleure valeur d'IC<sub>50</sub> des graines non germinées =  $0,58$  mg.mL<sup>-1</sup>) (de Souza Rocha et al. 2014). Encore aujourd'hui, le meilleur hydrolysats identifié est un hydrolysats d' $\alpha$ -lactalbumine obtenu par hydrolyse pepsique et dont l'IC<sub>50</sub> est de  $0,036$  mg.mL<sup>-1</sup> (Lacroix and Li-chan 2013). Il a été montré que la digestion GI potentialise l'inhibition de l'activité de la DPP-IV : les digestats intestinaux ont des valeurs d'IC<sub>50</sub> inférieures à celles des digestats gastriques mais également inférieures à celle de protéines natives qui n'inhibent généralement pas l'activité de l'enzyme. Ceci a été démontré avec des hydrolysats de seiche (Cudennec et al. 2015), de riz, pois, soja, chanvre (Nongonierma and FitzGerald 2015), des hydrolysats de protéines de lactosérum (Nongonierma and FitzGerald 2013), ou encore un digestat d'hémoglobine bovine (Caron et al. 2015). Actuellement, il y a eu peu d'études *in vivo* qui ont pu confirmer l'action des hydrolysats actifs *in vitro*. Parmi ces études, l'ingestion d'hydrolysats de zéine (Mochida et al. 2010), de  $\beta$ -lactoglobuline (Uchida et al. 2011), de gélatine de porc (Huang et al. 2014), de gélatine de saumon (Hsieh et al. 2013) et de gélatine de tilapia (Wang et al. 2012) ont montré une diminution de l'activité plasmatique de la DPP-IV mais également une amélioration de la glycémie, une augmentation des concentrations de GLP-1 et d'insuline plasmatique sur des rats diabétiques induit par la streptozocine.

Beaucoup de peptides montrant un potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV ont été identifiés par des études *in silico*. Le tableau suivant (**Tableau 3**) présente quelques peptides montrant un potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV.

**Tableau 3.** Liste non exhaustive des peptides identifiés pour inhiber l'activité de la DPP-IV.

Peptide	IC <sub>50</sub> (μM)	Source	Référence
<b>IPA</b>	49	β-lactoglobuline	(Tulipano et al. 2011)
<b>EPVK</b>	330,1 ± 55,9	α <sub>s1</sub> -CN (f147-150) de chameau	(Nongonierma et al. 2018)
<b>LAHKPL</b>	239,7 ± 24,7	α-LA (f105-110)	(Nongonierma et al. 2018)
<b>VPF</b>	55,1 ± 5,8	β-CN (f86-88)	(Nongonierma et al. 2018)
<b>VPV</b>	6,6 ± 0,5	β-CN (f213-215)	(Nongonierma et al. 2018)
<b>YPI</b>	35,0 ± 2,0	β-CN (f69-71)	(Nongonierma et al. 2018)
<b>YPLR</b>	360,1 ± 28,1	α <sub>s1</sub> -CN (f4-6)	(Nongonierma et al. 2018)
<b>VAAA</b>	141 ± 0,01	Hémoglobine bovine	(Caron et al. 2017a)
<b>ILAP</b>	43,4 ± 1,40	Microalgue ( <i>Palmaria palmata</i> )	(Harnedy et al. 2015)
<b>MAGVDHI</b>	159,37 ± 13,67	Microalgue ( <i>Palmaria palmata</i> )	(Harnedy et al. 2015)
<b>GPAE</b>	49,6	Gélatine de peau de saumon	(Hsu et al. 2012)
<b>GPGA</b>	41,9	Gélatine de peau de saumon	(Hsu et al. 2012)
<b>PGVGGPLGPIGPCYE</b>	116,1	Jus de thon cuit	(Huang et al. 2012)
<b>CAYQWQRPVDRIR</b>	78,0	Jus de thon cuit	(Huang et al. 2012)
<b>PACGGFWISGRPG</b>	96,4	Jus de thon cuit	(Huang et al. 2012)

A ce jour, un seul peptide a été découvert pour concurrencer les molécules synthétiques inhibitrices de l'activité de la DPP-IV. Il s'agit du tri-peptide IPI ou diprotine A qui est extrait de surnageants de culture de *Bacillus cereus* et qui obtient une valeur d'IC<sub>50</sub> d'environ 3,5 μM (Umezawa & al. 1984). Nongonierma et son équipe ont découvert un second peptide particulièrement actif provenant de la β caséine bovine (VPV) avec une IC<sub>50</sub> de 6,6 μM soit deux fois moins puissant que le tri-peptide IPI (Nongonierma et al. 2018). Il a été montré que la plupart des peptides inhibiteurs contiennent de la proline et/ou des acides aminés hydrophobes dans leur séquence. De plus, le 3<sup>e</sup> résidu N-terminal du peptide semble jouer un rôle important dans l'activité inhibitrice. Ainsi, l'inhibition de la DPP-IV par de tels peptides est déterminée par leur composition mais aussi par leur longueur (Gallego et al. 2014). La position de la proline en 1<sup>e</sup>, 2<sup>e</sup>, 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> positions a été définie comme une caractéristique structurelle déterminante pour l'inhibition de l'activité DPP-IV (Boots 2013). De plus, des études *in silico* récentes ont montré que les peptides exhibant un potentiel inhibiteur de la DPP-IV contenaient généralement une chaîne branchée d'acide aminé ou un résidu aromatique avec un groupement polaire dans la chaîne latérale en position N-terminal (Nongonierma and Fitzgerald 2014).

La recherche de peptides provenant de sources alimentaires et capables d'inhiber l'activité de la DPP-IV progresse, mais la plupart des études ne prennent pas en compte le fait que les

peptides obtenus par voie exogène (hydrolyse enzymatique ou fermentation) ou par voie endogène (digestion GI), doivent d'une part être résistants à la digestion GI et d'autre part être absorbés pour inhiber l'activité de l'enzyme DPP-IV et ainsi augmenter la demi-vie des hormones incrétines. Cette absorption implique le passage des peptides au travers de la barrière intestinale. En effet, l'enzyme DPP-IV impactant le plus l'action du GLP-1 et du GIP se situe du côté basolatéral de la paroi intestinale (DPP-IV sécrétée par les cellules adjacentes aux cellules libérant le GLP-1). Récemment, trois peptides ont été isolés à partir d'un hydrolysat de macroalgue (*Palmaria palmata*) : ILAP, LLAP et MAGVAHI. Ces peptides ont conservé leur potentiel inhibiteur de l'enzyme DPP-IV après avoir été soumis à une digestion GI simulée *in vitro* (Harnedy et al. 2015). L'équipe de Nongonierma a également mis en évidence une fraction isolée d'un hydrolysat d' $\alpha$ -lactalbumine qui a conservé son potentiel inhibiteur de la DPP-IV après digestion GI ( $1,20 \pm 0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Cependant cette équipe a montré, après caractérisation des fractions actives par LC-MS/MS que l'effet inhibiteur de la DPP-IV observé n'impliquait vraisemblablement pas les mêmes séquences peptidiques avant et après digestion (Nongonierma et al. 2016).

### VI.3. Conclusion

Pendant longtemps, le processus de digestion GI était considéré comme un processus ne servant qu'à transformer les aliments en nutriments, sources d'énergie pour notre organisme. Ce n'est qu'au cours de ces 20 dernières années que le tractus GI a été considéré comme une interface dynamique entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur. L'interaction entre les nutriments et la barrière intestinale provoque l'activation des différentes voies de signalisation dont certaines sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique. La recherche et l'identification de peptides augmentant la sécrétion des hormones intestinales et inhibant l'activité de l'enzyme DPP-IV est aujourd'hui très prometteuse. En effet, les maladies associées au style de vie telles que l'obésité et les pathologies chroniques qui en découlent comme le diabète de type 2 sont en pleine expansion. De nombreux médicaments existent pour lutter contre ces différentes pathologies, mais ces médicaments chimiques peuvent avoir des effets secondaires. C'est pourquoi les études se tournent vers la recherche de molécules naturelles issues de l'alimentation pour tenter de lutter contre ces maladies. Parmi les différents nutriments provenant de l'alimentation, les protéines ont été mises en évidence grâce à leurs effets bénéfiques sur l'induction de la satiété, la réduction de la prise alimentaire et l'augmentation de la dépense énergétique. Les mécanismes d'action de ces protéines sur les effets observés ne sont toutefois pas totalement

élucidés. Certains ont été largement étudiés *in vitro* tels que la production des hormones intestinales CCK et GLP-1 par les CEEs, ainsi que l'inhibition de l'activité DPP-IV. Le rôle primordial des peptides contenus dans les digestats pour ces activités a clairement été mis en évidence chez l'Homme et sur modèles murins. Cependant, chez le chien et le chat, aucune démonstration n'a été réalisée à ma connaissance. En effet, les études ont été principalement axées sur la perte de poids par ajout de fibres dans l'alimentation ou de repas riche en protéine. Aujourd'hui, quelques voies de signalisation impliquant majoritairement les récepteurs de la famille RCPG ont été partiellement caractérisées. Ainsi, les RCPG présents au niveau apical des CEEs constituent le premier niveau d'intégration de l'information sur le contenu luminal. A ce titre, la famille des RCPG est mise en avant comme nouvelle cible pour les traitements thérapeutiques contre l'obésité et le diabète de type 2. En ce qui concerne les peptides, très peu de critères structuraux sont à ce jour connus pour favoriser l'activation des récepteurs RCPG.

# Matériels et Méthodes

---

## I. Présentation des produits de l'étude

Différentes sources d'hydrolysats protéiques ont été analysées pendant un stage de fin d'étude. De ces travaux, deux hydrolysats protéiques ont été sélectionnés pour ce projet de thèse. Le choix des deux hydrolysats s'est axé sur leur potentiel à stimuler la sécrétion des hormones intestinales CCK et GLP-1 par les cellules entéroendocrines STC-1 et à inhiber l'activité de l'enzyme DPP-IV. Ces deux hydrolysats sont obtenus à partir de deux sources différentes : PWF est un hydrolysats obtenu à partir de coproduits de poisson et XVP 15035 est un hydrolysats obtenu à partir de coproduits de volaille.

### I.1. Hydrolysats PWF et sa matière première

L'hydrolysats PWF est un hydrolysats à partir de l'hydrolyse de coproduits de tilapia (*Oreochromis niloticus*). La matière première de cet hydrolysats (MP PWF) a également été étudiée afin de mesurer l'effet de la digestion GI sur les protéines en comparaison à l'hydrolysats obtenu à partir d'une hydrolyse par des enzymes industrielles. La matière première a été traitée pour inactiver les enzymes endogènes par chauffage à 95°C pendant 30 minutes. La MP a ensuite été centrifugée afin de supprimer un maximum de matière grasse, puis lyophilisée. Le tableau ci-dessous indique les compositions de l'hydrolysats PWF et de sa matière première (**Tableau 4**).

**Tableau 4.** Composition de l'hydrolysats PWF et de sa matière première.

	H <sub>2</sub> O (%)	Protéines (%)	Matière grasse (%)	Cendres (%)
MP PWF (liquide)	68,5	16,3	39,3	7,7
PWF	4,1	83,9	7,8	6,7

### I.2. Hydrolysats XVP 15035 et sa matière première

L'hydrolysats XVP 15035 est obtenu à partir de l'hydrolyse de foie de poulet (*Gallus gallus*). La matière première de l'hydrolysats XVP 15035 a également été étudiée afin de mesurer l'effet de la digestion GI sur les protéines en comparaison à l'hydrolysats obtenu à partir d'une hydrolyse par des enzymes industrielles. La matière première a été traitée pour inactiver les enzymes endogènes par chauffage à 95°C pendant 30 minutes. La MP a ensuite été centrifugée afin de supprimer un maximum de matière grasse, puis lyophilisée. Le tableau ci-dessous indique les compositions de l'hydrolysats XVP 15035 et de sa matière première (**Tableau 5**).

**Tableau 5.** Composition de l'hydrolysate XVP 15035 et de sa matière première.

	H <sub>2</sub> O (%)	Protéines (%)	Matière grasse (%)	Cendres (%)
MP XVP 15035 (liquide)	78,0	16,1	4,3	1,3
XVP 15035	4,0	66,0	5,6	15

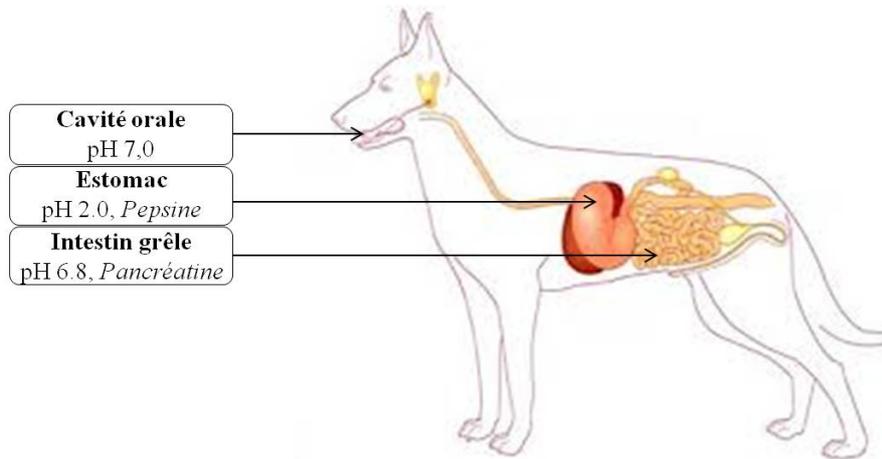
## **II. Simulation de la digestion gastro-intestinale des hydrolysats et de leurs matières premières**

### **II.1. Matériels**

Les hydrolysats PWF et XVP 15035, ainsi que leurs matières premières ont été fournis par Diana Pet Food. La pepsine porcine (EC 3.4.23, issue de la muqueuse gastrique porcine, >250 U.mg<sup>-1</sup>), la pancréatine porcine (spécifications 4xUSP, EC232-468-9, issue de pancréas de porc), l'albumine, l'aprotinine (extraite de poumon de bœuf), le glutathion, l'albumine de sérum bovin proviennent de chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne).

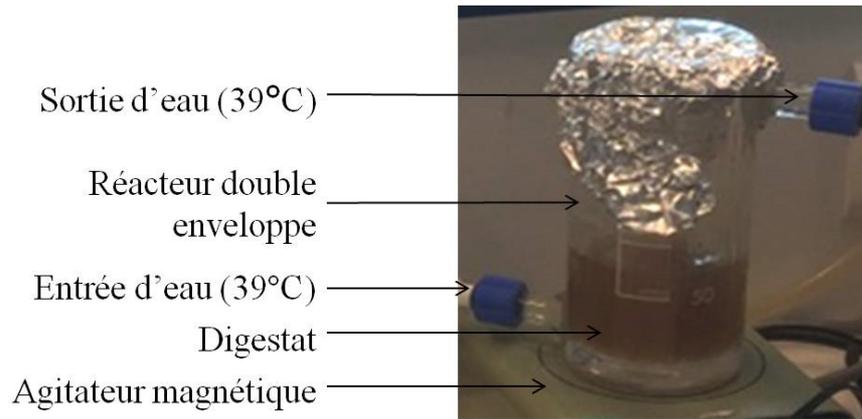
### **II.2. Modèle de digestion statique *in vitro***

Le dispositif a été mis en place afin de simuler le plus fidèlement la digestion gastro-intestinale du chien. La simulation de la digestion GI du chien a été réalisée à partir de précédents travaux réalisés au laboratoire (Caron et al. 2016) avec des modifications du protocole expérimental. Ce protocole établi au laboratoire a été mis au point pour simuler la digestion GI humaine pour une protéine (l'hémoglobine). A partir des informations trouvées dans la littérature scientifique et en se basant sur les informations fournies par Diana Pet Food sur la digestion du chien, un protocole adapté a été mis en place. Il s'agit d'un modèle de digestion GI statique mono-compartimenté qui permet la simulation des premières étapes de la digestion GI, c'est-à-dire la bouche, l'estomac et l'intestin grêle (**Figure 26**).



**Figure 26.** Représentation schématique du modèle de digestion gastro-intestinal *in vitro* statique mis en place pour l'étude.

La simulation de la digestion GI est réalisée dans un réacteur à double enveloppe de 200 mL sous agitation magnétique constante. La température de la réaction est maintenue à 39°C tout au long de la digestion. Le pH des différentes phases est contrôlé et ajusté à l'aide de solutions de NaOH (5M) et de HCl (5M). Les différents fluides (salivaire, gastrique et intestinal) sont composés d'eau ultra pure dont le pH a été ajusté en fonction des différentes phases considérées. Des prélèvements sont réalisés tout au long de la digestion à partir desquels seront réalisées les différentes analyses. Deux grammes (poids sec) d'hydrolysats ou de MP sont solubilisés avec 16 mL de fluide salivaire. Le pH n'est pas ajusté dans cette phase de digestion. Un prélèvement de 4 mL de phase salivaire est réalisé après 2 min. Le passage en phase gastrique est réalisé par l'ajout de 24 mL de fluide gastrique et de 37,5 mg de pepsine porcine (ratio E/S : 1/40) après ajustement du pH à 2.0. Un prélèvement de 4 mL est réalisé après 2h de phase gastrique et la pepsine est inactivée par chauffage à 95°C pendant 10 min. A la fin des 2h de réaction, le passage en phase intestinale est réalisé par l'ajout de 36 mL de fluide intestinal et de 4 mL de NaHCO<sub>3</sub> à 1 M. Après ajustement du pH à 6,8, 26,6 mg de pancréatine porcine (ratio E/S 1/50) sont ajoutés. Cette dernière phase est récoltée entièrement au bout de 4h de digestion, chauffée thermiquement pour inactiver les enzymes et aliquotée. Tous les prélèvements sont ensuite centrifugés 10 min à 12 000 *xg* et les surnageants sont récoltés et filtrés sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) de 0,22 µm et congelés à -20°C. La figure suivante illustre le montage expérimental (**Figure 27**).



**Figure 27.** Montage expérimental de la simulation de la digestion GI in vitro statique des hydrolysats et de leurs matières premières.

Tout au long du manuscrit, les échantillons ou digestats collectés pendant la digestion seront respectivement nommés bouche, digestat gastrique et digestat intestinal pour les phases salivaire, gastrique et intestinale. Les concentrations en poids sec/volume des échantillons sont de 125 g.L<sup>-1</sup> pour la phase salivaire, 41,67 g.L<sup>-1</sup> pour la phase gastrique et 18,51 g.L<sup>-1</sup> pour la phase intestinale.

### III. Caractérisation de la population peptidique des hydrolysats

#### III.1. Méthode de mise en évidence des peptides bioactifs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique

##### III.1.1. Matériels

Les substrats Glycine-Proline-p-nitroaniline (Gly-Pro-pNA/HCl) et Glycine-Proline-7-amino-4-méthylcoumarine (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) proviennent de chez Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Les matériels utilisés en culture cellulaire, c'est-à-dire le milieu DMEM (milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 4,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose), le sérum de veau fœtal (SVF), la pénicilline, la streptomycine et la L-glutamine proviennent de chez Dutscher (Issy-les-Moulineaux, France).

##### III.1.2. Préparation des échantillons pour le test d'activités biologiques

Les digestats bouches, gastriques et intestinaux, les fractions et sous-fractions peptidiques ainsi que les peptides synthétiques sont utilisés tels quels ou dilués avec la solution spécifique de chaque test. Les fractions et sous-fractions peptidiques sont issues des

différents fractionnements chromatographiques comme expliqué ci-dessous (partie 3.1.2.2 et 3.1.2.3).

#### *III.1.2.1. Effet des enzymes gastro-intestinales sur la population peptidique (profils SEC)*

La population peptidique des différentes phases de digestion de chaque hydrolysats et de leurs matières premières est séparée en fonction de son poids moléculaire apparent sur une colonne Superdex Peptide 10/300 GL (domaine de fractionnement 7000-500 Da) montée sur une chaîne AktaPurifier (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Afin de suivre la répartition de la population peptidique sur une gamme de poids moléculaire apparent, un détecteur UV à une longueur d'onde de 215 nm est couplé à la chaîne AktaPurifier pour détecter les liaisons peptidiques. La population peptidique est séparée à l'aide d'une élution isocratique pendant 70 min avec un solvant contenant 30% d'acétonitrile, 69,9% d'eau ultra pure et 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA) à un débit de 0,5 mL.min<sup>-1</sup>. Un volume de 25 µL de digestat à 18,5 g.L<sup>-1</sup> (concentration de la phase intestinale) est injecté sur la colonne et l'élution des peptides est suivie par la mesure de l'absorbance à 215 nm. Afin d'obtenir la gamme de poids moléculaire apparent de la population peptidique des différents digestats, la colonne est calibrée à l'aide de différents marqueurs de poids moléculaires connus (Albumine, 60 kDa ; Cytochrome C, 12.4 kDa ; Aprotinine 6.5 kDa ; Vitamine B12, 1.4 kDa et Gluthation, 307 Da).

#### *III.1.2.2. Protocole expérimental du fractionnement SEC-FPLC*

La population peptidique de la phase intestinale de chaque hydrolysats est séparée en fonction de son poids moléculaire apparent sur une colonne HiLoad 16/600 Superdex 30 prep grade montée sur un chaîne AktaPurifier (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Un volume de 2 mL à 18,5 mg.mL<sup>-1</sup> du digestat intestinal de chaque hydrolysats est injecté dans la colonne et une élution avec un solvant contenant 30% d'acétonitrile (ACN), 69,9% d'eau ultra pure et 0,1% TFA à 1 mL.min<sup>-1</sup> est réalisé pendant 2H. Le suivi de l'analyse est réalisé par mesure de l'absorbance à 215 nm. Les différentes fractions sont collectées manuellement, puis séchées par évaporation centrifuge dans un Speedvac (Mi Vac Quattro Concentrator, Biopharma Process Systems, Winchester, Royaume Unis) et conservées à -20°C. Afin d'obtenir une quantité suffisante pour tester à la fois le potentiel des fractions FPLC à stimuler la sécrétion des hormones intestinales et à inhiber l'activité DPP-IV, le fractionnement est réalisé

plusieurs fois (**Tableau 6**). Puis les différentes fractions sont solubilisées dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O ultra pure et le pH est ajusté à 7.

**Tableau 6.** Caractéristiques des fractionnements FPLC réalisé pour chaque hydrolysat.

Fractions FPLC	Digestat intestinal de PWF		Digestat intestinal de XVP 15035	
	Nombre de fractions	Concentration finale (mg.mL <sup>-1</sup> )	Nombre de fractions	Concentration finale (mg.mL <sup>-1</sup> )
F1	2	30,6	11	32,2
F2	2	25,8	3	36,0
F3	2	28,9	3	36,7
F4	8	28,6	4	32,9
F5	/	/	2	32,1

### III.1.2.3. Protocole expérimental de fractionnement RP-HPLC (semi préparatif)

Les fractions FPLC, issues du fractionnement des digestats intestinaux, qui ont montré le plus fort potentiel pour les différents tests ont été sélectionnées afin d'utiliser une deuxième technique pour séparer la population peptique. Le but de ce sous fractionnement est de permettre la séparation de la population peptidique en fonction des propriétés physico-chimiques des peptides. Les fractions FPLC les plus bioactives sont sous-fractionnées sur une colonne semi préparative C18 Gemini (150 x 10 mm, particules de 5 µm, 110 Å, Phenomenex, Le Pecq, France), à un débit de 5 mL.min<sup>-1</sup>. Les peptides ont été élués à l'aide de deux solvants ; le solvant A constitué de 99,9% d'H<sub>2</sub>O ultrapure/0,1% de TFA et le solvant B constitué de 99,9% d'ACN/0,1% de TFA. Avant chaque fractionnement, la colonne est équilibrée avec 98% de solvant A pendant 20 min, puis un gradient linéaire de 2 à 15% de solvant B de 35 min est réalisé et suivi d'un gradient linéaire de 15 à 90% de solvant B de 10 min. La colonne est ensuite rééquilibrée pendant 10 min avec 98% de solvant A. De la même façon les différentes fractions sont collectées manuellement, puis séchées par évaporation centrifuge dans un Speedvac (Mi Vac Quattro Concentrator, Biopharma Process Systems, Winchester, Royaume Unis) et conservées à -20°C. Afin d'obtenir une quantité de poids sec suffisante pour tester le potentiel des fractions HPLC à stimuler la sécrétion des hormones intestinales, le fractionnement est réalisé plusieurs fois (**Tableau 7**). Puis les différentes fractions sont solubilisées dans 1 mL d'H<sub>2</sub>O ultra pure et le pH est ajusté à 7.

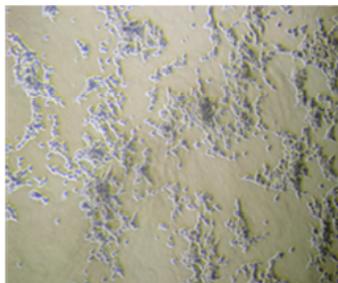
**Tableau 7.** Caractéristiques des sous-fractionnements HPLC réalisés pour chaque hydrolysat.

Sous-fractions HPLC	Digestat intestinal de PWF		Digestat intestinal de XVP 15035	
	Nombre de fractions	Concentration finale (mg.mL <sup>-1</sup> )	Nombre de fractions	Concentration finale (mg.mL <sup>-1</sup> )
FA	7	22,6	5	26,0
FB	4	25,2	8	16,2
FC	5	26,4	7	20,5
FD	4	21,6	7	21,2
FE	5	25,2	4	37,5
FF	11	23,3	6	23,1
FG	11	11,3	/	/

### III.1.3. Méthodes générales de culture cellulaire

#### III.1.3.1. La lignée STC-1

La lignée STC-1 est dérivée d'une tumeur neuroendocrine développée dans l'intestin grêle d'une souris double transgénique (**Figure 28**).

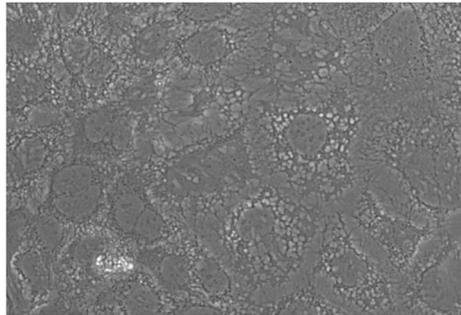


**Figure 28.** Cellules STC-1 cultivées en flasque T75 (MO X20).

Cette lignée a gracieusement été donnée par Mme Corinne Grangette (Institut Pasteur, Lille, France). La lignée cellulaire est utilisée comme modèle d'étude de la sécrétion de deux hormones intestinales, CCK et GLP-1. Les cellules STC-1 sont cultivées dans des flasques T75 contenant du milieu DMEM à 4,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose complété avec 10% de SVF, 100 U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline, 100 µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine et 2 mM de L-glutamine dans une étuve à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules STC-1 sont passées deux fois par semaine etensemencées à hauteur de 1,5 millions de cellules en flasque T75. Selon les besoins des différentes expériences, les cellules peuvent êtreensemencées à hauteur de 40 000 cellules par puits en plaques 24 puits ou à hauteur de 8 000 cellules par puits en plaque 96 puits.

### III.1.3.2. La lignée Caco-2

La lignée cellulaire Caco-2 (clone ATCC) dérive d'un adénocarcinome colorectal humain (**Figure 29**) et provient de chez Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).



**Figure 29.** Cellules Caco-2 cultivées en flasque T75 (MO X40).

Cette lignée a été choisie car ces cellules présentent des caractéristiques phénotypiques proches des entérocytes dont notamment leur capacité à se polariser et leur capacité à former une monocouche de cellules avec la présence de jonctions serrées tel un épithélium. La lignée cellulaire Caco-2 a été utilisée comme modèle de barrière intestinale mais également comme source naturelle d'enzyme DPP-IV. Les cellules Caco-2 sont cultivées dans les mêmes conditions que les cellules STC-1 avec du milieu DMEM à 4,5 g.L<sup>-1</sup> de glucose complémenté avec 10% de SVF, 100 U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline, 100 µg.mL<sup>-1</sup> de streptomycine et 2 mM de L-glutamine dans une étuve à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Dans la suite du manuscrit, le DMEM supplémenté sera nommé DMEM complet. Les cellules Caco-2 sont passées une fois par semaine et le milieu de la flasque est changé deux fois par semaine. Chaque semaine, les cellules sontensemencées à 1,5 millions de cellules en flasque T75. Selon les besoins des différentes expériences, les cellules peuvent êtreensemencées à hauteur de 40 000 cellules par puits en plaques 24 puits ou à hauteur de 8 000 cellules par puits en plaque 96 puits ou à hauteur de 84 000 cellules par insert.

### III.1.4. Test de cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité sont réalisés afin d'évaluer l'effet des échantillons issus de la Digestion GI sur la viabilité des cellules Caco-2 et STC-1. Pour cela, les cellules Caco-2 ou les cellules STC-1 sontensemencées en plaque 96 puits à 8 000 cellules/puits dans un volume final de 150 µL de milieu DMEM complet et incubées pendant 7 jours pour la lignée Caco-2 et 4 jours pour la lignée STC-1 dans une étuve à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Après incubation des

cellules, les échantillons à tester sont dilués à différentes concentrations dans du milieu DMEM complet (0,2 ; 0,5 et 1% pour les digestats) et filtrés sur une membrane PVDF 0,22 µm. Le milieu de culture dans la plaque 96 puits est remplacé par 50 µL de milieu DMEM complet et 50 µL de chaque échantillon en triplicata. Trois puits « contrôle » sont réalisés en ajoutant 100 µL de milieu DMEM complet. Après 18h d'incubation à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules sont lavées avec 100 µL de milieu DMEM sans ajout. Puis 150 µL de milieu DMEM sans ajout contenant 5% de réactif CCK-8 (Cell Count Kit-8, Dojindo Molecular Technologies, Japon) sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est de nouveau incubée pendant 1h ou 2h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. L'absorbance de la plaque est lue au bout de 1h et de 2h à l'aide un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco, Monaco, France) à une longueur d'onde de 450 nm. La viabilité cellulaire est calculée par rapport à la moyenne des absorbances des puits « contrôle » (correspondant à 100% de cellules viables).

### III.1.5. Etude de la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales CCK et GLP-1

L'objectif de cette expérience est de mesurer le potentiel des hydrolysats et de leurs matières premières au cours de la digestion GI et des fractions et sous-fractions issues des différentes méthodes de fragmentation à stimuler *in vitro* la sécrétion des hormones intestinales CCK et GLP-1. Ceci permet d'évaluer *in vitro* le potentiel des hydrolysats à jouer un rôle dans la régulation à court terme de la prise alimentaire.

#### III.1.5.1. *Protocole du test de contact des échantillons avec les cellules STC-1*

Afin de permettre le dosage des hormones intestinales CCK et GLP-1, les échantillons sont d'abord mis en contact avec les cellules entéroendocrines STC-1. Pour cela, les cellules STC-1 sontensemencées dans des plaques 24 puits à 40 000 cellules par puits dans un volume de 500 µL de milieu DMEM complet. Les cellules sont incubées environ 4 jours à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> afin d'atteindre 80% de confluence. Une fois la confluence atteinte, les échantillons issus de la Digestion GI sont dilués à 0,2 ; 0,5 et 1% (pds sec/vol) avec du tampon d'incubation Hepes (4,5 mM KCl, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 140 mM NaCl et 20 mM Hepes, pH 7,4) ; les échantillons issus du fractionnement FPLC et du sous-fractionnement HPLC sont dilués à 0,5% (pds sec/vol) à l'aide de ce même tampon. Les cellules sont ensuite rincées une fois avec 300 µL de tampon Hepes, puis 300 µL d'échantillons à tester ou de tampon Hepes sont ajoutés dans les puits. Les plaques sont ensuite incubées pendant 2h à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. A la

fin de l'incubation, le surnageant de chaque puits est prélevé et centrifugé pendant 5 min à 7 000 g afin d'éliminer les cellules qui se seraient détachées au cours du contact. Le surnageant de chaque tube est mis dans un nouveau tube et congelé à -20°C jusqu'au dosage des hormones.

### III.1.5.2. Dosage des hormones intestinales CCK et GLP-1

La quantification des hormones intestinales CCK et GLP-1 produite au cours du contact des échantillons avec les cellules STC-1 est respectivement réalisée par dosage radio-immunologique à l'aide du kit GASK-PR (CisBioassays, Codolet, France) et du kit GLP-1 actif (GLP1A-35HK, EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Allemagne). Le principe de ces deux dosages repose sur la liaison d'une hormone marquée à l'iode 125 ( $I^{125}$ ) avec son anticorps spécifique ainsi que sur l'inhibition compétitive de cette liaison par son homologue non marqué contenu dans les échantillons. Le déplacement de la liaison radioactive induite par les surnageants provenant du contact avec les cellules STC-1 est calculé. Ce déplacement de la liaison permet de déterminer la concentration en hormone dans les surnageants à l'aide d'une gamme de concentration d'hormone connue. Pour cela, la capacité de liaison du système est évaluée par le rapport  $B_0/T$  avec  $B_0$  représentant la radioactivité spécifique liée à l'anticorps en absence d'une hormone non marquée et  $T$  représentant la radioactivité totale. La réalisation de la gamme étalon permet d'établir une corrélation sigmoïde de type exponentiel décroissant entre la concentration hormonale et  $B/B_0$ , rapport représentant le pourcentage de liaison du calibrant avec  $B$  radioactivité spécifique en présence de l'hormone non marquée. La relation peut être linéarisée par la relation mathématique suivante :

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

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 :

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

### III.1.6. Identification des séquences peptidiques impliquées dans la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales par spectrométrie de masse

L'objectif de cette partie est d'identifier les différents peptides présents dans les sous-fractions (HPLC) ayant montré la plus forte activité pour la stimulation des hormones intestinales (CCK et GLP-1).

#### *III.1.6.1. Analyse LC-MSMS des sous fractions HPLC*

Les sous-fractions HPLC sélectionnées sont de nouveau séchées par évaporation centrifuge (Mi Vac Quattro Concentrator, Biopharma Process Systems, Winchester, Royaume Unis) et les culots sont solubilisés dans 50  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  ultra pure contenant 0,1% d'acide formique (AF). Afin de bien solubiliser le culot, les sous-fractions sont vortexées et soumises à un bain à ultrason trois fois, puis centrifugés 5 min à 10 000 rpm.

Un volume de 10  $\mu\text{L}$  d'échantillon est séparé par RP-UPLC (chromatographie liquide ultra haute performance en phase inverse) à l'aide d'une colonne analytique C18 Uptisphère (250x3 mm, particules de 5  $\mu\text{m}$ , 300 Å, Interchim, Montluçon, France) sur un système chromatographique Acquity biocompatible (Waters, Etten-Leur, Pays-Bas). L'élution des peptides des sous-fractions est réalisée à 30°C, à un débit de 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  et à l'aide de deux solvants ; le solvant A constitué de 99,9% d' $\text{H}_2\text{O}$  ultrapure/0,1% d'AF et le solvant B constitué de 99,9% d'ACN/0,1% d'AF. Le gradient apolaire utilisé est le suivant : injection dans la colonne à 100% de solvant A, puis un gradient linéaire de 0 à 15% de solvant B en 45 min, suivi d'un gradient linéaire de 15 à 35% de solvant B de 20 min et de 35 à 90% de solvant B de 15 min. Après 10 min de lavage de la colonne à 90% de solvant B, la colonne est rééquilibrée à 100% de solvant A pendant 7 min.

Les mesures en masse sont réalisées en mode sensibilité et en mode positif à l'aide d'un spectromètre de masse Synapt-G2-Si-IMS (Waters) de type Electrospray-Quadrupôle-Temps de vol (ESI-Q-TOF) piloté par le logiciel propriétaire MassLynx (version 4.1 Waters) et préalablement calibré à l'aide d'une solution de formate de sodium.

Les peptides séparés par chromatographie sont ionisés par electrospray grâce à un voltage en source de 3 kV et une température de désolvatation de source de 300°C. Les mesures MS et MS/MS sont réalisées en analyse donnée dépendante (DDA) dans la gamme de mesure de 100 à 2000 de rapport masse/charge (m/z). Quinze ions précurseurs, au maximum, avec un seuil

d'intensité de 10 000 sont sélectionnés pour être fragmentés par dissociation induite par collision (mode CID) à un voltage de 8 à 9 V pour les ions de faible masse moléculaire et de 40 à 90 V pour ceux de masse moléculaire élevée. La leucine enképhaline ( $[M/H^+]$  de 556,632) est injectée dans le système toutes les 2 minutes pendant 0,5 sec afin de suivre et corriger les erreurs de mesure du spectromètre de masse pendant toute la durée des analyses.

#### III.1.6.2. *Traitement des données de spectrométrie de masse*

Le traitement des données de spectrométrie de masse et la recherche en banque de données sont réalisés via le logiciel Peaks Studio version 8.5 (Bioinformatics Solutions, Waterloo, Canada) en utilisant respectivement la base de données UniProt (mis à jour le 28 Août 2018) restreinte au protéome complet de la famille de poisson *Cichlidae* pour l'analyse de la sous-fraction HPLC de PWF et la base de données UniProt (mis à jour le 28 Août 2018) restreinte au protéome complet de *Gallus Gallus* en ce qui concerne l'analyse de la sous-fraction HPLC de XVP 15035. Les seuils de tolérance des masses des ions précurseurs et fragments sont définis à 35 ppm et 0,2 Da respectivement et la recherche est effectuée sans notifier le choix d'une enzyme. Les séquences peptidiques identifiées par le logiciel sont filtrées selon un taux de faux positifs (FDR) strictement inférieur à 1%. Les séquences *de novo* identifiées par le logiciel sont filtrées selon un score de confiance (ALC score) supérieur à 80%.

### III.2. Méthode de mise en évidence des peptides bioactifs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique : inhibition de l'activité enzymatique de la DPP-IV

L'objectif de cette expérience est de mesurer le potentiel inhibiteur de la population peptidique des hydrolysats sur l'activité de la DPP-IV. La mesure du potentiel inhibiteur a été réalisée selon une méthode classique de dosage avec l'utilisation de l'enzyme DPP-IV purifiée et/ou selon une méthode mis au point au laboratoire à l'aide des enzymes DPP-IV présentes sur la membrane de cellules Caco-2 vivantes (Caron et al. 2017b).

#### III.2.1. Test d'inhibition de l'activité DPP-IV

##### III.2.1.1. *Test d'inhibition de l'activité DPP-IV avec l'enzyme purifiée*

Le potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV des digestats et des peptides ayant traversés une barrière intestinale simulée par une monocouche de cellules Caco-2 (décrit dans la section 3.2.2.1 ci-dessous) a été mesuré. Pour cela, les échantillons sont mis en présence

d'un substrat préférentiel de l'enzyme DPP-IV (substrat Gly-Pro-pNa) permettant ainsi de mesurer, par l'absorbance à 405 nm, le groupement chromophore (p-nitroaniline) du substrat clivé par l'enzyme DPP-IV purifiée. Le test est réalisé en plaques 96 puits transparentes. Les échantillons testés sont dilués à différentes concentrations (de 9 g.L<sup>-1</sup> à 18 g.L<sup>-1</sup> pour les digestats, de 0,5 à 4 g.L<sup>-1</sup> pour les échantillons apicaux de la manipulation de passage) dans du tampon Tris/HCl 100 mM, pH 8. Dans chaque puits, 25 µL d'une solution de DPP-IV à 0,018 U.mL<sup>-1</sup> sont ajoutés au 25 µL d'échantillon dilués et 75 µL de tampon Tris/HCl. Un contrôle négatif (puits sans inhibiteur potentiel) permettant d'obtenir 100% de l'activité enzymatique soit le 0% d'inhibition de l'activité DPP-IV est réalisé en remplaçant les 25 µL d'échantillon par du tampon Tris/HCl. De plus pour chaque échantillon testé ou contrôle, des puits nommés « puits couleur » sont réalisés afin de soustraire l'absorbance issue de l'échantillon. Pour cela, le volume d'enzyme est remplacé par du tampon Tris/HCl 100 mM, pH 8. Dans chaque puits, 50 µL de substrat Gly-Pro-pNa à 1 mM sont ajoutés et la plaque est incubée pendant 1h à 37°C. L'absorbance est lue à 405 nm toutes les 2 min par un spectromètre ELx808 Absorbance Reader (BioTek Instruments Inc., Etats-Unis).

Le pourcentage d'inhibition de l'activité de la DPP-IV est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{\text{Abs (échantillon)} - \text{Abs (puits couleur)}}{\text{moyenne Abs (témoin négatif)}}$$

Avec Abs pour l'absorbance mesurée à 405 nm.

A partir des pourcentages d'inhibition obtenus, la régression linéaire du pourcentage d'inhibition en fonction du logarithme népérien de la concentration finale de l'échantillon testé peut être calculée. La relation suivante est ainsi obtenue :

$$\% \text{ inhibition} = a * \text{Ln}(\text{échantillon}) + b$$

Avec a représentant la pente et b l'ordonnée à l'origine.

A partir de cette équation, la valeur de la concentration minimale pour inhiber de 50% l'activité de l'enzyme DPP-IV (IC<sub>50</sub>) est ensuite déterminée par la relation linéaire suivante :

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

### III.2.1.2. *Test d'inhibition in situ de l'activité DPP-IV sur les cellules Caco-2*

Comme pour la méthode avec l'enzyme purifiée, les échantillons ont été mis en présence d'un substrat fluorescent préférentiel de l'enzyme DPP-IV présente à la surface des membranes des cellules Caco-2 (substrat Gly-Pro-AMC). Pour cela, les cellules Caco-2 ont étéensemencées à 8 000 cellules /puits en plaque 96 puits opaque (Nunc, Thermo Fisher Scientific, Rochester NY, Etats-Unis). Les plaques sont incubées pendant 1 semaine à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Le jour de l'expérimentation, les échantillons sont dilués à différentes concentrations (allant de 3,47 à 13,89 g.L<sup>-1</sup>) dans du tampon phosphate (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, NaHPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM) à 10 mM, pH 7,4. Les cellules sont lavées avec 100 µL de tampon phosphate préalablement chauffé à 37°C puis 75 µL de tampon sont déposés dans tous les puits. Puis un volume de 25 µL d'échantillon ou de tampon (pour les puits contrôle négatif) est ajouté. La plaque est ensuite incubée à 37°C pendant 5 min avant l'ajout de 50 µL de substrat Gly-Pro-AMC à 1 mM dans tous les puits. La mesure de la fluorescence émise est enregistrée toutes les 2 min pendant 1h par un spectrofluorimètre Xenius XS (Safas Monaco, Monaco) équipée d'un bain-marie thermostaté à 37°C. 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 dans la partie précédente (3.2.1.1).

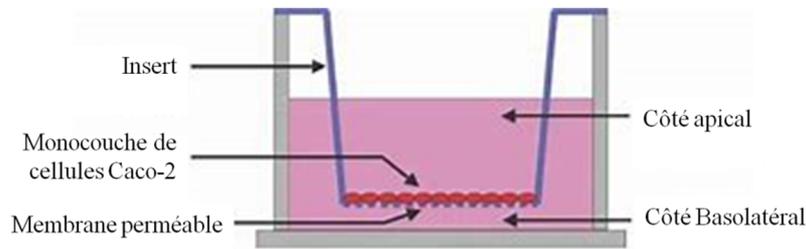
### III.2.2. Passage d'une barrière de cellules Caco-2, modèle de la barrière intestinale

L'objectif de cette expérience est d'identifier les peptides provenant des digestats intestinaux des hydrolysats capables de traverser une barrière intestinale simulée par une monocouche de cellules Caco-2 pour inhiber l'activité de l'enzyme DPP-IV.

#### III.2.2.1. *Protocole de l'expérience de passage de la barrière de cellules Caco-2*

Afin d'obtenir un modèle de barrière intestinale (**Figure 30**), les cellules Caco-2 ont été cultivées sur des inserts (D = 4,2 cm ; Taille des pores = 3 µm, #référence : 353092, Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) placés dans une plaque Compagnon 6 puits (Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France). Pour cela, les cellules Caco-2 ont étéensemencées à 20 000 cellules.cm<sup>-2</sup> soit 84 000 cellules par insert dans 2 mL de milieu DMEM complet. Un volume de 2,5 mL de milieu DMEM est déposé dans chaque puits de la plaque. Les cellules

sont incubées à 37°C pendant 15 jours et le milieu du côté apical et du côté basolatéral est changé tous les 2 jours.



**Figure 30.** Schéma du modèle de barrière intestinale.

Le jour de l'expérience, un milieu de transport Hepes-Hank's Balanced Salt Solution (HBSS :  $\text{CaCl}_2$  1,26 mM,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,49 mM, KCl 87,8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,41 mM,  $\text{NaHCO}_3$  4,2 mM, NaCl 136 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,27 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,19 mM, Glucose 5,6 mM, Hepes 22 mM) est préparé et filtré sur membrane PVDF 0,2  $\mu\text{m}$ . Les échantillons sont dilués à 4  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  dans le milieu de transport. Le côté apical et le côté basolatéral de chaque puits sont respectivement lavés avec 500  $\mu\text{L}$  et 1 mL de milieu de transport préalablement chauffé à 37°C. Puis, 1 mL du milieu de transport à 37°C est déposé du côté apical et 2,5 mL du côté basolatéral. La plaque est incubée pendant 30 min à 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ , puis le contenu du côté apical est aspiré et remplacé par 1 mL d'échantillon ou de milieu de transport (pour le contrôle) préalablement chauffé. Afin d'évaluer l'intégrité de la barrière, de la Lucifer Yellow (LY, Lucifer Yellow CH dilithium salt, Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne) est ajoutée dans chaque puits (voir partie 3.2.2.2 ci-dessous). Une cinétique est réalisée avec des prélèvements de 100  $\mu\text{L}$  en apical et en basolatéral à 15 min, 250  $\mu\text{L}$  en apical et 1 mL en basolatéral à 60 min et l'intégrité du contenu en apical (650  $\mu\text{L}$ ) et en basolatéral (1,4 mL) à 120 min d'incubation à 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$ .

### III.2.2.2. Estimation de la perméabilité apparente de la barrière cellulaire

L'objectif de cette expérience est d'estimer l'intégrité de la barrière intestinale simulée par une monocouche de cellules Caco-2. Pour cela, un colorant hydrophile (la Lucifer Yellow, LY) capable de traverser la barrière cellulaire par voie paracellulaire a été utilisé. La LY a donc été déposée dans le côté apical à une concentration de 100  $\mu\text{M}$ . Les concentrations de la LY ayant traversé la monocouche de cellules Caco-2 ont été déterminées par spectrofluorimétrie à l'aide d'une gamme de concentration connue de LY. Dans une plaque 96 puits opaque, 50  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon (apical à 120 min et basolatéral à 15, 60 et 120

min) sont déposés en simplicat et 50  $\mu\text{L}$  de chaque point de gamme (allant de 0,1 à 100  $\mu\text{M}$ ) sont déposés en triplicata. Le pourcentage de fluorescence est obtenu à l'aide d'un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco, Monaco) à des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectives de 485 et 530 nm. Les concentrations en LY obtenues dans les échantillons basolatéraux à l'aide de la gamme de LY, sont représentées en fonction du temps pour chaque condition permettant ainsi de déterminer la perméabilité apparente moyenne de la monocouche de cellules Caco-2. La perméabilité apparente ( $P_{\text{app}}$ ) est calculée grâce à la formule ci-dessous :

$$P_{\text{app}} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{V}{A \times C_0}$$

Avec  $\frac{dQ}{dt}$  représentant le taux de perméabilité déterminé par la pente de la régression linéaire de la concentration en LY dans les surnageants basolatéraux en fonction du temps, V le volume basolatéral, A l'aire de l'insert et  $C_0$  la concentration initiale déposée de LY.

Une barrière est considérée comme intègre si la valeur du  $P_{\text{app}}$  est inférieure à  $1.10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ .

### III.2.2.3. Estimation de l'intégrité de la barrière cellulaire

L'une des méthodes classiquement utilisée pour estimer la mise en place de l'intégrité de la barrière cellulaire est de réaliser la mesure de la résistance trans-épithéliale (TEER). Cette mesure n'a cependant pas pu être réalisée sur les inserts 6 puits. Afin de pallier à ce manque d'information, les cellules ont été fixées et marquées à l'aide de fluorophore afin de visualiser l'intégrité de la monocouche de cellules Caco-2. Deux fluorophores ont été utilisés permettant de visualiser les noyaux des cellules et les jonctions serrées. Pour cela, à la fin de la cinétique du passage de la barrière intestinale, les cellules ont été lavées avec du PBS. Puis, elles ont été fixées à l'aide de 1 mL de ParaFormaldehyde à 4% (PFA). Les inserts ont été incubés 15 min à température ambiante, puis de nouveau lavés avec du PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{NaHPO}_4$  10 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 mM). Dans une plaque 24 puits contenant préalablement 500  $\mu\text{L}$  de PBS par puits, les inserts coupés en deux sont placés dans chaque puits. Ensuite une saturation est réalisée à l'aide de 500  $\mu\text{L}$  de PBS contenant 3% de BSA (Bovine Sérum Albumine). Le PBS est remplacé par un volume de 150  $\mu\text{L}$  d'anticorps primaire ZO-1 (Fisher Scientifique, Rochestern NY, Etats-Unis) se fixant au niveau des jonctions serrées. La plaque 24 puits est alors incubée pendant 1h30 à température ambiante et sous agitation. Les cellules sont lavées 3 fois avec un volume de 500  $\mu\text{L}$  de PBS contenant

3% de BSA et 20% de TWEEN et avec une incubation de 5 min entre chaque lavage. Ensuite un volume de 150 µL d'anticorps secondaire ALEXA 488 antirabbit (anticorps contenant le fluorophore, Life Technologies, ThermoFisher Scientific, USA) est ajouté dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée 45 min à température ambiante, protégée de la lumière et sous agitation. Les cellules sont de nouveau lavées 3 fois comme précédemment, puis un volume de 150 µL de Dapi (Euromedex, Souffelweyersheim, France) est ajouté et la plaque est de nouveau incubée 10 min à température ambiante. Des lavages sont de nouveau réalisés à la fin de l'incubation avec du PBS contenant la BSA et le Tween puis avec 500 µL de PBS seul et avec de l'eau ultrapure autoclavée. Les inserts sont ensuite placés sur une lame de microscope et une goutte de milieu de montage (Euromedex, Souffelweyersheim, France) est déposée ainsi qu'une lamelle. Après séchage sur la nuit à température ambiante et protégées de la lumière, le contour des lamelles est verni et les lames sont observées à l'aide d'un microscope optique à fluorescence EVOS FL Cell Imaging System (Thermofisher Scientific, Waltham, USA).

### III.2.3. Identification des séquences peptidiques dans les surnageants par spectrométrie de masse

Les surnageants apicaux et basolatéraux à 120 min sont préparés et analysés par spectrométrie de masse de la même façon que les sous-fractions HPLC (cf partie 3.1.6.1 et 3.1.6.2). La colonne UPLC utilisée est une C18-AQ (250x3 mm, particules de 3 µm, Interchim, Montluçon, France) et le gradient apolaire utilisé à un débit de 0.5 mL.min<sup>-1</sup> est le suivant : 5 min à 1% de solvant B, puis un gradient linéaire de 1 à 30% de solvant B de 40 min, suivi d'un gradient linéaire de 30 à 70% de solvant B de 8 min. Après 2 min de lavage de la colonne à 95% de solvant B, la colonne est rééquilibrée à 99% de solvant A pendant 3 min. De même que pour les peptides HPLC, l'ionisation est réalisée par électrospray. Cependant, les mesures MS et MS/MS sont réalisées en analyse donnée dépendante (DDA) dans la gamme de mesure de 30 à 2000 de rapport masse/charge (m/z).

## IV. Etude *in vivo* de l'effet satiétogène d'un hydrolysat protéique

L'objectif de cette étude est de mesurer l'effet satiétogène de l'hydrolysat PWF afin de pouvoir comparer les résultats obtenus au cours de l'étude *in vitro* chez le rat. De plus, cette étude permet d'aller plus loin dans la recherche de bioactivité de l'hydrolysat PWF par la mesure de son effet sur l'homéostasie énergétique en général sur des animaux en bonne santé

et sur des animaux subissant une modification de leur homéostasie énergétique par l'alimentation. Dans une première étude, le potentiel de l'hydrolysat PWF (HP) à réguler la prise alimentaire a été comparé à sa matière première (MP). Dans une seconde étude, ce potentiel de HP a été mesuré dans le cas d'un déséquilibre alimentaire.

