Bioactivités de cryptides marins : quels potentiels pour la santé humaine ?

Yesmine Ben Henda

▶ **To cite this version:**

Yesmine Ben Henda. Bioactivités de cryptides marins : quels potentiels pour la santé humaine ?. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2014. Français. NNT : 2014LAROS032 . tel-01451348

HAL Id: tel-01451348
https://theses.hal.science/tel-01451348

Submitted on 1 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE

Sciences pour l'Environnement Gay-Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS-ULR
Equipe Approches Moléculaires, Environnement-Santé (AMES)

THESE

présentée par:

Yesmine BEN HENDA

Soutenance prévue le 1 Décembre 2014
Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de la Rochelle
Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Bioactivités de cryptides marins : Quels potentiels pour la santé humaine ?

JURY:

Mme. Alric Monique	Professeur, Université d'Auvergne, Examinateur
Mme. Bordenave-Juchereau Stéphanie	Maître de conférences, Université de la Rochelle, Directrice de thèse
Mr. Dhulster Pascal	Professeur, Université de Lille 1, Rapporteur
Mr. Piot Jean-Marie	Professeur, Université de la Rochelle, Examinateur
Mr. Maugard Thierry	Professeur, Université de la Rochelle, Examinateur
Mr. Peltier Sébastien	Directeur scientifique, Valbiotis, Rapporteur

CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Publications et brevet

Yesmine Ben Henda, Anis Labidi, Ingrid Arnaudin, Nicolas Bridiau Regis Delatouche, Thierry Maugard, Jean Marie Piot, Frédéric Sannier; Valérie Thiery, Stéphanie Bordenave-Juchereau. Measuring Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Activity by Micro Plate Assays: Comparison Using Marine Cryptides and Tentative Threshold Determinations with Captopril and Losartan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61, 10685−10690.

Yesmine Ben Henda, Mariem Laamiri, Isabelle Lanneluc, Marie Agnès Travers, Hélène Agogue, Ingrid Arnaudin, Thierry Maugard, Jean-Marie Piot, Frédéric Sannier, Nicolas Bridiau, Stéphanie Bordenave-Juchereau. Marine cryptides and regulation of the adipocyte life cycle. En cours de soumission pour le journal *Peptides.*

Yesmine Ben Henda et Stéphanie Bordenave-Juchereau. Using Marine Cryptides against Metabolic Syndrome. Blanca Hernandez-Ledesma et Miguel Herrero, Eds, *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*, 2013, Chapitre 4, 95-112.

Jean-Marie Piot, Stéphanie Bordenave-Juchereau, Thierry Maugard, **Yesmine Ben Henda**, Jean-Marie Piot. Compositions pour la prévention et/ou le traitement de pathologies liées à l'alpha-glucosidase. *Brevet d'invention français 14/51280.* Déposé le 18 février 2014.

Communications orales

Yesmine Ben Henda, Stéphanie Bordenave-Juchereau. Cryptides marins et syndrome métabolique. Colloque AdebiotechSFGP : Peptides issus des procédés d'hydrolyse Filières Industrielles, le 2 et 3 octobre 2012 à Biocitech –Romainville.

Yesmine Ben Henda. Cryptides marins et syndrome métabolique (communication orale et poster), colloque des doctorants, le 30 mai 2013 à La Rochelle.

Yesmine Ben Henda, Thierry Maugard, Stéphanie Bordenave-Juchereau. Syndrome métabolique et nutraceutiques: un défi à relever, Health Ingredients Congress 2013, le 26-27 Septembre à Poitiers.

Communication par affiche

Yesmine Ben Henda, Stéphanie Bordenave-Juchereau. Cryptides marins et syndrome métabolique (communication orale et poster). Colloque AdebiotechSFGP : Peptides issus des procédés d'hydrolyse Filières Industrielles, le 2 et 3 octobre 2012 à Biocitech –Romainville.

Yesmine Ben Henda, Thierry Maugard, Stéphanie Bordenave-Juchereau. Marine Cryptides As Slimming Agents (Poster), COSM'ING 2013 : 6ème colloque international (Ingrédients cosmétiques et biotechnologies), le 26-28 juin à Saint Malo.

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au sein du laboratoire Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs). Je tiens donc à remercier Monsieur Pierre Richard, ancien directeur du LIENSs et Monsieur Olivier de Viron, directeur actuel, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Je remercie particulièrement ma directrice de thèse, Madame Stéphanie Bordenave-Juchereau, maître de conférences à l'Université de la Rochelle.

Pour m'avoir encadré au cours de ces travaux
Pour ses précieux conseils, sa confiance, ses encouragements et sa disponibilité,
Pour sa patience et son aide dans la rédaction d'articles et du manuscrit,
Pour son attitude positive et son soutien en toutes circonstances, et pour m'avoir permis de connaître les plaisirs de l'enseignement.

Veuillez trouver dans cet ouvrage l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens à remercier, Monsieur Thierry Maugard, Professeur à l'Université de la Rochelle pour ses précieux conseils, son intérêt pour le projet, pour ses encouragements et d'avoir permis la concrétisation du brevet. C'est un honneur que vous me faite en acceptant de juger ma thèse.

Je remercie également les rapporteurs et membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail :

Madame Monique Alric, Professeur à l'Université de l'Auvergne,

Monsieur Jean Marie Piot, Professeur à l'Université de la Rochelle,

Monsieur Pascal Dhulster, Professeur à l'Université de Lille 1,

Monsieur Sébastien Peltier, Directeur scientifique de la société Valbiotis,

Je remercie également nos collaborateurs :

-Le laboratoire Adaptations Métaboliques à l'Exercice en conditions Physiologiques et Pathologiques (AME2P) pour l'aspect in vivo.

-Le laboratoire ProBioGEM, Lille 1 et particulièrement Rozenn Ravallec pour l'aspect satiété (encore en cours).

-Le Dr.Ortencia Da Silva Nunes, de l'Université d'Etat de l'ouest du Parana, Campus de Toledo, au Brésil.

Merci aussi à Madame Ingrid Fruitier et Monsieur Laurent Picot de m'avoir offert la possibilité d'assurer certains de leurs travaux pratiques et dirigés.

Je tiens à remercier particulièrement :

-Isabelle Lanneluc, Hélène Agogue, Vanessa Becquet et Laureen Beaugeard de la plateforme de biologie moléculaire et cytométrie en flux, pour la partie «biologie moléculaire» et pour leur gentillesse et leur intérêt.

-Marie Agnès Travers, chercheur au laboratoire de Génétique et Pathologie des mollusques marins à Ifremer, La Tremblade, pour ses conseils et sa gentillesse.

-Antoine Bonnet, ingénieur au sein de la plateforme d'analyse haute résolution de Biomolécules, Université de La Rochelle, pour son aide et son dévouement dans les analyses UPLC.

Je souhaite également remercier Hérvé Rouillard et Nicolas Bridiau ainsi que tous les enseignants, les doctorants, stagiaires, techniciens et personnels présent dans le laboratoire pour leur sympathie : Nicolas, Viviane, Isabelle, Valérie, Laetitia, Sophie, Fréderic, Claire, Alexendre …

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à mes amis Meriem Laamari, Oussema Achour et Rachida Mersni-Achour pour leur aide précieuse et leur soutien permanent.

Enfin, je dédie ce travail

A mes parents pour leur amour inconditionnel, leur soutien, leur confiance.

A ma petite sœur, toujours à mon écoute et pour sa beauté aussi.

A mon fiancé, pour son écoute et sa patience. Mon amour, merci d'avoir toujours cru en moi.

A ma grand-mère Halima (amoureuse de la science), tata Raoudha, tata Leila, tata Fehima, tonton Sleh, Héla, Tijeni et mes amies Azza, Douja, Nadia, Nawel, Asma, Marine, Yosra, Sonia, Taha, Skan, Jleil…

Table des matières

Table des matières 7
Index des figures 13
Index des tableaux 16
Liste des abréviations 18
Introduction générale 23
Chapitre I: Etude bibliographique 27
1. Cryptides marins et modes de génération 28
1.1. Définition 28
1.2. Génération des cryptides marins 28
1.2.1. Génération des cryptides par hydrolyse chimique 28
1.2.2. Génération des cryptides par fermentation 29
1.2.3. Génération de cryptides par hydrolyse enzymatique 29
1.3. Purification et identification des peptides bioactifs 31
2. Le syndrome métabolique : pathologies anciennes dans un monde moderne 32
2.1. Définition 32
2.2. Epidémiologie 35
2.3. Obésité et tissu adipeux 36
2.3.1. Le tissu adipeux 36
2.3.2. Origine du tissu adipeux blanc 36
2.3.3. Développement du tissu adipeux et adipogenèse 37
2.3.4. Le contrôle de la différenciation adipocytaire 39
2.3.4.1. La régulation transcriptionelle 40
2.3.4.2. Régulation hormonale et intracellulaire de l'adipogenèse 42
2.3.5. Les fonctions du tissu adipeux 44

2.3.5.1. Mécanismes et voies de régulation des fonctions métaboliques 44
2.3.5.2. Les fonctions sécrétoires du tissu adipeux blanc 48
2.4. Physiopathologie générale du Syndrome Métabolique 49
2.5. Quelle prise en charge pour les patients souffrant du syndrome métabolique ? 51
3. Cryptides marins et syndrome métabolique 54
3.1. Cryptides marins et dyslipidémie 54
3.2. Cryptides marins et diabète 56
3.2.1. Cryptides marins et stress oxydatif 57
3.2.2. Cryptides marins et modulation du métabolisme glucidique 57
3.2.2.1. Cryptides marins et modulation de la sensibilité à l'insuline 58
3.2.2.2. Cryptides marins et glycémie post-prandiale 60
3.3. Cryptides marins et obésité 62
3.3.1. Cryptides marins et régulation de la satiété 64
3.3.2. Cryptides marins et régulation de la sécrétion des acides biliaires 66
3.3.3. Cryptides marins et cycle de vie des adipocytes 67
3.4. Cryptides marins et hypertension 68
3.5. Autres actions des cryptides marins associées aux anomalies du syndrome métabolique 74
3.5.1. Cryptides marins et action anti-plaquettaire et anti-coagulante 74
3.5.2. Cryptides marins et action sur la fixation du calcium 75
4. Biodisponibilité des cryptides marins 75
5. Position du sujet 79
Chapitre II : Matériels & méthodes 81
1. Matériels 82
1.1. Matériels biologiques 82
1.1.1. Enzymes 82
1.1.2. Lignée cellulaire 83

1.1.3. Milieux de culture et suppléments 83
1.1.4. Espèce utilisée pour la réalisation de l'hydrolysat protéique : Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) 84
1.2. Réactifs chimiques 85
1.2.1. Peptides synthétiques 85
1.2.2. Inhibiteurs de références et substrats 87
2. Evaluation de l'inhibition des activités enzymatiques 88
2.1. Inhibition des enzymes impliquées dans la régulation de l'hypertension artérielle 88
2.1.1. Mesure de l'inhibition de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en utilisant 3 types de substrats 88
2.1.1.1. Mesure de l'inhibition de l'activité de l'ECA en utilisant le FAPGG comme substrat 88
2.1.1.2. Mesure de l'inhibition de l'activité de l'ECA en utilisant le HHL comme substrat 89
2.2.1.3. Mesure de l'inhibition de l'activité d'ECA en utilisant l'angiotensine I comme substrat 91
2.1.2. Mesure de l'inhibition de l'activité de la cathepsine G 92
2.1.3. Mesure de l'inhibition de l'activité de la chymase 92
2.2. Inhibition des enzymes impliquées dans la régulation de la glycémie 93
2.2.1. Inhibition de l'activité de l'α-glucosidase 93
2.2.2. Inhibition de l'activité de l'α-amylase pancréatique 94
2.2.3. Inhibition de l'activité de la Dipeptidyl peptidase-IV 95
2.3. Analyse des résultats 95
3. Expérimentations *in vitro* sur la lignée d'adipocytes blancs humains 95
3.1. Culture des cellules pré-adipocytaires et conservation 96
3.1.1. Propagation des cellules et conservation 96
3.1.1.1. Pré-culture 96

3.1.1.2. Trypsination 96
3.1.1.3. Dénombrement cellulaire 96
3.1.1.4. Remise en culture et maturation des lignées adipocytaires 96
3.2. Evaluation de l'influence des cryptides *in vitro* sur le développement des adipocytes humains sous-cutanés 98
3.2.1. Etude de l'effet cytotoxique et antiprolifératif des peptides 98
3.2.2. Etude de l'effet des cryptides sur le contenu lipidique final des adipocytes humains 99
3.2.3. Etude de l'effet des cryptides sur l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase 100
3.2.4. Etude de l'effet des cryptides sur l'expression des marqueurs de différenciation adipocytaire par PCR quantitative 102
3.2.5. Analyses statistiques 104
4. Méthodes analytiques de purification et de caractérisation des cryptides 104
4.1. Vérification de la pureté des peptides synthétiques 104
4.2. Purification et séparation de l'hydrolysat protéique de Tilapia du Nil 105
4.2.1. Fractionnement de l'hydrolysat par ultrafiltration 105
4.2.2. Séparation et purification de la fraction E par RP-HPLC 106
4.2.3. Identification et caractérisation des peptides par UPLC-MS 106
Chapitre III : Résultats & discussions 111
Partie 1 : Cryptides marins et hypertension 112
1. Introduction 113
2. Etude comparative du potentiel inhibiteur exercé par les cryptides marins sur l'activité de l'ECA 115
2.1. Détermination de l'activité inhibitrice de l'ECA exercée par le captopril et le losartan en utilisant le FAPGG, le HHL et l'angiotensine I comme substrat 115
2.2. Détermination de l'activité inhibitrice de l'ECA exercé par les cryptides marins en utilisant le FAPGG, le HHL et l'angiotensine I comme substrat 118
2.3. Analyse SWOT des 3 méthodes HHL, angiotensine I et FAPGG 121

3. Etude du potentiel inhibiteur des cryptides marins sur l'activité de la cathepsine G et de la chymase 124

3.1. Détermination de l'activité inhibitrice de la cathepsine G exercé par les cryptides marins 124

3.2. Détermination de l'activité inhibitrice des cryptides marins sur la chymase ... 126

4. Conclusion 129

Partie 2 : Cryptides marins et obésité 131

1. Introduction 132

2. Influence des cryptides inhibiteurs de l'ECA *in vitro* sur les adipocytes blancs humains 134

2.1. Effet de cryptides marins sur la viabilité des pré-adipocytes blancs humains pendant la prolifération et la différenciation. 134

2.2. L'effet de cryptides marins sur la teneur résiduelle en lipides des adipocytes matures 138

2.3. L'effet de cryptides marins sur l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) 141

2.4. Effet des cryptides marins sur l'expression des marqueurs de différenciation adipocytaire 142

3. Conclusion 146

Partie 3 : Cryptides marins et hyperglycémie 148

1. Introduction 149

2. Actions inhibitrices des peptides marins sur l'activité des enzymes digestives des glucides 151

2.1. Action inhibitrice des cryptides marins sur l'activité de l'α-glucosidase 151

2.2. Action inhibitrice des cryptides marins sur l'activité de l'α-amylase 155

3. Etude du potentiel inhibiteur des cryptides marins sur l'activité de la dipeptidyl peptidase IV 158

4. Conclusion 161

Partie 4 : Identification des cryptides dans un hydrolysat protéique de poisson 162

1. Introduction 163

2. Fractionnement de l'hydrolysat par ultrafiltration et activité inhibitrice de l'ECA .. 164

3. Séparation et purification de l'hydrolysat enrichi en peptides ≤ 1 kDa (fraction E) par RP-HPLC 166

4. Identification et caractérisation des peptides de la fraction (PM ≤1 kDa issue de l'hydrolysat protéique de Tilapia du Nil par UPLC-ESI-Q-TOF..... 167

4.1. Identification de di et tripeptides spécifiques dans l'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia..... 168

4.2. Identification des cryptides de faibles PM dans l'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia..... 171

5. Conclusion..... 174

Conclusions & perspectives 176

Annexes..... 182

Références bibliographiques 186

Index des figures

Figure 1: Représentation schématique des différentes étapes de l'hydrolyse enzymatique réalisée à partir de produits marins pour l'obtention d'un hydrolysat protéique. 31
Figure 2: Diagramme présentant sommairement les étapes de purification et d'identification des peptides bioactifs dérivés de ressources marines. 32
Figure 3: Détermination et différenciation adipocytaire. 38
Figure 4: Interactions entre les principaux facteurs de transcriptions de la différentiation adipocytaire. 39
Figure 5: Mécanisme d'action des PPAR dans le noyau des cellules adipocytaires. 41
Figure 6 : Balance entre les facteurs de transcriptions pro- et anti-adipogéniques. 42
Figure 7: Lipogenèse et synthèse des triglycérides dans l'adipocyte. 45
Figure 8: Les étapes de la lipolyse. 47
Figure 9: Adipokines produites par le tissu adipeux et leurs principaux rôles dans le contrôle des grandes fonctions métaboliques 48
Figure 10 : Présentation schématique des facteurs de risques menant au développement du syndrome métabolique 49
Figure 11: Composantes du syndrome métabolique, traitements médicamenteux pratiqués et mécanismes d'action 53
Figure 12 : Absorption intestinale des di- et tripeptides au niveau du transporteur PEPT1. .. 77
Figure 13: Observation microscopique de pré-adipocytes blancs humains sous-cutanés 83
Figure 14: Images de Tilapia du Nil, *Oreochromis niloticus*. 84
Figure 15 : Dégradation du FAPGG par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. 89
Figure 16 : Dégradation de l'Hippuryl-Histidyl-Leucine (HHL) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. 90
Figure 17 : Dégradation de l'angiotensine I en angiotensine II par l'ECA. 91
Figure 18 : Dégradation du p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside (PNPG) par l'α-glucosidase. 93
Figure 19 : Croissance et différents stades de différenciation des adipocytes humains blancs sous-cutanés. 97
Figure 20 : Observation microscopique d'adipocytes blancs humains sous-cutanés (HWP) colorés à l'huile rouge. 100

Figure 21 : Principe de mesure de l'activité de la GPDH. 101
Figure 22 : Illustration de la méthode de fractionnement de l'hydrolysat protéique de Tilapia par ultrafiltrations successives. 105
Figure 23: Représentation schématique du système UPLC-ESI-Q-TOF utilisé. 107
Figure 24: Photographie du système Acquity UPLC H-Class couplé au spectromètre de masse Xevo G2 S Q-TOF..... 108
Figure 25: Enzymes impliquées dans la génération de l'angiotensine II. 113
Figure 26 : Analyse par chromatographie liquide haute performance des produits d'hydrolyse du HHL (A) et de l'angiotensine I (B) par l'ECA. 116
Figure 27: Structure chimique du losartan, antagoniste des récepteur AT1 (A) et du captopril, inhibiteur de l'ECA (B). 117
Figure 28: Analyse de corrélation du Log CI 50 utilisant l'angiotensine-I, le FAPGG, ou le HHL comme substrat. 120
Figure 29: Forces, faiblesses, opportunités et menaces des tests *in vitro* de mesure de l'inhibition de l'ECA en utilisant FAPGG, HHL et l'angiotensine I en tant que substrats. ... 122
Figure 30 : Structure chimique de la chymostatine..... 125
Figure 31: Effet des cryptides sur la viabilité cellulaire des pré-adipocytes humains blancs au cours de la prolifération, après 24 h (A) et 72 h (B) de traitement. 135
Figure 32: Effet des cryptides sur la viabilité cellulaire après un traitement de 3, 6, 9 et 12 jours durant la phase de différenciation. 136
Figure 33: Observation microscopique (grossissement x 100) d'adipocytes blancs humains fixés et colorés à l'huile rouge. 138
Figure 34: Effet des cryptides sur la teneur en lipides résiduelle des adipocytes matures. .. 139
Figure 35: Effet des cryptides sur la teneur en lipides résiduelle des adipocytes matures traités à différents stades du processus de différenciation. 140
Figure 36 : Effet des cryptides sur l'activité de GPDH dans les adipocytes blancs humains. 141
Figure 37 : Effet de GPL, IY et LKP sur l'expression d'ARNm de la LPL (A), GLUT 4 (B), aP2 (C), AGT (D). 143
Figure 38 : Effet du GPL, IY et LKP sur l'expression d'ARNm de la PPARγ (A) et C/EBPα (B)..... 144
Figure 39 : Evolution du pourcentage d'inhibition de l'activité de l'α-glucosidase en fonction de la concentration d'acarbose. 151

Figure 40 : Fractionnement par HPLC en phase inverse de l'hydrolysat protéique de coproduits de Tilapia du Nil obtenu après ultrafiltration sur membrane de 1 kDa (fraction E). 167
Figure 41 : Chromatogramme MS obtenu après séparation en UPLC sur C18 de la sous fraction 9 (A) et de la sous fraction 21 (B)..... 169
Figure 42 : Spectre d'analyse Q-TOF MS/MS du peptide VY. 170
Figure 43 : Spectre d'analyse Q-TOF MS/MS du peptide VW. 170
Figure 44 : Présentation schématique des principaux résultats obtenus dans cette étude..... 181

Index des tableaux

Tableau 1: Critères et seuils de diagnostic du syndrome métabolique. 34
Tableau 2: Facteurs physiologiques régulant l'adipogenèse et mécanismes d'action 43
Tableau 3 : Peptides inhibiteurs de la DPPIV identifiés dans les ressources marines. 61
Tableau 4 : Di et tripetides inhibiteurs de l'ECA d'origine marine. 70
Tableau 5 : Enzymes utilisées lors de l'étude. 82
Tableau 6 : Les suppléments et leurs concentrations finales 84
Tableau 7: Séquences des peptides synthétiques, structures chimiques, formules brutes et masses moléculaires. 86
Tableau 8: Substrats et inhibiteurs de références utilisés dans l'évaluation de l'inhibition des activités des enzymes. 87
Tableau 9 : Amorces utilisées en Q-PCR et leurs séquences et la taille des produits amplifiés. 103
Tableau 10 : Gradient d'élution utilisé pour la vérification de la pureté des peptides synthétiques. 104
Tableau 11: Gradient d'élution utilisé pour la séparation des peptides contenus dans la fraction E. 106
Tableau 12: Gradient d'élution utilisé pour la séparation des sous-fractions par UPLC. 109
Tableau 13: Concentrations inhibitrices (µM) en captopril et losartan nécessaires pour inhiber 50% l'activité de l'ECA 116
Tableau 14: Concentration inhibitrice (µM) en captopril, losartan et cryptides marins nécessaire pour inhiber 50% l'activité de l'ECA 118
Tableau 15: Concentration inhibitrice (µM) en chymostatine et cryptides marins nécessaire pour inhiber 50% l'activité de la cathepsine G 124
Tableau 16: Concentration inhibitrice (µM) en chymostatine et cryptides marins nécessaire pour inhiber 50% l'activité de la chymase 127
Tableau 17: Exemples d'inhibiteurs de la chymase humaine rapportés dans la littérature. . 128
Tableau 18: Concentrations inhibitrices en acarbose, miglitol,voglibose et cryptides marins nécessaires pour inhiber 50% l'activité de l'α-glucosidase 152
Tableau 19 : Concentration inhibitrice (mM) en acarbose et cryptides marins nécessaire pour inhiber 50% l'activité de l'α-amylase pancréatique 156

Tableau 20 : Concentration inhibitrice (mM) en diprotine A et cryptides marins nécessaire pour inhiber 50% l'activité de dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) 158
Tableau 21: Concentration inhibitrice de l'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia et de ses différentes fractions obtenues par ultrafiltration..... 164
Tableau 22 : CI 50 d' hydrolysats protéiques de co-produits de poisson de différentes espèces rapportées dans la littérature. 165
Tableau 23: Identification des peptides contenus dans les sous fractions majoritaires séparées par RP-HPLC.. 173
Tableau 24 : Les peptides précédemment identifiés comme inhibiteurs de l'ECA dans la littérature 174

Liste des abréviations

ACAT	Acyl-CoA cholestérol acyl transférase
ACC	Acétyl coenzyme A carboxylase
ADD1	Alpha-adducin 1
ADNc	Adényl cyclase
AGNE	Acide gras non estérifié
AGT	Angiotensinogène
AHA/NHLBI	Heart Association and the National Heart, Lung, and. Blood Institute
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANP	Peptide natriurétique atrial (Atrial Natriuretic Peptide)
aP2	Adipocyte proteine 2
ARA-II	Antagoniste des récépteurs de l'angiotensine II
ATGL	Adipocyte triglycérol lipase
ATP	Adénosine triphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding proteins
CCK	Cholécystokinine
CD36	Cluster de différenciation 36
CHOP	C/EBP homologous protein
CI	Concentration inhibitrice
CO	Oxyde de carbone
CREBs	Camp responsive element binding protein
CRP	C-reactive protein (protéine C réactive)
CUP	C/EBP unidentified protein

Da	Dalton
DAG	Diacyl glycérol
DH	Degré d'hydrolyse
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNS	Acide 3-5 dinitrosalicylique
DO	Densité optique
DPPIV	Dipeptidyl peptidase IV
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
FAS	Fatty acid synthase
FATP	Protéine transporteur d’acide gras
FOXC2	Forkhead box C2
GATA2 et 3	GATA binding protein
GH	Growth hormone
GIP	Gastric inhibitory polypeptides
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GLUT4	Glucose transporteur de type 4
GPDH	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
GPIHBP1	Glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1
HAT	Hypertension artérielle
HDL	High density lipoprotein (Lipoprotéine de haute densité)
HMGs	High mobility group proteins
HWPc	Human white pre-adipoctes subcutaneous
IDF	International Diabetes Federation
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL	Interleukine

KLF 2	Kruppel like factor 2
LDL	Low density lipoprotein (Lipoprotéines de petite densité)
LHS	Lipase hormono sensible
LPL	Lipoproteine lipase
LXR	Liver X receptor.
MAG	Monoacyl glycérol
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MCP	Monocyte chemotactic protein
MGL	Monoglycéride
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NCEP/ATPIII	National Cholesterol Education Program Adult treatment Panel III
NFATs	Nuclera factor of activated Tcells
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NO	Oxyde nitrique
NPRA	Récepteur du peptide natriurétique atriale
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Pression artérielle
PAI	Plasminogen activator inhibitor
PDGF	Platelet-derived growth factor
PG	Prostaglandin
PKA	Protéine Kinase A
PKB	Proteine kinase B
PLA2	Phospholipase A2
PLA2	Phospholipase A2
PM	Poids moléculaire
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
PPRE	PPAR responsive element

RARα	Retnoic acid receptor α
RARα	Retinoic acid receptor α
RAS	Système rénine angiotensine
SHR	Spontaneously Hypertensive rat
SM	Syndrome métabolique
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding transcription factor 1
STATs	Signal transducers and activators of transcription
TAG	Triacyl glycérol
TCF/LEF	T-cell factor/Lymphoid enhancer factor
TG	Triglycérides
TNF	Tumor necrosis factor
VLDL	Very-low-density lipoprotein
Wnt	Wingless type MMTV integration site

Symboles des acides aminés

Symbole	Abréviation	Nom de l'acide aminé
A	Ala	Alanine
R	Arg	Arginine
N	Asn	Asparagine
D	Asp	Acide aspartique
C	Cys	Cystéine
Q	Gln	Glutamine
E	Glu	Acide glutamique
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
L	Leu	Leucine
K	Lys	Lysine
M	Met	Méthionine
F	Phe	Phénylalanine
P	Pro	Proline
S	Ser	Sérine
T	Thr	Thréonine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine
V	Val	Valine

Introduction générale

Les ressources marines bénéficient d'une bonne image auprès du public. L'attention s'est portée dans un premier temps sur leurs apports en acides gras polyinsaturés à longue chaîne de la famille n-3, dont les effets biologiques sont aujourd'hui bien connus. Les produits et co-produits marins constituent un réservoir considérable de substances actives qui ne peuvent être réduits à l'un de leurs composé (Bouglé, 2007). Ils ne peuvent être considérés uniquement comme des sources d'acides gras polyinsaturés : leurs protéines et les peptides bioactifs qui en sont dérivés ont des actions propres parfois synergiques avec celles des acides gras (Wergedahl *et al*., 2009). Ces peptides bioactifs ou cryptides initialement dissimulés au cœur des protéines sont libérés à partir de protéines marines lors de la digestion ou lors de procédés protéolytiques industriels.

Plusieurs cryptides marins ont déjà été isolés après hydrolyse de protéines d'organismes marins et de leurs co-produits et pourraient moduler le métabolisme de l'être humain. Certains présentent des propriétés anticoagulantes et anti-plaquettaires *in vitro* (Kim et Wijesekara, 2010). Des activités antioxydantes ont également été détectées en plus d'effets immuno-stimulateurs et anticancéreux (Kim et Wijesekara, 2010). Les cryptides marins ont été largement étudiés pour leur activité antihypertensive à travers la mise en évidence de peptides capables d'inhiber une enzyme clé impliquée dans la régulation de la pression artérielle : l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). L'action antihypertensive de certains cryptides a été démontré chez des rats spontanément hypertendus (SHR) et les humains (Kim et Wijesekara, 2010, Harnedy et FitzGerald, 2012).

L'hypertension artérielle est fortement liée à d'autres désordres métaboliques tels que l'obésité, un déséquilibre du métabolisme glucidique et lipidique. Ces troubles métaboliques rassemblés sous le nom du syndrome métabolique entraînent une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires.

Des hydrolysats protéiques et des peptides bioactifs issus d'organismes marins peuvent moduler le métabolisme glucidique et lipidique. Leur action satiétogène peut contrôler la prise alimentaire et donc prévenir la prise de poids (Bouglé, 2007). Toutes ces actions montrent le potentiel prometteur des cryptides marins dans la promotion de la santé humaine et en particulier dans la lutte contre le syndrome métabolique. Intégrés dans la formulation de produits, ils confèrent image et fonctionnalité. Ainsi, la valorisation des fractions protéiques marines est d'un intérêt industriel considérable.

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux cryptides marins et avons cherché à montrer leur potentiel dans la lutte contre l'hypertension, le diabète et l'obésité. Nous avons donc caractérisé l'action de 11 cryptides : Val-Tyr (VY), Val-Trp (VW), Lys-Trp (KW), Lys-Tyr (KY), Ile-Tyr (IY), Leu-Lys-Pro (LKP), Ala-Lys-Lys (AKK), Val-Ile-Tyr (VIY), Gly-Pro-Leu (GPL), Val-Ala-Pro (VAP) et Ala-Pro (AP), précédemment identifiés dans les ressources marines comme inhibiteurs de l'ECA sur d'autres cibles : celles impliquées dans la génération de l'angiotensine II, et celles impliquées dans le développement de l'obésité et du diabète de type II.

Puisqu'un lien étroit existe entre les anomalies du syndrome métabolique, nous avons cherché à montrer que ces cryptides pouvaient être multifonctionnels et donc capables de cibler plusieurs facteurs de risques à la fois.

La présentation de ces travaux s'articulera de la manière suivante :

L'étude bibliographique présentera :

- Les cryptides et leurs modes de génération.
- Le syndrome métabolique, ses définitions, sa physiopathologie avec un focus sur le développement du tissu adipeux et ses fonctions métaboliques et sécrétoires.
- Le potentiel des hydrolysats protéiques et peptides bioactifs marins dans la régulation des pathologies du syndrome métabolique.

La synthèse bibliographique, sera suivie du chapitre « matériels et méthodes ». Les principaux résultats et discussions seront déclinés en quatre parties :

Dans la première partie nous avons évalué l'activité inhibitrice de l'ECA des cryptides choisis en utilisant 3 substrats différents : deux substrats synthétiques et un substrat naturel et ce, afin de comparer les méthodes et d'établir leur forces et faiblesses. Parallèlement à cela, nous avons étudié l'action inhibitrice de ces cryptides sur l'activité de la cathepsine G et de la chymase, principales alternatives à l'ECA dans la génération de l'angiotensine II.

Dans une seconde partie, nous avons étudié l'effet des 11 cryptides marins sur le cycle de vie des adipocytes blancs humains, dont l'augmentation anormale dans le corps caractérise la première étape menant au surpoids et à l'obésité. Leur potentiel sur l'hyperplasie a été évalué *in vitro* via leur effet sur la viabilité cellulaire. Quand à leur influence sur l'hypertrophie, elle

a été évaluée par la mesure de l'action de ces derniers sur les marqueurs de différenciation adipocytaire.

Dans une troisième partie, nous nous sommes intéressés à l'action antidiabétique de ces cryptides marins via l'inhibition d'enzymes impliquées dans l'élévation de la glycémie post-prandiale l'α-amylase pancréatique, l'α-glucosidase et la dipeptidyl peptidase IV. Quelques résultats obtenus lors d'une étude *in vivo* sont également évoqués.

Dans une quatrième et dernière partie, nous avons cherché à identifier la présence des séquences étudiées dans un hydrolysat protéique de co-produits de poisson industriel. Ceci a été entrepris afin de valider une démarche originale impliquant l'identification de cryptides précédemment caractérisées, dans des hydrolysats protéiques donnés.

Chapitre I: Etude bibliographique

1. Cryptides marins et modes de génération

1.1. Définition

Les peptides bioactifs, cachés dans la séquence des protéines, ou nommés plus récemment, les « cryptides » (mot issu de la contraction de « Crypted peptides ») sont au cœur de l'actualité. Autelitano *et al.* (2006) ont défini en langue anglaise les CRYPTIDES comme des séquences cachées au cœur des protéines appelées « CRYPTEINES ». Cette définition est utilisée dans ce manuscrit et est adoptée en langue française.

Les ressources marines étant très diverses, les protéines qui en sont issues contiennent très certainement des cryptides originaux possédant des activités spécifiques ou multifonctionnelles (Harnedy et FitzGerald, 2012). Pour exercer leurs activités biologiques, les cryptides doivent être libérés par les processus de digestion des cryptéines, exploitant la chimie (hydrolyse acide ou basique) ou la biochimie (hydrolyse enzymatique, fermentation microbienne ou autolyse).

1.2. Génération des cryptides marins

1.2.1. Génération des cryptides par hydrolyse chimique

L'hydrolyse des protéines par des acides ou des bases en présence ou non de solvants est souvent réalisée dans des conditions drastiques : à des températures, pressions et pH élevés. L'hydrolyse acide consiste à dégrader les liaisons peptidiques en présence d'un acide fort. Après acidification, l'hydrolysat est neutralisé, entaînant la formation d'une forte quantité de sels dans le produit final. Cette hydrolyse acide détruit également le tryptophane et certains autres acides aminés. De plus, l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique ou sulfurique oxyde la cystéine et la méthionine, détruit la serine et la thréonine et converti la glutamine et l'asparagine en glutamate et aspartate (Manninen, 2009).

Dans le cas de l'hydrolyse alcaline, la base forte employée entraîne, des réactions délétères. En effet, ce type d'hydrolyse peut entraîner la racémisation des L-acides aminés en D-acides aminés non absorbés par l'homme et la destruction de certains acides aminés tels que les cystéines, histidines, arginines, méthionines, et thréonines.

Lorsque ces méthodes chimiques ont été employées sur les protéines marines, les produits qui en étaient issus possédaient une piètre qualité nutritionnelle et fonctionnelle. Les utilisations

proposées portaient sur le rôle d'exhausteurs de flaveur et de goût pour la viande, les gâteaux secs ou les soupes (Kristinsson et Rasco, 2000).

1.2.2. Génération des cryptides par fermentation

La fermentation naturelle ou contrôlée est un moyen traditionnel utilisé pour conserver les aliments, et notamment le poisson. Le processus de fermentation implique des bactéries naturellement présentes dans le produit ou ajoutées, telles que les bactéries lactiques, qui, lors de leur croissance, hydrolysent les protéines et les sucres présents dans le milieu. L'hydrolyse des protéines génère alors différentes séquences peptidiques et des acides aminés libres. Le degré de protéolyse dépend fortement des espèces bactériennes impliquées et des conditions de fermentation. Les peptides et les acides aminés générés au cours de la fermentation modifient alors les propriétés fonctionnelles, rhéologiques, sensorielles et les propriétés biologiques du produit fermenté.

Un certain nombre d'hydrolysats protéiques d'origine marine ayant des effets bénéfiques sur la santé ont été produits à partir d'organismes marins fermentés. Wang *et al*. (2008) ont isolé 3 peptides inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) : DP, GTG et ST après fermentation de la crevette (*Acetes chinensis*) par *Lactobacillus fermentum* SM 605. De plus, Rajapakse *et al*. (2005) ont identifié un héptapeptide antioxydant de séquence HFGBPFH, issu de la fermentation de la moule bleue (*Mytilus edulis*). Ce peptide s'est révélé avoir une importante activité anti-radicalaire et inhibait la peroxydation des lipides de façon plus importante que l'α-tocopherol.

Les bactéries lactiques ont été largement utilisées au cours de la fermentation de plusieurs sources protéiques marines. Le mode de génération des peptides bioactifs le plus couramment adopté en industrie pharmaceutique ou alimentaire reste cependant l'hydrolyse enzymatique.

1.2.3. Génération de cryptides par hydrolyse enzymatique

Le clivage des liaisons peptidiques des protéines peut être catalysé par une ou plusieurs protéases, spécifiques ou non, et génère des peptides d'intérêt. En modifiant leur taille et leur charge, l'hydrolyse modifie les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des protéines (digestibilité, solubilité, réduction de l'allergénicité, développement d'activités biologiques…).

L'hydrolyse enzymatique est caractérisée par le degré d'hydrolyse (DH) qui correspond en théorie, au pourcentage des liaisons peptidiques clivées par rapport au nombre des liaisons peptidiques totales. Dans la majeure partie des cas, l'hydrolyse totale aboutissant à une solution d'acides aminés libres, n'est pas le but recherché. Il est toutefois primordial de suivre l'évolution d'une hydrolyse en temps réel afin de générer des peptides choisis en fonction de leur séquence et/ou en fonction de leur masse moléculaire.

Les paramètres physico-chimiques du milieu réactionnel (pH, température, ratio enzyme/substrat, temps d'hydrolyse) tout comme le type de protéase utilisé doivent être optimisés afin de produire un hydrolysat contenant un maximum de cryptides d'intérêt (Shahidi et Zhong, 2008). A ces paramètres, peut s'ajouter le prétraitement des protéines avant hydrolyse. En effet, le traitement thermique des protéines augmente potentiellement les interactions enzymes-protéines dues aux dépliements induits par la chaleur (Inouye *et al*., 2009). De plus, le traitement des protéines par sonication et par haute pression peut accélérer l'hydrolyse et la libération des peptides bioactifs à haute valeur ajoutée (Quirós *et al*., 2007).

La production d'hydrolysats riches en peptides bioactifs à partir de protéines marines a été conduite en utilisant différentes enzymes d'origines animale, végétale, ou microbienne. Les enzymes microbiennes sont les plus couramment utilisées car elles sont moins coûteuses, présentent une grande variété d'activités catalytiques et ont l'avantage de posséder une importante stabilité thermique (Diniz et Martin, 1996). La production d'un hydrolysat protéique à partir de produits et co-produits de pêche peut être résumée par les étapes présentées dans la figure 1.

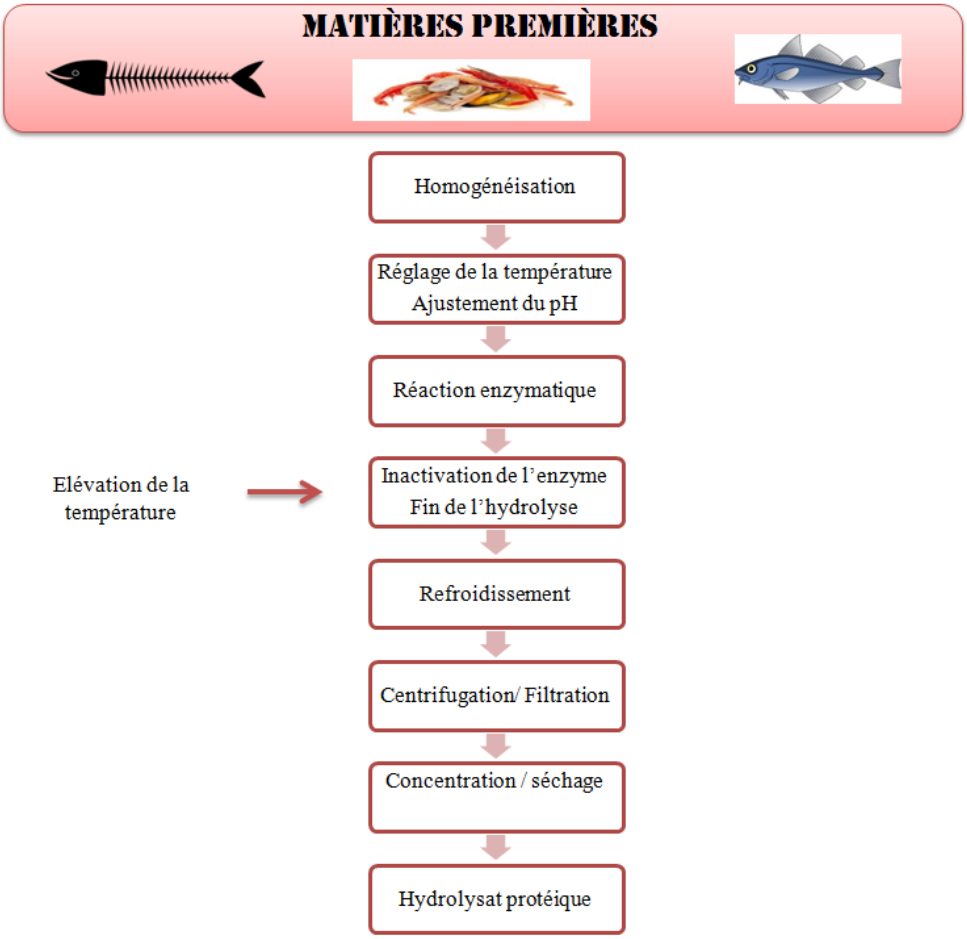


Figure 1: Représentation schématique des différentes étapes de l'hydrolyse enzymatique réalisée à partir de produits marins pour l'obtention d'un hydrolysat protéique.

1.3.Purification et identification des peptides bioactifs

Afin de déterminer leurs activités biologiques potentielles, les hydrolysats produits sont concentrés et/ou séchés puis soumis à des tests d'évaluation. Un fractionnement bioguidé pourra mener jusqu'à l'identification des peptides actifs qui sont à l'origine de l'action biologique et/ou permettra d'obtenir des fractions peptidiques possédant de meilleures fonctionnalités (Ketnawa et Rawdkuen, 2013). Les procédés couramment utilisés pour la purification et l'identification des peptides bioactifs sont présentés dans la figure 2.