#### **IV.1. Matériel**

Les animaux et l'alimentation de maintenance (Teklab2016) proviennent de chez Envigo (Gannat, France). Le régime riche en matières grasses (DIO12451) provient de chez OpenSource Diets (New Brunswick, USA) et la litière Lignocel Selec Fine provient de Safe (Augy, France). L'inhibiteur de l'enzyme DPP-IV, les kits RIA pour doser l'insuline plasmatique et les kits Luminex pour doser les hormones plasmatiques circulantes proviennent de chez Millipore (Saint Quentin en Yvelines, France). Les kits pour doser les hormones CCK proviennent de chez Euro Diagnostica (Malmö, Suède).

#### **IV.2. Animaux et groupes expérimentaux**

L'expérimentation a été réalisée sur 32 rats mâles Wistar (Envigo, Gannat, France), pesant  $277 \pm 31$  g (7-8 semaines) à l'arrivée à l'animalerie. A la réception, les rats ont été placés individuellement dans des cages transparentes en polysulfone (type III H, 425x265x180, SERLAB, Montataire, France). Les animaux ont ensuite été introduits dans une pièce climatisée, à une température de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  et une humidité relative de  $50 \pm 20\%$ . Les rats ont disposé de la nourriture *ad libitum* (**Tableau 8**) ainsi que de l'eau de boisson et ont été maintenus dans un cycle lumière-obscureté 12h-12h (lumière de 5h30-17h30). Après cinq jours d'acclimatation aux conditions du laboratoire, les rats ont été répartis en quatre groupes de traitement ( $n = 8$  / groupe) sur la base de leur poids.

L'animalerie possède l'autorisation du Ministère de l'Agriculture et de la Recherche (Agrément No. 5900912). L'ensemble des procédures qui ont été utilisées dans cette étude était conforme à la Directive 2010/63/UE du Parlement Européen. Le protocole d'étude a été soumis au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche conformément à l'Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation de projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales.

**Tableau 8.** Caractéristiques énergétiques des aliments utilisés au cours des deux phases d'expérimentation.

Apports	Teklad 2016 standard	DIO D12451
Calories par les protéines	22%	20%
Calories par la matière grasse	12%	45%
Calorie par les glucides	66%	35%
Apport énergétique	3000 kcal.kg <sup>-1</sup>	4057 kcal.kg <sup>-1</sup>

### IV.3. Evaluation des effets des solutions testées sur la prise alimentaire et sur la prise de poids des rats

#### IV.3.1. Première phase d'expérimentation

L'objectif de la première phase d'expérimentation est de mesurer le potentiel de l'hydrolysat PWF sur la régulation de l'homéostasie énergétique des animaux en croissance et en bonne santé. Pour cela, l'effet de l'hydrolysat a été comparé à celui induit par sa matière première.

##### IV.3.1.1. *Protocole expérimental*

La première phase d'expérimentation s'est déroulée pendant 27 jours consécutifs (**Figure 31**). A la suite d'une période d'acclimatation des rats à leur nouvel environnement, ils ont été divisés en quatre groupes de 8 rats (Contrôle, HP250, HP500 et MP500) en fonction de leur poids.

**Figure 31.** Schéma du protocole expérimental de la première phase d'expérimentation.

Les animaux ont un accès *ad libitum*, à l'eau et à l'aliment standard (Teklad 2016, cf. **Tableau 8**). Les animaux ont été gavés, avec 1 mL de solution, une fois par jour à heure fixe (15h30) (**Tableau 9**). La solution a été administrée à l'aide d'une seringue connectée à une sonde de gavage oro-gastrique.

**Tableau 9.** Administration des traitements.

Groupes	Nombre de rats	Traitement	Dose
Contrôle	8	Eau	1 mL
HP250	8	Hydrolysats de tilapia (HP)	1 mL à 250 mg.mL <sup>-1</sup>
HP500	8	Hydrolysats de tilapia (HP)	1 mL à 500 mg.mL <sup>-1</sup>
MP500	8	Matière première non hydrolysée de HP	1 mL à 500 mg.mL <sup>-1</sup>

#### IV.3.1.2. Consommation et prise de poids

La consommation des animaux a été mesurée de façon quotidienne par la pesée des croquettes au moment de l'administration de leur traitement habituel. Le suivi du poids a été réalisé par la pesée de chaque animal une fois par semaine, le premier jour de la semaine.

A la fin de cette première phase expérimentale, les animaux n'ont plus reçu de gavage oro-gastrique pendant une période de 9 jours.

#### IV.3.2. Deuxième phase de l'expérimentation

L'objectif de cette deuxième phase est de mesurer le potentiel de l'hydrolysats PWF sur des animaux subissant un dérèglement de leur métabolisme énergétique occasionné par une alimentation riche en matières grasses.

##### IV.3.2.1. Protocole expérimental

La deuxième phase d'expérimentation s'est déroulée pendant 50 jours consécutifs (**Figure 32**). A la fin de la période de 9 jours sans gavage, les animaux ont été pesés et divisés en quatre groupes de 8 rats (Ctrl, Ctrl HF, HP250 et HP500) en fonction de leur poids.

**Figure 32.** Schéma du protocole expérimental de la deuxième phase d'expérimentation.

Les animaux ont été gavés, avec 1 mL de solution, une fois par jour à heure fixe (15h30) (**Tableau 10**). La solution a été administrée à l'aide d'une seringue connectée à une sonde de gavage oro-gastrique.

**Tableau 10.** Administration des traitements.

Groupes	Nombre de rats	Traitement	Dose
Contrôle Standard	8	Eau	1 mL
Contrôle High Fat	8	Eau	1 mL
HP250	8	Hydrolysate de tilapia (HP)	1 mL à 250 mg.mL <sup>-1</sup>
HP500	8	Hydrolysate de tilapia (HP)	1 mL à 500 mg.mL <sup>-1</sup>

#### IV.3.2.2. Consommation et prise de poids

Les animaux ont un accès *ad libitum*, à l'eau et à l'aliment standard (Teklad 2016, cf. **Tableau 8**) pour le groupe contrôle ou à l'aliment riche en matières grasses (45%) pour les groupes contrôle HF, HP250 et HP500 (DIO D12451, cf. **Tableau 8**). Le suivi du poids au cours de la 2<sup>e</sup> phase d'expérimentation a été réalisé par pesée de chaque animal une fois par semaine, le premier jour de la semaine comme en première phase d'expérimentation. Contrairement à la première phase, la consommation a été suivie par la pesée de l'alimentation deux fois par jour (pesée après 12h jour + 2h nuit pour la période jour et 10h pour la période nuit). Ceci permet de mesurer l'effet à court terme de l'hydrolysate PWF sur la prise alimentaire.

#### IV.3.2.3. Points limites de l'expérimentation animale

Que ce soit au cours de la première ou de la deuxième phase d'expérimentation, le souci du bien-être animal a été primordial au cours de cette étude. Toute souffrance animale a été évitée par une surveillance constante de l'état des animaux via leur comportement et leur état physique, selon les critères établis par Morton et Griffiths (Morton and Griffiths 1985).

Un autre point limite a été mis en place pour la deuxième phase d'expérimentation. En effet, les rats ont été sous régime riche en matières grasses afin de déséquilibrer leur métabolisme énergétique. Afin d'éviter toute souffrance induite par le régime alimentaire, les rats qui auraient développé une obésité avérée et un trouble du métabolisme tel que du diabète de type 2 auraient été éliminés de l'étude, ce qui n'a pas été le cas. Pour cela, des tests de tolérance au glucose ont été réalisés au cours de la deuxième phase d'expérimentation.

#### IV.3.2.4. Protocole de l'OGTT

Afin de s'assurer que les animaux ne développent pas de trouble du métabolisme et notamment du diabète de type 2 induit par le régime riche en matières grasses, différents tests de tolérance au glucose (OGTT) ont été réalisés. Le premier test a été réalisé avant le début de la deuxième phase d'expérimentation, puis après 44 jours de régimes (**Figure 32**). Les rats ont

d'abord été mis à jeun pendant la nuit, puis 100 µL de sang ont été prélevés (sang à jeun = T0) au niveau de la veine caudale afin de mesurer le niveau basal d'insuline plasmatique et une goutte est déposée sur un glucomètre Accu Chek Performa (Pharmacie Roussel, Lille, France) pour mesurer la glycémie sanguine. A la suite de ce prélèvement, les animaux reçoivent une solution de glucose par voie orale à une dose de 0,4 mL/100 g de poids corporel. Le sang est ensuite collecté à 30, 60 et 120 min après l'administration de la charge de glucose. Chaque prélèvement est mis dans des tubes contenant 5% (vol/vol) d'Acide EthyleneDiamineTetraacétique (EDTA). Puis les tubes sont centrifugés à 12 000  $xg$  pendant 10 min à 4°C et le plasma est récupéré et conservé à -80°C jusqu'au dosage. Le glucose sanguin est mesuré en utilisant un glucomètre et la concentration plasmatique en insuline est mesurée en utilisant le kit RI-13K (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France).

A partir des concentrations en glucose sanguin et en insuline plasmatique à jeun, l'état physiologique a été estimé en fonction de deux scores permettant de déterminer l'insulino-résistance (HOMA-IR) et le dysfonctionnement des cellules  $\beta$ -pancréatiques (HOMA- $\beta$ ). Les scores HOMA (ou Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance) sont calculés selon les formules suivantes :

$$HOMA - IR = \frac{[Insuline \text{ à jeun}] \times [Glucose \text{ à jeun}]}{22,5}$$

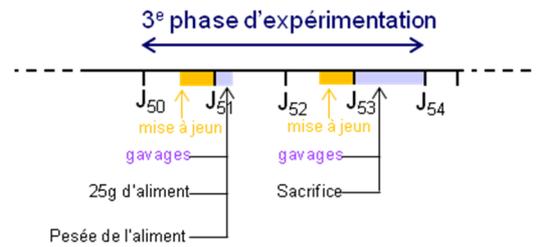
$$HOMA - \beta = \frac{20 \times [Insuline \text{ à jeun}]}{[Glucose \text{ à jeun}] - 3,5}$$

Avec la concentration en insuline circulante exprimée en UI.mL<sup>-1</sup> et la concentration du glucose exprimée en mmol.mL<sup>-1</sup>.

#### IV.3.3. Troisième phase de l'expérimentation

Le premier objectif de la troisième phase est de mesurer l'effet de l'hydrolysate sur la régulation de l'homéostasie énergétique à court terme par la mesure de la prise alimentaire après un gavage suivant une période de mise à jeun et par le dosage des différentes hormones en lien avec la régulation de l'homéostasie énergétique. Le deuxième objectif est de mesurer l'effet à long terme de l'hydrolysate PWF par la mesure de l'expression des gènes de certains marqueurs de l'homéostasie.

Le schéma suivant décrit le protocole expérimental de la troisième phase (**Figure 33**) :



**Figure 33.** Schéma du protocole expérimental de la troisième phase d'expérimentation.

Pendant la dernière semaine d'expérimentation, l'effet de HP a été mesuré sur la reprise alimentaire (jour J<sub>51</sub>). Pour cela, les rats ont été mis à jeun pendant la nuit, puis gavés avec 1 mL des solutions habituelles (eau, HP250 ou HP500). 30 minutes après le gavage, environ 25 g de nourriture ont été mis à disposition et la consommation a été suivie par pesée après 30 min, 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 et 6 h. Le lendemain, les animaux sont de nouveau mis à jeun pendant la nuit, puis gavés avec 1 mL des solutions habituelles (eau, HP250 ou HP500). 30 minutes après le gavage, les animaux sont sacrifiés par décapitation. Le sang et différents organes sont récoltés pour différentes analyses (régulation des hormones intestinales, activité plasmatique de l'enzyme DPP-IV, expression de différents gènes...). Comme décrit précédemment, le sang est récolté dans des tubes contenant 5% d'ETDA et 10  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  d'inhibiteur de DPP-IV (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). Puis les tubes sont centrifugés et le plasma est congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à analyse. L'estomac et le foie ont été congelés directement dans de l'azote liquide avant d'être conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les autres tissus (hypothalamus, duodénum, jéjunum, iléon, tissu adipeux) ont été placés dans des tubes contenant du RNA later tissue protect (QIAGEN, Courtaboeuf, France).

#### **IV.4. Potentiel de l'hydrolysate dans la modulation de certaines hormones impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique**

##### **IV.4.1. Dosage des CCK plasmatiques**

Afin de pouvoir doser le niveau de CCK circulant, une étape d'extraction est réalisée. L'extraction a été réalisée en suivant les recommandations du kit de dosage et de l'équipe de Iwai (Iwai et al. 1986). Un volume de 3 mL d'éthanol à 96 % a été ajouté à 2 mL de plasma, puis les tubes ont été vortexés et incubés 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Ensuite, les tubes ont été centrifugés à 2 200 g pendant 30 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant de chaque tube, contenant les CCK, est séché en utilisant un speed vac (Mivac) à  $37^{\circ}\text{C}$ . Chaque culot est ensuite dissout avec 1 mL de réactif D fournis dans le kit, puis vortexé et incubé pendant 30 min sur glace avant de doser les CCK

à l'aide du kit EURIA-CCK (Euro-Diagnostica, Suède). La détermination de la concentration circulante de CCK est réalisée selon le même principe que celui décrit dans la partie 3.1.5.2.

#### IV.4.2. Dosage des autres hormones circulantes

Les niveaux circulants des hormones (GLP-1, GIP, Insuline, Glucagon, Ghréline et Leptine) ont été mesurés en utilisant la technologie du Luminex. Le kit utilisé est le kit métabolique du rat (Rat Metabolic Magnetic, Bead Panel, ref : RMHMAG-84K, Merck, USA). Après une incubation de 10 min à température ambiante et sous agitation de la plaque 96 puits avec 200  $\mu$ L de tampon, le tampon de chaque puits est retiré et un volume de 25  $\mu$ L de plasma ou de standard est ajouté dans chaque puits. Puis un volume de 25  $\mu$ L de tampon est ajouté dans les puits contrôle et dans les puits contenant le plasma ou 25  $\mu$ L de matrice (permettant de simuler le plasma) sont ajoutés dans les puits de la gamme. Enfin 25  $\mu$ L de billes, greffées avec les anticorps de GLP-1, GIP, Insuline, Glucagon, Ghréline et Leptine, sont ajoutés dans chaque puits. Et la plaque est incubée sur la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, la plaque est posée sur une plaque magnétique pour fixer les billes magnétiques au fond de la plaque et le surnageant de chaque puits est jeté. La plaque est lavée trois fois avec du tampon de lavage et en utilisant la plaque magnétique pour retenir les billes entre chaque lavage. Après le lavage des puits, un volume de 50  $\mu$ L d'anticorps est ajouté par puits et la plaque est incubée sous agitation 30 min à température ambiante. A la fin de l'incubation, 50  $\mu$ L de solution de streptavidin-Phycoerythrin sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est de nouveau incubée sous agitation 30 min à température ambiante. Les étapes de lavage sont répétées et 100  $\mu$ L de Sheath Fluid sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est incubée 5 min sous agitation avant la lecture par le Luminex 200 (Merck, USA).

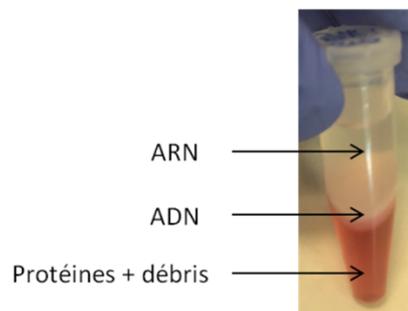
#### IV.4.3. Mesure de l'activité de la DPP-IV plasmatique

L'activité de la DPP-IV plasmatique a été mesurée avec le test biochimique d'inhibition pour mesurer l'inhibition de l'activité DPP-IV (voir partie 3.2.1.1). Cependant, 15  $\mu$ L de plasma contenant la DPP-IV sont ajoutés à la plaque à la place de l'enzyme purifiée et 25  $\mu$ L de tampon Tris/HCl (100 mM, pH 8) sont ajoutés à la place des échantillons. Un contrôle positif (enzyme purifiée) et des puits couleurs sont réalisés comme dans la partie 3.2.1.1.

## IV.5. Etude de la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique

### IV.5.1. Extraction et rétro-transcription des ARN

Avant l'extraction de l'ARN, l'estomac a été poudré à l'aide d'un mortier et d'azote. Une quantité de 100 mg de poudre d'estomac a été pesée dans des tubes, puis 1 mL de Qiazol (QIAGEN, Courtaboeuf, France) a été ajouté avant broyage à l'aide d'un Tissue Ruptor (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Pour les autres tissus (duodénum, jéjunum, iléon), un morceau a été prélevé, déposé et broyé dans un nouveau tube contenant 1 mL de Qiazol. L'hypothalamus a été broyé entièrement dans 1 mL de Qiazol. L'extraction des ARN à partir des cellules Caco-2 et STC-1 a été réalisée par la méthode d'extraction au chloroforme/isopropanol. Un volume de 200  $\mu$ L de chloroforme a été ajouté dans chaque tube. Après avoir été vortexé pendant 15 sec, et incubés 2-3 min sur glace les tubes sont centrifugés 15 min à 3 934  $xg$  à 4°C. Le surnageant contenant les ARN (**Figure 34**) de chaque tube est prélevé et mis dans de nouveaux tubes.



**Figure 34.** Identification des différentes phases à la suite de l'extraction d'ARN au chloroforme.

Un volume de 500  $\mu$ L d'isopropanol est ensuite ajouté dans chaque tube. Les tubes sont vortexés et incubés sur la nuit à -20°C. Le lendemain, les tubes sont centrifugés 20 min à 3 934  $xg$  à 4°C. Le culot d'ARN est lavé deux fois par centrifugation 10 min à 3 934  $xg$  à 4°C avec 1 mL d'éthanol 70%. Après séchage du culot 1h à température ambiante les ARN purifiés sont solubilisés dans 11  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O RNase et DNase free. La concentration et la pureté de chaque échantillon sont évaluées par la mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Darmstadt, Allemagne). Une quantité de 1  $\mu$ g d'ARN a été rétro-transcrit en ADN complémentaire en utilisant le kit *RevertAid H Minus First Strand* cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Darmstadt, Allemagne) selon les instructions du fabricant.

IV.5.2. PCR quantitative en temps réel (rt-qPCR)

L'objectif de cette expérience est de mesurer les niveaux relatifs de transcription par RT-qPCR des gènes. Pour cela, les ADN complémentaires transcrits (voir partie IV.5.1) sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel. Un volume de 2  $\mu\text{L}$ /puits d'ADN complémentaire est ajouté dans une plaque 96 puits opaque blanche (4titude, Dutscher, Issy-les-Moulineaux, France) et 18  $\mu\text{L}$  d'un mélange constitué de 10  $\mu\text{L}$  de Master Mix SYBR Green Brilliant III Ultra-Fast (Agilent Technologies, Les Ulis, France), 6  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  DNase et RNase free, 1  $\mu\text{L}$  d'amorce sens et 1  $\mu\text{L}$  d'amorce antisens. Les niveaux relatifs de transcription des gènes codant pour les CCK, le proglucagon, la DPP-IV, la ghréline, PYY, GIP, la leptine, et les neurotransmetteurs (CART, POMC, NPY, AgRP) ainsi que les gènes de référence GAPDH sont analysés par PCR quantitative en temps réel. Le tableau ci-dessous (**Tableau 11**) indique les séquences des amorces utilisées pour standardiser les niveaux relatifs d'expression.

**Tableau 11.** Séquences des amorces utilisées pour la quantification de l'expression des gènes cibles.

Gènes cibles	Amorce sens	Amorce antisens
GAPDH	GGCTCTCTGCTCCTCCCT	GGTAACCAGGCGTCCGATAC
CCK	GCACTGCTAGCCCGATACAT	CCGAAATCCATCCAGCCCAT
Proglucagon	GGAGACAGACTCTGAGGGGC	GAAGGAACCGTTACAGGCCA
DPP-IV	GCTGGTCATATGGAGGGTACG	TGGAGTTGGGAGACCCATGTA
PYY	GAGCCGCTACTATGCTTCCC	CACCTTCTGGCCGAGACCTG
GIP	TAAGAAGAGCTGTTGGCTCGG	CATGGGATCGGAACTCAACCT
Ghrélin	TTGGCATCAAGCTGTCAGGA	TTGTTAGCTGGCGCCTCTTT
Leptine	TCACACACGCAGTCGGTATC	GCAAGCTGGTGAGGATCTGT
CART	GCGCTGTGTTGCAGATTGAA	CGTCACACATGGGGACTTGG
POMC	ATAACGGGAGGCGACGGAG	CTGAGGCTCTGTCCGGGAA
NPY	TGGCCAGATACTACTCCGCT	TTCAAGCCTTGTCTGGGGG
AgRP	AGAGTTCTCAGGTCTAAGTCT	CTTGAAGAAGCGGCAGTAGCACGT

La réaction PCR est conduite dans un thermocycler (CFX Connect, BIO-RAD, Marnes-la-Coquette, France). Après une première dénaturation à 95°C pendant 3 min, un cycle constitué d'une phase de dénaturation à 95°C pendant 15 sec, d'une phase d'hybridation à 60°C pendant 30 sec et d'une phase d'élongation à 72°C pendant 30 sec est répété 40 fois. La réaction PCR s'achève par la réalisation de courbes de fusion (95°C pendant 10 sec, 65°C pendant 0,5 sec et 95°C pendant 5 sec). Chaque couple d'amorce a d'abord été validé par la mesure de l'efficacité. Pour cela, un volume de 2  $\mu\text{L}$  d'ADN complémentaires de chaque condition a été mélangé dans un tube et dilué cinq fois. Puis des dilutions en série au 1/5 ont été réalisées (allant de 1/5 à 1/3125). La réaction de PCR est la même que celui cité ci-dessus.

Le niveau relatif d'ARN est calculé selon la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001) avec :

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ échantillon} - Ct \text{ référence}) - \text{moyenne}(Ct \text{ échantillon} - Ct \text{ référence})[\text{contrôle}]$$

Avec Ct échantillon représentant le nombre de cycles seuils du gène ciblé en présence de l'échantillon testé, Ct référence représentant le nombre de cycles seuil du gène de référence et Ct contrôle représentant le nombre de cycles seuils du gène ciblé en présence de la condition contrôle.

## V. Traitement statistique des données

Les analyses de variance (ANOVA) ainsi que les tests posthoc (Tuckey) ont été réalisés pour chacun des résultats des analyses *in vitro* ainsi que pour le dosage des hormones plasmatiques de l'étude rat. Les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel GraphPad. 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.

Les résultats de l'étude *in vivo* ont été traités par deux analyses statistiques. Lors des deux phases d'expérimentation la prise alimentaire (kcal), et le poids (g) ont été étudiés. De plus lors de la 2<sup>ème</sup> phase le détail des prises alimentaires Jour et Nuit a été également étudié. Chaque critère a été analysé par un modèle mixte prenant en compte la corrélation entre des mesures répétées chez un même rat (effet aléatoire Rat avec une matrice de variance covariance non structurée). Les valeurs de poids à baseline (J1) sont incluses dans le modèle, ainsi que les effets fixes : groupe, moment et l'interaction groupe X moment. Pour la prise alimentaire des modèles mixtes complémentaires ont été effectués par semaine, avec le rat en effet aléatoire, le poids (g) en début de semaine en covariable quantitative ainsi que le groupe en effet fixe qualitatif. Les modèles mixtes fournissent les estimations des moyennes des moindres carrés par groupe ainsi que les différences de ces estimations 2 à 2 avec leurs erreurs types, les statistiques du test de Student, leurs intervalles de confiance à 95% ainsi que la *p value* du test associé.

Les résultats sur les hormones plasmatiques, sur l'expression des gènes ainsi que les résultats des OGTT ont été analysés par des analyses de variance (ANOVA) ainsi que les tests posthoc (Dunnett).

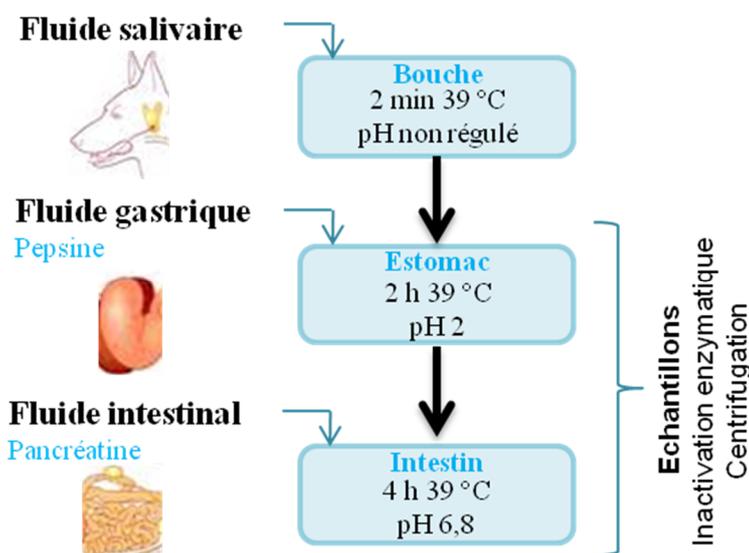
# Résultats

---

## I. Digestion gastro-intestinale simulée *in vitro* des hydrolysats protéiques et de leurs matières premières

### I.1. Introduction

Dans cette première partie de l'étude, une digestion GI des protéines *in vitro* a été adaptée au chien afin de reproduire l'action des enzymes gastro-intestinales sur les hydrolysats et leurs matières premières. La mise au point du modèle de digestion a été décrite dans le chapitre Matériels et Méthodes (partie II.2). La digestion GI simule les trois grandes étapes de la digestion protéique du tractus GI du chien, c'est-à-dire la bouche, l'estomac et l'intestin (*Figure 35*).



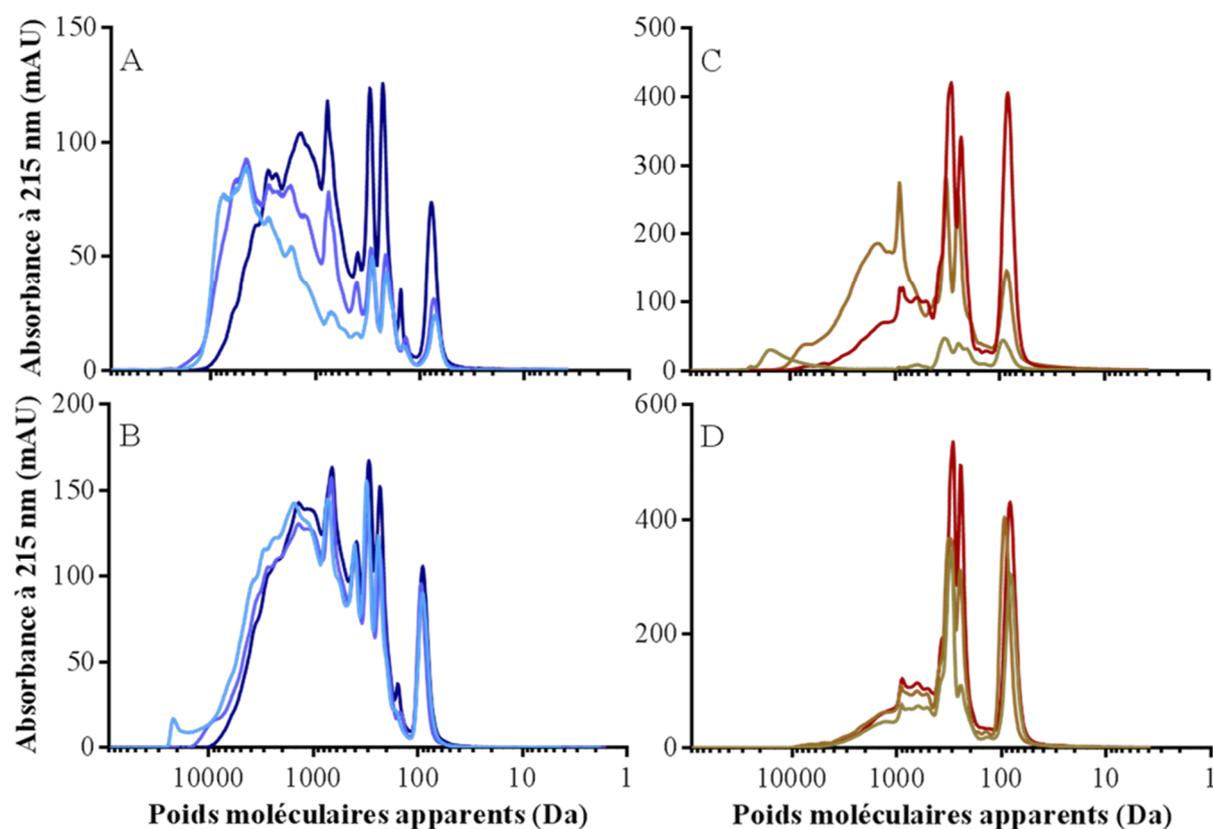
*Figure 35. Modèle de digestion statique in vitro.*

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. Il a été préalablement démontré au laboratoire que la présence ou l'absence de bile ne modifiait pas les résultats obtenus dans le cas de la digestion de protéines.

Grâce à une analyse par chromatographie d'exclusion stérique les peptidomes gastriques et intestinaux des hydrolysats (PWF et XVP 15035) et de leurs matières premières (MP-PWF et MP-XVP 15035) ont été caractérisés sur la base de la répartition de la population peptidique en fonction du poids moléculaire apparent.

## I.2. Evolution de la population peptidique au cours de la digestion

La modification de la population peptidique pour les hydrolysats et leurs matières premières au cours de la digestion GI est représentée par les profils de poids moléculaires apparents (**Figure 36**). Afin de préciser ce qui est observé à partir des chromatogrammes, des classes de tailles ont été définies ( $> 10$  ;  $10 - 1$ ,  $1 - 0,5$  ;  $0,5 - 0,2$  ;  $< 0,2$  kDa) et le pourcentage de la population peptidique de chaque gamme de poids moléculaire apparent (par rapport à la population totale) a été déterminé par l'intégration de l'aire sous la courbe (**Tableau 12**).



**Figure 36.** Profils SEC de la population peptidique au cours de la digestion GI des hydrolysats et de leurs matières premières.

La séparation de la population peptidique au cours de la digestion de MP-PWF (A), de PWF (B), de MP-XVP 15035 (C) et de XVP 15035 (D) a été réalisée avec une colonne Superdex Peptides 10/300 GL en appliquant une élution isocratique d'un mélange 30% ACN, 70% H<sub>2</sub>O ultrapure et 0,1% TFA pendant 70 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 Logarithme du poids moléculaire des standards et leur volume d'élution a été utilisée pour calculer le poids moléculaire apparent. Trait bleu clair et marron clair : bouche ; Trait violet et marron foncé : digestat gastrique ; Trait bleu foncé et rouge : digestat intestinal.

Les profils peptidiques obtenus pour les deux hydrolysats et leurs matières premières couvrent une large gamme de poids moléculaire comprise entre 10 et 20000 Da. L'action des enzymes gastro-intestinales induit une plus forte modification de la population peptidique des deux

matières premières MP-PWF (*Figure 36A*) et MP-XVP 15035 (*Figure 36C*) par rapport aux profils peptidiques observés pour leur hydrolysats. L'intensité du profil peptidique de MP-XVP 15035 de la bouche est faible car la matière première n'est pas totalement soluble. Les profils peptidiques de MP-PWF et de MP-XVP 15035 se décalent, au cours de la digestion GI, sur la droite du chromatogramme illustrant la diminution de la proportion de peptides de haut poids moléculaire apparent et l'augmentation de celle de plus faible poids moléculaire apparent. Ainsi, logiquement la proportion de la population peptidique de poids moléculaire apparent inférieur à 1000 Da, augmente de la bouche à l'estomac et de l'estomac à l'intestin passant de 7,8 à 19,5% pour MP-PWF et de 5 à 15,2% pour MP-XVP 15035.

L'action des enzymes gastro-intestinales sur les hydrolysats PWF et surtout XVP 15035 est moins importante que sur leur matière première respective. Ces résultats sont attendus car les hydrolysats ont déjà subi une hydrolyse par un processus industriel. Pour l'hydrolysats PWF (*Figure 36B*), les résultats obtenus montrent que les protéines et polypeptides (> 10 kDa) présents dans l'hydrolysats de départ (bouche), représentant 2,2% de la population totale, sont partiellement dégradés par la pepsine dans le compartiment gastrique, représentant alors 1,6% de la population totale, pour totalement disparaître dans le compartiment intestinal sous l'action de la pancréatine. La proportion de la population peptidique caractérisée par un poids moléculaire apparent supérieure à 2 kDa diminue au cours du processus de digestion au profit de l'augmentation de la proportion de la population peptidique caractérisée par un poids moléculaire apparent inférieur à 2 kDa.

**Tableau 12.** Répartition par classe de taille de la population peptidique des deux hydrolysats et de leurs matières premières en fonction des compartiments du tractus GI.

Les valeurs sont exprimées en pourcentage de l'aire totale du chromatogramme.

kDa	MP-PWF			PWF		
	Bouche (%)	Estomac (%)	Intestin (%)	Bouche (%)	Estomac (%)	Intestin (%)
> 10	2,3	2,1	0,0	2,2	1,6	0,0
10 - 1	70,5	64,6	48,0	49,3	49,3	45,4
1 - 0,5	7,8	14,2	19,5	19,0	20,3	21,7
0,5 - 0,2	11,6	12,2	21,4	21,0	20,0	23,5
< 0,2	7,4	6,8	10,7	8,2	7,5	8,5
kDa	MP-XVP 15035			XVP 15035		
	Bouche (%)	Estomac (%)	Intestin (%)	Bouche (%)	Estomac (%)	Intestin (%)
> 10	21,4	0,5	0,0	0,1	0,1	0,0
10 - 1	13,7	41,9	13,9	13,5	14,1	10,1
1 - 0,5	5,0	18,7	15,2	15,4	15,4	14,5
0,5 - 0,2	31,3	24,6	41,3	37,8	40,9	45,2
< 0,2	27,2	13,9	29,4	32,4	29,2	29,5

Concernant l'hydrolysate XVP 15035 (*Figure 36D*), le chromatogramme obtenu pour le compartiment buccal confirme l'hydrolyse plus avancée de cet hydrolysate, la digestion modifie donc peu sa population peptidique (en terme de poids moléculaire apparent). En revanche, les pourcentages d'aire sous la courbe montrent des variations importantes, du compartiment gastrique au compartiment intestinal, pour les peptides de poids moléculaire apparent compris entre 1 et 10 kDa dont la proportion passe de 14,1 à 10,1% ainsi que pour ceux dont le poids moléculaire apparent est compris entre 0,5 et 0,2 kDa qui passe de 40,9% dans le compartiment gastrique à 45,2% dans le compartiment intestinal.

## **II. Mise en évidence des groupes peptidiques, issus de la digestion GI des hydrolysats protéiques, impliqués dans les activités biologiques en rapport avec l'homéostasie énergétique**

### **II.1. Introduction**

Les protéines alimentaires sont bien connues pour leur rôle nutritionnel et leur digestion permet la libération de nombreux peptides pouvant interagir avec l'environnement GI et exercer différents effets biologiques. L'action des enzymes gastro-intestinales sur la capacité des hydrolysats et de leurs matières premières à moduler la sécrétion des hormones intestinales (CCK et du GLP-1) ou à inhiber l'activité de la DPP-IV a été investiguée. Un fractionnement, par deux méthodes chromatographiques successives, a été réalisé sur les digestats intestinaux afin d'identifier les séquences peptidiques contenues dans les fractions les plus actives par spectrométrie de masse.

### **II.2. Caractérisation des activités biologiques des digestats des hydrolysats protéiques et de leurs matières premières**

#### **II.2.1. Effet des hydrolysats protéiques sur la viabilité des cellules**

Les cellules Caco-2 et STC-1 ont été incubées pendant 18h avec 1% d'hydrolysats PWF ou XVP 15035 avant digestion (bouche) et en fin de digestion (intestin) afin de mesurer l'effet de ces hydrolysats sur la viabilité des cellules. Les pourcentages de viabilité cellulaire sont présentés dans le tableau suivant (*Tableau 13*).

**Tableau 13.** Pourcentage de viabilité des cellules Caco-2 et des cellules STC-1.

L'effet des hydrolysats protéiques en phase buccale et intestinale sur la viabilité des cellules Caco-2 et STC-1 ont été mesurés à 1% final (pds/vol). Les moyennes (n=4) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

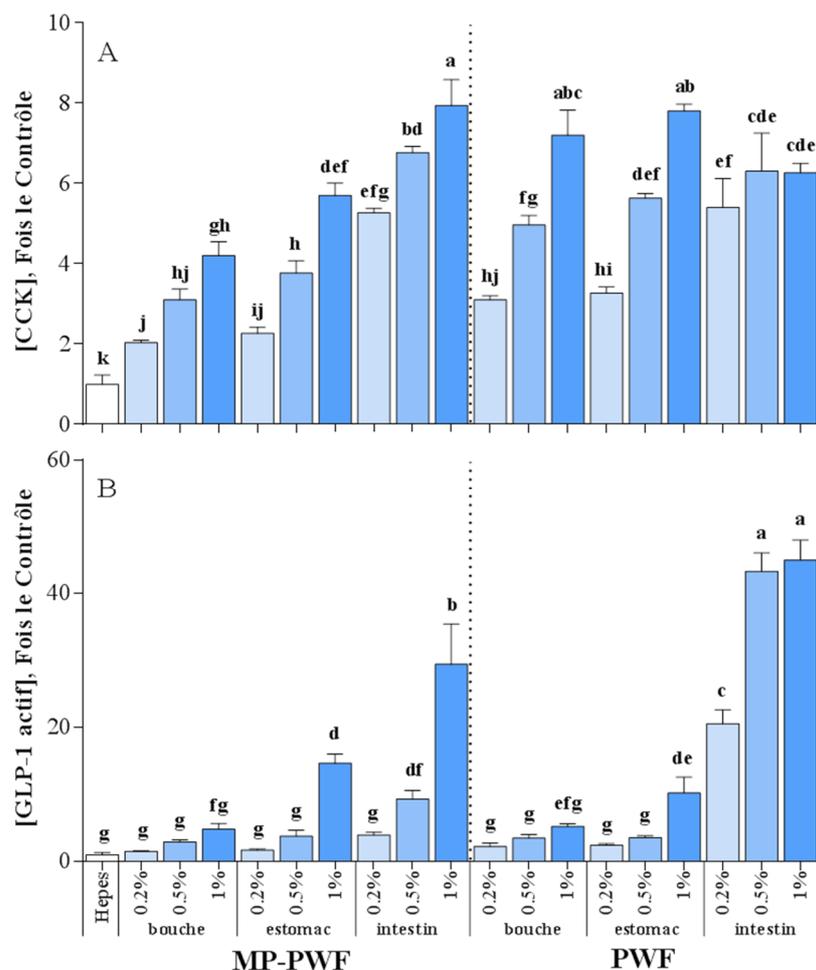
	PWF		XVP 15035	
	Bouche (%, du contrôle)	Intestin (%, du contrôle)	Bouche (%, du contrôle)	Intestin (%, du contrôle)
Cellules Caco-2	112,8 ± 5,6 <sup>A</sup>	109,5 ± 1,2 <sup>A</sup>	110,1 ± 6,2 <sup>A</sup>	107,2 ± 12,3 <sup>A</sup>
Cellules STC-1	102,5 ± 6,4 <sup>AB</sup>	111,5 ± 3,2 <sup>A</sup>	112,1 ± 5,5 <sup>A</sup>	84,1 ± 11,1 <sup>B</sup>

Les résultats obtenus indiquent que l'hydrolysate PWF avant et après digestion n'induit pas de toxicité sur les cellules Caco-2 et STC-1 et permet une augmentation de la croissance cellulaire.

Pour l'hydrolysate XVP 15035, les résultats obtenus ne montrent pas d'effet cytotoxique sur les deux lignées cellulaires par rapport au contrôle ( $100 \pm 8,18\%$  pour la lignée Caco-2 et  $100 \pm 5,03\%$  pour la lignée STC-1) et montrent un effet stimulant de cet hydrolysate, avant et après digestion GI, sur la croissance de cellules Caco-2 et avant digestion pour les cellules STC-1. Le digestat intestinal de XVP 15035 induit un effet cytotoxique en comparaison de XVP 15035 avant action des enzymes gastro-intestinales.

#### II.2.2. Effet des digestats sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) par les cellules STC-1

Les cellules STC-1 ont été incubées deux heures avec chaque prélèvement réalisé au cours de la digestion (bouche, estomac, intestin) des hydrolysats PWF et XVP 15035 ainsi que de leurs matières premières. Les concentrations de CCK et de GLP-1 mesurées par dosage radioimmunologique dans les surnageants sont représentées dans la **Figure 37** pour l'hydrolysate PWF et dans la **Figure 38** pour l'hydrolysate XVP 15035.



**Figure 37.** Effet des échantillons bouche et des digestats gastriques et intestinaux sur la sécrétion des hormones CCK et GLP-1 par les cellules STC-1.

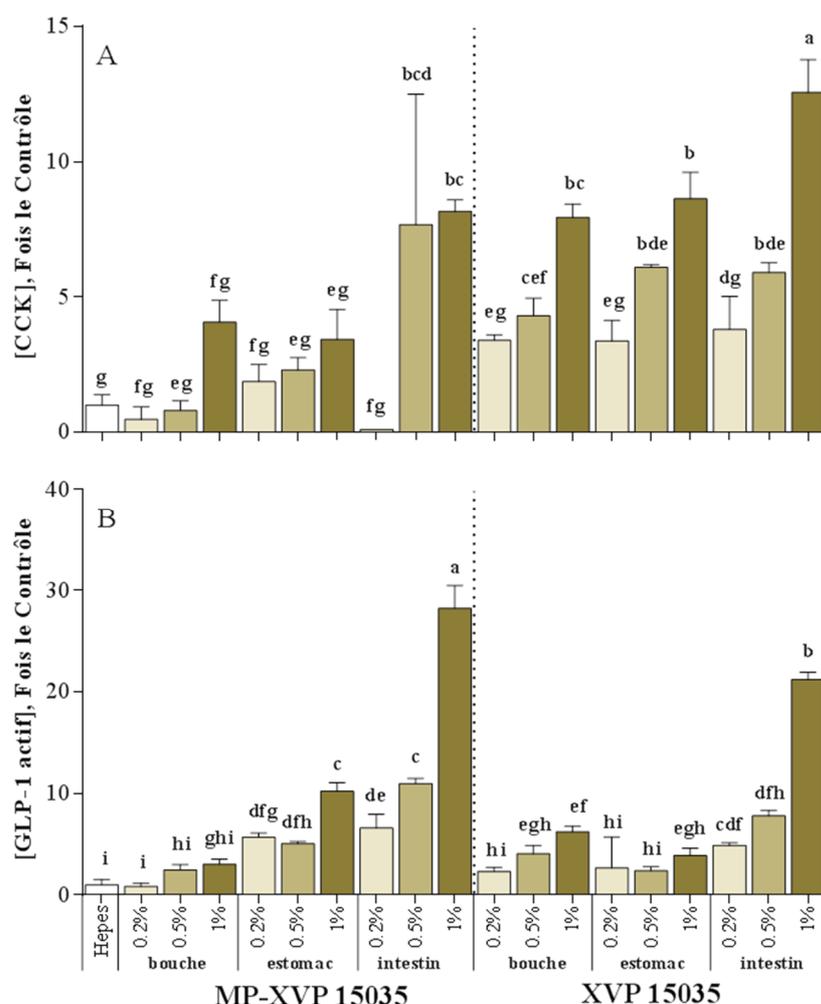
La stimulation de la sécrétion des hormones CCK (A) et du GLP-1 actif (B) induite par l'hydrolysat PWF et sa matière première a été mesurée par un dosage radio-immunologique. Le contrôle (représentant le niveau basal de sécrétion des hormones intestinales) est composé d'un tampon Hepes à pH 7,4. Les différents échantillons ont été incubés à 0,2 ; 0,5 et 1% (poids sec/volume) pendant 2h. Les moyennes (n = 3) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tuckey ( $p < 0,05$ ).

Les concentrations de CCK mesurées dans les surnageants après contact des cellules avec l'hydrolysat PWF et sa matière première (**Figure 37A**) mettent en évidence une augmentation dose-dépendante (excepté pour le digestat intestinal de PWF) de la sécrétion au cours de la digestion GI. Ainsi, pour MP-PWF les concentrations de CCK obtenues passent de  $4,20 \pm 0,35$  à  $7,93 \pm 0,65$  fois le contrôle pour l'échantillon bouche et le digestat intestinal (1% poids sec/vol). Concernant l'hydrolysat PWF (1% poids sec/vol), la concentration de CCK augmente très faiblement entre l'échantillon bouche et le digestat gastrique passant de  $7,20 \pm 0,62$  à  $7,80 \pm 0,17$  fois le contrôle puis diminue significativement pour le digestat intestinal ( $6,27 \pm 0,23$  fois le contrôle).

De manière remarquable, le digestat intestinal de PWF et celui de sa matière première (MP-PWF) ont le même effet sur la stimulation de la sécrétion de CCK.

De même que pour la sécrétion de CCK, la sécrétion de GLP-1 augmente tout au long de la digestion GI, de façon dose dépendante, à la suite du contact de PWF et de sa matière première avec les cellules STC-1 (**Figure 37B**). Pour cette activité, l'action des enzymes GI potentialise clairement la stimulation de la sécrétion de GLP-1 que ce soit pour les digestats de PWF ou de sa matière première. En effet, pour MP-PWF à la dose de 1% (poids sec/vol), les concentrations de GLP-1 mesurées passent de  $4,80 \pm 0,87$  fois le contrôle pour l'échantillon bouche à  $14,67 \pm 1,33$  fois le contrôle pour le digestat gastrique et à  $29,40 \pm 6,00$  fois le contrôle pour le digestat intestinal. Pour PWF, les concentrations mesurées passent de  $5,27 \pm 0,35$  fois le contrôle pour la bouche à  $10,23 \pm 2,32$  fois le contrôle pour le digestat gastrique et à  $44,93 \pm 3,02$  fois le contrôle pour le digestat intestinal.

De manière remarquable, le digestat intestinal de PWF stimule 2 fois plus la sécrétion de GLP-1 que le digestat intestinal de MP-PWF, ce qui confirme l'intérêt d'hydrolyser au préalable la matière première afin de générer des séquences actives, parfois résistantes à la digestion.



**Figure 38.** Effet des échantillons bouche et des digestats gastriques et intestinaux sur la sécrétion des hormones CCK et GLP-1 par les cellules STC-1.

La stimulation de la sécrétion des hormones CCK (A) et du GLP-1 actif (B) par l'hydrolysate XVP 15035 et sa matière première a été mesurée par un dosage radio-immunologique. Le contrôle (représentant le niveau basal de sécrétion des hormones intestinales) est composé d'un tampon Hepes à pH 7,4. Les différents échantillons ont été incubés à 0,2 ; 0,5 et 1% (poids sec/volume) pendant 2h. Les moyennes (n = 3) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tuckey (p < 0,05).

De la même façon que pour PWF et sa matière première, la stimulation de la sécrétion de CCK (**Figure 38A**) et du GLP-1 (**Figure 38B**) augmente de façon dose dépendante au cours de la digestion GI de XVP 15035 et de sa matière première. A la dose de 1% (poids/vol), les concentrations mesurées de CCK passent de  $4,07 \pm 0,81$  fois le contrôle pour l'échantillon bouche à  $3,43 \pm 1,11$  fois le contrôle pour le digestat gastrique et à  $8,17 \pm 0,42$  fois le contrôle pour le digestat intestinal à la suite du contact des cellules avec les échantillons de la digestion de MP-XVP 15035. Pour XVP 15035 à la même dose, les concentrations obtenues, mesurées après contact avec les cellules STC-1, passent de  $7,93 \pm 0,49$  fois le contrôle pour

l'échantillon bouche à  $8,63 \pm 0,97$  fois le contrôle pour le digestat gastrique et à  $12,57 \pm 1,20$  fois le contrôle pour le digestat intestinal.

De manière remarquable, le digestat intestinal de XVP 15035 stimule 1,6 fois plus la sécrétion de CCK que le digestat intestinal de MP-XVP 15035.

Pour le GLP-1, les concentrations mesurées passent de  $3,03 \pm 0,50$  fois le contrôle pour l'échantillon bouche à  $10,20 \pm 0,51$  fois le contrôle pour le digestat gastrique et à  $28,20 \pm 2,26$  fois le contrôle pour le digestat intestinal à la suite du contact des cellules avec les échantillons de la digestion de MP-XVP 15035 à 1% (poids sec/volume). Pour l'hydrolysate XVP 15035, les concentrations mesurées passent de  $6,23 \pm 0,42$  fois le contrôle pour l'échantillon bouche à  $3,90 \pm 0,70$  fois le contrôle pour le digestat gastrique et à  $21,20 \pm 0,71$  fois le contrôle pour le digestat intestinal.

Le digestat intestinal de MP-XVP 15035 stimule 1,3 fois plus la sécrétion de GLP-1 que le digestat intestinal de MP-PWF.

### II.2.3. Effets des digestats sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV

La capacité des digestats des hydrolysats et de leurs matières premières à inhiber l'activité de la DPP-IV a été dans un premier temps évaluée à l'aide d'une méthode enzymatique spectrophotométrique utilisant de la DPP-IV porcine purifiée. Les valeurs d'inhibition de l'activité enzymatique obtenues pour les prélèvements réalisés au cours de la digestion GI et testés à une concentration finale de  $2,57 \text{ g.L}^{-1}$ , ainsi que la détermination de valeurs d' $IC_{50}$  sont présentées dans le **Tableau 14**.

**Tableau 14.** Concentrations inhibitrices des échantillons au cours de la digestion GI induisant 50% d'inhibition ( $IC_{50}$ ) de l'activité de la DPP-IV.

Les  $IC_{50}$  des échantillons ont été calculées à partir des pourcentages d'inhibition obtenus aux concentrations testées (1,29 ; 1,57 ; 1,86 ; 2,14 et 2,57 g.L<sup>-1</sup>). Les pourcentages d'inhibition de l'activité de la DPP-IV sont déterminés pour une concentration finale de 2,57 g.L<sup>-1</sup> poids sec. Les moyennes (n=3) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey ( $p < 0,05$ ). NC= Non Chiffable.

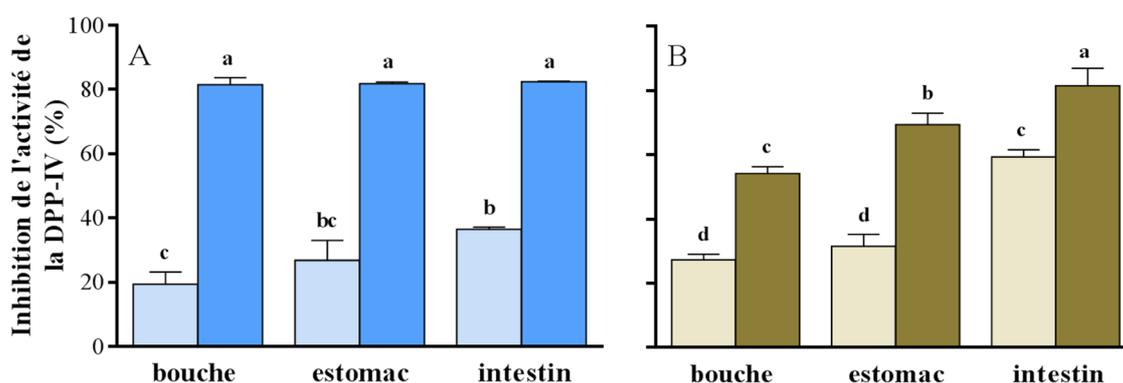
	Echantillons de la digestion	$IC_{50}$ (mg.mL <sup>-1</sup> )	% Inhibition de l'activité DPP-IV
<b>MP-PWF</b>	bouche	12,27	26,02 ± 1,11 <sup>C</sup>
	estomac	3,19	46,17 ± 2,47 <sup>B</sup>
	intestin	2,76	48,27 ± 1,60 <sup>B</sup>
<b>PWF</b>	bouche	2,20	53,93 ± 0,74 <sup>B</sup>
	estomac	1,71	61,71 ± 1,80 <sup>A</sup>
	intestin	1,52	65,47 ± 0,30 <sup>A</sup>
<b>MP-XVP 15035</b>	bouche	NC	2,30 ± 0,74 <sup>C</sup>
	estomac	2,08	56,98 ± 1,97 <sup>AB</sup>
	intestin	1,43	62,13 ± 0,80 <sup>A</sup>
<b>XVP 15035</b>	bouche	2,36	51,37 ± 2,27 <sup>B</sup>
	estomac	1,72	62,14 ± 7,26 <sup>A</sup>
	intestin	1,67	64,93 ± 4,26 <sup>A</sup>

Le pourcentage d'inhibition de l'activité de la DPP-IV augmente tout au long de la digestion pour les deux hydrolysats et leurs matières premières. Ainsi pour MP-PWF, les pourcentages d'inhibition de l'activité de la DPP-IV sont respectivement de 26,02 ± 1,1% et de 48,28 ± 1,60% pour la bouche et l'intestin avec des valeurs d' $IC_{50}$  respectives passant de 12,27 à 2,76 mg.mL<sup>-1</sup>. Pour PWF, ils sont respectivement de 53,93 ± 0,74% et de 65,47 ± 0,30% pour la bouche et l'intestin avec des valeurs d' $IC_{50}$  respectives passant de 2,20 à 1,52 mg.mL<sup>-1</sup>. De manière similaire, pour MP-XVP 15035, le pourcentage d'inhibition de l'activité de la DPP-IV passe de 2,30 ± 0,74% pour la bouche à 62,13 ± 0,80% pour le digestat intestinal avec des valeurs d' $IC_{50}$  atteignant 1,43 mg.mL<sup>-1</sup>. Concernant l'hydrolysate XVP 15035, son pourcentage d'inhibition de l'activité de la DPP-IV évolue de 51,37 ± 2,27% pour la bouche à 64,93 ± 4,26%, alors que les  $IC_{50}$  décroissent respectivement de 2,36 à 1,67 mg.mL<sup>-1</sup> pour de la phase buccale au digestat intestinal.