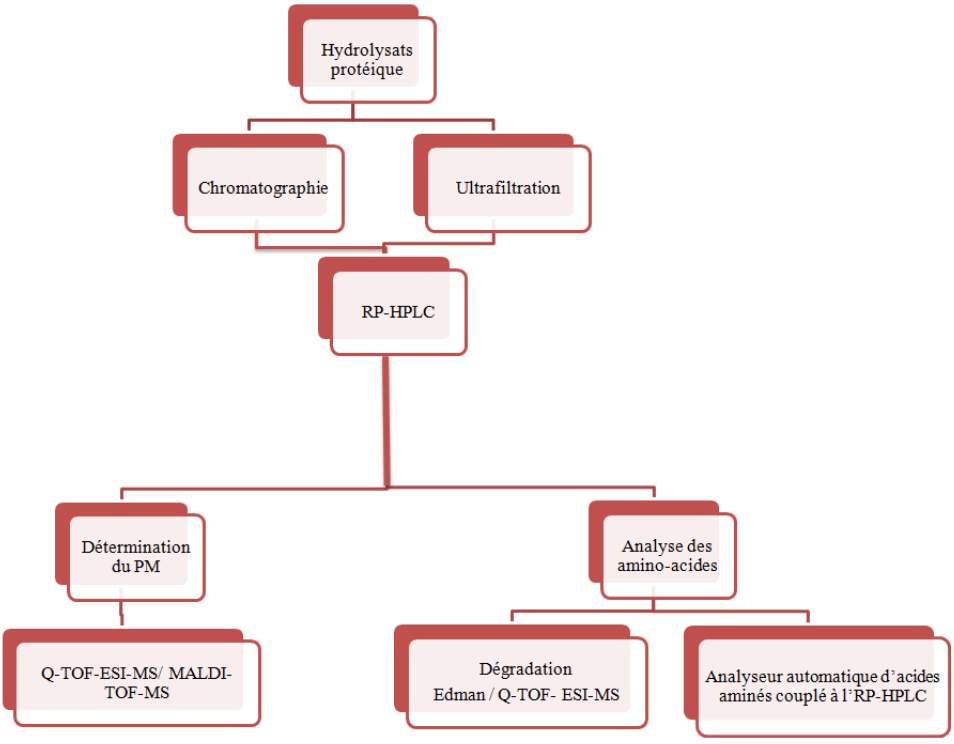


Figure 2: Diagramme présentant sommairement les étapes de purification et d'identification des peptides bioactifs dérivés de ressources marines.

PM : poids moléculaire, **RP-HPLC** : chromatographie liquide à haute pression en phase inverse, **Q-TOF-ESI-MS** : spectrométrie de masse quadripôle/temps de vol couplé à une source d'ionisation electrospray, **MALDI-TOF-MS** : spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée sur une matrice et un analyseur à temps de vol.

Les activités biologiques des cryptides sont très diverses. Au cours de cette étude bibliographique, un focus sera fait sur celles touchant les pathologies du syndrome métabolique. Ces pathologies sont décrites dans les paragraphes suivants.

2. Le syndrome métabolique : pathologies anciennes dans un monde moderne

2.1. Définition

Le concept du syndrome métabolique (SM) a été identifié il y a plus de 80 ans mais formellement décrit il y a seulement une vingtaine d'années. Le syndrome métabolique constitue une entité qui regroupe chez le même individu plusieurs anomalies métaboliques dont notamment une obésité dite « abdominale », des perturbations lipidiques (élévation des triglycérides, diminution de lipoprotéines de haute densité (HDL)…), des perturbations

glucidiques (élévation de la glycémie, résistance à l'insuline…) et une hypertension artérielle (Lejeune et Descazeaud, 2007).

Le syndrome métabolique est actuellement un problème de santé publique majeur. Si les tendances actuelles se confirment, les décès précoces et les incapacités résultant de ces pathologies grèveront les budgets de santé de nombreux pays développés et en cours de développement. Les personnes atteintes du syndrome métabolique sont exposées à un risque trois fois plus élevé d'avoir une crise cardiaque ou un accident vasculaire cérébral et à un risque deux fois plus élevé d'en mourir comparativement aux personnes saines (Lakka *et al*., 2002). Afin de décider des stratégies de prévention à adopter, plusieurs groupes d'experts ont proposé des critères de diagnostic à l'origine des diverses définitions du SM. Parmi les nombreuses définitions existantes du SM, quatre sont les plus fréquemment citées dans la littérature (tableau 1):

-La définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

-La définition du National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III).

-La définition de l'American Heart Association/National Heart, Lung and Blood Institute (AHA/NHLBI) (Grundy *et al*., 2005).

-La définition de l'International Diabetes Federation (IDF) ("IDF Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome,"2006).

Tableau 1: Critères et seuils de diagnostic du syndrome métabolique (selon l'OMS, NCEP /ATPIII, AHA/NHLBI, et IDF) (Arsenault *et al*., 2012).

	OMS (1998)	NCEP ATP III (2001)	AHA/NHLBI (2005)	IDF (2006)
Critères d'identification	Anomalies de la régulation du glucose (diabète, AGJ, IG et/ou insulinorésistance) + au moins 2 autres critères	Au moins 3 critères	Au moins 3 critères	Obésité abdominale + au moins 2 autres critères
Glycémie à jeun (GJ)	aGj : glycémie à jeun entre 6,1 et 6,9 mmol/L ou iG : glycémie entre 7,8 et 11,0 deux heures post ingestion de 75 g de glucose)	≥ 5,6 mmol/L	≥ 5,6 mmol/L ou traitement hypoglycémiant	≥ 5,6 mmol/L ou diabète de type 2 déjà diagnostiqué
Pression artérielle (Pa)	PA systolique ≥ 140 mmHg et PA diastolique ≥ 90 mmHg	PA systolique ≥ 130 mmHg et PA diastolique ≥ 85 mmHg ou traitement antihypertenseur	PA systolique ≥ 130 mmHg ou PA diastolique ≥ 85 mmHg ou traitement antihypertenseur	PA systolique ≥ 130 mmHg ou PA diastolique ≥ 85 mmHg ou traitement antihypertenseur
Triglycérides (TG)	≥1,7 mmol/L	≥1,7 mmol/L	≥1,7 mmol/L ou traitement contre l'hypertriglycéridémie	≥1,7 mmol/L ou traitement contre l'hypertriglycéridémie
C-HDL	♂: < 0,9 mmol/L ♀: < 1,0 mmol/L	♂: < 1,0 mmol/L ♀: < 1,3 mmol/L	♂: < 1,03 mmol/L ♀: < 1,3 mmol/L Ou traitement pour contrer un faible taux de C-HDL	♂: < 1,03 mmol/L ♀: < 1,26 mmol/L Ou traitement pour contrer un faible taux de C-HDL
obésité abdominale	♂: RTH > 0,90 ♀:RTH ≥ 0.85	♂: TT > 102 cm ♀: TT > 88 cm	♂: TT > 102 cm (> 90 cm chez l'homme asiatique) ♀: TT > 88 cm (> 80 cm chez la femme asiatique)	europoïdes, africains subsahariens, méditerranéens de l'est, moyen-orientaux : ♂: TT ≥ 94 cm ♀: TT ≥ 80 cm Membres des premières nations, asiatiques et sud-asiatiques, sud ou centraux-américains: ♂: TT ≥ 90 cm ♀: TT ≥ 80 cm
Fonction rénale	excrétion urinaire d'albumine > 20 µg/min ou RAC ≥ 30 mg/mmol	sans objet	sans objet	sans objet

AGJ : anomalie de la glycémie à jeun, **C-HDL** : cholestérol des lipoprotéines de haute densité, **TT** : tour de taille, **IG** : intolérance au glucose, **RTH** : ratio taille/hanche, **RAC** : rapport albumine/créatinine.

Nous pouvons constater que les critères de diagnostic du SM diffèrent. Par exemple, selon les critères de l'IDF, l'obésité abdominale doit absolument être l'un des trois critères observés pour qu'on puisse déclarer un SM (en plus de deux autres facteurs), alors que pour l'OMS c'est plutôt une anomalie dans la régulation du glucose qui est considérée comme un facteur essentiel (en plus de deux autres facteurs). Pour le NCEP ATP III, et AHA/NHLBI trois critères suffisent, peu importe lesquels. Par ailleurs, l'OMS est la seule à mentionner l'insulinorésistance et l'excrétion urinaire d'albumine. Il est également à noter que les valeurs

cibles comme la pression artérielle ou le tour de taille, par exemple, varient d'un organisme à l'autre. La définition du SM ne fait donc pas consensus. Les définitions de l'IDF et du NCEP ATP III sont celles les plus couramment utilisées (Delarue *et al.*, 2006). Les principales différences entre ces deux définitions portent d'abord sur l'obésité centrale comme critère obligatoire dans la définition de l'IDF. De plus, à la différence du NCEP la définition proposée par l'IDF tient compte des différences de tours de taille et de la répartition du tissu adipeux entre les populations. Le seuil de tour de taille choisi par l'IDF a été revu à la baisse par rapport à NCEP ATP III pour les populations blanches d'origine européenne quel que soit leur pays de résidence dans le monde.

2.2.Epidémiologie

La prévalence du SM dépend de la définition retenue, mais aussi des caractéristiques de la population considérée : ethnie, sexe, âge et indice de masse corporelle. Elle augmente considérablement avec l'âge (variant de moins de 10% avant 30 ans à plus de 40 % après 60 ans) et avec l'excès de poids (de moins de 10 % chez les sujets avec poids normal à plus de 50 % cent chez les sujets obèses) (Lameira *et al.*, 2008). Aux États-Unis, après ajustement par rapport à l'âge, la prévalence du SM était estimée à 22,1 % en 2010 selon l'étude NHANES ("NHANES-National Health and Nutrition Examination Survey Homepage"). L'obésité abdominale, considérée comme le principal déterminant conduisant au développement du SM est en continuelle augmentation (Beltrán-Sánchez *et al*., 2013).

En France, l'étude MONICA a observé une prévalence du syndrome métabolique qui varie en fonction du territoire et du sexe. Elle était, chez les hommes âgés de 35-65 ans de 26% à Lille, 22% à Strasbourg et 16% à Toulouse. Chez les femmes, les fréquences étaient respectivement de 26%, 24% et 13% selon les critères du NCEP/ATP III (Junquero et Rival, 2006). Très récemment, l'enquête ObEpi 2012 a estimé que 15 % de français étaient obèses ("ObEpi-Roche, enquête épidémiologique de référence sur l'évolution de l'obésité et du surpoids en France").

Au-delà des données globales de prévalence du SM au sein de différentes populations, une analyse détaillée des différentes composantes de ce syndrome permet de mieux appréhender certains particularismes. Ainsi, aux États-Unis, l'obésité abdominale est le principal contributeur du SM, alors qu'en France et en Europe, l'hypertension artérielle (HTA) est le paramètre le plus fréquemment retrouvé (Hu *et al.*, 2004). Ces nuances sont importantes car

elles sous-entendent des profils de population incomparables, conduisant à des axes d'intervention et de prévention différents selon les pays.

2.3. Obésité et tissu adipeux

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a qualifié l'obésité de première épidémie non infectieuse de l'histoire. C'est une pathologie du tissu adipeux due à une hypertrophie et une hyperplasie des cellules adipocytaires (Friedman, 2000). Au-delà de ses rôles de stockage de lipides neutres et de source d'acides gras, le tissu adipeux est un organe endocrine et paracrine qui secrète de nombreuses protéines, les adipokines, qui jouent un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique et l'inflammation vasculaire.

2.3.1. Le tissu adipeux

Il existe deux types de tissus adipeux, le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Le tissu adipeux brun assure le réchauffement de l'organisme grâce à une activité thermogénique et le tissu adipeux blanc joue un rôle considérable dans le maintien de la balance énergétique car il peut stocker et libérer l'énergie selon les besoins de l'organisme (Casteilla *et al*., 1994). C'est ce tissu qui se développe au cours de l'installation d'un surpoids et de l'obésité et qui fait donc l'objet de cette étude bibliographique.

2.3.2. Origine du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est le dernier tissu à se mettre en place lors du développement de l'être humain (au cours du deuxième trimestre de gestation) (Poissonnet *et al*., 1983). Il est constitué d'un mélange hétérogène de cellules. En plus des adipocytes, ce tissu contient également la fraction stroma-vasculaire composée de : pré-adipocytes, cellules vasculaires, cellules endothéliales, cellules inflammatoires (péricytes, monocytes, macrophages) et cellules progénitrices (Desruisseaux *et al*., 2007). Le tissu adipeux blanc est divisé en deux catégories : le tissu adipeux sous-cutané (environ 80 % de la masse totale de gras corporel) et le tissu adipeux viscéral. (Ibrahim, 2010). Des différences morphologiques et fonctionnelles entre ces deux dépôts ont été rapportées chez l'homme (Ibrahim, 2010). Les adipocytes du tissu viscéral expriment moins de facteurs de transcription favorisant l'adipogenèse, comme la CCAAT/enhancer binding protein-α (C/EBP-α), et plus de facteurs associés avec la répression de la différentiation, comme les gènes du système Wnt, comparativement aux adipocytes du tissu sous-cutané (Vohl *et al*., 2004).

Au niveau de la sécrétion d'adipokine, le tissu viscéral est généralement plus actif que le tissu sous-cutané. Ainsi, l'adiponectine, la protéine C réactive (CRP), le facteur de nécrose tumorale (TNF: tumor necrosis factor), l'interleukine-6 (IL-6), le monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), l'angiotensinogène et le plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) sont plus fortement exprimés dans le tissu viscérale que dans le sous-cutané (Ibrahim, 2010). Toutefois, l'expression de la leptine est plus importante dans le tissu adipeux sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral (Lefebvre *et al*., 1998).

La masse du tissu adipeux blanc peut varier de manière considérable en fonction du statut énergétique de l'organisme et dans des situations pathologiques comme l'obésité. L'augmentation de la masse des tissus adipeux blancs est due à l'augmentation de la taille et/ou du nombre des adipocytes durant le processus de l'adipogenèse. L'adipogenèse peut conduire à l'obésité centrale si elle se produit dans le dépôt de graisse abdominale viscérale et à l'obésité périphérique si elle se produit dans le tissu sous-cutané (Ali *et al*., 2013).

2.3.3. Développement du tissu adipeux et adipogenèse

L'adipogenèse est un processus de développement en deux étapes : l'étape de détermination dans laquelle une cellule mésenchymateuse indifférenciée se différencie en pré-adipocyte. Ce pré-adipocyte subit ensuite une étape de différenciation secondaire pour devenir un adipocyte mature. Tout au long du processus d'adipogenèse, se produit des changements chronologiques dans l'expression de nombreux gènes. L'apparition de marqueurs précoces, intermédiaires et tardifs d'ARNm ou de protéines aboutissent à l'accumulation de TG. Ces changements sont principalement transcriptionnels. L'adipogenèse se décompose donc en une série d'étapes cellulaires bien caractérisées présentées dans la figure 3.

L'adipogenèse est devenue l'un des processus de développement cellulaire les plus étudié pour au moins deux raisons : (1) La prévalence croissante de l'obésité dans notre société a attiré l'attention sur de nombreux aspects de la biologie des cellules adipeuses; et (2) la disponibilité de bons modèles de culture cellulaire permettant l'étude détaillée de la différenciation adipocytaire (Ali *et al*., 2013).

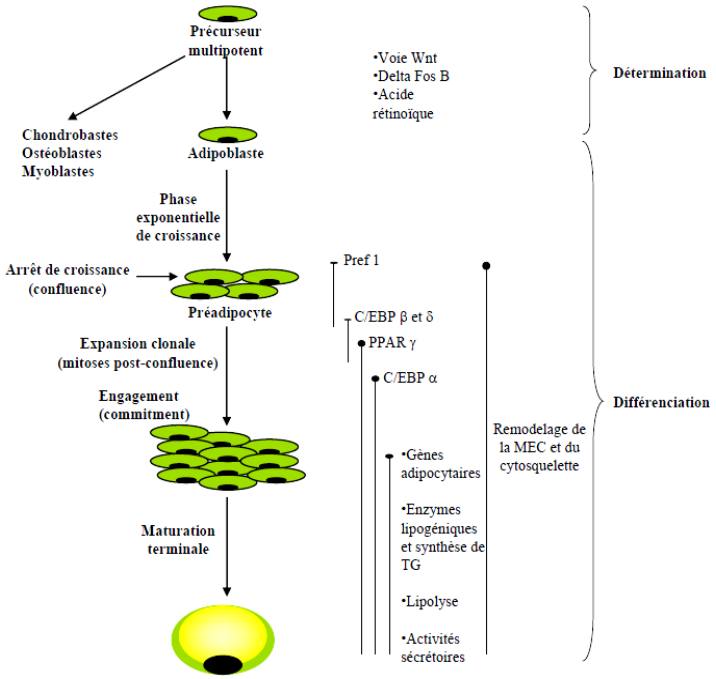


Figure 3: Détermination et différenciation adipocytaire d'après Gregoire *et al*., (1998).

- **L'étape de détermination**

L'étape de détermination désigne la conversion des cellules souches mésenchymateuses, cellules pluripotentes en pré-adipocytes. Suite à cette étape, la cellule n'est pas complètement différenciée. Ce processus nécessite encore une étape de stimulation adipogénique par des facteurs spécifiques pour compléter la différenciation terminale, formant ainsi un adipocyte mature. La régulation de cette étape fait intervenir un ensemble de facteurs. Il a été démontré que les voies de signalisation du gène Wnt, la composition et la rigidité de la matrice extracellulaire, et le contact cellule-cellule, ont tous un rôle dans la détermination (Cristancho et Lazar, 2011).

- **L'étape de différenciation**

Les pré-adipocytes, après avoir subi une phase d'expansion clonale, se dirigent vers l'étape de la différenciation proprement dite. Cette étape nécessite l'expression de certains marqueurs clés dits marqueurs de différenciation, qui vont induire l'apparition des changements morphologiques. Les principaux facteurs de transcription qui stimulent le mécanisme de la différenciation sont le peroxysome proliferator-activated receptor-γ (PPARγ), C/EBPα, C/EBPβ et C/EBPδ (Lefterova *et al.*, 2008). Pendant la différenciation, les cellules adipocytaires passent d'un phénotype fibroblastique allongé à des cellules de forme sphérique, capables de stocker de la matière grasse.

Lors de la phase terminale de différenciation, la lipogenèse de *novo* s'installe et les adipocytes acquièrent leur sensibilité à l'insuline (Gregoire *et al*., 1998). L'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme des TG : ATP citrate lyase, enzyme malique, acétyl CoA carboxylase, stearoyl-CoA désaturase, acyltransférase, glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) augmente. Les transporteurs au glucose (GLUT4) et à l'insuline sont exprimés, tout comme d'autres gènes spécifiques de l'adipocyte dont l'expression augmente: adipocytes protéines 2 (aP2), cluster de différenciation (CD36), périlipine, adipsine, leptine…

2.3.4. Le contrôle de la différenciation adipocytaire

Les changements morphologiques majeurs qui accompagnent la différenciation adipocytaire, tels que l'arrondissement des cellules et l'accumulation progressive de vacuoles lipidiques dans le cytoplasme, sont la conséquence de variation d'expression d'un très grand nombre de gènes. Cette reprogrammation génétique profonde est sous le contrôle de facteurs de transcription pro- ou anti-adipogéniques dont les principaux sont les Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), les CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) et le sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c). Les différentes interactions entre ces facteurs sont résumées dans la figure 4.

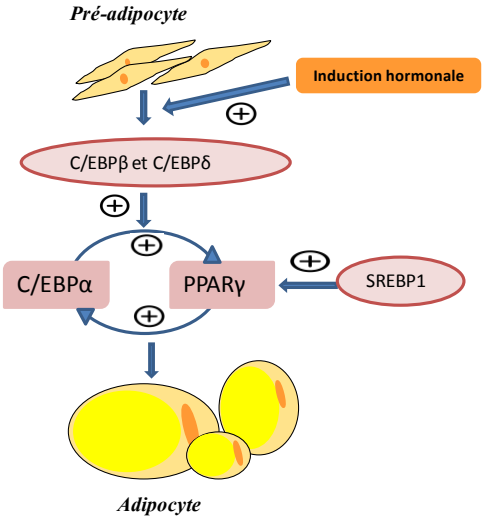


Figure 4: Interactions entre les principaux facteurs de transcriptions de la différentiation adipocytaire.

PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptors, **C/EBPs** : CCAAT/enhancer binding proteins, **SREBP-1c** : Sterol regulatory element binding protein-1c.

2.3.4.1. La régulation transcriptionelle

-C/EBPs

Il existe trois isoformes de C/EBPs, α, β δ et de la famille des C/EBP qui sont exprimés dans les adipocytes et qui agissent comme facteurs de transcription importants dans l'activation de gènes impliqués dans l'adipogenèse (Rosen et Spiegelman, 2000). C/EBPβ et C/EBPδ sont les premiers facteurs de transcription adipogéniques à être exprimés lors de l'adipogenèse et C/EBPδ l'est seulement de façon transitoire au début de la différenciation. L'expression de ces protéines est suivie rapidement par l'expression de C/EBPα et de PPARγ (figure 4). La séquence d'activation de C/EBPβ et C/EBPδ et ensuite de C/EBPα et de PPARγ indique que C/EBPβ et C/EBPδ augmenteraient l'expression de C/EBPα et de PPARγ (Darlington *et al.*, 1998). L'induction de C/EBPα, qui se fait plus tardivement, permet de transactiver différents gènes marqueurs de la différenciation adipocytaire tels que l'aP2 et la leptine mais également d'activer sa propre expression (Rosen et Spiegelman, 2000).

-Les PPARs

Les facteurs de transcription PPAR appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ces récepteurs sont activés par la liaison à leur ligand, ils forment des hétérodimères avec les récepteurs de l'acide 9-cis-rétinoïque (RXR) qui reconnaissent spécifiquement des éléments de réponse : PPAR Responsive Element (PPRE) situés dans les régions promotrices de gènes cibles (Issemann *et al*., 1993). Plusieurs cofacteurs protéiques, coactivateurs ou corépresseurs modulent la capacité des récepteurs nucléaires à initier ou réprimer la transcription (figure 5).

Chez les mammifères, trois isoformes de PPARs : α, β, et γ ont été décrits. Chacun est codé par un gène différent et caractérisé par une distribution tissulaire, des ligands, des cofacteurs et des fonctions qui leurs sont propres (Wahli *et al.*, 1995). De nombreuses études démontrent que le PPARγ, est préférentiellement exprimé dans les adipocytes. Le PPARγ est considéré comme « le maître régulateur » de l'adipogenèse par sa fonction d'activation des gènes nécessaires à ce phénomène. En effet, il est responsable de la transcription de nombreux marqueurs de la différenciation adipocytaire, comme celui de la lipoprotéine lipase (LPL) ou celui codant pour la protéine de transport des acides gras, l'adipocyte protéine 2 (aP2) (Rosen et Spiegelman, 2000).

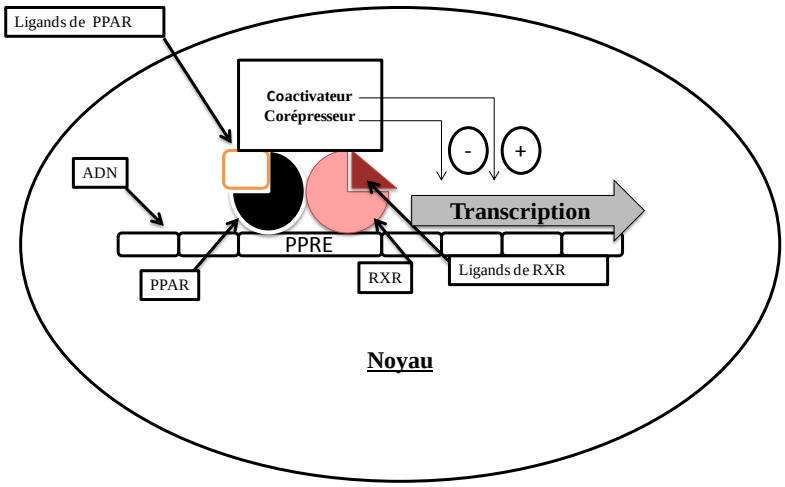


Figure 5: Mécanisme d'action des PPAR dans le noyau des cellules adipocytaires d'après Laracine (2009).

Le récepteur nucléaire PPAR forme un dimère avec le récepteur aux rétinoïdes RXR. Ce dimère se lie à une séquence d'ADN spécifique PPRE.

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, **PPRE** : PPAR Response Element, **RXR** : Retinoid X Receptor.

-Les SREBP-1

Le facteur SREBP1 fait partie de la famille des facteurs à motifs hélice-boucle-hélice. Son expression est induite très tôt au cours de la différenciation (Tontonoz *et al*., 1993). Son implication au niveau hépatique et adipocytaire dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, des TG et des acides gras a été publié (Horton *et al*., 2002). De plus, ce facteur présente une expression étroitement dépendante du processus de différenciation en exerçant un effet adipogénique discret (Casteilla *et al*., 2005). Au niveau du tissu adipeux, il favoriserait l'adipogenèse en induisant l'expression de PPARγ (Fajas *et al*., 1999).

- Autres facteurs de transcription

En dehors de ces intervenants essentiels dans l'adipogenèse, d'autres facteurs transcriptionnels aux fonctions pro- ou anti-adipogéniques constituent potentiellement des régulateurs importants de la différenciation adipocytaire. Ces différents facteurs sont identifiés et présentés dans la figure 6.

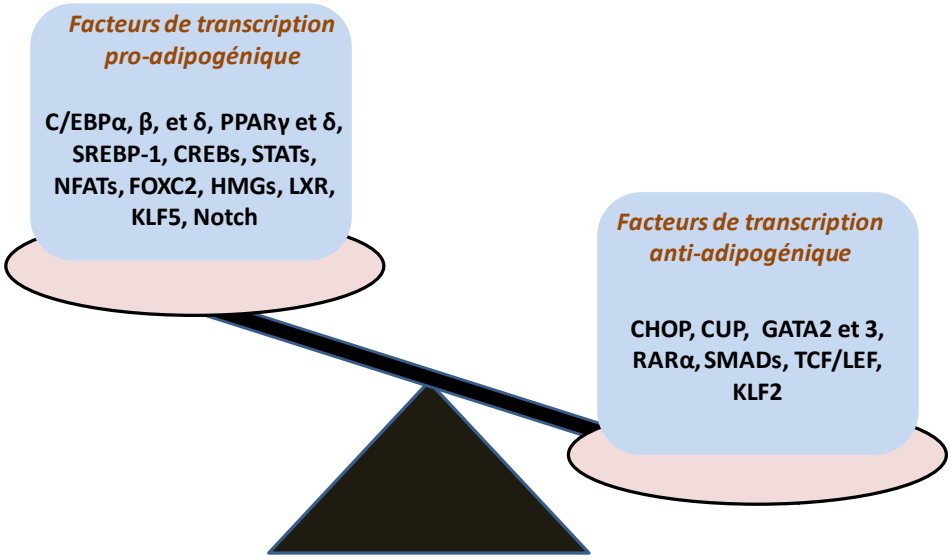


Figure 6 : Balance entre les facteurs de transcriptions pro- et anti-adipogéniques d'après Fève (2005).

CHOP : C/EBP homologous protein, **CUP** : C/EBP unidentified protein GATA2 et 3: GATA binding protein 2 et 3, **RARα** : Retnoic acid receptor α, **TCF/LEF** : T-cell factor/Lymphoid enhancer factor, **KLF 2** : Kruppel like factor 2, **CREBs** : Camp responsive element binding protein, **STATs** : Signal transducers and activators of transcription, **NFATs** : Nuclear factor of activated T cells, **FOXC2** : Forkhead box C2, **HMGs** : High mobility group proteins, **LXR** : Liver X receptor.

2.3.4.2. Régulation hormonale et intracellulaire de l'adipogenèse

En plus des facteurs de transcription qui viennent d'être présentés, l'adipogenèse est contrôlée par de nombreux facteurs de nature très variée : hormones, cytokines, nutriments et molécules de signalisation cellulaire. Les principaux facteurs connus sont présentés dans le tableau 2, classés selon leurs effets pro- et anti-adipogénique ou mixte. Leurs mécanismes d'action sont également indiqués.

Tableau 2: Facteurs physiologiques régulant l'adipogenèse et mécanismes d'action, d'après Casteilla *et al*. (2005).

Nature de l'effet	Agent	Commentaires et mécanismes d'action
Adipogénique	**GH**	-Intervient au moment de l'engagement -Induit la synthèse de la sécrétion d'IGF-1 par le pré-adipocyte
	IGF-1	-Permet l'amplification clonale des préadipocytes
	Insuline	-Potentialise l'action transactivatrice de PPARγ et α ainsi que la phosphorylation de ces facteurs -Augmente l'expression des C/EBPβ et δ et de ADD1
	Triiodothyronine	-Contrôle la multiplication des cellules engagées
	Acides gras	-Activent la croissance et la différenciation des pré-adipocytes -Activent les PPAR
	Glucose et acides aminés	-Inhibent l'expression de CHOP-10
Effet mixte	**AMPc**	-Induit la différenciation des cellules (3T3-L1 et Ob17) avec une synergie entre AMPc et Ca^{2+}. -Induit la C/EBPβ- -Inhibe la maturation terminale des cellules 3T3-F442A
	Corticostéroide	- Induit la différenciation des cellules (3T3-L1 et Ob17) sans doute par induction de PLA2 avec production de certaines prostaglandines - Induit la C/EBPδ -inhibe la maturation terminale des cellules 3T3-F442A
	Acide rétinoïque	-Effet dépendant de la dose (inducteur de la différenciation à faibles doses, inhibiteurs à forte dose) -Effet inhibiteur relayé par RARα, et peut être lié à une compétition entre PPAR et RARα pour l'hétérodimérisation avec RXR.
	Prostaglandines	-PGI2, carbacycline et PGJ2 (ligand potentiel de PPARγ favorisent la différenciation -PGF2α inhibe la différenciation
Anti-adipogénique	**EGF, PDGF**	-Réduisent l'activité transactivatrice de PPARγ, à la suite de sa phosphorylation
	TGFβ	**-**Préviennent la différenciation indépendamment de leur effet mitogénique
	TNFα	-Inhibe la différenciation et peut même « dédifférencier » des adipocytes constitués -Inhibe l'expression de C/EBPα et de PPARγ

GH : Growth Hormone, **IGF-1** : Insulin-like growth factor-1, **ADD1** : Alpha-adducin; **CHOP-10** : C/EBP homologous protein 10, **AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique, **PLA2** : Phospholipase A2, **RXR** : Retinoid X receptor, **RARα** : Retinoic Acid Receptor α, **PGI2** : Prostaglandin analogue, **PGJ2** : Prostaglandin J2, **PGF2α** : Prostaglandin F2α, **EGF** : Epidermal growth factor, **PDGF** : Platelet-derived growth factor, **TGFβ** : Transforming growth factor beta, **TNFα** : Tumor necrosis factor alpha.

2.3.5. Les fonctions du tissu adipeux

Les premiers rôles attribués au tissu adipeux blanc étaient : la protection et l'isolement mécanique, le maintien de l'homéostasie énergétique (stockage de lipides sous forme de triglycérides (TG) et la libération de substrats énergétiques sous forme d'acides gras non estérifiés (AGNE)). En plus de ses fonctions métaboliques, il est maintenant largement démontré que le tissu adipeux possède une riche activité sécrétoire et communique avec les cellules des différents organes tels que le pancréas, le foie, les reins ainsi que les muscles squelettiques (Fain *et al*., 2004).

2.3.5.1. Mécanismes et voies de régulation des fonctions métaboliques

L'adipogenèse

Les TG stockés dans les adipocytes sont synthétisés à partir des AGNE et de glycérol préalablement activés respectivement en acyl-Co-enzyme–A (Acyl-Co-A) et glycérol-3-phosphate (G3P). Les AGNE proviennent de deux voies majeures (figure 7). La voie dominante est représentée par le captage des AGNE préexistant sous la forme de TG plasmatique associé aux chylomicrons et aux lipoprotéines de très faible densité (VLDL).

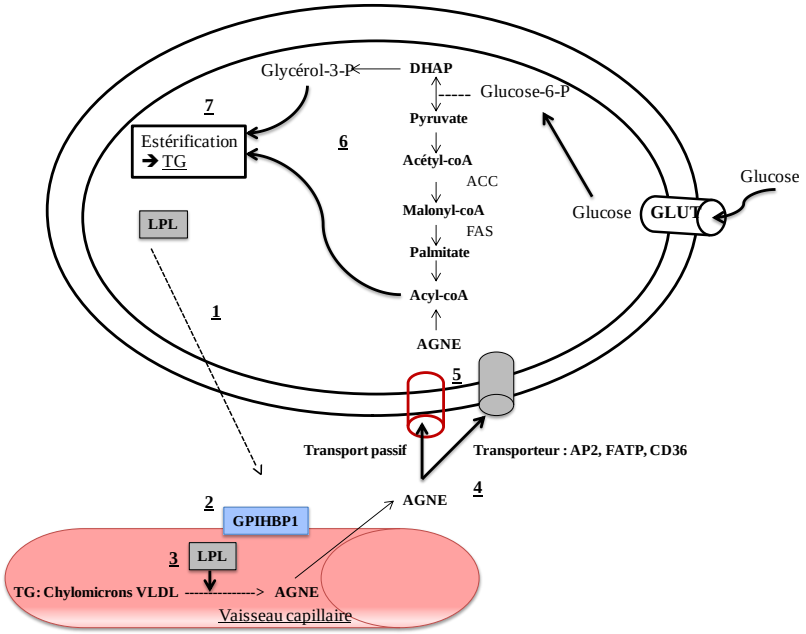


Figure 7: Lipogenèse et synthèse des triglycérides dans l'adipocyte d'après De Barros (2007).

***1** : Ancrage de la LPL à la surface endothéliale, **2** et **3** : Coopération de la LPL avec GPIHBP1 pour l'hydrolyse des lipoprotéines, **4** : transport des AGNE vers l'adipocyte, **5** : Transformation des AGNE en Acétyl Co-A. **6** : Transport du glucose pour la lipogenèse de novo. **7** : Ré-estérification en présence du glycérol en TG.*

TG : Triglycéride, **LPL** : Lipoprotéine lipase, **AGNE** : Acide gras non estérifié, **GPIHBP1** : Glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1, **VLDL** :Very low protein density, **GLUT** : Transporteur de glucose ; **DHAP** : Dihydroxyacétone phosphate, **FAS** : Fatty acid synthase, **ACC** : Acetyl coenzyme A carboxylase, **FATP** : Fatty acid transport protein.

La lipoprotéine lipase (LPL), enzyme produite et sécrétée par les adipocytes, est transférée au niveau de la lumière des capillaires du TA et se fixe à la surface endothéliale par des liaisons avec des glycosaminoglycans (comme des proteoglycans héparine sulfate) (Lafontan, 2012).

Une protéine ancrée aux cellules de l'endothélium capillaire du TA par un groupement glycosylphosphatidylinositol, la GPI-anchored high-density lipoprotein-binding protein 1 (GPIHBP1) a été découverte récemment. Localisée à la surface basolatérale de la cellule endothéliale capillaire, elle joue un rôle crucial en assurant la transcytose de la LPL dans la lumière des capillaires. De plus, elle faciliterait l'hydrolyse de TG en se liant aux chylomicrons (Young *et al*., 2007 ; Davies *et al*., 2010). Les AGNE libérés par l'action de la LPL vont être capturés par les adipocytes. Ils peuvent diffuser passivement via un système de transport passif ou être véhiculés par certaines protéines membranaires.

Les adipocytes blancs humains expriment différents transporteurs des AG, qui facilitent et contrôlent leur entrée dans la cellule tels que : la protéine CD36 (homologue du transporteur des AG murin Fatty Acid Transporteur (FAT)), la protéine de transport des AG : « Fatty Acid Transport Protein » (FATP), et l'adipocyte protéine 2 (aP2). Ces protéines transportent les AGNE jusqu'au site d'action de l'enzyme acyl-Co-A synthétase, qui les transforme en acyl-Co–A puis les estérifie en TG en présence de glycérol.

La deuxième voie est la lipogenèse de *novo*: néosynthèse d'acide gras principalement à partir du glucose. Le glucose entre dans l'adipocyte grâce aux transporteurs spécifiques GLUT1 et GLUT4. Il est transformé via le processus de la glycolyse en pyruvate puis en AG à longue chaîne par l'action de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la fatty acid synthase (FAS), puis en Acyl-CoA. Comme précédemment, ces derniers sont ensuite estérifiés pour donner les TG. La lipogenèse de *novo* est moins active chez l'homme que chez le rongeur et contribue bien moins aux stocks lipidiques de l'adipocyte que les TG alimentaires (Mårin *et al.*, 1992). De nombreux facteurs tels que les catécholamines, l'hormone de croissance et la leptine sont capables de contrôler le stockage des TG, mais le facteur majeur est l'insuline. Elle stimule cette voie en augmentant le captage du glucose via le recrutement du transporteur GLUT4 à la membrane, et active les enzymes glycolytiques et lipogéniques (Kersten, 2001).

La lipolyse

La fonction lipolytique de l'adipocyte correspond au catabolisme des triglycérides qui conduit à la libération dans le compartiment interstitiel puis plasmatique, le glycérol et les acides gras non estérifiés. La lipolyse est régulée par la lipase hormono-sensible (LHS). Cette enzyme hydrolyse les triglycérides en 1,2-diacylglycérol et 2-monoacylglycérol. Les monoglycérides sont ensuite hydrolysés en acide gras et en glycérol par la monoacylglycérolipase.

Cependant, la mise en évidence d'une activité lipolytique diminuée mais toujours présente chez des souris invalidées pour le gène de la LHS laisse supposer l'existence d'au moins une autre lipase capable d'hydrolyser les TG dans les adipocytes : l'adipocyte triacylglycerol lipase (ATGL) (Osuga *et al*., 2000). L'ATGL jouerait un rôle clé dans la lipolyse basale, mais l'hydrolyse des TG et des diglycérides par la LHS demeurerait l'étape limitante dans la lipolyse stimulée par les principaux agents lipolytiques chez l'homme: les catécholamines et les peptides natriurétiques (Langin *et al*., 1996 ; Langin *et al*., 2005). Les mécanismes d'activation de la LHS sont désormais bien connus : Les catécholamines (noradrénaline, adrénaline (β1, β2-AR)) agissent via leurs récepteur couplé à la protéine G en activant

l'adénylyl cyclase qui hydrolyse l'ATP en AMPc (Lafontan, 2005). Les concentrations intracellulaires d'AMPc dépendent de l'hydrolyse de l'ATP en AMPc par l'adénylyl cyclase, mais également de la dégradation de l'AMPc en 5'AMP par la phosphodiestérase (POE). La LHS est activée par phosphorylation d'un seul résidu sérine de la protéine. Cette réaction est catalysée par une protéine kinase AMPc dépendante (PKA) ou GMPc dépendante (PKG) (Sengenes *et al*., 2003).

La phosphorylation de la LHS démasque le site catalytique et active l'enzyme. Cette phosphorylation entraîne une redistribution de la lipase du cytoplasme vers la vacuole lipidique. La phosphorylation des périlipines (protéines abondamment exprimées à la surface des gouttelettes lipidiques, et intervenant dans la localisation et la stabilisation de la LHS à la surface des vacuoles) provoque leur détachement des lipides qui deviennent plus accessibles à au LHS ce qui, finalement, déclenche la lipolyse. L'ensemble de ces réactions est présenté dans la figure 8.

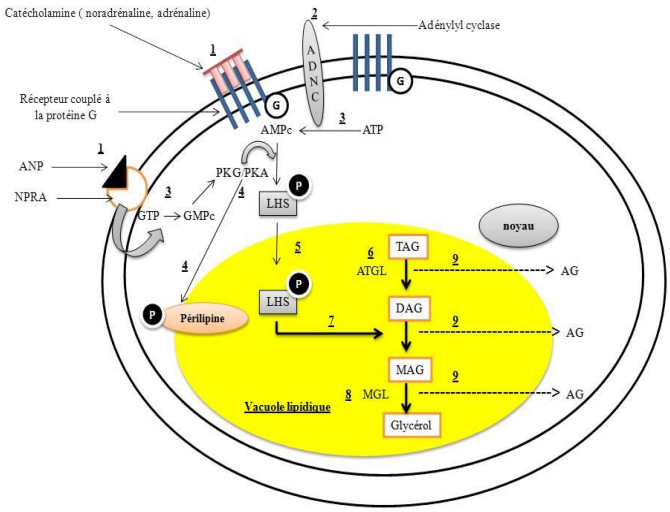


Figure 8: Les étapes de la lipolyse.

***1** : Fixation des catécholamines ou peptide natriurétique atrial (ANP) sur leur récepteur, **2** : Activation de l'ADNC, **3** : Hydrolyse de l'ATP en AMPc ou hydrolyse du GTP en GMPC, **4** : Phosphorylation de la LHS et du périlipine via PKA/ou PKG, **5** : Passage de la LHS-P vers la vacuole lipidique, **6** : Hydrolyse des TAG en DAG, **7** : Hydrolyse des DAG en MAG , **8** : Libération du glycérol, **9** : Expulsion des acides gras libres vers le plasma.*

ADNc : Adényl cyclase, **ANP** : Peptide natriurétique atrial (atrial natriuretic peptide), **NPRA** : Récepteur du peptide natriurétique atrial, **GTP** : Guanosine triphosphate, **GMPc** : Guanosine monophosphate cyclique, **ATP** : Adénosine Triphosphate, **AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique, **PKA** : Protéine kinase A, **PKG** : Protéine kinase G, **LHS** : Lipase hormono sensible, **TAG** : triacyl glycérol, **AG** : Acide gras, **DAG** : Diacyl glycérol, **MAG** : Monoacyl glycérol, **ATGL** : Adipocyte triglycérol lipase, **MGL** : Monoglycéride lipase.

2.3.5.2. Les fonctions sécrétoires du tissu adipeux blanc

Le TA est capable de synthétiser et de sécréter une multitude de facteurs qui agissent soit localement de façon autocrine et/ou paracrine, soit de façon endocrine. On désigne sous le terme « adipokines », l'ensemble des facteurs bioactifs produits et sécrétés par le TA. Les principaux adipokines sont présentées dans la figure 9. Historiquement, la LPL est la première adipokine découverte (Lafontan et Berlan, 2003). Toutefois, c'est la découverte de la leptine, hormone synthétisée par le TA et intervenant dans le contrôle de la prise alimentaire, qui a permis au TA d'acquérir le statut d'organe endocrine. Par la suite, d'autres facteurs produits et sécrétés par le TA ont été décrits. Il en est compté actuellement plus d'une cinquantaine qui diffèrent tant au niveau de leurs structures que de leurs fonctions : des hormones (stéroïdes et glucocorticoïdes), des cytokines (TNFα, IL-6, IL-8), des facteurs de croissance (TGF-β), des protéases (MMP-2 et 9) et des inhibiteurs de protéase (TIMP, PAI-1) (Frayn *et al*., 2003). Ces adipokines possèdent des fonctions physiologiques différentes, allant du contrôle du métabolisme lipidique, à l'inflammation. Il est à noter qu'à part la leptine et l'adiponectine considérées comme spécifiques des adipocytes, les adipokines seraient également exprimées et produites par les cellules de la fraction non adipocytaire du TA (la fraction stroma-vasculaire) (Gregoire *et al*., 1998).

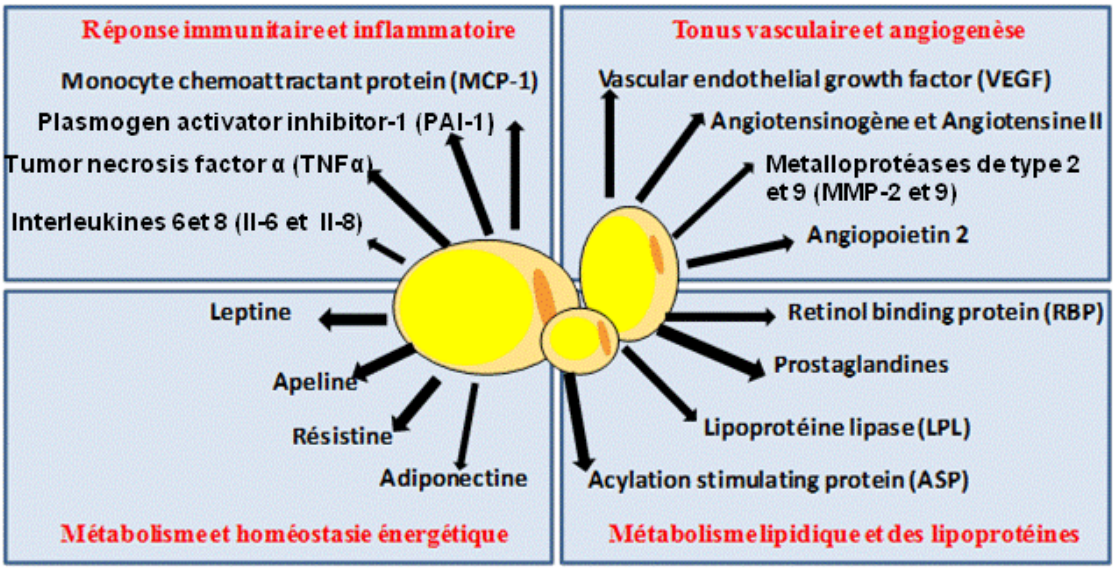


Figure 9: Adipokines produites par le tissu adipeux et leurs principaux rôles dans le contrôle des grandes fonctions métaboliques d'après De Barros (2007).

Un dysfonctionnement métabolique et sécrétoire des adipocytes influence grandement l'apparition des anomalies associées au développement du SM.

2.4.Physiopathologie générale du Syndrome Métabolique

Les causes du développement du SM sont mal connues et la physiopathologie de ce syndrome n'est encore aujourd'hui que partiellement comprise. Des prédispositions génétiques (particulièrement celles déterminant la corpulence, la répartition de la masse grasse, l'hyperinsulinisme) et des facteurs environnementaux tels que la sédentarité, le tabagisme, le stress, l'alimentation riche en lipides et glucides constituent des facteurs en faveur du développement du SM.

Si l'insulinorésistance semble être au cœur des anomalies parce qu'elle prédispose au diabète de type 2, aux dyslipidémies qui lui sont associées et à un état pro-inflammatoire, elle n'est toutefois pas directement corrélée à l'hypertension. En revanche, l'obésité représente le facteur le plus important dans l'étiologie du syndrome métabolique, contribuant à l'hyperglycémie, l'hypertension et l'hypercholestérolémie. La survenue d'une obésité abdominale qui se traduit par un dysfonctionnement du tissu adipeux contribue grandement à l'apparition du syndrome métabolique. Ceci est résumé dans la figure 10.

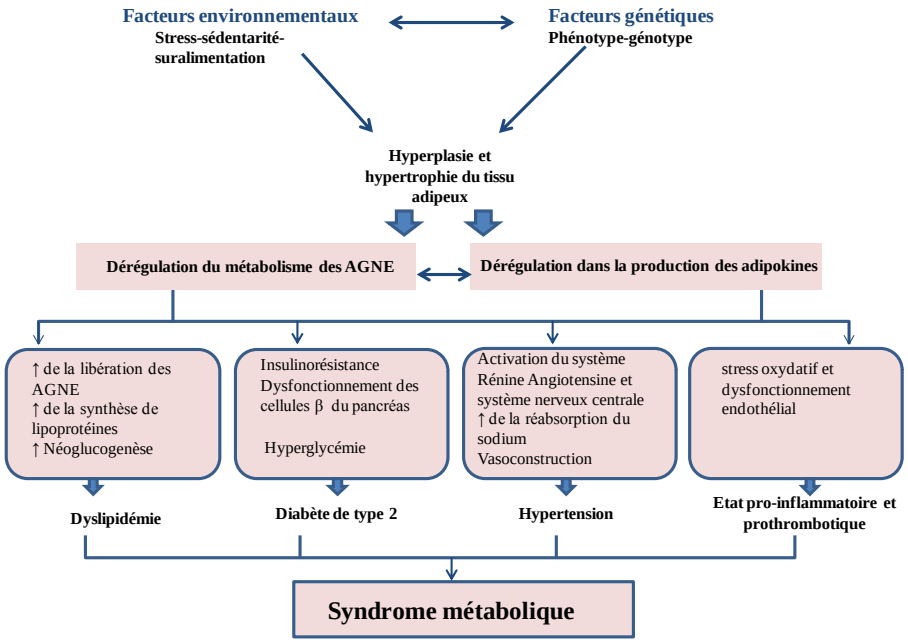


Figure 10 : Présentation schématique des facteurs de risques menant au développement du syndrome métabolique d'après Kaur (2014). **AGNE** : acides gras non estérifiés

L'implication du tissu adipeux abdominal dans la régulation de la balance glucidique, et de manière plus large dans la physiopathologie du syndrome métabolique, emprunte schématiquement au moins deux voies : une altération du métabolisme des AGNE et la

production d'adipokines. En cas d'obésité, le tissu adipeux et particulièrement l'adipocyte devient moins sensible à l'action anti-lipolytique de l'insuline. L'insulinorésistance s'accompagne d'une diminution de la lipogenèse habituellement observée en situation d'hyperglycémie, d'une levée de l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux, et d'une réduction du transfert des acides gras non estérifiés (AGNE) des lipoprotéines circulantes vers le tissu adipeux.

L'excès de catécholamines associés à la moindre inhibition de la lipase hormonosensible du fait de l'insulinorésistance du tissu adipeux favorise cette lipolyse, en particulier au niveau du tissu adipeux viscéral (Wajchenberg, 2000). La libération des AGNE en excès entraîne une:

- Stimulation de la néoglucogenèse, altération du métabolisme des lipides, des lipoprotéines de la dégradation de l'apolipoprotéine B et une élévation de production des lipoprotéines riches en TG contribuant ainsi à l'hypertriglycéridémie.
- Accumulation des graisses dans des localisations ectopiques (pancréas, muscle, foie, cœur) altérant ainsi l'insulino-sécrétion par les cellules β du pancréas et de l'insulino-sensibilité au niveau musculaire en inhibant l'entrée du glucose médiée par l'insuline.
- Diminution de l'extraction hépatique de l'insuline, accroissant l'hyperinsulinémie déjà induite par l'insulino-résistance.

Au travers de mécanismes impliquant l'augmentation de l'activité du système nerveux sympathique, la perturbation du métabolisme hydrosodé, et la limitation de la vasodilatation périphérique, l'insulino-résistance et l'hyperinsulinémie contribuent également à l'élévation de la tension artérielle (Reaven, 2005 ; Cooper *et al*., 2007). Parallèlement à ces dysfonctionnements accompagnant la libération abondante des AGNE par le tissu adipeux, les adipokines auraient un rôle d'interface entre l'obésité et les événements moléculaires qui conduisent à la résistance à l'insuline, l'inflammation, la dyslipidémie, l'hypercoagulabilité et les anomalies endothéliales associées à l'athérosclérose et au SM (Jullien, 2008).

Le tissu adipeux d'un individu obèse produit des cytokines pro-inflammatoires: le TNF α, l'IL-1β et l'IL-6 (Jullien, 2008). La production excessive de TNFα observée chez l'obèse et dans les autres états de résistance à l'insuline comme le sepsis, pourrait jouer un rôle central dans le développement du SM. Le TNFα semble agir localement dans les adipocytes en stimulant la lipolyse, favorisant ainsi la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie, l'élévation

de la pression systolique et la dyslipidémie athérogène (Porter *et al*., 2002 ; Krauss, 2004). Le TNFα module également la production d'autres adipokines. Il augmente ainsi la production d'IL-6, de leptine, de résistine et diminue celle de l'adiponectine (Hutley et Prins, 2005).

La leptine est impliquée dans la régulation de la satiété et de la consommation d'énergie (Lau *et al*., 2005). Les niveaux de leptine augmentent au cours du développement de l'obésité. Outre son effet sur l'appétit et le métabolisme énergétique, la stimulation de l'hypothalamus par la leptine peut augmenter la pression du sang à travers l'activation du système nerveux sympathique (Carlyle *et al.*, 2002). À l'opposé de la leptine, l'adiponectine, dont les taux sanguins sont diminués chez l'obèse, a une action antidiabétique, antiathérogène et pourrait limiter le développement du SM. Elle sensibilise l'organisme à l'insuline, régule l'homéostasie glucidique et lipidique et exerce une action anti-inflammatoire et immunosuppressive sur le système immunitaire (Kadowaki *et al*., 2006). L'adiponectine réduit notamment la prolifération des lymphocytes B et T, la production de TNFα et d'IL-6 et induit la production de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 et l'IL-1RA (Jullien, 2008). D'autres adipokines interviennent dans la physiopathologie du SM. Par exemple, le retinol binding protein-4 (RBP4) dont le taux sérique augmente chez les individus obèses et les sujets atteints du diabète de type II, induit au travers différents mécanismes, une résistance à l'insuline dans les cellules musculaires et hépatiques (Yang *et al*., 2005). D'autre part, le plasminogen-activator inhibitor 1 (PAI-1), protéine régulatrice de la cascade de la coagulation, notamment produite par le tissu adipeux (Shimomura *et al.*, 1996), semble augmenter chez l'obèse favorisant ainsi l'état d'hypercoagulabilité, prédisposant à l'athérosclérose.

Les adipokines comme la visfatine, l'omentine, l'apeline ou la vaspine, sont potentiellement impliquées dans la physiopathologie du SM, mais leur rôle n'est pas encore clairement établi. Tous ces mécanismes conduisent à l'évolution du syndrome métabolique vers les complications cardiovasculaires.

2.5. Quelle prise en charge pour les patients souffrant du syndrome métabolique ?

La prise en charge du SM, idéalement préventive, repose en premier lieu sur des mesures hygiéno-diététiques (activité physique, alimentation équilibrée), éventuellement au sein de structures spécialisées. La prise en charge d'un patient présentant un syndrome métabolique

est notamment basé sur une perte de masse grasse abdominale (Battu, 2014). Une perte de poids modérée (5 à 10 % du poids initial) mais durable est recommandée en réduisant l'apport énergétique total, avec notamment une diminution des glucides (principalement ceux à index glycémique élevé) et en normalisant l'apport lipidique (Battu, 2014). En effet, cette perte de poids s'accompagne aussi d'une baisse du taux de triglycérides et du taux plasmatique de protéine C réactive, considérée comme un marqueur d'inflammation. Notons que sur le plan diététique, la réduction de l'apport lipidique au profit de l'apport glucidique aggrave le SM. La prévention du diabète de type II chez les sujets intolérants au glucose bénéficie beaucoup plus de l'association « exercice physique et réduction pondérale » que de la mise en œuvre d'une seule de ces mesures.

En plus des mesures hygéno-diététiques, certains patients atteints du syndrome métabolique nécessitent une thérapie médicamenteuse. Cette prise en charge clinique est difficile car aucun protocole de soin n'est reconnu pour prévenir ou améliorer le syndrome métabolique dans son ensemble. Néanmoins, quelques stratégies multifactorielles pourraient étoffer l'arsenal thérapeutique existant, essentiellement constitué de composés ciblant un facteur de risque spécifique. La figure 11 résume les traitements médicamenteux et leurs modes d'action thérapeutiques susceptibles d'être proposés pour réduire chacun des facteurs de risque.

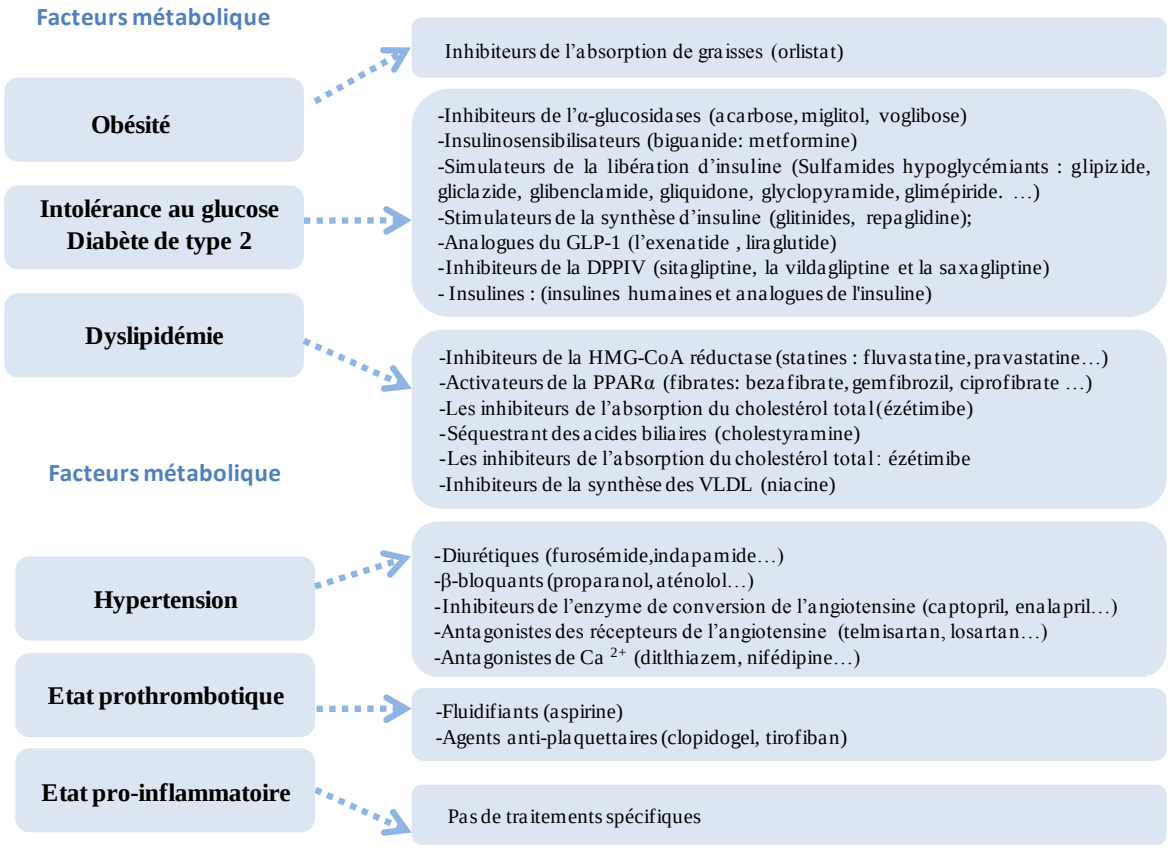


Figure 11: Composantes du syndrome métabolique, traitements médicamenteux pratiqués et mécanismes d'action (Junquero et Rival., 2006).

Pour la plupart des patients atteints du syndrome métabolique, les tentatives d'adhérer à un régime alimentaire et un mode de vie « sain » ne sont pas suffisants, conduisant à la chirurgie et/ou à un traitement médicamenteux. A ces deux mesures extrêmes pourrait s'ajouter une mesure intermédiaire : la consommation d'aliments fonctionnels qui pourraient aider à contrôler l'homéostasie énergétique. En plus de leur bonne image auprès du public, ces aliments, notamment d'origine marine, peuvent contenir des molécules bioactives naturelles. En effet, les ressources marines et, en particulier, les protéines marines ont un potentiel thérapeutique prometteur.

La teneur protéique brute moyenne dans les poissons crus varie entre 17 et 22% (p/p). Chez les crustacés et les mollusques ce taux est compris entre 7 et 23% (Harnedy et FitzGerald, 2012). Les hydrolysats et les peptides biologiquement actifs libérés à partir de ces protéines, que ce soit lors de la digestion ou pendant la transformation des aliments, peuvent avoir des influences cruciales sur la régulation et la modulation du métabolisme de l'être humain.

De nombreuses études ont montré que des peptides de poisson pouvaient avoir des effets bénéfiques sur de nombreuses maladies y compris l'hypertension artérielle, l'obésité, le diabète, le cancer, les maladies coronaires vasculaires, l'inflammation et les maladies immunologiques (Kristinsson et Rasco, 2000). Dans la partie qui suit, nous insisterons plus spécifiquement sur les cryptides marins évoqués dans la littérature comme potentiellement capables de cibler un ou plusieurs facteurs de risque associés au développement du SM.

3. Cryptides marins et syndrome métabolique

3.1. Cryptides marins et dyslipidémie

Les protéines alimentaires et leurs hydrolysats peuvent jouer un rôle dans la réduction des risques des maladies coronariennes en abaissant les taux de cholestérol et de triglycérides plasmatiques (Bakhit *et al*., 1994).

Wergedahl *et al*. (2004) ont comparé les effets hypocholestérolémiants des hydrolysats de protéines issues de co-produits du saumon de l'atlantique avec celles du soja et des caséines. Ces hydrolysats ont été testés chez les rats obèses Zucker (fa/fa). Ces travaux ont montré que le régime alimentaire supplémenté par les peptides du saumon donné pendant 22 jours aux rats Zuckers affectait de façon bénéfique la composition en acides gras plasmatiques et hépatiques ainsi que le taux des VLDL. De plus, ces auteurs ont montré que la concentration du cholestérol plasmatique des rats ayant reçu les peptides du saumon ou de soja dans leur alimentation était moins élevée que ceux traités avec des hydrolysats de caséine. Les hydrolysats protéiques de saumon diminueraient le taux de cholestérol plasmatique via la réduction de l'activité de l'Acyl-CoA Cholestérol Acyl Transférase (ACAT). Les hydrolysats de soja agiraient sur l'activité de l'ACAT et en stimulant l'excrétion fécale des acides biliaires.

Chez le rat, il a été montré que les protéines de poisson potentialisent l'effet hypolipidémiant des huiles de poisson. En effet, en combinaison, les protéines et les huiles de poisson abaissent sensiblement le taux de cholestérol total. Ceci serait dû principalement à l'augmentation de la concentration du cholestérol-HDL (Wergedahl *et al.*, 2009).

Récemment, Hosomi *et al*. (2012) ont eux aussi comparé les effets d'hydrolysats de protéines préparés à partir de filet de lieu d'Alaska et de caséine. Les expérimentations *in vivo* menées sur des rats mâles Wistar nourris avec les hydrolysats de poisson ont présenté des

concentrations plasmatiques de TG et de cholestérol-LDL ainsi qu'un taux de cholestérol hépatique inférieur à celui des rats nourris avec des hydrolysats de caséine. L'excrétion fécale du cholestérol était beaucoup plus importante chez le groupe traité avec l'hydrolysat de poisson. Ces données suggèrent que l'hydrolysat de lieu d'Alaska exercerait des effets sur les teneurs en lipides du plasma et du foie. Ces effets ont été, au moins partiellement, médiés par une altération de l'expression des gènes hépatiques impliqués dans l'homéostasie lipidique tels que celui codant pour le cholestérol 7-alpha hydroxylase (Hosomi *et al*., 2012).

Au cours d'autres travaux, des hydrolysats protéiques du muscle de la sardinelle (*Sardinella aurita*) élaborés en utilisant trois différentes préparations protéolytiques : extrait enzymatique endogène de sardinelle (SPHEE), préparations enzymatiques de *Bacillus mojavensis* A21 (SPHA21) et de *Bacillus pumilus* A1 (SPHA1) ont montré un effet hypolipidémiant chez les rats Wistar (Ben Khaled *et al.*, 2012). Dans cette étude, les rats ont été nourris avec une alimentation riche en cholestérol ce qui a provoqué une augmentation du cholestérol sanguin (67,8%) et de triglycérides (53%) par rapport au témoin. Le ratio LDL/HDL a également augmenté de manière significative par rapport à celui du témoin. L'administration des 3 types hydrolysats protéiques de sardinelle à une concentration de 5% (p/v), en concomitance avec l'alimentation riche en cholestérol a permis la correction : des taux de cholestérol total de 11 % (SPHA1), 20% (SPHA21) et 31% (SPHEE) et des taux des triglycérides de 22% (SPHA1), 32% (SPHA21) et 46% (SPHEE), comparé au groupe témoin. Une diminution significative du ratio LDL/HDL a été observée avec les 3 groupes traités avec les hydrolysats SPHEE, SPHA21 et SPHEE. Cette correction n'est pas si importante pour le groupe traité par les protéines de sardinelle non hydrolysées (Ben Khaled *et al.*, 2012).

Les hydrolysats de protéine de poisson ne sont pas la seule source de peptides bioactifs potentiellement capables de moduler le métabolisme lipidique. En effet, *Rhopilema esculentum*, une méduse largement consommée par les Chinois depuis plus de mille ans se révèle être riche en cryptides régulant le syndrome métabolique. Une étude récente a montré que l'administration orale de l'hydrolysat protéique de cette méduse riche en peptides (PM $\leq$ 2 kDa) pendant 30 jours engendrait une diminution du niveau du cholestérol total et des triglycérides et une augmentation significative de lipoprotéine de haute densité par rapport à des rats nourris avec un régime riche en graisse (Liu *et al*., 2012).

Les données publiées précédemment proposent des mécanismes d'action multiples et variés par lesquels les cryptides marins peuvent agir sur la distribution du profil lipidique. La

réduction du taux du cholestérol plasmatique et/ou hépatique, la diminution des TG et des LDL-C, l'élévation du HDL-C ou encore l'excrétion des acides biliaires figurent parmi ces mécanismes. La plupart de ces études ont été menées sur des modèles de rats et les études cliniques sur les humains sont limitées ou inexistantes. De plus, il est à noter que les concentrations plasmatiques optimales des peptides bioactifs conduisant à une activité biologique n'ont pas encore été déterminées.

3.2. Cryptides marins et diabète

Le diabète est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit. Sa prévalence augmente fortement et rapidement dans tous les pays. 347 millions de personnes sont diabétiques dans le monde (Danaei *et al*., 2011) et l'OMS prévoit qu'en 2030, le diabète sera la septième cause de décès dans le monde ("WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2010''). L'hyperglycémie est un effet courant du diabète. Elle provoque, avec le temps, de graves lésions affectant de nombreuses parties du corps, en particulier les nerfs et les vaisseaux sanguins (définition OMS).

Les maladies cardiovasculaires, le syndrome métabolique et le diabète de type II sont tous associés à une augmentation de la concentration des cytokines circulatoires produites à la suite de l'inflammation. Ces cytokines inflammatoires, sont produites par différents types de cellules et libérés dans la circulation sanguine, où elles régulent les différents tissus par leurs actions locales, centrales et périphériques. La meilleure stratégie permettant de réguler efficacement la réponse inflammatoire est encore un sujet à débats (Calle et Fernandez, 2012).

Dans le diabète de type I, le système immunitaire attaque les cellules productrices de l'insuline alors que dans le diabète de type II, le type le plus commun, les cellules deviennent résistantes à l'action de l'insuline et le pancréas est incapable de produire suffisamment d'insuline pour surmonter cette résistance. Cette résistance à l'insuline appelée couramment « insulinorésistance» est associée à une inflammation chronique et à la libération de la cytokine pro-inflammatoire tels que le TNFα (Shoelson *et al*., 2006).

Le diabète pourrait donc être assimilé à une maladie inflammatoire. Dans ce type de pathologie, le système de défense antioxydant est compromis, ce qui se traduit par une augmentation des marqueurs de stress oxydatif, et une diminution de la production d'enzymes

antioxydantes. L'utilisation de composés permettant de rétablir l'équilibre de la balance antioxydants/oxydants pourrait s'avérer bénéfique.

3.2.1. Cryptides marins et stress oxydatif

Les antioxydants dérivants de ressources naturelles, en particulier, ceux d'origine marine, peuvent avoir un effet protecteur contre le développement de maladies inflammatoires (D'Orazio *et al*., 2012). Plusieurs hypothèses sont proposées pour élucider le mécanisme exact par lequel les peptides exercent leur potentiel antioxydant. Des études ont montré que les hydrolysats de protéines et les peptides purs peuvent agir comme piégeurs de radicaux libres, chélateurs des métaux de transition, ou encore inhibiteurs de la peroxydation lipidique qui se produit chez les diabétiques (Sarmadi et Ismail, 2010). De plus, certains peptides allégeraient le stress oxydatif en activant des gènes spécifiques d'enzymes antioxydantes et de composants antioxydants non enzymatiques dans des modèles cellulaires *in vitro* (Erdmann *et al*., 2006).

Les peptides antioxydants d'origine marine sont bien documentés et il est à noter leur intégration dans de nombreux produits commercialisés pour des applications nutraceutiques, tels que : Stabilium 200, un autolysat de poisson de l'Atlantique (Compagnie Générale de Diététique-Yalacta F-14000 Caen, www.yalacta.com) et PROTIZEN®, un hydrolysat de poisson blanc de Copalis (F-62480 Le Portel www.copalis.fr). Ces deux produits revendiquant des effets relaxants. Fortidium Liquamen® est un autolysat de poisson blanc (Molva de molva) des laboratoires Duchange (F-14120 Mondeville, www.biothalassol.com) présentant des effets multiples, tels que la réduction du stress oxydatif, l'abaissement de l'index glycémique et un effet anti-stress.

Les produits et co-produits de pêche contiennent des peptides à activité antioxydante qui pourraient avoir un rôle dans la prévention des dommages oxydatifs liés au développement du SM (Ryan et *al.,* 2011 ; Najafian et Babji, 2012). D'autres peptides dérivés d'hydrolysats protéiques d'origine marine peuvent avoir des propriétés antidiabétiques et moduler le métabolisme lipidique en agissant sur la sensibilité à l'insuline et l'absorption du glucose.

3.2.2. Cryptides marins et modulation du métabolisme glucidique

Les propriétés antidiabétiques des cryptides ont récemment été mises en évidence. En effet, un certain nombre d'études ont montré que ces derniers pouvaient exercer leur potentiel

antidiabétique en modulant la sensibilité à l'insuline, en retardant l'absorption du glucose ou encore en favorisant le maintien de l'équilibre du glucose via la diminution de la dégradation des incrétines. Parmi les espèces de poissons concernées, la morue, le requin, la sardine et le saumon ont été étudiés.

3.2.2.1. Cryptides marins et modulation de la sensibilité à l'insuline

Plusieurs auteurs ont suggéré que les protéines de poisson, auraient un effet glucorégulateur. Lavigne *et al*. (2001) ont dans un premier temps démontré les effets bénéfiques de la protéine de morue sur la résistance à l'insuline chez des rats ainsi que sur la réponse glycémique et insulinémique. La conclusion de cette étude est qu'une ration riche en protéines de morue diminue l'insulinorésistance musculaire induite par l'obésité chez des rats. Cette action serait médiée par des acides aminés qui agiraient sur l'absorption du glucose stimulée par l'insuline dans les cellules musculaires squelettiques.

D'autres études ont exploré les mécanismes cellulaires à l'origine de cette augmentation de la sensibilité à l'insuline. Ils ont conclu que la protéine de morue restaurerait l'activité de la PI3-kinase/AKT dans le muscle squelettique et améliorerait la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 dans les tubules transverses du muscle des rats obèses nourris avec un régime riche en matières grasses (Tremblay *et al*., 2003).

Des études menées par des chercheurs de l'Université Laval sur l'effet de la consommation de protéines de morue chez 17 sujets humains obèses et résistants à l'insuline, mais non diabétiques, ont montré qu'un régime alimentaire riche en protéines de morue comparativement à d'autres protéines animales (bœuf, porc, œufs, volaille et produits laitiers), provoquait une augmentation de 30% de la sensibilité à l'insuline (Ouellet *et al*., 2007) et une diminution de 24% de la protéine C réactive, marqueur d'inflammation chez les sujets insulinorésistants (Ouellet *et al*., 2008).

Une autre équipe a évalué l'effet thérapeutique d'hydrolysats de protéines de peau de saumon sur un modèle de rat de diabète de type II (Zhu *et al.*, 2010c). Les dysfonctionnements des cellules β, qui caractérisent ce type de diabète ont été étudiés. Les résultats ont montré que les oligopeptides issus de peau de saumon pouvaient réduire de manière significative les niveaux de glycémie à jeun ainsi que l'apoptose des cellules β des îlots pancréatiques. Les auteurs ont suggéré que cet effet bénéfique était obtenu suite à une régulation du stress oxydatif et de l'inflammation liée au diabète de type II.

Une autre étude portant sur les effets thérapeutiques des peptides de collagène marin (MCP) a été menée par cette même équipe. Ces peptides obtenus à partir de la peau de poisson sauvage (hydrolysée par la pepsine, la chymotrypsine, la trypsine et la lipase pancréatique) ont été testés chez 100 patients chinois atteints de diabète de type II (Zhu *et al*., 2010a). Une réduction significative de la glycémie à jeun, de l'hémoglobine A1c glyquée humaine, de l'insuline à jeun dans le sang, accompagnée d'une augmentation des niveaux de l'indice de sensibilité à l'insuline a été observée chez les patients après un traitement d'une durée de 1,5 et 3 mois. En effet, il s'avère qu'un traitement à base d'hydrolysats de poisson favoriserait la régulation du métabolisme glucidique et lipidique chez les diabétiques (Zhu *et al*., 2010b) et chez les patients diabétiques et hypertendus (Zhu *et al*., 2010a)

Un peptide antidiabétique d'origine marine a été purifié et caractérisé en 2005 (Huang et Wu, 2005). Ce peptide purifié de 8200 Da, appelé S-8300, a été découvert dans un extrait de foie de requin. Après avoir rendu des souris diabétiques par administration de streptozocine, agent alkylant toxique ayant pour effet de détruire sélectivement les cellules β des îlots de Langerhan. Les souris ont été traitées au S-8300. Leurs taux de glucose, de cholestérol et de triglycérides sanguins ont alors diminué de façon significative, alors que les réserves hépatiques de glycogène ont augmenté (Huang et Wu, 2009). Ce peptide agirait vraisemblablement en inhibant la protéine Fas, contrôlant l'apoptose des cellules pancréatiques, et aurait donc un potentiel comme agent antidiabétique. Cependant, malgré sa stabilité à température élevée (95 °C, 30 min) et à pH entre 3 et 9, ce peptide s'avère être totalement inactivé par la protéinase K et par digestion à la trypsine, ce qui empêche son utilisation directe comme ingrédient fonctionnel (Huang et Wu, 2010).

En plus de ces études *in vivo* suggérant un effet bénéfique des hydrolysats et protéines marins sur la modulation du métabolisme glucidique quelques études *in vitro* et *in silico* ont proposé d'autres mécanismes pour le contrôle de la glycémie post-prandiale. Ces études suggèrent que les peptides notamment d'origine marine pouvaient constituer d'éventuels inhibiteurs d'enzymes intervenant dans la régulation de la glycémie post-prandiale telles que les enzymes digestives (α-glucosidases et α-amylases) ou encore la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV).

3.2.2.2. Cryptides marins et glycémie post-prandiale

- Cryptides et inhibition des enzymes digestives régulant la glycémie

Une première approche, pourrait consister à inhiber les enzymes digestives. L'objectif étant de diminuer et de retarder la dégradation des sucres et l'absorption du glucose afin de diminuer la glycémie post-prandiale.

Au cours de la digestion, les glucides absorbés sont dégradés par les α-amylases salivaires et pancréatiques en dissacharides puis par les α-glucosidases (maltase, lactase, saccharase ou invertase) en monosaccharides. Seuls les mono-saccharides peuvent franchir la barrière intestinale. Les inhibiteurs de ces enzymes clés peuvent donc empêcher la digestion des sucres. Ceux ci ne pouvant être absorbés, continuent leur périple dans l'intestin et subissent la fermentation colique bactérienne où ils sont convertis en acides gras volatiles ou sont éliminés dans les selles.

Quelques études ont rapporté l'effet inhibiteur de peptides issus de sources naturelles sur l'α-amylase (Yu *et al*., 2012) et l'α-glucosidase (Yu *et al*., 2011 ; Yu *et al*., 2012) et un nombre très limité de ces peptides sont issus de ressources marines. Matsui *et al*. (1999) présentent un travail concernant l'identification de peptides inhibiteurs de l'α-glucosidase provenant de l'hydrolysat de muscle de sardine, préparé par digestion avec la protéase alcaline de *Bacillus licheniformis*. Après purification par HPLC en phase inverse, deux peptides inhibiteurs de l'α-glucosidase ont été isolés : VW et YYPL. Les études d'inhibition du peptide YYPL et ses dérivés ont démontré que la longueur de la chaîne, ainsi que la présence d'acides aminés aromatiques hydrophobes à l'extrémité N-terminale et les acides aminés aliphatiques à l'extrémité C-terminale pouvaient avoir de l'importance pour développer une activité d'inhibition.

- Cryptides marins et inhibition de la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV)

La seconde approche utilisée dans le contrôle de l'hyperglycémie post-prandiale chez les diabétiques implique l'inhibition de la DPPIV. Les peptides inhibiteurs de la DPPIV de source alimentaire sont mieux documentés dans la littérature que ceux des enzymes digestives. La DPPIV est une serine protéase clivant préférentiellement les dipeptides Xaa-proline ou Xaa-alanine à partir de l'extrémité N-terminale de polypeptides, où Xaa représente un acide aminé quelconque à l'extrémité N-terminale. Cette enzyme multifonctionnelle est exprimée dans diverses cellules, et notamment dans le foie, le rein et l'intestin (Thoma *et al*.,

2003). La DPPIV est impliquée dans la dégradation de l'hormone glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et de l'hormone gastric inhibitory polypeptides (GIP). Ces hormones régulent la glycémie à jeun et post-prandiale, en stimulant la sécrétion de l'insuline et en diminuant la sécrétion du glucagon par les cellules α-pancréatiques pour faire diminuer la production de glucose par le foie (Addison et Aguilar, 2011).

Des séquences peptidiques inhibitrices de la DDPIV issues de différentes sources alimentaires ont été identifiées. La plupart des peptides sont issus de protéine du lait (Nongonierma et FitzGerald, 2014). Malgré la diversité structurale des protéines d'organismes marins, peu de travaux ont rapporté des peptides inhibiteurs de la DPPIV dérivés de ces ressources. Les séquences de ces peptides d'origine marine, leurs origines et leur potentiel inhibiteurs exprimé en valeur de CI 50 (concentration en peptides nécessaire pour inhiber 50 % l'activité de la DPPIV) sont récapitulés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Peptides inhibiteurs de la DPPIV identifiés dans les ressources marines.

Séquences	**Origine**	**CI 50 (µM)**	**Références**
GPAE	Gélatine de peau de saumon de l'atlantique)	49,6	(Li-Chan *et al*., 2012)
GPGE	Gélatine de peau de saumon de l'atlantique)	41,9	(Li-Chan *et al*., 2012)
PGVGGPLGPIGPCYE	Jus de cuisson thon	52,3	(Huang *et al*., 2012)
CAYQWQRPVDRIR	Jus de cuisson de thon	46,1	(Huang *et al*., 2012)
PACGGFWISGRPG	Jus de cuisson de thon	41,7	(Huang *et al*., 2012)

Récemment, une approche *in silico* a étudié le potentiel de diverses protéines alimentaires à contenir dans leur séquence des précurseurs inhibiteurs de la DPPIV (Lacroix et Li-Chan, 2012). Des séquences peptidiques proposées dans la littérature comme inhibiteurs de l'activité de la DPPIV ont été recherchées dans les protéines de différentes sources. Le potentiel de chaque protéine a été quantifié sur la base de la fréquence de ces fragments peptidiques par rapport à la longueur de la chaîne. Les auteurs ont montré que 4 protéines de viande bovine et 4 autres dérivées du saumon du Pacifique contenaient respectivement 685 et 499 fragments qui correspondaient à des tri et dipeptides préalablement identifiés comme ayant une activité

inhibitrice sur la DPPIV. Les protéines du collagène de la viande bovine et du saumon du pacifique semblent donc être des sources intéressantes en inhibiteurs potentiels de la DPPIV.

Le potentiel des hydrolysats protéiques de poisson à réguler le taux de glucose dans le sang a été étudié *in vivo* : un hydrolysat protéique de muscle de sardine a montré un effet bénéfique sur la tolérance au glucose chez les rats spontanément hypertensifs prédisposés aux accidents vasculaires cérébraux. L'effet observé serait lié à la présence de peptides inhibiteurs de l'ECA (Otani *et al.*, 2009). Cette dernière étude indique que les cryptides marins pourraient cibler plus d'une pathologie intervenant dans le développement du syndrome métabolique. D'autres études sur des actions synergiques et effets multifonctionnels de cryptides marins vont certainement confirmer leur potentiel contre le SM et les pathologies qui lui sont associés.

3.3. Cryptides marins et obésité

Autrefois considérée comme provenant d'un simple déséquilibre de la balance énergétique, l'obésité est désormais reconnue comme une maladie complexe d'origine multifactorielle, qui résulte d'une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux, psychologiques, sociaux et culturels. Les gènes impliqués dans la régulation de l'appétit et du poids corporel ont été identifiés, mais leur contribution dans le développement de l'obésité humaine semble être très modeste (moins de 5%) (Barceló-Batllori et Gomis, 2009). L'obésité implique de multiples dysfonctionnements métaboliques, notamment une dérégulation dans le métabolisme des lipides, la fonction des adipocytes, la thermogenèse ou l'apport énergétique (Barceló-Batllori et Gomis, 2009).

L'identification des cibles thérapeutiques potentielles passe de plus en plus souvent par l'utilisation d'une combinaison de plusieurs technologies, y compris la protéomique. D'importants progrès ont été réalisés dans la compréhension de l'intégration supérieure des signaux entre le tissu adipeux, les organes périphériques et le système nerveux central conduisant à la régulation de l'homéostasie énergétique. Ces travaux ont permis la synthèse de nombreuses molécules, potentiellement intéressantes pour lutter contre l'obésité (Barceló-Batllori et Gomis, 2009).

A ce jour, il n'existe pas de traitements médicamenteux à action centrale contre l'obésité sur le marché Européen à l'exception de l'orlistat (nom commercial : Xenical®). Ce produit, est actuellement le seul médicament anti-obésité autorisé en France. L'orlistat agit dans l'estomac

et dans l'intestin grêle en inhibant les enzymes gastro-intestinales (lipases gastro-intestinales). Il limite ainsi l'absorption des triglycérides alimentaires. Ces derniers sont ensuite éliminés par voie fécale.

Aux Etats-Unis, les seuls médicaments pouvant être utilisés pour traiter l'obésité sont des suppresseurs d'appétit sympathomimétiques. Cependant, ces traitements ne sont approuvés que pendant des durées inférieures à 3 mois. Il y a quelques années, la D-amphétamine et de la méthamphétamine ont été prescrits comme coupe-faim, mais leur mauvaise utilisation et le risque d'accoutumance ont conduit à limiter leur prescription et à leur classement en drogues contrôlées à usage restreint. D'autres médicaments ont été retirés du marché en raison de leurs effets secondaires. En effet, l'utilisation prolongée de certains produits tels que les dérivés de l'ergot, la phénylpropanolamine ou encore le benfluorex plus connu sous le nom de Mediator® a été liée à un développement d'hypertension artérielle pulmonaire et de valvulopathies cardiaques (Heal *et al*., 2012). Les effets indésirables de ces médicaments médiatisés jugés intolérables au regard de l'enjeu initial motive l'intérêt du public pour les molécules naturelles. Des produits nutraceutiques combinés à une bonne hygiène de vie pourraient favoriser la perte de poids.

Les principaux facteurs aggravants de l'obésité sont la consommation d'une alimentation riche en matières grasses, sucre et sel combinée à un mode de vie sédentaire. Ainsi, le premier moyen de lutte contre l'obésité reste bien évidemment la diminution de la prise alimentaire et l'augmentation des dépenses caloriques. Le maintien à long terme d'un poids corporel stable est régulé par plusieurs signaux endocriniens tels que l'insuline et la leptine. Cette régulation est couplée à des signaux à court terme qui sont directement liés à la prise alimentaire comme la cholécystokinine (CCK). La libération de la CCK par les cellules duodénales dans la lumière du tube digestif conduit à la stimulation de la motilité intestinale, la contraction de la vésicule biliaire, l'inhibition de la vidange gastrique, et la stimulation de la sécrétion pancréatique (Strader et Woods, 2005). Ainsi, la CCK contribue à contrôler la prise alimentaire et à réguler l'apport énergétique quotidien.

Pendant la digestion, les acides biliaires sont sécrétés par le foie à partir du cholestérol. Ils sont la principale composante de la bile. Il semble que l'apport hépatique en taurine et glycine affecte la conjugaison et la sécrétion des acides biliaires qui, à leur tour, peuvent interférer avec les récepteurs des hépatocytes. Par ailleurs, la perturbation ciblée du gène codant pour

ces récepteurs conduit à l'accumulation de graisse et à une augmentation du poids corporel (Maruyama *et al*., 2006). Ainsi, la perturbation de la sécrétion de l'acide biliaire est également une cible thérapeutique potentielle pour le développement de médicaments dédiés au traitement des maladies métaboliques humaines.

Il est aujourd'hui clairement établi que les signaux de satiété incluent les précurseurs d'acides aminés ou des neurotransmetteurs comme la sérotonine et les catécholamines (noradrénaline et dopamine). Le niveau des métabolites circulant (acides aminés, glucose…) et des hormones insuline….) ainsi que les signaux digestifs (distension, l'osmolarité et taux d'hormones gastro-intestinales telle que la CCK) modulent également la satiété.

3.3.1. Cryptides marins et régulation de la satiété

Quelques études ont démontré que les hydrolysats protéiques dérivés de ressources marines peuvent avoir une incidence sur la satiété.

En 1991, Uhe *et al*. (1992) ont comparé la métabolisation de trois sources de protéines (bifteck maigre, poitrine de poulet sans peau, et requin (*Mustelus antarcticus*) chez six sujets masculins maigres. Les résultats ont montré que les protéines de poisson procuraient une sensation de satiété plus importante que celle de bœuf ou de poulet. Selon ces auteurs, ceci pouvait être dû à leur digestion plus lente, à leur influence sur la sécrétion des hormones digestives ou encore à la différence en taux de tryptophane post-prandial (Uhe *et al*., 1992).

En effet, le pic post-prandial d'acides aminés observé après l'ingestion de protéine de poisson est plus tardif que celui qui suit l'ingestion de protéines de viande, suggérant une digestion plus lente. De plus, une augmentation plus importante de taux plasmatiques d'acides aminés soufrés (taurine et méthionine) a été observée mais elle est restée sans signification biologique bien établie. Cependant, d'autres signaux putatifs de la satiété (insuline, taux de glucose) n'étaient pas significativement différents selon la consommation des trois types de protéines étudiés.