Il est intéressant de souligner que le potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV en phase buccale est deux fois supérieur pour l'hydrolysate PWF comparé à celui de MP-PWF. De la même manière en phase buccale, le potentiel inhibiteur de XVP 15035 est 20 fois supérieur comparé à sa matière première MP-XVP 15035. De plus, la digestion *in vitro* des hydrolysats et de leurs matières premières génère des peptides dont le potentiel inhibiteur de l'activité de

la DPP-IV augmente au fur et à mesure de la digestion. Ce potentiel inhibiteur est ainsi significativement amélioré dans le compartiment intestinal pour les hydrolysats et leurs matières premières.

La capacité des digestats des hydrolysats et de leurs matières premières à inhiber l'activité de la DPP-IV a ensuite été évaluée *in situ* sur cellules humaines Caco-2 vivantes exprimant la DPP-IV d'après une méthode innovante préalablement développée au laboratoire (Mat et Meth 3.2.1.2 ; Caron et al. 2017). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 39**.



**Figure 39.** Inhibition de l'activité de la DPP-IV *in situ* (cellules Caco-2) par les hydrolysats et leurs matières premières au cours de la digestion GI.

Les échantillons prélevés au cours de la digestion GI de PWF et de MP-PWF (A) et de XVP 15035 et de MP-XVP 15035 (B) ont été testés à une concentration finale de  $9,25 \text{ g.L}^{-1}$  (poids sec/volume). Barre couleur claire = matière première et Barre couleur foncée = hydrolysat. Les moyennes  $\pm$  écart type ( $n = 3$ ) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique par ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Comme pour le test enzymatique réalisé avec de la DPP-IV purifiée (**Tableau 14**), les peptides des deux hydrolysats, présents dans le compartiment bouche, inhibent plus fortement l'activité de la DPP-IV que de leur matière première respective. De même, plus la digestion GI avance et plus le potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV augmente, excepté pour l'hydrolysat PWF qui présente un pourcentage d'inhibition de l'activité DPP-IV très élevé (env. 81%) dès la phase buccale et qui reste stable au cours de la digestion (**Figure 39A**) avec des valeurs d' $IC_{50}$  qui diminuent légèrement entre la bouche et le digestat gastrique passant de  $0,43$  à  $0,34 \text{ mg.mL}^{-1}$  mais qui augmentent de nouveau pour le digestat intestinal à  $0,67 \text{ mg.mL}^{-1}$  (**Tableau 15**). Le pourcentage d'inhibition de l'activité de la DPP-IV double au cours de la digestion GI passant de  $19,48 \pm 3,74\%$  pour l'échantillon bouche à  $36,56 \pm 0,63\%$  pour le digestat intestinal de MP-PWF. Pour MP-XVP 15035, le pourcentage d'inhibition passe de  $27,35 \pm 1,74\%$  pour l'échantillon bouche à  $59,35 \pm 2,20\%$  pour le digestat intestinal. Pour le digestat intestinal de l'hydrolysat XVP 15035 de  $54,26 \pm 2,06\%$  pour l'échantillon

bouche à  $81,59 \pm 5,45\%$  (**Figure 39B**) avec des valeurs d'IC<sub>50</sub> respectives de 1,87 à 0,73 mg.mL<sup>-1</sup> (**Tableau 15**).

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues *in situ* sont comparées à celles obtenues avec le test enzymatique *in vitro* dans le **Tableau 15**.

**Tableau 15.** Concentrations induisant 50% d'inhibition (IC<sub>50</sub>) de l'activité de la DPP-IV purifiée et *in situ*.

Les IC<sub>50</sub> des échantillons ont été calculées à partir des pourcentages d'inhibition obtenus aux concentrations testées pour (2,32 ; 4,63 et 9,26 g.L<sup>-1</sup>). NC = Non Chiffrable.

	Echantillons de la digestion	IC <sub>50</sub> (mg.mL <sup>-1</sup> )	
		Cellules Caco-2	Enzyme purifiée
<b>MP-PWF</b>	Bouche	86,08	12,27
	Gastrique	14,21	3,19
	intestinale	3,70	2,76
<b>PWF</b>	Bouche	0,43	2,20
	Gastrique	0,34	1,71
	intestinale	0,67	1,52
<b>MP-XVP 15035</b>	Bouche	NC	NC
	Gastrique	23,26	2,08
	intestinale	1,38	1,43
<b>XVP 15035</b>	Bouche	1,87	2,36
	Gastrique	1,01	1,72
	intestinale	0,73	1,67

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues pour les digestats intestinaux de PWF et de MP-PWF sont très faibles montrant leur fort potentiel à inhiber aussi bien l'activité de la DPP-IV purifiée (respectivement 1,52 et 2,76 mg.mL<sup>-1</sup>) que celle de la DPP-IV exprimée par les Caco-2 et mesurée *in situ* (respectivement 0,67 et 3,70 mg.mL<sup>-1</sup>). Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues pour les digestats intestinaux de XVP 15035 et de MP-XVP15035 sont très faibles montrant leur fort potentiel à inhiber aussi bien l'activité de la DPP-IV purifiée (respectivement 1,47 et 1,63 mg.mL<sup>-1</sup>) que celle de la DPP-IV exprimée par les Caco-2 et mesurée *in situ* (respectivement 0,73 et 1,38 mg.mL<sup>-1</sup>). Mise à part pour le digestat intestinal de MP-PWF, les valeurs d'IC<sub>50</sub> des digestats intestinaux obtenues avec l'enzyme purifiée sont inférieures à celles obtenues avec les cellules Caco-2. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'étape d'hydrolyse supplémentaire réalisée par les enzymes transmembranaires des cellules Caco-2 sur la population peptidique.

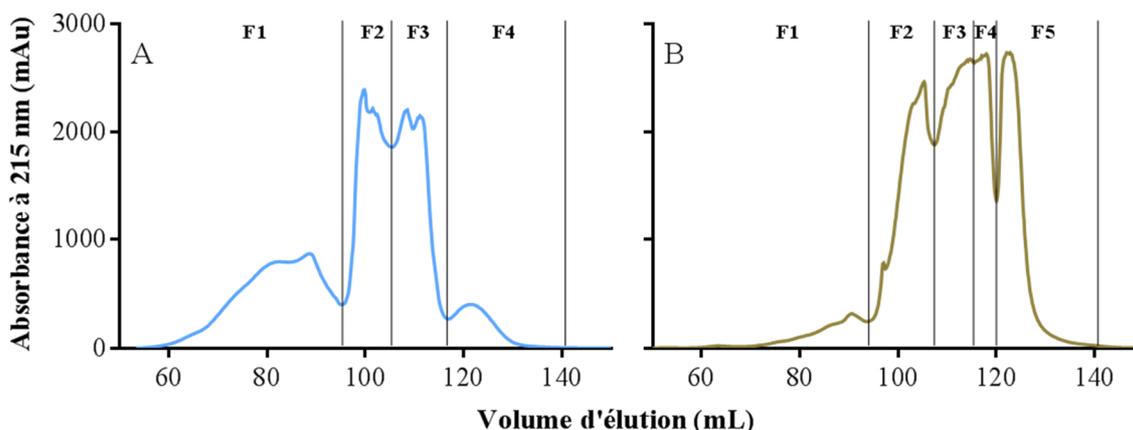
Il est très intéressant de confirmer, quel que soit le test utilisé, qu'au terme de la digestion GI, les hydrolysats exercent un potentiel inhibiteur de la DPP-IV supérieur à celui de leur matière

première respective (non hydrolysées par un procédé industriel préalable), ce qui met en évidence la valeur ajoutée de l'hydrolyse industrielle pour cette activité biologique.

### II.3. Fractionnement des digestats intestinaux et potentiels bioactifs

#### II.3.1. Plan de fractionnement des digestats intestinaux

Dans le but d'identifier les peptides impliqués dans les activités biologiques observées, une première étape de fractionnement a été appliquée au digestat intestinal des hydrolysats PWF et XVP 15035 par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) couplée à une détection UV à 215 nm. Le fractionnement réalisé pour chaque digestat intestinal est présenté dans la **Figure 40**.



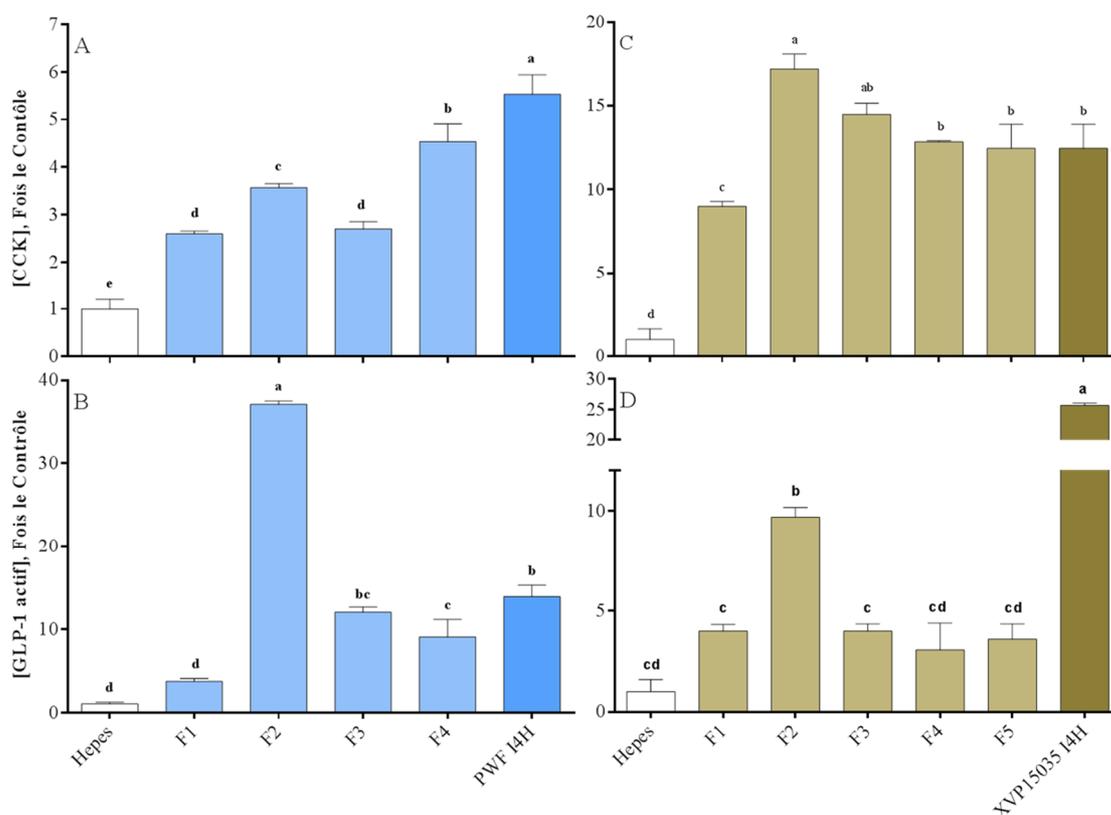
**Figure 40.** Profils peptidiques obtenus par SEC des digestats intestinaux des hydrolysats.

La séparation de la population peptidique du digestat intestinal de PWF (A) et de XVP 15035 (B) a été menée avec une colonne HiLoad 16/600 Superdex prep 30 grade en appliquant une élution isocratique d'un mélange de 30% ACN, 70% d'eau ultrapure, 0,1% de TFA à un débit de 1 mL.min<sup>-1</sup>. La détection UV a été réalisée à 215 nm.

Quatre fractions ont été définies et nommées de F1 à F4 pour le digestat intestinal PWF (**Figure 40A**) et cinq fractions nommées de F1 à F5 ont été définies pour le digestat intestinal XVP 15035 (**Figure 40B**). Le fractionnement des digestats intestinaux a été établi de telle sorte que la quantité de peptides, évaluée grâce à l'aire sous la courbe, soit dans la mesure du possible équivalente entre chaque fraction. Ainsi, pour le digestat intestinal de PWF, les aires sous la courbe des fractions F1, F2, F3, F4 représentent respectivement 33,1 ; 27,9 ; 31,3 et 7,7% de l'aire totale du chromatogramme. Pour le digestat intestinal de XVP 15035, les aires sous la courbe des fractions F1, F2, F3, F4 et F5 représentent respectivement 5,8 ; 24,3 ; 24,8 ; 16,2 et 28,9% de l'aire totale du chromatogramme obtenu.

### II.3.2. Effets des différentes fractions obtenues par SEC sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales

Le but de cette étape du travail est de sélectionner la ou les fraction(s) les plus actives qui sera(ont) fractionnée(s) une deuxième fois par une technique de séparation différente afin de sélectionner et d'identifier les peptides les plus actifs. Les cellules STC-1 ont été mises en contact avec le digestat intestinal des hydrolysats PWF et XVP 15035, ainsi qu'avec les fractions des digestats intestinaux obtenues par SEC. Les résultats sont présentés dans la **Figure 41**.



**Figure 41.** Effets du digestat intestinal des hydrolysats et de ses fractions obtenues par SEC sur la sécrétion de CCK et de GLP-1 par les cellules STC-1.

Les concentrations de CCK (A) et de GLP-1 actif (B) induites par le digestat intestinal de PWF et de ses fractions SEC, ainsi que les sécrétions de CCK (C) et de GLP-1 (D) induites par le digestat intestinal de XVP 15035 et de ses fractions SEC, ont été mesurées par un dosage radio-immunologique. Le contrôle est composé d'un tampon Hepes. Les différents échantillons ont été incubés à 0,5% (poids sec/volume) pendant 2h. Les moyennes (n = 3) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tuckey (p < 0,05).

Les résultats obtenus pour les fractions SEC du digestat intestinal PWF montrent que toutes les fractions ainsi que le digestat intestinal stimulent significativement la sécrétion de CCK ainsi que la sécrétion de GLP-1, mise à part la fraction F1 (**Figure 41A, B**). Ainsi, les valeurs

des concentrations en CCK mesurées dans les surnageants après contact avec les fractions F1 et F3, testées à une concentration de 0,5% (poids/volume), stimulent respectivement  $2,60 \pm 0,10$  et  $2,70 \pm 0,26$  fois plus la sécrétion de CCK que le contrôle HEPES seul. La fraction F2 stimule  $3,57 \pm 0,15$  fois plus que le contrôle la sécrétion de CCK et stimule significativement plus fortement la sécrétion de CCK comparé aux fractions F1 et F3. De toutes les fractions, la fraction F4 est la fraction stimulant le plus fortement ( $4,53 \pm 0,38$  fois le contrôle) la sécrétion de CCK.

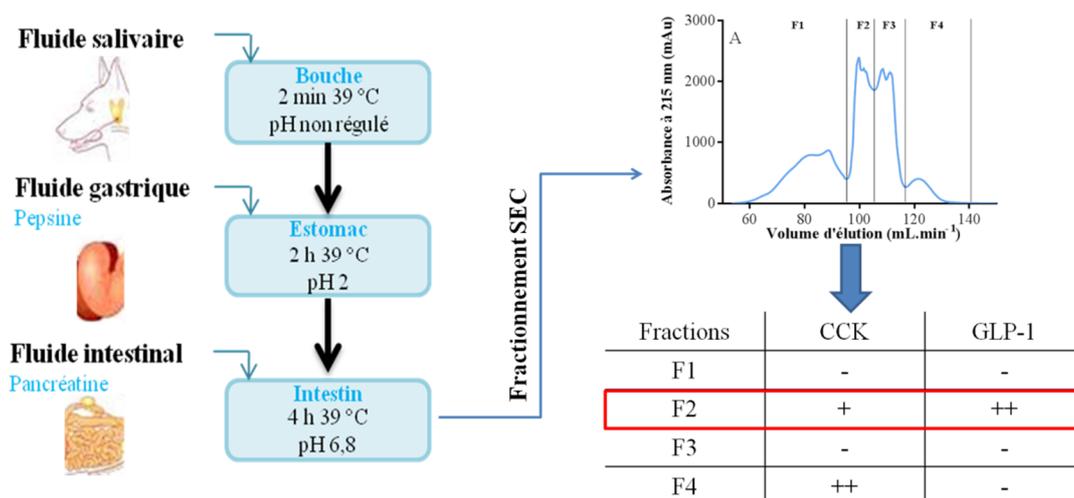
Les valeurs obtenues pour les concentrations de GLP-1 mesurées dans les surnageants après contact des fractions F1, F3 et F4 du digestat intestinal PWF, testées à une concentration de 0,5% (poids/volume), stimulent respectivement  $3,75 \pm 0,50$  ;  $12,03 \pm 1,10$  et  $9,07 \pm 2,10$  fois plus que le contrôle la sécrétion de CCK par les cellules STC-1. Les fractions F3 et F4 stimulent de façon significative la sécrétion de CCK en comparaison de la fraction F1 et du contrôle mais aucune différence n'est observée entre ces deux fractions. La fraction F2 stimule significativement de  $37,10 \pm 0,57$  fois plus la sécrétion de GLP-1 que le contrôle et de 2,7 fois plus la sécrétion de GLP-1 que le digestat intestinal de PWF ( $13,90 \pm 1,40$  fois le contrôle).

Concernant les concentrations de CCK mesurées dans les surnageants après contact avec les fractions du digestat intestinal de XVP 15035 (**Figure 4IC**), les valeurs obtenues pour les fractions F1 à F5 sont respectivement de  $9,00 \pm 0,50$  ;  $17,20 \pm 1,27$  ;  $14,50 \pm 1,14$  ;  $12,85 \pm 0,07$  et  $12,47 \pm 1,45$  fois la concentration en CCK du contrôle. Les fractions F4 et F5 stimulent significativement plus la sécrétion de CCK que la fraction F1. La fraction F3 stimule significativement plus la sécrétion de CCK que la fraction F1. Enfin, la plus forte concentration en CCK a été mesurée dans le surnageant après contact avec la fraction F2 qui stimule significativement plus la sécrétion de CCK que le digestat intestinal de XVP 15035 et que les autres fractions à l'exception de la fraction F3.

Les concentrations de GLP-1 mesurées dans les surnageants après contact avec les fractions montrent que les fractions prises individuellement ne stimulent pas plus la sécrétion de GLP-1 que le digestat intestinal de XVP 15035 ( $25,65 \pm 0,35$  fois le contrôle) (**Figure 4ID**). Seule la fraction F2 stimule plus fortement la sécrétion de GLP-1 de manière significative comparée aux autres fractions et au contrôle, ce dernier atteignant une stimulation de  $9,67 \pm 0,84$  fois celle du contrôle et quasiment de deux fois celles des autres fractions.

II.3.3. Fractionnement HPLC et potentiels bioactifs sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales

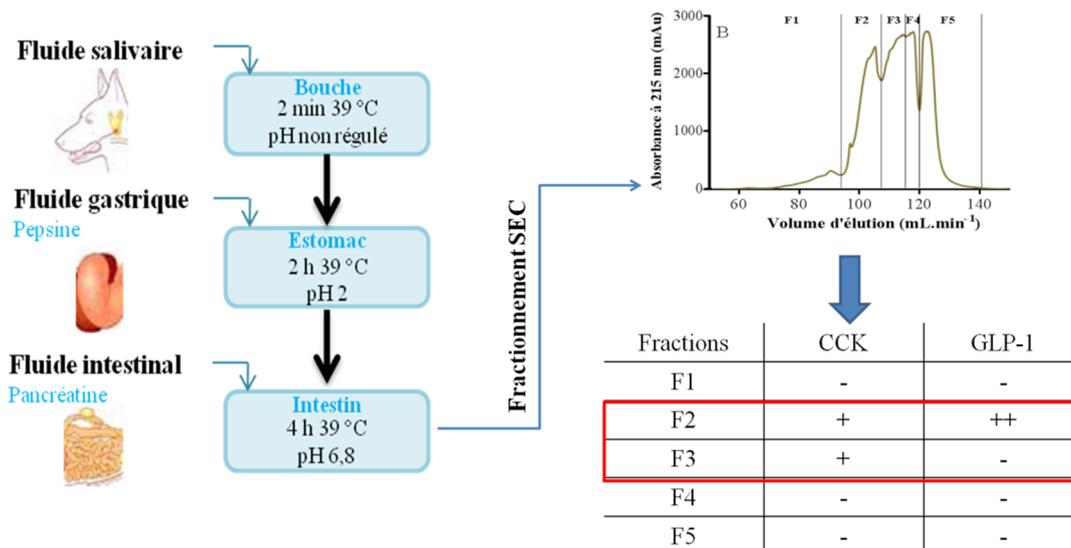
Les résultats obtenus pour la sécrétion des hormones intestinales induite par le contact des fractions issues du fractionnement du digestat intestinal de PWF ont permis de sélectionner la fraction F2 (*Figure 42*).



**Figure 42.** Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour les fractions SEC du digestat intestinal de PWF.

Une digestion GI a été réalisée sur les hydrolysats protéiques menant à la démonstration d’une augmentation du potentiel de la population peptidique à stimuler la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) au cours de cette digestion. De plus les CEEs pour les hormones ciblées se situant au niveau intestinal, la démarche de recherche a donc été d’identifier les peptides bioactifs du digestat intestinal de l’hydrolysat protéique PWF par chromatographie d’exclusion stérique.

De la même façon les résultats obtenus pour la sécrétion des hormones intestinales induite par le contact des fractions issues du fractionnement du digestat intestinal de XVP 15035 ont permis de sélectionner les fractions F2 et F3 (*Figure 43*).



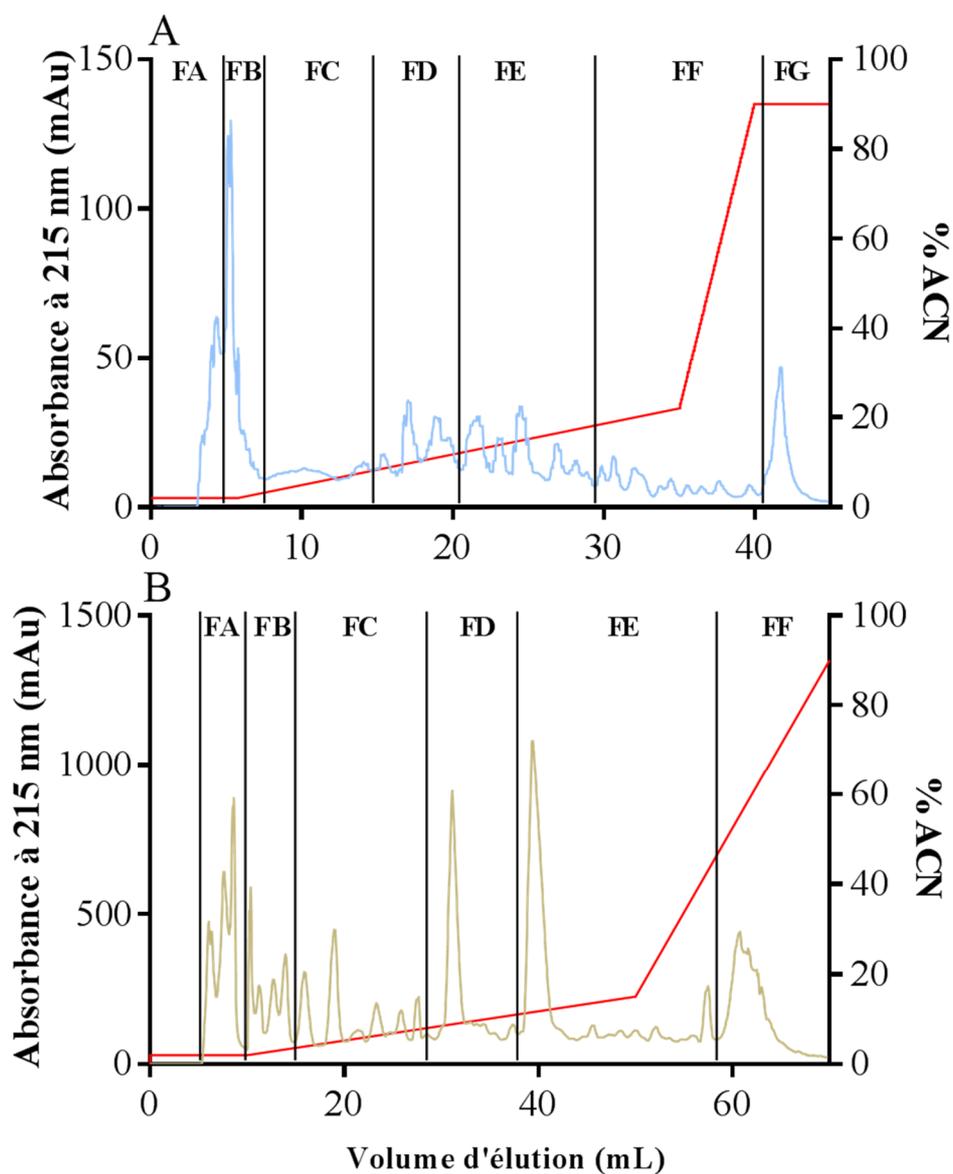
**Figure 43.** Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour les fractions SEC du digestat intestinal de XVP 15035.

Une digestion GI a été réalisée sur les hydrolysats protéiques menant à la démonstration d’une augmentation du potentiel de la population peptidique à stimuler la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) au cours de cette digestion. De plus les CEEs pour les hormones ciblées se situant au niveau intestinal, la démarche réalisée afin d’identifier les peptides bioactifs de l’hydrolysat protéique XVP 15035 a été de fractionner le digestat intestinal par chromatographie d’exclusion stérique.

Bien que la sélection de ces trois fractions ait permis de diminuer sensiblement la quantité de peptides à identifier, celle-ci reste trop abondante et complexe dans les fractions SEC. C’est pourquoi, une étape supplémentaire de fractionnement a été réalisée par chromatographie liquide en phase inverse (RP/HPLC) qui a été appliquée à la fraction F2 du digestat intestinal PWF et aux fractions F2 et F3 regroupées (renommées F2-3) du digestat intestinal XVP 15035.

#### II.3.4. Plan de sous-fractionnement des fractions SEC sélectionnées par RP-HPLC

La fraction F2 du digestat intestinal PWF et la fraction F2-3 du digestat XVP 15035 ont été séparées par RP-HPLC en mode semi-préparatif. Le fractionnement est présenté dans la **Figure 44**.



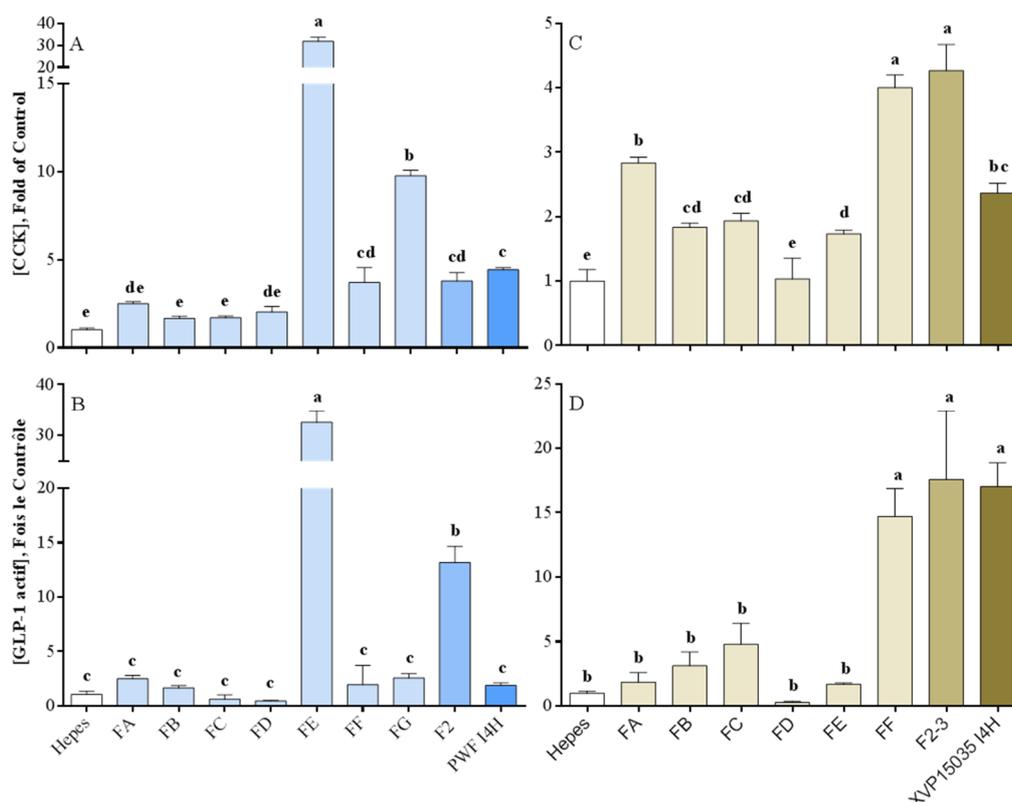
**Figure 44.** Profils de séparation RP-HPLC des fractions SEC sélectionnées.

Chromatogrammes obtenus pour la fraction F2 du digestat intestinal PWF (A) et pour la fraction F2-3 du digestat intestinal XVP 15035 (B) après passage sur une colonne C18. Le gradient de solvant exprimé en % d'ACN apparaît en rouge sur les graphiques. L'absorbance a été mesurée à 215 nm.

A partir du chromatogramme obtenu, sept sous-fractions (nommées de FA à FG) pour la fraction F2 du digestat intestinal de PWF et six sous-fractions (notés de FA à FF) pour la fraction F2-3 du digestat intestinal de XVP 15035 (**Figure 44A, B**) ont été collectées.

II.3.5. Effet des sous-fractions sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales

Chaque sous-fraction a été mise au contact des cellules STC-1 à une concentration finale de 0,5% (poids/volume) pendant 2h et les quantités d'hormones sécrétées dosées par RIA. Les résultats sont présentés dans la **Figure 45**.



**Figure 45.** Effets des sous-fractions issues des fractions SEC et de la fraction SEC du digestat intestinal des hydrolysats sur la sécrétion des hormones intestinales par les cellules STC-1.

Les concentrations de CCK (A) et de GLP-1 actif (B) obtenues après contact avec les sous-fractions HPLC, la fraction SEC F2 et le digestat intestinal de PWF (I4H) et les concentrations de CCK (C) et de GLP-1 (D) obtenues après contact des cellules avec les sous-fractions HPLC, la fraction SEC F2-3 et le digestat intestinal de XVP 15035 (I4H) ont été mesurées par un dosage radio-immunologique. Les différents échantillons ont été incubés à 0,5% (poids/volume) pendant 2h. Les moyennes (n = 3) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tuckey (p < 0,05).

La plus forte stimulation de la sécrétion de CCK et de GLP-1 a été obtenue avec la sous fraction FE de la fraction F2 du digestat intestinal PWF (**Figure 45A, B**). Ainsi les concentrations de CCK et de GLP-1 mesurées étaient respectivement de  $31,97 \pm 1,91$  et de  $32,57 \pm 2,15$  fois celle du contrôle. Ces valeurs sont significativement supérieures à celles obtenues avec la fraction F2 ( $3,80 \pm 0,46$  et  $13,17 \pm 1,50$  fois le contrôle pour respectivement CCK et GLP-1) et avec le digestat intestinal ( $4,43 \pm 0,12$  et  $1,87 \pm 0,23$  fois le contrôle pour

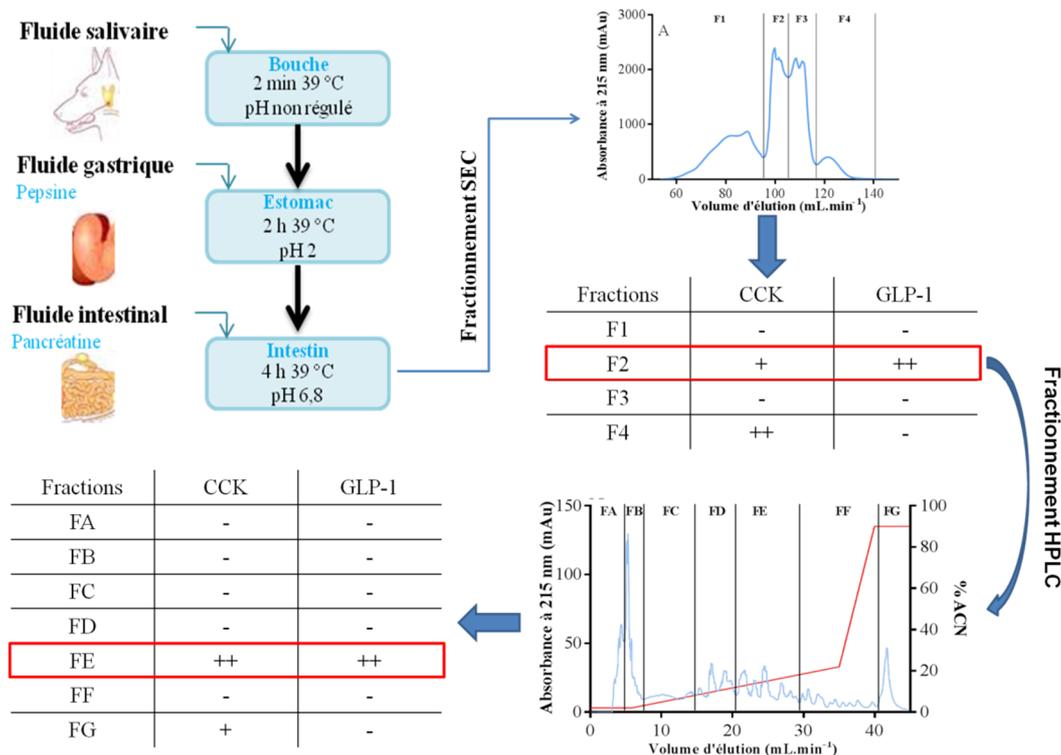
respectivement CCK et GLP-1). La sous fraction FG stimule également la sécrétion de CCK ( $9,77 \pm 0,85$  fois le contrôle).

Les résultats obtenus après contact des sous-fractions de la fraction SEC F2-3 du digestat intestinal XVP 15035 (**Figure 45C et D**) montrent que la sous fraction FF stimule de façon significative la sécrétion de CCK ( $4,00 \pm 0,20$  fois le contrôle) et de GLP-1 ( $1,70 \pm 2,15$  fois le contrôle) par rapport au contrôle et aux autres sous-fractions. La sous-fraction FA stimule également relativement fortement la sécrétion de CCK ( $2,83 \pm 0,15$  fois le contrôle).

Au regard des résultats obtenus, la sous-fraction FE de F2 du digestat intestinal PWF et la sous-fraction FF de F2-3 du digestat intestinal XVP 15035 ont été sélectionnées pour la suite des travaux relative à l'identification des séquences actives.

#### **II.4. Conclusion**

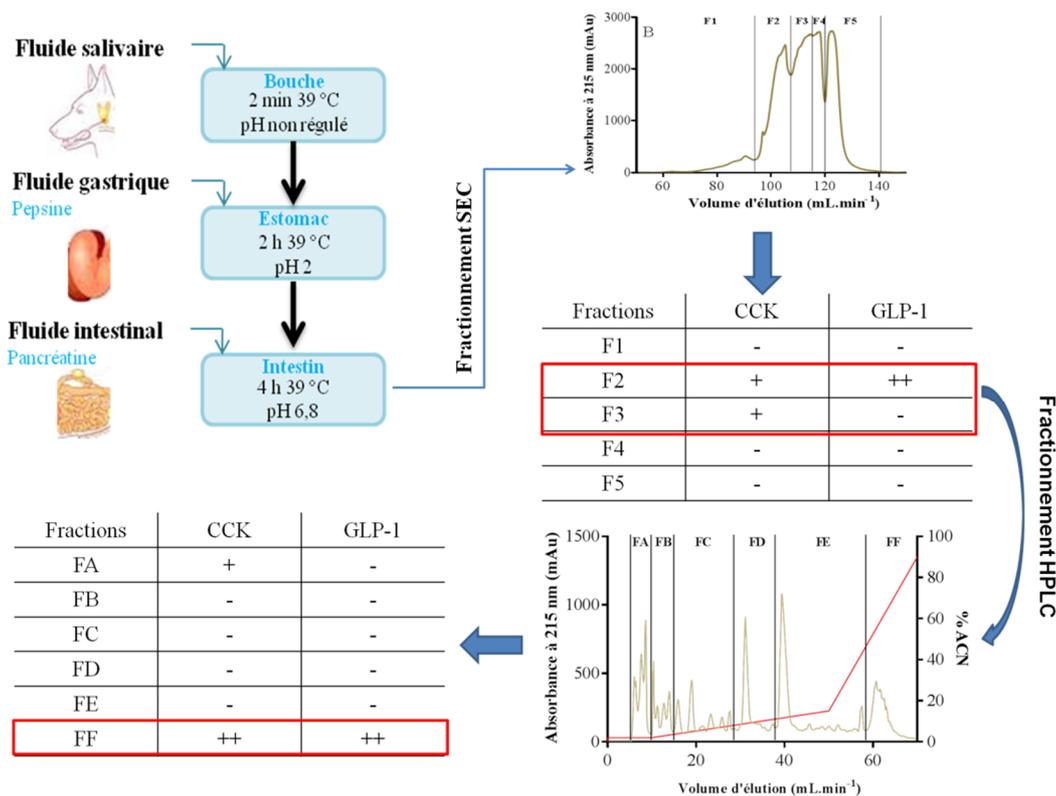
Cette deuxième partie du travail a d'abord permis de mesurer l'impact de la digestion GI sur les activités biologiques suivies *in vitro*. Les résultats obtenus démontrent dans l'ensemble un meilleur effet des hydrolysats, en comparaison des matières premières sur la stimulation de la sécrétion de CCK et sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV. Ainsi, l'hydrolyse industrielle des matières premières génère une population peptidique possédant un meilleur potentiel. La stimulation de la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) et la capacité inhibitrice de la DPP-IV étaient potentialisées pour les digestats intestinaux par rapport aux phases buccales et aux digestats gastriques, que ce soit pour l'hydrolysat ou la matière première. D'autre part, les fractions obtenues par les deux étapes de fractionnement ont montré le meilleur potentiel à stimuler la sécrétion des hormones intestinales pour les digestats intestinaux de PWF et XVP 15035. Deux schémas récapitulatifs des différentes étapes sont présentés dans la **Figure 46** pour PWF et dans la **Figure 47** pour XVP 15035.



**Figure 46.** Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour les différentes étapes de fractionnement du digestat intestinal de PWF.

Une digestion GI a été réalisée sur les hydrolysats protéiques pour démontrer l’augmentation du potentiel de la population peptidique à stimuler la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) au cours de cette digestion. De plus, étant donné que la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales a été réalisée avec les CEEs la démarche réalisée a été de fractionner le digestat intestinal par chromatographie d’exclusion stérique suivie d’une nouvelle étape de fractionnement par RP-HPLC pour la fraction la plus active, afin d’identifier les peptides bioactifs de l’hydrolysats protéique PWF.

La première étape du fractionnement par chromatographie d’exclusion stérique du digestat intestinal de PWF a mené à la sélection de la fraction F2 montrant un potentiel intéressant à stimuler la sécrétion de CCK et le meilleur potentiel à stimuler la sécrétion GLP-1 par les cellules entéroendocrines STC-1. Cette fraction a donc été sélectionnée pour la seconde étape de fractionnement par RP-HPLC. Les résultats obtenus pour la sécrétion des hormones intestinales ont permis de sélectionner clairement la sous-fraction FE pour l’identification des peptides responsables des activités biologiques



**Figure 47.** Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour les différentes étapes de fractionnement du digestat intestinal de XVP 15035.

Une digestion GI a été réalisée sur les hydrolysats protéiques pour démontrer l’augmentation du potentiel de la population peptidique à stimuler la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) au cours de cette digestion. De plus, étant donné que la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales a été réalisée avec les CEEs la démarche réalisée a été de fractionner le digestat intestinal par chromatographie d’exclusion stérique suivie d’une nouvelle étape de fractionnement par RP-HPLC pour la fraction la plus active, afin d’identifier les peptides bioactifs de l’hydrolysate protéique XVP 15035.

De la même façon, la première étape de fractionnement du digestat intestinal de XVP 15035 a mené à la sélection des fractions F2 et F3, ces dernières fractions montrant un potentiel de stimulation de la sécrétion intéressant pour l’hormone CCK. la fraction F2 a obtenu le meilleur potentiel à stimuler la sécrétion GLP-1 par les cellules entéroendocrines STC-1. Les fractions F2 et F3 ont donc été sélectionnées et regroupées pour la seconde étape de fractionnement par RP-HPLC. Les résultats obtenus pour la sécrétion des hormones intestinales ont permis de sélectionner clairement la sous-fraction FF pour l’identification des peptides responsables des activités biologiques.

### **III. Identification et caractérisation des peptides responsables des activités biologiques étudiées**

#### **III.1. Introduction**

La troisième partie de cette étude s'est concentrée sur l'identification des séquences peptidiques impliquées dans les activités biologiques étudiées. Les résultats obtenus ont permis d'isoler des fractions actives et d'identifier les peptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

Concernant l'activité stimulatrice de CCK et de GLP-1, la fraction SEC F2 du digestat intestinal PWF et la fraction SEC F2-3 du digestat intestinal XVP 15035 ont conduit à la sélection de la sous-fraction FE pour PWF et de la sous-fraction FF pour XVP 15035. Suite à une étude du passage *in vitro* de la barrière intestinale des peptides contenus dans le digestat intestinal de chaque hydrolysate, le travail s'est concentré sur les séquences capables de traverser la monocouche cellulaire.

#### **III.2. Identification des séquences impliquées dans la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales**

##### **III.2.1. Démarche adoptée**

L'identification des séquences peptidiques, présentes dans les sous-fractions sélectionnées, a été réalisée par LC-MS/MS. Les séquences peptidiques identifiées ont été synthétisées chimiquement et mises au contact des cellules STC-1 afin de confirmer leur potentiel stimulateur de la sécrétion des hormones intestinales.

##### **III.2.2. Identification par LC-MS/MS des séquences peptidiques de la sous-fraction FE de la fraction F2 du digestat intestinal PWF**

Les séquences peptidiques présentes dans la sous-fraction FE ont été identifiées par LC-MS/MS après confrontation des spectres obtenus contre la banque de données *Cichlidae* ainsi qu'à l'aide du mode d'identification *de novo* du logiciel Peaks Studio (Bio informatic Solution) en appliquant, respectivement, un taux de faux positifs de 1% (False Discovery Rate, FDR) et un indice de confiance supérieur à 90% (ALC score). La recherche en banque a également été réalisée avec la banque de données *Sus Scrofa* afin de ne pas prendre en compte les séquences peptidiques issues de l'autodigestion des enzymes digestives utilisées pour simuler la digestion GI. Un total de 78 séquences peptidiques a été identifié par comparaison

à la banque de donnée *Cichlidae* et 416 séquences peptidiques ont été identifiées par le mode *de novo*. Le nombre de séquences peptidiques identifiées étant conséquent, un choix de 20 peptides a été réalisé. Les données sur les séquences peptidiques connues pour stimuler la sécrétion de CCK et de GLP-1 étant limitées à ce jour, il n'a pas été possible de sélectionner les peptides en se basant sur la présence ou non de certains acides aminés connus pour leur rôle dans la stimulation de la sécrétion de CCK et de GLP-1. Le choix des peptides s'est donc fait en se basant sur les peptides présents dans les pics les plus intenses des chromatogrammes UV 215 nm.

Le **Tableau 16** regroupe les séquences peptidiques qui ont été sélectionnées.

**Tableau 16.** Séquences peptidiques de la sous-fraction FE sélectionnées pour la synthèse chimique.

FE F2 digestat PWF	
LEL	EVLSQ
ELLK	PEEHPT
LKPT	HIHVNGA
VVEP	EAPLNPK
LTDY	DSKPGSL
LGME	VAPEEHPT
LLMMK	DVSGGYDE
DLVDK	GATGPAGAV
PSLVH	AGPQGPIGPR
LGVDE	SAGPQGPIGPR

Compte tenu du mode de sélection, le potentiel de tous les peptides synthétisés pour stimuler la sécrétion de CCK et de GLP-1 sera mesuré.

### III.2.3. Identification des séquences peptidiques dans la sous-fraction HPLC FF de la fraction F2-3 du digestat intestinal XVP15035

De la même façon que pour la sous-fraction FE, les séquences peptidiques présentes dans la sous-fraction FF ont été identifiées par LC-MS/MS après confrontation des spectres obtenus contre la banque de données *Gallus gallus* ainsi qu'à l'aide du mode d'identification *de novo* du logiciel Peaks Studio en appliquant, respectivement, un taux de faux positifs de 1% (False Discovery Rate, FDR) et un indice de confiance supérieur à 90% (ALC score). La recherche en banque a également été réalisée avec la banque de données *Sus Scrofa* afin de ne pas prendre en compte les séquences peptidiques issues de l'autodigestion des enzymes utilisées lors de la digestion GI *in vitro*. Un total de 5 séquences peptidiques a été identifié par

comparaison à la banque de données *Gallus gallus* et 744 séquences peptidiques ont été identifiées par le mode *de novo*.

Le choix des 20 séquences peptidiques a été fait de la même façon que pour la sous-fraction FE et ces séquences sont indiqués dans le **Tableau 17**. Le potentiel de ces 20 séquences peptidiques pour stimuler la sécrétion des hormones intestinales CCK et GLP-1 sera également mesuré.

**Tableau 17.** Séquences peptidiques de la sous-fraction FF sélectionnées pour la synthèse chimique.

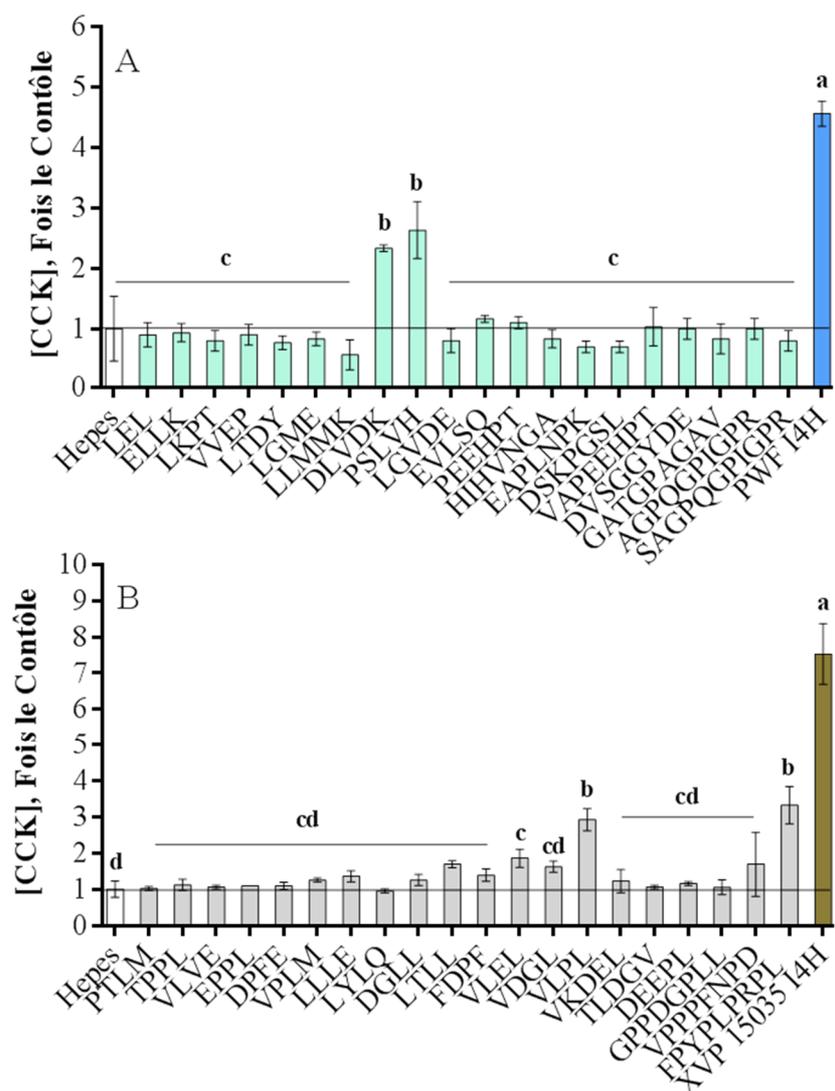
FF F2-3 digestat XVP 15035	
PTLM	FDPF
TPPL	VLEL
VLVE	VDGL
EPPL	VLPL
DPFE	VKDEL
VPLM	TLDGV
LLLE	DEEPL
LYLQ	GPPDGPLL
DGLL	VPPPFNPD
LTLT	FPYPLPRPL

#### III.2.4. Etude du potentiel bioactif des peptides synthétiques à stimuler la sécrétion des hormones intestinales

Les 40 séquences peptidiques synthétisées ont été mises au contact des cellules STC-1 à une concentration finale de 1 mM.

##### III.2.4.1. *Stimulation de la sécrétion de CCK*

La capacité à stimuler la sécrétion de CCK par la lignée STC-1 a été étudiée pour les 40 peptides synthétiques. Les résultats sont représentés dans la **Figure 48**.



**Figure 48.** Effet des peptides synthétiques sur la sécrétion de CCK par les cellules STC-1.

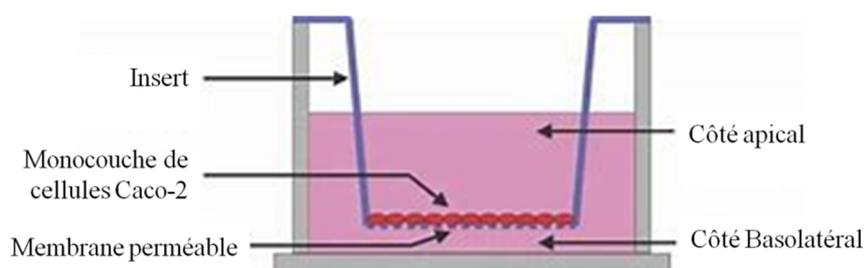
Les peptides issus de la sous fraction FF du digestat intestinal de PWF (A) et de la sous fraction FE du digestat intestinal XVP 10535 (B) sont testés à la concentration de 1 mM. Le contrôle est composé d'un tampon Hepes à pH 7,4. Les différents échantillons ont été incubés à 0,5% (poids/volume) pendant 2h. Les moyennes (n = 3) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tuckey ( $p < 0,05$ ).

Parmi les vingt peptides identifiés dans la sous fraction FE de F2 du digestat intestinal PWF et synthétisés (**Figure 48A**), seuls deux peptides synthétiques ont stimulé significativement la sécrétion de CCK en comparaison au contrôle : DLVDK ( $2,35 \pm 0,06$  fois le contrôle) et PSLVH ( $2,65 \pm 0,47$  fois le contrôle).