Une autre étude a décrit l'effet de l'hydrolysat de protéines d'une espèce de requin appelée l'émissole lisse (*Mustelus mustelus*), dans la régulation de la prise alimentaire (Ali Bougatef, 2010). Dans ces travaux, l'hydrolysat de protéines a été produit par des protéases digestives intestinales de la même espèce. L'analyse des acides aminés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a montré que l'hydrolysat était riche en leucine, alanine, glycine, thréonine, sérine, lysine et acide glutamique. Le poids moléculaire

des peptides a été estimé entre 200 et 2500 Da et leur potentiel à diminuer le poids corporel et réduire la prise alimentaire *in vivo* a été évalué sur des modèles de rats Wistar. Les chercheurs ont observé qu'au bout de 21 jours de gavage quotidien avec 10 mg/ml d'hydrolysat, le gain de poids corporel ainsi que la prise alimentaire chez les rats traités avaient significativement diminué par rapport aux rats du groupe contrôle (Ali Bougatef, 2010). L'effet satietogène observé n'a pas été significativement corrélé au taux de l'insuline ni avec la concentration de CCK dans le plasma des rats nourris avec l'hydrolysat. Cet effet a été probablement induit par l'intermédiaire d'autres hormones. Toutefois, la réduction de la prise alimentaire par les neuropeptides anorexigènes est l'un des mécanismes possibles par lesquels cet hydrolysat de poisson a pu agir.

Le développement de tests *in vitro* pour la recherche de peptides capables d'augmenter la sécrétion de CCK s'appuie sur des similitudes entre les cellules sécrétant les CCK humaines et la lignée cellulaire entéroendocrine STC-1. Les peptides activateurs de la sécrétion de CCK pourraient être liés à la suppression de l'appétit.
Il a été rapporté que l'hydrolysat protéique du muscle de merlan bleu (*Micromesistius poutassou*) et des têtes de crevettes brunes (*Penaeus aztecus*) stimulaient, de façon significative les cellules STC-1 qui sécrètent les hormones de satiété GLP1 (glucagon-like peptide 1) et CCK (Cudennec *et al*., 2008). Par exemple, après une incubation de 2 heures avec une concentration de 1% p/v d'hydrolysat de crevettes, les cellules STC-1 étaient capables de libérer 160,7 pM de CCK tandis qu'un traitement par l'hydrolysat d'albumine d'œuf, utilisé comme contrôle positif, libérait seulement 67,6 pM de CCK.

L'hydrolysat de merlan bleu a également entraîné la sécrétion d'une grande quantité de CCK. La purification partielle de cet hydrolysat a permis de connaître les masses moléculaires des fractions estimées à moins de 1500 Da. Les résultats obtenus *in vitro* sur la lignée cellulaire STC-1 ont été confirmés par des expériences *in vivo* sur des rats. En effet, Cudennec *et al*. (2012) ont montré que les hydrolysats produits à partir du muscle de merlan bleu possèdent un effet rassasiant chez le rat. Un tel hydrolysat était non seulement capable d'augmenter la sécrétion par les cellules STC-1 de CCK et du GLP-1, mais également de réduire à court terme la prise alimentaire des rats. Ce résultat a été corrélé avec une augmentation des taux de CCK et GLP-1 plasmatiques. En outre, il a été démontré que l'administration chronique de cet hydrolysat a conduit à une diminution du poids corporel (Cudennec *et al.*, 2012).

À notre connaissance, aucune séquence de peptides capables de stimuler la sécrétion de CCK et donc présentant un effet satiétogène n'a été caractérisée, mais ces cryptides marins impliqués dans l'apparition de cet effet semblent être de petite taille.

3.3.2. Cryptides marins et régulation de la sécrétion des acides biliaires

La bile est composée principalement d'acides biliaires, de cholestérol et de phospholipides. Elle est produite par le foie et stockée dans la vésicule biliaire. En réponse à l'ingestion d'aliments, la CCK est sécrétée par les cellules entéro-endocrines dans le duodénum. Elle déclenche la contraction de la vésicule biliaire et la libération de la bile dans l'intestin grêle et facilite l'absorption des nutriments lipophiles (Choi *et al.*, 2006).

Une alimentation riche en taurine et glycine pourrait affecter le métabolisme des acides biliaires. En effet, les acides biliaires sont conjugués avec la glycine et la taurine après leur synthèse ce qui induit l'augmentation de leur solubilité et l'augmentation de la sécrétion biliaire. Liaset et Espe. (2008) ont testé différents hydrolysats issus de plusieurs sources de protéines alimentaires et ont évalué comment ces derniers pouvaient affecter le métabolisme des acides biliaires chez les jeunes rats. Parmi les hydrolysats testés, l'hydrolysat protéique de lieu noir riche en taurine et en glycine a été choisi (Liaset et Espe, 2008). Les résultats ont montré que les rats nourris avec un régime contenant l'hydrolysat de lieu noir avaient des concentrations d'acides biliaires plasmatiques à jeun nettement plus élevées que les rats nourris avec des hydrolysats de soja ou de caséine. Les auteurs ont également constaté une diminution des lipides hépatiques et des taux de TG plasmatique à jeun. La masse viscérale du tissu adipeux a également été réduite. Ainsi, la supplémentation alimentaire en hydrolysat protéique de poisson pourrait conduire à la diminution du tissu adipeux chez les rats.

À notre connaissance, aucune étude n'a été entreprise jusqu'à ce jour sur des sujets humains pour démontrer si la consommation des hydrolysats protéiques de poisson pouvaient aider à diminuer le tissu adipeux.

Les études que nous venons de citer indiquent que les cryptides marins sont capables de contrôler le poids corporel en agissant essentiellement sur la sécrétion d'hormones satiétogène (GPL-1 et CCK) ou encore en augmentant la sécrétion d'acides biliaires.
Une meilleure élucidation des facteurs qui contrôlent l'appétit augmenterait le nombre de cibles potentielles à travers lesquelles les cryptides marins pourraient agir afin de contrôler la prise de poids. En ce qui concerne les acides biliaires et leur rôle, il a été montré que ces

derniers peuvent activer un récepteur couplé à la protéine G appelé TGR5, qui est exprimé au niveau du tissu adipeux brun et des muscles (Kawamata *et al.*, 2003). L'activation de TGR5 déclenche une augmentation de la dépense énergétique et pourrait atténuer l'obésité induite par un excès d'apport calorique (Watanabe *et al*., 2006). Dans des modèles de souris obèses, l'activation de TGR5 conduit à l'augmentation de la dépense d'énergie et améliore la sensibilité à l'insuline (Thomas *et al*., 2009). Plus récemment, il a été montré que le récepteur TGR5 était fortement exprimé dans la vésicule biliaire, où il stimule son remplissage avec de la bile (Li *et al*., 2011). Le récepteur TGR5 semble être une cible thérapeutique intéressante pour traiter l'obésité et le diabète de type II, mais aucune étude portant sur des cryptides marins pouvant agir sur ce type de récepteur n'a été menée jusqu'à présent.

En matière de régulation de la prise alimentaire, la ghréline représente l'un des acteurs clés : elle déclenche la faim, provoquant la prise de nourriture. Ce peptide de 28 acides aminés est un peptide orexigenique circulant, sécrété principalement par des cellules spécifiques de l'estomac. La ghréline n'agit pas seulement comme un signal de la faim, mais aussi en tant que signal d'adiposité. En effet, il a été montré que la ghréline stimule l'adipogenèse et favorise le stockage de l'énergie sous forme de graisse. La ghréline régule également la fréquence des repas (Depoortere, 2009). En outre, la ghréline a des effets directs sur les composants du système de récompense et augmente la sensation de plaisir liée à l'apport alimentaire. Interférer avec la cascade de signalisation de la ghréline et plus particulièrement en produisant des antagonistes sélectifs de ses récepteurs pourrait traiter les troubles de poids. Des molécules neutralisant la ghréline ou étant antagoniste de cette hormone font l'objet de nombreuses études précliniques (Depoortere, 2009). Cependant, un traitement par les antagonistes de la ghréline semble produire des effets secondaires sur l'humeur et la mémoire.
A ce jour, aucune étude rapportant l'utilisation de cryptides comme antagonistes de la ghréline n'a été publiée, mais il se pourrait que les cryptides marins représentent une alternative à ces antagonistes et soient sans effets secondaires et bien tolérés

3.3.3. Cryptides marins et cycle de vie des adipocytes

Le contrôle du développement excessif du tissu adipeux constitue un élément clé dans la lutte contre l'obésité. La gêne esthétique liée à l'obésité a conduit au développement de nombreux suppléments alimentaires et autres produits à application locale. Ces produits contiennent principalement de la caféine ou des polyphénols. Par exemple, la crème Bliss Fatgirlslim® contenant de la caféine encapsulée (www.sephora.com/fatgirlslim) et la crème Celludestock®

des laboratoires Vichy (www.vichy.fr F-93588 Saint Ouen) contiennent 5% de caféine. Un complément alimentaire à base de polyphénols d'agrumes appelé Sinetrol® est également commercialisé pour son puissant effet lipolytique médiée par l'inhibition de l'AMPc-phosphodiestérase (Dallas *et al*., 2008).

Le tissu adipeux peut être aussi une cible pour les cryptides marins. Des études antérieures menées au sein de notre laboratoire ont montré que les cryptides inhibant l'ECA issus de l'hydrolyse des protéines du lactosérum pouvaient réduire le nombre de pré-adipocytes en culture. Un léger effet lipolytique a également été observé (Hammé *et al*., 2010). Etant donné que l'effet antihypertensif des cryptides marins est largement rapporté, il est probable que des peptides inhibiteurs de l'ECA pourraient présenter un potentiel intéressant pour réduire le développement excessif du tissu adipeux. Des cryptides capables de réduire l'hypertrophie des adipocytes et/ou pouvant exercer une action antiproliférative sont recherchés activement. Leur découverte pourrait conduire à une alternative intéressante aux molécules phytochimiques comme la caféine et les polyphénols déjà intégrés dans la formulation des produits cosmétiques visant la diminution de la masse grasse corporelle et du poids.

3.4. Cryptides marins et hypertension

L'hypertension artérielle (HTA), est la principale cause de maladies cardiovasculaires. C'est également la maladie chronique humaine la plus fréquente à travers le monde (Wolf-Maier *et al*., 2003). Plusieurs facteurs ont été associés au développement d'une HTA résistante, dont quatre sont essentiels : l'âge, le diabète, la maladie rénale chronique et l'altération structurale vasculaire (Seidowsky *et al*., 2014). La pression artérielle est déterminée par le débit cardiaque et la résistance vasculaire périphérique. Elle est principalement régulée par le système nerveux sympathique (SNS) et le système rénine-angiotensine (SRA). Etant donnée la complexité du système de régulation de la pression artérielle, les peptides antihypertensifs peuvent agir à différents niveaux et avoir plusieurs sites d'interactions potentiels.

Néanmoins, les peptides antihypertensifs en général et ceux dérivés de ressources marines en particulier sont principalement identifiés et étudiés pour leur effet inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), enzyme clé intervenant dans la synthèse de l'angiotensine II, effecteur actif du SRA. Un grand nombre de peptides inhibiteurs de l'ECA ont été isolés à partir d'hydrolysats de poissons et d'autres organismes marins (Kim et Wijesekara, 2010). L'activité de ces peptides est généralement exprimée en valeur de CI 50,

qui est la concentration de l'inhibiteur nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de l'ECA. Par exemple, plusieurs peptides ayant des valeurs de CI 50 allant de 2,6 à 51 µM ont été isolés à partir d'hydrolysats de protéines de co-produits de poisson, de mollusques et de crustacés (Byun et Kim, 2001 ; Hai-Lun *et al*., 2006 ; Tsai *et al.*, 2008). L'activité *in vitro* de ces peptides est comparable à celle de deux puissants peptides antihypertensifs dérivés du lait, VPP et IPP, présents dans les boissons fonctionnelles antihypertensives: Evolus et AmealS disponibles dans le commerce (Harnedy et FitzGerald, 2012).

Pour avoir une activité physiologique, un peptide doit résister à la dégradation et la modification dans les systèmes gastro-intestinaux et vasculaires, afin d'atteindre sa cible sous une forme active. De ce fait, les études *in vivo* complètent indiscutablement l'évaluation de l'effet antihypertenseur d'un peptide (Harnedy et FitzGerald 2012). Les propriétés structurelles spécifiques des peptides inhibiteurs de l'ECA jouent un rôle très important. La plupart de ces peptides sont à chaîne courte allant de deux à neuf acides aminés. Il a été montré que les di et tripeptides, en particulier ceux portant une proline C-terminale ou des résidus d'hydroxyproline, sont généralement résistants à la dégradation par les enzymes digestives et de bons inhibiteurs de l'ECA (Matsufuji *et al*., 1994 ; Vermeirssen *et al.*, 2004).

Le tableau 4 rassemble la plupart des di et tripeptides identifiés comme inhibiteurs de l'ECA issus d'organismes marins (vertébrés et invertébrés).

Tableau 4 : Di et tripetides inhibiteurs de l'ECA d'origine marine.

Source	Séquence	Enzyme/espèce	CI 50 (µM)	Références
Vertébrés				
Sardine				
muscle	MF	Alcalase	44,7	(Matsufuji *et al*., 1994)
	RY	Alcalase	51	(Matsufuji *et al*., 1994)
	MY	Alcalase	193	(Matsufuji *et al*., 1994)
	LY	Alcalase	38,5	(Matsufuji *et al*., 1994)
	YL	Alcalase	82	(Matsufuji *et al*., 1994)
	IY	Alcalase	10,5	(Matsufuji *et al*., 1994)
	VF	Alcalase	43,7	(Matsufuji *et al*., 1994)
	GRP	Alcalase	20	(Matsufuji *et al*., 1994)
	RFH	Alcalase	330	(Matsufuji *et al*., 1994)
	AKK	Alcalase	3,13	(Matsufuji *et al*., 1994)
	RVY	Alcalase	205,6	(Matsufuji *et al*., 1994)
	KW	Alcalase	1,63	(Matsufuji *et al*., 1994)
	VY	Alcalase	10	(Matsufuji *et al*., 1994)
Sauce fermentée de sardine	AP		29	(Ichimura *et al*., 2003)
	GP		360	(Ichimura *et al*., 2003)
	TP		290	(Ichimura *et al*., 2003)
	VP		570	(Ichimura *et al*., 2003)
	DP		2300	(Ichimura *et al*., 2003)
	NM		600	(Ichimura *et al*., 2003)
	NL		2000	(Ichimura *et al*., 2003)
	AV		ND	(Ichimura *et al*., 2003)
	GV		ND	(Ichimura *et al*., 2003)
Saumon				
	WA	Themolysine	277,3	(Ono *et al*., 2003)
	VW	Themolysine	2,5	(Ono *et al*., 2003)
	WM	Themolysine	96,6	(Ono *et al*., 2003)
	MW	Themolysine	9,9	(Ono *et al*., 2003)
	IW	Themolysine	4,7	(Ono *et al*., 2003)
	LW	Themolysine	17,4	(Ono *et al*., 2003)
	FL	Themolysine	13,6	(Ono *et al*., 2006)
	LF	Themolysine	382,2	(Ono *et al*., 2006)
Peau	AP	Alcalase	0,060*	(Gu *et al*., 2011)
	RQR	Alcalase	ND	(Gu *et al*., 2011)
	VR	Alcalase	0,332*	(Gu *et al*., 2011)
	LN	Alcalase	ND	(Gu *et al*., 2011)
Sauce fermentée	GW		35	((kainuma *et al*., 1995)
	IW		1,8	(kainuma *et al*., 1995)
	VW		2	(kainuma *et al*., 1995)

Anchois				
Sauce d'anchois fermentée	AP		29	(Ichimura *et al*., 2003)
	KP		22	(Ichimura *et al*., 2003)
	RP		21	(Ichimura *et al*., 2003)
	GP		360	(Ichimura *et al*., 2003)
	QP		1200	(Ichimura *et al*., 2003)
	TP		290	(Ichimura *et al*., 2003)
	VP		570	(Ichimura *et al*., 2003)
	GI		1300	(Ichimura *et al*., 2003)
	NF		360	(Ichimura *et al*., 2003)
Bonite				
bonite séchée	FQP	Thermolysine	21	(Yokoyama *et al*., 1992)
	LKP	Thermolysine	36	(Fujita et Yoshikawa, 1999)
	IY	Thermolysine	12	(Fujita et Yoshikawa, 1999)
	IWH	Thermolysine	0,32	(Fujita et Yoshikawa, 1999)
	IKP	Thermolysine	2,31	(Fujita et Yoshikawa, 1999)
Sauce de bonite fermentée	AP		29	(Ichimura *et al.*, 2003)
	RP		28	(Ichimura *et al*., 2003)
	GP		360	(Ichimura *et al*., 2003)
	AGP		560	(Ichimura *et al*., 2003)
Dorade				
Ecailles	GY	Alcalase	265	(Fahmi *et al*., 2004)
	GF		708	(Fahmi *et al*., 2004)
	VY		16	(Fahmi *et al*., 2004)
	VIY		7,5	(Fahmi *et al*., 2004)
Colin				
Peau	GPL	Alcalase+pronase+ collagenae	2,65	(Byun et Kim, 2001)
	GPM	Alcalase+pronase+ collagenase	17,13	(Byun et Kim, 2001)
Requin				
Muscle	CF	Protease SM605	1,96	(Wu *et al*., 2008)
	EW		2,68	(Wu *et al*., 2008)
	FE		1,45	(Wu *et al*., 2008)
Invertébrés				
Wakame				
	VY	Protease S	32,2	(Sato *et al*., 2002)
	IY	Protease S	6,1	(Sato *et al*., 2002)
	AW	Protease S	18,8	(Sato *et al*., 2002)
	FY	Protease S	42,3	(Sato *et al*., 2002)
	VW	Protease S	3,3	(Sato *et al*., 2002)
	IW	Protease S	1,5	(Sato *et al*., 2002)
	LW	Protease S	23,6	(Sato *et al*., 2002)

Huitre Muscle de (*Pinctada fucata martencii)*	FY AW VW GW	Alcalase Alcalase Alcalase Alcalase	14 9,5 1,1 44	(Katano *et al*., 2003) (Katano *et al*., 2003) (Katano *et al*., 2003) (Katano *et al*., 2003)
Palourde Palourde commune d'orient (*Meretrix lusoria*)	YN VRK	Protamex Protamex	51 700	(Tsai *et al*., 2008) (Tsai *et al*., 2008)
Crevette *(Plesionika izumiae Omori)* *(Acetes chinensis)*	VW AFL	Protease S Protease SM98011	6,6	(Nii *et al*., 2008) (Hai-Lun *et al*., 2006)

* IC50 en mg/ml, ND : non déterminé

L'analyse de ce tableau montre que les peptides à chaîne courte, composés de deux ou trois acides aminés, sont ubiquitaires. Ils seraient, de plus, absorbés plus rapidement que les acides aminés libres (Erdmann *et al.*, 2006). Une étude menée par Fujita et Yoshikawa (1999) a isolé le peptide LKPNM, après hydrolyse par la thermolysine d'un aliment traditionnel japonais à base de bonite séchée «Katsuo –bushi». L'hydrolyse du LKPNM en LKP sous l'action de l'ECA a conduit à l'augmentation de 8 fois son pouvoir inhibiteur. De plus, LKP a montré presque le même potentiel antihypertensif *in vivo* que celui du captopril, agent thérapeutique, après administration unique par voie orale chez les rats spontanément hypertensifs (SHR) (Fujita et Yoshikawa, 1999). Une étude clinique à petite échelle, a confirmé l'activité antihypertensive de cet hydrolysat chez les sujets hypertendus et hypertendus borderline (Fujita *et al*., 2001).

Cet hydrolysat appelé " Katsuo -bushi oligopeptides " a été officiellement approuvé comme aliments à usage médicinal spécifique (Foods for Specified Health Use: FOSHU) par le Ministère de la Santé et du bien-être au Japon (Fujita *et al*., 2001). De nombreuses études *in vivo* chez les SHR ainsi que chez des volontaires humains hypertendus ont démontré que plusieurs peptides inhibiteurs de l'ECA dérivés de ressources marines réduisent de manière significative la pression artérielle, que ce soit après administration par voie intraveineuse ou par voie orale (Kim et Wijesekara, 2010). Par conséquent, les peptides inhibiteurs de l'ECA pourraient être employés comme traitement initial chez les sujets modérément hypertendus ou comme traitement d'appoint. Toutefois, en raison de la protection incomplète fournie par les inhibiteurs de l'ECA, les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA-II) ou sartans ont été élaborés et la combinaison d'inhibiteurs de la rénine et inhibiteurs de l'ECA/ARA a

récemment émergé comme une stratégie intéressante pour le traitement de l'hypertension artérielle. Les peptides synthétiques et des composés peptidomimétiques précédemment mis au point pour inhiber efficacement l'activité de la rénine *in vitro* ont permis de réduire la pression artérielle chez les humains et chez les animaux (Harnedy et FitzGerald 2012). Cependant, ces composés ne peuvent être administrés que par voie intraveineuse.

À notre connaissance, il semble que l'inhibition de l'activité de la rénine par les hydrolysats protéiques et peptides d'origine marine ne soit pas encore démontrée. Il a été rapporté que les hydrolysats protéiques de graine de lin et les dipeptides: IR, KF et EF, isolés à partir d'hydrolysat de protéines de pois pouvaient inhiber l'activité de la rénine et de l'ECA *in vitro* (Li et Aluko, 2010). Par conséquent, l'exploitation de peptides issus de ressources marines qui inhiberaient à la fois la rénine et l'ECA pourrait être très intéressante. Ces cryptides seraient des agents antihypertenseurs naturels dotés d'une double action.

Les ccryptides peuvent réguler la pression artérielle par des mécanismes autres que l'inhibition de l'ECA. En effet, il a été rapporté que la libération de substances vasodilatatrices comme la prostaglandine I2, l'oxyde nitrique (NO) ou l'oxyde de carbone (CO) sous l'action de divers peptides inhibiteurs de l'ECA pourraient également contribuer à la diminution de la pression artérielle (Erdmann *et al.*, 2008). En outre, l'inhibition des enzymes impliquées dans la cascade de génération de l'angiotensine II telles que la chymase, les cathepsines A, D et G, pourrait fournir un effet antihypertenseur supplémentaire. Ainsi, l'identification de peptides dérivés de protéines marines qui soient potentiellement capables d'exercer un effet inhibiteur sur l'activité de ces enzymes pourrait être considérée comme une nouvelle approche pour la régulation de la pression artérielle et des troubles du métabolisme qui lui sont associés.

Les cryptides marins présentent un grand potentiel d'utilisation comme ingrédients fonctionnels en raison de leur efficacité dans la prévention et le traitement de l'hypertension. Le coût attractif et l'image favorable en tant que produit naturel, ajouté à leurs effets bénéfiques sur la santé peuvent être des atouts de taille leur permettant d'intégrer de nombreux futurs produits. Leurs bienfaits sur la santé humaine doivent encore être confirmés par des études cliniques.

3.5. Autres actions des cryptides marins associées aux anomalies du syndrome métabolique

3.5.1. Cryptides marins et action anti-plaquettaire et anti-coagulante

La réduction de risque de maladie cardiovasculaire passe par l'emploi de molécules à activité anticoagulante et antiplaquettaire. Plusieurs cryptides possédant une activité anticoagulante ont été isolés à partir d'organismes marins tels que les vers marins (Jo *et al*., 2008), l'étoile de mer (Koyama *et al*., 1998), la moule bleue (Jung et Kim, 2009), la palourde (Jung *et al.*, 2002), et la sole (Rajapakse *et al*., 2005). L'activité anticoagulante de ces peptides a été déterminée par la mesure du temps de céphaline activée (TCA), le temps de prothrombine (TP) ou encore le temps de thrombine (TT). L'activité obtenue a été comparée avec celle obtenue avec l'héparine, l'anticoagulant commercial de référence.

Un cryptide anticoagulant d'une taille de 12 kDa a été purifié à partir d'un hydrolysat protéique de sole jaune (Rajapakse *et al*., 2005). Ce cryptide se fixe sur le facteur XII en formant un complexe inactif. Il présente, de plus, une activité anti-plaquettaire en inhibant les intégrines αIIbα3 (GPIIb-IIIa), complexe glycoprotéiné de membrane plaquettaire. Cependant, aucun travail n'a été effectué pour évaluer *in vivo* l'efficacité de ce peptide. Jung *et al*. (2007) ont caractérisé un polypeptide anticoagulant de 7,7 kDa appelé « TGAP » issu de protéine du bivalves sud-coréen « *Tegillarca granosa* ». Ce polypeptide de faible cytotoxicité *in vitro* sur cellules endothéliales, a inhibé spécifiquement le facteur de coagulation du sang Va, ainsi que l'interaction moléculaire entre les facteurs IIa et Va de manière dose dépendante (CI 50=77,9 nM), conduisant à une prolongation du TP.

Par conséquent, les cryptides libérés par hydrolyse enzymatique à partir de produits de la mer pourraient être dotés de propriétés anticoagulantes qu'ils exerceraient par des mécanismes d'action multiples. Toutefois, les applications à l'homme restent hypothétiques et des études cliniques sont maintenant nécessaires pour confirmer ces résultats avant que l'utilisation en santé de ces peptides ne soit autorisée.

3.5.2. Cryptides marins et action sur la fixation du calcium

L'apport de calcium est particulièrement crucial chez l'homme et se fait essentiellement au travers l'alimentation. En plus de la réduction du risque d'ostéoporose, plusieurs études épidémiologiques suggèrent que le calcium affecte la perte de poids. Cependant, le calcium n'est pas une solution miracle dans la lutte contre l'obésité, même si il peut jouer un rôle comme décrit précédemment par Schrager (2005) et Zemel (2005).

Plusieurs peptides améliorant la fixation du calcium ont été isolés et caractérisés à partir des hydrolysats d'arêtes issues du filetage industriel de hoki (*Johnius de belengerii*) (Jung *et al*., 2005). Les auteurs ont suggéré qu'une fraction concentrée d'un hydrolysat d'arêtes pourrait être utilisée comme nutraceutique conduisant ainsi à renforcer la biodisponibilité du calcium ingéré.

Un peptide de plus faible poids moléculaire présentant une grande affinité pour le calcium a été isolé d'hydrolysat d'arêtes de « *Theragra chalcogramma* ». Ce peptide, de séquence Val-Leu-Ser-Gly-Gly-Thr-Thr-Met-Ala-Tyr-Met-Thr-Leu-Val (MW: 1442 Da), présente une forte affinité pour l'ion calcium (Jung *et al*., 2005). Dans cette étude, les tests *in vitro* de fixation du calcium ont permis de démontrer que ce peptide pouvait solubiliser une quantité de calcium similaire à celle des phosphopeptides de caséine. L'utilisation de ces hydrolysats de poissons comme produit nutraceutique pour augmenter la minéralisation osseuse pourrait être développée pour réduire le risque d'ostéoporose en particulier pour les personnes souffrant d'intolérance au lactose (Jung *et al*., 2005).

En considérant le fait que les hydrolysats protéiques d'origine marine pourraient améliorer la fixation du calcium, il est probable que des études démontreront dans un avenir proche l'utilité d'inclure les protéines de poisson dans les programmes diététiques destinés à la perte de poids.

4. Biodisponibilité des cryptides marins

Les cryptides ne peuvent exercer leurs activités biologiques potentielles que s'ils sont capables d'atteindre intacts leurs sites d'action. La dégradation par les enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine, chymotrypsine, élastase, carboxypeptidase…), les enzymes présentes au niveau des bordures en brosse ou encore au niveau du cytoplasme enterocytaire et les protéases présentes dans le système circulatoire constituent une première barrière à franchir.

La faible perméabilité des membranes biologiques sensibles à la taille des cryptides, l'instabilité, l'agrégation et l'absorption sont parmi les facteurs qui affectent également la biodisponibilité de ces molécules (Lu *et al*., 2006). Les peptides qui échappent à l'hydrolyse par les enzymes protéolytiques sont capables d'exercer un effet soit localement dans le tube digestif, soit au niveau périphérique après leur passage dans la circulation sanguine.

Afin de prédire si un cryptide va résister à la digestion gastro-intestinale, une simulation *in vitro* des conditions gastro-intestinales de protéolyse est souvent réalisée en utilisant des enzymes tels que : la pepsine, trypsine, α-chymotrypsine, pancréatine ou la préparation enzymatique corolase PP. De nombreux cryptides ont donc été identifiés comme résistants à la digestion gastro-intestinale (Tsai *et al*., 2008 ; Sheih *et al*., 2009). En général, ceux de petite taille (≤ à 6 aa) et plus spécifiquement les di et tripeptides sont plus facilement absorbés que les acides aminés et les protéines et traversent la bordure en brosse des entérocytes (Vermeirssen *et al*., 2004). Le transport des peptides de la membrane apicale des entérocytes jusqu'à la circulation sanguine se fait principalement par 3 voies :

-Transport via le transporteur spécifique PEPT1
-Transport par tanscytose
-Transport par diffusion paracellulaire

Concernant le transport spécifique via le transporteur PEPT1, les di et tripeptides traversent la membrane apicale des entérocytes par l'intermédiaire d'un co-transport H^+/peptide lié au transporteur PEPT1 (figure 12).

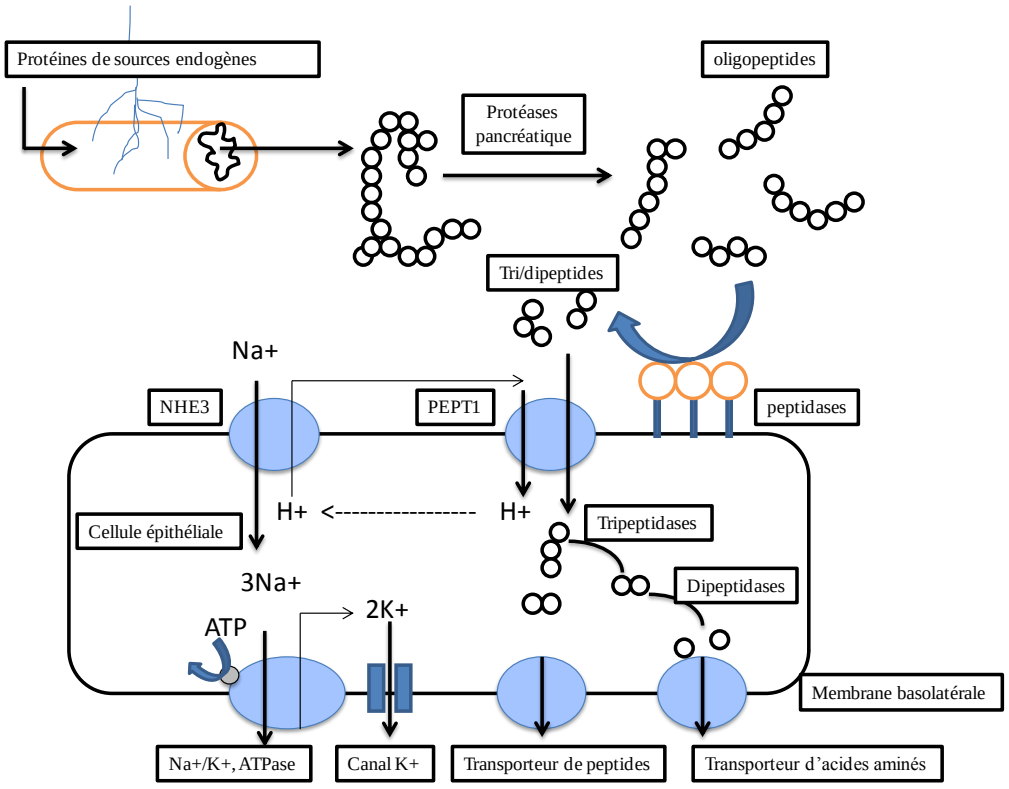


Figure 12 : Absorption intestinale des di et tripeptides au niveau du transporteur PEPT1 (Daniel, 2004).

Un gradient électrochimique de protons apporte l'énergie nécessaire pour entrer dans la cellule intestinale (Daniel et Kottra, 2004). La plupart des peptides entrant dans l'entérocyte sont hydrolysés par les peptidases cytosoliques avant d'être libérés dans la circulation sanguine sous forme d'acides aminés libres. Les peptides qui résistent à l'hydrolyse intracellulaire peuvent être transportés intacts à travers la membrane basolatérale des entérocytes et atteindre la circulation sanguine. Les peptides peuvent également être absorbés par transcytose au niveau de la bordure en brosse des entérocytes, et d'exocytose au niveau de la membrane basolatérale. L'internalisation par endocytose des peptides de la lumière intestinale s'effectue par invagination de la membrane plasmique et formation de vésicules intracellulaires. Cependant ces peptides, peuvent être hydrolysés en acides aminés au sein de ces résidus. En général ce sont les peptides hydrophobes et basiques qui sont transportés par cette voie (Young et Mine, 2009).

La voie paracellulaire, voie de passage entre les cellules, peut également être utilisée lors de l'absorption des oligopeptides intacts (Pappenheimer *et al*., 1994).

Chez l'homme, la possibilité d'une absorption de peptides intacts à travers l'épithélium a été étudiée par quelques travaux (Prockop *et al*., 1962 ; Adibi et Morse, 1971 ; Park *et al*., 2005). Une étude portant sur le peptide VY dérivé du muscle de la sardine, a montré que ce peptide traverse intact l'épithélium intestinal et se retrouve dans le plasma après 2h d'administration orale chez des sujets humains normotensifs. Cette étude a aussi montré que son absorption est dose dépendante (Matsui *et al*., 2002a, 2002b).
La taille, la composition et la position des acides aminés dans la chaîne peptidique influencent fortement la résistance à la dégradation et donc la capacité du peptide à atteindre sa cible et exercer son effet.

En général, les peptides contenant la proline ou l'hydroxyproline sont plus résistants à une hydrolyse par les enzymes digestives (FitzGerald et Meisel, 2000). Ainsi, plusieurs peptides présentant ces acides aminés dans leur séquence ont été retrouvés dans le sang de sujets humains après ingestion de gélatine de poisson (Ohara *et al*., 2007). Ces travaux ont montré que les tripeptides Ala-Hyp-Gly et Ser-Hyp-Gly ont été présents dans le plasma 4 h après leur administration (Ohara *et al*., 2007). Ceci indique que ces peptides riches en proline et hydroxyproline étaient non seulement résistants à la digestion gastro-intestinale mais pouvaient aussi échapper aux enzymes protéolytiques présentes dans le système circulatoire.

La modification des peptides par alkylation, glycosylation ou encore la protection des extrémités N- et C-terminales telles que la N-acétylation et la C-amidation pourrait, si nécessaire augmenter la stabilité des peptides en empêchant leur dégradation enzymatique (Witt et Davis, 2006). Chen *et al*. (2003) ont rapporté que la modification de l'extrémité N-terminale du peptide Leu-Arg-Pro, issu de l'autolysat de l'intestin de bonite augmentait sa stabilité et son absorption chez les rats spontanément hypertendus (SHR). La cyclisation de ce même peptide a permis également de prolonger sa demi-vie (Chen *et al*., 2003).

L'encapsulation des peptides dans des micro ou nanoparticules pourrait les protéger de la digestion par les enzymes protéolytiques, leur faciliter le passage à travers la membrane intestinale et contrôler leur libération au niveau de leur site d'action. Par exemple l'encapsulation d'oligopeptides dérivés d'un hydrolysat protéique de thon a montré une réduction de la tension artérielle et a prolongé l'effet antihypertensif chez les rats spontanément hypertensifs (SHR) par rapport aux oligopeptides non encapsulés (Hwang *et al*., 2010).

5. Position du sujet

La revue de littérature présentée dans cette première partie montre qu'un faisceau de résultats expérimentaux réalisés *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux et sujets humains soutiennent le potentiel prometteur des cryptides marins dans la lutte contre le syndrome métabolique. Les hydrolysats protéiques et cryptides marins pourraient réguler la dyslipidémie notamment en diminuant la concentration plasmatique et hépatique du cholestérol. Ils pourraient atténuer l'hyperglycémie et prévenir l'insulinorésistance en augmentant la sensibilité à l'insuline et en régulant la glycémie post-prandiale. En outre, ils moduleraient l'hypertension artérielle en inhibant l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et contrôleraient le poids corporel via une action satiétogène et une augmentation des taux d'acides biliaires. De plus, les cryptides marins peuvent présenter des activités antioxydantes, anti-agrégation ou des propriétés de fixation du calcium.

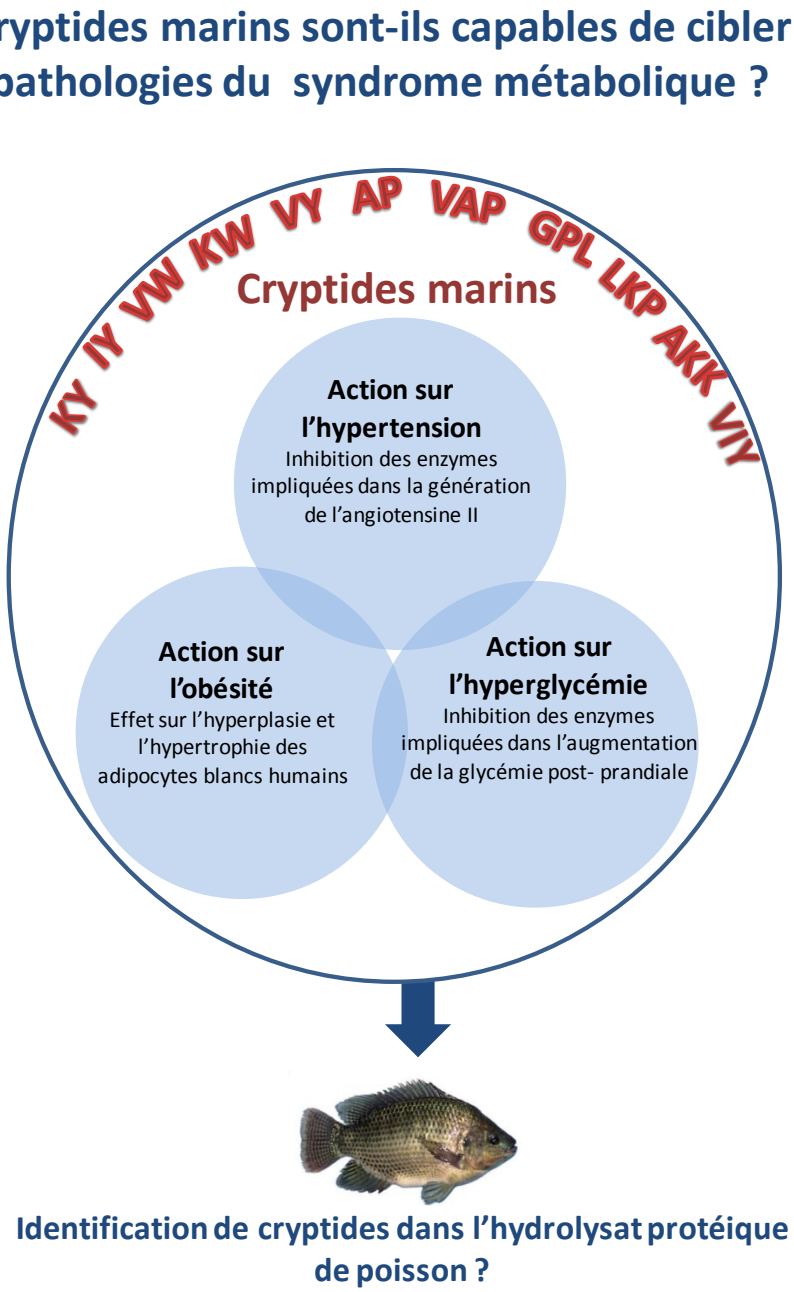
Compte tenu des liens métaboliques qui existent entre les différentes anomalies du syndrome métabolique, les agents nutraceutiques tels que les cryptides pourraient cibler plusieurs facteurs de risque associés au développement de ces anomalies en offrant ainsi des moyens simples à mettre en œuvre pour la prévention du syndrome métabolique et ses conséquences pour la santé humaine.

En s'appuyant sur cette hypothèse, nous nous sommes intéressés à l'action de 11 cryptides marins, précédemment identifiés comme inhibiteurs de l'ECA et issus de produits et co-produits marins, sur différentes cibles intervenants dans la régulation du syndrome métabolique. Cette étude a été entreprise dans le but d'évaluer leurs activités biologiques multifonctionnelles. Puis nous avons cherché à retrouver ces séquences dans un hydrolysat protéique modèle.

Les 11 cryptides marins : Val-Tyr (VY), Val-Trp (VW), Lys-Trp (KW), Lys-Tyr (KY), Ile-Tyr (IY), Leu-Lys-Pro (LKP), Ala-Lys-Lys (AKK), Val-Ile-Tyr (VIY), Gly-Pro-Leu (GPL), Val-Ala-Pro (VAP) et Ala-Pro (AP) ont été choisis dans notre étude car ils sont courts (des di et tripetides), identifiés comme de puissants inhibiteurs de l'ECA (Leurs valeurs de CI 50 étaient parmi les plus faibles des cryptides marins précédemment rapportées dans la littérature) et ubiquitaires. Par exemple VY a été identifié dans les hydrolysats protéiques d'origine marine (muscle de sardine, écailles de dorade, wakame) ou encore d'hydrolysat de protéine non marine (boisson fermenté à base de riz).

Un tableau, présenté *cf* en annexe 1 page 183 présente les cryptides choisis dans notre étude identifiés dans différentes ressources marines et non marines ainsi que leurs activités antihypertensives évaluées *in vitro* et *in vivo*.

Notre démarche pourrait s'illustrer par le diagramme ci-dessous.



Chapitre II : Matériels & méthodes

1. Matériels

1.1.Matériels biologiques

1.1.1. Enzymes

Les différentes enzymes utilisées dans les tests d'inhibition d'activité des enzymes impliquées dans l'hypertension et le diabète de type II sont listées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Enzymes utilisées lors de l'étude.

Enzymes	**N° de classification**	**Origine**	**Réference**	**Fournisseur**
Enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA)	EC.3.4.15.1	Extraite de poumon du lapin	A6778	Sigma-Aldrich
Cathepsine G	EC.3.4.21.20	Extraite de Leukocytes humains	C4428	Sigma-Aldrich
Chymase	EC. 3.4.21.39	Enzyme humaine recombinante exprimée dans *Pichia Pastroris*	C8118	Sigma-Aldrich
α-Glucosidase	EC.3.2.1.20	Enzyme recombinante de *Saccharomyces Cerevisiae*	G0660	Sigma-Aldrich
α-amylase pancréatique	EC.3.2.1.1	Extraite du pancréas du porc	A3176	Sigma-Aldrich
Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV)	D7052	du rein de porc	D7052	Sigma-Aldrich

1.1.2. Lignée cellulaire

La lignée cellulaire utilisée est la lignée cryopréservée de pré-adipocytes blancs humains sous-cutanés (HWP : Human White Pre-adipocytes subcutaneous) (figure 13) fournie par la société PromoCell (Heidelberg, Allemagne). Les cellules sont obtenues après liposuccions abdominales chez des femmes caucasiennes ayant une moyenne d'âge de 62 ans.

Figure 13: Observation microscopique (grossissement x 100) de pré-adipocytes blancs humains sous-cutanés (HWP).

1.1.3. Milieux de culture et suppléments

Pour la culture des cellules adipocytaires humaines, trois milieux de cultures différents ont été utilisés : un milieu de croissance, un milieu de différenciation et un milieu de maturation. Ces milieux (prêts à l'usage) ont été fournis par la société Promocell (Heidelberg, Allemagne). Chaque milieu a été supplémenté par une solution complément de la même société au moment de son utilisation (tableau 6).

Tableau 6 : Les suppléments et leurs concentrations finales (après addition dans les milieux de culture de base).

Suppléments	Milieu de croissance	Milieu de différenciation	Milieu de nutrition
Sérum de veau foetal	0.005 ml/ml	-	0.03 ml/ml
Facteur de croissance endothéliale	0.004 ml/ml	-	-
Facteur de croissance épidermique (recombinant humain)	10 ng/ml	-	-
Hydrocortisone	1 µg/ml	-	-
d-Biotine	-	8 µg/ml	8 µg/ml
Insuline (recombinante humaine)	-	0.5 µg/ml	0.5 µg/ml
Dexamethasone	-	400 ng/ml	400 ng/ml
3-Isobutyl-1-methylxanthine	-	44 µg/ml	-
L-Thyroxine	-	9 ng/ml	-
Ciglitazone	-	3 µg/ml	-
Heparine	90 µg/ml	-	-

Antibiotiques : Une solution de Pénicilline/ Streptomycine 10 000 U/ml (Pan Biotech GmbH) a été ajoutée aux milieux de culture à raison de 1% (v/v) au moment de l'utilisation des milieux.

1.1.4. Espèce utilisée pour la réalisation de l'hydrolysat protéique : Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*)

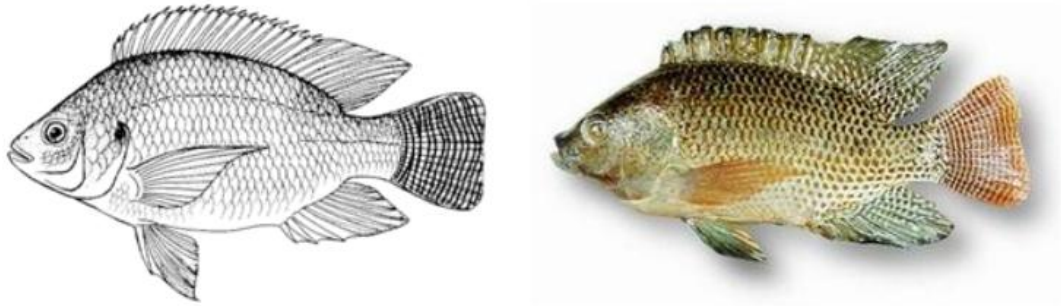


Figure 14: Images de Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*).

Le Tilapia du Nil (figure 14) est un poisson exotique omnivore appartenant à la famille des *Cichlidae.*

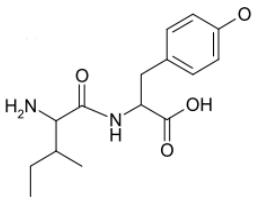
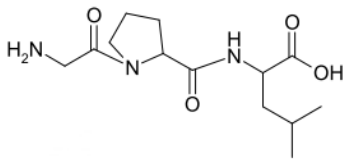
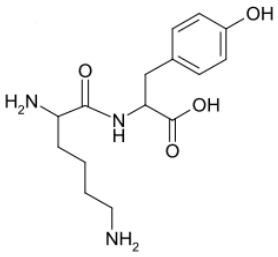
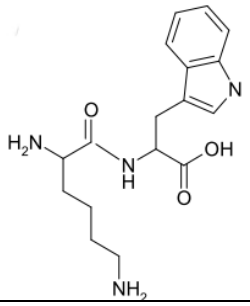
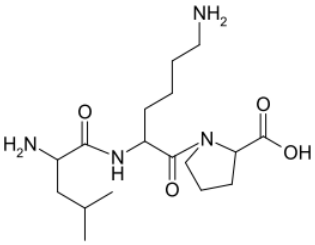
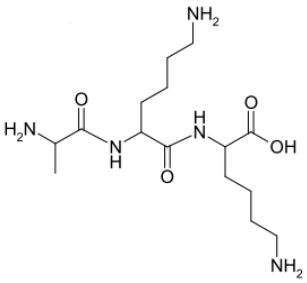
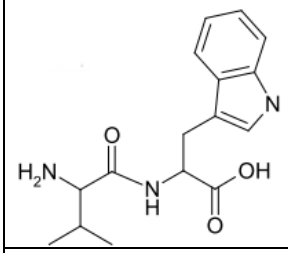
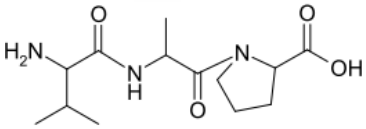
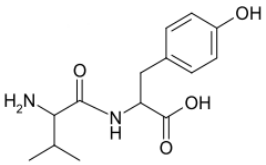
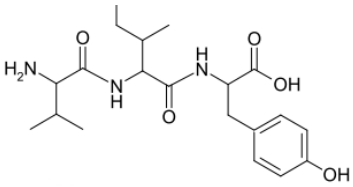
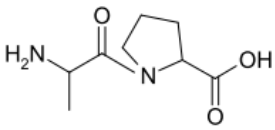
L'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia nous a été gracieusement donné par le Docteur Ortencia Da Silva Nunes de l'Université d'Etat de l'ouest du Parana, Campus de Toledo, Brésil. Brièvement, l'hydrolyse des résidus de filet de Tilapia du Nil a été réalisée sous l'action de l'alcalase à 60°C pendant 1 heure à pH 8. Puis la réaction a été arrêtée par élévation de température à 90°C pour inactiver l'enzyme. Le produit a été filtré et séché par atomisation.

1.2.Réactifs chimiques

1.2.1. Peptides synthétiques

Les 11 cryptides marins précédemment identifiés comme des inhibiteurs de l'ECA et qui font l'objet de cette étude ont été soit synthétisés au sein de notre laboratoire ou fourni par les sociétés Altergen (France) ou GeneCust (Dudelange, Luxembourg) et leur pureté est supérieure à 90 %. Leurs structures, formules chimiques et masses moléculaires sont répertoriées dans le tableau 7.

Tableau 7: Séquences des peptides synthétiques, structures chimiques, formules brutes et masses moléculaires.

IY $C_{15}H_{22}N_2O_4$ MM=294,17 g/mol 	GPL $C_{13}H_{23}N_3O_4$ MM= 285,18 g/mol 	KY $C_{15}H_{23}N_3O_4$ MM= 309,18 g/mol 
KW $C_{15}H_{24}N_4O_3$ MM=308,19 g/mol 	LKP $C_{17}H_{32}N_4O_4$ MM= 356,25 g/mol 	AKK $C_{15}H_{31}N_5O_4$ MM=345,24 g/mol 
VW $C_{16}H_{18}N_2O_4$ MM= 302,13 g/mol 	VAP $C_{13}H_{23}N_3O_4$ MM= 285,18 g/mol 	VY $C_{14}H_{20}N_2O_4$ MM=280,15 g/mol 
VIY $C_{20}H_{31}N_3O_5$ MM=293,23 g/ml 	AP $C_8H_{14}N_2O_3$ MM=186,11 g/mol 	

1.2.2. Inhibiteurs de références et substrats

Les différents réactifs (substrats et inhibiteurs de référence) utilisés dans l'évaluation de l'inhibition des activités des enzymes citées dans la partie (I.1.1) sont récapitulés dans le tableau 8.

Tableau 8: Substrats et inhibiteurs de références utilisés dans l'évaluation de l'inhibition des activités des enzymes.

Nom	Référence	Formule brute	Masse Molaire (g/mol)	Fournisseurs
Substrats				
·[3-(2-Furyl)acryloyl]-Phe-Gly-Gly (FAPGG)	F7131	$C_{20}H_{21}N_3O_6$	399.40	Sigma-aldrich
·Hippuryl-His-Leu hydrate (HHL)	H1635	$C_{21}H_{27}N_5O_9$	429,47	Sigma-aldrich
ngiotensine I (acetate salt)	A9650	$C_{62}H_{89}N_{17}O_{14}$	1296.48	Sigma-aldrich
4-Nitrophenyl α-D-glucopyranoside	N1377	$C_{12}H_{15}NO_8$	301.25	Sigma-aldrich
Gly-L-Pro-p-nitroanilide hydrochloride	G0513	$C_{13}H_{16}N_4O_4$	328.75	Sigma-aldrich
Amidon soluble	S9765	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.30	Sigma-aldrich
Les inhibiteurs				
Captopril	C4042	$C_9H_{15}NO_3S$	217.29	Sigma-aldrich
Miglitol	M1574	$C_8H_{17}NO_5$	207.22	Sigma-aldrich
Losartan	61188	$C_{22}H_{22}ClKN_6O$	461.00	Fluka
Chymostatine*	C7268	$C_{31}H_{41}O_6N_7$	607.7	Sigma-aldrich

*Masse moléculaire de la chymostatine A

2. Evaluation de l'inhibition des activités enzymatiques

Le potentiel des peptides à inhiber des enzymes impliquées dans la génération de l'angiotensine II et des enzymes impliquées dans la régulation de la glycémie a été évalué selon les protocoles décrits ci-dessous.

2.1. Inhibition des enzymes impliquées dans la régulation de l'hypertension artérielle

2.1.1. Mesure de l'inhibition de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en utilisant 3 types de substrats

Une étude comparative du pouvoir inhibiteur de 11 cryptides marins déterminé par 3 méthodes a été entreprise. Le pouvoir inhibiteur est exprimé en CI 50. Les valeurs de CI 50, définies comme étant la concentration en inhibiteur nécessaire pour réduire soit l'aire du pic de produit soit l'activité de l'enzyme de 50%, ont été déterminées et comparées. Le captopril a été choisi comme inhibiteur de référence (contrôle positif) et le losartan comme contrôle négatif.

2.1.1.1. Mesure de l'inhibition de l'activité de l'ECA en utilisant le FAPGG comme substrat

Le Z-furanacryloyl-L-phenylalanylglycylglycine (FAPGG) est hydrolysé sous l'action de l'enzyme de conversion de l'angiotensine en furanacryloyl L-phenylalanine (FAP) et GlycylGlycine (GG). La dégradation du FAPGG est suivie spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 340 nm (figure 15).

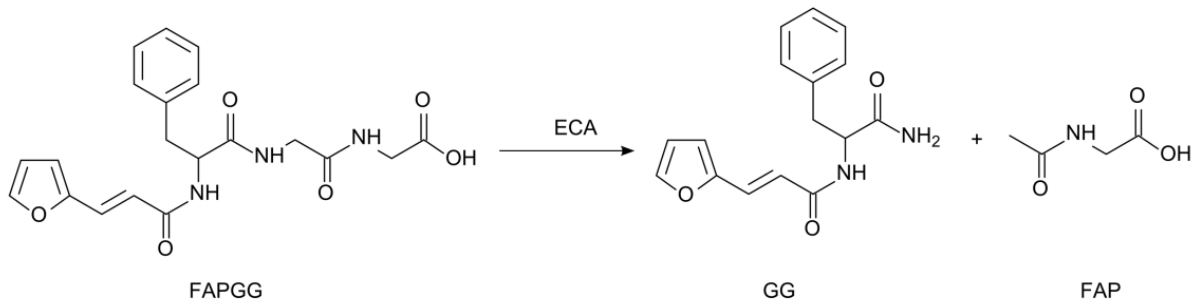


Figure 15 : Dégradation du FAPGG par l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Libération du FAP et GG.

Le test a été réalisé en microplaque 96 puits selon la méthode décrite par Cushman *et al.* (1977) avec des modifications : 150 µl de FAPGG (0,87 mM) dans du tampon 50 mM Tris HCl contenant 300 mM NaCl, pH 7 ont été mélangés avec 10 µl de ce même tampon et 10 µl de la solution d'inhibiteur (captopril, losartan ou cryptides). Le mélange a été incubé à 37°C pendant 5 min. La réaction a été initiée par l'addition de 10 µL d'ECA (127,5 mU/ml). La plaque a été agitée 20 s avant la première lecture, et la dégradation du FAPGG a été suivie à 340 nm pendant 5 min avec le spectrophotomètre Max Molecular Devices Versa. Le pourcentage d'inhibition de l'ECA a été calculé selon l'équation suivante :

$$\%\ \text{d'inhibition} = [1 - \frac{(\text{pente test})}{(\text{pente contrôle})}] * 100$$

Equation 1 : Calcul du pourcentage d'inhibition de l'ECA par la méthode utilisant le FAPGG.

Où «pente test» et «pente contrôle» sont les pentes des courbes de dégradation du FAPGG en fonction du temps des réactions avec l'inhibiteur ou contrôle.

2.1.1.2. Mesure de l'inhibition de l'activité de l'ECA en utilisant le HHL comme substrat

Cette méthode de Cushman et Cheung (1971) est la plus ancienne et la plus utilisée pour le dosage de l'activité de l'ECA. Elle est basée sur l'utilisation du peptide His-Leu couplé à l'acide hippurique, le HHL (Hippuryl-L-Histidyl-L-Leucine), substrat synthétique de l'ECA. L'hydrolyse du HHL par l'enzyme de conversion de l'angiotensine libère de l'acide hippurique (AH) et un dipeptide l'Histidyl-Leucine selon la réaction présentée dans la figure 16.

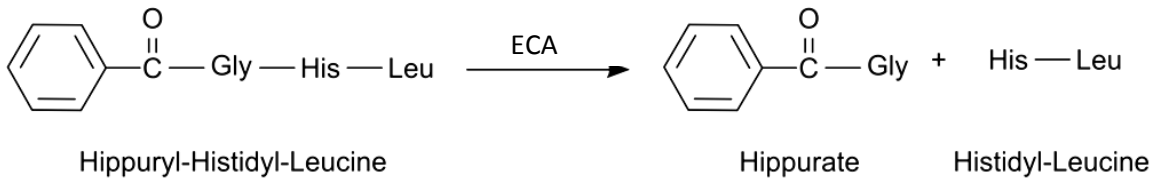


Figure 16 : Dégradation de l'Hippuryl-Histidyl-Leucine (HHL) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine et libération du dipeptide Histidyl-Leucine et de l'acide hippurique (AH).

L'absorbance à la longueur d'onde d'absorption maximale de l'acide hippurique, soit 228 nm, permet de suivre la production de HA. Le test a été réalisé en microplaque selon la méthode précédemment décrite par Wu *et al*. (2002) avec des modifications : 30 µl d'ECA (60 mU/ ml) dans 50 mM de tampon borate, contenant 300 mM NaCl, pH 8,3 ont été mélangés avec 20 µl du même tampon et incubés pendant 5 min à 37 °C.

10 µl de la solution d'inhibiteur (captopril, losartan, ou cryptides) à différentes concentrations (0.001-2000 µM) ont été ajoutés, et la réaction a été initiée par l'addition de 50 µl de HHL (5 mM) préalablement solubilisé dans le même tampon. Après une incubation de 30 min à 37°C, la réaction a été stoppée par ajout de 100 µl d'HCL (1M).

La séparation et la quantification de l'HA a été réalisé par HPLC analytique (Waters, Milford, États-Unis) sur une colonne C18 (Kinetex 2,6 µm, 100 mm × 4,6 mm Phenomenex (Le Pecq, France). L'élution a été conduite en mode isocratique : eau ultra-pure+0,1% acide trifluoroacétique (TFA) et acétonitrile + 0,1% TFA avec un débit de 0,5 ml/min pendant 6 min. Un écart de 5 min était respecté entre deux injections. Les temps de rétention du HHL et du HA étaient respectivement de 2,27 et de 1,57 min. L'inhibition de l'ECA (en pourcentage) a été calculée selon l'équation 2 :

$$\%\ \text{d}'\text{inhibition} = [1 - \frac{(\text{A test})}{(\text{A contrôle})}] * 100$$

Equation 2 : Calcul du pourcentage d'inhibition de l'ECA par la méthode HHL.

Où A test et A contrôle sont respectivement, les aires du pic du HA dans l'échantillon test (avec l'inhibiteur) et l'échantillon contrôle (tampon au lieu de l'inhibiteur).

2.2.1.3. Mesure de l'inhibition de l'activité d'ECA en utilisant l'angiotensine I comme substrat

L'angiotensine I (Ang I) est le substrat naturel de l'enzyme de conversion de l'angiotensine qui le dégrade en angiotensine II (Ang II) par clivage du dipeptide His-Leu en C-terminal (figure 17).

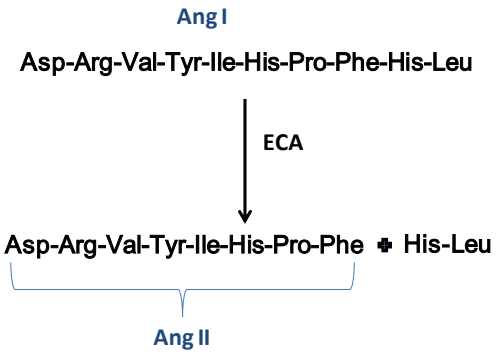


Figure 17 : Dégradation de l'angiotensine I en angiotensine II par l'ECA.

Le test a été réalisé en microplaque 96 puits. 20 µl de tampon borate de sodium 50 mM, contenant 300 mM de NaCl, à pH 8,3 ont été pré-incubés à 37°C pendant 5 min. Par la suite, 30 µl d'ECA (127,5 mU/ml) dans le même tampon d'essai, 10 µl de la solution d'inhibiteur (captopril, losartan, ou peptide) à différentes concentrations (0.001-2000 µM) et 20 µl de l'angiotensine I (5 mM) ont été ajoutés séquentiellement afin d'initier la réaction. La microplaque a été incubée à 37°C pendant 30 min.

La réaction a été arrêtée par addition de 100 µl de HCl 1M. L'angiotensine II libérée par l'action de l'ECA a été quantifiée par HPLC sur le système décrit précédemment pour le test HHL. Un gradient d'acétonitrile contenant 0,1% de TFA de 25 à 50% en 7 min, suivi par 1 min. à 50% puis retour à 25% en 2 min a été utilisé. Les temps de rétention sont de 1,68 et 2,45 min pour l'angiotensine I et l'angiotensine II, respectivement. Les aires des pics ont permis de quantifier l'angiotensine II.

Le pourcentage d'inhibition de l'ECA a été calculé selon l'équation 3:

$$\%\ \text{d'inhibition} = [1 - \frac{(\text{A test})}{(\text{A contrôle})}] * 100$$

Equation 3 : Calcul du pourcentage d'inhibition de l'ECA utilisant l'angiotensine I comme substrat.

Où A test et A contrôle sont respectivement les aires du pic de l'angiotensine II dans l'échantillon test (avec l'inhibiteur) et l'échantillon contrôle (tampon au lieu de l'inhibiteur).

2.1.2. Mesure de l'inhibition de l'activité de la cathepsine G

La cathepsine G est capable de générer de l'angiotensine II (Ang II) par clivage du dipeptide en C-terminal His-Leu de l'angiotensine I (Ang I). La chymostatine, un puissant inhibiteur de la cathepsine G a été utilisée comme référence.

Le test a été réalisé en microplaque selon la méthode précédemment décrite par Klickstein *et al*. (1982) avec des modifications : 20 µl de cathepsine G (60 mU/ml) dans 10 mM de tampon Tris-HCL, NaCl 150 mM, pH 7,4 ont été mélangés avec 40 µl du même tampon et 10 µl de la solution d'inhibiteur (Chymostatin, ou cryptides) à différentes concentrations (0.001-2000 µM) et incubé pendant 5 min à 37 °C. La réaction a été initiée avec l'addition de 30 µl d'Ang I (0,66 mM). Après une incubation de 30 min à 37°C, la réaction a été stoppée par ajout de 100 µl de HCL (1 M). La quantification de l'Ang II formée été réalisée selon la méthode décrite dans la partie 2.1.1 (Mesure de l'inhibition de l'activité d'ECA en utilisant l'angiotensine I comme substrat). La quantification de l'Ang II formée ainsi que le pourcentage d'inhibition de l'ECA a été calculé selon l'équation 3.

2.1.3. Mesure de l'inhibition de l'activité de la chymase

La chymase est capable de générer de l'Ang II par clivage du dipeptide C-terminal His-Leu de l'Ang I. La chymostatine, un puissant inhibiteur de la chymase a été utilisé comme référence. Le test a été réalisé en microplaque selon la méthode précédemment décrite par Li *et al*. (2004) avec des modifications : 5 µl de chymase (185,2 mU /ml) dans 20 mM de tampon Tris HCL, NaCl 150 mM, pH 7,8 ont été mélangés avec 40 µl du même tampon et 10 µl de la solution d'inhibiteur (chymostatine, ou peptide) à différentes concentrations (0,001-2000 µM) et incubés pendant 5 min à 37 ° C. La réaction a été initiée avec l'addition de 20 µl d'Ang I (0,5 mM). Après une incubation de 30 min à 37°C, la réaction a été stoppée par ajout de 50 µl de HCL (1 M). La quantification de l'Ang II formée été réalisée selon la méthode décrite dans la partie 2.1.1 (Mesure de l'inhibition de l'activité d'ECA en utilisant l'angiotensine I comme substrat). Le pourcentage d'inhibition de l'ECA a été calculé selon l'équation 3.

2.2.Inhibition des enzymes impliquées dans la régulation de la glycémie

2.2.1. Inhibition de l'activité de l'α-glucosidase

Le test d'inhibition de l'activité de l'α-glucosidase a été réalisé en mesurant par spectrophotométrie à 410 nm la formation du produit p-nitro phenol (PNP) de couleur jaune à partir du substrat synthétique : le p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside (PNPG) (figure 18). Le test a été réalisé en microplaque. La diminution de l'absorbance à 410 nm par rapport aux puits contrôles (sans inhibiteur) témoignait d'une inhibition de l'enzyme. L'acarbose, le miglitol et le voglibose, inhibiteurs synthétiques commerciaux, ont été utilisés comme références (contrôles positifs).

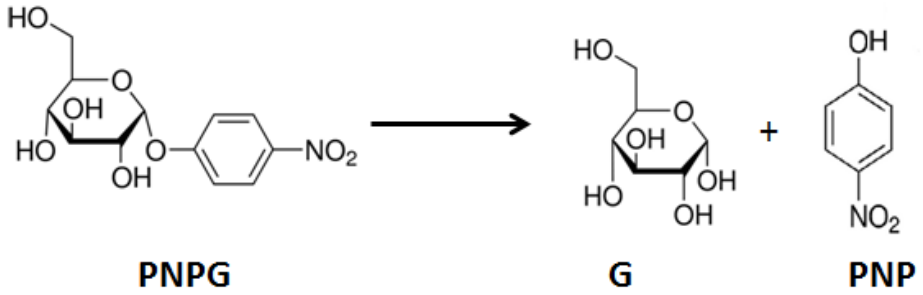


Figure 18 : Dégradation du p-nitrophenyl α-D-glucopyranoside (PNPG) par l'α-glucosidase.

Le test a été réalisé en microplaque selon la méthode décrite par Kang *et al*. (2012), avec des modifications : 20 µl d'α-glucosidase à 1,6 U/ml dans du tampon 0,1 mol.L^{-1} phosphate de potassium (pH 6,8) ont été mélangés avec 112 µl de ce même tampon et 8 µl d'échantillon (peptide ou d'inhibiteur de référence) à différentes concentrations. Les échantillons étant précédemment solubilisés si nécessaire dans du tampon contenant 10 % de dimétylsulfoxide. Après une pré-incubation à 37°C pendant 15 min, 20 µl de PNPG à 20 mM dans le tampon décrit précédemment ont été rajoutés au mélange afin d'initier la réaction. Le milieu réactionnel a été incubé pendant 30 min à 37°C. La réaction a été stoppée par l'ajout de 80 µl d'une solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 1 M.

La quantité de produit formé (4-nitrophenol) a été mesurée spectrophotométriquement par lecture de l'absorbance à 410 nm. Le pourcentage d'inhibition de l'alpha-glucosidase a été calculé selon l'équation 4 ci-dessous :

$$\%\ \text{d'inhibition} = [1 - \frac{(\text{DO test} - \text{DO Blanc})}{(\text{DO contrôle} - \text{DO Blanc})}] * 100$$

Equation 4 : Calcul du pourcentage d'inhibition de l'activite de l'α-glucosidase.
DO test et DO contrôle sont respectivement les densités optiques de l'échantillon test (avec l'inhibiteur) et l'échantillon contrôle (tampon à la place de l'inhibiteur), DO blanc (tampon à la place de l'enzyme).

2.2.2. Inhibition de l'activité de l'α-amylase pancréatique

Dans ce test, la formation de sucres réducteurs à partir d'amidon est suivie en présence d'α-amylase pancréatique. La quantité de sucres réducteurs libérée est dosée par réaction avec le DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique) et par lecture de l'absorbance à 540 nm en utilisant le spectrophotomètre. L'acarbose, inhibiteur synthétique commercial, a été utilisé comme référence.

10 µl d'α-amylase (0,5 mg/ml) dans du tampon phosphate de sodium 200 mmol.L^{-1} (pH 6,9) et 100 µl de ce même tampon, ont été pré-incubés avec 10 µl de peptide ou d'acarbose (solubilisé dans du tampon contenant 10 % DMSO). Après incubation à 37°C pendant 10 min, 100 µl de la solution d'amidon à 0,5 % dans du tampon phosphate de sodium ont été ajoutés au mélange afin d'initier la réaction. Le milieu réactionnel a été incubé pendant 15 min à 37°C et la réaction a été stoppée par l'ajout de 200 µl de réactif au DNS (1% acide 3,5-dinitrosalicylique, 12% Na–K tartrate dans 0,4 mol.L^{-1} NaOH). Le milieu réactionnel a été ensuite porté à ébullition pendant 5 min dans un bain marie puis refroidit par l'ajout de 1 ml d'eau distillée. L'activité de l'α-amylase a été mesurée par lecture de l'absorbance à 540 nm en utilisant le spectrophotomètre Fluostar Omega (BMG Labtech). Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation 5.

$$\%\ \text{d'inhibition} = [\frac{(\text{DO contrôle} - \text{DO test})}{(\text{DO contrôle} - \text{DO Blanc})}] * 100$$

Equation 5 : Calcul du pourcentage d'inhibition de l'activité de l'α-amylase.

2.2.3. Inhibition de l'activité de la Dipeptidyl peptidase-IV

L'inhibition de l'activité de la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) a été évaluée en mesurant par spectrophotométrie à 385 nm la formation du produit p-nitroanilide de couleur jaune à partir du substrat synthétique : le Gly-L-Pro-p-nitroanilide. Le test a été réalisé en microplaque. La diminution de l'absorbance à 385 nm par rapport aux puits contrôles (sans inhibiteur) témoignait d'une inhibition de l'enzyme. Le tripeptide IPI, appelé aussi diprotine A, inhibiteur spécifique de la DPPIV, a été utilisé comme référence.

Le test a été réalisé en microplaque selon la méthode précédemment décrite dans le brevet WO 2009/128713 (Van Amerongen *et al.*, 2009). 25 µl du substrat Gly-L-Pro-p-nitroanilide dans du tampon 0,1 mol.L^{-1} de Tris-HCl (pH 8,0) à 1,6 mM, a été mélangé avec 25 µl de l'échantillon peptide ou d'inhibiteur de référence à différentes concentrations. Les échantillons étant précédemment solubilisés dans du tampon 0,1 mol/l Tris-HCl (pH 8,0). Après une pré-incubation à 37°C pendant 10 min, 50 µl de DPPIV à une concentration de 0.01U/ml dans du tampon 0,1 mol.L^{-1} Tris-HCl (pH 8,0) ont été rajoutés au mélange afin d'initier la réaction. Le milieu réactionnel a été incubé pendant 60 min à 37°C avant que la réaction ne soit arrêtée par l'ajout de 100 µl de tampon acétate de sodium 1M (pH 4,0). La quantité de produit formé (p-nitroanilide) a été mesurée par lecture de l'absorbance à 385 nm en utilisant le spectrophotomètre Fluostar Omega (BMG Labtech, Allemagne). Les pourcentages d'inhibition ont été calculés selon l'équation 5.

2.3. Analyse des résultats

Tous les tests ont été effectués au moins en triplicata et les résultats sont exprimés en moyenne +/- écart à la moyenne (SEM).

3. Expérimentations *in vitro* sur la lignée d'adipocytes blancs humains

Toutes les étapes de culture cellulaire ont été réalisées en conditions stériles sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) et tous les milieux utilisés ont été préparés et filtrés sur membrane de 0,22 µm (Millex, Millipore).

3.1. Culture des cellules pré-adipocytaires et conservation

3.1.1. Propagation des cellules et conservation

3.1.1.1. Pré-culture

La totalité du cryotube de pré-adipocytes fournis par Promocell à un passage 2 et à une concentration de 500.000 cellules/ml a été inoculée dans une flasque de 25 cm^2. Les cellules ont été incubées dans une étuve à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO_2. Le milieu de culture a été changé tous les 2 ou 3 jours jusqu'à ce que les cellules atteignent la confluence. Cette étape permet d'amplifier les cellules et de les stocker en cryotube sous azote liquide avec une densité cellulaire de 10^6 cellules/ml.

3.1.1.2. Trypsination

A confluence, c'est-à-dire lorsque les cellules ont formé un tapis cellulaire au fond de la flasque, une étape de trypsination a été effectuée. Le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été lavées avec du tampon PBS stérile (pH 7,4). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 5 min avec une solution de trypsine/EDTA 1X. L'action de la trypsine est inhibée par la suite par l'ajout du milieu de croissance et les cellules sont enfin récupérées par centrifugation pendant 5 min à 250 g.

3.1.1.3. Dénombrement cellulaire

Les cellules collectées ont été suspendues dans du milieu de croissance et dénombrées par observation microscopique sur cellule de Malassez. La viabilité cellulaire a été déterminée par coloration au bleu Trypan ($1/5^{ème}$ v/v). 40µl de suspension cellulaire a été ajouté à un volume de 160 µl de la solution de bleu Trypan, le mélange bien homogénéisé a été déposé sur cellule de Malassez.

3.1.1.4. Remise en culture et maturation des lignées adipocytaires

Remise en culture

Le contenu cellulaire conservé en cryotube a été décongelé pendant 90 secondes dans un bain marie à 37°C. Les cellules ont été ensuite déposées en flasque ou en microplaques de 6, 24 ou 96 puits selon le test à effectuer.

Croissance, différenciation et maturation adipocytaire (Etapes présentées figure 19)

Croissance des pré-adipocytes

Les cellules sont cultivées en milieu de croissance pendant 7 à 10 jours dans une étuve à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO_2. Le milieu est renouvelé tous les deux ou trois jours selon les besoins des cellules.

Induction de la différenciation des pré-adipocytes (J0-J4) ou première période de différenciation.

Lorsque les cellules arrivent à confluence (jour 0), le milieu de croissance (MC) est remplacé par du milieu de différenciation (MD) pendant 4 jours afin d'induire la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes. Le milieu était renouvelé tous les deux jours.

Maturation des adipocytes ou deuxième période de différenciation (J4-J16)

Après 4 jours dans le milieu de différenciation, ce dernier est remplacé par du milieu de nutrition. Cette étape permet la maturation des adipocytes différenciés (augmentation de taille et chargement en gouttelettes lipidiques). Les cellules ont été cultivées dans du milieu de nutrition pendant 4, 8 ou 12 jours selon le test. Le jour 16, les cellules étaient chargées en gouttelettes lipidiques et ont été considérées comme des adipocytes matures. Le milieu était renouvelé tous les deux ou trois jours selon les besoins des cellules.

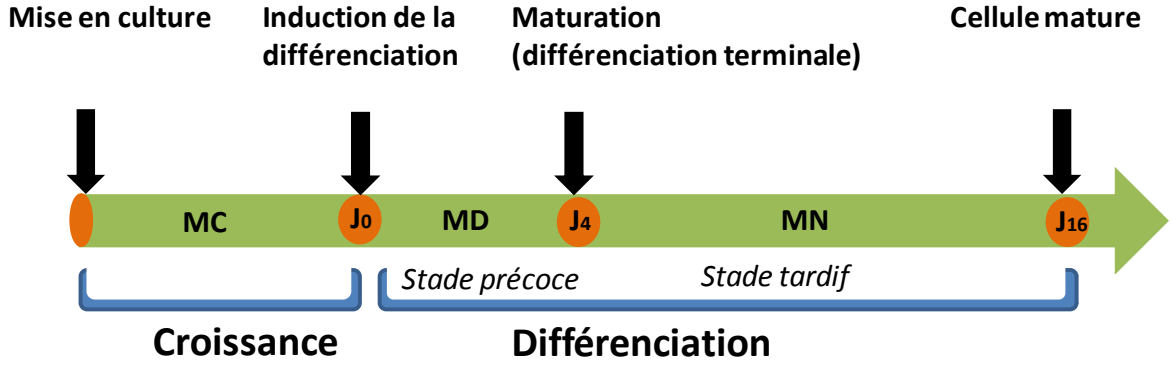


Figure 19 : Croissance et différents stades de différenciation des adipocytes humains blancs sous-cutanés.

***MC** : milieu de croissance, **MD** : milieu de différenciation, **MN** : milieu de nutrition.*

3.2. Evaluation de l'influence des cryptides *in vitro* sur le développement des adipocytes humains sous-cutanés

3.2.1. Etude de l'effet cytotoxique et antiprolifératif des peptides

Le potentiel cytotoxique et antiprolifératif des peptides inhibiteurs de l'ECA, a été estimé en utilisant le test MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium). Le test MTT est réalisé selon la méthode décrite par Mosmann (1983). Ce test consiste à mesurer l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. Cette enzyme transforme le MTT, de couleur jaune, en cristaux de formazan bleus, par coupure du cycle tétrazolium. Après dissolution de ces cristaux, une lecture spectrophotométrique est réalisée. La densité optique obtenue est directement proportionnelle à la quantité de formazan produite et donc au nombre de cellules vivantes.

Pour détecter l'effet des cryptides marins sur la viabilité des HWP lors de l'étape de prolifération, les pré-adipocytes ont été cultivés en plaques 96 puits selon une densité cellulaire de 5000 cellules/puits pendant 24 h avant d'être traités. Après 24 h de mise en culture, selon le traitement imposé, le milieu de culture a été retiré et remplacé par 100 µl de milieu de croissance comprenant 100 µM des cryptides VW, IY, VY, AP, KY, KW, VAP, GPL, LKP, AKK et VIY. Après 24 h ou 72 h de traitement, 25 µl de MTT (5 mg/ml) ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 4 h. Le milieu a été ensuite retiré pour être remplacé par 200 µl de DMSO. Les plaques ont alors été incubées 5 min à l'étuve à 37°C. La lecture des densités optiques a été réalisée à 570 nm avec le spectrophotomètre UV versa lecteur de microplaques Max (dispositifs moléculaires, Californie, États-Unis).

Dans un deuxième temps, l'effet de certains cryptides sur la viabilité des cellules HWP lors de la différenciation a été évalué. Les cellules ont été cultivées avec 100 µM de cryptides marins du jour 0 au jour 12. Les milieux avec ou sans les peptides ont été changés tous les 2 jours. Les tests MTT ont été effectués aux jours 3, 6, 9 et 12 en utilisant la méthode décrite ci-dessus.

Le pourcentage de cellules survivantes a été calculé selon l'équation 5 :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{DO moyenne des cellules traitées}}{\text{DO moyenne des cellules non traitées}} * 100 \pm \text{ecart type}$$

Equation 5: Calcul du pourcentage de viabilité cellulaire.

La cytotoxicité correspondant à 100 % - % de cellules survivantes. Les cellules non traitées ont été utilisées comme contrôle. Chaque condition a été testée sur 8 puits et répétée 3 fois.

3.2.2. Etude de l'effet des cryptides sur le contenu lipidique final des adipocytes humains

L'effet des cryptides sur le contenu lipidique final des adipocytes matures cultivés dans des plaques à 24 puits à une densité de 10^4 cellules/ml, a été estimé par un dosage colorimétrique à l'huile rouge. Ce colorant est utilisé pour la mise en évidence des lipides totaux contenus dans le cytoplasme des adipocytes. Les cryptides ont été solubilisés dans du DMSO puis dilués dans du milieu de croissance supplémenté de 1 % d'antibiotique (concentration finale de DMSO dans le puits ≤ 1%). Chaque condition expérimentale a été réalisée sur 6 puits et répétée 3 fois. Les cellules qui ont effectué leur croissance sans traitement ont été considérées comme des cellules contrôles. Les différents milieux ont été renouvelés tous les 2 jours, avec ou sans cryptides.

La solution d'huile rouge a été préparée en diluant 0,5 g de poudre Oil Red O (sigma Aldrich) dans 100 ml d'isopropanol. Cette solution constitue la solution stock qui peut être conservé pendant un an à 4°C. Une solution de travail a été préparée à partir de la solution stock diluée dans l'eau (40/60 v/v) puis filtrée sur une membrane 0,22 µm. Cette solution n'est stable que pendant 2 heures.

Dans un premier temps, les HWP ont été incubés avec les cryptides pendant toute la phase de différentiation (J0-J16). Ensuite, pour identifier à quelle phase agissaient les cryptides, les cellules ont été traitées soit pendant la première période de différentiation (J0-J4) soit pendant la deuxième période (J5-J16, phase de maturation).

Au jour 16, le milieu de nutrition a été retiré et les adipocytes, chargés en gouttelettes lipidiques, ont été incubés 5 minutes avec 500 µl de formaldéhyde à 4% (v/v) dans un tampon phosphate salin (PBS), puis les cellules ont été fixées 1 h à 4°C avec 500 µl d'une solution de formaldéhyde fraîche à 4 %. Le milieu a ensuite été retiré et les cellules lavées avec 500 µl

d'isopropanol dilué dans l'eau (60/40 v/v). Les cellules ont été ensuite séchées avant d'être incubées 10 minutes avec 200 µl de la solution de travail d'huile rouge. L'huile rouge non fixée a été éliminée par 4 lavages successifs avec de l'eau distillée.

Les images ont été obtenues en utilisant un microscope inversé Eclipse TS100 (100X) équipé pour contraste de phase (Nikon, Yokohama, Japon).

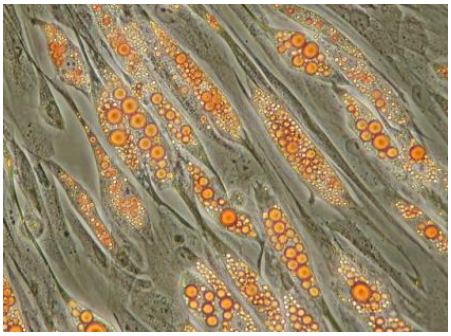


Figure 20 : Observation microscopique d'adipocytes blancs humains sous cutanés (HWP) colorés à l'huile rouge.

Pour la quantification de la teneur en lipides qui est proportionnelle à la quantité d'huile rouge fixée, les cellules colorées ont été incubées avec 750 µl d'isopropanol pendant 10 minutes à température ambiante. La solution obtenue après plusieurs pipetages/ refoulements a ensuite été transférée dans une autre microplaque 24 puits pour lecture de la densité optique à 540 nm en utilisant un spectrofluorimètre Omega Fluostar (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Allemagne).

Les résultats sont représentés en pourcentage du contenu lipidique total des adipocytes traités comparé à celui des adipocytes non traités. Le pourcentage des lipides totaux résiduels a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Lipides totaux résiduels (\%)} = \frac{\text{DO moyenne des cellules traitées}}{\text{DO moyenne des cellules non traitées}} * 100 \pm \text{ecart type}$$

Equation 6 : Calcul du pourcentage des lipides totaux résiduels

3.2.3. Etude de l'effet des cryptides sur l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase

La glycérolphosphate déshydrogénase (GPDH) est une enzyme impliquée dans la synthèse des triglycérides. Elle convertit la dihydroxyacétone phosphate en glycérol-3-phosphate en

oxydant le NADH en NAD^+ selon la figure 21. L'activité GPDH est déterminée en suivant en UV la diminution de l'absorbance à 340 nm correspondant à la consommation du NADH.

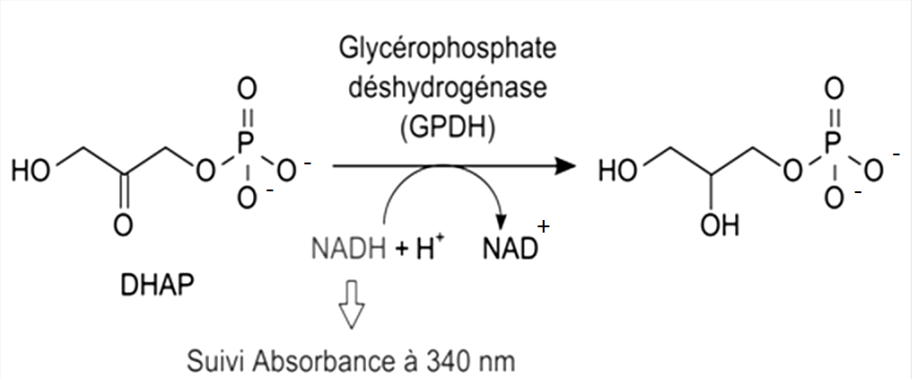


Figure 21 : Principe de mesure de l'activité de la GPDH.

Les cellules HWP ont été ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de 10^4 cellules/ml, et cultivés jusqu'à atteindre la confluence. Au jour 0, les cellules sont induites en différenciation et traitées pendant 8 jours avec 100 µM de cryptides (cellules traitées). Un contrôle avec le milieu seul a été inclus dans l'étude (cellules contrôles). Au jour 8, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS, puis un tampon d'extraction enzymatique fournie avec le kit GPDH Activity Assay (Takara Bio Inc., Shiga, Japon) a été ajouté pour induire la lyse des cellules. Les extraits cellulaires ont été recueillis par raclage et centrifugés pendant 5 min, 4°C à 10000 g. L'activité spécifique de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH) du surnageant a été mesurée en utilisant le kit GPDH Activity Assay. La baisse de l'absorbance a été mesurée à 340nm en fonction du temps en utilisant un spectrophotomètre « Devices vesa Max microplate reader » pendant 20 minutes à 37°C à raison d'une lecture toutes les 20 secondes.

La concentration en protéine des surnageants a été mesurée en utilisant le dosage de protéine de Bradford (Bradford, 1976). L'activité de la GPDH a été calculée selon l'équation 7 et les résultats ont été exprimés en pourcentage de cellules contrôles (100%).

$$\text{Activité GPDH(U/ml)} = \frac{\Delta \text{DO}(340) \times \text{A(ml)} \times \text{facteur de dilution de l'échantillon}}{6.22 \times \text{B(ml)} \times \text{C(cm)}}$$

Equation 7 : Calcul de l'activité de la GPDH.