Parmi les vingt peptides testés identifiés dans la sous fraction FF de F2-3 du digestat intestinal XVP 15035 (**Figure 48B**), seuls trois peptides synthétiques ont stimulé significativement la sécrétion de CCK en comparaison au contrôle : FPYPLPRPL ( $3,30 \pm 0,52$  fois le contrôle), VLPL ( $2,92 \pm 0,34$  fois le contrôle) et VLEL ( $1,85 \pm 0,21$  fois le contrôle).

### III.3. Etude du passage des digestats intestinaux au travers d'une monocouche de cellules Caco-2 et identification des peptides inhibant l'activité de la DPP-IV

Les peptides générés au cours de la digestion GI des protéines peuvent traverser ou non, qu'ils soient intacts ou hydrolysés, la barrière intestinale. Le lieu du clivage du GLP-1 par la DPP-IV étant la circulation sanguine, les peptides inhibiteurs doivent être retrouvés intacts du côté basolatéral d'une couche intègre de cellules mimant la barrière intestinale. Nous avons donc étudié la capacité des peptides contenus dans le digestat intestinal des hydrolysats à passer au travers d'un épithélium modélisé *in vitro* par une monocouche de cellules Caco-2 différenciées (**Figure 49**). L'objectif principal étant d'identifier les séquences peptidiques, potentiellement inhibitrices de l'activité de la DPP-IV, capables de traverser la barrière intestinale.



**Figure 49.** Modèle de barrière de cellules Caco-2 différenciées utilisé pour l'étude du passage des peptides.

Les digestats intestinaux PWF et XVP 15035 sont dilués à 4 ou 8 g.L<sup>-1</sup> dans le milieu de transport et sont déposés du côté apical. Le volume basolatéral est 2,5 fois supérieur à celui du pôle apical. Des prélèvements sont réalisés des deux côtés au cours d'une cinétique de 2h d'incubation

Deux expériences de passage ont été menées au cours de cette étude dont les conditions expérimentales sont récapitulées dans le **Tableau 18**.

**Tableau 18.** Conditions expérimentales appliquées au passage de la barrière intestinale simulée *in vitro* des digestats intestinaux des hydrolysats PWF et XVP 15035.

	Expérience 1	Expérience 2
Objectif	Identification des peptides traversant la barrière intestinale	Mesure de l'inhibition de l'activité DPP-IV au cours du passage de la barrière intestinale
Inserts utilisés	Inserts 6 puits	Inserts 12 puits
Concentration des digestats	4 g.L <sup>-1</sup> (poids sec/vol)	8 g.L <sup>-1</sup> (poids sec/vol)

### III.3.1.1. Identification des séquences peptidiques passant la barrière de cellules Caco-2

Au cours de l'expérience 1, l'identification des peptides a été réalisée par LC-ESI-MS/MS. La digestion gastro-intestinale apportant aussi des peptides issus de l'autolyse des enzymes digestives, la recherche en banque de données a été réalisée à la fois sur la banque de données correspondant aux deux hydrolysats mais également sur la banque de données *Sus Scrofa* (enzymes gastro-intestinales d'origine porcine), ceci dans le but de n'identifier que les peptides provenant des hydrolysats. De plus, les peptides, identifiés dans les compartiments basolatéraux, communs aux puits contrôle et aux échantillons n'ont pas été pris en compte afin de s'affranchir des métabolites ayant pu être produits par les cellules en conditions contrôle. A la suite de différents essais montrant un plus grand nombre de peptides identifiés, les échantillons collectés à la fin de la cinétique (2h) ont été préférentiellement utilisés, permettant ainsi d'optimiser l'exhaustivité de l'analyse.

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

La Lucifer Yellow (LY) est un composé hydrosoluble fluorescent connu pour traverser la barrière intestinale par voie paracellulaire. Elle a donc été utilisée au cours de cette expérience comme contrôle de l'intégrité de la barrière cellulaire lors du passage des digestats intestinaux des hydrolysats PWF et XVP 15035. Elle a également permis de calculer le coefficient de perméabilité de la barrière dans les différentes conditions expérimentales. Les cellules ont été incubées du côté apical avec une solution de LY (100  $\mu\text{M}$ ) avec ou sans les digestats intestinaux. Le coefficient de perméabilité cellulaire a été calculé en présence du contrôle et des digestats intestinaux à 4  $\text{g.L}^{-1}$ . L'ensemble des valeurs obtenues est présenté dans le **Tableau 19**.

**Tableau 19.** Coefficients de perméabilité apparente ( $P_{app}$ ) de la monocouche de cellules Caco-2 en présence du contrôle ou des digestats intestinaux testés à une concentration de 4  $\text{g.L}^{-1}$ . Les digestats intestinaux de PWF et XVP 15035 ont été repris avec le milieu de transport (HHBSS). Le contrôle est composé du même milieu de transport.

	$P_{app}$ ( $\text{cm.s}^{-1}$ )
Contrôle	$7,63 \pm 2,08.10^{-07}$
Digestat intestinal PWF	$4,41 \pm 1,42.10^{-07}$
Digestat intestinal XVP 15035	$3,28 \pm 1,39.10^{-07}$

Les valeurs de perméabilité apparente  $P_{app}$  calculées dans les trois conditions (contrôle, digestat intestinal PWF et digestat intestinal XVP 15035) sont bien inférieures à la valeur seuil de l'intégrité de la barrière intestinale. En effet, d'après la littérature, la valeur limite de  $P_{app}$  témoignant d'une intégrité suffisante de la barrière cellulaire est de  $1.10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ . Les résultats montrent également que le contact des digestats intestinaux des hydrolysats diminue la perméabilité de la barrière intestinale. Avec ces valeurs de perméabilité apparente, la barrière cellulaire semble pouvoir jouer son rôle de filtre vis-à-vis du passage peptidique.

#### *Identification des peptides des digestats intestinaux*

Les séquences peptidiques présentes dans les digestats intestinaux ont été identifiées par LC-MS/MS. Les conditions d'analyse ont toutes été décrites dans le paragraphe II.2.3 du chapitre Matériels et Méthodes. Pour le digestat intestinal de PWF, un total de 145 séquences peptidiques uniques a été identifié grâce de la base de données *Cichlidae* et 213 séquences peptidiques ont été identifiées par le mode *de novo* avec un indice de confiance  $\geq 90\%$ . Pour le digestat intestinal de XVP 15035, un total de 27 séquences peptidiques uniques a été identifié par comparaison contre la base de données *Gallus gallus* et 84 séquences peptidiques ont été identifiées par le mode *de novo*.

#### *Identification des peptides dans les surnageants basolatéraux de la monocouche de cellules Caco-2*

Suite à l'expérience de passage de la barrière Caco-2 les peptides présents du côté basolatéral des puits, où les digestats intestinaux à  $4 \text{ g.L}^{-1}$  ont été incubés pendant 2h au contact des cellules, ont été identifiés par LC-MS/MS. Les nombres de séquences identifiées dans les différents compartiments basolatéraux sont présentés dans le **Tableau 20**.

**Tableau 20.** Nombre de séquences peptidiques identifiées par LC-MS/MS couplé au logiciel PEAKS.

	Basolatéral		Apical	Séq. Communes Apical/Basolatéral
	Identifiées par Peaks DB	Identifiées par <i>de novo</i>		
Digestats intestinal PWF	2	15	358	4
Digestats intestinal XVP 15035	8	17	111	2

Dix-sept (15+2) et vingt cinq (17+8) séquences peptidiques ont respectivement été identifiées dans les surnageants basolatéraux des digestats intestinaux de PWF et de XVP 15035. Comme attendu, la population peptidique apicale est plus importante en nombre de séquences que la population basolatérale, ce qui est en accord avec l'intégrité de la monocouche de Caco-2

mesurée précédemment. La comparaison des listes peptidiques basales et apicales de chaque échantillon a montré un très faible nombre de séquences communes aux deux compartiments. En effet, seulement 4 séquences peptidiques sont communes aux compartiments apicaux et basolatéraux pour le digestat intestinal PWF, soit 1,1%, et 2 séquences peptidiques communes pour le digestat intestinal XVP 15035, soit 1,8%. L'apparition de nouveaux motifs peptidiques du côté basolatéral témoigne ainsi de l'activité des peptidases des cellules Caco-2 durant le contact, permettant ainsi le passage au travers de la barrière intestinale simulée.

### III.3.1.2. Effet des digestats intestinaux sur l'inhibition de l'activité DPP-IV au cours du passage au travers de la barrière intestinale

Dans la deuxième expérience, l'inhibition de l'activité de la DPP-IV a été mesurée au cours du passage au travers de la barrière intestinale. L'intégrité de la barrière a également été suivie au cours de cette expérience.

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

L'intégrité de la barrière intestinale a été mesurée par deux méthodes différentes. Tout d'abord par la mesure de la résistance transépithéliale (TEER) de tous les puits, puis par la mesure du passage de la LY au travers de la barrière intestinale. La mesure du passage de la LY a été réalisée soit au cours de l'expérience de passage avec l'ajout de la LY dans les digestats intestinaux ou après l'expérience de passage des digestats intestinaux par une incubation de la LY de 2h. Le **Tableau 21** présente les valeurs des TEER obtenues.

**Tableau 21.** Mesure de la résistance transépithéliale (TEER) de la monocouche de cellules Caco-2 en présence du contrôle ou des digestats intestinaux à 4 g.L<sup>-1</sup>.

Les valeurs reportées dans la littérature sont d'environ 2000 Ω.cm<sup>2</sup> pour une membrane intègre, comprises entre 300 et 400 Ω.cm<sup>2</sup> pour une membrane avec une perméabilité intermédiaire et entre 50 et 100 Ω.cm<sup>2</sup> pour une membrane à forte perméabilité c'est à dire une intégrité altérée.

	TEER (Ω.cm <sup>2</sup> )
Lucifer Yellow	1053,90
Contrôle HHBSS	1153,50 ± 58,73
Digestat intestinal PWF	1138,50 ± 51,90
Digestat intestinal XVP 15035	1176,60 ± 43,50

Les valeurs de TEER obtenues indiquent que la perméabilité de la monocouche de cellules Caco-2 est acceptable.

Le coefficient de perméabilité cellulaire a été calculé en présence du contrôle et des digestats intestinaux à 8 g.L<sup>-1</sup>. L'ensemble des valeurs obtenues est présenté dans le **Tableau 22**.

**Tableau 22.** Coefficients de perméabilité apparente ( $P_{app}$ ) de la monocouche de cellules Caco-2 en présence du contrôle ou des digestats intestinaux testés à une concentration de 8 g.L<sup>-1</sup>.

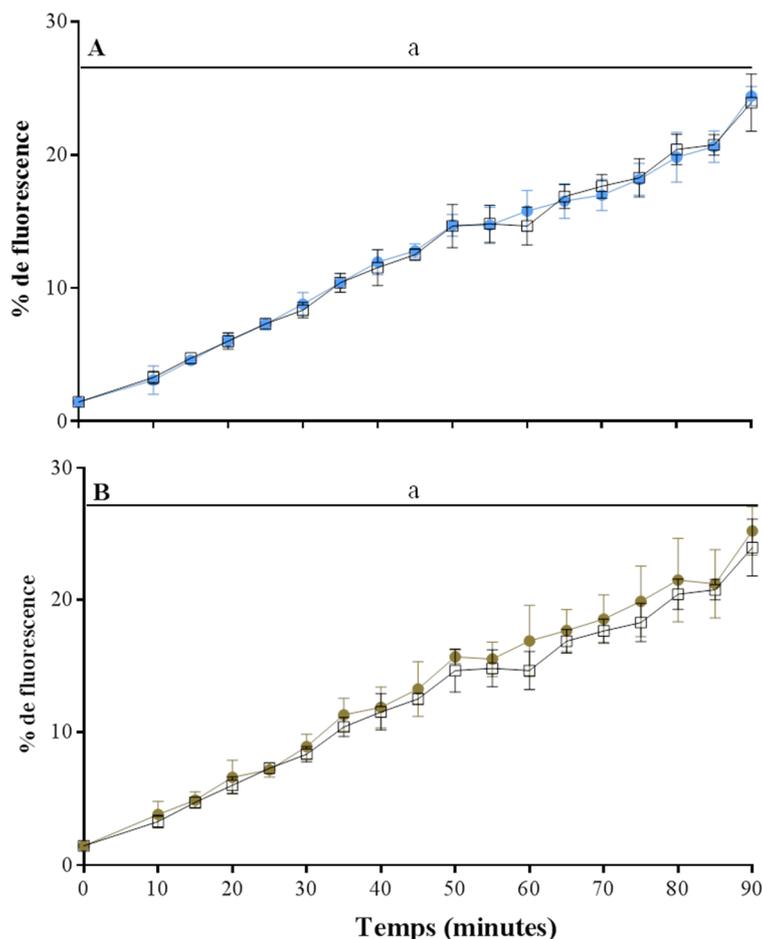
Les digestats intestinaux de PWF et XVP 15035 ont été repris avec le milieu de transport (HHBSS). Le contrôle est composé uniquement d'HHBSS. D'après la littérature, la valeur seuil de  $P_{app}$  témoignant d'une intégrité suffisante de la barrière cellulaire est de 1.10<sup>-6</sup> cm.s<sup>-1</sup>.

	$P_{app}$ (cm.s <sup>-1</sup> )
LY	2,08.10 <sup>-07</sup>
Contrôle	6,41 ± 4,40.10 <sup>-07</sup>
Digestat intestinal PWF	5,51 ± 2,46.10 <sup>-07</sup>
Digestat intestinal XVP 15035	5,42 ± 2,28.10 <sup>-07</sup>

Les valeurs de perméabilité apparente  $P_{app}$  calculées dans les trois conditions (contrôle, digestat intestinal PWF et digestat intestinal XVP 15035) sont bien inférieures à la valeur seuil, ce qui témoigne d'un maintien de l'intégrité de la barrière intestinale au cours de l'expérimentation. Le contact des hydrolysats provoque cependant une légère diminution du coefficient de perméabilité apparente.

#### *Mesure de l'inhibition de l'activité DPP-IV*

L'inhibition de l'activité de la DPP-IV par les peptides passant au travers de la barrière intestinale a été mesurée pendant 1h30. Pour cela, la fluorescence émise à la suite de l'hydrolyse du substrat Gly-Pro-AMC par la DPP-IV a été mesurée. Les résultats obtenus pour chaque digestat intestinal, testé à une concentration de 8 g.L<sup>-1</sup>, sont présentés dans la **Figure 50**.



**Figure 50.** Mesure de l'inhibition de l'activité de la DPP-IV au cours du passage de la barrière intestinale.

L'inhibition de l'activité de la DPP-IV par la population peptidique présente du côté basolatéral de la barrière intestinale simulée, après contact avec le digestat intestinal PWF (A) et le digestat intestinal XVP 15035 (B), a été mesurée au cours d'une cinétique de 1h30. Carrés blancs = Contrôle HNBSS et Ronds noirs = hydrolysats. Les moyennes ( $n = 3$ ) ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivi d'un test de Tuckey ( $p < 0,05$ ).

Quel que soit le digestat intestinal considéré, les résultats obtenus montrent qu'aucune activité inhibitrice de l'activité de la DPP-IV, n'a été mise en évidence du côté basolatéral.

### III.3.2. Sélection des peptides au sein de la liste des peptides identifiés passant la barrière de cellules Caco-2

A la suite de l'identification des séquences peptidiques dans les compartiments basolatéraux de la barrière intestinale simulée *in vitro* (partie II.3.2.3.3), le choix de peptides pour être synthétisés a été réalisé à l'aide de la méthode QSAR (Nongonierma and Fitzgerald 2016). Cette méthode de sélection, différente de la méthode utilisée pour la sélection des peptides pour la sécrétion des hormones intestinales, est réalisée à l'aide d'un modèle de calcul. Les treize peptides synthétisés sont présentés dans le **Tableau 23**.

**Tableau 23.** Séquences peptidiques issues du passage de la barrière intestinale sélectionnées pour la synthèse chimique.

Digestat PWF	Digestat XVP 15035
DPLV	FPKATG
PDLV	MTPKAG
DLDL	ECLKAG
MDLP	ERGLAG
EDTY	RGPDSS
VDAGAP	ECMMG
VADTMEVV	

### III.3.3. Etude du potentiel bioactif des peptides synthétiques à inhiber l'activité de la DPP-IV

Le potentiel des peptides synthétisés à inhiber l'activité de la DPP-IV a été mesuré en utilisant le test développé sur les cellules Caco-2. Les valeurs d'IC<sub>50</sub> obtenues sont présentées dans le **Tableau 24**.

**Tableau 24.** Concentrations inhibitrices induisant 50% d'inhibition de l'activité DPP-IV (IC<sub>50</sub>) des peptides synthétisés.

NC = Non Chiffable

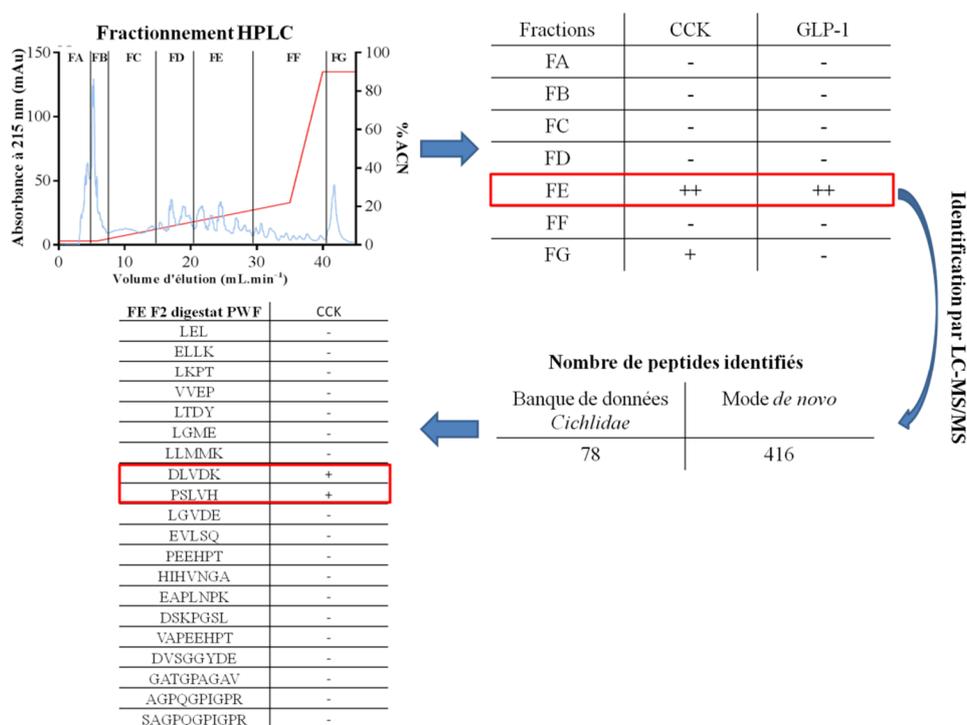
Digestat intestinal	Peptides	IC <sub>50</sub> (mM)
<b>PWF</b>	DPLV	12,78
	PDLV	31247,13
	DLDL	0,76
	MDLP	0,61
	EDTY	NC
	VDAGAP	NC
	VADTMEVV	1132,70
<b>XVP 15035</b>	FPKATG	5,61
	MTPKAG	NC
	ECLKAG	134,49
	ERGLAG	265,59
	RGPDSS	93860,68
	ECMMG	129,62

Parmi les peptides synthétisés, deux peptides issus du digestat intestinal PWF et capables de passer la barrière intestinale simulée par une monocouche de cellules Caco-2 différenciées, montrent un potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV plutôt intéressant avec des IC<sub>50</sub> faibles. Il s'agit des peptides DLDL et MDLP qui présentent respectivement une IC<sub>50</sub> de 760 et 610  $\mu$ M.

Pour le digestat intestinal XVP 15035, seul le peptide FPKATG exerce un potentiel inhibiteur intéressant pour inhiber l'activité de la DPP-IV avec une IC<sub>50</sub> de 5,61 mM parmi les six peptides synthétisés.

### III.4. Conclusion

Dans cette troisième partie du travail, le but a été de vérifier par les différents tests biologiques le potentiel des peptides identifiés et synthétisés. Une première partie a été consacrée à l'identification des peptides stimulant la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1). La **Figure 51** récapitule l'identification des peptides stimulant la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1 dans les sous-fractions du digestat intestinal de PWF.

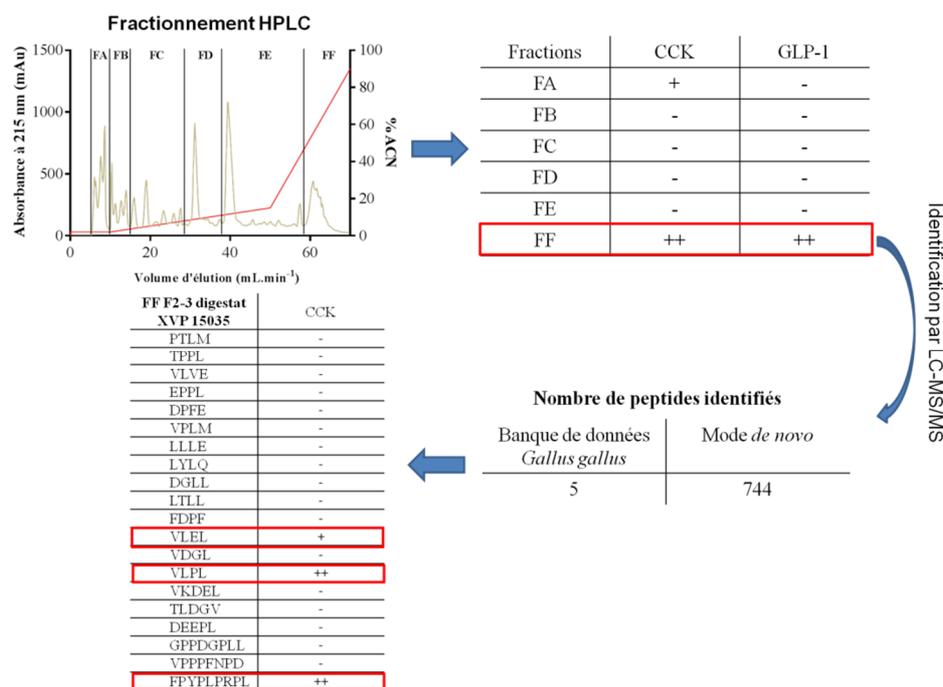


**Figure 51.** Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour l'identification des peptides bioactifs stimulant la sécrétion des hormones intestinales présents dans le digestat intestinal de PWF.

Le fractionnement de la fraction F2 du digestat intestinal de PWF par RP-HPLC a permis d'identifier la sous-fraction FE montrant le plus fort potentiel à stimuler la sécrétion des hormones intestinales. Les peptides présents dans cette sous-fraction ont été identifiés par LC-MS/MS et 20 peptides ont été synthétisés et testés pour la sécrétion des hormones.

Parmi les 494 séquences peptidiques qui ont été identifiées, 20 peptides ont été synthétisés pour vérifier leur potentiel à stimuler la sécrétion des hormones intestinales. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence les peptides DLVDK et PSLVH stimulant la sécrétion de CCK.

La **Figure 52** récapitule l'identification des peptides stimulant la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1), présents dans les sous-fractions du digestat intestinal de XVP 15035.

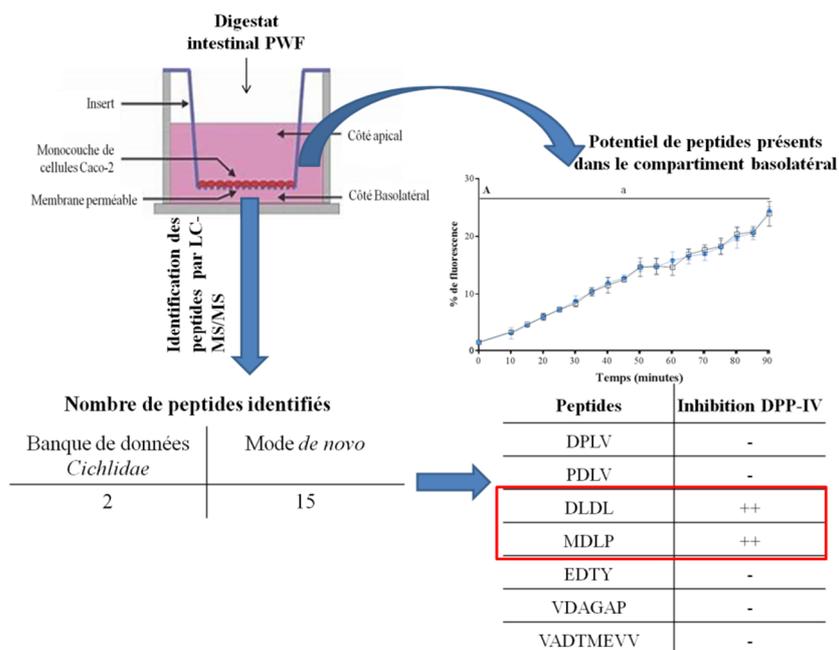


**Figure 52.** Schéma récapitulatif des résultats obtenus pour l'identification des peptides bioactifs stimulant la sécrétion des hormones intestinales présents dans le digestat intestinal de XVP 15035.

Le fractionnement de la fraction F2-3 du digestat intestinal de XVP 15035 par RP-HPLC a permis d'identifier la sous-fraction FF montrant le plus fort potentiel à stimuler la sécrétions des hormones intestinales. Les peptides présents dans cette sous-fraction ont été identifiés par LC-MS/MS et 20 peptides ont été synthétisés et testés pour la sécrétion des hormones.

Parmi les 749 séquences peptidiques qui ont été identifiées, 20 peptides ont été synthétisés pour vérifier leur potentiel à stimuler la sécrétion des hormones intestinales. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence les peptides VLEL, VLPL et FPYPLRPL stimulant la sécrétion de CCK.

Une deuxième partie a été consacrée à l'identification des peptides inhibant l'activité de l'enzyme DPP-IV des digestats intestinaux des hydrolysats. Pour cela, une simulation du passage de la barrière intestinale a été réalisée à l'aide d'une monocouche de cellules Caco-2. La démarche réalisée pour l'inhibition de l'activité de la DPP-IV au cours du passage de la barrière intestinale et l'identification des peptides passant cette barrière simulée est résumée dans la **Figure 53** pour le digestat intestinal de PWF et dans le pour le digestat intestinal de XVP 15035.

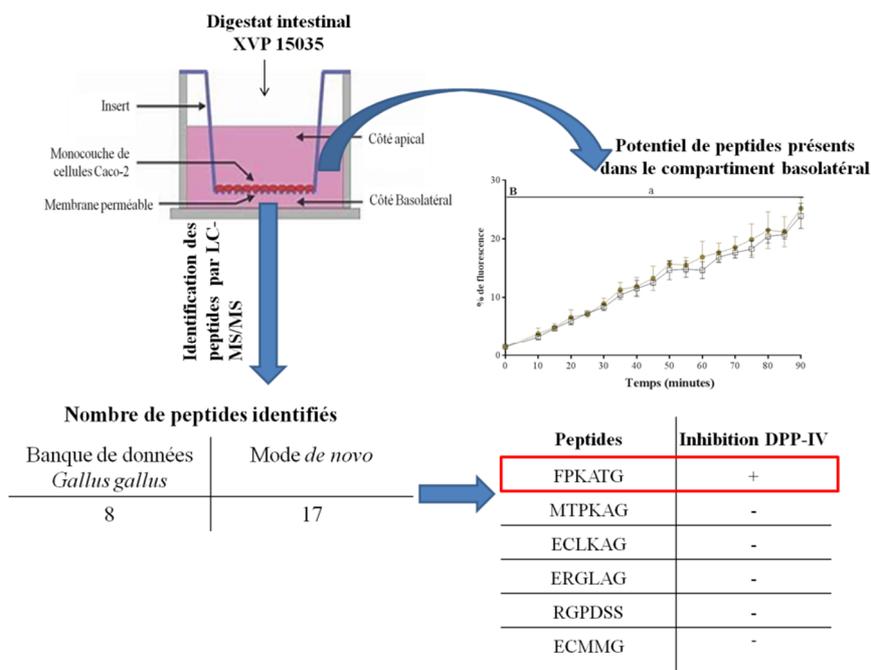


**Figure 53.** Schéma récapitulatif des résultats obtenus lors de l'expérience de passage de la barrière intestinale pour le digestat intestinal.

L'inhibition de l'activité de l'enzyme DPP-IV a été mesurée au cours du passage de la barrière intestinale dans le compartiment basolatéral. Les peptides traversant la barrière intestinale ont été identifiés par LC-MS/MS et 7 peptides ont été synthétisés pour identifier ceux inhibant l'activité de l'enzyme DPP-IV.

La mesure de l'inhibition de l'activité de la DPP-IV au cours du passage de la barrière intestinale n'a pas permis de démontrer le potentiel des peptides du digestat intestinal de PWF traversant cette barrière à inhiber l'activité de l'enzyme DPP-IV. Parmi les 17 peptides identifiés dans le compartiment basolatéral, 7 peptides ont été synthétisés et deux peptides ont montré un potentiel intéressant : DLDL et MDLP.

La **Figure 54** résume les résultats obtenus pour le digestat intestinal de XVP 15035 sur l'inhibition de l'activité de l'enzyme DPP-IV.



**Figure 54.** Schéma récapitulatif des résultats obtenus lors de l'expérience de passage de la barrière intestinale pour le digestat intestinal de XVP 15035.

L'inhibition de l'activité de l'enzyme DPP-IV a été mesurée au cours du passage de la barrière intestinale dans le compartiment basolatéral. Les peptides traversant la barrière intestinale ont été identifiés par LC-MS/MS et 6 peptides ont été synthétisés pour identifier ceux inhibant l'activité de l'enzyme DPP-IV.

De la même façon que pour le digestat intestinal de PWF, les peptides traversant la barrière intestinale n'ont pas montré de potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV. Parmi les 25 peptides identifiés dans les compartiments basolatéraux, 6 peptides ont été synthétisés et seul le peptide FPKATG a montré un potentiel intéressant bien que plus faible que les peptides identifiés du digestat intestinal de PWF.

#### **IV. Etude *in vivo* de l'effet de l'hydrolysate protéique PWF sur l'homéostasie énergétique**

##### **IV.1. Introduction**

Les résultats présentés dans les trois premières parties ont permis de mettre en avant le rôle potentiel des hydrolysats dans la régulation de la prise alimentaire via la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1). Cependant, ces résultats obtenus *in vitro* doivent être validés *in vivo* afin de confirmer le rôle des hydrolysats dans la régulation de la prise alimentaire. Il a ainsi été choisi de mesurer le potentiel de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'homéostasie énergétique chez le rat. L'expérimentation s'est déroulée en deux phases. Dans une première phase, les effets de l'hydrolysate PWF sur la régulation de la prise

alimentaire et sur le poids ont été mesurés sur des rats en croissance et en bonne santé. Dans une deuxième phase, les effets de l'hydrolysate PWF sur la prise alimentaire et le poids ont été mesurés sur des rats adultes suivant un régime alimentaire riche en matières grasses. Dans cette deuxième phase d'expérimentation, les effets de l'administration de l'hydrolysate PWF sur la régulation de certains marqueurs de l'homéostasie énergétique ont également été suivis.

Toutes les procédures expérimentales réalisées sur les animaux ont été conformes aux directives du Comité National de Soins Animaliers et validées par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale (CEEA) sous le n° 2017011816001003.

#### **IV.2. Analyse statistique des résultats par modèle mixte**

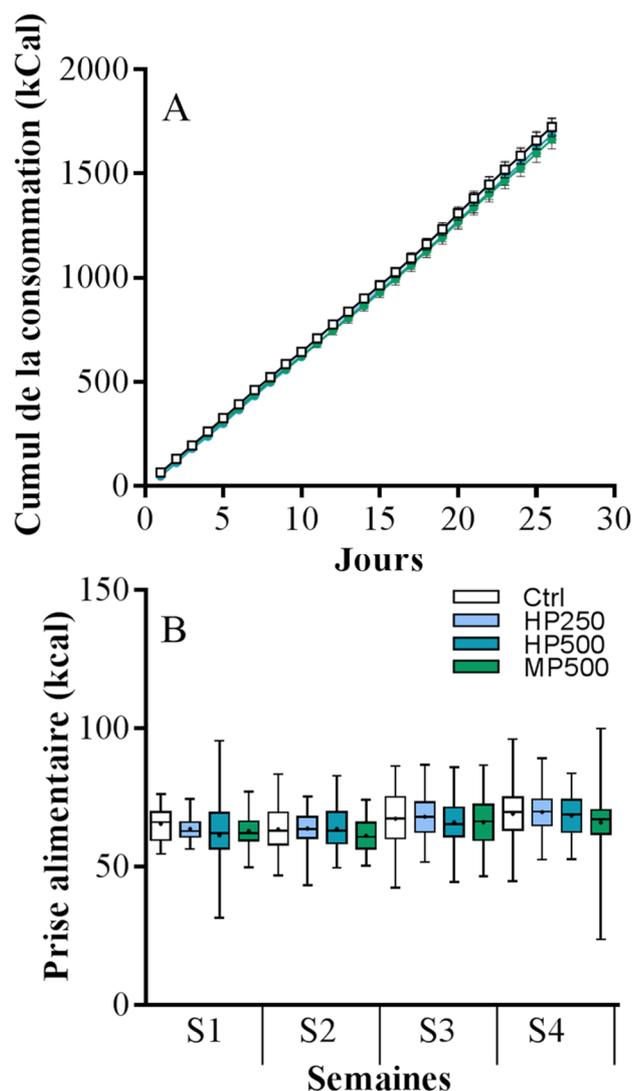
L'analyse statistique par le modèle mixte a été réalisée sur les résultats de la prise alimentaire et du poids des animaux. Il s'agit d'une analyse de la variance qui permet de prendre en compte plusieurs paramètres. Dans notre étude, le modèle mixte a pris en compte l'animal comme effet aléatoire, et le poids des animaux, le poids du jour J1 ou en début de semaine) ainsi que le groupe comme effets fixes ; mais également de corrélérer des effets fixes comme le groupe x le moment (jour, semaine, mois) pour la prise alimentaire. Pour le poids des animaux, la consommation est prise en compte comme effet fixe ainsi que l'interaction groupe x semaine et groupe x consommation. Le modèle mixte permet ainsi d'obtenir les *p value* des différents effets (groupe, poids, moment, interaction groupe x moment, consommation, interaction groupe x consommation). Dans cette partie, seuls les résultats de l'analyse de variance sur l'effet groupe ont été présentés. Cependant, si un effet a été observé autre que l'effet groupe, la *p value* est indiquée. L'analyse de la variance a été suivie par une comparaison par paire réalisée par un test de Student.

#### **IV.3. Effet de l'hydrolysate PWF et de sa matière première sur un modèle d'étude de rat en croissance**

Cette première phase d'expérimentation a pour but de mesurer l'effet de l'hydrolysate PWF sur la prise alimentaire et le poids en comparaison avec d'une part un contrôle physiologique et d'autre part un groupe recevant la matière première à l'origine de cet hydrolysate. Ainsi, quatre groupes de huit rats ont été formés et ont reçu quotidiennement par gavage oro-gastrique soit de l'eau (Ctrl), de la matière première à 500 mg.mL<sup>-1</sup> (MP500) ou encore de l'hydrolysate PWF à 250 ou 500 mg.mL<sup>-1</sup> (respectivement intitulés HP250 et HP500).

IV.3.1. Effet de l'hydrolysate et de sa matière première sur la prise alimentaire

Les quatre groupes de rats ont reçu un régime de maintenance standard (Teklad 2016) tout au long de cette première phase d'expérimentation. La consommation des croquettes a été pesée quotidiennement. La **Figure 55** présente les résultats obtenus pour la prise alimentaire cumulée et la prise alimentaire moyennée par semaine.



**Figure 55.** Effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de la prise alimentaire.

La prise alimentaire cumulée représente la consommation moyenne de chaque groupe incrémentée chaque jour (A) et la prise alimentaire est obtenue en moyennant la prise alimentaire journalière semaine par semaine pour chaque groupe (B). Le cumul de la prise alimentaire et la prise alimentaire journalière moyennée par semaine sont exprimés en énergie ingérée (kcal) correspondant à la somme des apports énergétiques venant de l'alimentation et de la charge oro-gastrique. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). Les moyennes ont été considérées comme non significativement différentes après traitement statistique réalisé par modèle mixte suivi par une analyse posthoc de Student. Les quatre groupes ont reçu une alimentation standard avec Ctrl : groupe en régime standard recevant de l'eau par voie oro-gastrique, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 500 mg.

La prise alimentaire cumulée au cours de cette première phase montre un léger détachement du groupe HP500 et du groupe MP500 à partir du dixième jour de gavage par rapport au groupe contrôle et au groupe HP250 (**Figure 55A**). La consommation cumulée des groupes HP500 et MP500 sont proches jusqu'au jour J24 puis le groupe MP500 présente une consommation cumulée légèrement plus faible mais non statistiquement différente de celle du groupe HP500. Le groupe Contrôle et le groupe HP250 ont des consommations cumulées similaires tout au long de cette première phase d'expérimentation.

Concernant l'évolution de la prise alimentaire au cours des quatre semaines d'expérimentation, les résultats montrent une légère diminution à partir de la deuxième semaine pour les groupes HP500 ( $63,61 \pm 0,97$  kCal) et MP500 ( $61,16 \pm 0,82$  kCal). La moyenne de la consommation à la quatrième semaine indique que le groupe MP500 ( $65,97 \pm 1,51$  kCal) a légèrement moins consommé que le groupe HP500 ( $68,47 \pm 1,01$  kCal) qui a lui-même moins consommé que les deux autres groupes ( $68,99 \pm 1,34$  et  $69,47 \pm 1,03$  kCal respectivement pour les groupe contrôle et HP250) (**Figure 55B**). Cependant le modèle mixte sur toute la période ainsi que les modèles mixtes par semaine ne montrent aucun effet groupe (**Tableau 25**).

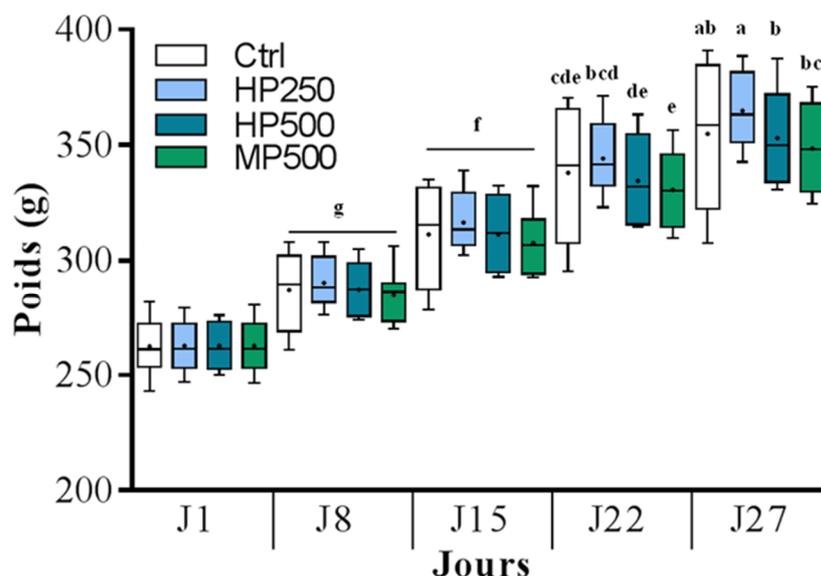
**Tableau 25.** P values obtenues pour l'effet groupe sur 24h par modèles mixtes.

Analyse	Pvalue (Période sur 24h) de l'effet Groupe
Modèle mixte sur la durée totale de l'étude	0,5547
Modèle mixte Semaine 1	0,0968
Modèle mixte Semaine 2	0,7409
Modèle mixte Semaine 3	0,8584
Modèle mixte Semaine 4	0,6916

Bien que l'analyse de variance ne montre pas d'effet groupe, une comparaison par paire a été réalisée. La comparaison par paire n'a pas permis de différencier les groupes entre eux sur la consommation globale (sur le mois d'étude) ni sur la consommation par semaine. Le modèle mixte sur la durée totale indique un effet semaine ( $p < 0,001$ ) et la comparaison par paire montre que les rats ont davantage consommé en troisième semaine en comparaison avec les deux premières semaines et en quatrième semaine en comparaison avec les trois autres semaines.

IV.3.2. Effet de l'hydrolysate et de sa matière première sur le poids

Le poids des animaux a également été suivi tout au long de cette première phase d'expérimentation. Pour cela, les animaux ont été pesés une fois par semaine. La **Figure 56** présente les résultats obtenus.



**Figure 56.** Effet de l'hydrolysate PWF sur le poids des animaux.

Les valeurs sont les moyennes du poids de chaque animal  $\pm$  SEM par groupe ( $n = 8$ ) mesuré chaque semaine. Le traitement statistique réalisé par modèle mixte suivi d'une analyse posthoc de Student. Les quatre groupes ont reçu une alimentation standard avec Ctrl : groupe en régime standard recevant de l'eau par voie oro-gastrique, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 500 mg.

Bien que les résultats montrent une prise de poids plus faible pour le groupe HP500 et pour le groupe MP500 à partir de la deuxième semaine (J8) jusqu'à la dernière semaine (J27), Le modèle mixte sur la durée totale de l'étude n'a pas mis en avant d'effet groupe significatif ( $p$  value = 0,2236) ni un effet groupe x moment ( $p$  value = 0,224). Ainsi, le poids des animaux passent de  $262,6 \pm 4,4$  g au jour J1 à  $354,9 \pm 11,18$  g au jour J27 pour le groupe contrôle, de  $262,7 \pm 3,92$  g à  $364,9 \pm 5,74$  g au jour J27 pour le groupe HP250, de  $262,7 \pm 3,92$  g à  $353,2 \pm 7,22$  g au jour J27 pour le groupe HP500 et de  $262,8 \pm 4,06$  g à  $348,6 \pm 6,78$  g au jour J27 pour le groupe MP500. Les comparaisons par paire sur l'interaction groupe\*moment ont permis cependant de mettre en évidence une prise de poids significativement plus faible du groupe MP500 en comparaison du groupe HP250 en semaine 3 et des groupes MP500 et HP500 en comparaison du groupe HP250 en semaine 4.

La représentation des résultats en boîte à moustache permet de visualiser la variabilité intragroupe. Le gavage oro-gastrique journalier avec l'hydrolysate PWF et la matière première

diminue la variabilité intragroupe de la prise de poids par rapport au groupe contrôle. En effet, la variabilité des poids dans les différents groupes, approximativement équivalente au début de l'expérimentation, augmente au fur et à mesure des semaines dans le groupe contrôle.

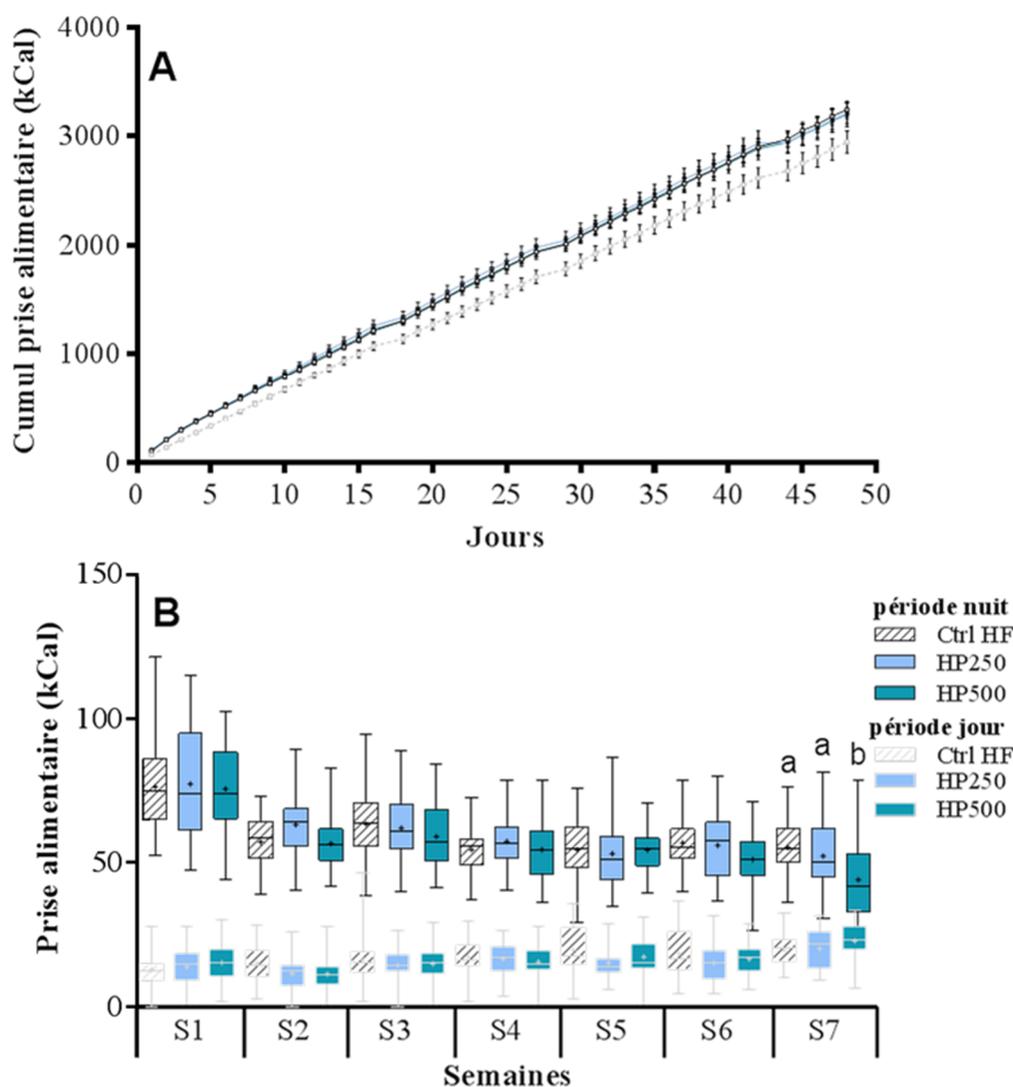
#### **IV.4. Conclusion**

Bien qu'une légère diminution de la prise alimentaire et du poids pour les groupes HP500 et MP500 semaine par semaine ait pu être observée en comparaison du groupe contrôle, cette première phase d'expérimentation n'a pas permis de mettre en évidence un effet significatif de l'hydrolysat PWF sur la régulation de la prise alimentaire et de la prise de poids. Une légère diminution de la prise alimentaire est également observée pour le groupe HP500 et MP500 en comparaison du groupe HP250 ; et une diminution de la prise de poids a été observée pour les groupes MP500 (semaine 3 et 4) et HP500 (semaine 4) en comparaison du groupe HP250.

#### **IV.5. Effet de l'hydrolysat PWF sur un modèle d'étude de rat adulte en régime riche en matières grasses**

##### **IV.5.1. Effet de l'hydrolysat PWF sur la prise alimentaire**

Comme en première phase d'expérimentation, la consommation des animaux a été suivie tout au long de l'étude. Ici, la pesée des aliments a été réalisée deux fois par jour afin d'obtenir la consommation sur la période nocturne (17h30-5h30 + 2h lumière allumée) et sur la période diurne (7h30-17h30). Les résultats obtenus pour la prise alimentaire cumulée et la consommation sont présentés dans la figure ci-dessous (*Figure 57*).



**Figure 57.** Effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de la prise alimentaire.

La prise alimentaire cumulée représente le cumul de la consommation moyenne de chaque groupe par jour (A) et la prise alimentaire moyenne a été déterminée en moyennant la prise alimentaire journalière de chaque groupe semaine par semaine sur la période jour (07h30-17h30) et sur la période nuit (17h30-07h30) (B). Le cumul de la prise alimentaire et la prise alimentaire sont exprimés en énergie ingérée (exprimée en kcal) correspondant à la somme des apports énergétiques venant de l'alimentation et de la charge oro-gastrique. Les valeurs sont les moyennes  $\pm$  SEM (n = 8). Les moyennes de la prise alimentaire ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par modèle mixte suivie d'une analyse posthoc de Student. Les trois groupes sont en régime riche en matières grasses avec Ctrl HF : groupe recevant de l'eau, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 500 mg par gavage oro-gastrique. La consommation cumulée du groupe contrôle physiologique (Ctrl) est représentée pour en gris.

Le cumul de la prise alimentaire sur la période expérimentale montre dans un premier temps la différence de prise calorique entre les trois groupes en régime HF et le groupe contrôle physiologique en régime standard (**Figure 57A**). L'apport énergétique différent des deux régimes (3 et 4 kcal.kg<sup>-1</sup> respectivement pour le régime de maintenance et le régime HF) explique cette différence. La prise énergétique cumulée pour les trois groupes HF est similaire

jusqu'au jour J45, jour à partir duquel le groupe HP500 a une consommation légèrement plus faible que les deux autres groupes.

La **Figure 57B** montre que la prise énergétique des animaux, semaine par semaine, en période jour (10h jour) est globalement stable au cours des six premières semaines pour les trois groupes en régime HF. A la septième semaine, la consommation du groupe HP500 ( $22,84 \pm 1,34$  kCal) est légèrement plus élevée que le groupe Ctrl HF ( $19,70 \pm 1,12$  kCal) et le groupe HP250 ( $20,25 \pm 1,46$  kCal). Sur la période nuit (12h nuit + 2h jour), la moyenne de la consommation de chaque groupe est stable (entre  $52,86 \pm 1,76$  et  $63,08 \pm 1,91$  kCal/semaine) après la première semaine (environ 75 kCal consommés) d'adaptation au nouveau régime et ce jusqu'à la cinquième semaine. A partir de la sixième semaine, la prise énergétique du groupe HP500 commence à diminuer pour atteindre  $50,84 \pm 2,02$  kCal en semaine 6 et  $43,92 \pm 2,80$  kCal en semaine 7 pour laquelle elle est significativement plus faible que celle des groupes Ctrl HF et HP250 qui ont respectivement consommé  $54,98 \pm 1,81$  et  $52,06 \pm 2,52$  kCal en semaine 7.

Les modèles mixtes réalisés sur la période totale de l'étude pour les deux périodes séparées (nuit et jour), ainsi que sur la période 24h n'ont pas mis en évidence d'effet groupe significatif. Les *p values* obtenues pour l'effet groupe sont reportées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 26**).

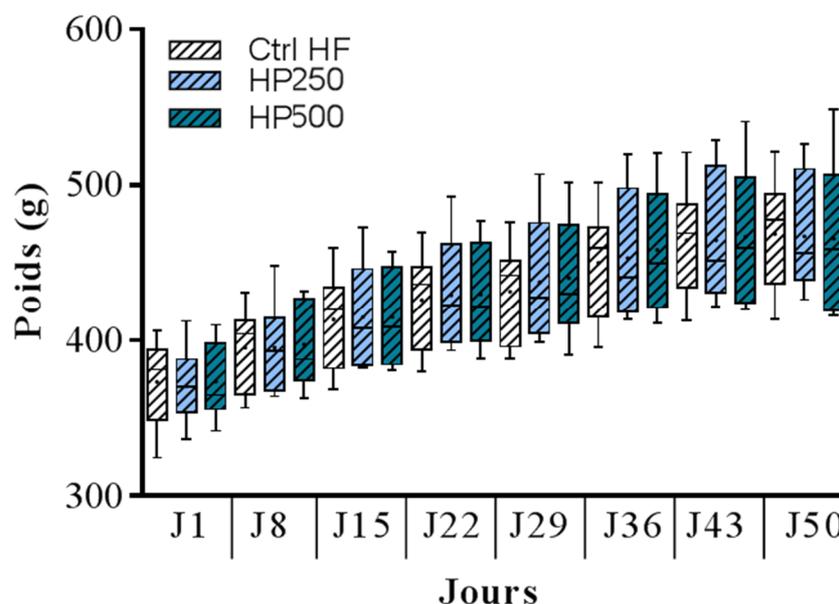
**Tableau 26.** Synthèse des *p values* obtenues pour l'effet groupe sur la période jour (7H30-17h30), nuit (17h30-7h30) et sur 24h issues des modèles mixtes sur la prise alimentaire.