DO_{340} : Diminution de l'absorbance à 340nm par minute, **A** (ml) : Volume total de la réaction, **B** (ml) : Volume de la solution d'enzyme ajoutée **C** (ml) : Trajet optique et 6.22 : Coefficient d'absorption molaire du NADH

3.2.4. Etude de l'effet des cryptides sur l'expression des marqueurs de différenciation adipocytaire par PCR quantitative

La modulation de la différenciation adipocytaire par les cryptides marins à été étudiée. Cette modulation a été évaluée par la quantification de l'expression de marqueurs de différenciation adipocytaire (aP2, GLUT4, LPL, AGT, PPARγ et C/EBPα) par Q-PCR. Les cellules HWP ont été ensemencées à 10^5 cellules/ml dans des plaques de six puits, cultivées à confluence, traitées avec 100 µM de cryptides pendant la période de différenciation (du jour 0 au jour 8). Les cellules n'ayant pas reçu de traitement ont été considérées comme des cellules contrôles. Au jour 8, les cellules ont été recueillies après trypsination.

Les ARN totaux ont été extraits des HWP en utilisant le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Les échantillons d'ARN ont été traités afin d'enlever toute trace de contamination par de l'ADN génomique en utilisant le kit Ambion DNA-free (Life Technologies, Carlsbad, États-Unis). L'ARN a été quantifié à 260 nm en utilisant le NanoDrop 2000 spectrophotomètre UV-Vis (Thermo Scientific, États-Unis), et l'intégrité de l'échantillon a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. La transcription inverse de l'ARN (500 ng) a été réalisée en utilisant le kit AMV Cloned First-Strand cDNA Synthesis (Invitrogen, Carlsbad, USA), avec des amorces aléatoires (Random Hexamer primer) suivant les instructions du fabricant.

Une PCR quantitative a été ensuite réalisée sur des échantillons d'ADNc afin d'évaluer les niveaux d'expression des marqueurs de différentiation PPARγ, C/EBPα, aP2, GLUT4, LPL et AGT. La β-actine humaine a été choisie comme gène de ménage, c'est une protéine ubiquitaire présente dans tous les types cellulaires. L'amplification des fragments de l'ADNc a été réalisée par le thermocycleur en temps réel Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA, USA) en utilisant le kit Brilliant III SYBR Ultra-Fast Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) dans une plaque 96 puits.

Les paramètres du cycle étaient les suivants: 1 cycle à 95 ° C pendant 3 min, suivi par 40 cycles à 95 ° C pendant 10s et 60 ° C pendant 20 s. Chaque réaction a été effectuée en double exemplaire, dans un volume final de 20 µl contenant 5 µl d'ADNc (dilution 1/20), 2 ×

Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green Master Mix (10 µl), avec une concentration optimisée d'amorces spécifiques (400 nM). Les séquences d'amorces (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne) sont présentées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Amorces utilisées en Q-PCR et leurs séquences et la taille des produits amplifiés.

Amorces	Séquences (5' vers 3')	Taille de l'amplicon (bp)
PPARγ-R PPARγ-F	GGCGGTCTCCACTGAGAATA GAGCCAAGTTTGAGTTTGC	*100*
C/EBPα- C/EBPα-F	TTTAGCAGAGACGCGCACATTCAC ATTGCCTAGGAACACGAAGCACGA	*160*
LPL-R LPL-F	CTGGCATTGCAGGAAGTCTG GCATCATCAGGAGAAAGACGA	*114*
aP2-R aP2-R	TCTCTTTATGGTGGTTGATTTT CAGTGTGAATGGGGATGTG	*192*
GLUT4-R GLUT4-F	TTTCACCTCCTGCTCTAA CGTCTTCCTTCTATTTGC	*142*
AGT-R AGT-F	AGGCATAGTGAGGCTGGAT CCTGGCTTTCAACACCTAC	*227*
β-actine-R β-actine-F	GCCTCGTCGCCCACATAG GCCGTCTTCCCCTCCATC	*89*

AGT : Angiotensinogène, **aP2** : Adipocyte protéine 2, **C/EBPα** : CCAAT/enhancer-binding protein, **GLUT 4**: Transporteur de glucose de type 4, **PPARγ** : Peroxisome prolifertor-activated receptor γ, **LPL** : Lipoprotéine lipase et **GPDH** : Glycérol 3-phosphate déshydrogénase.

Les valeurs de la quantification relative ont été exprimées en utilisant la méthode$^{-\Delta\Delta Ct}$ (Expression Normalisée de la Cible). Avec cette méthode, les changements dans l'expression des gènes cibles (PPARγ, C/EBPα, aP2, GLUT4, LPL et AGT) sont normalisés par rapport à celle du gène de référence, la β-actine, et rapportés à l'expression des gènes dans les échantillons contrôles non traités. Les amorces ont été validées en testant leur efficacité PCR grâce aux courbes d'étalonnage. Leur efficacité était entre 95 % et 105 %. La spécificité des produits PCR a été évaluée par la génération d'une courbe de dissociation en suivant les recommandations du fabricant. Tous les résultats ont été obtenus à partir de trois expériences indépendantes.

3.2.5. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- écart à la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Origin 6.0. Le test statistique *t* de Student de type non apparié a été utilisé. Il permet de déterminer s'il y a une différence significative entre le groupe traité et le groupe témoin. Lorsque $p \leq 0.05$, la différence entre le groupe témoin et le groupe test est dite «statistiquement significative».

4. Méthodes analytiques de purification et de caractérisation des cryptides

4.1. Vérification de la pureté des peptides synthétiques

Une vérification de l'état de pureté des peptides a été réalisée en utilisant une HPLC-analytique Agilent (1200 LC), en une double détection : UV à 215 nm et spectrométrie de masse (MS-Quadripole 6120). La séparation a été réalisée à l'aide de la colonne C18 Kinetex (100×2 .10mm, 2.6µm ; phenomenex, USA) et l'ionisation de l'échantillon à pression atmosphérique de type electrospray (API-ES) en mode scan positif. Les phases mobiles utilisées à température ambiante formaient un gradient en fonction du temps (tableau 10), contenant deux types de phases mobiles :

- Solvant A : eau /0,1% TFA.
- Solvant B : acétonitrile/ 0,1% TFA.

Tableau 10 : Gradient d'élution utilisé pour la vérification de la pureté des peptides synthétiques.

Temps en minutes	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Débit (mL/min)
0	90	10	0.3
5	50	50	0.3
20	0	100	0.3
25	90	10	0.3

4.2. Purification et séparation de l'hydrolysat protéique de Tilapia du Nil

4.2.1. Fractionnement de l'hydrolysat par ultrafiltration

2 g de l'hydrolysat protéique en poudre issu de co-produits de filetage de Tilapia du Nil ont été solubilisés dans 20 ml d'eau ultra-pure et centrifugés à 4000 g pendant 20 min. Le surnageant a été collecté et constituait l'hydrolysat non fractionné. Ce dernier a été par la suite fractionné par 3 ultrafiltrations successives (figure 22) :

-Une première ultrafiltration sur membrane Ultracel® avec un seuil de coupure de plus de 30 kDa : un rétentat ≥30 kDa (Fraction A) et un filtrat ≤30 kDa (fraction B) sont collectés.

-Une deuxième ultrafiltration sur membrane Ultracel® avec un seuil de coupure de plus de 10 kDa : on récupère un rétentat entre 30 et 10 kDa (Fraction C) et un filtrat ≤10 kDa (fraction D) sont collectés.

-Une troisième ultrafiltration sur membrane Ultracel® avec un seuil de coupure de plus de 1kDa. Le rétentat ≤1 kDa (fraction E) est collecté.

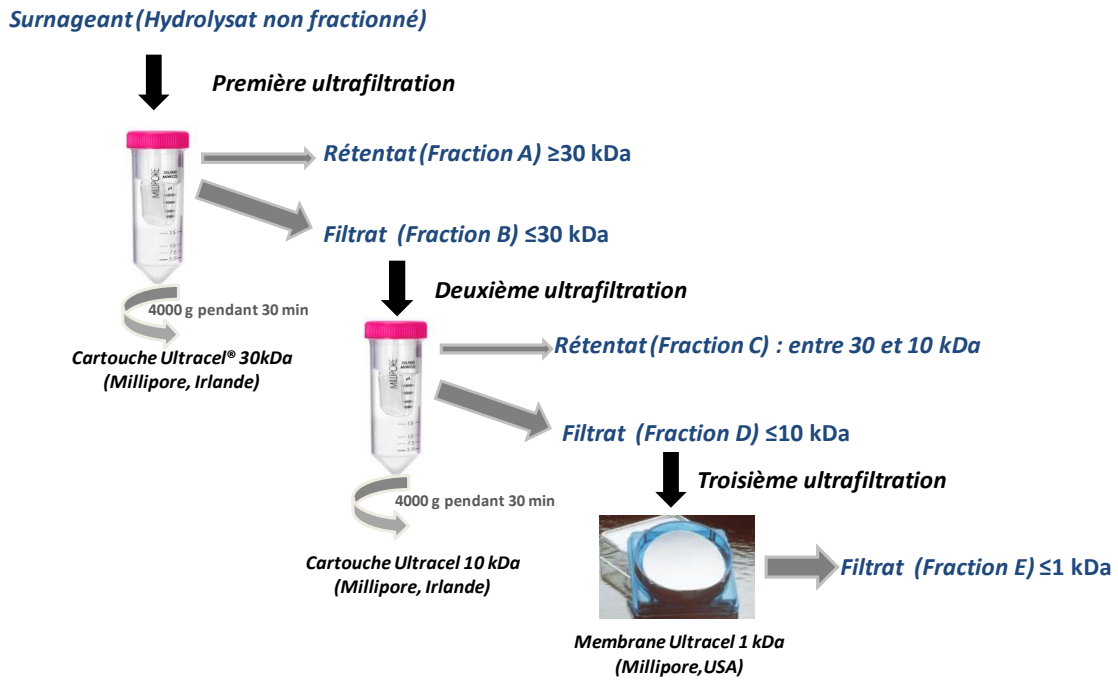


Figure 22 : Illustration de la méthode de fractionnement de l'hydrolysat protéique de Tilapia par ultrafiltrations successives.

Le potentiel inhibiteur de l'ECA de l'hydrolysat non fractionné et des différentes fractions (A, B, C, D et E) récupérées a été évalué par la méthode HHL comme décrit précédemment dans ce chapitre lors de la partie (2.1.1.1). La concentration en protéines de l'hydrolysat et les différentes fractions a été déterminée par la méthode de Bradford.

4.2.2. Séparation et purification de la fraction E par RP-HPLC

Dans la mesure où notre étude est basée sur l'évaluation de l'activité des di et tripeptides, c'est donc la fraction E riche en peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 1 kDa qui nous a intéressé. La fraction E a été lyophilisée et reprise dans 1 ml d'eau ultra-pure. Les espèces contenues dans cette fraction ont été séparées à l'aide du système HPLC-analytique d'Agilent (1200 LC). La séparation a été réalisée en utilisant la colonne C18 ProntoSil (250× 4 mm, 5.0 µm; Bischoff, Allemagne).

100 µl d'hydrolysat ont été déposés sur la colonne. La séparation a été effectuée à température ambiante avec un débit de 1 ml/min. Le gradient utilisé est décrit ci-dessous (tableau 11) :

- Solvant A : eau ultra-pure /0,1% TFA.
- Solvant B : acétonitrile/ 0,1% TFA.

Tableau 11: Gradient d'élution utilisé pour la séparation des peptides contenus dans la fraction E.

Temps en minutes	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Débit (mL/min)
0	99	1	1.0
55	90	10	1.0
60	50	50	1.0
65	1	99	1.0
75	99	1	1.0
80	99	1	1.0

La détection des peptides a été suivie à 215 nm et 280 nm. Plusieurs fractions peptidiques ont été collectées manuellement. Après 10 injections, les fractions ont été rassemblées puis lyophilisées et stockées à -20°C.

4.2.3. Identification et caractérisation des peptides par UPLC-MS

Les sous-fractions collectées après séparation par RP-HPLC de la fraction E (≤ 1kDa) ont été analysées par spectrométrie de masse (ESI-Q-TOF) après séparation par UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography).

Principe général

L'UPLC-ESI-Q-TOF (figure 23) utilise :

- Une UPLC couplée au spectromètre de masse en amont ce qui permet une séparation des analytes présents dans nos échantillons.

- Une source d'électronébulisation ESI : La solution d'échantillon est introduite dans un capillaire. Le champ électrique intense appliqué à la sortie de ce capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées, de quelques micromètres de diamètre, qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur quadripôle.

- Un couplage de 2 analyseurs: un analyseur quadripole (Q) et un temps de vol (ToF). L'analyseur quadripole est constitué de quatre barres métalliques parallèles soumis à des tensions continues. C'est un analyseur à balayage qui va utiliser la stabilité de la trajectoire des ions entre les barres pour les séparer en fonction de leur rapport m/z. Le second analyseur TOF mesure le temps que mettent les ions à parcourir la distance du tube de vol après avoir été accélérés par un champ électrique. Un signal au niveau du détecteur à un temps donné du balayage correspond à un m/z donné. C'est un analyseur de haute résolution qui permet de mesurer la masse exacte et de déterminer la formule brute d'un composé détecté.

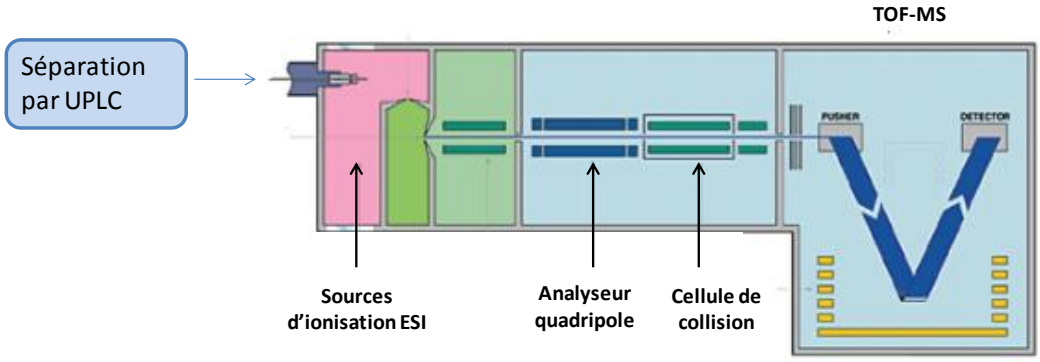


Figure 23: Représentation schématique du système UPLC-ESI-Q-TOF utilisé.

L'analyse peut être effectuée selon deux modes : le mode scan ou MS/MS. Dans le mode scan, la cellule de collision est inactive ce qui permet le passage de tous ions vers l'analyseur

TOF et d'avoir une acquisition de toutes les masses allant de 50 à 1500 m/z. Le mode MS/MS permet de sélectionner un ion parent parmi tous les ions formés dans la source et de le fragmenter dans la cellule de collision.

La démarche générale était :

- Dans un premier temps: d'effectuer une analyse ESI-Q-TOF de toutes les fractions collectées, nous permettant d'observer la masse des peptides ionisables présents dans ces sous fractions, de sélectionner certains qui pourraient potentiellement correspondre aux di et tripetides précédemment testés puis de vérifier leurs séquences en utilisant la MS/MS.

-Dans un deuxième temps : d'identifier de nouveaux di et tripeptides présents dans les sous-fractions majoritaires de la fraction E.

Les analyses ont été réalisées en utilisant le système Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, USA) couplé au spectromètre de masse Xevo G2 S Q-TOF (figure 24) équipé d'une source d'ionisation electrospray (Waters, Manchester, United Kingdom).

Figure 24: Photographie du système Acquity UPLC H-Class (Waters, Milford, USA) couplé au spectromètre de masse Xevo G2 S Q-TOF.

La séparation chromatographique a été effectuée sur une colonne C18 UPLC BEH (Waters Acquity, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm) maintenue à une température de 25°C. Les phases mobiles utilisées formaient un système d'élution correspondant à un gradient en fonction du temps (tableau 12) :

- Solvant A : eau ultra-pure /0,01% acide formique.
- Solvant B : acétonitrile /0,01% acide formique.

Tableau 12: Gradient d'élution utilisé pour la séparation des sous-fractions par UPLC.

Temps en minutes	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Débit (mL/min)
0	97	3	0.4
1	95	5	0.4
1:30	95	5	0.4
2:50	92	8	0.4
3:00	92	8	0.4
5:00	70	30	0.4
5:50	70	30	0.4
6:00	60	40	0.4
6:50	60	40	0.4
7:00	50	50	0.4
7:50	50	50	0.4
8:00	0	100	0.4
8:50	0	100	0.4
9:00	100	0	0.4
9:50	100	0	0.4

Le volume d'injection est de 10 µl. Le système d'auto-échantillonnage est maintenu à une température de 4°C.

Les paramètres utilisés dans les analyses de spectrométrie de masse sont :

-Gamme de masse entre 50 et 1500 m/z.

-Electrospray en mode positif, voltage du capillaire et du cône de 2.5 kV et 30 Kv respectivement.

-Désolvatation du gaz à 1000L/h à T°500°C

-Température de la source 120°C.

-Voltage du détecteur 2400 V.

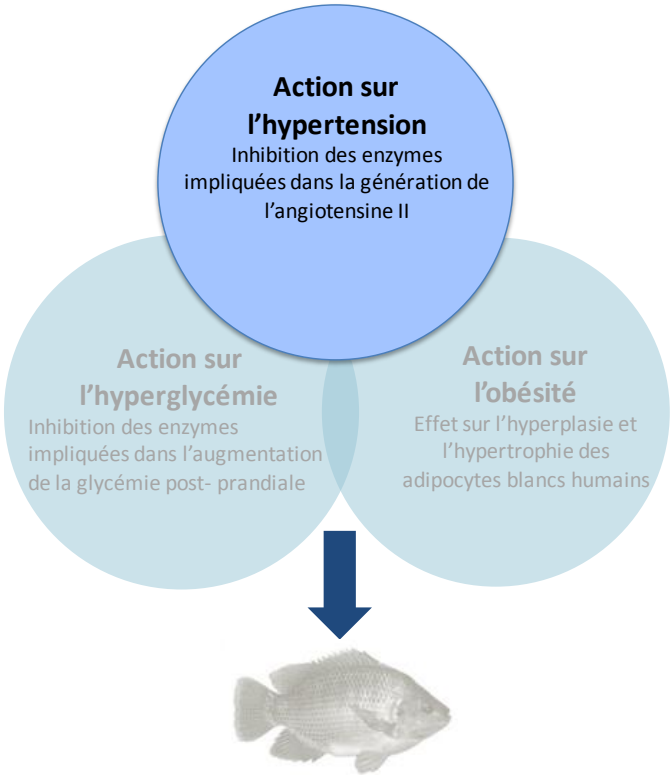
L'acquisition des analyses a été réalisée en présence d'une référence interne (Lock spray) de leucine-enkephaline à une concentration de 1 µg/ml et un débit de 5 µl/min. Les acquisitions et le traitement des données ont été réalisés en utilisant le logiciel « MassLynx Version 4.1 » de Waters. Le module « Chromalynx » de ce même logiciel nous a permis de vérifier par rapport à une base de données si nos cryptides étaient potentiellement présents dans notre

échantillon. La base de données que nous avons créée comprend le nom du peptide, sa séquence (en trois lettres), le temps de rétention, la formule brute et une masse d'un des fragments (issu d'une fragmentation spontanée obtenue en haute énergie dans la cellule de collision). Notons que le temps de rétention et le fragment utilisé dans la création de cette banque de données ont été sélectionnés par rapport à une analyse dans les mêmes conditions de nos peptides purs synthétiques (pris comme références). Le module « Biolynx » utilisé a permis de proposer et de vérifier la séquence des peptides après fragmentation MS/MS.

Chapitre III : Résultats & discussions

Partie 1 : Cryptides marins et hypertension

Les cryptides marins sont-ils capables de cibler les pathologies du syndrome métabolique ?



Identification de cryptides dans l'hydrolysat protéique de co-produits de poisson

1. Introduction

Un grand nombre de peptides antihypertenseurs ont été isolés à partir d'hydrolysats de protéines de produits et co-produits marins. Ces peptides sont activement recherchés et étudiés pour leur effet inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Inhiber l'ECA est considérée comme une approche thérapeutique intéressante dans le traitement de l'hypertension artérielle puisque l'angiotensine II, composé vasoconstricteur est moins produit et que la bradykinine, composé vasodilatateur, est moins dégradé.

Outre la voie de synthèse classique de l'angiotensine II, mettant en jeu l'ECA, il existe des voies alternatives (figure 25) qui permettent la production d'angiotensine II, soit à partir de l'angiotensine I, soit directement à partir de l'angiotensinogène. Bien qu'il reste sans doute beaucoup à découvrir sur ces productions parallèles d'angiotensine II, un certain nombre d'enzymes sont déjà connues.

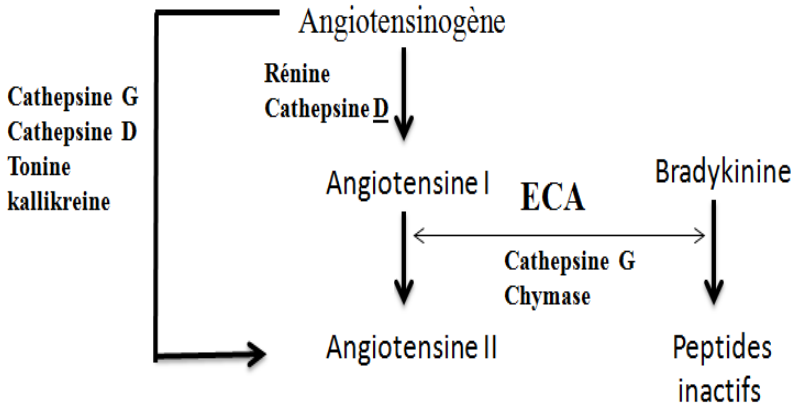


Figure 25: Enzymes impliquées dans la génération de l'angiotensine II.

Il a été rapporté que la chymase (Reilly *et al*., 1982 ; Takai *et al*., 1996) et la cathepsine G (Klickstein *et al*., 1982 ; Reilly *et al*., 1982), comme l'ECA, sont capables de convertir l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I, à un rythme similaire ou plus rapide que l'ECA (Miyazaki et Takai, 2000). De plus, ces deux enzymes s'avèrent être également capables de dégrader la bradykinine (Reilly *et al*., 1985).

La cathepsine G (Wintroub *et al*., 1984), la tonine (Boucher *et al*., 1977) et la kallikreine (Arakawa et Maruta, 1980) sont capables de convertir *in vitro* l'angiotensinogène en angiotensine II. La cathepsine D est également capable de convertir l'angiotensinogène en angiotensine II. Aussi, la cathepsine D est capable de convertir l'angiotensinogène en

angiotensine I bien que la rénine le fasse au moins 100 000 fois plus vite (Hackenthal *et al*., 1978).

Ces voies de synthèse non-classiques semblent être particulièrement impliquées dans la synthèse d'angiotensine II dans les systèmes rénine angiotensine locaux. Ainsi, chez l'homme la chymase jouerait un rôle prépondérant dans la synthèse d'angiotensine II cardiaque (Balcells *et al*., 1997 ; Urata *et al*., 1993).

La réduction de la formation de l'angiotensine II par les inhibiteurs de l'ECA, et l'inhibition des effets cardiovasculaires de ce dernier par les antagonistes des récepteurs AT1, sont des mécanismes largement exploités en clinique pour abaisser la pression artérielle chez les patients hypertendus. Un traitement combinant un inhibiteur de l'ECA et un antagoniste des récepteurs AT1 s'avère plus efficace qu'une monothérapie par un inhibiteur de l'ECA seul pour l'abaissement de la pression artérielle chez les patients hypertendus (Azizi *et al*., 1995). **Ceci témoigne d'une suppression incomplète du système rénine angiotensine par les inhibiteurs de l'ECA probablement due aux voies alternatives de génération de l'angiotensine indépendantes de l'ECA** (Li *et al*., 2004).

Les cryptides marins sélectionnés dans notre étude ont été précédemment identifiés comme des inhibiteurs de l'ECA. Leurs activités inhibitrices exprimées en valeurs de CI 50 ont été évaluées *in vitro* en utilisant des substrats synthétiques (HHL ou FAPGG).

Dans la première partie de l'étude nous avons réalisé une étude comparative de 3 méthodes de criblage d'activité inhibitrice de l'ECA. Ces méthodes diffèrent par la nature du substrat et le mode de dosage de l'activité inhibitrice. Nous avons ainsi évalué le potentiel inhibiteur de l'ECA de ces cryptides en utilisant 3 substrats différents : deux substrats synthétiques (HHL et FAPGG) et le substrat naturel de l'ECA (angiotensine I). Nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux mesurés avec le contrôle positif, le captopril, et un contrôle négatif le losartan, qui n'est pas un inhibiteur de l'ECA, mais un antagoniste compétitif et sélectif des récepteurs AT1 de l'angiotensine II (Cockcroft *et al.*, 1993).

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons évalué la capacité des cryptides marins à inhiber la chymase et la cathepsine G, les deux principales alternatives de l'ECA dans la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II.

2. Etude comparative du potentiel inhibiteur exercé par les cryptides marins sur l'activité de l'ECA

Dans le but d'évaluer l'effet du substrat utilisé dans la mesure de l'inhibition *in vitro* de l'activité de l'ECA, nous avons comparé les valeurs de CI 50 de 11 cryptides marins obtenues en utilisant comme substrat : le HHL, le FAPGG et l'angiotensine I. Ces valeurs de CI 50 ont été aussi comparées à celles obtenues avec les deux molécules de référence : le captopril (contrôle positif) et le losartan (contrôle négatif), afin de sélectionner les cryptides présentant le pouvoir inhibiteur le plus intéressant. Afin de calculer ces valeurs de CI 50, nous avons fait varier la concentration des cryptides Val-Tyr (VY), Val-Trp (VW), Lys-Trp (KW), Lys-Tyr (KY), Ile-Tyr (IY), Leu-Lys-Pro (LKP), Ala-Lys-Lys (AKK), Val-Ile-Tyr (VIY), Gly-Pro-Leu (GPL), Val-Ala-Pro (VAP) et Ala-Pro (AP) et des références entre 0.001-2000 µM. La dégradation du FAPGG a été suivie par spectrophotométrie. Alors que la dégradation du HHL et de l'angiotensine I respectivement en HA et en angiotensine II, a été suivie et quantifiée par HPLC.

2.1. Détermination de l'activité inhibitrice de l'ECA exercée par le captopril et le losartan en utilisant le FAPGG, le HHL et l'angiotensine I comme substrat

L'activité inhibitrice de l'ECA du captopril et du losartan a été mesurée avec les 3 substrats précédemment cités. La figure 26 présente les chromatogrammes de dégradation du HHL et de l'angiotensine I. Les temps de rétention sont compris entre 1 et 3 minutes, et les produits des réactions ont été élués avant les substrats.

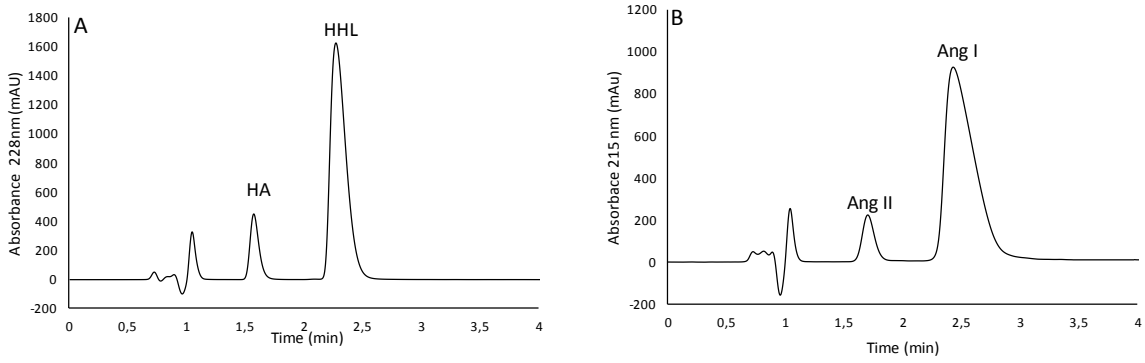


Figure 26 : Analyse par chromatographie liquide haute performance des produits d'hydrolyse du HHL (A) et de l'angiotensine I (B) par l'ECA.(A) le HA a été élué à 1,57 minutes, suivi par HHL à 2,27min, (B) L'angiotensine II a été éluée à 1,68 min suivie par l'angiotensine I à 2,45 min.

Le tableau 13 illustre les valeurs de CI 50 obtenues en fonction des 3 substrats testés.

Tableau 13: Concentrations inhibitrices (µM) en captopril et losartan nécessaires pour inhiber 50% l'activité de l'ECA dans nos conditions. Les résultats ont été obtenus avec le FAPGG, le HHL et l'angiotensine I comme substrat.

Molécules de réference	FAPGG	HHL	Angiotensine I
Captopril	0.00179±0.0003	0.0151±0.005	16.71±1.9
Losartan	17.13±1.4	49.61±3.7	146±11

La valeur de CI 50 la plus faible a été obtenue avec le captopril en utilisant le FAPGG comme substrat (CI 50 = 1,79 ±0,3 nM) tandis que les valeurs de CI 50 du captopril étaient respectivement de 10 à 10000 fois plus élevées avec le HHL et l'angiotensine I (CI 50=15,1±0,5 nM et CI 50=16.71±1,9 µM). La valeur de CI 50 du captopril obtenue avec le FAPGG comme substrat est en accord avec les données de la littérature qui étaient aussi de l'ordre du nanomolaire.

Bordenave *et al*. (1999) ont mesuré une CI 50 de 13,9±0,6 nM avec une concentration en FAPGG de 50 µM et un volume final de 1,2 ml. Vermeirssen et *al*. (2002) ont calculé une CI 50 de 1,56 nM, alors que Murray *et al*. (2004) ont rapporté des valeurs allant de 9,1 à 39,4 nM avec une concentration d'enzyme variant de 155 mU/ml à 222 mU/ml et une concentration de 0,8 mM de FAPGG. Lahogue et *al.* (2010) ont calculé une valeur de 1,75 nM lorsque la dégradation du FAPGG par l'ECA a été suivie par HPLC. Toutes ces valeurs sont de l'ordre

du nanomolaire. Nous pouvons donc suggérer que le captopril devrait être utilisé systématiquement comme molécule de référence dans chaque étude visant à identifier des inhibiteurs de l'ECA lorsque le FAPGG est utilisé comme substrat.

Bien que le losartan (figure 27.A) possède un certain pouvoir inhibiteur de l'ECA, les valeurs de CI 50 sont relativement élevées par rapport au captopril (figure 27.B). Ces valeurs allant de 17.13±1.4 µM avec le FAPGG comme substrat à 146±11 µM quand l'angiotensine I est le substrat. Dans notre étude, nous avons donc défini les valeurs de CI 50 obtenues avec le losartan comme des valeurs seuils au-delà desquelles les molécules seront considérées comme étant non inhibitrices de l'ECA.

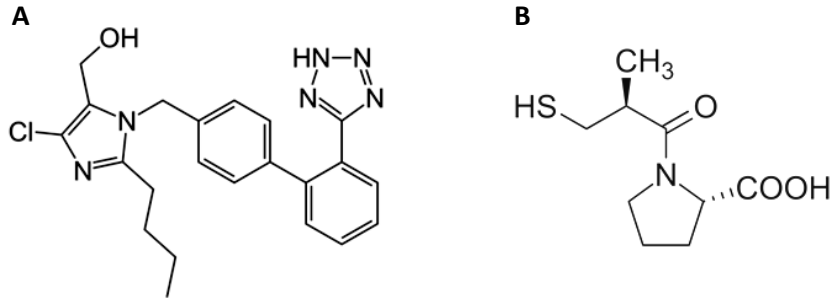


Figure 27: Structure chimique du losartan, antagoniste des récepteur AT1 (A) et du captopril, inhibiteur de l'ECA (B).

Le FAPGG et le HHL sont des substrats largement utilisés pour mesurer l'activité de l'ECA humaine dans le sérum. Ces substrats ont été par la suite utilisés pour mesurer l'inhibition de l'ECA par différents types de molécules dans les tests de criblage. Dans cette étude, nous avons ajouté le substrat naturel de l'ECA, l'angiotensine I humaine.

L'écart entre la CI 50 du captopril et celle du losartan quand l'angiotensine I est utilisé comme substrat est de 8 fois, alors que la différence est d'environ 10000 et 3300 fois respectivement lorsque le FAPGG et HHL sont utilisés comme substrat. Ceci pourrait être expliqué par la différence de l'affinité de l'enzyme pour les 3 substrats utilisés. L'ECA contient deux domaines appelés N et C, qui possèdent chacun un site catalytique actif. Ces deux sites sont subtilement différents en terme de spécificité de substrat, menant ainsi à une différence d'hydrolyse du substrat (Guang *et al*., 2012). En effet, il a été montré que le site actif du domaine C pouvait hydrolyser l'angiotensine I et le HHL plus rapidement, tandis que le site actif du domaine N hydrolyse préférentiellement d'autres substrats tels que l'angiotensine 1-7. De plus il a été établi que ces deux domaines de l'ECA avaient des affinités différentes pour les inhibiteurs tels que le captopril, le lisinopril, et le fosinoprilat (Michaud *et al*., 1997).

Ainsi, la comparaison des CI 50 devrait également inclure des valeurs d'inhibiteurs autres que celle du captopril.

2.2. Détermination de l'activité inhibitrice de l'ECA exercé par les cryptides marins en utilisant le FAPGG, le HHL et l'angiotensine I comme substrat

Les cryptides VY, VW, KW, KY, IY, LKP, AKK, VIY, GPL, VAP et AP, ont été précédemment identifiés dans la littérature comme des inhibiteurs de l'ECA issus d'hydrolysats de poissons ou de coproduits marins. Nous avons mesuré leurs CI 50 en utilisant les 3 substrats : FAPGG, HHL et angiotensine I. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Tableau 14: Concentration inhibitrice (µM) en captopril, losartan et cryptides marins nécessaire pour inhiber 50% l'activité de l'ECA dans nos conditions. Les résultats ont été obtenus avec le FAPGG, le HHL et l'angiotensine I comme substrat. Les valeurs en gras soulignent les valeurs des CI 50 de cryptides plus élevées que celles obtenues avec le losartan (contrôle négatif).

Inhibiteurs	FAPGG	HHL	Angiotensine I
Captopril	0,00179±0,0003	0,0151±0,005	16,71±1,9
Losartan	17,13±1,4	49,61±3,7	146±11
VY	1,64±0,2	0,067±0,009	0,22±0,01
VW	10,15±2	0,48±0,02	18,26±1.3
KW	12	1,7±0,02	108,33±3,88
KY	**85±7**	0,08±0,002	3,18±0,2
IY	**140±8**	0,88±0,08	1,03±0,06
LKP	13±2,5	0,076±0,006	0,41±0,03
AKK	0,090±0,002	0,178±0,01	**420,89 ±2,3**
VIY	**714,77 ± 8,65**	2,27±0,78	127,97±0,65
GPL	3,31±0,4	**1020±9**	**1074±7**
VAP	**52,54±9,15**	0,639±0,12	**458,2 ±3,62**
AP	**135,22±13,38**	18,97±1,71	**437,72±4,00**

Comme le montre le tableau 14, les valeurs de CI 50 des peptides, sont supérieures à celles du captopril lorsque le FAPGG ou le HHL sont utilisés comme substrats. Certains peptides présentent des CI 50 égales ou inférieures à celles du captopril lorsque l'angiotensine I, est utilisée comme substrat.

En effet, la CI 50 du VW (18,26±1,3 µM) a été très proche de celle du captopril (16,71±1,9 µM), tandis que les CI 50 de VY (0,22±0,01 µM), KY (3,18±0,2 µM), IY (1,03±0,06 µM), et LKP (0,41±0,03 µM) été plus faibles.

En comparant, les valeurs des CI 50 des cryptides évaluées avec la méthode HHL avec celles trouvées en utilisant l'angiotensine I, on remarque que toutes les CI 50 déterminées en utilisant l'angiotensine I comme substrat sont supérieures à celles déterminées avec le HHL quel que soit le cryptide testé. Nos résultats sont en accord avec de précédents travaux de Ruiz-Giménez et *al*. (2011) qui ont montré que les valeurs des CI 50 d'héxa et héptapeptides synthétiques obtenues avec l'angiotensine I comme substrats étaient plus élevées que celles mesurées avec le HHL. En outre, d'après le tableau 14, plusieurs peptides présentent des CI 50 (en gras dans le tableau) supérieures à la CI 50 de notre contrôle négatif, le losartan. En se référant au seuil fixé dans cette étude, les cryptides : KY, IY, VIY, VAP et AP semblent ne pas être de bons inhibiteurs de l'ECA *in vitro* lorsque le FAPGG est utilisé comme substrat. Par ailleurs, quand le HHL est utilisé comme substrat, seul le cryptide GPL présente une CI 50 plus importante que le losartan. Alors que les cryptides AKK, GPL, VAP et AP présentent des CI 50 supérieures à celle du losartan quand l'angiotensine I a été le substrat de la réaction.

L'utilisation de la CI 50 pour définir l'activité biologique est un outil pratique pour comparer le potentiel inhibiteur des peptides lorsque les mesures étaient effectuées dans les mêmes conditions (même nature et concentration de substrat, même quantité d'enzyme, même tampon, même méthode de détection, etc.). Cependant, nous considérons que cette méthode présente quelques limites si les valeurs de CI 50 ne sont pas comparées à celles de molécules de références mesurées dans les mêmes conditions.

D'une façon générale, aucune corrélation entre les valeurs des CI 50 des cryptides avec les 3 substrats n'a été observée. Par exemple, le cryptide AKK, présente la CI 50 la plus faible parmi tous les cryptides testés lorsque le FAPGG est utilisé comme substrat (CI 50=0,090±0,002 µM) alors que sa CI 50 est 4 fois supérieure au losartan lorsque elle est mesurée avec l'angiotensine I.

La figure 28 présente une analyse de corrélation des valeurs des Log CI 50 de chaque cryptide déterminées avec les 3 méthodes : HHL, FAPGG, et angiotensine I. Les valeurs de CI 50 à

l'intérieur du carré sont considérées comme intéressantes pour l'inhibition *in vitro* de l'ECA, dans la mesure où elles sont toutes inférieures à celles obtenues avec le losartan.

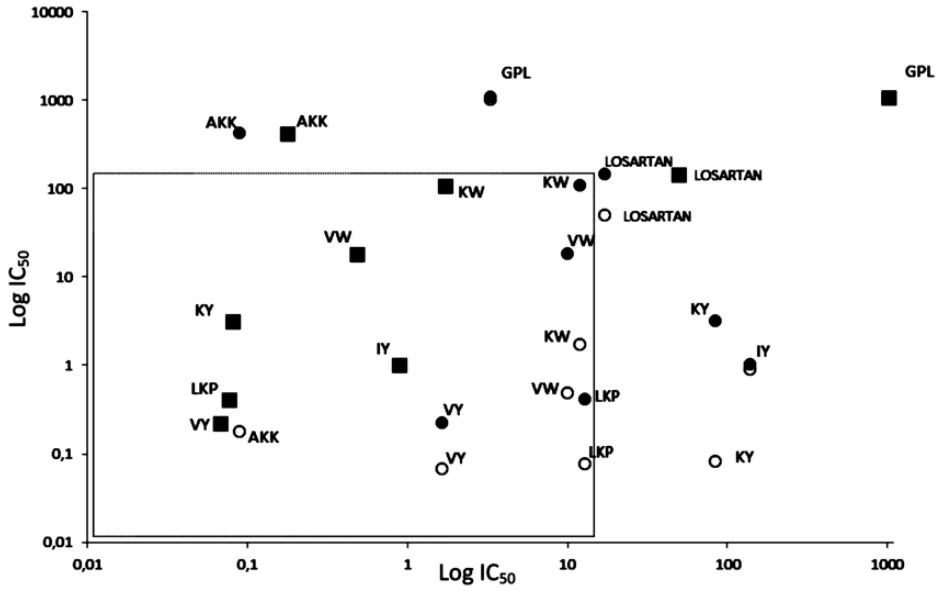


Figure 28: Analyse de corrélation du Log CI 50 utilisant l'angiotensine-I, le FAPGG, ou le HHL comme substrat. ■ : angiotensine-I vs HHL;○ : HHL vs FAPGG;● :angiotensine-I vs FAPGG.

D'après le tableau 14 et la figure 28, le cryptide VY semble avoir le potentiel inhibiteur le plus intéressant dans notre étude. En effet, il présente les valeurs de CI 50 parmi les plus faibles quel que soit le substrat utilisé. Ses valeurs de CI 50 sont toutes inférieures à celles du losartan. De plus, sa CI 50 (0,22±0,01 µM) est environ 75 fois plus faible que le captopril (16,71±1,9 µM) lorsque le substrat naturel de l'ECA (angiotensine I) est utilisé comme substrat.

Le cryptide VY a été pour la première fois isolé et identifié à partir de l'hydrolysat protéique du muscle de la sardine avec une activité inhibitrice de l'ECA CI 50=10 µM (Matsufuji *et al*., 1994). Ce cryptide qui correspond au fragment (3-4) de la séquence de l'angiotensine I (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu) a été retrouvé dans d'autres ressources marines tels que les écailles de dorade (Fahmi et *al*., 2004), l'algue comestible *Undaria pinnatifida* (Suetsuna *et al*., 2004), ou encore dans d'autres sources comme une boisson de riz fermentée japonaise (Saito *et al.*, 1994). Il a été rapporté que ce cryptide résiste à la digestion gastro-intestinale et se retrouve intact dans la circulation sanguine (Matsui *et al*., 2002b). De plus, son activité antihypertensive a été vérifiée *in vivo* sur des rats spontanément hypertensifs

(SHR) et sur des sujets hypertensifs (Kawasaki *et al*., 2000 ; Suetsuna *et al*., 2004). Ainsi, ce cryptide ubiquitaire semble être doté d'un potentiel prometteur comme agent antihypertensif naturel. En plus du peptide VY, on remarque que 3 autres peptides : VW, KW et LKP présentent des valeurs de CI 50 plus faibles que le losartan quel que soit le substrat utilisé.

Le cryptide LKP a été mis en évidence après une hydrolyse par l'ECA du peptide LKPMN, un peptide plus long issu d'un hydrolysat de bonite séchée. Sa CI 50 mesurée avec le HHL était de 0,32 µM (Fujita et Yoshikawa, 1999). Il a également été identifié dans hydrolysat protéique de blanc d'œufs (Majumder et Wu, 2011)

Quant à VW, il a été identifié dans le saumon avec une CI 50 de 2,5 µM (HHL) (Ono *et al*., 2003), dans l'algue *Undaria pinnatifida* (Suetsuna *et al.*, 2004) avec une CI 50 de 10,8 µM (HHL), et aussi dans l'hydrolysat protéique de colza avec une CI 50 de 1,6 µM (HHL) (Marczak *et al.*, 2003).

KW a été identifié dans le muscle de la sardine (Matsufuji *et al*., 1994) et dans l'hydrolysat du muscle du poulet (Terashima *et al*., 2011). Dans la mesure où les valeurs de CI 50 de ce dernier, obtenues avec le FAPGG (12 µM) et l'angiotensine-I (108.33±3.88 µM) sont proches de celles du losartan (CI 50=17,13±1,4 µM et CI 50=146±11 µM respectivement avec le FAPGG et l'angiotensine I), il semble moins intéressant comme inhibiteur de l'ECA que les peptides VY, VW et LKP.

2.3. Analyse SWOT des 3 méthodes HHL, angiotensine I et FAPGG

Pour les 3 protocoles testés utilisant les 3 substrats HHL, FAPGG et l'angiotensine I, une analyse SWOT : **S**trengths (forces), **W**eaknesses (faiblesses), **O**pportunities (opportunités), **T**hreats (menaces) a été réalisée afin de comparer les différentes méthodes. Dans notre étude, toutes les expériences ont été effectuées en microplaques permettant ainsi de tester de manière économique jusqu'à 96 échantillons en une seule étape (possibilité de tester : plusieurs concentrations et différents inhibiteurs). La figure 29 présente une analyse SWOT des 3 tests utilisés pour l'évaluation de l'inhibition de l'ECA.

FAPGG comme substrat de l'ECA	
Forces Bien documenté dans la littérature Temps d'analyse court (5min) pour toute une microplaque Matériels simples (spectrophotomètre) Sans danger (pas de solvant nécessaire) Coût (41 euros /25 mg)	**Faiblesses** CI 50 mesurée à partir des pentes correspondant à la diminution du substrat. Substrat synthétique
Opportunités Test pratique pour le criblage	**Menaces** Légère variation de la DO Reproductibilité

HHL comme substrat de l'ECA	
Forces Bien documenté dans la littérature CI 50 calculée après quantification du produit après séparation par HPLC Coût (23,2 euros / 25mg)	**Faiblesses** Equipement HPLC avec injecteur compatible microplaques et colonne. Temps d'analyse: 11 min par puits (6 min + 5 min équilibration de la colonne) Substrat synthétique
Opportunités Le temps d'analyse pourrait être réduit en optimisant les conditions d'analyse	**Menaces** Peptide testé élué en mème temps que le produit quantifié (HA)

Angiotensine I comme substrat de l'ECA	
Forces Substrat naturel	**Faiblesses** Equipement HPLC compatible avec injecteur de microplaques et colonne. Temps d'analyse: 11 min par puits (6 min + 5 min équilibration de la colonne) Coût (angiotensine I: 622,5 euros / 25mg)
Opportunités Le temps d'analyse pourrait être réduit en optimisant les conditions d'analyse Le cout pourrait être réduit en optimisant les conditions d'analyse et de détection	**Menaces** Peptide testé élué en mème temps que le produit quantifié (angiotensine I)

Figure 29: Forces, faiblesses, opportunités et menaces des tests *in vitro* de mesure de l'inhibition de l'ECA en utilisant le FAPGG, le HHL et l'angiotensine I en tant que substrats.

Avec un temps d'analyse très court (5 min) et une mesure de dégradation du substrat par simple spectrophotométrie, la méthode utilisant le FAPGG comme substrat s'est révélée la plus facile et la plus rapide à mettre en œuvre pour évaluer la valeur de CI 50 des inhibiteurs. Le FAPGG a un prix relativement raisonnable et le protocole est réalisé sans utilisation de

solvant. De ce fait, ce test se présente comme étant le plus propre et sans danger vis-à-vis de la santé humaine et de l'environnement. De plus, ce test est utile pour l'évaluation rapide et la comparaison des activités inhibitrices de l'ECA des fractions d'hydrolysats obtenues. Cependant, la diminution de l'absorbance étant, dans certains cas, difficile à être évaluée constitue un inconvénient. La rapidité de l'ajout d'enzyme que requiert le test afin d'initier la réaction conduit parfois à des erreurs de prélèvement et donc à un défaut de reproductibilité des résultats. Ce test devrait donc être accompagné d'une vérification de l'activité biologique en utilisant d'autres substrats *in vitro* suivi d'études *in vivo*.

Avec le HHL et l'angiotensine I en tant que substrat, nous avons utilisé une HPLC pour la séparation et la quantification des produits de réaction, ce qui nécessite d'avantage d'investissements matériels et de formation. Chaque échantillon a besoin d'un temps d'analyse de 15 min. De ce fait, environ une journée sera nécessaire pour analyser le contenu de toute une microplaque. Toutefois, ces deux méthodes présentent l'avantage de pouvoir suivre les produits de réaction séparés sur le chromatogramme. Ainsi, il est possible de déterminer si les peptides sont potentiellement des substrats de l'ECA ou s'ils sont seulement des inhibiteurs. Compte tenu du prix élevé de l'angiotensine I, son utilisation devrait être réservée à la confirmation des activités biologiques de peptides purifiés, précédemment sélectionnés après des tests d'inhibition de l'ECA utilisant des substrats synthétiques.

Nos résultats indiquent que la mesure de l'effet inhibiteur est dépendante du substrat utilisé et mettent l'accent sur l'importance d'indiquer le substrat lorsque la CI 50 est mentionnée ou comparée à d'autres études. En plus de la valeur d'un inhibiteur de référence bien établie de l'ECA comme le captopril, le niveau de l'activité biologique devrait également être modulé par une molécule non inhibitrice et bien sûr vérifié par des tests *in vivo* sur des modèles animaux puis, éventuellement des tests cliniques.

Les substrats synthétiques tels que le HHL et le FAPGG conviennent au criblage des fractions protéiques inhibitrices de l'ECA. L'angiotensine I devrait aussi être utilisée pour évaluer l'activité inhibitrice de l'ECA mais réservé pour les molécules connues pour des raisons économiques. Un autre substrat fluorescent synthétique, l'o-aminobenzoylglycyl-p-nitrophenylalanylproline (Abz-Gly-Phe (NO2)-Pro; Abz), a été développé pour mesurer l'activité inhibitrice de l'ECA mais n'a pas été intégré dans cette étude. Les tests préliminaires réalisés avec ce substrat semblent indiquer une interférence des cycles aromatiques des

peptides lors de la mesure de la fluorescence. De plus, son coût est relativement élevé par rapport aux autres substrats utilisés dans cette étude.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans le journal *Agricultural and Food Chemistry* en octobre 2013.

3. Etude du potentiel inhibiteur des cryptides marins sur l'activité de la cathepsine G et de la chymase

3.1. Détermination de l'activité inhibitrice de la cathepsine G exercé par les cryptides marins

Le potentiel inhibiteur des cryptides VY, VW, KW, KY, IY, LKP, AKK, VIY, GPL, VAP et AP, a été testé sur l'activité de la cathepsine G en utilisant l'angiotensine I comme décrit dans le paragraphe 2.1.2 du chapitre II « matériels et méthodes ». Nous avons testé la chymostatine et les cryptides à différentes concentrations (0,01 µM à 2000 µM) afin de déterminer les valeurs de CI 50. Les résultats obtenus suite à l'étude de l'inhibition de la cathepsine G, sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15: Concentration inhibitrice (µM) en chymostatine et cryptides marins nécessaire pour inhiber 50% l'activité de la cathepsine G dans nos conditions du test. Les résultats ont été obtenus avec l'angiotensine I comme substrat.

Inhibiteurs	CI 50 (µM)
Chymostatine	2,6 ±0,07
VY	1218,5±6,74
VW	1186,35±24,22
KW	ND*
KY	946,5±39,30
IY	967,05±15,99
LKP	1040,72±50,34
AKK	538,27±19,96
VIY	1189,1±14,83
GPL	301,77±17,30
VAP	139,6±19,86
AP	420,38±28,6

*ND : Non déterminée

D'après le tableau 15, tous les cryptides testés présentent une activité inhibitrice de la cathepsine G. Les di et tripeptides ayant dans leur séquence un acide aminé aromatique en position C-terminale présentent le potentiel inhibiteur le plus faible avec des CI 50 très proches, tous de l'ordre du millimolaire. Parmi les onze cryptides testés, GPL, VAP et AP présentent les CI 50 les plus faibles.

Le cryptide VAP présente l'activité inhibitrice la plus élevée avec une CI 50=139,6±19,8 µM. Cette CI 50 est environ 2 à 3 fois plus faible que les CI 50 respectives de GPL et de AP. Cependant, la valeur de CI 50 du VAP potentiellement inhibiteur de la cathepsine G, se révèle être environ 53 fois plus importante que celle obtenue avec l'inhibiteur de référence : la chymostatine (CI 50=2,6 ±0,07 µM). Les CI 50 du GPL (CI 50=301,77±17,3 µM) et de AP (CI 50=420,3±28,6 µM) sont respectivement 115 et 161 fois plus élevées que celles de la chymostatine.

En comparant les structures des 3 cryptides qui présentent l'inhibition la plus importante : VAP, AP et GPL avec celle de la chymostatine, on note une certaine homologie entre le peptide GPL et la chymostatine A (figure 30) : la présence d'un résidu glycine, suivit d'un hétérocycle et ensuite de la glycine. La séquence GPL est présente dans la séquence du substrat fluorogénique, Acetyl-Gly-Pro-Leu-Asp-7-amido-4-methylcoumarin (Ac-GPLD-AMC), un dérivé peptidique utilisé pour mesurer l'activité des caspases qui a été rapporté comme un inhibiteur allostérique des enzymes «chymotrypsin like», comme la cathepine G (Kisselev *et al*., 2003).

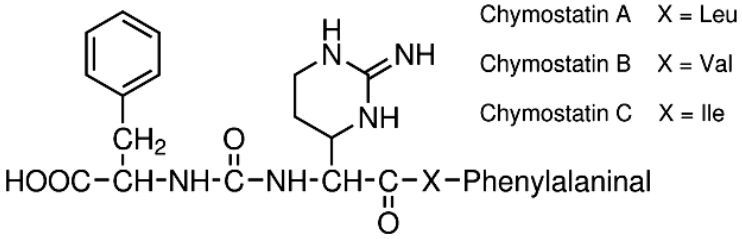


Figure 30 : Structure chimique de la chymostatine

Le peptide VAP qui a montré le potentiel inhibiteur le plus marqué comparativement aux autres cryptides testés, se retrouve dans la séquence de l'octapeptide (VT**VAP**VHI) un inhibiteur de la cathepsine G rapporté par Yavin *et al*., (1997). Ce peptide issu de l'hydrolyse du fragment (f 89-96) de la protéine C réactive a montré un potentiel inhibiteur de l'activité de la cathepsine G (*Ki*=120±15 µM) et de l'élastase (*Ki*=1400±200 µM) isolées toutes les

deux des leukocytes humains. Ce potentiel était plus important que celui des peptides de même longueur correspondant à des séquences d'inhibiteurs naturels de la cathepsine G : l'*α1*-antitrypsine et l'α-antichymotrypsine.

Yavin *et al.* (1997) ont aussi rapporté que d'autres peptides inhibiteurs de la cathepsine G pouvaient être issus de fragments de la protéine C réactive humaine et ont démontré que l'allongement de la chaîne peptidique augmentait le potentiel inhibiteur de ces peptides. Ceci pourrait suggérer que des peptides à plus longue chaîne pourraient être de meilleurs inhibiteurs de l'activité de la cathepsine G que ceux à courte chaîne qui sont choisis délibérément pour notre étude.

Plusieurs inhibiteurs de la cathepsine G ont été rapportés, tels que les dérivés d'acides β-ketophosphonate, les acides et les esters d'aminoalkylphosphoniques et les dérivés peptidiques d'origine naturelle, qui semblent être les plus prometteurs (Kosikowska et Lesner, 2013). Le peptide VAP, a été précédemment identifié dans les hydrolysats protéiques de carpe (Chen *et al*., 2012), ou encore de caséine (Maruyama *et al.*, 1987). Dans notre étude, ce cryptide a montré le potentiel inhibiteur de la cathepsine G le plus faible relativement aux autres cryptides testés mais son activité reste plutôt faible par rapport à la chymostatine (inhibiteur de référence).

3.2. Détermination de l'activité inhibitrice des cryptides marins sur la chymase

Le potentiel inhibiteur des cryptides VY, VW, KW, KY, IY, LKP, AKK, VIY, GPL, VAP et AP a été testé sur l'activité de la chymase humaine en utilisant l'angiotensine I comme substrat, comme décrit dans le paragraphe 2.1.3 du chapitre II « matériels et méthodes ». Comme pour l'étude de l'inhibition de la cathepsine G, nous avons déterminé la CI 50 de notre inhibiteur de référence : la chymostatine. Puis, nous avons testé les cryptides à différentes concentration (0,01µM à 2000 µM). Les résultats obtenus suite à l'étude de l'inhibition de la chymase sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16: Concentration inhibitrice (µM) en chymostatine et cryptides marins nécessaire pour inhiber 50% l'activité de la chymase dans nos conditions du test. Les résultats ont été obtenus avec l'angiotensine I comme substrat.

Inhibiteurs	CI 50 (µM) ou % d'inhibition
Chymostatine	0,19±0,04
VY	1487,1±97,8
VW	658,57±11,5
KW	ND*
KY	41,6 % à 2000 µM
IY	9,1% à 2000 µM
LKP	20,4% à 2000 µM
AKK	1658,1±73,6
VIY	8 % à 2000 µM
GPL	32,8% à 2000 µM
VAP	25,3% à 2000 µM
AP	1658,7 ±55,6

*ND : Non déterminée

D'après le tableau 16, tous les cryptides testés présentent un effet inhibiteur, mais à forte concentration. Parmi les peptides testés VW présente le potentiel inhibiteur le plus élevé avec une CI 50 de 658,57±11,5 µM. Toutefois, cette valeur est très largement supérieure à celle obtenue avec l'inhibiteur de référence, la chymostatine (0,19±0,04 µM). De plus, en comparant sa valeur de CI 50 par rapport à celles des inhibiteurs de nature peptidique et non peptidiques de la chymase rapportés dans la littérature (tableau 17), les cryptides inhibiteurs de l'ECA choisis dans cette étude sont de piètres rivaux. L'activité enzymatique de la chymase humaine a été rapporté comme n'étant pas inhibée par les inhibiteurs chimiques de l'ECA (Miyazaki et Takai, 2000; Cristovam *et al*., 2008). En effet, le captopril n'a montré aucun effet *in vivo* sur la génération d'angiotensine II chez des sujets humains à partir du peptide [$Pro^{11}{}_{D}$-Ala^{12}] angiotensine I, un substrat résistant à la dégradation par l'ECA élaboré spécifiquement pour la chymase (McDonald *et al*., 2001).

Tableau 17: Exemples d'inhibiteurs de la chymase humaine rapportés dans la littérature.

Inhibiteurs	CI 50	Références
Suc-Val-Pro-PheP(OPh)2	2,8 nM	(Takai *et al*., 2000)
NK3201 (2-(5-formyla-mino-6-oxo-2-phenyl-1,6-dihydropyrimidine-1-yl)-N-[{3,4dioxo-1-phenyl-7-(2-pyridyloxy)}-2-heptyl] acetamide)	2,5 nM	(Takai *et al*., 2001a)
BCEAB (4-[1-[[bis-(4-methyl-phenyl)-methy]-carbamoyl]3-(2-ethoxy-benzyl)-4-oxo-azetidine-2-yloxy]-benzoic Acid),	5,4 nM	(Takai *et al*., 2001b)
SUN-C8257, 3-[(3-amino-4-carboxy) phenylsulfonyl]-7chloroquinazoline-2,4(1H,3H) dione)	310 nM	(Uehara *et al*., 2002)
TY51184,(2-[4-(5-Fluoro-3-methylbenzo[b]thiophen-2-yl) sul sulfonamido-3-methanesulfonylphenyl]oxazole-4-carboxylicacid)	37 nM	(Takai *et al*., 2004)

Dans la mesure ou la chymase est particulièrement active dans les ventricules et serait responsable de 90 % de la conversion de l'Ang I en Ang II dans le tissu cardiaque humain (Balcells *et al*., 1997 ; Swynghedauw, 1999), les inhibiteurs de la chymase pourraient être utiles dans la prévention des maladies cardio-vasculaires. D'autres séquences peptidiques dérivées de sources alimentaires devraient être testés afin d'identifier de potentiels inhibiteurs naturels de la chymase.

L'étude de l'activité inhibitrice de nos cryptides marins sur les deux protéases à sérines révèle un effet inhibiteur de la cathepsine G par les cryptides VAP, AP et GPL avec un potentiel inhibiteur largement inférieur à celui de la chymostatine, notre inhibiteur de référence. Cependant, ces trois cryptides ne présentent pas un potentiel d'inhibition de l'activité de la chymase.

La chymase et la cathepsine G présentent d'importantes homologies de séquences (Korkmaz *et al*., 2011). Ces deux enzymes présentent des spécificités similaires vis-à-vis de nombreux substrats et d'inhibiteurs. Toutefois, certains inhibiteurs se trouvent être spécifiques d'une enzyme plutôt que d'une autre. Par exemple, Shimatani *et al*. (2006) ont isolé deux composés pyridones nommés SPF-32629 A et B. Le composé SPF-32629 B se révèle être spécifique de la chymase et n'inhibe pas la cathepsine G.

A notre connaissance, aucun peptide dérivé de protéine de source alimentaires n'a été identifié à ce jour comme inhibiteur de la chymase ou de la cathepsine G. Lehtinen *et al*. (2010) a testé l'activité inhibitrice de 3 tripeptides dérivés de la caséine du lait précédemment identifiés comme inhibiteurs de l'ECA : VPP, LPP et IPP sur l'activité de 5 enzymes impliquées dans le système rénine-angiotensine dont notamment la chymase et la cathepsine G. Ces auteurs n'ont pas observé d'inhibition de ces deux enzymes par les 3 peptides testés. Ils ont conclu que ces 3 peptides, dont l'action antihypertensive a été démontrée *in vivo* sur des modèles animaux et sur des sujets humains agissent sur la régulation de la pression artérielle probablement en inhibant sélectivement l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

4. Conclusion

Les peptides dérivés de ressources naturelles en général et d'origine marine en particulier ont un potentiel prometteur en tant qu'ingrédients fonctionnels dans la formulation des produits nutraceutiques et pharmaceutiques. Ceci est dû notamment à leur effet bénéfique dans la modulation de l'hypertension artérielle largement rapporté dans la littérature. Leur principal avantage pourrait être l'absence d'effets secondaires car ils semblent être bien tolérés par l'organisme.

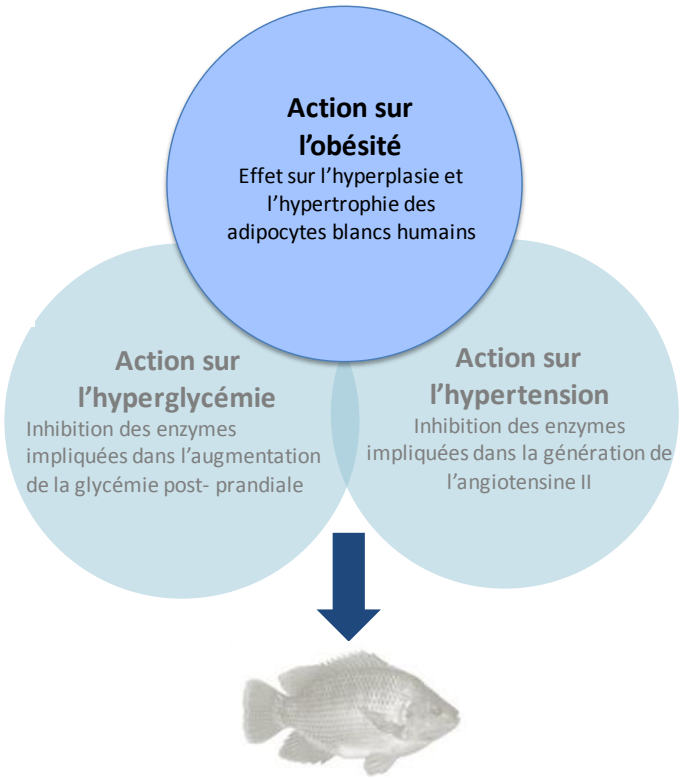
Dans la première partie de ce chapitre, nous avons évalué l'effet antihypertensif des 11 cryptides marins (VW, VY, KY, KW, IY, AP, LKP, VIY, GPL, VAP et AKK) via l'inhibition de l'activité de l'ECA en utilisant 3 substrats différents. Les valeurs d'inhibition obtenues pour le captopril (inhibiteur de référence), pour le losartan (molécule non inhibitrice) et pour nos peptides étaient clairement dépendantes du substrat mis en œuvre. Parmi, les cryptides testés VY, VW, LKP et KW sont considérés dans notre étude comme de bons inhibiteurs de l'ECA. En effet, leurs valeurs de CI 50 étaient inférieures à celles du losartan quel que soit le substrat testé.

Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons étudié l'effet inhibiteur de ces cryptides marins sur les deux principales alternatives de l'ECA : la chymase et la cathepsine G. Le potentiel inhibiteur le plus marqué exercé sur l'activité de la cathepine G a été obtenu avec le cryptide VAP alors que VW a présenté le potentiel inhibiteur le plus marqué vis-à vis de la chymase. Toutefois, les valeurs de CI 50 obtenues semblent montrer que ces molécules sont de mauvais inhibiteurs des activités chymase et cathepsine G. Les peptides VY et LKP sont considérés comme de bons inhibiteurs de l'ECA selon notre étude et la littérature. Leur activité antihypertensive a été précédemment vérifiée *in vivo.* Elle est probablement médiée par une inhibition sélective de l'ECA.

D'autres études devront être menées afin d'identifier des cryptides qui pourraient cibler différentes enzymes impliquées dans la génération de l'angiotensine II, ce qui pourrait conférer une inhibition plus complète de la production d'angiotensine II. La caractérisation des paramètres cinétiques des enzymes étudiées et le type d'inhibition des cryptides pourraient conduire à une meilleure compréhension du mécanisme d'action de ces derniers.

Partie 2 : Cryptides marins et obésité

Les cryptides marins sont-ils capables de cibler les pathologies du syndrome métabolique ?



Identification de cryptides dans l'hydrolysat protéique de co-produits de poisson

1. Introduction

L'obésité est caractérisée au niveau cellulaire par une augmentation du nombre (hyperplasie) et de la taille (hypertrophie) des adipocytes provenant de pré-adipocytes fibroblastiques contenus dans les tissus adipeux (Furuyashiki *et al*., 2004). Les pré-adipocytes, qui peuvent ensuite être différenciés en adipocytes matures, modulent la masse grasse, et jouent donc un rôle clé dans le développement de l'obésité (Park *et al*., 2013).

Les études épidémiologiques ont toujours montré une corrélation étroite entre le poids corporel et la pression artérielle. 70% de l'hypertension chez les hommes et 60% chez les femmes sont directement liés à l'excès d'adiposité (Sharma *et al*., 2001). La signification fonctionnelle de la production des composants système rénine-angiotensine et la sur-activation de ce système chez les sujets obèses est un domaine de recherche intense. L'angiotensine II augmente la lipogenèse et l'accumulation de triglycérides dans les adipocytes murins 3T3-L1 et adipocytes humains (Jones *et al*., 1997 ; Sarzani *et al*., 2008). Crandall *et al*. (1999) ont observé que la stimulation de pré-adipocytes humains avec l'angiotensine II avait entraîné une accélération de la phase G1 du cycle cellulaire et une augmentation dans l'expression du régulateur du cycle cellulaire : la cycline D1 (Crandall *et al*., 1999). Ceci suggère que l'angiotensine II peut contribuer à la croissance et au développement du tissu adipeux. **Le blocage du système rénine-angiotensine pourrait être particulièrement utile dans le traitement de l'obésité probablement en contrôlant l'hypertrophie des adipocytes et en réduisant le nombre d'adipocytes fonctionnels**.

Il a de plus été montré que les deux inhibiteurs de l'ECA : l'énalapril et le perindopril, avaient pu diminuer la masse corporelle chez le rat (Carter *et al*., 2004; Fayez *et al.*, 2011). Townsend (2001) a constaté que l'énalapril était capable de contrôler la micro-circulation sanguine dans le tissu adipeux ainsi que la taille et le nombre de cellules graisseuses. Ceci pourrait ainsi conduire à une diminution du poids corporel et de la masse grasse. De plus, Velkoska *et al.*, (2010) ont suggéré qu'une réduction de l'activité de l'ECA hépatique par le périndopril pouvait affecter l'accumulation des lipides dans le tissu adipeux. Ces auteurs ont démontré que le traitement par l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine avait diminué de façon significative les taux circulants de leptine, une hormone produite par les adipocytes proportionnellement à l'augmentation de leur taille suite à l'accumulation de graisse. **Toutes ces études suggèrent que les inhibiteurs de l'ECA pourraient ainsi contribuer à atténuer l'obésité en agissant sur le cycle de vie des adipocytes**.

Cependant les inhibiteurs de l'ECA synthétiques ont souvent des effets secondaires indésirables : toux sèche, éruptions cutanées et fièvre (Atkinson et Robertson, 1979 ; Dicpinigaitis, 2006). Les peptides bioactifs dérivés de produits alimentaires naturels pourraient être donc des alternatives intéressantes à utiliser dans la prévention et/ou le traitement de l'obésité. Au laboratoire, Hammé *et al*. (2010) ont démontré que l'incubation des adipocytes humains avec un hydrolysat de lactosérum de chèvre contenant des peptides inhibiteurs de l'ECA avait diminué la prolifération des pré-adipocytes et avait réduit la teneur en lipides d'adipocytes matures (Hammé *et al*., 2010).

Ce chapitre a pour objectif d'évaluer si des cryptides marins, déjà identifiés dans la littérature comme inhibiteurs de l'ECA, pouvaient agir sur les étapes stratégiques du cycle de vie des adipocytes. Nous avons étudié l'action de 6 dipeptides (Val-Trp (VW), Val-Tyr (VY), Lys-Tyr (KY), Lys-Trp (KW), Ile-Tyr (IY), Ala-Pro (AP)) et 5 tripeptides (Val-Ile-Tyr (VIY), Leu-Lys-Pro (LKP), Gly-Pro-Leu (GPL), Ala-Lys-Lys (AKK), Val-Ala-Pro (VAP)) sur le développement d'adipocytes blancs sous-cutanés. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'action de ces cryptides sur l'hyperplasie des adipocytes en évaluant la viabilité cellulaire après une incubation avec les cryptides pendant la phase de croissance et de différenciation des adipocytes.

Ensuite, nous avons analysé l'effet des cryptides sur l'hypertrophie des adipocytes en mesurant leur impact sur la différenciation des adipocytes. La modulation de la différenciation par les cryptides marins a été évaluée par la mesure de leur effet sur l'accumulation des lipides dans les adipocytes matures après différents temps d'exposition ainsi que par la mesure de l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH). Enfin, nous avons tenté de comprendre le mode d'action des cryptides ayant montré un effet significatif sur la différenciation par la mesure de changements quantitatifs dans l'expression des marqueurs de différenciation adipocytaire.

2. Influence des cryptides inhibiteurs de l'ECA *in vitro* sur les adipocytes blancs humains

Nous avons étudié l'effet *in vitro* de cryptides marins sur la prolifération et la différenciation des pré-adipocytes blancs humains (HWP). Ceci a été entrepris afin d'identifier leurs potentiels dans la modulation du développement excessif du tissu adipeux, première étape menant à l'obésité. Nous avons défini la concentration des cryptides à 100 µM après un screening de concentrations allant de « 1 à 1000 µM ». Cette concentration relativement importante a été fixée afin d'identifier plus rapidement les peptides exerçant une action sur le développement des adipocytes.

2.1. Effet de cryptides marins sur la viabilité des pré-adipocytes blancs humains pendant la prolifération et la différenciation.

Dans un premier temps nous avons évalué l'effet des cryptides marins sur la viabilité cellulaire au cours de la phase de prolifération. Les cellules ont été traitées avec 100 µM de VW, KW, IY, KY, VIY, VY, LKP, GPL, AKK, AP, et VAP après un jour de dépôt en plaque à raison de 5000 cellules/puits. Le pourcentage de viabilité cellulaire a été évalué après 24 h et 72 h de traitement par le test MTT comme décrit dans le paragraphe 3.2.1 du chapitre II « matériels et méthodes ».

Comme le montre les figures 31.A et B, les cryptides AP, VAP et AKK affectent de manière significative la viabilité cellulaire. La mortalité la plus importante est observée lorsque les pré-adipocytes ont été traités avec le peptide VAP. En effet, la viabilité cellulaire a diminué de 59,3±7,3% et de 81,1±4,3% par rapport aux cellules contrôles après 24 h et 72 h de traitement avec le peptide VAP. La viabilité, suite à un traitement avec AP et AKK, a diminué respectivement de 46,4±3,9% et de 24,5±5,3% après 24 h et de 55,8 ± 4,5% et 22,8 ± 4,3% après 72 h d'incubation. Toutefois, la viabilité cellulaire après une incubation de 24 h et 72 h avec les peptides VY, IY, KY, VW, KW, LKP, VIY et GPL, ne semble pas être affectée. Aucun effet significatif n'a été observé avec ces cryptides puisque la viabilité des cellules reste sensiblement proche de celle des cellules contrôles.

Seuls les peptides AP, VAP et AKK semblent avoir un effet cytotoxique (évalué après 24 h) et antiprolifératif (évalué après 72 h) sur les pré-adipocytes en phase de croissance.

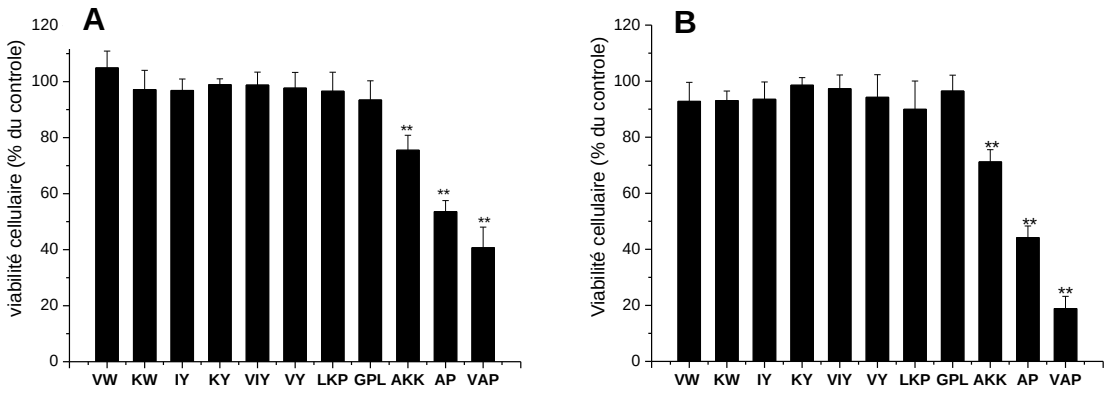


Figure 31: Effet des cryptides sur la viabilité cellulaire des pré-adipocytes humains blancs au cours de la prolifération, après 24 h (A) et 72 h (B) de traitement. La viabilité des cellules a été exprimée en pourcentage des cellules non traitées (témoins). Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart à la moyenne (SEM), avec n = 24 répétitions. ** Indique une différence significative par rapport au groupe non traité (p <0,01).

Dans un deuxième temps, les cryptides ne présentant pas d'effet sur la prolifération cellulaire pendant la phase de croissance ont été ensuite incubés avec les pré-adipocytes blancs humains pendant la période de différenciation (du jour 0 au jour 12). Après une phase de croissance sans traitement, les cellules ont été induites en différenciation en présence de 100 µM de VW, VY, IY, KY, VIY, KW, GPL et LKP. L'analyse MTT a été réalisée après 3, 6, 9 et 12 jours de traitement lors de la phase de différenciation. Les viabilités cellulaires obtenues après un traitement avec les différents cryptides pendant la phase de différenciation sont illustrées dans la figure 32.

Comme le présente cette figure, un effet significatif sur la viabilité cellulaire n'a été observé qu'avec un traitement par VW et KW. En effet, dès 3 jours de traitement, la viabilité cellulaire a diminué respectivement de 24,5±2,7 % et de 18,6±5 % par rapport aux cellules contrôles. Après 12 jours de traitement par VW et KW, la viabilité cellulaire a diminué respectivement en 32,8±5,1% et 26,8±4,3%.

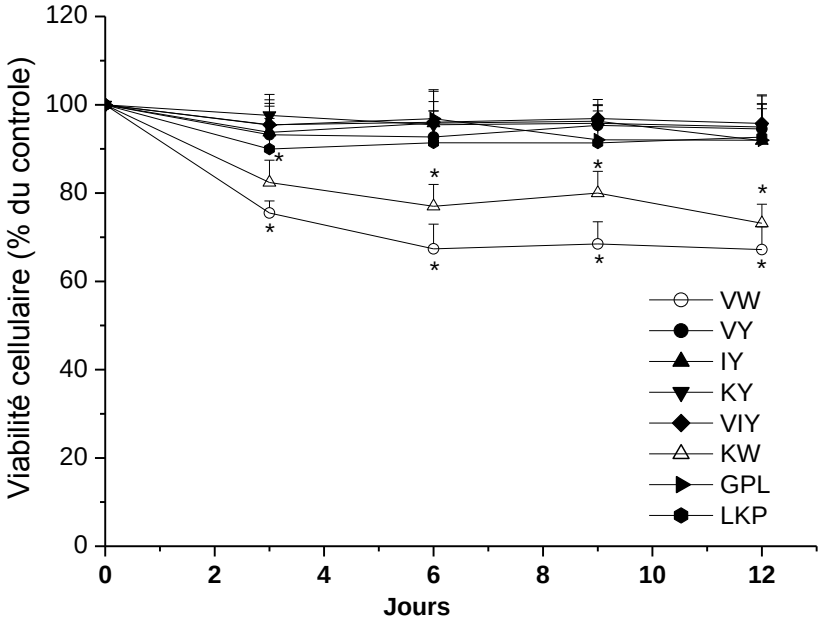


Figure 32: Effet des cryptides sur la viabilité cellulaire après un traitement de 3, 6, 9 et 12 jours durant la phase de différenciation. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart à la moyenne (SEM), avec *n* = 24 répétitions. * Indique une différence significative par rapport au groupe non traité (p <0,05).

Nous avons montré dans cette étude que certains cryptides marins, pourraient affecter la viabilité des adipocytes humains pendant la phase de croissance ou de différenciation. Parmi les 11 cryptides testés, 5 peptides ont induit une mortalité cellulaire significative à une concentration de 100 µM : AKK, AP et VAP ont affecté la viabilité des pré-adipocytes pendant la phase de croissance alors que KW et VW semblent exercer leur effet toxique lors de la phase de différenciation. La diminution du nombre de cellules par VAP, AP et AKK pourrait être due à l'inhibition de la division et/ou à l'induction de la mort cellulaire par apoptose des adipocytes.

Il a été rapporté qu'un certain nombre de composés naturels tels que les polyphénols seraient capables d'inhiber la prolifération des pré-adipocytes en induisant leur apoptose (Rayalam *et al*., 2008). Par exemple, la quercetine et le diphlorethohydroxycarmalol ont induit l'apoptose de pré-adipocytes murins 3T3-L1 (Hsu et Yen, 2006 ; Park *et al*., 2013). Ces composés induiraient l'apoptose en diminuant le potentiel membranaire des mitochondries, l'expression de la poly (ADP-ribose) polymérase (une enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN), l'expression de la protéine anti-apoptotique, la lymphome à cellules B 2 (Bcl-2) et en activant

l'expression des facteurs pro-apototiques tels que : la caspase 3 et les protéines Bax et Bak (Hsu et Yen, 2006 ; Park *et al*., 2013).

Nos résultats ont également montré que KW et VW ont exercé un effet antiprolifératif sur les adipocytes blancs humains pendant la période de différenciation. Cette diminution de la viabilité cellulaire semble se produire au cours de l'étape précoce de différenciation. Cette action antiprolifération exercée sur les adipocytes pendant la phase de différenciation a déjà été observée suite à un traitement par un autre composé d'origine marine : l'acide docosahexaénoïque, un acide gras présent dans l'huile de poisson. En effet, Kim *et al.* (2006a) ont constaté que l'acide docosahexaénoïque n'affectait pas la croissance des pré-adipocytes murins 3T3-L1. Cependant, après initiation de la différenciation, un traitement par cet acide diminue la viabilité des cellules et augmente la libération de lactate déshydrogénase. Les auteurs ont suggéré que le traitement par l'acide docosahexaénoïque induisait l'apoptose dans les cellules 3T3-L1 au cours de l'expansion clonale mitotique, survenant au cours des premiers jours après le début de la différenciation. En effet, ces deux événements critiques se produisent au cours de la phase précoce de la différenciation : l'expansion clonale mitotique et l'engagement irréversible dans le processus de différentiation (Ntambi et Young-Cheul, 2000 ; Tang *et al*., 2003). Kim *et al*. (2006b) ont suggéré que la diminution de l'hyperplasie des adipocytes pourrait être utile dans la diminution de graisse corporelle. Ainsi, l'utilisation de AKK, AP et VAP pourrait être une approche intéressante dans la modulation du développement excessif du tissu adipeux menant à une augmentation du poids corporel.

Nous avons démontré que GPL, LKP, IY, KY et VIY n'avaient aucun effet sur la viabilité des cellules adipocytaires pendant la croissance et la différenciation. Donc, ils n'affecteraient pas le cycle de vie des adipocytes par un contrôle de l'hyperplasie des adipocytes comme c'était le cas des cryptides AKK, AP, VAP, KW et VW. Cependant, ces peptides pourraient agir sur le processus de différenciation adipocytaire comme le fait la berbérine, un alcaloïde botanique. En effet, la berbérine, n'affecte pas la viabilité des cellules 3T3-L1 et des pré-adipocytes blancs humains sous-cutanés (lignée HWP). Cependant, ce composé semble induire une inhibition importante de la différenciation de ces deux lignées adipocytaires et agirait donc sur l'hypertrophie adipocytaire (Hu et Davies, 2009 ; Hu *et al*., 2010).

2.2. L'effet de cryptides marins sur la teneur résiduelle en lipides des adipocytes matures

Les cryptides GPL, IY, VIY, KY, VY et LKP, identifiés comme n'affectant pas la viabilité cellulaire, ont été testés pour évaluer leur effet sur la teneur en lipides finale des adipocytes matures. 100 µM de cryptides ou de caféine ont été ajoutés aux milieux de culture (milieu de différenciation + milieu de nutrition) au cours de toute la phase de la différenciation des pré-adipocytes humains blancs (du jour 0 au jour 16). La caféine a été choisie car c'est un agent lipolytique très connu et qu'elle a été identifiée comme régulateur de la différenciation adipocytaire à une concentration de 100 µM (Su *et al*., 2013). Les gouttelettes lipidiques accumulées dans le cytoplasme des cellules matures ont été colorées à l'huile rouge comme décrit dans le paragraphe 3.2.2 du chapitre II « matériels et méthodes ». Nous avons observé par microscopie les cellules contrôles (cellules non traitées) et celles traitées après coloration à l'huile rouge.

La figure 33 présente des clichés des cellules témoins (figure 33.A) et des cellules traitées pendant la phase de différenciation avec les cryptides GPL (figure 33.B), IY (figure 33.C) ou de la caféine (figure 33.D). La figure 34 présente les résultats de quantification de l'huile rouge fixée dans les adipocytes matures (au jour 16).

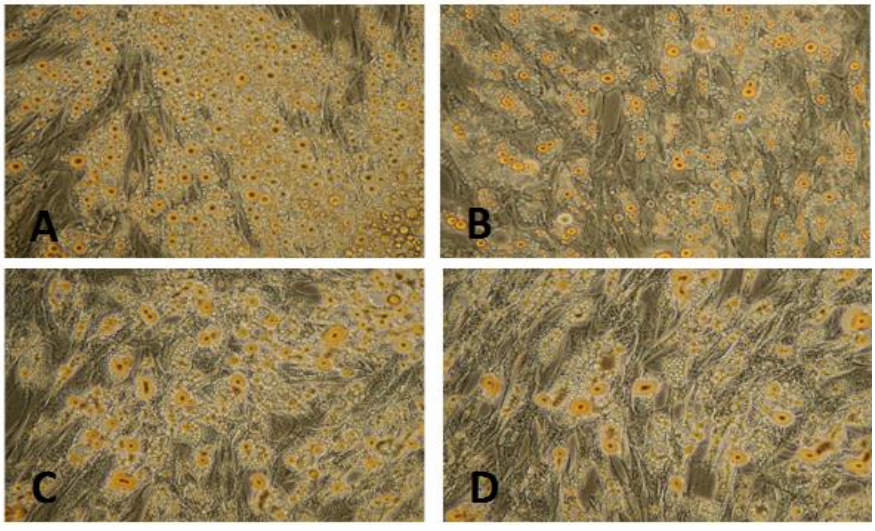


Figure 33: Observation microscopique (grossissement x 100) d'adipocytes blancs humains fixés et colorés à l'huile rouge. Cellules contrôle (A), cellules traitées par 100 µM de GPL (B), IY(C) et caféine (D).

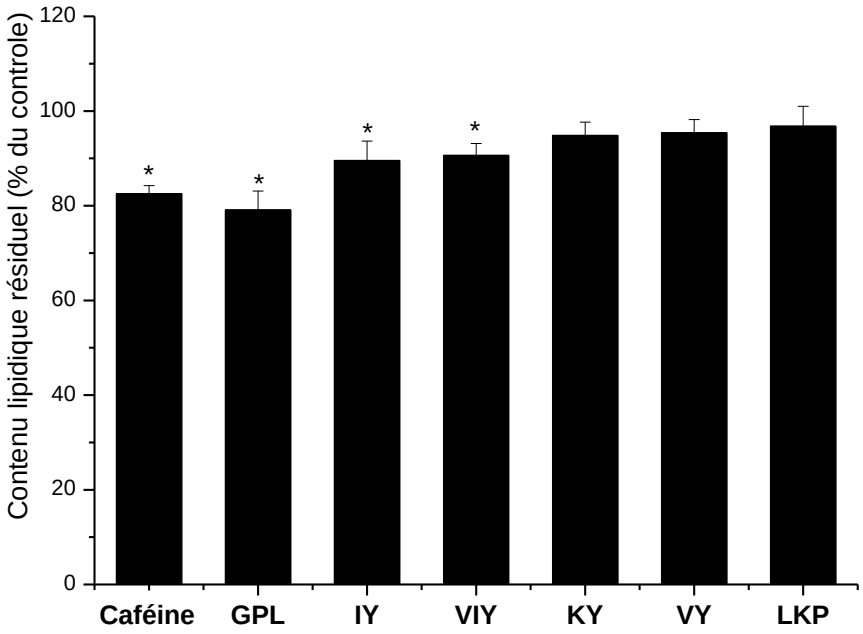


Figure 34: Effet des cryptides sur la teneur en lipides résiduelle des adipocytes matures. Les cellules ont été traitées pendant la période de différenciation (du jour 0 au jour 16) avec 100 µM de caféine ou cryptides GPL, IY, VIY, KY, VY et LKP. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart à la moyenne (SEM), avec n=12 répétitions. * Indique une différence significative par rapport au groupe non traité (p <0,05).