Analyse	<i>P value</i> (Période diurne)	<i>P value</i> (Période nocturne)	<i>P value</i> (Période sur 24h)
Modèle mixte sur la durée totale de l'étude	0,1065	0,5895	0,8825
Modèle mixte Semaine 1	0,3858	0,9763	0,9954
Modèle mixte Semaine 2	0,1532	0,1051	0,1656
Modèle mixte Semaine 3	0,5374	0,4162	0,4359
Modèle mixte Semaine 4	0,6226	0,5993	0,9927
Modèle mixte Semaine 5	0,2203	0,8544	0,8205
Modèle mixte Semaine 6	0,2126	0,2321	0,4817
Modèle mixte Semaine 7	0,3433	0,0161	0,1782

En revanche, un effet groupe a été observé sur la période nuit (17h30-7h30) à la 7<sup>e</sup> semaine ( $p$  value = 0,0161). Les comparaisons par paire du modèle mixte effectué sur la 7<sup>ème</sup> semaine montrent une consommation significativement plus faible du groupe HP500 par rapport au groupe Ctrl HF et au groupe HP250 (**Figure 57B**).

#### IV.5.2. Effet de l'hydrolysate sur le poids

Comme lors de la première phase, le poids des animaux a également été mesuré une fois par semaine. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure suivante (**Figure 58**).



**Figure 58.** Effet de l'hydrolysate PWF sur le poids des animaux.

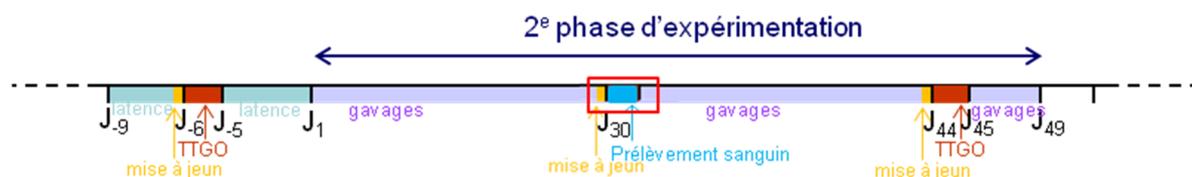
Les valeurs sont les moyennes du poids de chaque animal  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). Les moyennes ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par modèle mixte suivi d'une analyse posthoc de Student. Les trois groupes sont en régime riche en matières grasses avec Ctrl HF : groupe recevant de l'eau, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 500 mg par gavage oro-gastrique.

Tout au long de la deuxième phase d'expérimentation, les animaux ont tous pris du poids quelque soit le groupe passant de  $373,5 \pm 27,5$  g à  $470 \pm 34,3$  g pour le groupe Ctrl HF, de  $370,7 \pm 23,8$  g à  $469,0 \pm 38,7$  g pour le groupe HP250 et de  $373,7 \pm 24,3$  g à  $462,3 \pm 52,5$  g pour le groupe HP500. La représentation des résultats en boîte à moustache permet de mettre en évidence la grande variabilité intragroupe quel que soit le groupe. Le modèle mixte sur toute la durée de l'étude ne montre pas d'effet groupe ( $p$  value = 0,9508).

## IV.6. Dosage des hormones circulantes et étude d'autres marqueurs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique

### IV.6.1. Effet de l'hydrolysat PWF après un mois du régime HF vs régime standard

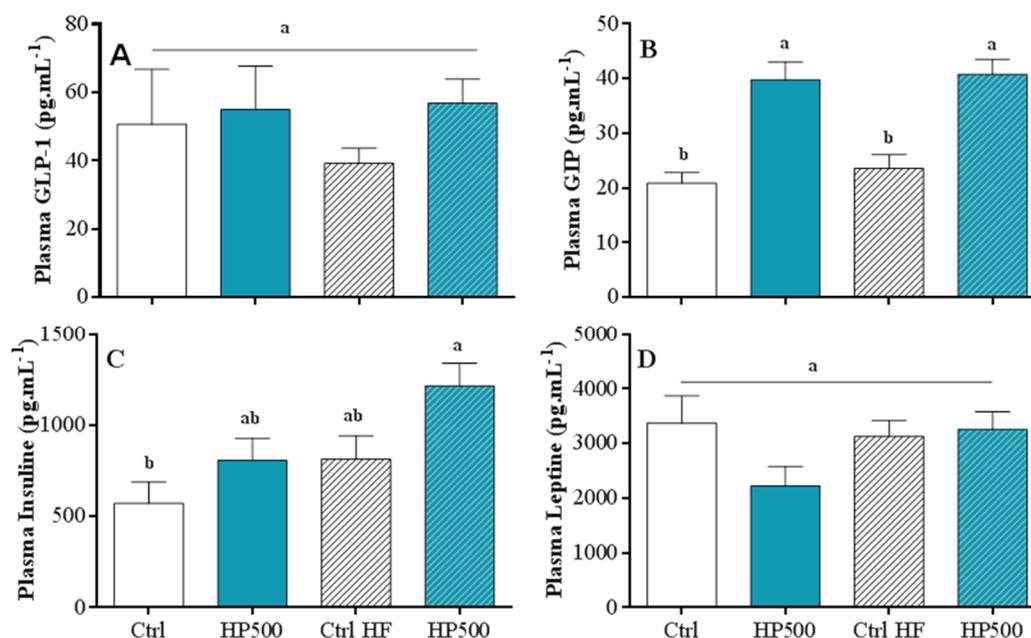
L'effet de l'hydrolysat PWF sur la modulation de certaines hormones intervenant dans la régulation de l'homéostasie énergétique a été mesuré après un mois d'expérimentation (**Figure 59**).



**Figure 59.** Schéma du protocole expérimental de la deuxième phase d'expérimentation.

Un prélèvement sanguin a été réalisé après un mois (J30) de mise en régime HF afin de mesurer l'effet de l'hydrolysat PWF sur la modulation de différentes hormones intestinales (GLP-1, GIP, insuline, leptine).

Les rats maintenus à jeun depuis 12h ont été gavés comme les jours précédents puis prélevés exactement 30 minutes après l'administration. Les taux d'hormones des rats ayant suivi un régime standard (Teklad 2016) pendant 30 jours comparés à ceux des rats ayant suivi un régime riche en matières grasses (45%) sont comparés dans la **Figure 60**.



**Figure 60.** Impact du régime alimentaire et de l'hydrolysat sur les concentrations plasmatiques des hormones intervenant dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

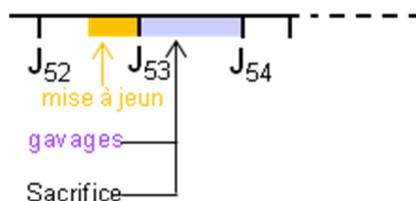
Les prélèvements sanguins ont été réalisés après une nuit de mise à jeun et un prélèvement 30 min après l'administration orale de l'hydrolysat PWF ou celle de l'eau. Les taux circulants de GLP-1 (A), de GIP (B), d'insuline (C) et de leptine (D) ont ensuite été déterminés par dosage RIA et Luminex. Barre avec rayures = rats en régime HF. Les valeurs sont les moyennes intragroupes ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Les moyennes ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Ctrl : groupe en régime standard recevant de l'eau par voie oro-gastrique, Ctrl HF : groupe en régime riche en matières grasses recevant de l'eau; HP500 : groupe recevant de l'hydrolysat PWF à 500 mg.

Les résultats obtenus montrent en premier lieu que le régime alimentaire des animaux n'influence ni les concentrations plasmatiques de GLP-1 (**Figure 60A**), ni celles de leptine (**Figure 60D**). En effet, aucune différence significative n'a été observée entre les contrôles HF et Standard ou entre les groupes HP500 en régime HF et HP500 Standard. Concernant l'effet de l'hydrolysat, l'administration de HP500 n'a pas engendré d'augmentation des concentrations de GLP-1 circulantes quel que soit le régime considéré. En revanche, l'hydrolysat PWF stimule significativement la sécrétion de GIP par rapport au contrôle et ce, pour les deux régimes alimentaires (**Figure 60B**). Ainsi, les animaux ayant reçu HP500 ont un niveau de GIP circulant de  $39,78 \pm 3,30$  pg.mL<sup>-1</sup> (régime standard) et de  $40,83 \pm 2,70$  pg.mL<sup>-1</sup> (régime HF) alors que les valeurs obtenues pour les contrôles des groupes en régime standard et en régime HF sont respectivement de  $20,91 \pm 1,94$  pg.mL<sup>-1</sup> et de  $23,60 \pm 2,50$  pg.mL<sup>-1</sup>. Concernant le niveau circulant de leptine (**Figure 60D**), les groupes contrôles et le groupe HP500 en régime HF ont des niveaux légèrement plus élevés que celui du groupe HP500 en régime standard, mais il n'y a pas de différence significative. Après un mois de régime HF, seuls les niveaux d'insuline varient entre les groupes en régime standard et les groupes en

régime HF. Bien que les résultats obtenus ne soient pas significatifs, le groupe HP500 en régime standard ( $806,5 \pm 122 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) et le groupe contrôle en régime HF ( $814,3 \pm 128,9 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) ont des niveaux d'insuline circulants légèrement plus élevés que celui du groupe contrôle en régime standard ( $572,0 \pm 117,7 \text{ pg.mL}^{-1}$ ). Les résultats obtenus pour le groupe HP500 en régime HF ( $1217,0 \pm 122,9 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) montrent que l'administration de l'hydrolysate a engendré une augmentation significative de la concentration d'insuline par rapport à l'eau (contrôle) en régime standard.

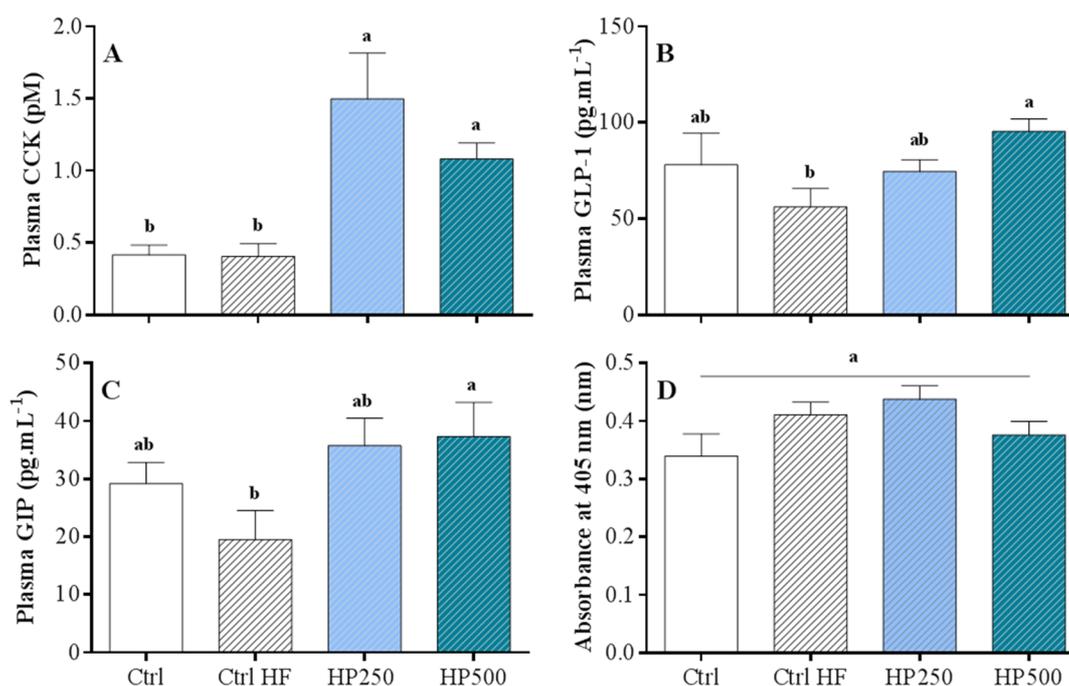
#### IV.6.2. Effet de l'hydrolysate PWF après deux mois du régime HF sur certains marqueurs de la régulation de l'homéostasie énergétique.

L'effet court terme de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'homéostasie énergétique a été mesuré après quasiment deux mois d'expérimentation (**Figure 61**).



**Figure 61.** Schéma du protocole expérimental de la troisième phase d'expérimentation.

Pour cela, les rats ont reçu leur traitement habituel après une nuit de mise à jeun et le sang a été prélevé 30 min après le gavage. La figure ci-dessous (**Figure 62**) présente les résultats obtenus pour les niveaux circulants de CCK, de GLP-1, de GIP plasmatique ainsi que pour la mesure de l'activité de la DPP-IV plasmatique.



**Figure 62.** Effet de l'hydrolysate PWF sur certains marqueurs de la régulation à court terme de l'homéostasie énergétique.

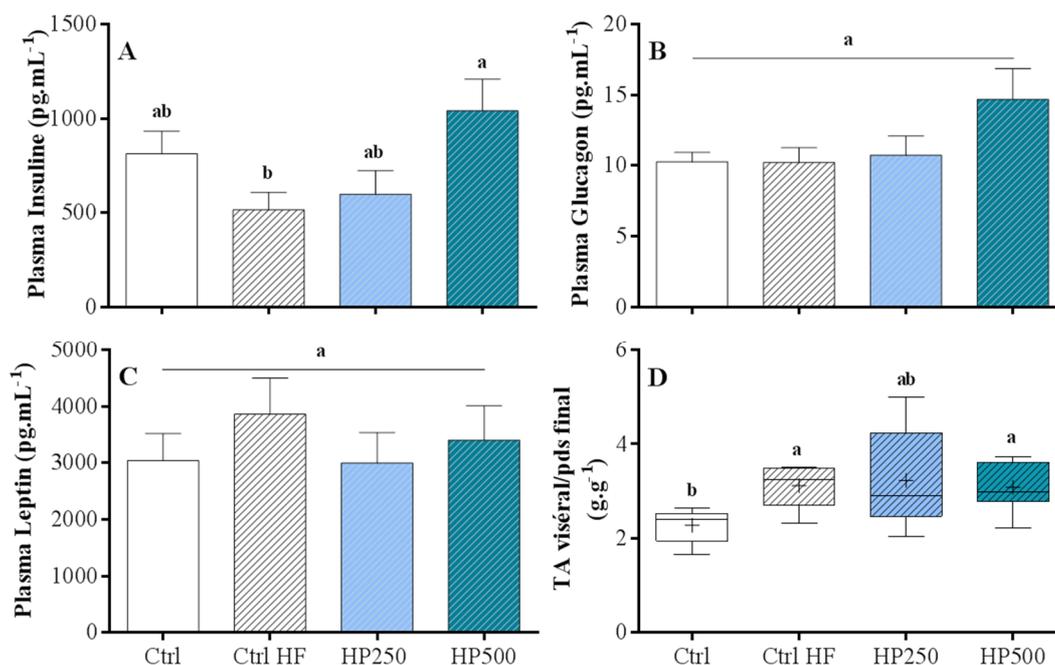
Les prélèvements sanguins ont été réalisés après une nuit de mise à jeun et un prélèvement 30 min après l'administration orale de l'hydrolysate PWF ou celle de l'eau. Les taux circulants de CCK (A), de GLP-1 (B), de GIP (C) et l'activité de la DPP-IV (D) ont ensuite été déterminés par dosage RIA, Luminex et dosage enzymatique. L'activité de la DPP-IV est estimée par l'absorbance du produit de l'hydrolyse du gly-pro-pNA par la DPP-IV plasmatique après 1H de réaction à 37°C. Les valeurs sont les moyennes intragroupes ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Les moyennes ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Ctrl : groupe en régime standard recevant de l'eau par voie oro-gastrique. Trois groupes en régime riche en matières grasses avec Ctrl HF : groupe recevant de l'eau, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 500 mg. Ctrl : groupe en régime standard recevant de l'eau par voie oro-gastrique et les trois groupes en régime riche en matières grasses avec Ctrl HF : groupe recevant de l'eau, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 500 mg.

L'administration de l'hydrolysate aux deux doses stimule significativement la sécrétion de CCK avec des valeurs de 1,5 et 1,1 pM pour HP250 et HP500 contre 0,4 pM pour le contrôle (**Figure 62A**). Les concentrations de GLP-1 plasmatiques (**Figure 62B**) obtenues sont de  $56,22 \pm 9,48$  pg.mL<sup>-1</sup> pour le groupe Ctrl HF, de  $74,59 \pm 6,09$  pg.mL<sup>-1</sup> pour le groupe HP250 et de  $95,40 \pm 6,57$  et  $37,32 \pm 5,92$  pg.mL<sup>-1</sup> pour le groupe HP500.

L'effet de l'hydrolysate PWF sur l'inhibition de l'activité DPP-IV a été mesuré via la détermination de l'hydrolyse du substrat Gly-Pro-pNA par l'enzyme DPP-IV plasmatique et la mesure de l'absorbance à 405 nm qui correspond à la quantité de substrat hydrolysé. Les résultats obtenus (**Figure 62D**) ne montrent pas de différences significatives entre les différents groupes, bien que l'activité DPP-IV soit légèrement plus faible pour le groupe

HP500 en comparaison aux deux autres groupes HF, avec une activité proche de celle mesurée pour le Ctrl physiologique.

Au cours de cette étude, l'effet de l'hydrolysat PWF sur l'homéostasie énergétique à long terme a également été suivi après les deux mois d'expérience. Les deux hormones intervenant dans la régulation à long terme de l'homéostasie énergétique sont l'insuline et la leptine. Comme la leptine est sécrétée par les adipocytes, le tissu adipeux viscéral (tissu adipeux de l'épididyme et le tissu rétropéritonéal) a été prélevé au moment de la mise à mort et pesé. En plus de jouer un rôle dans la prise alimentaire, l'insuline joue également un rôle dans la régulation de l'homéostasie glucidique. L'homéostasie glucidique est régulée par une boucle insuline/glucagon. En effet, l'insuline régule la glycémie en diminuant les niveaux de glucose sanguin après un repas alors que le glucagon va permettre de maintenir un niveau basal de glucose sanguin entre les repas. Ainsi, il a été décidé de mesurer également le glucagon qui régule avec l'insuline la glycémie. Les résultats sont présentés dans la **Figure 63**.



**Figure 63.** Effet de l'hydrolysat PWF sur certains marqueurs de la régulation de l'homéostasie énergétique à long terme.

Les prélèvements ont été réalisés après une nuit de mise à jeun et un prélèvement 30 min après l'administration orale de l'hydrolysat PWF ou celle de l'eau. Les taux circulants d'insuline (A), de glucagon (B), de leptine (C) et le poids du tissu adipeux viscéral (D) ont ensuite été déterminés. Les valeurs sont les moyennes intragroupes ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Les moyennes ne partageant pas une lettre identique ont été considérées comme statistiquement différentes après traitement statistique réalisé par une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Ctrl : groupe en régime standard recevant de l'eau par voie oro-gastrique. Trois groupes en régime riche en matières grasses avec Ctrl HF : groupe recevant de l'eau, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysat PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysat PWF à 500 mg.

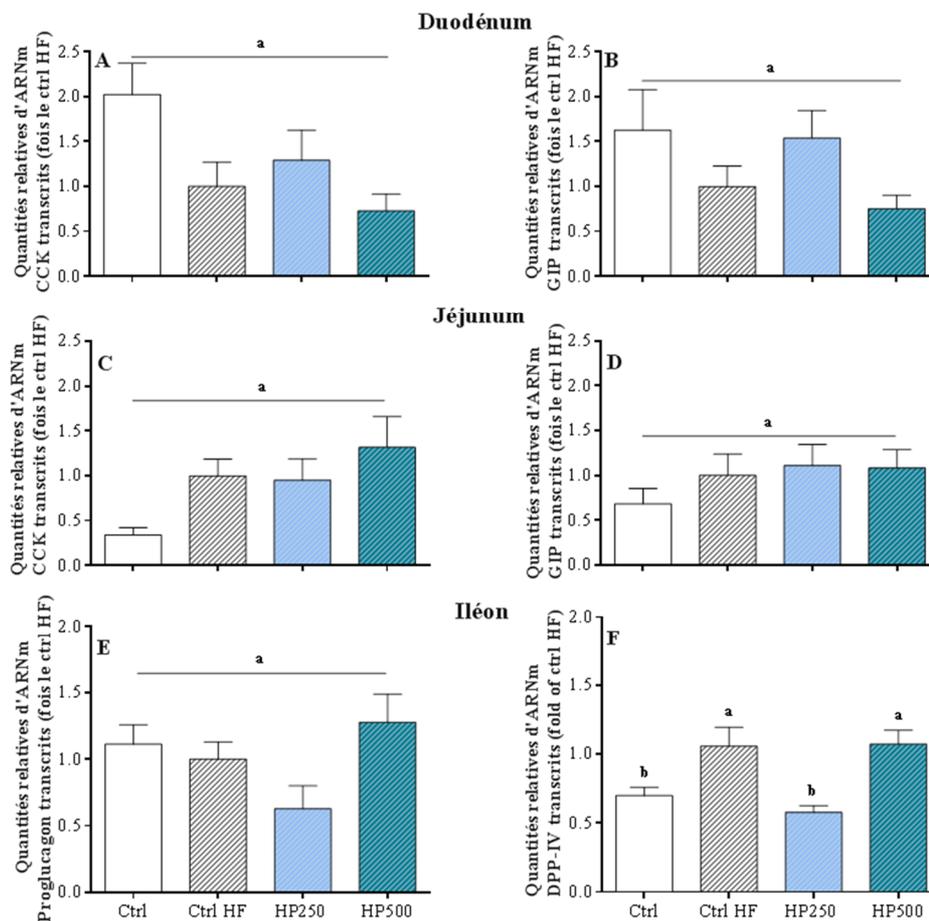
Les résultats obtenus pour les niveaux d'insuline plasmatique (*Figure 63A*) indiquent une sécrétion significativement plus élevée pour le groupe HP500 par rapport au contrôle HF avec des valeurs respectives de  $1042 \pm 167,8 \text{ pg.mL}^{-1}$  et  $515,6 \pm 92,37 \text{ pg.mL}^{-1}$ . Cependant, le niveau d'insuline plasmatique du groupe HP500 n'est pas significativement différent de celui du groupe HP250 ( $597,8 \pm 126,2 \text{ pg.mL}^{-1}$ ) ni de celui du groupe contrôle en régime standard ( $813,3 \pm 120,5 \text{ pg.mL}^{-1}$ ). Concernant le glucagon, bien qu'aucune différence significative ne soit observée entre les groupes, le taux de glucagon circulant est plus élevé chez les animaux du groupe HP500 (*Figure 63B*). Concernant les niveaux circulants de leptine, aucune différence n'a été observée entre les groupes alors que, comme attendu par l'influence du régime, la masse de tissu adipeux viscéral des animaux ayant été nourris avec le régime HF est significativement supérieure à celle des animaux contrôle nourris avec le régime standard (*Figure 63C, D*). Ainsi, les masses obtenues sont de  $3,12 \pm 0,16 \text{ g.g}^{-1}$  de rat pour le groupe contrôle HF, de  $3,09 \pm 0,18 \text{ g.g}^{-1}$  de rat pour le groupe HP500 et de  $2,28 \pm 0,13 \text{ g.g}^{-1}$  de rat pour le groupe contrôle en régime standard. Même si la moyenne de la masse du tissu viscéral obtenue pour le groupe HP250 ( $3,23 \pm 0,36 \text{ g.g}^{-1}$  de rat) est plus élevée que celle des autres groupes, elle n'est pas significativement différente ce qui est sans doute dû à une plus grande variabilité intragroupe.

#### **IV.7. Effet de l'hydrolysate sur la régulation de l'expression des gènes codant certains marqueurs de la régulation de l'homéostasie énergétique**

En complément du suivi de certains marqueurs de l'homéostasie énergétique, cette étude a permis de mesurer l'effet du gavage quotidien sur la régulation de l'expression des gènes codant les hormones étudiées et d'autres marqueurs de l'homéostasie. Pour cela, le duodénum et le jéjunum ont été prélevés au moment de la mise à mort afin de mesurer l'expression des gènes codants les CCK et le GIP. L'iléon a quant à lui été prélevé pour déterminer l'expression des gènes codant le GIP, la DPP-IV et le GLP-1. Enfin, l'hypothalamus a également été conservé afin de mesurer l'expression des gènes codant certains neurotransmetteurs impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, comme la proopiomélanocortine (POMC), le Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript (CART), le neuropeptide Y (NPY) et l'Agouti Related Peptide (AgRP).

IV.7.1. Mesure de l'expression des gènes étudiés le long de l'intestin

Les résultats obtenus pour l'effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'expression du gène codant les CCK et le GIP sont présentés dans la **Figure 64**.



**Figure 64.** Effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'expression des gènes codant les CCK et le GIP au niveau du duodénum et du jéjunum et des gènes codant le proglucagon et la DPP-IV au niveau de l'iléon.

La quantité relative de transcrite des gènes codant CCK (A), GIP (B) dans le duodénum, pour CCK (C), GIP (D) dans le jéjunum et de GLP-1 (E) et DPP-IV (F) a été mesurée par qPCR. Le gène codant la GAPDH a été utilisé comme gène de référence. La quantité relative de transcrits des gènes a été obtenue selon la méthode du  $\Delta\Delta C_t$  en référence au niveau de transcrits du contrôle HF. Les valeurs sont les moyennes intragroupes ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. L'analyse statistique par ANOVA à un facteur suivi d'un test de Dunnett par rapport au ctrl HF ( $p < 0,05$ ) a permis de déterminer la significativité des différences de niveau d'expression, indiquées par des lettres différentes. Ctrl : groupe en régime standard recevant de l'eau par voie oro-gastrique. Trois groupes sont en régime riche en matières grasses avec Ctrl HF : groupe recevant de l'eau, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 500 mg.

Les résultats obtenus pour les gènes codant les CCK, le GIP et le proglucagon n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les groupes. Cependant, l'expression du gène codant les CCK (**Figure 64A**) pour le groupe HP500 ( $0,73 \pm 0,19$  fois le

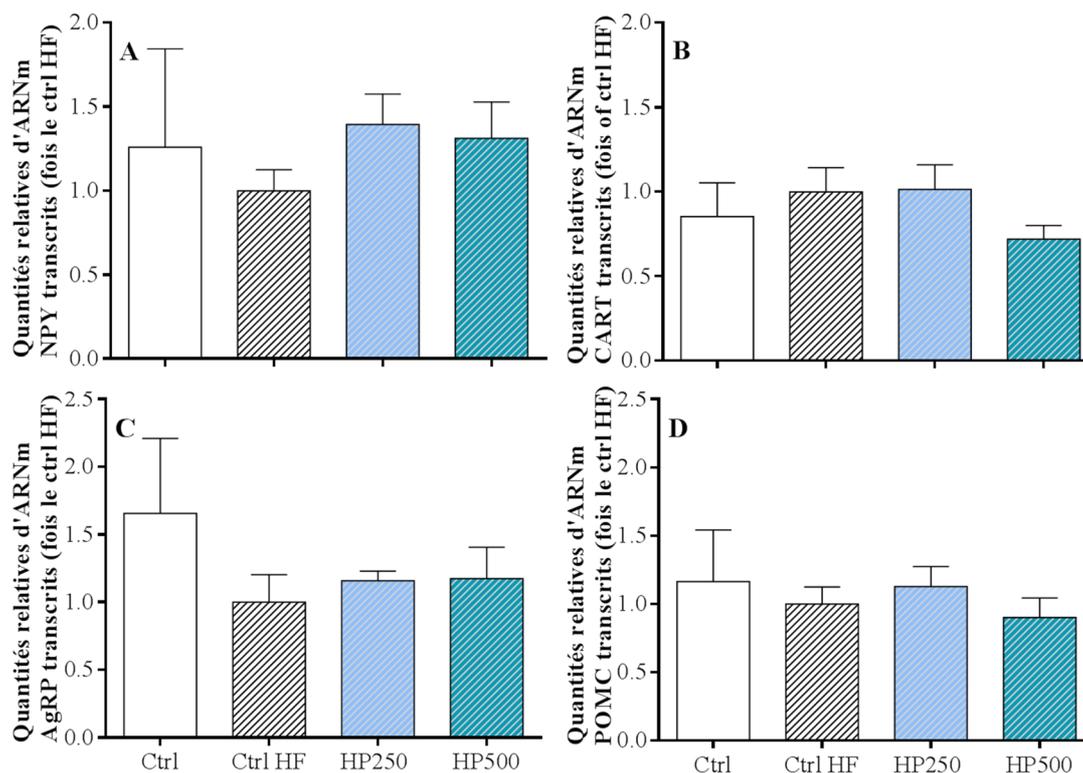
contrôle HF) est légèrement plus faible comparée à celle du groupe contrôle HF dans le duodénum. Pour le groupe HP250, l'expression du gène codant les CCK est légèrement plus élevée que celle du contrôle HF. Cette même tendance est observée pour l'expression du gène codant le GIP (**Figure 64B**), le groupe HP250 montre un niveau d'expression légèrement supérieur à celui du contrôle HF avec  $1,54 \pm 0,31$  fois le contrôle HF. L'expression du gène codant GIP pour HP500 est légèrement plus faible que celle du contrôle en régime HF.

Contrairement à la tendance observée dans le duodénum, une légère augmentation de l'expression du gène codant les CCK (**Figure 64C**) est observée pour le groupe HP500 ( $1,32 \pm 0,34$  fois le contrôle HF) par rapport au groupe contrôle en régime HF. Le niveau d'expression pour ce même gène dans le groupe HP250 est légèrement plus faible ( $0,95 \pm 0,24$  fois le contrôle) que celui du groupe contrôle HF. Les résultats sur l'expression du gène codant le GIP (**Figure 64D**) montrent que les animaux des groupes contrôle en régime standard et contrôle en régime HF ont un niveau d'expression similaire. Le groupe HP500 induit un niveau d'expression légèrement plus élevé que le groupe contrôle en régime HF avec un niveau d'expression qui est de  $1,09 \pm 0,20$  fois le contrôle HF.

Les résultats obtenus concernant l'expression du gène codant le proglucagon (**Figure 64E**) ne montrent pas de différences significatives entre les groupes. Les animaux du groupe HP500 présentent cependant un niveau d'expression légèrement plus élevé ( $1,28 \pm 0,21$  fois le contrôle HF). A l'inverse, les animaux du groupe HP250 ont un niveau d'expression du gène codant le proglucagon légèrement moins élevé avec une expression de  $0,63 \pm 0,17$  fois le contrôle HF. Concernant la modulation de l'expression du gène codant la DPP-IV (**Figure 64F**), le groupe HP250 et le groupe contrôle en régime standard présentent des niveaux d'expression significativement plus faibles que celui du contrôle HF. Les valeurs obtenues sont respectivement de  $0,70 \pm 0,06$  et de  $0,58 \pm 0,05$  fois le contrôle HF pour le groupe contrôle en régime standard et HP250.

#### IV.7.2. Mesure de l'expression des gènes des neurotransmetteurs exprimés dans l'hypothalamus

Les résultats obtenus concernant l'effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'expression des gènes codant la POMC, la CART, le NPY et l'AgRP sont présentés sur la **Figure 65**.



**Figure 65.** Effet de l'hydrolysat PWF sur la régulation de l'expression des gènes codant les neurotransmetteurs exprimés dans l'hypothalamus.

La quantité relative de transcrit des gènes codant NPY (A), AgRP (B), CART (C) et POMC (D) a été mesurée par qPCR. Le gène codant la GAPDH a été utilisé comme gène de référence. La quantité relative de transcrits des gènes a été obtenue selon la méthode du  $\Delta\Delta C_t$  en référence au niveau de transcrits du contrôle HF. Les valeurs sont les moyennes intragroupes ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. L'analyse statistique par ANOVA à un facteur suivi d'un test de Dunnett ( $p < 0,05$ ) a permis de déterminer la significativité des différences de niveau d'expression, indiquées par des lettres différentes. Ctrl : groupe en régime standard recevant de l'eau par voie oro-gastrique et trois groupes sont en régime riche en matières grasses avec Ctrl HF : groupe recevant de l'eau, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysat PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysat PWF à 500 mg.

Les résultats obtenus pour l'expression des gènes codant NPY, AgRP, CART et POMC n'ont montré aucune différence entre les groupes. Cependant, les tendances de chaque groupe pour le gène codant NPY (**Figure 65A**) et AgRP (**Figure 65B**), le groupe contrôle en régime standard a montré une expression pour ces gènes respectifs légèrement supérieure à celle du groupe contrôle en régime HF. Il en est de même pour le groupe HP250 et HP500 pour l'expression du gène codant NPY et légèrement pour l'expression du gène codant AgRP. Concernant l'expression du gène codant CART (**Figure 65C**) et POMC (**Figure 65D**), le groupe HP500 montre un niveau d'expression légèrement plus faible que le groupe contrôle en régime HF. L'expression du gène codant CART chez les animaux du groupe HP250 est identique à celle du groupe contrôle HF et l'expression du gène codant POMC pour ce même groupe est légèrement supérieur à celui du groupe contrôle HF.

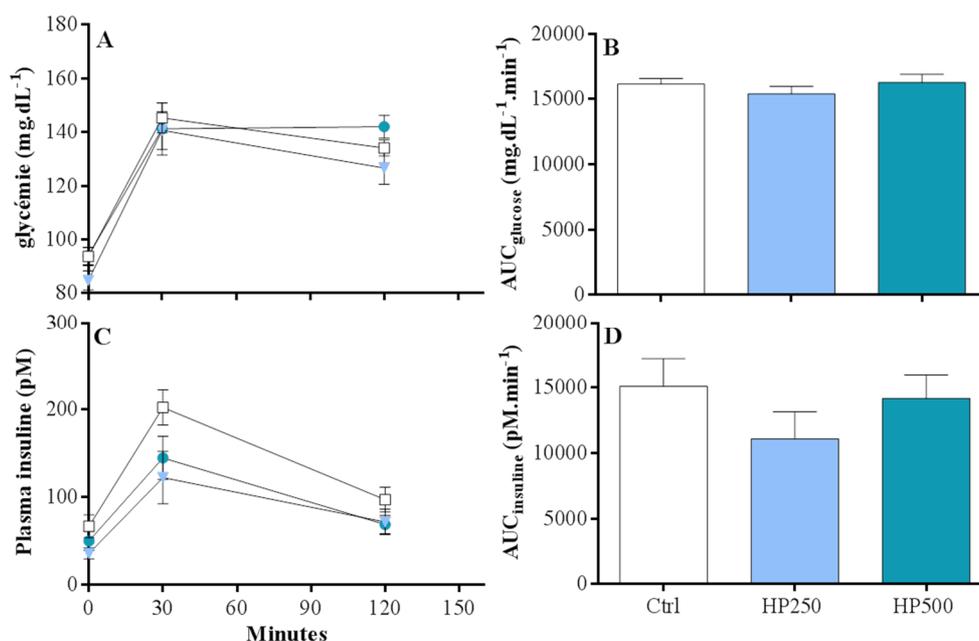
## IV.8. Effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'homéostasie glucidique

Un régime riche en matières grasses (High Fat 45%) a été utilisé afin d'étudier l'effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation du métabolisme énergétique avec pour objectif de mimer une prise alimentaire déséquilibrée mais sans atteindre des points limites fixés, caractéristiques du développement de l'obésité et du diabète de type II. Afin de s'assurer de ne pas atteindre ces états physiologiques chez les animaux, un test de tolérance au glucose a été réalisé tout au long de l'étude. Les deux marqueurs qui ont été suivis sont la glycémie et l'insuline plasmatique.

### IV.8.1. Résultats des tests de tolérance au glucose par voie orale (OGTT)

#### IV.8.1.1. *OGTT avant la mise en place du régime riche en matières grasses*

La figure suivante (**Figure 66**) présente les résultats obtenus pour la glycémie et la concentration d'insuline circulante à la suite du test de tolérance au glucose.



**Figure 66.** Test de tolérance au glucose avant la mise en place du régime riche en matières grasses (J-4).

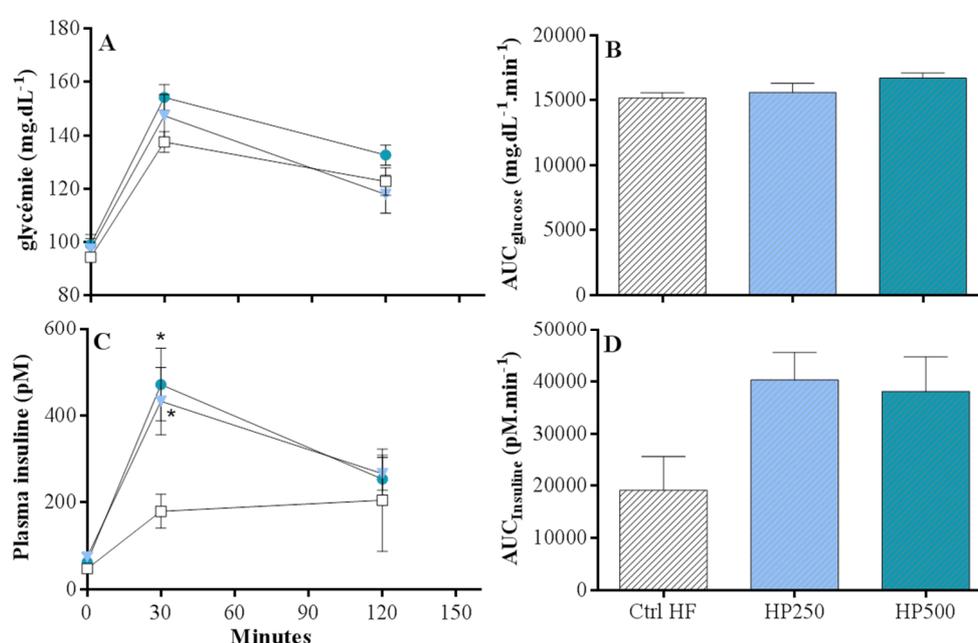
Le test a été réalisé sur des rats mis à jeun pendant une nuit et ayant reçu 1 mL de glucose à 7 g.L<sup>-1</sup> par gavage oro-gastrique. La glycémie (A) a été mesurée avant gavage et à 30 et 120 minutes après gavage, l'aire sous la courbe de la glycémie au cours du temps a été calculée (B), le niveau d'insuline plasmatique (C) a été mesuré avant gavage et à 30 et 120 minutes après gavage, l'aire sous la courbe de l'insulinémie au cours du temps a été calculée (D). Les valeurs sont les moyennes intragroupes (n = 8) ± SEM. Le traitement statistique réalisé est une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett par rapport au Ctrl (p < 0,05). Les trois groupes sont en régime standard de maintenance avec Ctrl : groupe recevant de l'eau, HP250 : groupe destiné à recevoir de l'hydrolysate PWF à 250 mg et HP500 : groupe destiné à recevoir de l'hydrolysate PWF à 500 mg.

Ce premier OGTT a été réalisé 4 jours avant la mise en place du régime riche en matières grasses. Les animaux sont nourris avec un régime standard (Teklad2016) et reçoivent pas de gavage oro-gastrique (**Figure 59**). Les résultats de la glycémie au cours du temps obtenus lors de ce premier OGTT indiquent un pic de la glycémie (**Figure 66A**) au bout de 30 minutes de 145,25 ± 5,60 ; 140,63 ± 7,09 et 141,25 ± 9,71 mg.dL<sup>-1</sup> respectivement pour les groupes contrôle HF, HP250 et HP500. Aucun des groupes ne revient aux valeurs de glycémie mesurées avant le gavage du glucose (93,63 ± 3,34 ; 84,75 ± 3,52 et 93,88 ± 3,30 mg.dL<sup>-1</sup>) au terme des 120 minutes (134,13 ± 5,60 ; 140,63 ± 7,09 et 141,25 ± 9,71 mg.dL<sup>-1</sup>). Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes aux différents temps de prélèvement. Les résultats de l'aire sous la courbe (AUC) (**Figure 66B**) ne montrent aucune différence significative entre les groupes avec des valeurs d'environ 1500 mg.dL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. Concernant les niveaux d'insuline plasmatique, les résultats montrent également un pic au bout de 30 min après le gavage au glucose. Les valeurs obtenues sont respectivement de 202,74 ± 20,22 ; 122,41 ± 29,72 et 144,90 ± 24,68 pM pour le groupe contrôle en régime HF,

HP500 et HP250. Les niveaux de l'insuline plasmatique des trois groupes après 120 min tendent à revenir à leur niveau de base avec des valeurs respectives de  $97,08 \pm 14,19$ ,  $71,73 \pm 14,59$  et de  $68,50 \pm 10,41$  pM pour le groupe contrôle HF et les groupe HP250 et HP500. Enfin, l'aire sous la courbe de l'insuline au cours du temps du groupe HP250 est légèrement inférieure mais de manière non significative aux valeurs d'aire sous la courbe obtenues pour les groupes contrôle HF et HP500.

#### IV.8.1.2. OGTT après 44 jours de régime riche en matières grasses

La figure suivante présente les résultats obtenus pour la glycémie et le niveau circulant d'insuline circulante à la suite du test de tolérance au glucose par voie orale après 44 jours (**Figure 59**) de régime riche en matières grasses (**Figure 67**).



**Figure 67.** Test de tolérance au glucose après 44 jours de régime riche en matières grasses.

Le test a été réalisé sur des rats mis à jeun pendant une nuit et ayant reçus 1 mL de glucose à  $7 \text{ g.L}^{-1}$  par gavage oro-gastrique. La glycémie (A) a été mesurée avant gavage et à 30 et 120 minutes après gavage, l'aire sous la courbe de la glycémie au cours du temps a été calculée (B), le niveau d'insuline plasmatique (C) a été mesuré avant gavage et à 30 et 120 minutes après gavage et l'aire sous la courbe de l'insuline au cours du temps a été calculée (D). Les valeurs sont les moyennes intragroupes ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Le traitement statistique réalisé est une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett par rapport au Ctrl HF ( $p < 0,05$ ) avec \* =  $p$  value  $< 0,05$ . Les trois groupes sont en régime riche en matières grasses avec Ctrl HF : groupe recevant de l'eau, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 500 mg.

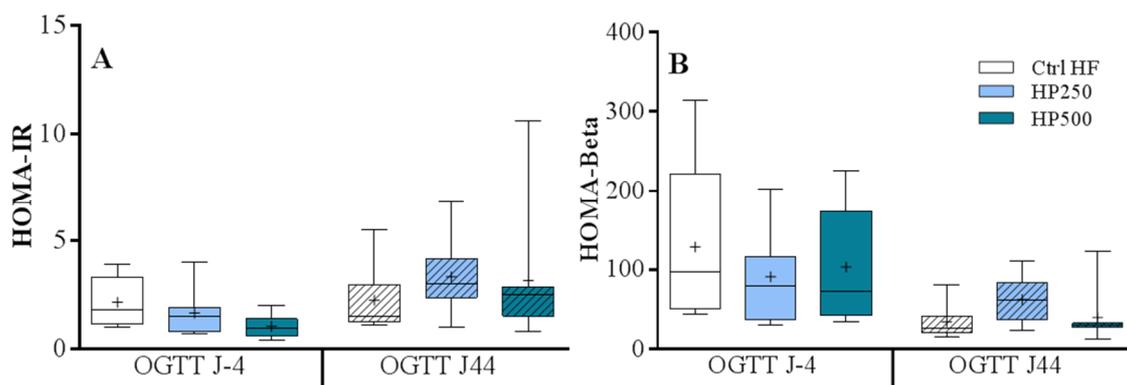
Les résultats obtenus après 44 jours de régime High Fat pour la glycémie (**Figure 67A**) montrent un pic de la glycémie au bout de 30 minutes pour chacun des groupes en régime HF. Les valeurs obtenues 30 min après le gavage sont respectivement de  $137,50 \pm 3,88$  ;  $147,38 \pm$

8,01 et  $154,25 \pm 4,78$  mg.dL<sup>-1</sup> pour les groupes contrôle HF, HP250 et HP500. La glycémie des animaux diminue 120 minutes après la charge de glucose mais n'atteint pas le niveau basal qui est de  $94,25 \pm 1,91$  mg.dL<sup>-1</sup> pour le groupe contrôle HF alors qu'il est respectivement de  $97,36 \pm 3,87$  et  $99 \pm 3,77$  mg.dL<sup>-1</sup> pour les groupes HP250 et HP500. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes aux différents temps de prélèvement. L'aire sous la courbe de la glycémie (**Figure 67B**) mesurée pour chaque groupe n'indique pas non plus de différence significative entre les groupes avec des valeurs respectives de  $15188 \pm 397,5$  ;  $15608 \pm 705,7$  et  $16708 \pm 390,1$  mg.dL<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> pour le groupe contrôle HF, HP250 et HP500.

Les niveaux d'insuline plasmatique obtenus (**Figure 67C**) à la suite de la charge oro-gastrique de glucose montrent un pic après 30 min de gavage pour le groupe HP250 ( $432,17 \pm 77,50$  pM) et HP500 ( $470,51 \pm 83,28$  pM). Même s'il intervient au même moment, ce pic est significativement plus élevé que celui observé avec les animaux du groupe contrôle HF ( $179,67 \pm 77,50$  pM). Les niveaux d'insuline plasmatique pour les deux groupes HP diminuent après 120 min pour atteindre respectivement  $265,66 \pm 37,77$  et  $253,38 \pm 54,98$  pM pour les groupes HP250 et HP500, mais ces valeurs restent plus élevées que celle obtenue avec le groupe Contrôle HF ( $205,01 \pm 117,19$  pM). Aucune différence n'est observée entre les groupes avant le gavage du glucose et après 120 min. L'aire sous la courbe de l'insulinémie (**Figure 67D**) obtenue pour le contrôle HF est plus faible, mais de manière non significative, comparée aux valeurs obtenues avec les deux autres groupes. En effet, l'AUC de l'insulinémie est respectivement de  $19166 \pm 6423$  pM.min<sup>-1</sup> pour le groupe contrôle HF et de  $40312 \pm 5290$  et  $38088 \pm 6692$  pM.min<sup>-1</sup> pour les groupes HP250 et HP500. Ces résultats laissent supposer que le groupe contrôle HF a une déficience dans la sécrétion de l'insuline puisque les niveaux d'insuline plasmatique ne diminuent pas au bout de 2h et que l'aire sous la courbe a légèrement augmenté entre l'OGTT réalisé avant la mise en place du régime riche en matières grasses et celui après 44 jours. Quant au groupe HP500 et HP250, les résultats peuvent laisser supposer que les animaux sont insulino-résistants bien que la glycémie semblent normales par rapport à ce qui a été observé lors de l'OGTT avant la mise en place du régime HF.

#### IV.8.2. Scores de la résistance à l'insuline (HOMA-IR) et du fonctionnement des cellules $\beta$ -pancréatiques (HOMA- $\beta$ )

A partir des valeurs obtenues au cours des OGTT, le calcul du score de l'insulino-résistance (HOMA-IR) et du score du fonctionnement des cellules  $\beta$ -pancréatique (HOMA- $\beta$ ) permet de mesurer la mise en place de troubles métaboliques. Ces deux scores sont calculés à partir de la glycémie et de l'insulinémie à jeun. Les résultats sont présentés dans la **Figure 68**.



**Figure 68.** Effet du régime riche en matières grasses sur la résistance à l'insuline et la fonctionnalité des cellules  $\beta$ -pancréatiques.

Les scores HOMA-IR (A) et de l'HOMA- $\beta$  (B) ont été calculés à partir de la glycémie et du niveau d'insuline plasmatique à jeun des rats. Les valeurs sont les moyennes intragroupes ( $n = 8$ )  $\pm$  SEM. Le traitement statistique réalisé est une ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett par rapport au Ctrl HF ( $p < 0,05$ ). Les trois groupes sont nourris par un régime riche en matières grasses avec Ctrl HF : groupe recevant de l'eau, HP250 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 250 mg et HP500 : groupe recevant de l'hydrolysate PWF à 500 mg.

Plus le score de l'HOMA-IR est élevé et plus les animaux sont insulino-résistants. Sur cette base, les résultats obtenus pour le score de l'HOMA-IR (**Figure 68A**) indiquent une légère augmentation de l'insulino-résistance des groupes en régime HF après un mois et demi de régime riche en matières grasses, et ce comparé à la moyenne des groupes avant la mise en place du régime HF, mais sans qu'aucune différence significative ne soit observée entre les différents groupes. Le score de l'HOMA- $\beta$  (**Figure 68B**) est un score permettant de mesurer la fonctionnalité des cellules  $\beta$ -pancréatiques. Plus ce score est faible et plus les animaux sont susceptibles de présenter un dysfonctionnement des cellules  $\beta$ -pancréatiques. Les résultats obtenus montrent une diminution du score de l'HOMA- $\beta$  après 44 jours de régime riche en matières grasses mais sans aucune significativité entre les groupes. Ces résultats tendent à montrer que les animaux traités n'ont pas encore développé de désordres métaboliques après avoir été soumis à un régime riche en matières grasses pendant 44 jours.

#### **IV.9. Conclusion sur l'effet du régime HF et de HP sur l'homéostasie énergétique**

Le test de tolérance au glucose a été réalisé afin de s'assurer que les animaux ne développaient pas de troubles métaboliques. Les résultats des OGTT réalisés ont permis de montrer qu'il n'y avait pas de différences entre les groupes pour l'insuline et la glycémie. Cependant entre le premier OGTT réalisé 4 jours avant le régime HF et l'OGTT après 44 jours de régime, l'aire sous la courbe de l'insuline est en moyenne plus élevée à J44 qu'à J-4. De plus, la charge de glucose n'a pas induit un pic pour le groupe contrôle HF au bout de 30 min lors de l'OGTT réalisé 44 jours après la mise en place du régime riche en matières grasses. Ces résultats indiquent qu'il y a un début d'insulino-résistance dans la sécrétion d'insuline qui se met en place suite au régime HF. En effet, l'augmentation de la sécrétion d'insuline entre les deux OGTT, n'induit pas une diminution de la glycémie plus importante pour les groupes HP. Afin de vérifier ces résultats, les scores de l'insulino-résistance (HOMA-IR) et du fonctionnement des cellules  $\beta$ -pancréatiques (HOMA- $\beta$ ) ont été calculés. Les résultats obtenus n'ont pas montré d'effet significatif entre les groupes avant le régime HF et 44 jours après le régime HF pouvant laisser supposer que les rats n'ont pas développé à la fin de l'expérimentation une insulino-résistance ou une déficience dans la sécrétion de l'insuline.

#### **V. Conclusion**

L'objectif de cette étude a été de mesurer l'effet de l'hydrolysat PWF sur la régulation de la prise alimentaire et la régulation du poids à moyen terme sur des animaux en croissance et à long terme sur des animaux adultes soumis à un régime riche en matières grasses (45%). L'utilisation du régime riche en matières grasses a permis de mimer chez le rat l'effet potentiel de l'hydrolysat PWF sur des sujets exposés à un déséquilibre alimentaire qui mène au développement de l'obésité et du diabète de type II. L'hydrolysat PWF a permis d'induire une diminution de la prise alimentaire au bout de sept semaines de régime riche en matières grasses, mais sur la consommation nuit (12h nuit + 2h jour) uniquement. L'hydrolysat PWF n'a pas induit de diminution significative du poids au cours de ces deux expériences. Cependant, il a été montré à la fin de la première expérimentation que les groupes recevant l'hydrolysat PWF, ainsi que celui recevant sa matière première, possédaient une plus faible variabilité intragroupe en comparaison à celle du groupe Contrôle.

Au cours de cette étude, les effets de l'hydrolysat PWF sur certains marqueurs hormonaux et enzymatiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique ont été mesurés. Les

résultats mettent en évidence une augmentation significative de la sécrétion de GIP et d'insuline chez les animaux traités avec HP500 après un mois de régime riche en matières grasses, ainsi qu'une légère augmentation de la sécrétion de GLP-1. Après environ deux mois de régime riche en matières grasses, l'hydrolysate PWF a induit une augmentation significative de la sécrétion de CCK (HP250 et HP500), de GLP-1 (HP500), de GIP (HP500) mais également d'insuline (HP500) en comparaison avec les valeurs obtenues pour le groupe Contrôle HF. De plus, bien que les différences ne soient pas significatives, l'activité DPP-IV plasmatique du groupe HP500 tend à atteindre le niveau d'activité du groupe Contrôle en régime standard. Ces résultats permettent de conclure que l'hydrolysate PWF semble jouer un rôle sur l'homéostasie énergétique (sécrétion de CCK, GLP-1 GIP, insuline) et permet de prolonger légèrement la demi-vie de l'activité du GLP-1 via une diminution de l'activité DPP-IV.

Malgré la mise en évidence de quelques tendances, aucun effet à long terme de l'hydrolysate PWF sur la modulation de l'expression des gènes codant les marqueurs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique et exprimés au niveau intestinal et hypothalamique n'a été démontré.

# Discussion

---

## **I. Simulation de la digestion gastro-intestinale des hydrolysats protéiques et de leurs matières premières**

L'objectif de cette première partie de l'étude était la mise en place d'un protocole de digestion GI mimant la digestion du chien et permettant de mesurer l'effet des enzymes digestives sur la population peptidique des hydrolysats PWF (source poisson) et XVP 15035 (source carnée) ainsi que sur leur matière première respective non hydrolysée, mais également de mesurer l'impact de la digestion du chien sur la présence de molécules potentiellement actives tout au long du tractus gastro-intestinal, et en particulier au niveau de l'intestin. Pour cela un protocole de digestion simulée *in vitro* adapté aux caractéristiques du chien a été mis au point. La digestion GI du chien n'avait jusqu'alors été étudiée et simulée que dans le but d'obtenir des informations sur le devenir de certaines molécules pharmaceutiques (Arndt et al. 2013; Hatton et al. 2015) ou pour évaluer la digestibilité des nutriments et de l'énergie des aliments pet food (Hervera i Abab 2011). Au cours de ce travail, la simulation de la digestion GI du chien a été élaborée à partir d'un protocole préalablement développé au laboratoire pour l'étude de la digestion des protéines et mis au point sur la base du protocole consensuel INFOGEST de digestion GI statique humaine, d'informations récoltées dans la littérature et d'informations fournies par Diana Pet Food (Caron et al. 2015; Minekus et al. 2014). Ainsi le principal résultat obtenu au cours de cette première partie de l'étude est la mise en place d'un protocole de digestion *in vitro* statique simulant la digestion GI du chien, adapté à la digestion des protéines, et dont les principales différences avec le protocole de digestion statique de Minekus sont le pH dans le compartiment gastrique (pH 2 pour le chien vs pH 3 pour l'Homme) et dans le compartiment intestinal (pH 6,8 pour le chien vs pH 7 pour l'Homme) ainsi que la durée de la digestion intestinale (4h pour le chien vs 2h pour l'Homme) et la température qui a été fixée à 39°C.

Les hydrolysats peptidiques et leur matière première respective ont donc été soumis à cette digestion *in vitro* et des échantillons ont été prélevés, mimant les trois premiers compartiments du tractus GI. La comparaison des profils peptidiques des hydrolysats obtenus pour la bouche et l'estomac avec ceux de leur matière première respective a montré une différence de répartition de la population peptidique en fonction du poids moléculaire. Comme attendu, les enzymes digestives (pepsine puis pancréatine) ont eu un impact plus important sur les matières premières que sur les hydrolysats qui avaient déjà subi une hydrolyse enzymatique au cours de leur procédé industriel d'obtention. En effet, le déplacement de la répartition des poids moléculaires apparents des peptides générés au cours

de la digestion GI de la matière première de PWF (MP-PWF), vers des poids moléculaires plus faibles, confirme la modification de la population peptidique sous l'action des enzymes digestives. Cela avait déjà été observé avec des protocoles similaires de digestion GI simulée et d'analyse à partir d'hydrolysats de viscères de seiche et d'hépatopancreas d'escargot et de leur matière première respective (Cudennec et al. 2015; Cudennec et al. 2016). Pour la matière première de XVP 15035 (MP-XVP 15035), l'action de la pepsine après 2h de digestion gastrique a permis la solubilisation de la matière première avec une disparition quasi-totale des peptides de poids moléculaire apparent supérieur à 10 kDa. Puis les 4h de digestion intestinale avec de la pancréatine ont permis, comme avec MP-PWF, d'augmenter la proportion de peptides de poids moléculaire apparent inférieur à 4 kDa. Pour l'hydrolysat PWF, la digestion GI diminue légèrement la proportion de la population peptidique de poids moléculaire supérieur à 1,5 kDa et augmente légèrement celle des peptides de poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa entre le compartiment salivaire et le compartiment intestinal, avec une différence plus nette pour les très faibles poids moléculaires. Pour l'hydrolysat XVP 15035, la principale différence entre les trois phases de la digestion se situe également dans la tranche des plus faibles poids moléculaires. Enfin, un des objectifs principaux de cette étape du travail était de mesurer l'impact du procédé industriel sur la répartition en poids moléculaires des digestats intestinaux. Ainsi, la comparaison des profils peptidiques des digestats intestinaux des hydrolysats, et des digestats intestinaux de leurs matières premières, montre que les répartitions sont très proches malgré quelques différences visibles. En effet, la proportion de peptides caractérisés par un PM apparent compris entre 1,1 et 1,2 kDa du digestat intestinal MP-PWF est plus importante que celle de PWF et inversement pour les peptides de poids moléculaire apparent inférieur à 500 Da. En ce qui concerne le digestat intestinal de MP-XVP 15035, la proportion de la population peptidique caractérisée par un PM apparent compris inférieur à 500 Da est plus faible que celle du digestat de l'hydrolysat. Ceci met en évidence l'action puissante de la pancréatine qui reproduit en partie celle des enzymes utilisées au cours du procédé industriel. Cependant cette constatation ne signifie pas que, malgré des répartitions en termes de taille très proches, les séquences peptidiques contenues dans les digestats intestinaux des hydrolysats et de leur matière première respective soient identiques.

## **II. Mise en évidence des fractions peptidiques impliquées dans les activités biologiques en rapport avec l'homéostasie énergétique**

La deuxième partie de l'étude a été principalement dédiée à la recherche de peptides possédant des activités biologiques en lien avec la régulation de l'homéostasie énergétique telles que la sécrétion de certaines hormones intestinales (CCK et GLP-1) et l'inhibition de l'activité de l'enzyme DPP-IV. Les hormones ciblées étant sécrétées dans l'intestin grêle, l'approche principale a consisté à sélectionner les digestats intestinaux des hydrolysats, à les fractionner par des outils chromatographiques, à tester les activités biologiques des fractions générées, et enfin, à sélectionner les fractions les plus actives pour en caractériser la population peptidique. La mesure du potentiel inhibiteur des hydrolysats sur l'activité de l'enzyme DPP-IV a tout d'abord été réalisée en utilisant une méthode biochimique. Cependant, cette technique ne permet pas de modéliser les conditions physiologiques pouvant notamment limiter la biodisponibilité des peptides. De plus, bien que le potentiel inhibiteur de la population peptidique, pour l'inhibition de l'activité de la DPP-IV, ait été mesuré, il a été montré dans la littérature que l'enzyme DPP-IV clive les hormones incrétines, telles que le GIP et le GLP-1, du côté basolatéral de la paroi intestinale (Abdalla 2017). C'est pourquoi, il a été décidé de travailler avec la lignée cellulaire Caco-2 qui présente des caractéristiques morphologiques proches des entérocytes telles que la présence d'aminopeptidases ou encore une différenciation cellulaire avec un effet barrière (présence de jonctions serrées). Ainsi ce modèle a été très largement adopté pour modéliser la barrière intestinale (Sambuy et al. 2005). Au cours de cette étude, la lignée Caco-2 a donc été utilisée pour estimer le potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV en présence d'un environnement enzymatique plus complexe permettant ainsi de mimer au mieux l'environnement intestinal. Ce test a été développé au laboratoire et permet de mesurer, sur cellules vivantes, la capacité de peptides ou populations peptidiques, à inhiber l'activité enzymatique de la DPP-IV transmembranaire (Caron et al. 2017b). Cette lignée cellulaire a également été utilisée pour étudier le passage des peptides des digestats intestinaux au travers d'une barrière intestinale simulée par une monocouche de cellules Caco-2 différenciées.

## II.1. Caractérisation des activités biologiques impliquées dans la régulation des hormones intestinales

La recherche de molécules capables de stimuler la sécrétion des hormones intestinales et notamment des CCK et du GLP-1 ou inhibant l'activité de la DPP-IV représente aujourd'hui l'une des stratégies pharmaceutiques les plus prometteuses dans le cadre de la lutte contre l'obésité et le diabète de type 2 (Chaudhari et al. 2017), stratégies qui compte tenu des points communs de régulation entre vertébrés pourraient être transposées aux animaux de compagnie. Le pouvoir satiétogène des protéines s'est révélé être supérieur à celui des autres macronutriments, mais les mécanismes physiologiques associés ne sont pas totalement élucidés à l'heure actuelle (Caron et al. 2017a). Après la sélection, au cours d'une précédente étude, de deux hydrolysats présentant un potentiel prometteur, ce travail a porté sur l'analyse de leur capacité, à stimuler la sécrétion des CCK et de GLP-1, ainsi qu'à inhiber l'activité de la DPP-IV au cours de la digestion GI simulée *in vitro*, par rapport à celle de leur matière première respective.

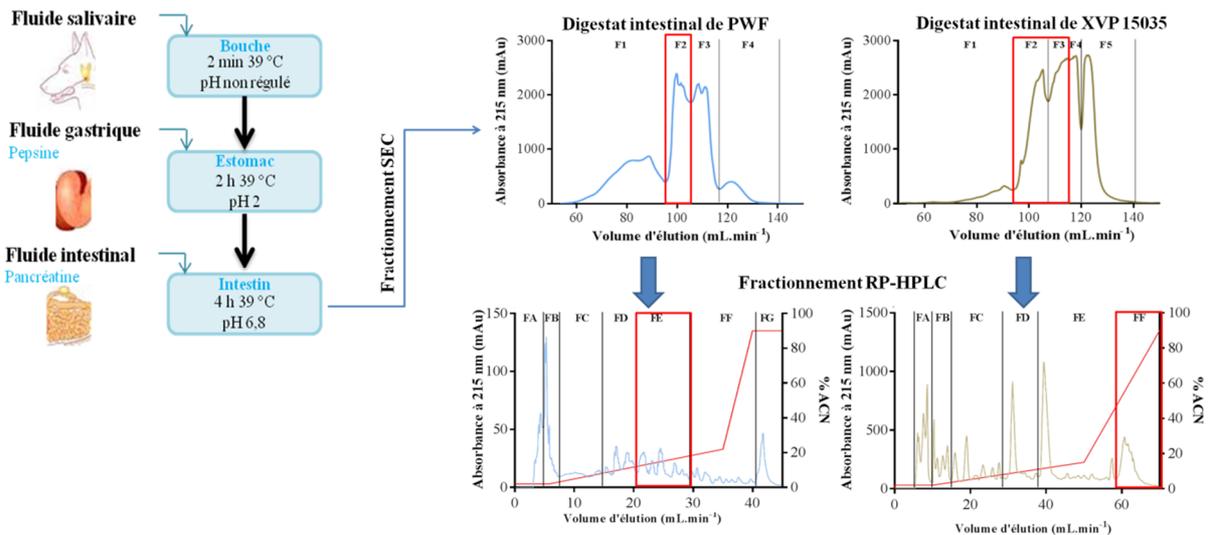
### II.1.1. Effets des digestats et des fractions sur la sécrétion des hormones intestinales CCK et GLP-1

Les avancées de la recherche ont permis de montrer que le contact des hydrolysats protéiques avec les cellules intestinales permet de stimuler la sécrétion des hormones CCK et GLP-1 généralement plus fortement que les protéines intactes dont sont issues ces hydrolysats (Santos-Hernández et al. 2018b). Au cours de ce travail, l'étude des effets des hydrolysats et de leurs matières premières au cours de la digestion GI sur la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) par les cellules entéroendocrines STC-1 a montré la plus-value qu'apporte l'hydrolyse préalable de la matière première, en termes de génération de peptides possédant une activité biologique. De plus, nous avons pu montrer que la digestion GI augmentait significativement la capacité des hydrolysats et de leurs matières premières à stimuler la sécrétion de CCK et de GLP-1 par les cellules STC-1. Nous avons obtenu ce résultat, à une exception près qui est l'effet de l'hydrolysat PWF sur la sécrétion de CCK. En effet, les peptides, stimulant la sécrétion de CCK, et présents dès le départ dans cet hydrolysat, ont résisté à l'action des enzymes digestives. Plusieurs études *in vitro* ont permis de mettre en évidence cette stimulation de la sécrétion des hormones intestinales par des digestats intestinaux de protéines ou d'hydrolysats (Caron et al. 2015; Harnedy et al. 2018b; Santos-Hernández et al. 2018b). Il a déjà été observé dans la littérature que des digestats

intestinaux de caséine et de gélatine de saumon induisaient une sécrétion de GLP-1, respectivement par les cellules STC-1 et GLUTag, plus faible que leurs digestats gastriques (Chaudhari et al. 2017; Harnedy et al. 2018a). D'autres études ont démontré « l'effet peptide », c'est à dire qu'un mélange d'acides aminés libres ne provoquait pas une augmentation significative, ou équivalente, de la sécrétion des CCK par rapport à celle provoquée par l'hydrolysat protéique. Bien que les profils peptidiques des digestats intestinaux des hydrolysats et de leur matière première respective soient proches au niveau de la répartition des poids moléculaires apparent des peptides, les résultats obtenus ici montrent bien que les séquences générées au cours de la digestion GI simulée ne sont pas les mêmes. Le rôle clé des enzymes intestinales dans la production de nouvelles séquences peptidiques bioactives et potentiellement impliquées dans la régulation de la prise alimentaire a donc été mis en évidence.

Les cellules STC-1, dérivées d'une tumeur intestinale de souris double transgénique, sont fréquemment utilisées comme modèle d'étude de la physiologie des cellules L. D'autres cellules entéroendocrines sont également utilisées comme les cellules GLUTag dérivées d'une tumeur du colon de souris ou encore les cellules NCI-H716 dérivées d'un adénocarcinome colorectal humain. Ces trois lignées cellulaires sont utilisées pour l'étude de la sécrétion de GLP-1 et parmi elles, les cellules STC-1 sont celles qui ressemblent le plus aux cellules L en termes de sécrétion, les deux autres lignées étant plus proches des cellules entéroendocrines de type « I ». De plus, les STC-1 produisent et sécrètent des CCK plus que les GLUTag, alors que les cellules NCI-H716 n'expriment pas les CCK (Kuhre et al. 2016).

La démarche adoptée, dans le but d'identifier les peptides bioactifs des deux hydrolysats protéiques, a été de fractionner les digestats intestinaux par deux étapes de séparation chromatographiques successives et de mesurer le potentiel des fractions et des sous-fractions à stimuler la sécrétion des hormones intestinales. La démarche et les résultats sont présentés dans la **Figure 69**.



**Figure 69.** Schéma récapitulatif des étapes de fractionnement réalisées sur les digestats intestinaux des hydrolysats PWF et XVP 15035.

La première étape de fractionnement a permis d'identifier clairement les fractions F2 comme présentant le meilleur potentiel de stimulation de la sécrétion de GLP-1 pour les deux digestats intestinaux PWF et XVP 15035. Ces fractions sont composées de peptides ayant un poids moléculaire apparent compris entre 400 et 1000 Da pour l'hydrolysat PWF et inférieur à 500 Da pour l'hydrolysat XVP 15035. En ce qui concerne la sécrétion de CCK, la première étape de fractionnement a mené à des conclusions un peu moins tranchées. Une seconde fraction (F3) a donc été retenue pour le digestat intestinal de l'hydrolysat XVP 15035. Pour l'hydrolysat PWF, la fraction F4 stimule fortement la sécrétion de CCK, cependant cette fraction doit être majoritairement constituée d'acides aminés libres et de sels. En effet, la fraction F4 est composée de molécules aux poids moléculaires apparents inférieurs à 100 Da. Des peptones composées d'oligopeptides d'un poids moléculaire majoritairement inférieur ou égal à 1200 Da ont été identifiées pour leur potentiel à stimuler la sécrétion de CCK (jusqu'à  $1420 \pm 170$  fois le contrôle) par les cellules STC-1 par rapport à un contrôle (tampon Krebs-Ringer) (Cordier-bussat et al. 1997). Une étude menée au sein du laboratoire sur la digestion GI de l'hémoglobine bovine a également montré que les peptides de poids moléculaire apparent inférieur à 1000 Da stimulaient plus fortement la sécrétion de CCK par les cellules STC-1 que les peptides arborant des poids moléculaires apparents plus importants. Dans cette même étude, la stimulation de la sécrétion de GLP-1 a été plus importante avec les fractions peptidiques caractérisées par un poids moléculaire apparent supérieur à 350 Da (Caron et al. 2015).

La seconde étape de fractionnement par RP-HPLC, réalisée sur la fraction F2 du digestat intestinal de PWF et la fraction regroupée F2-3 du digestat intestinal de XVP 15035, a permis d'identifier clairement une sous-fraction pour chacun des digestats montrant un fort potentiel pour la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales. Il s'agit de la sous-fraction FE pour le digestat intestinal de PWF et de la sous-fraction FF pour le digestat intestinal de XVP 15035. Le gradient appliqué pour éluer les peptides permet de qualifier de faible à moyenne l'hydrophobie des séquences composant ces sous-fractions puisqu'elles sont éluées avec un pourcentage d'acétonitrile compris entre 20 et 40%. Une petite proportion de la population peptidique de la sous-fraction FF du digestat intestinal de PWF est éluée avec un pourcentage d'acétonitrile compris entre 40 et 80%. Une étude menée au sein du laboratoire sur l'hémoglobine bovine a également permis d'identifier des sous-fractions stimulant la sécrétion des CCK par les cellules STC-1 et éluées avec un pourcentage d'acétonitrile supérieur à 30% et des sous-fractions stimulant la sécrétion de GLP-1 caractérisées par un pourcentage d'acétonitrile compris entre environ 30 et 45% (Caron et al. 2016).

#### II.1.2. Effet des digestats sur l'inhibition de l'activité de l'enzyme DPP-IV

La DPP-IV est une enzyme qui clive les hormones incrétines, tel que le GLP-1, réduisant ainsi considérablement son action dans la régulation de la prise alimentaire et dans l'homéostasie du glucose. Les peptides, composants les digestats des deux hydrolysats et de leur matière première respective, générés au cours de la digestion GI *in vitro*, possèdent la capacité d'inhiber l'activité de l'enzyme DPP-IV. Il a été observé que plus la digestion des hydrolysats ou celle de leurs matières premières progresse et plus les peptides générés, exercent un potentiel inhibiteur élevé. Ainsi, les enzymes intestinales, qui prolongent l'hydrolyse gastrique, permettent d'augmenter le potentiel inhibiteur de la DPP-IV. Les valeurs des  $IC_{50}$  obtenues pour les deux hydrolysats protéiques avant digestion GI sont respectivement de 2,20 et de 2,36  $mg.mL^{-1}$  pour l'hydrolysat PWF et XVP 15035. Ces valeurs d' $IC_{50}$  sont dans la gamme des valeurs classiquement observées dans la littérature pour des hydrolysats protéiques de viande (Lima et al. 2019), de poisson (Harnedy et al. 2018b; Huang et al. 2014; Wang et al. 2015) ou encore de lait (Lacroix and Li-chan 2013; Mudgil et al. 2018; Nongonierma et al. 2018) ; avec des  $IC_{50}$  comprises entre 1 et 5  $mg.mL^{-1}$ . Les valeurs d' $IC_{50}$  obtenues pour les digestats des hydrolysats protéiques PWF et XVP 15035 et de leurs matières premières sont respectivement comprises entre 1,52 (digestats intestinaux) et 1,71  $mg.mL^{-1}$  (digestats gastriques) et entre 1,43 (digestats intestinaux) et 3,19  $mg.mL^{-1}$  (digestats gastriques). Ces valeurs sont légèrement plus faibles et montrent donc un meilleur

potentiel pour inhiber l'activité de l'enzyme DPP-IV, que celles qui ont été calculées pour des digestats gastro-intestinaux de chanvre, de pois, de riz et de soja où les valeurs d'IC<sub>50</sub> étaient comprises entre 1,85 et 4,50 mg.mL<sup>-1</sup> (Nongonierma and FitzGerald 2015). Cependant, d'autres sources ont montré un potentiel inhibiteur de la DPP-IV plus intéressant que celui de nos hydrolysats. C'est le cas des digestats intestinaux d'hémoglobine (Caron et al. 2015), de collagène de colin d'Alaska (Guo et al. 2015), de saumon (Harnedy et al. 2018a) ou encore de son de riz (Hatanaka et al. 2012) pour lesquels les IC<sub>50</sub> obtenues étaient inférieures à 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Lacroix et Li-Chan ont étudié des hydrolysats d'isolats de protéines du lactosérum ou d' $\alpha$ -lactalbumine, obtenus à la suite d'une hydrolyse par la pepsine, dont les IC<sub>50</sub> atteignaient respectivement des valeurs de 0,075 et de 0,036 mg.mL<sup>-1</sup> (Lacroix and Li-Chan 2013). Ainsi, le potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV dépend non seulement de la source protéique hydrolysée, mais également des conditions d'hydrolyse comme la température, l'enzyme utilisée et le temps d'hydrolyse (Nongonierma et al. 2016).

Les valeurs des IC<sub>50</sub> obtenues en utilisant le test sur cellules Caco-2 sont parfois plus de deux fois plus faibles que celles obtenues avec le test acellulaire. Bien que les valeurs des deux tests ne puissent être comparées, les résultats obtenus pour l'inhibition de la DPP-IV transmembranaire (cellules caco-2) montrent le fort potentiel des digestats intestinaux dans des conditions physiologiques, mimant l'environnement intestinal et notamment l'action des peptidase produites par les cellules épithéliales de la bordure en brosse de l'intestin.

## **II.2. Identification et caractérisation des peptides responsables des activités biologiques étudiées**

Cette troisième partie a eu pour but d'identifier les peptides responsables des réponses observées sur la sécrétion des hormones intestinales et sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV. Pour cela, une sélection des séquences peptidiques identifiées par LC-MS/MS a été réalisée et certaines séquences ont été synthétisées.

### **II.2.1. Identification et sélection des séquences peptidiques des sous-fractions et surnageants basolatéraux**

Les peptides présents dans les sous-fractions obtenues par RP-HPLC ou dans les surnageants basolatéraux à la suite du passage de la barrière intestinale, ont fait l'objet d'une étude analytique centrée sur la spectrométrie de masse en mode tandem couplée à la chromatographie liquide. Cette stratégie est communément utilisée dans le domaine de la

protéomique et a été appliquée à la caractérisation des peptides (Mamone et al. 2009). L'hydrolyse des protéines alimentaires génère une population complexe en termes de propriétés physico-chimiques qui sont liées à la grande diversité de longueur et de composition en acides aminés des chaînes peptidiques. La caractérisation des séquences amène à de nombreux défis technologiques pour la spectrométrie de masse. En effet, plusieurs séquences peptidiques peuvent avoir le même poids moléculaire mais être de composition différente. Des difficultés sont également rencontrées quand le nombre d'ionisation, c'est-à-dire la fragmentation générée par MS/MS, est trop faible, ce qui est souvent le cas pour les di- et tri-peptides, induisant un manque d'information et une trop faible fiabilité. Afin d'identifier le maximum de séquences peptidiques, plusieurs techniques chromatographiques complémentaires peuvent être couplées comme la phase inverse (RP) et l'HILIC, ce qui peut permettre d'améliorer la précision de l'identification des peptides, notamment pour les plus petits (Harscoat-Schiavo et al. 2012; Le Maux et al. 2015b). D'autres techniques ont pu être mises en place pour les peptides de moins de 5 acides aminés. O'Keeffe et FitzGerald ont réalisé un grand travail en amont de l'identification des séquences peptidiques d'un hydrolysate protéique de lait, en caractérisant par LC-MS/MS une collection de peptides synthétiques de petite taille, prédits *in silico* à partir des sources protéiques et dans les conditions d'hydrolyse sélectionnées (O'Keeffe and Fitzgerald 2015). Une autre méthode concerne l'utilisation de modèles de prédiction des temps de rétention des peptides couplés à une analyse LC-MS/MS, ce qui a permis d'améliorer la fiabilité de l'identification de peptides de bas poids moléculaires comme il a été montré pour des hydrolysats de protéines de lait (Le Maux et al. 2015a) ou de protéines de colza (Schweizer et al. 2007). Cette méthode est très bien adaptée à l'identification de séquences homologues et vise à démontrer une corrélation entre l'activité biologique et les propriétés hydrophiles/hydrophobes d'une séquence peptidique. Dans notre étude sur la caractérisation des sous-fractions HPLC et des peptides ayant traversé la barrière intestinale, une seule méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse a été utilisée pour des raisons de faisabilité (temps d'obtention, quantité suffisante de sous-fractions HPLC ne permettant pas de réaliser une autre séparation chromatographique). Cette technique n'a donc pas permis l'identification des séquences peptidiques de moins de quatre acides aminés, bien qu'il soit connu que le processus de digestion GI des protéines alimentaires génère des di- et tri-peptides pouvant potentiellement franchir la barrière intestinale et être bioactifs (Morifuji et al. 2010).

L'un des aspects qui n'a pas été pris en compte au cours de l'identification des peptides stimulant la sécrétion des hormones intestinales et inhibant l'activité de l'enzyme DPP-IV est la quantification des peptides présents dans les sous-fractions et dans les surnageants basolatéraux. Ainsi, il n'y a pas eu de distinction entre un peptide présent à l'état de trace ou un autre présent à une forte concentration. Néanmoins la sélection des peptides stimulant la sécrétion des CCK et de GLP-1 a été réalisée parmi les peptides présents dans les pics les plus intenses des chromatogrammes. Cependant, l'identification par spectrométrie de masse en mode tandem des séquences d'un mélange peptidique se heurte au phénomène de suppression d'ionisation. Une ionisation simultanée de plusieurs peptides peut engendrer une diminution ou une disparition du signal d'un ou plusieurs peptides si leur capacité à s'ioniser est plus faible que les autres présents en solution. Ainsi, aucune corrélation formelle 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. 2013). Bien que compliqué à réaliser sur un mélange complexe, des méthodes d'ajouts-dosés permettent la quantification des molécules présentes. Dans un mélange complexe, il est rare d'obtenir un peptide pour un pic sur le chromatogramme. D'autres méthodes seraient à développer afin de permettre une quantification des peptides dans un mélange complexe.

Les connaissances actuelles, fondées sur les propriétés physico-chimiques, de structure ou d'enchaînement des acides aminés dans les séquences peptidiques connues pour stimuler la sécrétion de CCK et de GLP-1, n'ont toujours pas permis d'établir des liens entre structure et activité. Une première tentative de sélection des peptides à synthétiser, parmi les peptides identifiés dans chaque sous-fraction, s'est d'abord basée sur les connaissances scientifiques et les hypothèses émises quant à la composition en acides aminés des séquences ainsi que les places potentiellement clés de certains acides aminés. Cependant, le nombre de séquences peptidiques était encore trop important pour permettre la sélection des peptides dans chaque sous-fraction. Comme évoqué précédemment, le choix s'est donc fait à la fois à partir des chromatogrammes et à partir de l'identification des peptides présents dans les pics les plus intenses. C'est sur cette base que 20 peptides ont été sélectionnés pour chaque sous-fraction. La sélection des peptides à synthétiser pour leur activité potentielle à inhiber la DPP-IV a été réalisée à l'aide du modèle QSAR développé par Nongonierma et Fitzgerald (Nongonierma et al. 2016).

## II.2.2. Mise en évidence de nouveaux peptides stimulant la sécrétion des hormones intestinales

La digestion GI des protéines alimentaires libère un mélange complexe de peptides de différentes tailles et d'acides aminés libres, qui au travers de différentes actions, va induire une diminution de la prise alimentaire et générer un sentiment de satiété. La stimulation de la sécrétion des hormones intestinales, telles que les CCK et le GLP-1, est une des actions provoquées par le contenu protéique dans la lumière intestinale lorsqu'il est détecté par les cellules entéroendocrines (CEEs). Ainsi, ces cellules, en contact direct avec le lumen, représentent le premier niveau de détection et d'intégration de ces signaux. Pour cela, des récepteurs transmembranaires, présents au niveau apical des cellules, permettent de détecter et d'estimer la valeur nutritionnelle du contenu intestinal (Janssen and Depoortere 2013; Rønnestad et al. 2014; Sternini et al. 2008). Les récepteurs et voies de signalisation impliquées dans la détection et le déclenchement de la sécrétion des hormones ne sont toujours pas totalement élucidés. Au cours de cette étude, seule la recherche des séquences peptidiques impliquées dans la sécrétion de CCK a été réalisée. Les travaux sur la recherche des récepteurs potentiellement activés sont à ce jour en cours et ne figurent pas dans ce manuscrit.

Les fractionnements de F2 et de F2-3 obtenus à partir des digestats intestinaux de PWF et de XVP 15035 ont permis d'isoler respectivement les sous-fractions FE de F2 et FF de F2-3 (**Figure 69**). Ces étapes de fractionnement ont permis de réduire la quantité de peptides à identifier. Parmi les quarante peptides qui ont été synthétisés dans cette étude, deux séquences peptidiques pour chaque sous-fraction ont stimulé significativement la sécrétion des CCK après contact avec les cellules STC-1. Il s'agit de PSLVH et de DLVDK pour PWF, ainsi que de FPYPLPRPL et de VLPL pour XVP 15035. A ce jour, seulement quelques séquences peptidiques sont référencées dans la littérature pour leur implication dans la stimulation de la sécrétion des CCK. L'identification de ces peptides bioactifs a été réalisée à partir de trois sources protéiques différentes, la  $\beta$ -conglycinine de soja, l'hémoglobine bovine et l' $\alpha$ - et  $\beta$ -lactoglobuline (Caron 2016; Domenger et al. 2017; Nishi et al. 2003; Tulipano et al. 2017) (**Tableau 27**).

**Tableau 27.** Peptides identifiés montrant une augmentation de la sécrétion de CCK.

Peptides identifiés dans la littérature	Source	Peptides identifiés dans cette étude	Source
<b>β-51-63</b>	β-glycine de soja	<b>PSLVH</b>	PWF
<b>FESF</b>	Hémoglobine bovine	<b>DLVDK</b>	PWF
<b>LSFPT</b>	Hémoglobine bovine	<b>FPYPLRPL</b>	XVP 15035
<b>YFPH</b>	Hémoglobine bovine	<b>VLPL</b>	XVP 15035
<b>ALPMH</b>	β-lactoglobuline		
<b>PHLMA</b>	α-lactoglobuline		
<b>AAMPLW</b>	α-lactoglobuline		
<b>DRVYIHPF</b>	α-lactoglobuline		
<b>LLVVYPW</b>	Hémoglobine bovine		
<b>LVVYPW</b>	Hémoglobine bovine		

Parmi les séquences peptidiques stimulant la sécrétion de CCK dans cette étude, FPYPLRPL possède un résidu arginine comme le fragment β 51-63 issu de la β-conglycinine de soja. Comme pour trois des séquences peptidiques (FESF, LSFPT et YFPH), identifiées dans des sous fractions obtenues par RP-HPLC du digestat intestinal d'hémoglobine bovine (Caron et al. 2016) et les séquences peptidiques issues de digestat intestinaux d'hémoglobine bovine (LLVVYPW et LVVYPW) (Domenger et al. 2017), le peptide FPYPLRPL possède des résidus d'acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine (F) ou la tyrosine (Y). Cependant, la présence de résidus d'acides aminés aromatiques ne semble pas être indispensable puisque le peptide DLVDK ne possède pas de résidu aromatique et que le peptide DPFE ne stimule pas la sécrétion de CCK. De plus, FPYPLRPL, PSLVH et DLVDK sont composés de cinq acides aminés ou plus. ce qui coïncide avec les résultats d'une étude qui a démontré que la séquence minimale des peptides stimulant la sécrétion de CCK était de cinq acides aminés (Tulipano et al. 2017). Cependant, le peptide VLPL identifié dans cette étude, ainsi que deux des peptides identifiés à partir du digestat intestinal d'hémoglobine bovine (FESF, YFPH) sont composés de quatre acides aminés. Le peptide VLPL a une proline (P) en avant dernière position, comme quatre des séquences (LSFPT, DRVYIHPF, LLVVYPW et LVVYPW) sur les dix identifiées dans la littérature. D'autres peptides synthétisés au cours de cette étude comme VAPEEHPT identifié dans l'hydrolysat PWF ou encore TPPL identifié dans l'hydrolysat XVP 15035 ont également une proline en avant dernière position sans pour autant stimuler la sécrétion de CCK. Le peptide PSLVH a une proline en première position comme l'un des trois peptides identifiés de l'α-lactoglobuline (PHLMA) et un résidu d'histidine en dernière position tout comme YFPH, identifié à partir du digestat d'hémoglobine bovine, et ALPMH à partir de la β-lactoglobuline (Caron et al. 2016 ; Tulipano et al. 2017). Dans les quatre séquences identifiées dans cette étude,

des chaînes aliphatiques sont présentes. Leur présence a été proposée par Tulipano et son équipe comme nécessaire à la stimulation de la sécrétion de CCK (Tulipano et al. 2017) mais certains peptides stimulateurs de la sécrétion ne possèdent cependant pas de chaîne aliphatique tels que les peptides FESF et YFPH de l'hémoglobine bovine.

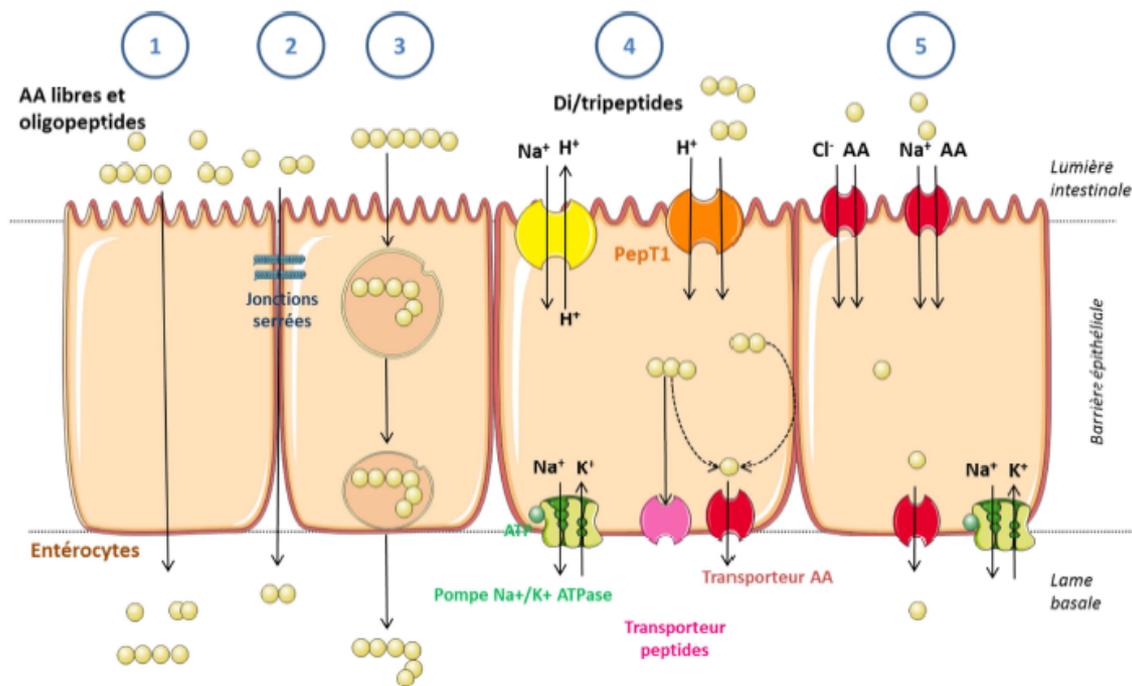
### II.2.3. Suivi du passage des peptides issus des digestats intestinaux au travers de la barrière intestinale simulée *in vitro*

#### II.2.3.1. *Mise en évidence des séquences peptidiques passant au travers de la monocouche de cellules Caco-2*

Le test de passage au travers de la barrière intestinale, simulée par une monocouche de cellules Caco-2, a permis de suivre le transport des peptides provenant des hydrolysats protéiques au travers de cette barrière. Les digestats intestinaux ayant montré un fort potentiel à stimuler la sécrétion de GLP-1 et à inhiber l'activité de l'enzyme DPP-IV ont été sélectionnés afin d'identifier les peptides passant intacts ou non cette barrière. Comme évoqué précédemment, le contact des hydrolysats avec une couche de cellules épithéliales pourrait être à l'origine de modifications de la population peptidique sous l'action des peptidases produites par les cellules épithéliales et, par conséquent, pourrait générer de nouveaux peptides et ainsi augmenter, diminuer ou supprimer le potentiel bioactif mis en évidence par les tests acellulaires *in vitro*. Cherchant à identifier les peptides responsables de l'inhibition de l'activité DPP-IV, le choix s'est donc porté sur les digestats intestinaux totaux plutôt que les fractions réalisées précédemment. Ainsi cette étude a donc permis de simuler d'une part l'hydrolyse par les enzymes de la bordure en brosse, et d'autre part le passage au travers de la barrière intestinale avec un objectif principal : l'identification de peptides inhibiteurs de l'activité de la DPP-IV capable de traverser l'épithélium intestinal.

Parmi les peptides qui ont été capables de passer au travers de la barrière intestinale, seul 1,1% (PWF) et 1,8% (XVP 15035) des peptides étaient identiques aux peptides identifiés dans le compartiment apical contenant les digestats intestinaux. Ces observations montrent bien que dès la mise en contact avec les cellules, les digestats intestinaux subissent des modifications qui peuvent notamment être expliquées par le clivage des séquences peptidiques par les peptidases exprimées par les cellules épithéliales, mais ces séquences peuvent également être métabolisées par les cellules. Le passage au travers de la barrière intestinale s'est avéré très sélectif ce qui est corroboré par le fait que les digestats intestinaux ne déstabilisaient pas la barrière intestinale ayant une intégrité conservée. Ces résultats

laissent supposer que les peptides passent principalement la barrière par des mécanismes mettant en œuvre des transporteurs, plutôt que par diffusion passive ou transport paracellulaire (**Figure 70**). En effet, il est connu que certaines protéines et/ou peptides sont capables d'augmenter la perméabilité de la barrière intestinale. C'est par exemple le cas des gliadines, un des facteurs de la maladie cœliaque, qui favorisent l'ouverture des jonctions serrées en agissant au niveau des zonulines (Fasano 2012) ou de certains peptides connus pour augmenter la perméabilité de la barrière intestinale et favorisant ainsi l'absorption de molécules pharmaceutiques (Sánchez-Navarro et al. 2016).



**Figure 70.** 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 tri-peptides par PepT1 et 5) transport actif des acides aminés libres (Caron 2016).

Compte-tenu de la diversité de séquences peptidiques présentes au niveau apical et du fait que l'intégrité de la barrière n'ait pas été modifiée, le mode de passage des peptides au travers de la barrière intestinale ne se fait probablement pas entre les entérocytes. D'autres mécanismes pourraient être impliqués tels qu'un passage transcellulaire par endocytose (peptides identifiés > 4 acides aminés) ou par un transport actif ou passif de certaines séquences à l'aide d'un transporteur tel que PepT1 (Giromini et al. 2019). Une étude a mis en évidence l'implication du transporteur PepT1 dans le passage d'une fraction peptidique inférieure à 500 Da. Dans cette étude, l'utilisation d'une molécule modifiant l'intégrité des jonctions serrées (Cytochalasin D) ou d'une molécule endommageant les vésicules transcytotiques

(Wortmannin) n'a pas impacté le passage des peptides de cette fraction, ce qui a mené les auteurs à confirmer l'implication du transporteur PepT1 (Wang and Li 2016). Une autre étude a mis en évidence le passage du peptide issu de la  $\beta$ -caséine (193-209) par endocytose transcellulaire (Regazzo et al. 2010).

#### II.2.4. Devenir du potentiel inhibiteur de l'activité de l'enzyme DPP-IV suite au passage au travers du modèle de barrière

A la suite de l'étude du passage de la barrière intestinale, une première mesure de l'inhibition de l'activité de la DPP-IV a été réalisée. Dans cette première expérience, les peptides présents dans les compartiments basolatéraux ont été capables d'inhiber l'activité de la DPP-IV de 2,5%. Cependant, cette première expérience avait montré que la barrière intestinale était deux fois plus perméable que la valeur seuil référencée dans la littérature soit  $1.10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  (Artursson and Karlsson 1991). Cette expérience a donc été de nouveau réalisée pour les deux digestats intestinaux et avec un modèle de barrière dont l'intégrité a été contrôlée. Les peptides présents dans les compartiments basolatéraux n'ont, dans cette seconde expérience, pas été capables d'inhiber l'activité de la DPP-IV. Le nombre faible de peptides ayant traversé la barrière intestinale et la concentration de peptides dans les compartiments basolatéraux sont sûrement responsables de ce résultat. Nous avons donc décidé de mesurer la capacité des digestats à inhiber l'activité de la DPP-IV des cellules Caco-2 directement au cours du passage au travers de la barrière intestinale en ajoutant du substrat au niveau basolatéral. Les résultats obtenus n'ont malheureusement pas permis de mettre en évidence le potentiel inhibiteur des séquences du côté basolatéral, la concentration de peptides passant la barrière intestinale étant probablement trop faible pour induire une inhibition significative de l'activité de l'enzyme DPP-IV. Il est de plus, difficile de comparer ces résultats avec d'autres études car il ne semble pas exister de travaux similaires dans la littérature. D'autres expériences seraient à réaliser en modulant les concentrations d'hydrolysats et autres paramètres pour pouvoir *in vitro* suivre au mieux l'activité de la DPP-IV au cours du passage au travers de la barrière intestinale.

##### II.2.4.1. *Mise en évidence des peptides inhibant l'activité de la DPP-IV*

Bien que peu de peptides aient été capables de traverser la barrière intestinale simulée *in vitro*, l'utilisation du modèle QSAR a permis de mettre en évidence, à partir des peptides identifiés dans les surnageant basolatéraux, des peptides potentiellement inhibiteurs de

l'activité de la DPP-IV. Ainsi, sept et six séquences potentiellement bioactives, issues des digestats intestinaux de PWF et de XVP ont respectivement été synthétisées.

Il est démontré depuis plusieurs années que les protéines alimentaires sont des sources intéressantes de peptides inhibiteurs de l'activité de la DPP-IV. Il a souvent été décrit que la capacité des peptides à inhiber l'activité DPP-IV est due à la nature et à la position de certains acides aminés au sein de la séquence, même si cette hypothèse n'a pas pu être généralisée car elle ne se vérifie pas pour certains peptides inhibiteurs (Lacroix and Li-Chan 2012). Cependant, ces récurrences dans les séquences ont permis le développement de modèles de prédiction, tel que le modèle QSAR qui permet d'une part de prédire le potentiel des peptides à inhiber l'activité de la DPP-IV mais qui peut également permettre de comparer un grand nombre de séquences inhibitrices identifiées expérimentalement et ainsi d'établir de nouvelles corrélations structure-fonction.

Parmi les 13 peptides synthétisés, seuls DLDL et MDLP, issus du digestat intestinal de PWF ont montré un potentiel inhibiteur intéressant avec respectivement des  $IC_{50}$  de 760 et 610  $\mu$ M. Des peptides identifiés au cours d'études préalables, ont cependant montré des potentiels plus intéressants, avec des  $IC_{50}$  comprises entre 30 et 200  $\mu$ M (Jao et al. 2015; Lacroix and Li-Chan 2014; Power-Grant et al. 2015). De plus, à ce jour, IPI reste le peptide identifié qui inhibe l'activité de la DPP-IV avec le plus d'efficacité ( $IC_{50} = 3 \mu$ M). Le peptide DLDL a une leucine du côté N-terminal et le peptide MDLP a une proline en C-terminal. Nongonierma et FitzGerald ont démontré, à partir d'une banque de données de séquences inhibitrices issues de protéines de lait, que la présence d'acides aminés hydrophobes (leucine, isoleucine, tryptophane ou phénylalanine) en position N-terminal était un critère favorisant le potentiel inhibiteur d'un peptide (Nongonierma et al. 2016). De plus, la présence d'un résidu proline en position P1 en N-terminal et/ou en C-terminal favorise l'inhibition de l'activité de la DPP-IV. (Hatanaka et al. 2012). Un autre peptide identifié dans le digestat intestinal de PWF, possédant un résidu proline en position P1 en N-terminal (DPLV), s'est montré peu efficace avec une  $IC_{50}$  de 12,78 mM. Il en est de même pour l'un des peptides identifiés dans le digestat intestinal de XVP 15035 (FPKATG) et dont l' $IC_{50}$  est de 5,61 mM. Ainsi, l'interaction enzyme-peptide ne semble pas entièrement reposer sur la présence d'un résidu en particulier mais plutôt sur la composition globale et la structure du peptide. Parmi les hémorphines identifiées à partir d'un digestat intestinal d'hémoglobine bovine capables de stimuler la sécrétion de CCK, LLVVYPW ( $IC_{50} = 220 \mu$ M) inhibe l'activité de la DPP-IV

(testée avec de l'enzyme purifiée) mais ce peptide ne traversait pas intact la barrière intestinale. Dans cette même étude, les peptides VVYPW ( $IC_{50} = 295 \mu M$ ), VVYPWQRF ( $IC_{50} = 180 \mu M$ ) montrent également un potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV intéressant et sont capables de traverser la barrière intestinale. Ces peptides ont également été testés avec les enzymes DPP-IV extraites à partir de membranes cellulaires de Caco-2 et seuls les peptides VVYPW, VVYPWQRF gardaient leur potentiel inhibiteur (Domenger et al. 2017; Domenger et al. 2018).

### **III. Etude de l'effet de l'hydrolysate protéique PWF sur la régulation de l'homéostasie énergétique chez le rat**

Dans cette dernière partie de l'étude, le potentiel de l'hydrolysate PWF à réguler l'homéostasie énergétique a été mesuré chez le rat. Cet hydrolysate a été sélectionné en regard des résultats obtenus *in vitro*, pour sa capacité à stimuler la sécrétion des hormones intestinales et à inhiber l'activité de la DPP-IV. Il possède donc potentiellement la capacité de réguler la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique. Ainsi, deux phases d'expérimentation ont été réalisées : une première phase avec pour modèle des rats en croissance, nourris avec un régime de maintenance classique sur une durée de 1 mois, et une deuxième phase, sur des rats adultes consommant un régime riche en matières grasses (45%) sur une durée de 57 jours.

#### **III.1. Effet de PWF sur la prise alimentaire et le poids de rats au cours de la première phase d'expérimentation**

Les rats, divisés en quatre groupes de huit animaux ont reçu quotidiennement de l'eau (contrôle), 250 mg (HP250) ou 500 mg (HP500) d'hydrolysate ou encore 500 mg (MP500) de matière première par gavage oro-gastrique (*Figure 71*).



**Figure 71.** Schéma du protocole expérimental de la première phase d'expérimentation.

Dans cette première phase, la quantité quotidienne de HP500 ingéré n'a pas entraîné de modification significative de la prise alimentaire et du poids des animaux par rapport aux animaux des groupes recevant de l'eau et de la matière première. Cependant une consommation plus faible a tout de même été observée à partir de la deuxième semaine

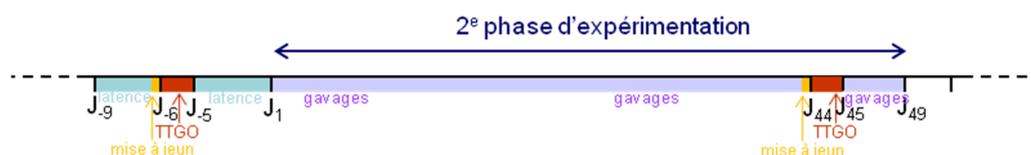
d'expérimentation chez les rats du groupe HP500 par rapport à ceux de HP250 et ceux du groupe contrôle. Les animaux étant en croissance, la consommation alimentaire des rats a augmenté tout au long de cette première phase. Cependant, les résultats laissent supposer que si cette première phase d'expérimentation avait été prolongée, avec des rats devenus adultes consommant une quantité d'aliment stable, la consommation des rats du groupe HP500 aurait pu être significativement plus faible que celles des rats des groupes HP250 et contrôle. La consommation du groupe MP500 est quant à elle légèrement plus faible que celle du groupe HP500. Les mêmes observations ont été faites pour le poids, où dès la deuxième semaine les rats des groupes HP500 et MP500 ont pris moins de poids que ceux des deux autres groupes. L'analyse statistique réalisée à partir de l'analyse de variance par modèle mixte suivie de la comparaison par paire laisse supposer que le nombre de rat par groupe était insuffisant pour mettre en évidence les effets de l'hydrolysate sur la prise alimentaire et le poids (puissance statistique trop faible). En effet, avec un nombre plus important d'animaux par groupe, les différences intragroupes auraient été lissées. Néanmoins, il est difficile d'utiliser plus de 8 rats par groupe compte tenu des règles éthiques d'expérimentation animale visant à réduire au maximum le nombre d'animaux. Cette étude a également permis d'observer la grande variabilité interindividuelle de la prise de poids. Mais, il est intéressant de remarquer que les groupes recevant l'hydrolysate PWF ou la matière première avaient une variabilité intragroupe plus faible que celle du groupe contrôle dès la deuxième semaine, laissant supposer que l'hydrolysate et la matière première induiraient une meilleure régulation du métabolisme énergétique. D'autres expériences seraient bien sûr à réaliser pour vérifier cette hypothèse.

Comme décrit dans la synthèse bibliographique, les protéines exercent globalement un pouvoir satiétogène plus important que celui des glucides et des lipides (Bensaïd et al. 2002) et l'origine de la protéine semble jouer un rôle dans l'intensité de cet effet de satiété (Diepvens et al. 2008; Hall et al. 2003). Dans l'étude menée par Abou-Samra, l'effet de cinq sources de protéines (protéines de pois, caséine, albumine d'œuf, lactosérum et maltodextrine) données avant un repas a été mesuré chez l'homme. Les résultats ont mis en évidence une diminution significative de la consommation du repas après une charge de caséines ou de protéines de pois (Abou-Samra et al. 2011). Il a été montré, notamment chez l'Homme qu'un repas composé de poisson induisait une forte satiété pendant une période de 3h en comparaison à l'administration d'un repas composé de bœuf ou de poulet, ou encore une augmentation de la satiété et une diminution de la consommation d'énergie induite par du lactosérum en comparaison à la consommation de caséine (Diepvens et al. 2008). De plus, il a

été montré que des hydrolysats de poisson ou encore des extraits de pommes de terre induisaient une diminution de la consommation pouvant avoir pour conséquence une diminution de la prise de poids chez le rat (Chen et al. 2015; Cudennec et al. 2012). Dans une expérience menée au laboratoire, l'administration oro-gastrique d'une dose journalière d'hydrolysate de merlan bleu à des rats en croissance pendant une période de trois semaines, a permis de montrer une diminution de la prise alimentaire et du poids des animaux. Cependant, cet effet a été obtenu sur une période court après l'administration de l'hydrolysate (9h - 19h) mais pas sur la journée complète ; et cela, bien que les rats aient reçu la dose d'hydrolysate de merlan bleu en deux fois dans la journée. Il a également été observé au cours de cette étude une diminution significative du poids des animaux recevant la charge d'hydrolysate de merlan bleu à la dose de 100 mg par jour (Cudennec et al. 2012). Dans l'étude menée par l'équipe de Chen et coll., l'effet court terme des extraits de pommes de terre sur la prise alimentaire a été mesuré sur 6h et une diminution a été observée (bien que non significative) pour le groupe ayant reçu l'extrait de pomme de terre (Chen et al. 2015).

### III.2. Effet de PWF sur la régulation de l'homéostasie énergétique des rats au cours des deuxième et troisième phases d'expérimentation

Dans une deuxième phase d'expérimentation, l'effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'homéostasie énergétique a été mesuré sur un modèle de rat adulte dans un état de déséquilibre alimentaire induit par une alimentation riche en matières grasses (**Figure 72**).



**Figure 72.** Schéma du protocole expérimental de la deuxième phase d'expérimentation.

Dans cette expérience, les rats ont de nouveau été séparés en quatre groupes de huit animaux dont un groupe dit de contrôle physiologique (charge quotidienne d'eau et régime de maintenance). Parmi les trois groupes en régime « riche en matières grasses », un groupe a reçu de l'eau (contrôle) et deux groupes ont reçu PWF à 250 mg (HP250) ou 500 mg (HP500) quotidiennement par administration oro-gastrique.

Comme décrit dans les parties précédentes, plusieurs facteurs permettent de réguler l'homéostasie énergétique. Les différents acteurs de la régulation de la prise alimentaire sont notamment la distension gastrique, mais également la sécrétion de différentes hormones par

les cellules entéroendocrines (CCK, GLP-1, PYY...) qui interviennent dans la régulation à court terme de l'homéostasie énergétique. D'autres hormones comme la leptine et l'insuline sont quant à elles des hormones intervenant notamment dans la régulation à long terme de la prise alimentaire en permettant d'informer le cerveau sur les quantités d'énergie stockées et disponibles. L'effet de l'hydrolysate PWF sur la stimulation de la sécrétion de ces hormones a donc été étudié au cours de cette étude. Une autre hormone principalement connue pour son effet incrétine a également été dosée, le GIP qui, avec le GLP-1, induit la sécrétion glucose-dépendante d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques.

### III.2.1. Effet de PWF sur la prise alimentaire et le poids de rats

Contrairement à la première phase d'expérimentation, la consommation de croquettes des animaux a été mesurée deux fois par jour : une fois pendant une période jour (7h30-17h30) et une fois pendant une période nuit (17h30-5h30 + 2h en période jour : 5h30-7h30). Le rat, étant un rongeur avec une activité plus intense la nuit, la consommation des croquettes s'est déroulée majoritairement pendant la nuit. Dans cette deuxième période, le gavage avec 500 mg d'hydrolysate PWF a provoqué une diminution de la prise alimentaire plus faible à partir de la deuxième semaine, devenue significativement différente de celle des autres groupes pendant la dernière semaine d'expérimentation et pour la période nuit uniquement. Ces résultats démontrent plutôt un effet à court terme de l'hydrolysate PWF confirmé par la consommation sur 24h qui n'est quant à elle, bien que plus faible, pas significativement différente entre les groupes. En effet, la consommation sur la période jour (10h de consommation) est légèrement plus importante pour le groupe HP500 pendant la septième semaine, ce qui semble montrer que les rats de ce groupe compensent en partie leur consommation plus faible au cours de la nuit et confirmerait un effet court terme de l'hydrolysate. En ce qui concerne le poids, le régime riche en matières grasses induit une grande variabilité intragroupe, et ce dans tous les groupes. Ainsi, PWF n'a pas induit d'effet sur la régulation du poids. Cependant, à la fin de l'expérimentation, les animaux du groupe HP500 ont obtenu un poids légèrement plus faible que dans les deux autres groupes en régime HF. Etant donné, qu'une différence sur la prise alimentaire a également été observée à partir de la septième semaine, il est vraisemblable que si l'expérimentation avait été poursuivie, l'hydrolysate PWF aurait induit une diminution plus importante du poids. D'autres études utilisant des hydrolysats de gluten ou de soja ont montré une diminution significative de la prise alimentaire et du poids des rats. Cependant, dans ces études, les rats ont d'abord consommé un régime riche en matières grasses pendant plusieurs semaines (entre 4 et 12

semaines), permettant d'induire un diabète de type 2, avant de mesurer l'effet de leur hydrolysate sur plusieurs semaines (2 mois) (Kim et al. 2009; Lee et al. 2015). L'hydrolysate PWF a montré un effet à partir de la dernière semaine d'expérimentation. En prolongeant cette deuxième phase d'expérimentation sur rats obèses et diabétiques, il aurait sans doute été possible d'observer un maintien de l'effet court terme de l'hydrolysate PWF sur la prise alimentaire pouvant *in fine* engendrer une diminution du poids des rats.

### III.2.2. Effet de PWF sur certains marqueurs plasmatiques

Dans une première expérience, l'effet de l'hydrolysate PWF sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales GLP-1 et GIP a été mesuré après un mois de régime riche en matières grasses. L'effet de l'hydrolysate PWF sur la stimulation de la sécrétion de ces hormones a également été mesuré sur des rats nourris en régime standard. Bien que l'apport quotidien de PWF n'ait pas permis d'induire une diminution de la prise alimentaire après un mois de régime riche en matières grasses, les taux plasmatiques de GIP et d'insuline, mais pas celui du GLP-1, augmentaient significativement pour HP500. Or, il a été mis en évidence que des hydrolysats de muscle de merlan bleu ou encore de caséine diminuaient la prise alimentaire et augmentaient la concentration plasmatique de GLP-1 (Cudennec et al. 2012; Nobile et al. 2016; O'Halloran et al. 2018). Dans notre expérience, l'augmentation non significative des niveaux plasmatiques de GLP-1 pourrait être corrélée à l'absence de différence significative de la prise alimentaire entre les différents groupes. La sécrétion d'insuline est stimulée par la sécrétion de GLP-1 et de GIP (Almutairi et al. 2018). Ici, pour le groupe HP500 en régime riche en matières grasses, les niveaux de GIP sont en adéquation avec ceux mesurés pour l'insuline plasmatique, ce qui n'est pas le cas pour le groupe HP500 en régime standard. Cette différence des niveaux d'insuline plasmatique pourrait être due uniquement au régime riche en matières grasses. En effet, le régime riche en matières grasses est couramment utilisé pour développer sur plusieurs semaines un modèle de rat en surpoids, voire diabétique, bien que la streptozotocine puisse également être utilisée pour installer plus rapidement ces troubles métaboliques (Huang et al. 2014). Ici, le groupe HP500 en régime riche en matières grasses présente un niveau d'insuline significativement plus élevé que le groupe contrôle en régime standard mais non significativement plus élevé que ceux des deux autres groupes soumis à un régime riche en matières grasses. Ces résultats peuvent laisser supposer que l'hydrolysate PWF n'améliore pas significativement certains dérèglements métaboliques qui commençaient à se mettre en place avec le régime riche en matières grasses dans les conditions de l'étude.

En revanche, après 53 jours de régime riche en matières grasses, le gavage quotidien par 500 mg d'hydrolysate PWF a induit une augmentation significative des niveaux circulants de CCK, GLP-1 et GIP par rapport à ceux mesurés pour le groupe contrôle HF. Des niveaux circulants de CCK significativement plus élevés ont également été observés pour le groupe HP250 alors que les niveaux circulants de GLP-1 et de GIP n'étaient pas significativement plus élevés que ceux des contrôles HF et physiologique. Les niveaux plasmatiques de CCK consécutifs à la consommation de PWF pourraient correspondre au début du pic de sécrétion de CCK. En effet, la sécrétion de CCK induite par une administration duodénale d'extrait de pomme de terre augmente pour atteindre son pic de sécrétion 90 minutes après l'administration duodénale (Chen et al. 2015). Or dans notre étude, le sang a été récolté 30 min après le gavage, ce qui permettait de se positionner dans le pic de sécrétion pour d'autres hormones telles que le GLP-1 ou encore l'insuline. Les niveaux circulants élevés de GLP-1 et de GIP induits par la charge de HP500, ont potentiellement stimulé la sécrétion d'insuline à la fin de l'expérimentation. L'ensemble des résultats sur les dosages plasmatiques montre une forte corrélation entre la diminution de la prise alimentaire sur le court terme (période nuit) induit par l'hydrolysate PWF à la plus forte dose et la sécrétion des hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire.

Comme évoqué précédemment, l'enzyme DPP-IV inactive les hormones incrétines réduisant leur demi-vie et donc leurs actions biologiques au niveau des organes (Nauck and Meier 2018). Les résultats des dosages réalisés sur les plasmas récoltés au moment du sacrifice n'ont pas montré de diminution de l'activité de la DPP-IV plasmatique chez les groupes recevant l'hydrolysate PWF. Cependant, l'activité plasmatique du groupe HP500 est légèrement plus faible que les activités plasmatiques des groupes contrôle HF et HP250. Un hydrolysate de gélatine de saumon (donné pendant cinq semaines) a permis d'induire une diminution significative de l'activité de l'enzyme DPP-IV plasmatique chez des rats diabétiques (modèle induit par streptozotocine) en comparaison d'un groupe contrôle diabétique et d'un groupe contrôle non diabétique. Ces résultats étaient corrélés avec des niveaux plasmatiques de GLP-1 significativement plus élevés pour le groupe recevant l'hydrolysate de poisson et avec des niveaux plasmatiques d'insuline significativement plus faibles que ceux obtenus pour leur groupe contrôle non diabétique, mais significativement plus élevés que leur groupe contrôle diabétique. Les auteurs ont conclu que leur hydrolysate de gélatine de saumon induisait une amélioration du contrôle du glucose sanguin (Hsieh et al. 2013). Ainsi, bien que l'hydrolysate PWF induise une augmentation significative des niveaux plasmatiques de GLP-1 et de GIP

ainsi qu'une activité de la DPP-IV plasmatique légèrement plus faible en comparaison avec le groupe contrôle HF, les niveaux d'insuline plasmatiques sont légèrement plus élevés (non significatifs) que celui du groupe contrôle en régime standard. Ces résultats laissent supposer que les rats, à la fin de ces deux mois d'expérimentation, ne sont pas diabétiques mais pourraient tout de même présenter une insulino-résistance. Ainsi, si l'expérience avait continué, tout laisse à penser que l'hydrolysate aurait eu un effet préventif sur le diabète via une meilleure régulation du métabolisme glucidique.

Bien qu'aucune différence significative n'ait été observée pour les niveaux circulants de leptine entre les différents groupes, des niveaux légèrement plus élevés ont été mesurés pour le groupe contrôle HF (4 000 pg.mL<sup>-1</sup>) et HP500 (3 000 pg.mL<sup>-1</sup>). La masse du tissu adipeux viscéral a été rapportée au poids final de chaque animal, et ces résultats montrent un rapport significativement plus grand pour les groupes contrôle HF et HP500. Il est pourtant connu que le niveau circulant de leptine est corrélé à la masse grasse (Cui et al. 2017). Cependant, une autre étude a montré qu'un régime riche en matières grasses induisait une augmentation non significative des niveaux de leptine (5 ng.mL<sup>-1</sup>) chez des rats par rapport au groupe contrôle physiologique en régime de maintenance (2 ng.mL<sup>-1</sup>). Cette équipe a également montré une différence significative sur la masse du tissu adipeux de l'épididyme après 20 semaines de régime HF (Moreno-Fernández et al. 2018). Une étude menée sur des souris a montré l'effet de collagène de raie sur les niveaux circulants de leptine après 8 semaines de régime riche en matières grasses. Le groupe recevant du collagène de raie a montré une diminution significative des niveaux de leptine de 23% en comparaison au contrôle en régime riche en matières grasses. Néanmoins les niveaux plasmatiques de leptine dans ce groupe étaient significativement plus élevés que ceux observés dans le groupe contrôle en régime standard (Woo et al. 2018)

Il est également important de mettre en avant que les résultats obtenus pour les hormones intestinales CCK et GLP-1 au cours de l'étude *in vivo* sont corrélés avec ceux obtenus *in vitro*, résultats qui montrent le potentiel de PWF à stimuler la sécrétion des hormones intestinales à l'issue d'une digestion GI simulée. Cependant les peptides impliqués dans la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales par les cellules STC-1 et générés au cours de la digestion *in vitro* ne sont peut-être pas les mêmes que ceux générés par la digestion *in vivo* des rats. Bien que l'hydrolysate PWF stimule la sécrétion de GLP-1 par les cellules STC-1, sa capacité à inhiber l'enzyme DPP-IV du côté basolatéral d'une monocouche de cellules Caco-2 n'a pas pu être démontrée dans les conditions expérimentales de l'étude.

Ici, l'étude *in vivo* n'a pas non plus permis de montrer une diminution significative de l'activité de la DPP-IV plasmatique. Ainsi, l'ensemble des résultats indiquerait que la biodisponibilité des peptides inhibiteurs de l'activité de la DPP-IV, présents dans la lumière intestinale, n'est pas suffisante pour inhiber la DPP-IV plasmatique. D'autres expériences seraient nécessaires pour s'en assurer, et notamment en réalisant une cinétique de dosage de l'activité de la DPP-IV plasmatique après l'administration de l'hydrolysate. Une autre étude a montré qu'un hydrolysate de saumon avant et après digestion GI induisait un effet anti-glycémique, et ce sur la base de résultats obtenus *in vitro* sur la sécrétion du GLP-1 par les cellules GLUTag, l'inhibition de l'activité de la DPP-IV (testé pour l'activité de l'enzyme DPP-IV purifiée) et la sécrétion d'insuline suite à un contact direct de l'hydrolysate avec la lignée cellulaire pancréatique BRIN-BD11. Cependant dans cette étude, la digestion intestinale a été réalisée avec de la Corolase PP (contenant de la chymotrypsine, de l'élastase, des dipeptidases et des aminopeptidases) à la place de la pancréatine (contenant de l'amylase pancréatique, de la trypsine, de la chymotrypsine et des lipases) produisant probablement des séquences peptidiques qui ne sont pas générées par la pancréatine mais pouvant permettre de simuler l'action des enzymes de la bordure en brosse (Harnedy et al. 2018a). Cette même équipe a montré également l'effet antidiabétique d'un hydrolysate de merlan bleu par la mesure de son potentiel par les mêmes tests *in vitro* réalisés pour montrer le potentiel de son hydrolysate de saumon. Cependant, dans cette étude les résultats ont été confirmés en mesurant l'effet de cet hydrolysate sur la régulation de l'homéostasie glucidique mesuré au cours d'un test de tolérance au glucose chez la souris en dose aiguë. Le test de tolérance au glucose a été réalisé après l'administration d'une charge de glucose seule ou en combinaison avec l'hydrolysate mais également par l'administration d'une charge de glucose après 4 ; 8 ou 12h après la charge de merlan bleu (Harnedy et al. 2018b). Dans notre étude, les tests de tolérance au glucose réalisés ont été mis en place afin de s'assurer que les rats ne devenaient pas diabétiques, mais également afin de mesurer l'effet à long terme de l'administration de l'hydrolysate PWF sur le retardement de la mise en place des troubles du métabolisme. Les résultats obtenus ont permis de montrer que les rats n'ont pas atteint un état diabétique mais le calcul des scores HOMA-IR (score de l'insulino-résistance) et HOMA  $\beta$  (dysfonctionnement des cellules  $\beta$ -pancréatique) montrent que les rats devenaient sans doute diabétiques.

### **III.3. Mesure du potentiel de PWF à réguler l'expression de certains gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique**

Il semblait pertinent d'étudier comment l'hydrolysate pouvait moduler l'expression des gènes codant les marqueurs d'intérêt après une administration oro-gastrique quotidienne de l'hydrolysate PWF pendant quasiment deux mois au cours de la deuxième phase d'expérimentation chez le rat. Au cours de cette étude, les organes connus pour contenir les cellules endocrines ont été prélevés afin de quantifier l'expression des gènes des hormones impliquées dans l'homéostasie. De plus, la modification de l'expression des gènes codant les neurotransmetteurs impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (NPY, AgRP, POMC et CART) a été mesurée.

L'analyse a montré que l'expression des gènes, dans les groupes HP, codants les hormones CCK et GIP dans le duodénum et dans le jéjunum, ainsi que le proglucagon et l'enzyme DPP-IV dans l'iléon, n'était pas significativement différente de l'expression de ces gènes dans le groupe contrôle HF. La mesure de l'expression des gènes permet de mettre en évidence, sur le long terme, l'effet d'une molécule, d'un hydrolysate ou d'un régime alimentaire sur des voies de régulation plus complexes. Les résultats obtenus sur les niveaux plasmatiques des hormones intestinales ont montré une stimulation de leur sécrétion induite par l'hydrolysate PWF. Cette stimulation pourrait être corrélée à une surexpression de ces gènes, permettant à la cellule de régénérer les stocks d'hormones disponibles. Le groupe HP250 a montré une quantité relative d'ARNm transcrit codant CCK et GIP légèrement plus élevée que celle du groupe contrôle HF au niveau du duodénum. C'est au niveau du jéjunum que l'hydrolysate PWF à 500 mg a induit une légère surexpression du gène codant les CCK par rapport au contrôle HF qui pourrait être corrélée à l'augmentation de la concentration de CCK circulante. Le groupe HP500 montre également une légère surexpression de la quantité relative d'ARNm du proglucagon transcrit, par rapport au groupe contrôle HF, qui pourrait également être corrélée à la concentration de GLP-1 plasmatique. Peu d'études ont pu mettre en évidence une augmentation de l'expression des gènes codant les CCK, le GLP-1 et la DPP-IV liée à la consommation de protéines (Costa et al. 2018; Elekofehinti et al. 2018). Le gavage oro-gastrique par des protéines de graines de Tamarin a montré une augmentation de l'expression du gène codant les CCK par rapport au groupe en régime standard (3 fois plus), mais pas en comparaison au groupe contrôle recevant également une alimentation avec un index glycémique élevé. Cependant ces résultats n'étaient pas corrélés avec les niveaux de CCK plasmatiques (Costa et al. 2018). Dans la deuxième étude, il a été mis en évidence l'effet de

protéines de melon sur l'expression des gènes codant le proglucagon et la DPP-IV, les résultats ont montré une surexpression gène codant le proglucagon avec une sous-expression du gène codant la DPP-IV. Cependant, les protéines étaient données via l'alimentation (inclusion dans les croquettes) pendant 72h et cette étude n'a pas mesuré la prise alimentaire ni les niveaux plasmatiques de GLP-1, ni l'activité de la DPP-IV plasmatique (Elekofehinti et al. 2018).

Concernant enfin les quantités relatives d'ARNm transcrits des gènes des neurotransmetteurs, aucune différence significative entre les groupes n'a été observée. L'activation ou la stimulation des neurones NPY entraînent une augmentation de la prise alimentaire, ainsi qu'une diminution de la dépense énergétique. Et inversement, l'activation des neurones POMC induit une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique (Roh and Kim 2016). En raison de l'effet à court terme de réduction de la prise alimentaire observé après gavage avec l'hydrolysate PWF. Il aurait été cohérent d'observer une baisse de l'expression du gène codant le NPY et une surexpression des gènes codant POMC et CART. Bien que cette étude ait duré quasiment deux mois, les animaux n'ont pas reçu de charge d'hydrolysate pendant les deux jours précédents le sacrifice. De plus, les animaux ont été sacrifiés 30 minutes après avoir reçu leur traitement habituel, ainsi, il est possible que les conditions de mise à jeun sur la nuit et de sacrifice (30 min après le gavage), soient à l'origine de l'absence de modification de l'expression de gènes des neurotransmetteurs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, la régulation de la prise alimentaire à court terme est un processus rapide et l'expression des gènes codant les neurotransmetteurs aurait pu revenir à son état initial. Ainsi, une étude a montré qu'une injection intrapéritonéale d'hydrolysate de poisson (lieu d'Alaska) correspondant au digestat intestinal (hydrolysé par la pepsine pendant 3h puis par la pancréatine pendant 3h) chez des rats induisait une diminution de la prise alimentaire, du poids, du tissu adipeux mais également une diminution de l'expression des gènes codant les neurotransmetteurs impliqués dans la prise alimentaire (NPY et AgRP). Dans cette étude, les rats ont été nourris *ad libitum* avec une alimentation standard et ont reçu soit de la solution saline soit l'hydrolysate de poisson deux fois par jour pendant deux jours. Dans cette étude, les rats ne semblent pas être mis à jeun et les auteurs ne précisent pas combien de temps après injection les animaux ont été sacrifiés (Mizushige et al. 2017).

Les résultats obtenus *in vitro* pour les deux hydrolysates (PWF et XVP 15035) et *in vivo* pour l'hydrolysate PWF ont permis de démontrer l'effet de ces hydrolysates sur la régulation de

l'homéostasie avec un effet court terme de ces hydrolysats sur la prise alimentaire induisant une stimulation de la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) corrélée avec les niveaux plasmatiques chez le rat et inhibant l'activité de l'enzyme DPP-IV. Cette étude a également pu mettre en évidence l'implication des quatre séquences peptidiques pour la stimulation de la sécrétion des CCK par les cellules STC-1 et deux peptides au potentiel intéressant pour l'inhibition de l'activité de la DPP-IV.

# Conclusions et perspectives

---

## **I. Conclusions**

La régulation de l'homéostasie énergétique est un mécanisme complexe qui implique de nombreux signaux produits par différents organes. Ainsi, il est aujourd'hui reconnu que la digestion des nutriments permet, outre le fait d'apporter l'énergie nécessaire à la survie des cellules, de stimuler la sécrétion de différentes hormones agissant comme des signaux informant sur la disponibilité de l'énergie. Ces hormones agissent au niveau du système nerveux central par différents modes d'action (action directe sur l'hypothalamus ou le tronc cérébral ou encore via le nerf vague) stimulant ou non la prise alimentaire par des systèmes de régulation à court et à long terme. Dans ce travail, deux hydrolysats protéiques d'origines différentes, sélectionnés au cours d'une précédente étude, ont été étudiés pour leur capacité à réguler l'homéostasie énergétique et en particulier via la régulation de la prise alimentaire. Dans un premier temps, l'impact de la digestion gastro-intestinale (GI) sur la population peptidique des deux hydrolysats mais également sur les protéines de leurs matières premières a été mesuré par chromatographie d'exclusion stérique. Au cours de la digestion GI, les potentiels de ces deux hydrolysats et de leurs matières premières à moduler la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) par les cellules STC-1 ainsi que leur capacité à inhiber l'activité de l'enzyme DPP-IV purifiée ou intestinale ont été étudiés. Les digestats intestinaux des hydrolysats protéiques PWF et XVP 15035 ont ensuite été fractionnés par deux techniques de chromatographie liquide en série dans le but de sélectionner les fractions montrant le meilleur potentiel stimulateur de la sécrétion des hormones intestinales et d'identifier la population peptidique composant les sous-fractions les plus bioactives. A partir des séquences peptidiques identifiées, une sélection de peptides a été synthétisée afin d'identifier ceux qui pouvaient être responsables de la stimulation de la sécrétion de CCK. En parallèle, l'identification des séquences peptidiques, constituant les digestats intestinaux des hydrolysats protéiques, capables de traverser une barrière intestinale simulée par une monocouche de cellules Caco-2 a été réalisée. Le potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV de ces peptides a alors été mesuré, puis une sélection parmi les séquences peptidiques identifiées a été synthétisée afin d'identifier les peptides inhibiteurs. Enfin, dans une dernière partie, le potentiel de l'hydrolysat PWF à réguler l'homéostasie énergétique a été mesuré chez le rat. Ainsi, les résultats obtenus ont permis de démontrer d'une part l'importance d'hydrolyser industriellement les matières premières pour générer une population peptidique avec un fort potentiel pour la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) et pour l'inhibition de l'activité de la DPP-IV. Les résultats ont d'autre part montré le

fort potentiel de l'ensemble des digestats intestinaux pour les trois activités testées mais surtout pour l'hydrolysate PWF qui a maintenu son fort potentiel de la sécrétion de CCK et l'inhibition de l'activité de la DPP-IV avant et après action des enzymes digestives. Ces résultats obtenus *in vitro* ont été confirmés par l'étude *in vivo* chez le rat pour l'hydrolysate PWF. Ainsi, une augmentation des niveaux plasmatiques des hormones impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique à court terme (CCK, GLP-1, mais également GIP) et une diminution de la prise alimentaire (effet court terme, sur la consommation en période nuit) ont été observées. Cette étude, nous permettant de mesurer le potentiel de PWF sur les marqueurs de la régulation de la prise alimentaire à long terme, a permis de montrer une augmentation des niveaux circulants d'insuline vraisemblablement induite par la stimulation des hormones incrétines (GLP-1 et GIP). Les travaux de thèse ont également permis d'identifier quatre nouvelles séquences peptidiques stimulant la sécrétion des CCK et deux nouvelles séquences peptidiques montrant un potentiel intéressant inhibant l'activité de la DPP-IV. Ainsi, ces hydrolysats présentent un potentiel prometteur pour la prévention du développement de l'obésité et du diabète et pourront être valorisés dans l'alimentation des animaux de compagnie chien et chat après que les effets aient été confirmés chez ces animaux.

Ces travaux de thèse devraient permettre à l'entreprise de rédiger une demande de brevet visant à protéger et à valoriser l'application des résultats sur le marché pet food. Par ailleurs, une partie de ces travaux a été présentée lors du 2<sup>nd</sup> symposium sur les peptides bioactifs qui s'est déroulé à Valence (Espagne) du 22 au 24 mai 2019. Enfin, un article scientifique portant sur les résultats obtenus pour l'hydrolysate PWF est en cours d'écriture.

## **II. Perspectives**

### **II.1. Simulation de la digestion gastro-intestinale des hydrolysats protéiques et de leurs matières premières**

Dans cette première partie, nous avons mis en place un système statique de digestion simulant *in vitro* la digestion GI du chien et mis en évidence les effets sur la régulation de l'homéostasie énergétique, et notamment sur la régulation de la prise alimentaire, des digestats intestinaux de deux hydrolysats protéiques (une source poisson : PWF et une source carnée : XVP 15035). Ces hydrolysats protéiques sont des ingrédients qui pourront être mis en inclusion dans les aliments spécifiques, comme des croquettes, destinées aux animaux de compagnie. En perspective de ce travail, il serait intéressant de réaliser une étude sur des

aliments contenant les hydrolysats protéiques, permettant de prendre en compte la complexité de l'aliment. Pour cela, le modèle statique de digestion *in vitro* n'est pas suffisant et l'utilisation du TIM, qui est un modèle dynamique de digestion GI proposé en 1998 par Smeets-Peeters et coll (Smeets-Peeters et al. 1998), apporterait des informations complémentaires. Le modèle dynamique, tout comme les modèles statiques, permet de simuler certains paramètres gastro-intestinaux tels que les conditions physico-chimiques 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) mais il simule également la cinétique de digestion ce qui n'est pas le cas des modèles de digestion *in vitro* statique (Kalantzi et al. 2006).

## **II.2. Peptides issus des protéines agroalimentaires et régulation de l'homéostasie énergétique**

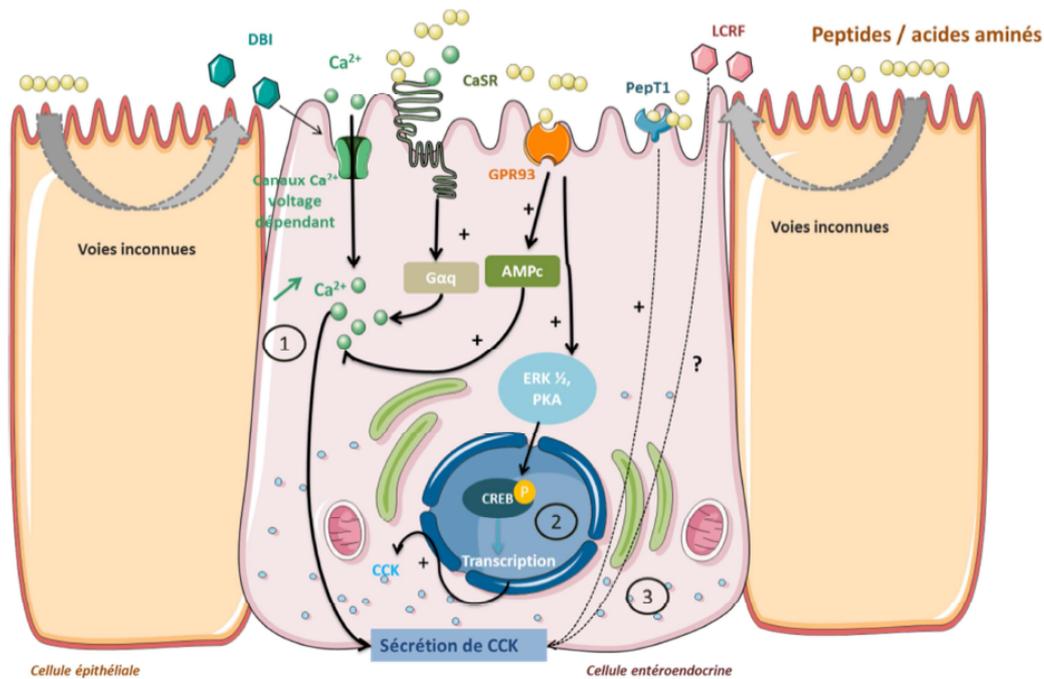
Cette deuxième partie, axée sur la caractérisation des hydrolysats protéiques a confirmé l'effet des digestats intestinaux des deux hydrolysats protéiques ainsi que de leurs matières premières sur la stimulation de la sécrétion des hormones intestinales (CCK et GLP-1) et sur l'inhibition de l'activité de l'enzyme DPP-IV. Nous avons mis en évidence d'une part, l'importance de l'hydrolyse préalable dans la génération d'une population peptidique bioactive, et d'autre part le fait que la digestion GI génère des peptides bioactifs capables de stimuler la sécrétion de ces hormones et d'inhiber l'activité de l'enzyme DPP-IV. Ce travail de thèse a également permis d'identifier une petite proportion des peptides responsables des activités biologiques étudiées. Afin d'identifier un plus grand nombre de peptides dans ces sous-fractions, une étape préliminaire aurait pu être réalisée par l'ajout d'une colonne HILIC ou par la réalisation de deux étapes différentes d'identification par RP-MS/MS et par HILIC-MS/MS ce qui aurait probablement permis d'identifier plus de peptides polaires (Buszewski and Noga 2012; Le Maux et al. 2015a). D'autres techniques séparatives telles que l'électrophorèse capillaire ou la chromatographie en fluide supercritique pourraient également apporter de nouvelles informations sur la caractérisation des peptidomes (Ibáñez et al. 2013; Tognarelli et al. 2010). La digestion GI conduit à l'obtention d'une population peptidique de faible poids moléculaire sous l'action des enzymes digestives. L'identification réalisée au cours de cette étude n'a pas permis d'identifier des peptides contenant moins de quatre acides aminés. Bien que les avancées en spectrométrie de masse aient permis d'améliorer l'identification des séquences peptidiques, notamment avec le développement des banques de données, cette étude a encore démontré les limites de la spectrométrie de masse pour l'étude

des peptidomes. En effet, le logiciel Peaks Studio n'a pas permis l'identification des peptides de faibles poids moléculaires (< 500 Da). Ainsi, la population peptidique présente dans la sous-fraction FF du digestat intestinal de XVP 15035 a été identifiée quasiment uniquement par le mode *de novo* permettant, à partir de la fragmentation des ions, de générer une séquence en suivant un algorithme, séquence néanmoins non répertoriée en banque de données (Muth and Renard 2018). Enfin, le développement d'une méthode de quantification des peptides dans les mélanges complexes permettrait de montrer l'intérêt des peptides bioactifs dans l'hydrolysate et potentiellement de ne s'intéresser qu'aux peptides présents en grande quantité dans le mélange. L'utilisation d'un protocole de dosage par étalonnage interne et reposant sur l'ajout d'une molécule connue servant de référence, l'étalon interne, à une quantité connue dans les échantillons aurait permis de s'affranchir des variations de paramètres expérimentaux (instrument, utilisateur, etc.). Cependant, 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 (Scott et al. 2015). L'étalonnage interne peut également être réalisé à l'aide des peptides cibles marqués et ajoutés au mélange. La quantification d'un peptide cible peut aussi se faire à l'aide d'une gamme de ce même peptide, réalisée en parallèle de l'identification du peptide au sein de l'échantillon. Cependant, cette technique exige de simuler la complexité de l'échantillon dans lequel se trouve le peptide cible afin de prendre en compte les interactions que peut avoir ce peptide en mélange avec les autres constituants et la colonne. Une autre méthode, permettant de suivre la fragmentation de l'ion parent et de quantifier les peptides dans l'échantillon, est la méthode en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring). Il s'agit de la technique la plus développée des approches protéomiques ciblées. Cette technique utilise deux quadripôles comme filtres pour analyser un ion précurseur et fragment spécifique. Un quadripôle agit comme un filtre des masse/charge ( $m/z$ ) pour les ions précurseurs (premier quadripôle) et un quadripôle qui agit comme un filtre des  $m/z$  pour les ions fragments (dernier quadripôle). Entre ces deux quadripôles, il y a un autre quadripôle qui sert de cellule de collision. Cette technique permet la détection des ions fragments des peptides d'intérêt (Ankney et al. 2018; Deracinois et al. 2013).

Dans cette thèse, nous avons également identifié les peptides pouvant être responsables de la régulation de la prise alimentaire. Sur les quarante peptides synthétisés, quatre peptides (PSLVH et DLVDK pour l'hydrolysate protéique PWF et FPYPLPRPL et VLPL pour l'hydrolysate protéique XVP 15035) ont stimulé la sécrétion de CCK par les cellules STC-1.

Les résultats obtenus ici sont très importants pour la communauté scientifique car peu de séquences ont été publiées à ce jour. Ces données associées à celles consignées dans la littérature qui concernent les peptides recensés capables de stimuler la sécrétion des hormones intestinales pourraient contribuer à établir enfin des liens concrets entre les séquences peptidiques, leur taille, leur composition en acides aminés, leur conformation tridimensionnelle et l'activité biologique. A terme, le recensement des séquences peptidiques permettrait de créer un algorithme pour prédire le potentiel de chaque séquence peptidique comme le modèle QSAR qui a été notamment développé pour identifier *in silico* le potentiel des peptides inhibiteurs de l'activité de la DPP-IV (Nongonierma and Fitzgerald 2016). Ce modèle a été mis au point au cours d'une étude conséquente et permet de donner un score à chaque acide aminé selon qu'il se trouve en première, deuxième, dernière ou avant dernière position dans la séquence peptidique. A partir de ces scores, une  $IC_{50}$  peut être calculée à partir de la séquence peptidique (Nongonierma and Fitzgerald 2016).

Enfin une perspective particulièrement importante serait de comprendre les modes d'action des peptides qui conduisent à la sécrétion de ces hormones et ainsi identifier les récepteurs impliqués. En effet, la sécrétion des hormones intestinales en réponse à des oligopeptides implique des récepteurs appartenant, pour la plupart, à la famille des RCPG (Choi et al. 2007b; Conigrave and Hampson 2010). Pour cela, l'ajout d'inhibiteurs des récepteurs impliqués dans la sécrétion des hormones intestinales (RPG93, CaSR par exemple) est couramment utilisé pour déterminer les modes d'action des peptides. Néanmoins, plusieurs voies parallèles semblent être impliquées (**Figure 73**), notamment celles utilisant le transporteur PepT1 ou des canaux voltage dépendants et qui pourraient être activées simultanément par plusieurs oligopeptides (effet synergique), rendant l'identification des peptides bioactifs responsables de la sécrétion des hormones plus complexe (Liou et al. 2011).



**Figure 73.** Voies de signalisation activées par les peptides et les acides aminés impliquées dans la sécrétion et la synthèse de CCK.

Les peptides présents dans la lumière intestinale peuvent activer la sécrétion de CCK par (1) une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire résultant d'une activation du CaSR ou de RPR93. Les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage dépendant permettent une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire sous l'action des récepteurs CaSR et RPR93 ou d'une dépolarisation de membrane provoquée par le transport de dipeptides par PepT1. L'activation de RPR93 par les peptides peut engendrer une activation de la transcription du gène CCK (2) en activant les voie 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 (Caron et al. 2017a).

Au cours de cette étude, le potentiel de chaque peptide synthétisé a été mesuré seulement pour la sécrétion de CCK. Ainsi, il serait intéressant de réaliser une étude complémentaire utilisant des inhibiteurs spécifiques des récepteurs impliqués dans les voies de signalisation et de tester des mélanges de peptides de façon équimolaire ou avec des ratios différents. Cette étude pourrait mener à l'identification des voies parallèles impliquées dans la sécrétion des CCK. Des travaux en cours s'intéressent à mesurer l'effet de quarante peptides sur la stimulation de la sécrétion de GLP-1 par les cellules entéroendocrines.

Dans cette étude, la modulation de l'activité de la DPP-IV par les peptides capables de passer au travers de la barrière intestinale, simulée par une monocouche de cellules Caco-2, a été suivie. Les tests utilisés ont cherché à reproduire le plus fidèlement possible les mécanismes physiologiques, d'où l'importance de mimer la digestion et de développer des tests permettant de se rapprocher au maximum des conditions de l'environnement intestinal (cellules cibles, passage au travers de la barrière etc...). Les résultats ont permis de montrer que les digestats

intestinaux des hydrolysats ne modifiaient pas l'intégrité d'une barrière intestinale simulée, confirmant probablement une autre voie de passage que le passage entre les jonctions serrées des entérocytes. Le nombre de peptides identifiés du côté basolatéral représente une proportion très faible de ce qui est présent dans les digestats intestinaux (côté apical) et l'activité inhibitrice de l'enzyme n'a pas été retrouvée après le passage de la barrière intestinale dans les conditions expérimentales de l'étude. Parmi les treize peptides, deux peptides issus du digestat intestinal de PWF (DLDL et MDLP) et un peptide issu du digestat intestinal de XVP 15035 (FPKATG) ont montré, *in situ* sur cellules Caco-2 vivantes, un bon potentiel inhibiteur de l'activité de la DPP-IV. En perspectives, il serait donc intéressant de chercher à connaître le mode d'inhibition des peptides (Domenger et al. 2017).

Au cours de l'étude *in vivo*, un modèle rat a permis de mettre en évidence l'effet court terme de l'hydrolysat PWF dans la régulation de l'homéostasie énergétique chez des animaux en croissance et en bonne santé et chez des animaux confrontés à un déséquilibre alimentaire. Une des principales conclusions tirées de cette étude a été, au cours de la première phase, que le nombre d'animaux par groupes étaient peut-être trop faible et que le temps d'expérimentation était peut-être trop court pour montrer des effets significatifs sur la prise alimentaire et le poids. Au vu des résultats, il aurait été intéressant de prolonger la première phase d'expérimentation. Cette même perspective est également valide pour la deuxième phase, d'autant plus que la prise alimentaire n'a commencé à diminuer qu'à partir de la sixième semaine d'expérimentation. Cependant les rats seraient devenus diabétiques et obèses (point limite de cette deuxième phase d'expérimentation), mais le prolongement de cette phase aurait sans doute permis de visualiser une perte de poids pour les groupes recevant l'hydrolysat PWF. De plus, il aurait été également intéressant d'avoir un groupe contrôle matière première afin de comparer les effets de l'hydrolysat et celui de la matière première. Les effets des hydrolysats protéiques sur les niveaux plasmatiques des hormones impliquées dans la régulation à court terme de l'homéostasie énergétique ont été couramment démontrés avec différentes sources en comparaison d'un contrôle physiologique. Cependant, de plus en plus d'études utilisent, en plus d'un contrôle physiologique, un contrôle iso-énergétique afin de montrer l'effet de leurs hydrolysats. En perspectives, les résultats obtenus sur la prise alimentaire et le poids des animaux laissent supposer que ces deux phases d'expérimentation pourraient être complétées par d'autres études complémentaires. Dans un premier temps, l'utilisation d'animaux adultes et non en croissance, pour lesquels la consommation journalière est stabilisée, pourrait permettre d'observer plus rapidement l'effet de l'hydrolysat

protéique en régime standard avec une diminution de la prise de poids des animaux. Pour la deuxième phase, il serait pertinent de travailler avec un modèle de rats diabétiques et obèses pour montrer plus rapidement l'effet de PWF sur la prise alimentaire mais également afin d'évaluer son effet dans le temps. En effet, la mise en place du régime riche en matières grasses induisant des modifications physiologiques importantes probablement plus fortes que celles induites par l'hydrolysate PWF qui ont pu passer inaperçues. Bien que cette expérimentation soit une preuve de concept pour évaluer l'effet de l'hydrolysate PWF sur la régulation de l'homéostasie énergétique et que le gavage oro-gastrique reste l'une des meilleures solutions pour s'assurer que la charge donnée est la même pour tous les animaux ; il serait également intéressant de mesurer les effets de l'hydrolysate en le donnant directement via l'alimentation (en inclusion dans des croquettes par exemple). En effet, les rats étant des rongeurs consommant de petites quantités tout au long de la nuit, puis de la journée, des différences auraient pu être observées sur la prise alimentaire en comparaison d'un groupe contrôle physiologique. Le fait de donner continuellement l'hydrolysate via l'alimentation, permet d'observer l'effet de l'hydrolysate sur la modulation de l'expression des gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique comme il a pu être observé avec une hydrolysate de melon pour l'expression du gène codant le proglucagon et la DPP-IV (Elekofehinti et al. 2018).

Pour conclure et continuer dans les perspectives, les hydrolysats protéiques PWF et XVP 15035 ont montré un potentiel intéressant dans la régulation de la prise alimentaire au travers des analyses réalisées *in vitro* et *in vivo* (sur modèle rats pour l'hydrolysate PWF). Il serait donc intéressant de confronter les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* pour l'hydrolysate protéique PWF et les résultats obtenus *in vitro* pour l'hydrolysate protéique XVP 15035 sur un modèle chien et/ou chat, avec le même mode d'administration de l'hydrolysate que celui utilisé au cours de l'étude sur le modèle rat. Il serait également pertinent de mesurer leurs effets dans les conditions d'utilisation prévues pour les animaux de compagnie, à savoir en inclusion dans les croquettes ou dans les friandises sur une longue durée et sur des animaux en surpoids. Pour cela, le développement de méthodes est nécessaire afin de mesurer l'effet des hydrolysats sur la satiété des chats et des chiens. La prise de l'hydrolysate étant basée sur le bon vouloir de l'animal à le manger, il est nécessaire de différencier l'effet satiétant de l'hydrolysate à un effet d'inappétence que peut présenter le produit. De plus, il est important pour l'entreprise de mesurer l'effet de l'hydrolysate dans la forme dans laquelle il sera incorporé et de vérifier sa stabilité au procédé et de déterminer sa durée. Ainsi différentes

applications pour ces hydrolysats peuvent être envisagées et leurs effets doivent être mesurés. Il serait intéressant, par exemple, de mesurer le potentiel des hydrolysats à diminuer les surconsommations chez les chiens et les chats, qui apparaissent après la stérilisation (animaux qui ont tendance à développer du surpoids), et donc le poids des animaux. Un effet des hydrolysats sur la diminution des surconsommations permettrait de diminuer certaines contraintes comme le rationnement.

# Références bibliographiques

---

- Abdalla, MM. 2017. "Central and peripheral control of food intake." *Endocrine Regulations* 51 (1): 52–70.
- Abou-Samra, R; Keersmaekers, L; Brienza, D; Mukherjee, R; Macé, K. 2011. "Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter." *Nutrition Journal* 10-139.
- Agyei, D; Danquah, MK. 2011. "Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides." *Biotechnology Advances* 29 (3): 272–7.
- Almutairi, M; Al Batran, R; Ussher, JR. 2018. "Glucagon-like peptide-1 receptor action in the vasculature." *Peptides* 111:26-32.
- Amin, A; Neophytou, C; Thein, S; Martin, NM; Alamshah, A; Spreckley, E; Bloom, SR; Murphy, HG. 2018. "L-arginine increases postprandial circulating GLP-1 and PYY levels in humans." *Obesity Journal* 26 (11): 1721-1726.
- Ankney, JA; Muneer, A; Chen, X. 2018. "Relative and absolute quantitation in mass spectrometry-based proteomics." *Annual Review of Analytical Chemistry* 11 (1): 49–77.
- Arndt, M; Chokshi, H; Tang, K; Parrott, NJ; Reppas, C; Dressman, JB. 2013. "Dissolution media simulating the proximal canine gastrointestinal tract in the fasted state." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84 (3): 633–41.
- Artursson, P; Karlsson, J. 1991. "Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 175 (3): 880–5.
- Artursson, P; Palm, K; Luthman, K. 2001. "Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport." *Advanced Drug Delivery Reviews* 46 (1-3): 27–43.
- Augstein, P; Naselli, G; Loudovaris, T; Hawthorne, WJ; Campbell, P; Bandala-Sanchez, E; Rogers, K; Heinke, P; Thomas, HE; Kay, TW; Harrison, LC. 2015. "Localization of dipeptidyl peptidase-4 ( CD26 ) to human pancreatic ducts and islet alpha cells." *Diabetes Research and Clinical Practice* 110 (3): 291-300.
- Bauer, PV; Hamr, SC; Duca, FA. 2015. "Regulation of energy balance by a gut-brain axis and involvement of the gut microbiota." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (4): 737-55.
- 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." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87 (2): 290-8.
- Begg, DP; Woods, SC. 2013. "The endocrinology of food intake." *Nature Reviews Endocrinology* 9 (10): 584–97.
- Bensaïd, A; Tomé, D; Gietzen, D; Even, P; Morens, C; Gausseres, N; Fromentin, G. 2002. "Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats." *Physiology and Behavior* 75 (4): 577–82.
- Bernard, C. 1878. *Leçon sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux*. Edited by JB Baillièrre et Fils. 2e édition. <https://archive.org/details/leonssurlesp02bern/page/6>.
- Blundell, J., de Graaf, C; Hulshof, T; Jebb, S; Livingstone, B; Lluch, A; Mela, D; Salah, S; Schuring, E; van der Knaap, H; Westerterp, M. 2010. "Methodological aspects of the evaluation of foods." *Obesity Reviews* 11 (3): 251–70.
- Bontempo, V. 2005. "Nutrition and health of dogs and cats: evolution of petfood." *Veterinary Research Communications* 29 (SUPPL. 2): 45–50.
- Boots, JWP. 2013. Protein hydrolysate enriched in peptides inhibiting DPP-IV and their use. WO/2006/068480.
- Bosch, G; Hagen-Plantinga, EA; Hendriks, WH. 2015. "Dietary nutrient profiles of wild wolves: insights for optimal dog nutrition?." *British Journal of Nutrition* 113: S40–54.
- Boyer, JL. 2013. "Bile formation and secretion." *Comprehensive Physiology*. 3 (3): 1035–78.
- Broberger, C. 2005. "Brain regulation of food intake and appetite : molecules and networks." *Journal of Internal Medicine* 258 (4): 301–27.
- Bruen, CM; Kett, AP; O'Halloran, F; Chaudrin, V; Fenelon, MA; Cashman, KA; Giblin, L. 2012a. "Effect of gelatinisation of starch with casein proteins on incretin hormones and glucose transporters in vitro." *British Journal of Nutrition* 107 (2): 155–63.
- Burcelin, R; Thorens, B. 2013. "Incretins: what is known, new and controversial in 2013?" *Diabetes*

- and Metabolism* 39 (2): 89–93.
- Buszewski, B; Noga, S. 2012. “Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (1): 231–47.
- Camarós, E; Münzel, SC, Cueto, M; Rivals, F; Conard, NJ. 2015. “The evolution of paleolithic hominin-carnivore interaction written in teeth: stories from the Swabian Jura (Germany).” *Journal of Archaeological Science: Reports* 6: 798–809.
- Cannon, WB; Washburn, AL. 1912. “An explanation of hunger.’.” *American Journal of Physiology* 29 (5): 441–54.
- Capriotti, AL; Caruso, G; Cavaliere, C; Samperi, R; Ventura, S; Chiozzi, RZ; Laganà, A. 2015. “Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins.” *Journal of Food Composition and Analysis* 44: 205–13.
- Carlson, AJ. 1916. “The control of hunger in health and disease.” Edited by Chicago, III., The University of Chicago press. <https://archive.org/details/controlhungerin01carlgoog/page/n23>.
- Caron, J. 2016. “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.” Thèse
- Caron, J; Cudennec, B; Domenger, D; Belguesmia, Y, Flahaut, C; Kouach, M; Lesage, J; Goossens, JF; Dhulster, P; Ravallec, R. 2016. “Simulated GI digestion of dietary protein : release of new bioactive peptides involved in gut hormone secretion.” *Food Research International* 89 (Pt1): 382-90.
- Caron, J; Domenger, D; Belguesmia, Y; Kouach, M; Lesage, J; Goossens, JF; Dhulster, P; Ravallec, R; Cudennec, B. 2015. “Protein digestion and energy homeostasis: how generated peptides may impact intestinal hormones?” *Food Research International* 88 (PB): 310-8.
- Caron, J; Domenger, D; Dhulster, P; Ravallec, R; Cudennec, B. 2017a. “Protein Digestion-Derived Peptides and the Peripheral Regulation of Food Intake.” *Frontiers in Endocrinology* 8: 85.
- Caron, J; Domenger, D; Dhulster, P; Ravallec, R; Cudennec, B. 2017b. “Using Caco-2 cells as novel identification tool for food-derived DPP-IV inhibitors.” *Food Research International* 92: 113–8.
- Carpenter, GH. 2013. “The secretion, components, and properties of saliva.” *Annual Review of Food Science and Technology* 4 (1): 267–76.
- Case, L. 2008. “ASAS CENTENNIAL PAPER: Perspectives on domestication: the history of our relationship with man’s best friend.” *Journal of Animal Science* 86: 3245-51.
- Cave, NJ. 2006. “Hydrolyzed protein diets for dogs and cats.” *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 36 (6): 1251–68.
- Chandler, M; Cunningham, S; Lund, EM; Khanna, C; Naramore, R; Patel, A; Day, MJ. 2017. “Obesity and associated comorbidities in people and companion animals: a one health perspective.” *Journal of Comparative Pathology* 156 (4): 296–309.
- Chapelot, D; Charlot, K. 2018. “Physiology of energy homeostasis: models, actors, challenges and the glucoadipostatic loop.” *Metabolism: Clinical and Experimental* 92: 11–25.
- Chapoutot, P; Rouillé, B; Sauvart, D; Renaud, B. 2018. “Les coproduits de l’industrie agro-alimentaire : des ressources alimentaires de qualité à ne pas négliger.” *INRA Productions Animales* 31 (3): 201–20.
- Chaudhari, DD; Singh, R; Mallappa, RH; Rokana, N; Kaushik, JK; Bajaj, R; Batish, VK; Grover, S. 2017. “Evaluation of casein & whey protein hydrolysates as well as milk fermentates from *Lactobacillus helveticus* for expression of gut hormones.” *Indian Journal Medical Research* 146 (3): 409–19.
- Chen, L; Tuo, B; Dong, H. 2016. “Regulation of intestinal glucose absorption by ion channels and transporters.” *Nutrients* 8 (1): 1–11.
- Chen, Q; Reimer, RA. 2009. “Dairy protein and leucine alter GLP-1 release and mRNA of genes involved in intestinal lipid metabolism in vitro.” *Nutrition* 25 (3): 340–9.
- Chen, W; Hira, T; Nakajima, S; Tomozawa, H; Tsubata, M; Yamaguchi, K; Hara, H. 2015. “Suppressive effect on food intake of a potato extract (Potein®) involving cholecystokinin release in rats.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 76 (6): 1104–9.
- Cheng, LK; O’Grady, G; Du, P; Egbuji, JU; Windsor, JA; Pullan, AJ. 2010. “Gastrointestinal system.” *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 2 (1): 65–79.
- Choi, S; Lee, M; Shiu, AL; Yo, SJ; Aponte, GW. 2007a. “Identification of a protein hydrolysate

- responsive G protein-coupled receptor in enterocytes.” *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 292 (1): G98–112.
- Choi, S; Lee, M; Shiu, AL; Yo, SJ; Halldén, G; Aponte GW. 2007b. “GPR93 activation by protein hydrolysate induces CCK transcription and secretion in STC-1 cells.” *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 292 (5): G1366–75.
- Choonara, BF; Choonara, YE; Kumar, P; Bijukumar, D; du Toit, LC; Pillay, V. 2014. “A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules.” *Biotechnology Advances* 32 (7): 1269–82.
- Chung, KM; Cheng, JH; Suen, CS; Huang, CH; Tsai, CH; Huang, LH; Chen, YR; Wang, AH; Jiaang, WT; Hwang, MJ; Chen, X. 2010. “The dimeric transmembrane domain of prolyl dipeptidase DPP-IV contributes to its quaternary structure and enzymatic activities.” *Protein Science* 19 (9): 1627–38.
- Conigrave, AD; Hampson, DR. 2010. “Broad-spectrum amino acid-sensing class C G-protein coupled receptors: molecular mechanisms, physiological significance and options for drug development.” *Pharmacology and Therapeutics* 127 (3): 252–60.
- Cordier-bussat, M; Bernard, C; Haouche, S; Roche, C; Abello, J; Chayvualle, JA; Cuber, JC. 1997. “Peptones stimulate cholecystokinin secretion and gene transcription in the intestinal cell line STC-1.” *Endocrinology* 138 (3): 1137–44.
- Costa, IS; Medeiros, AF; Carvalho, FMC; Lima, VCO; Serquiz, RP; Serquiz, AC; Silbiger, VN; Bortolin, RH; Maciel, BLL; Santos, EA; Morais, AHA. 2018. “Satiogenic protein from tamarind seeds decreases food intake, leptin plasma and CCK-1r gene expression in obese Wistar rats.” *Obesity Facts* 11 (6): 440–53.
- Cudennec, B; Balti, R; Ravallec, R; Caron, C; 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 Research International* 78: 238–45.
- Cudennec, Fouchereau-Peron, Ferry, Duclos, Ravallec. 2012. “In vitro and in vivo evidence for a satiating effect of fish protein hydrolysate obtained from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle.” *Journal of Functional Foods* 4 (1): 271–7.
- 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 Chemistry* 111 (4): 970–5.
- Cudennec, B; Violle, N; Chataigné, G; Drevet, P; Bisson, JF; Dhulster, P; Ravallec, R. 2016. “Evidence for an antihypertensive effect of a land snail (*Helix aspersa*) by-product hydrolysate - identification of involved peptides.” *Journal of Functional Foods* 22: 602–11.
- Cui, H; López, M; Rahmouni, K. 2017. “The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity.” *Nature Reviews. Endocrinology* 13 (6): 338–51.
- Cummings, DE; Overduin, J. 2007. “Gastrointestinal regulation of food intake.” *The Journal of Clinical Investigation* 117 (1): 13–23.
- Daly, K; Al-Rammahi, M; Moran, A; Marcello, M; Ninomiya, Y; Shirazi-Beechey, SP. 2013. “Sensing of amino acids by the gut-expressed taste receptor T1R1-T1R3 stimulates CCK secretion.” *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 304 (3): G271–82.
- Daniel, H; Zietek, T. 2015. “Taste and move : glucose and peptide transporters in the gastrointestinal tract.” *Experimental Physiology* 100 (12): 1441–50.
- Darcel, NP; Liou, AP; Tomé, D; Raybould, HE. 2005. “Activation of vagal afferents in the rat duodenum by protein digests requires PepT1.” *The Journal of Nutrition* 135 (6): 1491–5.
- de Jonge, L; Bray, GA; Smith, SR; Ryan, DH; de Souza, RJ; Loria, CM; Champagne, CM; Williamson, DA; Sacks, FM. 2012. “Effect of diet composition and weight loss on resting energy expenditure in the POUNDS LOST study.” *Obesity* 20 (12): 2384–9.
- de Lartigue, G; Dimaline, R; Varro, A; Raybould, H; De la Serre, CB; Dockray, GJ. 2010. “Cocaine- and amphetamine-regulated transcript mediates the actions.” *Gastroenterology* 138 (4): 1479–90.
- de Souza Rocha, T; Hernandez, LMP; Chang, YK; de Mejía, EG. 2014. “Impact of germination and enzymatic hydrolysis of cowpea bean (*Vigna unguiculata*) on the generation of peptides capable of inhibiting dipeptidyl peptidase IV.” *Food Research International* 64: 799–809.

- de Vos, WC. 1993. "Migrating spike complex in the small intestine of the fasting cat." *American Journal of Physiology* 265 (4): G619–27.
- Dedhia, PH; Bertaux-skeirik, N; Zavros, Y; Spence, JR. 2016. "Organoid models of human gastrointestinal development and disease." *Gastroenterology* 150 (5): 1098-112.
- Deng, P; Swanson, KS. 2015a. "Future aspects and perceptions of companion animal nutrition and sustainability." *Journal of Animal Science* 93 (3): 823–34.
- Deng, P; Swanson, KS. 2015b. "Gut microbiota of humans , dogs and cats : current knowledge and future opportunities and challenges." *British Journal of Nutrition* 113: 6–17.
- Deracinois, B; Flahaut, C; Duban-Deweere, S; Karamanos, Y. 2013. "Comparative and quantitative global proteomics approaches: an overview." *Proteomes* 1 (3): 180–218.
- Di Cerbo, A; Palmieri, B; Chiavolelli, F; Guidetti, G; Canello, S. 2014. "Functional foods in pets and humans." *The International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 12 (3): 192–9.
- Diakogiannaki, E; Pais, R; Tolhurst, G; Parker, HE; Horscroft, J; Rauscher, B; Zietek, T; Daniel, H; Gribble, FM; Reimann, F. 2013. "Oligopeptides stimulate glucagon-like peptide-1 secretion in mice through proton-coupled uptake and the calcium-sensing receptor." *Diabetologia* 56 (12): 2688–96.
- Diepvens, K; Häberer, D; Westerterp-Plantenga, M. 2008. "Different proteins and biopeptides differently affect satiety and anorexigenic/orexigenic hormones in healthy humans." *International Journal of Obesity* 32 (3): 510–8.
- Domenger, D; Caron, J; Belguesmia, Y; Lesage, J; Dhulster, P; Ravallec, R; Cudennec, B. 2017. "Bioactivities of hemorphins released from bovine haemoglobin gastrointestinal digestion: dual effects on intestinal hormones and DPP-IV regulations." *Journal of Functional Foods* 36: 9–17.
- Domenger, D; Cudennec, B; Kouach, M; Touche, V; Landry, C; Lesage, J; Gosselet, F; Lestavel, S; Goossens, JF; Dhulster, P; Ravallec, R. 2018. "Food-derived hemorphins cross intestinal and blood – brain barriers in vitro." *Frontiers in Endocrinology* 9: 159.
- Dosch, AR; Imagawa, DK; Jutric, Z. 2019. "Bile metabolism and lithogenesis: an update." *Surgical Clinics of North America* 99 (2). Elsevier Inc: 215–29.
- Douglas, A; Östman, E. 2016. "Protein-enriched liquid preloads varying in macronutrient content modulate appetite and appetite-regulating hormones in healthy adults." *The Journal of Nutrition* 146 (3): 637–45.
- Driscoll, CA; Macdonald, DW; O'Brien, SJ. 2009. "From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (Suppl 1): 9971–8.
- EFPIA. 2016. "Rendering in numbers." <http://efpra.eu/wp-content/uploads/2016/11/Rendering-in-numbers-Infographic.pdf>.
- Elekofehinti, OO; Ariyo, EO; Akinjiyan, MO; Olayeriju, OS; Lawal, AO; Adanlawo, IG; Rocha JBT. 2018. "Potential use of bitter melon (*Momordica charantia*) derived compounds as antidiabetics: in silico and in vivo studies." *Pathophysiology* 25 (4) 327–33.
- Elliott, RM; Morgan, LM; Tredger, JA; 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." *Journal of Endocrinology* 138 (1): 159–66.
- Euromonitor International. 2017. <https://www.euromonitor.com/>.
- Farias, G; Netto, BDM; Bettini, SC; Dâmaso, AR; de Freitas, ACT. 2017. "Neuroendocrine regulation of energy balance: implications on the development and surgical treatment of obesity." *Nutrition and Health* 23 (3): 131–46.
- Fasano, A. 2012. "Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases alessio." *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1258 (1): 25–33.
- Faure, E; Kitchener, AC. 2009. "An archaeological and historical review of the relationship between felids and people." 22 (3): 221–38.
- FEDIAF. 2019. "FEDIAF Nutritional guidelines for complementary pet food for cats and dogs." [http://www.fediaf.org/images/FEDIAF\\_Nutritional\\_Guidelines\\_2019\\_Update\\_030519.pdf](http://www.fediaf.org/images/FEDIAF_Nutritional_Guidelines_2019_Update_030519.pdf).
- Ferraris, RP; Choe, JY; Patel, CR. 2018. "Intestinal absorption of fructose." *Annual Review of Nutrition*, 38: 41–67.
- Foot, D; Mus, B. 2006. "The Human Animal Bond." *Sustainable Futures for Veterinary Practice*.

- Furness, JB; Rivera, LR; Cho, HJ; Bravo, DM; Callaghan, B. 2013. "The gut as a sensory organ." *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 10 (12): 729–40.
- Gaigé, S; Abou, E; Aysique, A; Bouvier, M. 2004. "Effects of interactions between interleukin-1 $\beta$  and leptin on cat intestinal vagal mechanoreceptors." *Journal of Physiology* 555 (1): 297–310.
- Gallego, M; Aristoy, MC; Toldrá, F. 2014. "Dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides generated in spanish dry-cured ham." *Meat Science* 96 (2 Pt A): 757–61.
- Gault, VA; O'Harte, FP; Flatt, PR. 2003. "Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP): anti-diabetic and anti-obesity potential?" *Neuropeptides* 37 (5): 253–63.
- Gelberg, HB. 2014. "Comparative anatomy, physiology, and mechanisms of disease production of the esophagus, stomach, and small intestine." *Toxicologic Pathology* 42 (1): 54–66.
- Geraedts, MC; Troost, FJ; Saris, WH. 2012. "Addition of sucralose enhances the release of satiety hormones in combination with pea protein." *Molecular Nutrition and Food Research* 56 (3): 417–24.
- Geraedts, MC; Troost, FJ; Fischer, MA; Edens, L; Saris, WH. 2011. "Direct induction of CCK and GLP-1 release from murine endocrine cells by intact dietary proteins." *Molecular Nutrition & Food Research* 55 (3): 476–84.
- German, AJ; Holden, SL; Wiseman-Orr, ML; Reid, J; Nolan, AM; Biourge, V; Morris, PJ; Scott, EM. 2011. "Quality of life is reduced in obese dogs but improves after successful weight loss." *Veterinary Journal* 192 (3): 428–34.
- German, AJ. 2006. "The growing problem of obesity in dogs and cats." *The Journal of Nutrition* 136 (7): 1940–46.
- Germonpré, M; Sablin, MV; Stevens, RE; Hedges, REM; Hofreiter, M; Stiller, M; Després, VR. 2009. "Fossil dogs and wolves from palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes." *Journal of Archaeological Science* 36 (2): 473–90.
- Gevrey, JC; Malapel, M; Philippe, J; Mithieux, G; Chayvialle, JA; 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 (5): 926–36.
- Gibbs, J; Young, RC; Smith, GP. 1973. "Cholecystokinin decreases food intake in rats." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 84 (3): 488–95.
- Gillespie, AL; Green, BD. 2016. "The bioactive effects of casein proteins on enteroendocrine cell health, proliferation and incretin hormone secretion." *Food Chemistry* 211: 148–59.
- Gilor, C; Gilor, S; Graves, TK; Borst, LB; Labelle, P; Ridge, TK; Santoro, D; Dossin, O. 2013. "Distribution of K and L cells in the feline intestinal tract." *Domestic Animal Endocrinology* 45 (1): 49–54.
- Giromini, C; Cheli, F; Rebucci, R; Baldi, A. 2019. "Invited review: dairy proteins and bioactive peptides: modeling digestion and the intestinal barrier." *Journal of Dairy Science* 102 (2): 929–42.
- Goyal, RK; Guo, Y; Mashimo, H. 2019. "Advances in the physiology of gastric emptying." *Neurogastroenterology & Motility* 31 (4): e13546.
- Grandjean, D; Butterwick, R. 2009. "Waltham pocket book of essential nutrition in cats and dogs." [https://www.waltham.com/dyn/\\_assets/\\_docs/waltham-booklets/essential-nutrition-for-cats-and-dogs/walthampocketbookofessentialnutritionforcatsanddogs.pdf](https://www.waltham.com/dyn/_assets/_docs/waltham-booklets/essential-nutrition-for-cats-and-dogs/walthampocketbookofessentialnutritionforcatsanddogs.pdf).
- Gribble, FM; Diakogiannaki, E; Reimann, F. 2016. "Gut hormone regulation and secretion via FFA1 and FFA4." *Handbook of Experimental Pharmacology* 236: 181–203.
- Gross, CG. 1998. "Claude Bernard and the constancy of the internal environment." *The Neuroscientist* 4: 380–5.
- 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 in Biotechnology* 30 (11): 591–600.
- Gul, K; Singh, AK; Jabeen, R. 2016. "Nutraceuticals and functional foods: the foods for the future world." *Food Science and Nutrition* 56 (16): 2617–27.
- Guo, L; Harnedy, PA; Zhang, L; Li, B; Zhang, Z; Hou, H; Zhao, X; Fitzgerald, RJ. 2015. "In vitro assessment of the multifunctional bioactive potential of Alaska pollock skin collagen following simulated gastrointestinal digestion." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95 (7): 1514–20.

- Hall, WL; Millward, DJ; Long, SJ; Morgan, LM. 2003. "Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite." *British Journal of Nutrition* 89 (2): 239–48.
- Han, P; Bagenna, B; Fu, M. 2019. "The sweet taste signalling pathways in the oral cavity and the gastrointestinal tract affect human appetite and food intake: a review." *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 70 (2): 125–35.
- Harnedy, PA; O’Keeffe, MB; Fitzgerald, RJ. 2015. "Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga *Palmaria palmata*." *Food Chemistry* 172: 400–6.
- Harnedy, PA; Parthasarathy, V; Mclaughlin, CM; O’Keeffe, MB; Allsopp, PJ; Mcsorley, EM; O’Harte, FPM; Fitzgerald, RJ. 2018a. "Atlantic salmon (*Salmo salar*) co-product-derived protein hydrolysates : a source of antidiabetic peptides." *Food Research International* 106: 598–606. doi:10.1016/j.foodres.2018.01.025.
- Harnedy, PA; Parthasarathy, V; Mclaughlin, CM; O’Keeffe, MB; Allsopp, PJ; Mcsorley, EM; O’Harte, FPM; Fitzgerald, RJ. 2018b. "Blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle protein hydrolysate with in vitro and in vivo antidiabetic properties." *Journal of Functional Foods* 40: 137–45.
- 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." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403 (7): 1939–49.
- Hartmann, R; Meisel, H. 2007. "Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications." *Current Opinion in Biotechnology* 18 (2): 163–9.
- 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 Chemistry* 134 (2): 797–802.
- Hatton, GB; Yadav, V; Basit, AW; Merchant, HA. 2015. "Animal farm: considerations in animal gastrointestinal physiology and relevance to drug delivery in humans." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104 (9): 2747–76.
- Hayes, MR; Covasa, M. 2005. "CCK and 5-HT act synergistically to suppress food intake through simultaneous activation of CCK-1 and 5-HT<sub>3</sub> receptors." *Peptides* 26 (11): 2322–30.
- Hendriks, WH. 2013. "The omnivorous dog dogma and carnivorous cat connection." *European Society of Veterinary and Comparative Nutrition*, 46–48.
- Herrmann, C; Göke, R; Richter, G; Fehmann, HC; Arnold, R; Göke, B. 1994. "Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptides plasma levels in response to nutrients." *Digestion* 56 (2): 117–26.
- Hervera, M. 2011. "Methods for Predicting the Energy Value of Commercial Dog Foods." thèse
- Hill, SR. 2010. "Changing the metabolism of dogs (*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus*) at rest and during exercise by manipulation of dietary macronutrients." Thèse.
- 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." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 297 (4): G663–71.
- Hirakawa, H; Zempo, H; Ogawa, M; Watanabe, R; Suzuki, J; Akasawa, H; Komuro, I; Isobe M. 2015. "A DPP-4 inhibitor suppresses fibrosis and inflammation on experimental autoimmune myocarditis in mice." *PLoS One* 10 (3): e0119360.
- Hooton, D; Lentle, R; Monro, J; Wickham, M; Simpson, R. 2015. "The secretion and action of brush border enzymes in the mammalian small intestine." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 168: 59-118.
- Hsieh, CH; Wang, TY; Hung, CC; Chen, MC; Hsu, KC. 2013. "Improvement of glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats by Atlantic salmon skin gelatin hydrolysate as the dipeptidyl-peptidase IV inhibitor." *Food and Function* 6 (6): 1887–92.
- Hsu, KC; Tung, YS; Huang, SL; Jao, CL. 2012. "Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of peptides in porcine skin gelatin hydrolysates." *Bioactive Food Peptides in Health and Disease* Chapitre 8.
- Huang, SL; Hung, CC; Jao, CL; Tung, YS; Hsu, KC. 2014. "Porcine skin gelatin hydrolysate as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic

- rats.” *Journal of Functional Foods* 11: 235–42.
- Huang, SL; Jao, CL; Ho, KP; Hsu, KC. 2012. “Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates.” *Peptides* 35 (1): 114–21.
- Hussain, MM. 2015. “Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation.” *Current Opinion in Lipidology* 25 (3): 200–6.
- Hutchison, AT; Feinle-Bisset, C; Fitzgerald, PC; Standfield, S; Horowitz, M; Luscombe-Marsh, ND. 2015. “Comparative effects of intraduodenal whey protein hydrolysate on antropyloroduodenal motility, gut hormones, glycemia, appetite, and energy intake in lean and obese men.” *American Journal of Clinical Nutrition* 102 (6): 1323–31.
- Ibáñez, C; Simó, C; García-Cañas, V; Cifuentes, A; Castro-Puyana, M. 2013. “Metabolomics, peptidomics and proteomics applications of capillary electrophoresis-mass spectrometry in Foodomics: a review.” *Analytica Chimica Acta* 802: 1–13.
- Irwin, N; Flatt, PR. 2013. “Enteroendocrine hormone mimetics for the treatment of obesity and diabetes.” *Current Opinion in Pharmacology* 13 (6): 989–95.
- 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 and Function* 6 (8): 2525–34.
- Ivy, AC; Oldberg, E. 1928. “A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation.” *American Journal of Physiology* 86 (3): 599–613.
- Iwai, K; Fukuoka, S; Fushiki, T; Kodaira, T; Ikei, N. 1986. “Elevation of plasma CCK concentration after intestinal administration of a pancreatic enzyme secretion-stimulating peptide purified from rat bile-pancreatic juice: analysis with N-terminal region specific radioimmunoassay.” *Biochemical and Biophysical Research Communication* 136 (2): 701-6.
- Jakubowicz, D; Froy, O. 2013. “Biochemical and metabolic mechanisms by which dietary whey protein may combat obesity and type 2 diabetes.” *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (1): 1–5.
- Janowitz, HD; Grossman, MI. 1949. “Some factors affecting the food intake of normal dogs and dogs with esophagostomy and gastric fistula.” *American Journal of Physiology* 159 (1): 143–8.
- Janssen, P; Vanden Berghe, P; Verschueren, S; Lehmann, A; Depoortere, I; Tack, J. 2011. “Review article : the role of gastric motility in the control of food intake.” *Alimentary Pharmacology and Therapeutic* 33 (8): 880-94.
- Janssen, S; Depoortere, I. 2013. “Nutrient sensing in the gut: new roads to therapeutics?” *Trends in Endocrinology & Metabolism* 24 (2): 92–100.
- Jao, CL; Hung, CC; Tung, YS; Lin, PY; Chen, MC; Hsu, KC. 2015. “The development of bioactive peptides from dietary proteins as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the management of type 2 diabetes.” *Biomedicine (Taipei)* 5 (3): 14.
- Jayathilakan, K; Sultana, K; Radhakrishma, K; Bawa, AS. 2012. “Utilization of byproducts and waste materials from meat , poultry and fish processing industries : a review.” *Journal of Food Science and Technology* 49 (3): 278–93.
- João, AL; Reis, F; Fernandes, R. 2016. “The incretin system ABCs in obesity and diabetes - novel therapeutic strategies for weight loss and beyond.” *Obesity Reviews* 17 (7): 553–72.
- Kalantzi, L; Goumas, K; Kalioras, V; Abrahamsson, B; Dressman, JB; Reppas, C. 2006. “Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies.” *Pharmaceutical Research* 23 (1): 165-76.
- Kato, M; Nakanishi, T; Tani, T; Tsuda, T. 2016. “Low molecular fraction of wheat protein hydrolysate stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in an enteroendocrine L cell line and improves glucose tolerance in rats.” *Nutrition Research* 37: 37-45.
- Kealy, RD; Lawler, DF; Ballam, JM; Mantz, SL; Biery, DN; Greeley, EH, Lust, G; Segre, M; Smith, GK; Stowe, HD. 2002. “Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs.” *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220 (9): 1315–20.
- Kiela, PR; Ghishan, FK. 2016. “Physiology of intestinal absorption and secretion.” *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 30 (2): 145–59.
- Kim, J; Park, J; Hong, S; Kim, MK. 2009. “Effect of corn gluten and its hydrolysate consumptions on weight reduction in rats fed a high-fat diet.” *Nutrition Research and Practice* 3 (3): 200-7.
- Kim, J; An, JU; Kim, W; Lee, S; Cho, S. 2017. “Differences in the gut microbiota of dogs (Canis

- lupus familiaris) fed a natural diet or a commercial feed revealed by the Illumina MiSeq platform.” *Gut Pathogens* 21: 9–68.
- Komatsu, Y; Wada, Y; Izumi, H; Shimizu, T; Takeda, Y; Hira, T; Hara, H. 2019. “Casein materials show different digestion patterns using an in vitro gastrointestinal model and different release of glucagon-like peptide-1 by enteroendocrine GLUTag cells.” *Food Chemistry* 277: 423–31.
- Könner, AC; Klöckener, T; Brüning, JC. 2009. “Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond.” *Physiology and Behavior* 97 (5): 632–8.
- Kopf-Bolanaz, KA; Schwander, F; Gijs, M; Vergères, G; Portmann, R; Egger, L. 2012. “Validation of an in vitro digestive system for studying macronutrient decomposition in humans.” *Journal of Nutrition* 142 (2): 245–50.
- Kuhre, RE; Wewer Albrechtsen, NJ; Deacon, CF; Balk-Møller, E; Rehfeld, JF. Reimann, F. Gribble, FM. Holst, JJ. 2016. “Peptide production and secretion in GLUTag, NCI-H716 and STC-1 cells: a comparison to native L-cells.” *Journal of Molecular Endocrinology* 56 (3): 201–11.
- Kumral, D; Zfass, AM. 2018. “Gut movements: a review of the physiology of gastrointestinal transit.” *Digestive Diseases and Sciences* 63 (10): 2500–6.
- Lacroix, IME; Li-Chan, ECY. 2014. “Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins.” *Peptides* 54: 39–48.
- Lacroix, IME; Li-Chan, ECY. 2013. “Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and  $\alpha$ -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (31): 7500–6.
- Lacroix, IME; Li-Chan, ECY. 2012. “Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach.” *Journal of Functional Foods* 4 (2) 403–22.
- Laflamme, DP. 2011. “Companion Animals Symposium: Obesity in dogs and cats: what is wrong with being fat?.” *Journal of Animal Science* 90 (5): 1653–62.
- Latorre, R; Sternini, C; de Giorgio, R; Greenwood-Van Meerveld, B. 2016. “Enteroendocrine cells: a review of their role in brain–gut communication.” *Neurogastroenterology and Motility* 28 (5): 620–30.
- Le Floch, P; Bourseau, P; Daurès, F; Guérard, F; Le Grel, L; Meunier, M; Tuncel, M. 2011. “Valorisation des coproduits de la mer et territoire: enjeux territoriaux.” *Revue d'Economie Régionale & Urbaine* 2011/1: 213–25.
- Le Hégarat, 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 (6): 631–6.
- Le Maux, S; Nongonierma, AB; Fitzgerald, RJ. 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 Chemistry* 173: 847–54.
- Le Maux, S; Nongonierma, AB; Murray, B; Kelly, PM; FitzGerald, RJ. 2015b. “Identification of short peptide sequences in the nanofiltration permeate of a bioactive whey protein hydrolysate.” *Food Research International* 77 (Part 3): 534–9.
- Le Nevé, B; Daniel, H. 2011. “Selected tetrapeptides lead to a GLP-1 release from the human enteroendocrine cell line NCI-H716.” *Regulatory Peptides* 167 (1): 14–20.
- Lee, H; Lee, HJ; Kim, JY; Kwon, O. 2015. “Corn gluten hydrolysate affects the time-course of metabolic changes through appetite control in high-fat diet-induced obese rats.” *Molecules and Cells* 38 (12): 1044–53.
- Lee, MG; Ohana, E; Park, HW; Yang, D; Muallem, S. 2012. “Mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO<sub>3</sub> secretion.” *Physiology Review* 92 (1): 39–74.
- Leech, CA; Habener, JF. 2003. “Regulation of glucagon-like peptide-1 receptor and calcium-sensing receptor signaling by L-histidine.” *Endocrinology* 144 (11): 4851–8.
- Lim, GE; Brubaker, PL. 2006. “Glucagon-like peptide 1 secretion by the L-cell: The view from within.” *Diabetes* 55 (SUPPL 2): 70–77.
- Lima, RCL; Berg, RS; Rønning, SB; Afseth, NK; Knutsen, SH; Staerk, D; Wubshet, SG. 2019. “Peptides from chicken processing by-product inhibit DPP-IV and promote cellular glucose uptake: potential ingredients for T2D management.” *Food & Function* 10 (3): 1619–28.
- Liou, AP; Chavez, DI; Espero, E; Hao, S; Wank, SA; Raybould, HE. 2011. “Protein hydrolysate-

- induced cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells is indirectly mediated by the intestinal oligopeptide transporter PepT1." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 300 (5): 885–902.
- Livak, KJ; Schmittgen, TD. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method." *Methods* 25 (4): 402–8.
- Lund, EM; Armstrong, PJ; Kirk, CA; Klausner, JS. 2006. "Prevalence and risk factors for obesity in adult dogs from private US veterinary practice." *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 4 (2): 177–86.
- Mace, OJ; Schindler, M; Patel, S. 2012. "The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and CasR in rat small intestine." *Journal of Physiology* 590 (12): 2917–36.
- MacHugh, DE; Larson, G; Orlando, L. 2016. "Taming the past: ancient DNA and the study of animal domestication." *Annual Review of Animal Biosciences* 5: 329–51.
- Maldonado-Valderrama, J; Wilde, P; Macierzanka, A; Mackie, A. 2011. "The role of bile salts in digestion." *Advances in Colloid and Interface Science* 165 (1): 36–46.
- Maljaars, PW; Peters, HP; Mela, DJ; Masclee, AA. 2008. "Ileal brake: a sensible food target for appetite control. A review." *Physiology & Behavior* 95 (3): 271–81.
- Mamone, G; Picariello, G; Caira, S; Addeo, F; Ferranti, P. 2009. "Analysis of food proteins and peptides by mass spectrometry-based techniques." *Journal of Chromatography A* 1216 (43): 7130–42.
- McCrea, K; Wisialowski, T; Cabrele, C; Church, B; Beck-Sickinger, A; Kraegen, E; Herzog, H. 2000. "2–36[K4, RYYSA(19-23)]PP a novel Y5-receptor preferring ligand with strong stimulatory effect on food intake." *Regulatory Peptides* 87 (1-3): 47–58.
- McMillan, CJ; Zapata, RC; Chelikani, PK; Snead, EC; Cosford, K. 2016. "Domestic animal endocrinology circulating concentrations of glucagon-like peptide 1, glucose-dependent insulinotropic peptide, peptide YY, and insulin in client-owned lean, overweight, and diabetic cats." *Domestic Animal Endocrinology* 54: 85–94.
- Meek, CL; Lewis, HB; Vergese, B; Park, A; Reimann, F; Gribble, F. 2016. "The effect of encapsulated glutamine on gut peptide secretion in human volunteers." *Peptides* 77: 38–46.
- Mentlein, R. 1999. "Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides." *Regulatory Peptides* 85 (1): 9–24.
- Millington, GWM. 2007. "The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in feeding behaviour." *Nutrition & Metabolism* 4 (18): 1–16.
- Minekus, M; Alminger, M; Alvito, P; Ballance, S; Bohn, T; Bourlieu, C; Corredig, M; Dupont, D; Dufour, C; Egger, L; Golding, M; Karakaya, S; Kirkhus, B; Le Feunteun, S; Lesmes, U; Macierzanka, A; Mackie, A; Marze, S; McClements, DJ; Ménard, O; Recio, I; Santos, CN; Singh, RP; Vegarud, GE; Wickham, MS; Weitschies, W; Brodkorb, A. 2014. "A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus." *Food & Function* 5 (6): 1113–24.
- Mizushige, T; Komiya, M; Onda, M; Uchida, K; Haymizu, K; Kabuyama, Y. 2017. "Fish protein hydrolysate exhibits anti-obesity activity and reduces hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related Peptide mRNA expressions in rats." *Biomedical Research* 38 (6): 351–7.
- Mochida, T; Hira, T; Hara, H. 2010. "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 (7): 3095–104.
- Möller, NP; Scholz-Ahrens, KE; Roos, N; Schrezenmeir, J. 2008. "Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects." *European Journal of Nutrition* 47 (4): 171–82.
- Monteiro, MP; Batterham, RL. 2017. "The importance of the gastrointestinal tract in controlling food intake and regulating energy balance." *Gastroenterology* 152 (7): 1707–17.
- Moreno-Fernández, S; Garcés-Rimón, M; Vera, G; Astier, J; Landrier, JF; Miguel, M. 2018. "High fat/high glucose diet induces metabolic syndrome in an experimental rat model." *Nutrients* 10 (10): 1–15.
- Morifuji, M; Ishizaka, I; 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." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (15): 8788–97.

- Morton, DB; Griffiths, PHM. 1985. "Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment," *The veterinary Record* 116 (16): 431-6.
- Mudgil, P; Kamal, H; Yuen, GC; Maqsood, S. 2018. "Characterization and identification of novel antidiabetic and anti-obesity peptides from camel milk protein hydrolysates." *Food Chemistry* 259: 46–54.
- Muñoz-Prieto, A; Nielsen, LR; Dąbrowski, R; Bjørnvad, CR; Söder, J; Lamy, E; Monkeviciene, I; Ljubić, BB; Vasiu, I; Savi, S; Busato, F; Yilmaz, Z; Bravo-Cantero, AF; Öhlund, M; Lucena, S; Zelvyte, R; Aladrović, J; Lopez-Jornet, P; Caldin, M; Lavrador, C; Karveliėne, B; Mrljak, V; Mazeikiene, J; Tvarijonavičute, A. 2018. "European dog owner perceptions of obesity and factors associated with human and canine obesity." *Scientific Reports* 8 (1):13353.
- Muth, T; Renard, BY. 2018. "Evaluating de novo sequencing in proteomics: already an accurate alternative to database-driven peptide identification?" *Briefings in Bioinformatics* 19 (5): 954–70.
- National Research Council. 2006. "Nutrient requirements of dogs and cats." Edited by *National Academies Press*.
- Nauck, MA; Meier, JJ. 2018. "Incretin hormones: their role in health and disease." *Diabetes, Obesity and Metabolism* 20 (suppl 1): 5–21.
- Nelson, RW; Reusch, CE. 2014. "Classification and etiology of diabetes in dogs and cats." *Journal of Endocrinology* 222 (3): T1–9.
- Némoz-Gaillard, E; Bernard, C; Abello, J; Cordier-Bussat, M; Chayvialle, JA; Cuber, JC. 1998. "Regulation of cholecystokinin secretion by peptones and peptidomimetic antibiotics in STC-1 cells." *Endocrinology* 139 (3): 932–8.
- Ngamchuea, K; Chaisiwamongkhol, K; Batchelor-McAuley, C; Compton, RG. 2018. "Correction: chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers-a tutorial review." *Analyst* 143 (3): 777–83.
- Martins, M. 2018. "Domestication animale: des animaux sur mesure?" <https://www.franceculture.fr/emissions/la-methode-scientifique/la-methode-scientifique-du-lundi-16-avril-2018>.
- Nishi, T; Hara, H; Hira, T; Fusao, F. 2001. "Dietary protein peptic hydrolysates stimulate cholecystokinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal cells." *Experimental Biology and Medicine* 226 (11): 1031–6.
- Nishi, T; Hara, H; Tomita, F. 2003. "Soybean  $\beta$ -conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats." *The Journal of Nutrition* 133 (2): 352–7.
- 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 & Nutrition* 60: 1–9.
- Nongonierma, AB; Fitzgerald, RJ. 2014. "An in silico model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides." *Food Chemistry* 165: 489–98.
- Nongonierma, AB; Fitzgerald, RJ. 2013. "Dipeptidyl peptidase IV inhibitory properties of a whey protein hydrolysate: influence of fractionation, stability to simulated gastrointestinal digestion and food-drug interaction." *International Dairy Journal* 32 (1): 33–9.
- Nongonierma, AB; Fitzgerald, RJ. 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 Digestion* 6 (1–3): 19–29.
- Nongonierma, AB; Le Maux, S; Hamayon, J; FitzGerald, RJ. 2016. "Strategies for the release of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides in an enzymatic hydrolyzate of  $\alpha$ -lactalbumin." *Food and Function* 7 (8): 3437–43.
- Nongonierma, AB; Cadamuro, C; Le Gouic, A; Mudgil, P; Fitzgerald, RJ. 2018. "Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory properties of a camel whey protein enriched hydrolysate preparation." *Food Chemistry* 279: 70–9.
- Nongonierma, AB; Fitzgerald, RJ. 2016. "Peptides structure activity relationship modelling of milk protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity." *Peptides* 79:

- 1–7.
- O'Connor, A; O'Moráin, C. 2014. "Digestive function of the stomach." *Digestive Diseases* 32 (3): 186–91.
- O'Halloran, F; Bruen, C; Mcgrath, B; Schellekens, H; Murray, B; Cryan, JF; Kelly, AL; Mcsweeney, PLH; Giblin, L. 2018. "A casein hydrolysate increases GLP-1 secretion and reduces food intake." *Food Chemistry* 252: 303–10.
- O'Keeffe, MB; Fitzgerald, RJ. 2015. "Identification of short peptide sequences in complex milk protein hydrolysates." *Food Chemistry* 184: 140–6.
- Ødegaard, S; Nesje, LB; Lærum, OD; Kimmey, MB. 2012. "High-frequency ultrasonographic imaging of the gastrointestinal wall." *Expert Review of Medical Devices* 9 (3): 263–73.
- Öhlund, M; Egenvall, A; Fall, T; Hansson-Hamlin, H; Röcklinsberg, H; Holst, BS. 2017. "Environmental risk factors for diabetes mellitus in cats." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 31 (1): 29–35.
- Öhlund, M; Palmgren, M; Holst, BS. 2018. "Overweight in adult cats: a cross-sectional study." *Acta Veterinaria Scandinavica* 60 (1): 5.
- OMS. 2016. "Rapport mondial sur le diabète."
- OMS.. 2018. "Obésité et surpoids principaux faits."
- Overduin, J; Gibbs, J; Cummings, DE; Reeve, JR Jr. 2014. "CCK-58 elicits both satiety and satiation in rats while CCK-8 elicits only satiation." *Peptides* 54: 71–80.
- Oya, M; Kitaguchi, T; Pais, R; Reimann, F; Gribble, F; Tsuboi, T. 2012. "The G protein-coupled receptor family C group 6 subtype A (GPRC6A) receptor is involved in amino acid-induced glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells." *Journal of Biological Chemistry* 288 (7): 4513–21.
- Pais, R; Gribble, FM; Reimann, F. 2016. "Signalling pathways involved in the detection of peptones by murine small intestinal enteroendocrine L-cells." *Peptides* 77: 9–15.
- Patel, CA; Acharya, SR. 2018. "Energy homeostasis and obesity : the therapeutic role of anorexigenic and orexigenic peptide." *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 25 (3): 919-32.
- Pathak, V; Flatt, PR; Irwin, N. 2018. "Peptides cholecystokinin (CCK) and related adjunct peptide therapies for the treatment of obesity and type 2 diabetes." *Peptides* 100: 229–35.
- Patil, P; Mandal, S; Tomar, SK; Anand, S. 2015. "Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes." *European Journal of Nutrition* 54 (6): 863-80.
- Pauletti, GM; Gangwar, S; Knipp, GT; Nerurkar, MM; Okumu, FW; Tamura, K; Siahaan, TJ; Borchardt, RT. 1996. "Structural requirements for intestinal absorption of peptide drugs." *Journal of Controlled Release* 41 (1-2): 3–17.
- Pedersen, AM; Bardow, A; Jensen, SB; Nauntofte, B. 2002. "Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion." *Oral Diseases* 8 (3): 117–29.
- Pepe, G, Sommella, E; Ventre, G; Scala, MC; Adesso, S; Ostacolo, C; Marzocco, S; Novellino, E; Campiglia, P. 2016. "Antioxidant peptides released from gastrointestinal digestion of 'Stracchino' soft cheese: characterization, in vitro intestinal protection and bioavailability." *Journal of Functional Foods* 26: 494–505.
- Perri, A; Widga, C, Lawer, D; Martin, T; Loebel, T; Farnsworth, K; Kohn, L; Buenger, B. 2018. "New evidence of the earliest domestic dogs in the americas," *American Antiquity* 84 (1): 68-87.
- Perry, B; Wang, Y. 2012. "Appetite regulation and weight control: the role of gut hormones." *Nutrition and Diabetes* 2: e26.
- Peterson, LW; Artis, D. 2014. "Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis." *Nature Reviews Immunology* 14 (3): 141–53.
- Picariello, G; Mamone, G; Nitride, C; Addeo, F; Ferranti, P. 2013. "Protein digestomics: integrated platforms to study food-protein digestion and derived functional and active peptides." *Trends in Analytical Chemistry* 52: 120–34.
- Plummer, MP; Hermanides, J; Deane, AM. 2019. "Incretin physiology and pharmacology in the intensive care unit." *Critical Care Clinics* 35 (2): 341-55.
- Power-Grant, O; Bruen, C; Brennan, L; Giblin, L; Jakeman, P; FiteGerald, RJ. 2015. "In vitro bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed whey protein: targeting the enteroinsular axis." *Food & Function* 6 (3): 972–80.

- Rafferty, EP; Wylie, AR; Elliott, CT; Chevallier, OP; Grieve, DJ; Green, BD. 2011. "In vitro and in vivo effects of natural putative secretagogues of glucagon-like peptide-1 (GLP-1)." *Scientia Pharmaceutica* 79 (3): 615–21.
- Ramakrishna, BS. 2013. "Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism." *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 28 (suppl 4): 9–17.
- Regazzo, D; Mollé, D; Gabai, G; Tomé, D; Dupont, D; Leonil, J; Boutrou, R. 2010. "The (193–209) 17-residues peptide of bovine  $\beta$ -casein is transported through Caco-2 monolayer." *Molecular Nutrition and Food Research* 54 (10): 1428–35.
- Rehfeld, JF. 2017. "Cholecystokinin-from local gut hormone to ubiquitous messenger." *Frontiers in Endocrinology* 8: 47.
- Reidelberger, RD; Castellanos, DA Hulce, M. 2003. "Effects of peripheral CCK receptor blockade on food intake in rats." *American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 285 (2): 429–37.
- Reimann, F; Williams, L; da Silva Xavier, G; Rutter, GA; Gribble, FM. 2004. "Glutamine potently stimulates glucagon-like peptide-1 secretion from GLUTag cells." *Diabetologia* 47 (9): 1592–601.
- Reimer, RA. 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." *Journal of Endocrinology* 191 (1): 159–70.
- Réséda. 2017. "Gisements et Valorisations Des Coproduits Des Industries Agroalimentaires."
- Ripken, D; van der Wielen, N; Wortelboer, HM; Meijerink, J; Witkamp, RF; Hendriks, HF. 2014. "Steviol glycoside rebaudioside A induces glucagon-like peptide-1 and peptide YY release in a porcine ex vivo intestinal model." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (33): 8365–70.
- Ritter, RC. 2004. "Gastrointestinal mechanisms of satiation for food." *Physiology & Behavior* 81 (2): 249–73.
- Roh, E; Kim, MS. 2016. "Brain regulation of energy metabolism." *Endocrinology and Metabolism* 31 (4): 519–24.
- Rønnestad, I; Akiba, Y; Kaji, I; Kaunitz, JD. 2014. "Duodenal luminal nutrient sensing." *Current Opinion in Pharmacology* 19: 67–75.
- Roujeau, C; Jockers, R; Dam, J. 2014. "New pharmacological perspectives for the leptin receptor in the treatment of obesity." *Frontiers in Endocrinology* 5: 167.
- Royal Canin. n.d. "The programme to promote successful ... with a growing."
- Ryan, JT; Ross, RP; Bolton, D; Fitzgerald, GF; Stanton, C. 2011. "Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish." *Nutrients* 3 (9): 765–91.
- Ryder, K; Bekhit, AD; McConnell, M; Carne, A. 2016. "Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: generation of peptides using commercial microbial proteases." *Food Chemistry* 208: 42–50.
- Salaun, F; Blanchard, G; Le Paih, L; Roberti, F; Niceron, C. 2017. "Impact of macronutrient composition and palatability in wet diets on food selection in cats." *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101 (2): 320–8.
- Sam, AH; Troke, RC; Tan, TM; Bewick, GA. 2012. "The role of the gut/brain axis in modulating food intake." *Neuropharmacology* 63 (1): 46–56.
- Sambuy, Y; De Angelis, I; Ranaldi, G; Scarino, ML; Stamatii, A; Zucco, F. 2005. "The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics." *Cell Biology and Toxicology* 21 (1): 1–26.
- Sánchez-Navarro, M; Garcia, J; Giralt, E; Teixidó, M. 2016. "Using peptides to increase transport across the intestinal barrier." *Advanced Drug Delivery Reviews* 106 (Pt B): 355–66.
- Santos-Hernández, M; Miralles, B; Amigo, L; Recio, I. 2018. "Intestinal signaling of proteins and digestion-derived products relevant to satiety." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (39): 10123–31.
- Santos-Hernández, M; Tomé, D; Gaudichon, C; Recio, I. 2018. "Stimulation of CCK and GLP-1 secretion and expression in STC-1 cells by human jejunal contents and in vitro gastrointestinal digests from caséin and whey proteins." *Food & Function* 9 (9): 4702–13.

- Scarpellini, E; Campanale, M; Leone, D; Purchiaroni, F; Vitale, G; Lauritano, EC; Gasbarrini, A. 2010. "Gut microbiota and obesity." *Internal and Emergency Medicine* 5 (Suppl 1): 53–6.
- 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 Chemistry* 105 (4): 1606–13.
- Scott, KP; Gratz, SW; Sheridan, PO; Flint, HJ; Duncan, SH. 2013. "The influence of diet on the gut microbiota." *Pharmacological Research* 69 (1): 52–60.
- Scott, KB; Turko, IV; Phinney, KW. 2015. "Quantitative performance of internal standard platforms for absolute protein quantification using multiple reaction monitoring-mass spectrometry." *Analytical Chemistry* 87 (8): 4429–35.
- Sekar, R; Singh, K; Arokiaraj, AW; Chow, BK. 2016. Pharmacological actions of glucagon-like peptide-1, gastric inhibitory polypeptide, and glucagon." *International Review of Cell and Molecular Biology* 326: 279-341.
- Sherwood, L. 2006. "Physiologie humaine." Edited by *De Boek and Larcier* 2e édition.
- Silveira, ST; 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  $\beta$ -lactoglobulin." *Food Chemistry* 141 (2): 1072–7.
- Smeets-Peeters, M; Watson, T; Minekus, M; Havenaar, R. 1998. "A review of the physiology of the canine digestive tract related to the development of in vitro systems." *Nutrition Research Reviews* 11 (1): 45-69.
- Stagsted, J; Zhou, J; Jessen, R; Palmfrldt, J; Hansen, ET. 2018. "Dietary peptides." *Patent 20180368459* issued 2018.
- Staljanssens, D; Azari, EK; 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* 32 (3): 607–19.
- Steinert, RE; Feinle-Bisset, C; Asarian, L; Horowitz, M; Beglinger, C; Geary, N. 2016. "Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3–36): secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB." *Physiological Reviews* 97 (1): 411–63.
- Sternini, C; Anselmi, L; Rozengurt, E. 2008. "Enteroendocrine cells: A site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing." *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity* 15 (1): 73–8.
- Stevens, JR; Newton, RW; Tlusty, M; Little, DC. 2018. "The rise of aquaculture by-products: increasing food production, value, and sustainability through strategic utilisation." *Marine Policy* 90: 115–24.
- Sufian, MK; Hira, T; Miyashita, K; Nishi, T; Asano, K; Hara, H. 2006. "Pork peptone stimulates cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells and suppresses appetite in rats." *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 70 (8): 1869–74.
- Sun, EWL; Martin, AM; Young, RL; Keating, DJ. 2019. "The regulation of peripheral metabolism by gut-derived hormones." *Frontiers in Endocrinology* 9: 1–11.
- Suzuki, K; Jayasena, CN; Bloom, SR. 2011. "The gut hormones in appetite regulation." *Journal of Obesity* 2011: 528401.
- Suzuki, T. 2013. "Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions." *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (4): 631–59.
- Tian, M; Heng, J; Song, H; Zhang, Y; Chen, F; Guan, W; Zhang, S. 2019. "Branched chain amino acids stimulate gut satiety hormone cholecystokinin secretion through the activation of the umami taste receptor T1R1/T1R3 using an in vitro porcine jejunum model." *Food & Function* 10 (6): 3356-67.
- Tobie, C; Péron, F; Larose, C. 2015. "Assessing food preferences in dogs and cats: a review of the current methods." *Animals* 5 (1): 126–37.
- Tognarelli, D; Tsukamoto, A; Caldwell, J; Caldwell, W. 2010. "Rapid peptide separation by supercritical fluid chromatography." *Bioanalysis* 2 (1): 5–7.
- Toldrá, F; Mora, L; Reig, M. 2016. "New insights into meat by-product utilization." *Meat Science* 120: 54-9.
- Toldrá, F, Reig, M; Aristoy, MC; Mora, L. 2018. "Generation of bioactive peptides during food processing." *Food Chemistry* 267: 395–404.

- Tolhurst, G; Zheng, Y; Parker, HE; Habib, AM; Reimann, F; Gribble, FM. 2011. "Glutamine triggers and potentiates glucagon-like peptide-1 secretion by raising cytosolic Ca<sup>2+</sup> and CAMP." *Endocrinology* 152 (2): 405–13.
- Tulipano, G; Faggi, L; Cacciamali, A; Caroli, AM. 2017. "Whey protein-derived peptide sensing by enteroendocrine cells compared with osteoblast-like cells: role of peptide length and peptide composition, focussing on products of  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysis." *International Dairy Journal* 72: 55–62.
- Tulipano, G; Sibilia, V; Caroli, AM; Cocchi, D. 2011. "Whey proteins as source of dipeptidyl dipeptidase IV (dipeptidyl peptidase-4) inhibitors." *Peptides* 32 (4): 835–8.
- Uchida, M; Ohshiba, Y; Mogami, O. 2011. "Novel dipeptidyl peptidase-4-inhibiting peptide derived from  $\beta$ -lactoglobulin." *Journal of Pharmacological Sciences* 117 (1): 63–6.
- United Nations. 2017. "World population prospects: the 2017 revision, key findings and advance tables" *Report from Un Department of Economic and Social Affairs*.
- Ojha, U. 2018. "Protein-induced satiation and the calcium-sensing receptor." *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 11: 45–51.
- Van der Klaauw, AA; Keogh, JM; Henning, E; Trowse, VM; Dhillon, WS; Ghatgei, MA; Farooqi, IS. 2013. "High protein intake stimulates postprandial GLP1 and PYY release." *Obesity* 21 (8): 1602–7.
- Venema, K; Havenaar, R; Minekus, M. 2009. Improving in vitro simulation of the stomach and intestines." *Designing Functional Foods* 314-339.
- Verbrugghe, A; Bakovic, M. 2013. "Peculiarities of one-carbon metabolism in the strict carnivorous cat and the role in feline hepatic lipidosis." *Nutrients* 5 (7): 2811–35.
- Verbrugghe, A; Hesta, M. 2017. "Cats and carbohydrates: the carnivore fantasy?" *Veterinary Sciences* 4 (4): 55.
- Verhoeckx, K; Cotter, P; López-Expósito, I; Kleiveland, C; Lea, T; Mackie, A; Requena, T; Swiatecka, D; Wichers, H. 2016. The impact of food bioactives on health.
- Versantvoort, CH; Oomen, AG; Van De Kamp, E; Rompelberg, CJ; Sips, AJ. 2005. "Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food." *Food and Chemical Toxicology* 43 (1): 31–40.
- Viswanathan, VK; Hodges, K; Hecht, G. 2009. "Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea." *Nature Reviews Microbiology* 7 (2): 110–9.
- Wang, B; Li, B. 2016. "Effect of molecular weight on the transepithelial transport and peptidase degradation of casein-derived peptides by using Caco-2 cell model." *Food Chemistry* 218: 1–8.
- Wang, B; Xie, N; Li, B. 2018. "Influence of peptide characteristics on their stability, intestinal transport, and in vitro bioavailability: a review." *Journal of Food Biochemistry* 43 (1): e12571.
- Wang, C; Kang, C; Xian, Y; Zhang, M; Chen, X; Pei, M; Zhu, W; Hang, S. 2018. "Sensing of L-arginine by gut-expressed calcium sensing receptor stimulates gut satiety hormones cholecystokinin and glucose-dependent insulinotropic peptide secretion in pig model." *Journal of Food Science* 83 (9): 2394–401.
- Wang, CY; Liu, S; Xie, XN; Tan, ZR. 2017. "Regulation profile of the intestinal peptide." *Drug Design, Development and Therapy* 11: 3511–7.
- Wang, TY, Hsieh, CH; Hung, CC; Jao, CL; Chen, MC; Hsu, KC. 2015. "Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: a comparison between warm- and cold-water fish." *Journal of Functional Foods* 19 (Part A): 330–40.
- Wang, Y; Chandra, R; Samsa, LA; Gooch, B; Fee, BE; Cook, JL; Vigna, SR; Grant, AO; Liddle, RA. 2011. "Amino acids stimulate cholecystokinin release through the Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor." *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 300 (4): G528–37.
- Wang, Y; Prpic, V; Green, GM; Reeve, JR Jr; Liddle, RA. 2002. "Luminal CCK-releasing factor stimulates CCK release from human intestinal endocrine and STC-1 cells." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 282 (1): 16–22.
- Wang, Y; Landheer, S; van Gilst, WH; van Amerongen, A; Hammes, HP; Henning, RH; Deelman, LE; 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 (10): e46781.

- Washabau, RJ; Day, MJ. 2012. "Canine and feline gastroenterology." *Edited by Elsevier Health Sciences*.  
[https://books.google.fr/books?id=8iwym8Q5XQ8C&pg=PA541&lpg=PA541&dq=saliva+composition+in+cats+mouth&source=bl&ots=mA76-4XOQe&sig=SP06yEnFwLIX3DSxOmIvoMMDjOM&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwiV6pKqiuzcAhURSsAKHdLABb84FBD0ATAAegQIABAB#v=onepage&q=saliva composition i.](https://books.google.fr/books?id=8iwym8Q5XQ8C&pg=PA541&lpg=PA541&dq=saliva+composition+in+cats+mouth&source=bl&ots=mA76-4XOQe&sig=SP06yEnFwLIX3DSxOmIvoMMDjOM&hl=fr&sa=X&ved=2ahUKEwiV6pKqiuzcAhURSsAKHdLABb84FBD0ATAAegQIABAB#v=onepage&q=saliva%20composition%20in%20cats%20mouth)
- Wasserstein, AG. 1996. "Death and the internal milieu: Claude Bernard and the origins of experimental medicine." *Perspectives in Biology and Medicine* 39 (3): 313–26.
- Whitcomb, DC; Lowe, ME. 2007. "Human pancreatic digestive enzymes." *Digestive Diseases and Sciences* 52 (1): 1–17.
- Woo, M; Song, YO; Kang, KH; Noh, JS. 2018. "Anti-obesity effects of collagen peptide derived from skate (*Raja kenoi*) skin through regulation of lipid metabolism." *Marine Drugs* 16 (9): 1–12.
- Xie, C; Xang, X; Young, RL; Horowitz, M; Rayner, CK; Wu, T. 2018. "Role of intestinal bitter sensing in enteroendocrine hormone secretion and metabolic control." *Frontiers in Endocrinology* 9: 576.
- Yadav, M; Verma, MK; Chauhan, NS. 2017. "A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition." *Archives of Microbiology* 200 (2): 203–17.
- Yamanashi, Y; Takada, T; Kurauchi, R; Tanaka, Y; Komine, T; Suzuki, H. 2017. "Transporters for the intestinal absorption of cholesterol, vitamin E, and vitamin K." *Journal Atherosclerosis Thrombosis* 24 (4): 347–59.
- Yoshida, H; Tsunoda, Y; Owyang, C. 1999. "Diazepam-binding inhibitor 33–50 elicits  $Ca^{2+}$  oscillation and CCK secretion in STC-1 cells via L-type  $Ca^{2+}$  channels." *Physiology* 276 (3): 694–702.
- Young, MS. 1985. "The evolution of domestic pets and companion animals." *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 15 (2): 297–309.
- Zanchi, D; Depoorter, A; Egloff, L; Haller, S; Mählmann, L; Lang, UE; Drewe, J; Beglinger, C; Schmidt, A; Borgwardt, S. 2017. "The impact of gut hormones on the neural circuit of appetite and satiety: a systematic review." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 80: 457–75.
- Zicker, SC. 2008. "Evaluating pet foods: how confident are you when you recommend a commercial pet food?" *Topics in Companion Animal Medicine* 23 (3): 121–26.