Comme l'indique la figure 33.A, la coloration à l'huile rouge des cellules contrôles indique que les cellules sont bien chargées en gouttelettes lipidiques ce qui témoigne d'une différenciation complète. Les cellules cultivées pendant toute la phase de différenciation en présence de GPL (figure 33.B), IY (figure 33.C) ou de la caféine (figure 33.D), semblent être moins chargées en gouttelettes lipidiques par rapport aux cellules contrôles. Les cellules traitées avec le GPL présentent le moins de gouttelettes lipidiques (figure 33.A). Cette observation a été confirmée par les mesures quantitatives à l'huile rouge (figure 34). En effet, le contenu lipidique a diminué significativement de 20,9±4,0% après une incubation avec le GPL. Cette réduction se trouve être presque égale à celle observée pour les cellules traitées avec la caféine (17,5±1,7%). IY et VIY réduiraient aussi de manière significative le contenu lipidique respectivement de 10,4±4,1% et de 9,3±2,5%. Par ailleurs, le contenu lipidique final n'a pas été affecté après une incubation par les cryptides VY, LKP et KY.

Dans la mesure où nous avons observé une réduction significative de la teneur finale en lipides après une incubation des adipocytes avec GPL, IY, et VIY pendant toute la phase de

différenciation (du jour 0 au jour 16), nous avons ensuite examiné si ces cryptides agissaient pendant le stade précoce ou le stade tardif de la différenciation. 100 µM de IY, GPL, et VIY ont été ajoutés au milieu de différenciation (du jour 0 au jour 4 : stade précoce de la différenciation) ou dans le milieu de nutrition (du jour 4 au jour 16 : stade tardif de la différenciation). L'évaluation du contenu lipidique final dans les adipocytes matures (jour 16) a été réalisée par quantification à l'huile rouge comme précédemment décrit. Les résultats sont illustrés dans la figure 35.

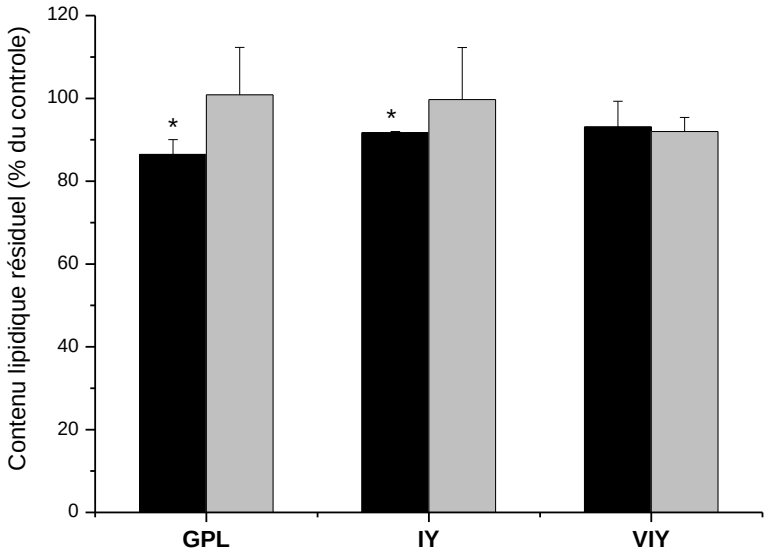


Figure 35: Effet des cryptides sur la teneur en lipides résiduelle des adipocytes matures traités à différents stades du processus de différenciation. Les valeurs ont été exprimées en pourcentage de cellules non traitées (contrôles). Les cellules ont été traitées au cours du processus de différenciation du jour 0 au jour 4 (■) ou de 4 jour à 16 jour (▒) avec 100 µM de GPL, IY et VIY. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart à la moyenne (SEM), avec n = 12 répétitions. * Indique une différence significative par rapport au groupe non traité (p <0,05).

Comme l'indique la figure 35, un traitement des cellules par les peptides IY et GPL au cours de la phase précoce de différenciation (du jour 0 au jour 4), a réduit de manière significative le contenu lipidique final respectivement de 13,5±3,6% et de 8,3± 0,3%. Le cryptide VIY avait seulement un effet mineur sur la teneur finale en lipides, effet qui s'est avéré être non significatif.

Aucun des peptides testés n'affecte de manière significative la teneur finale en lipides lorsque les cellules ont été traitées pendant la seconde période du processus de différenciation (du jour 4 au jour 16).

2.3. L'effet de cryptides marins sur l'activité de la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPDH)

L'activité de la GPDH, impliquée dans la synthèse des TG, est largement mesurée dans l'évaluation de la différenciation adipocytaire (Sottile et Seuwen, 2001). En effet, l'activité de cette enzyme augmente proportionnellement à la différenciation des cellules adipocytaires (Pairault et Green, 1979). Afin de vérifier les résultats obtenus avec la coloration à l'huile rouge, l'activité de la GPDH a été mesurée après 8 jours de traitement pendant la phase de différenciation avec 100 µM de GPL, IY, VIY, KY, VY et LKP.

Les pourcentages d'activités résiduelles de la GPDH dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles sont présentés figure 36.

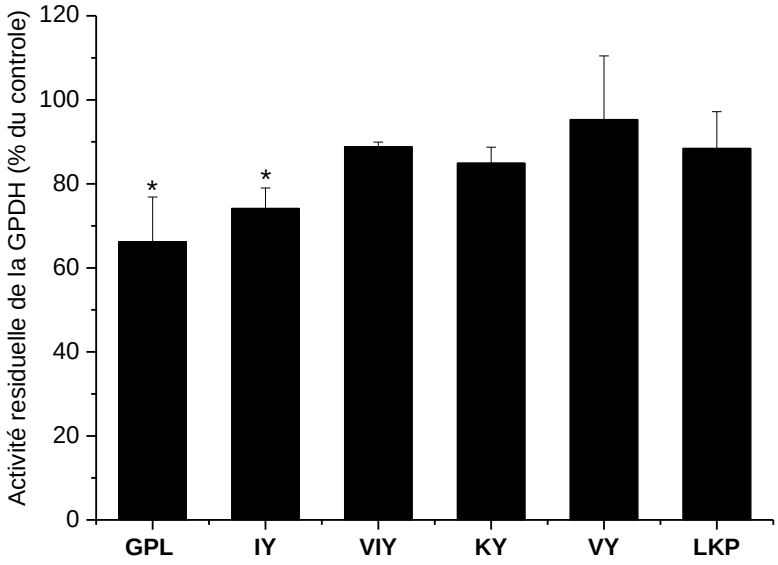


Figure 36 : Effet des cryptides sur l'activité de GPDH dans les adipocytes blancs humains. Activité de GPDH présentée en tant que pourcentage de l'activité des cellules non traitées (contrôles). Les cellules ont été traitées pendant la différenciation jour 0 au jour 8, en présence de 100 µM de GPL, IY, VIY, KY, VY et LKP. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart à la moyenne (SEM), avec n= 3 répétitions. * Indique une différence significative par rapport au groupe non traité (p <0,05).

Comme le montre la figure 36, l'activité de la GPDH a diminué de 33,7±10,6% dans les cellules incubées avec du GPL par rapport aux cellules non traitées. Un traitement avec le peptide IY a également affecté significativement l'activité de la GPDH. En effet, une diminution de l'activité de cette dernière de 25,8±4,8% a été observée suite à un traitement avec ce cryptide.

D'autre part, les résultats montrent qu'il n'existe aucune différence significative entre les cellules contrôles et les cellules traitées par les cryptides VIY, KY, VY et LKP.

2.4. Effet des cryptides marins sur l'expression des marqueurs de différenciation adipocytaire

Nous avons montré précédemment qu'un traitement des cellules avec les cryptides GPL et IY induisait une diminution significative de la teneur en lipides totaux et de l'activité de la GPDH. Ces résultats suggèrent que ces deux cryptides sont capables de moduler, à un stade précoce, la différenciation adipocytaire. Afin de confirmer l'effet inhibiteur des cryptides IY et GPL sur la différenciation adipocytaire, nous avons évalué les changements quantitatifs dans l'expression de gènes spécifiques de la différenciation adipocytaire (LPL, GLUT4, aP2 et AGT) par PCR quantitative. Dans cette étude, nous avons ajouté le cryptide LKP comme contrôle négatif car aucun changement sur la teneur en lipides ou de l'activité de la GPDH n'a été observé suite à un traitement des adipocytes blancs humains avec ce cryptide.

Les adipocytes ont été traités pendant 8 jours après induction de la différenciation avec 100 µM des peptides mentionnés ci-dessus. L'effet de GPL, IY et LKP sur l'expression relative d'ARNm des marqueurs de différenciation est présenté dans la figure 37.

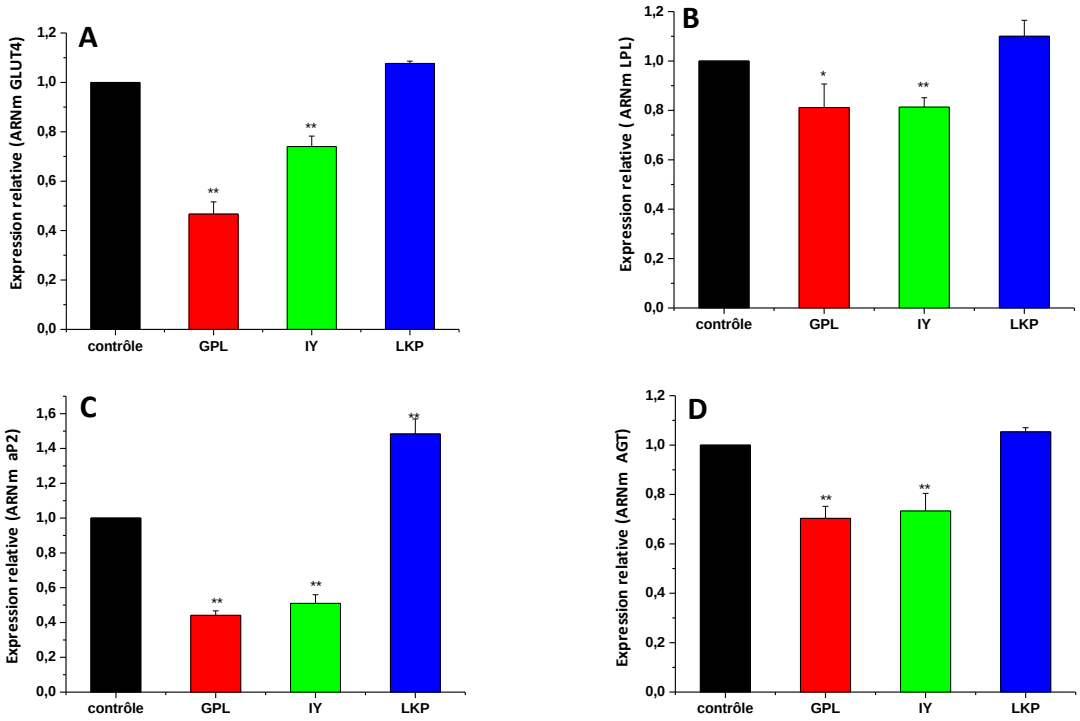


Figure 37 : Effet de GPL, IY et LKP sur l'expression d'ARNm de la LPL (A), GLUT 4 (B), aP2 (C), AGT (D). Les cellules ont été traitées au cours de la différenciation du jour 0 au jour 8, en présence de 100 µM de GPL, IY et LKP. Les niveaux d'expression relatifs d'ARNm ont été mesurés par PCR quantitative par rapport aux niveaux d'expression des ARNm dans les cellules non traitées (= 1,0), après normalisation à l'aide du niveau d'expression de l'ARNm du gène de ménage, la β-actine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart à la moyenne (SEM), avec n = 3 répétitions. * Indique une différence significative par rapport au groupe non traité (p <0,05) et. ** (p <0,01).

L'expression des gènes LPL, GLUT4, aP2 et AGT a diminué significativement par rapport aux cellules contrôles après un traitement par GPL et IY. Suite à une incubation avec GPL, une réduction d'expression d'environ deux fois des gènes GLUT4 (0,47±0,05) et aP2 (0,44±0,02) par rapport aux cellules contrôles (figure 37.A et C) est visible. L'incubation des cellules avec GPL a entraîné également une diminution de l'expression de LPL et d'AGT (figure 37.B et D). En effet, le niveau d'ARNm de LPL et de l'AGT exprimé par rapport aux cellules contrôles été respectivement de 0,81±0,09 et de 0,70±0,05.

Les niveaux d'expression des gènes aP2, LPL, GLUT4 et AGT ont également diminué après un traitement par le cryptide IY (Figure 37.A, B, C et D), mais cette diminution semble être moins marquée que celle obtenue avec GPL. LKP n'a pas eu d'incidence sur l'expression des gènes LPL, AGT et GLUT4 mais augmentait l'expression d'aP2 (1,48±0,08).

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'effet anti-adipogénique observé était médié par une régulation négative de l'expression des 2 principaux facteurs de transcription pro-adipogénique : PPARγ et C/EBPα. En effet, l'expression des gènes de protéines impliquées dans la lipogenèse (tels que la LPL, aP2…) ainsi que celles impliquées dans la sensibilité à l'insuline (GLUT4 et récepteur à l'insuline…) est essentiellement contrôlée par ces deux facteurs de transcriptions pro-adipogéniques. Après 8 jours de traitement avec le GPL et IY au cours de la différenciation, nous avons évalué l'expression relative des deux facteurs PPARγ et C/EBPα par PCR quantitative. Comme montré par la figure 38, un traitement par le GPL et IY a diminué significativement l'expression de PPARγ (figure 38.A) et de C/EBPα (figure 38. B). Cependant, l'effet du cryptide IY était plus faible que celui de GPL : les expressions relatives de PPARγ et C/EBPα ont diminué respectivement à 0,70±0,09 et 0,47±0,01, par rapport aux cellules contrôles suite à un traitement par GPL (figure 38.A, B), tandis que l'expression relative de PPARγ et C/EBPα a diminué respectivement à 0,80±0,09 et à 0,7±0,06, lorsque les cellules ont été incubées avec IY.

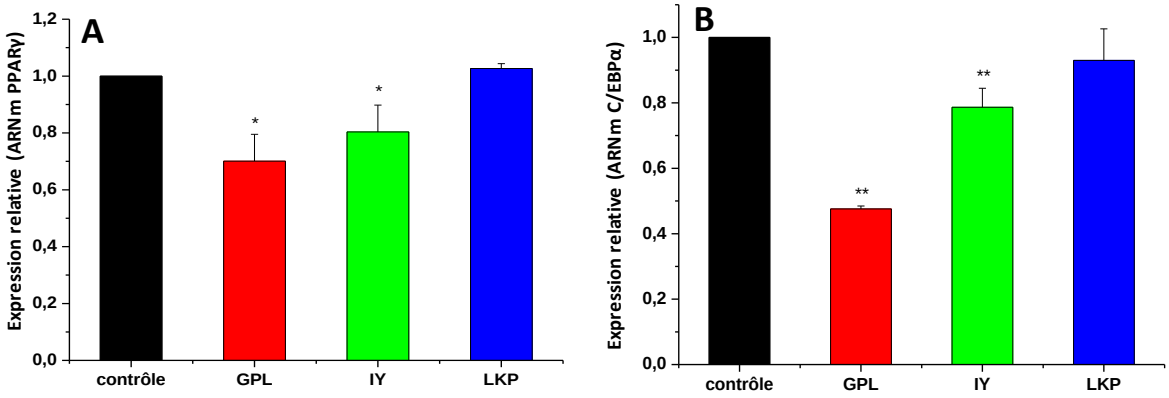


Figure 38 : Effet du GPL, IY et LKP sur l'expression d'ARNm de la PPARγ (A) et C/EBPα (B).Les cellules ont été traitées au cours de la différenciation du jour 0 au jour 8, en présence de 100 µM de GPL, IY et LKP. Les niveaux d'expression relatifs d'ARNm ont été mesurés par PCR quantitative par rapport aux niveaux d'expression des ARNm dans les cellules non traitées (= 1,0), après normalisation à l'aide du niveau d'expression de l'ARNm de la β-actine. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± écart à la moyenne (SEM), avec n = 3 répétitions. * Indique une différence significative par rapport au groupe non traité (p <0,05) et ** (p <0,01).

La régulation de la différenciation adipocytaire est importante. Toute dérégulation de ce processus entraînant l'augmentation de la taille des adipocytes peut conduire à un

développement excessif du tissu adipeux, aboutissant à une obésité de type hypertrophique. Par conséquent, l'effet de GPL, IY, VIY, KY, VY et LKP sur la différenciation adipocytaire a été évaluée par la mesure de l'accumulation des lipides dans les adipocytes (coloration à l'huile rouge) et l'activité de la GPDH, un marqueur de différenciation fortement exprimé dans les adipocytes en maturation. La coloration à l'huile rouge a démontré que GPL, IY et VIY diminuaient de façon significative la teneur en lipides finale dans les adipocytes humains blancs. Cette inhibition de l'accumulation des lipides a été associée à une diminution de l'activité de la GPDH uniquement pour GPL et IY. Ces résultats suggèrent que GPL et IY semblent inhiber partiellement la différenciation adipocytaire.

Nous avons mesuré l'expression des gènes de la LPL, GLUT4, aP2, AGT, PPARγ, et C/EBPα, dans les cellules ayant subi ou non un traitement par les cryptides IY et GPL. Nous avons observé une diminution significative de leurs niveaux d'expression dans les adipocytes traités par ces deux cryptides par rapport aux cellules contrôles (non traitées). Nous avons conclu, qu'un traitement par GPL et IY pouvait inhiber partiellement la différentiation adipocytaire via une régulation négative de ces deux facteurs de transcriptions : PPARγ et C/EBPα. En effet, ces deux facteurs sont les régulateurs clés qui induisent l'acquisition du phénotype adipocytaire et agissent en synergie pour promouvoir l'adipogenèse (Rahman *et al*., 2008) L'expression de ces deux facteurs est elle-même régulée par les facteurs de transcription C/EBPβ et δ (Tang et Lane, 1999). C/EBPβ et δ sont immédiatement exprimés après induction de la différenciation et acquièrent le potentiel de liaison à l'ADN après seulement 12-16 h (Tang et Lane, 1999). D'après les résultats obtenus avec la quantification à l'huile rouge, la modulation de la différenciation adipocytaire par les cryptides IY et GPL semble se réaliser pendant la phase précoce de la différenciation. Ces cryptides pourraient probablement agir sur la régulation des facteurs transcriptions PPARγ et C/EBPα en agissant sur les facteurs régulateurs de leur expression, C/EBPβ et δ.

Très peu d'études antérieures ont rapporté un tel effet inhibiteur de la différenciation adipocytaire impliquant des peptides dérivés de sources naturelles. Par exemple, Kim *et al.* (2007) ont montré que le tripeptide RQI, purifié à partir d'un hydrolysat de protéines de soja, pouvait agir sur l'adipogenèse et diminuer l'accumulation des lipides dans la lignée murine 3T3-L1, par inhibition de la différenciation. Plus récemment, Jung *et al*., (2011) ont montré que les peptides de soie, ont été capables de supprimer la différenciation adipocytaire de la lignée murine C3H10T1/2 par la répression de la voie Notch.

Par ailleurs, les séquences de nos cryptides les plus actifs, GPL et IY, ont déjà été identifiés comme importants dans la régulation de divers mécanismes. Par exemple, la séquence GPL appartient à la famille des glyprolines, famille de peptides linéaires, contenant la proline, dont les effets les plus importants sont la suppression de certaines réactions de coagulation du sang, l'agrégation des plaquettes et la protection de la muqueuse gastrique contre divers facteurs ulcérogènes (Samonina *et al*., 2002). De plus, la combinaison d'acides aminés de GPL et IY peut se retrouver dans la séquence du récepteur membranaire à l'insuline. En effet, GPLY constitue un signal de reconnaissance impliqué dans l'endocytose des récepteurs de l'insuline (Berhanu *et al*., 1995).

L'insuline joue un rôle dans la différenciation adipocytaire. En effet, les insulinosensibilisateurs activent la différenciation, tandis qu'une altération dans la voie de signalisation de l'insuline peut réguler négativement la différenciation (Kletzien *et al*., 1992). Dans cette voie, l'insuline active la protéine kinase mitogène activée (MAPK: Mitogen-activated protein kinase) et la protéine kinase B (PKB) après phosphorylation du substrat-1 récepteur d'insuline (IRS-1 : insulin receptor substrate-1) et du récepteur d'insuline β (RI-β). D'autres travaux seront donc entrepris pour mesurer l'action de GPL et IY sur la voie de signalisation de l'insuline dans les adipocytes blancs humains. Ceci pourrait être réalisé par exemple en mesurant l'état de phosphorylation des deux protéines précédemment cités : la protéine kinase mitogène activée (MAPK: Mitogen-activated protein kinase) et la protéine kinase B. En effet, une diminution de la phosphorylation de ces protéines témoignera d'une régulation négative de la voie de signalisation de l'insuline exercée par ces deux cryptides. Ceci nous permettra probablement de mieux comprendre le mécanisme d'action par lequel les deux cryptides marins IY et GPL exercent leur effet inhibiteur sur la différenciation des adipocytes blancs humains sous-cutanés.

3. Conclusion

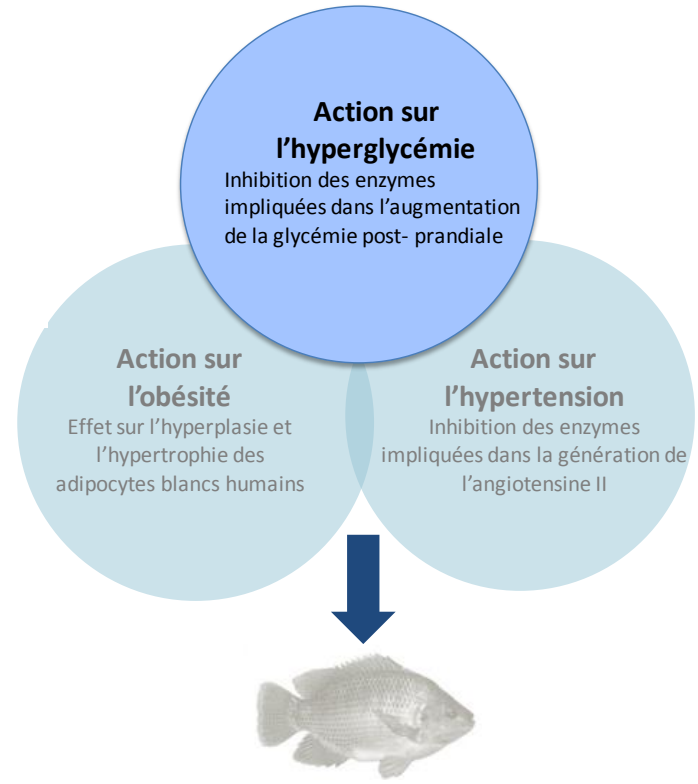
Nous avons constaté, dans cette étude que tous les cryptides inhibiteurs de l'ECA testés n'ont pas d'effet sur l'adipogenèse. Par exemple, les cryptides VY et LKP, qui ont montré une forte activité inhibitrice de l'ECA, n'ont aucun effet sur la prolifération et la différenciation des cellules adipocytaires. Ceci indique que la capacité de cryptides marins à affecter l'adipogenèse dans les adipocytes blancs humains sous-cutanés ne semble pas être corrélée avec leurs activités inhibitrices de l'ECA. Par ailleurs, nous avons montré dans cette étude que certains cryptides marins pourraient agir sur la masse adipeuse, en ciblant différentes étapes

du cycle de vie des adipocytes blancs humains. AP, VAP et AKK peuvent induire une inhibition de la croissance des pré-adipocytes pendant la phase de prolifération alors que KW et VW pourraient diminuer le nombre de pré-adipocytes engagés dans le processus de différenciation. Nous avons également montré qu'un traitement avec les cryptides GPL ou IY inhibait l'adipogenèse via une régulation négative des facteurs de transcription clés de la différenciation adipocytaire PPARγ et C/EBPα.

Nous devons maintenant mieux caractériser le mode d'action moléculaire des peptides GPL et IY. Nous tenons également à étudier l'effet du tétrapeptide GPLY sur le cycle de vie de l'adipocyte blanc humain, afin d'évaluer les similitudes et faire le lien entre la voie de l'insuline et les cryptides GPL et IY. Ces résultats encourageants démontrent pour la première fois que certains cryptides, facilement obtenus à partir de produits et co-produits marins, peuvent cibler le cycle de vie de l'adipocyte blanc humain sous-cutané. Ainsi, ces cryptides marins ont probablement un potentiel en tant qu'agent nutraceutique dans la prévention et la modulation du surpoids. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour vérifier leur action sur les adipocytes humains viscéraux et mieux comprendre leurs mécanismes d'action d'un point de vue moléculaires avant de valider ou non leur effet *in vivo* sur des modèles pathologiques animaux.

Partie 3 : Cryptides marins et hyperglycémie

Les cryptides marins sont-ils capables de cibler les pathologies du syndrome métabolique ?



Identification de cryptides dans l'hydrolysat protéique de poisson

1. Introduction

De nombreuses approches thérapeutiques sont adoptées dans la gestion du diabète de type II. L'inhibition des enzymes clés de la dégradation des carbohydrates : les α-glucosidases et les α-amylases en font partie. L'administration concomitante d'inhibiteurs de ces enzymes avec des glucides ralentit leur digestion et leur absorption. Toute quantité restante de glucides non digérés peut aller dans le gros intestin où les bactéries peuvent les métaboliser en acides gras à courte chaîne et en d'autres sous-produits. L'absorption retardée des glucides dans le jujénum proximal atténue l'augmentation post-prandiale de la glycémie. L'acarbose, inhibiteur spécifique des α-glucosidases et α-amylases, est largement disponible depuis plusieurs années (Balfour et McTavish, 1993). Il a été suivi par le miglitol et le voglibose qui sont actuellement disponibles sur le marché de plusieurs pays dont la France. D'après une étude internationale sur l'efficacité des inhibiteurs des α-glucosidases dans la prévention du diabète de type II : STOP-NIDDM (non-insulin-dependent diabetes mellitus), l'acarbose a également réduit significativement le risque de maladie cardiovasculaire et d'hypertension chez les sujets diabétiques (Chiasson *et al*., 2003). De plus, il a permis de réduire le risque d'intolérance au glucose qui évolue vers le diabète sucré (Chiasson *et al*., 2003).

Une autre approche utilisée dans le contrôle de l'hyperglycémie chez les diabétiques, est l'administration d'agents inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV). Ces derniers figurent parmi les nouveaux médicaments proposés pour traiter le diabète de type II (Tahrani *et al.*, 2011). Ces agents administrés par voie orale, régulent la glycémie en augmentant les concentrations endogènes des hormones incrétines, des hormones intestinales qui stimulent la sécrétion pancréatique d'insuline, diminuent la libération de glucagon pancréatique, retardent la vidange gastrique, et modulent l'appétit (Addison et Aguilar, 2011). Ces hormones, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) et glucagon-like peptide-1 (GLP-1) (Deacon, 2011) sont des substrats physiologiques endogènes de la DPPIV et sont donc rapidement inactivés en sa présence (Thoma *et al.*, 2003).

Un certain nombre d'inhibiteurs de synthèse de la DPPIV ont été développés au cours des dernières années, y compris les inhibiteurs peptidomimétiques tels que la vildagliptine (Galvus) de Novartis et saxagliptine (Onglyza) de Bristol-Meyers Squibb, ou d'autres inhibiteurs non peptidomimétiques tel que la sitagliptine (Januvia) de Merck.

Cependant, les agents antidiabétiques oraux cités plus haut sont connus pour avoir des effets indésirables. Par exemple, les inhibiteurs des α-glucosidases ont essentiellement des effets secondaires gastro-intestinaux (flatulences, gêne abdominale, diarrhée) qui peuvent entraîner un arrêt du traitement. En effet, dans l'étude la plus longue et comprenant la plus grande cohorte de patients diabétiques de type II (UKPDS), 61% des sujets avaient interrompu le traitement par l'acarbose après trois ans de suivi, par comparaison à 42% sous placebo, et ce, essentiellement en raison de plaintes digestives (Holman *et al*., 1999).

De ce fait, l'identification d'inhibiteurs naturels de ces enzymes impliquées dans l'hyperglycémie devient un enjeu important dans la mesure où ces molécules peuvent être une alternative intéressante aux médicaments synthétiques. Les produits marins pourraient être une source de choix contenant des peptides bioactifs pouvant agir sur la régulation de la glycémie chez les sujets diabétiques. Des travaux antérieurs ont montré que certains hydrolysats protéiques et peptides bioactifs issus des produits et co-produits marins présentent un potentiel antidiabétique *in vivo* sur les modèles animaux (Zhu *et al*., 2010c) et sur les sujets humains (Zhu *et al*., 2010a ; Zhu *et al*., 2010b). Cependant les mécanismes impliqués dans cette activité antidiabétique n'ont pas été complètement élucidés.

L'étude menée au cours des deux premières parties, nous a permis de sélectionner les peptides marins, inhibiteurs de l'ECA ayant également une action sur la différenciation adipocytaire, première étape menant au développement de l'obésité. **S'inscrivant dans une démarche d'identification de cryptides dotés d'activités multifonctionnelles et pouvant agir sur plusieurs cibles liées au développement des pathologies du syndrome métabolique**, l'objectif des travaux décrits dans ce chapitre a été de caractériser leur effet sur la glycémie post-prandiale des 11 cryptides marins via les deux approches précédemment détaillées. Ainsi, leur activité inhibitrice de l'α-amylase pancréatique, de l'α-glucosidase et de la DPPIV a été évaluée. Le potentiel des cryptides ayant montré les activités les plus intéressantes *in vitro* a été testé *in vivo* sur des modèles de souris diabétiques. Les expériences *in vivo* ont été réalisées au laboratoire Adaptations Métaboliques à l'Exercice en conditions Physiologiques et Pathologiques (AME2P), de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, sous la direction du Dr. Pascal Sirvent et du Pr. Nathalie Boisseau.

2. Actions inhibitrices des cryptides marins sur l'activité des enzymes digestives des glucides

2.1. Action inhibitrice des cryptides marins sur l'activité de l'α-glucosidase

Nous avons testé l'effet des cryptides sur l'activité de l'α-glucosidase de *Saccharomyces cerevisiae* en exploitant son activité maltase. L'acarbose, le miglitol, et le voglibose, agents thérapeutiques classiquement utilisés en tant qu'inhibiteurs de l'α-glucosidase seront les contrôles positifs dans notre étude. Les cryptides VY, VW, KW, KY, IY, LKP, AKK, VIY, GPL, VAP et AP et les molécules de référence ont été testés selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.1 du chapitre II « matériels et méthodes ». Nous avons fait varier la concentration de ces peptides (0,01 à 20 mM) ainsi que celle de des molécules de références (0,1 à 50 mM) pour déterminer leurs CI 50. L'évolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en acarbose (pris comme exemple) est présentée dans la figure 39.

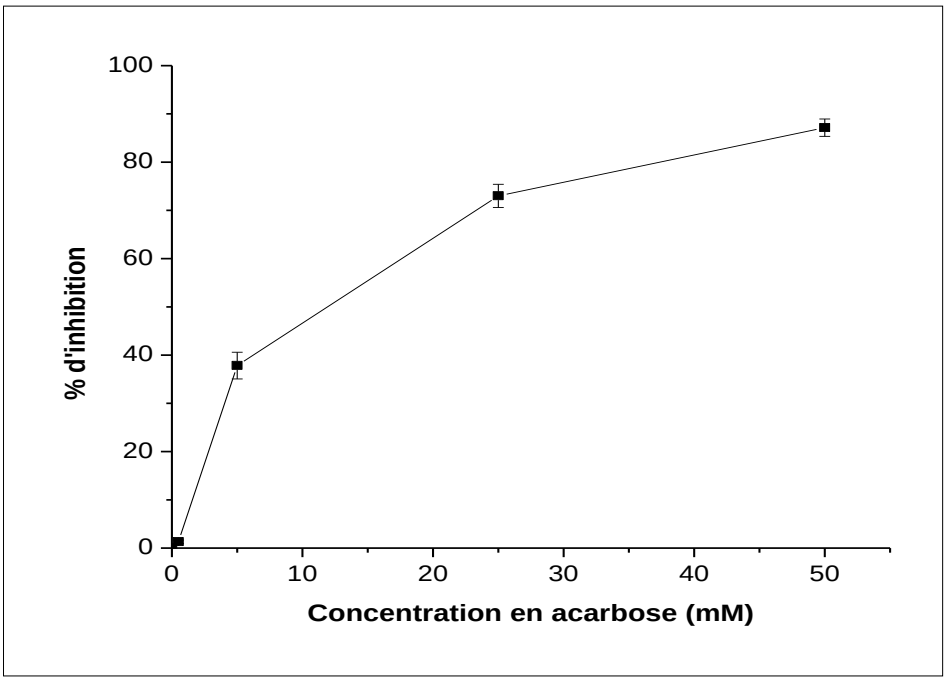


Figure 39 : Evolution du pourcentage d'inhibition de l'activité de l'α-glucosidase en fonction de la concentration d'acarbose.

Les CI 50 obtenues sont représentées dans le tableau 18.

Tableau 18: Concentrations inhibitrices (mM) en acarbose, miglitol, voglibose et cryptides marins nécessaires pour inhiber 50% l'activité de l'α-glucosidase dans nos conditions du test.

Inhibiteurs	**CI 50**
Acarbose	11,92± 1,44
Voglibose	24,41±0,47
Miglitol	37,47±0,68
LKP	7,11±0,20
GPL	4,82±0,15
VIY	Pas d'inhibition*
AKK	Pas d'inhibition*
VAP	0,0201± 0,0002
AP	0,0136 ± 0,001
KY	10,96±0,1
KW	12,76± 0,98
VW	Pas d'inhibition*
VY	2,70±0,18
IY	12,26±0,25

*Pas d'inhibition à 20 mM.

Parmi les molécules de référence testées, l'acarbose a montré l'activité inhibitrice de l'α-glucosidase la plus élevée avec une CI 50 de 11920±1444 µM. De ce fait, les activités inhibitrices des cryptides marins vont être comparées à cette référence. Certains cryptides ont montré une inhibition de l'activité de l'α-glucosidase *in vitro.* Parmi ces peptides, AP et VAP possèdent l'activité inhibitrice la plus élevée avec des CI 50 respectivement de 13,64±0,92 µM et de 20,01±0,21 µM. La CI 50 de AP était environ 874 fois moins importante que celle de l'acarbose (CI 50=11920±1444 µM) alors que celle du VAP est environ 595 fois plus faible.

Les cryptides LKP, GPL, KY, KW, IY et VY présentent aussi une activité inhibitrice de l'α glucosidase avec des CI 50 qui étaient comprises entre 2,70±0,18 mM et 12,76±0,98 mM respectivement pour VY et KW.

En comparant les CI 50 des dipeptides KY, VY et IY qui présentent le résidu tyrosine en position C-terminale, on remarque que la présence de la valine en position N-terminale semble améliorer l'activité inhibitrice relativement aux deux autres dipeptides KY et IY. En effet, la CI de VY (CI 50=2,70±0,18 mM) est environ 10 fois plus faible que celle obtenue avec KY (CI 50=10,96±0,1 mM) et IY (CI 50=12,76±0,98 mM). Cependant, ceci ne semble pas être le cas pour les dipeptides KW et VW. En effet, KW (CI 50=12,76±0,98 mM) montre une activité inhibitrice alors que VW n'affecte pas l'activité de l'α-glucosidase dans la

gamme de concentration testée. L'ajout de la valine en position N-terminale pour le tripeptide VIY semble même supprimer l'activité inhibitrice obtenue avec la séquence IY. Dans la mesure où AP et VAP ont montré de puissantes activités inhibitrices de l'α-glucosidase et que la présence de la valine dans la séquence de VAP ne semble pas être corrélée avec une meilleure activité inhibitrice, nous suggérons que c'est l'enchaînement des résidus A-P qui serait responsable de cette puissante activité inhibitrice.

La plupart des inhibiteurs synthétiques de l'α-glucosidase, tels que l'acarbose, le miglitol et le voglibose, sont des sucres ou des dérivés saccharidiques (Bharatham *et al*., 2008). Cependant, il a été rapporté dans la littérature que des composés non-saccharidiques dérivés de sources naturelles se révèlent être de bons inhibiteurs de l'α-glucosidase (Bharatham *et al*., 2008). La plupart de ces composés sont de nature phénolique dont notamment les flavonoïdes et les tanins (Kumar *et al*., 2011 ; Adisakwattana *et al*., 2010). En effet, les polyphénols comme l'acarbose présentent un cycle insaturé (phénol) dans leurs structures et ce dernier semble être en partie responsable de l'activité inhibitrice exercée par ces composés sur l'activité de l'α-glucosidase (Laube, 2002 ; Lee *et al*., 2011). Dans notre étude, les 3 cryptides VY, KY et VIY présentent eux aussi un groupement phénol dans leur structure. Toutefois, VY et KY présentent une activité inhibitrice de l'α-glucosidase mais VIY n'affecte pas l'activité de cette enzyme dans la gamme de concentrations testées.

Certains chercheurs ont montré que des acides aminés pouvaient aussi affecter l'activité de l'α-glucosidase. Suzuki *et al*. (1982) avaient testé l'effet de la glycine et de la sérine et ont montré que ces deux acides aminés affectaient l'activité de l'α-glucosidase (inhibition de l'activité de l'α-glucosidase de 6% à 5 mM). Récemment, il a été rapporté que quelques peptides inhibiteurs de l'α-glucosidase avaient été isolés à partir d'hydrolysats de protéine de sources naturelles. Lors d'une étude *in vitro* visant à tester le potentiel inhibiteur de différentes matrices alimentaires hydrolysées, Matsui *et al*. (1996) ont montré que l'hydrolysat de protéase alcaline du muscle de la sardine était capable d'inhiber l'hydrolyse des carbohydrates via l'inhibition de l'activité de l'α-glucosidase. Après un fractionnement de l'hydrolysat du muscle de la sardine, les auteurs ont isolé et identifié les peptides responsables de l'activité inhibitrice de l'α-glucosidase : Val-Trp (CI 50=22,6 mM) et Tyr-Tyr-Pro-Leu (CI 50=3,7 mM) qui s'avérait inhiber l'enzyme de manière compétitive (Matsui *et al*., 1999). Dans notre étude, le cryptide VW ne semblait pas affecter l'activité de l'enzyme dans la gamme de concentrations testées et a été considéré comme non inhibiteur de l'α-glucosidase. Cela pourrait être expliqué par la différence de la concentration du substrat p-nitrophenol-α-

D-glucopyranoside (PNPG) mis en œuvre dans la réaction. En effet dans notre étude la concentration finale du substrat a était de 2,5 mM alors que la concentration finale de PNPG utilisée dans les travaux de Matsui *et al*. (1999) était de 0,665 mM.

D'autres peptides issus de ressources naturelles, ont aussi été identifiés comme inhibiteurs de l'α-glucosidase. Les hexapeptides RVPSLM (CI 50=23,07 µM) et NVLQPS (CI 50=100 µM) et les pentapeptides TPSPR (CI 50=40.02 µM) et KLPGF (CI 50=59,5 µM) extraits de l'hydrolysat protéique du blanc d'œuf, ont été identifiés comme de puissants inhibiteurs de l'α-glucosidase de levure (Yu *et al*., 2011 ; Yu *et al*., 2012). Plus récemment, Lee *et al*. (2011) ont identifié deux tripeptides inhibiteurs de l'α-glucosidase GEY (CI 50=2,7 mg/ml ≃ 7,35 mM) et GYG (CI 50=1,5 mg/ml ≃ 5,08 mM) isolés à partir de l'hydrolysat protéique des cocons de soie. Nos cryptides AP et VAP comme ceux dérivés des hydrolysats protéiques du blanc d'œuf cités précédemment présentent une CI 50 de l'ordre du micromolaire. LKP, GPL, VY, IY et KW présentent des CI 50 de l'ordre du millimolaire plus proche des tripeptides dérivés des cocons de soie.

Le test utilisé dans notre étude ainsi que celui des études mentionnées plus haut met en œuvre une α-glucosidase de levure de *Saccharomyces Cerevisae* et le PNPG comme substrat de la réaction. Ce test est classiquement utilisé dans le criblage d'activité inhibitrice de l'α-glucosidase des molécules, il a l'avantage d'être rapide avec un coût relativement faible. Cependant, il présente plusieurs limites : le PNPG est un substrat synthétique et l'α-glucosidase utilisée est issue de la levure. Or il a été indiqué que l'origine de l'α-glucosidase (mammifère ou levure) affecte grandement l'amplitude de l'activité inhibitrice des molécules testées (Oki *et al*., 1999). Donc les molécules identifiées comme intéressantes devront nécessairement être testées sur une α-glucosidase de mammifère (comme par exemple l'extrait intestinal de rats) en utilisant le substrat naturel de l'enzyme (maltose ou sucrose). Ensuite, il convient de valider leur action *in vivo* sur des modèles animaux avant de les présenter comme de potentiels agents antidiabétiques.

En comparant les CI 50 de VAP et AP avec nos molécules de références, nous pouvons suggérer que ces peptides pourraient être considérés comme de puissants agents inhibiteurs de l'α-glucosidase *in vitro*. Le potentiel antidiabétique *in vivo* de ces deux peptides sur des modèles de souris diabétiques a été vérifié. Ces tests ont été entrepris par l'équipe du Pr. Nathalie Boisseau du laboratoire Adaptations Métaboliques à l'Exercice en conditions Physiologiques et Pathologiques (AME2P) dans le cadre d'une collaboration entre nos deux

laboratoires. Les résultats (non montrés ici) ont confirmé le potentiel antidiabétique du peptide AP mais pas du VAP. En effet, l'administration de 500 mg/kg du cryptide AP a diminué de manière significative la glycémie post-prandiale chez les souris diabétiques. Cette diminution était presque du même ordre que celle mesurée pour le groupe de souris ayant ingéré 10 mg/kg d'acarbose. Cependant, aucune différence significative entre le groupe témoin (souris non traitées) et le groupe traité par le cryptide VAP n'a été observé.

Certains chercheurs ont proposé quelques mécanismes expliquant l'inhibition de l'α-glucosidase par des composés non saccharidiques. Par exemple, Bharatham *et al.* (2008) ont montré que certains composés non saccharidiques, tels que les dérivés de chalcone sulfonamide, pourraient inhiber efficacement l'α-glucosidase. Ils ont étudié la nature des interactions avec les composés non saccharidiques et les dérivés de sucre au niveau du site actif et ont montré que l'inhibition de l'α-glucosidase par des composés non saccharidiques (dérivés de chalcone sulfonamide et d'iminocyclitol) était due essentiellement aux liaisons de type hydrophobe avec le site actif de l'enzyme. Quant au mécanisme d'inhibition de l'α-glucosidase par les peptides il n'a pas été encore élucidé. La corrélation structure-fonction des peptides inhibiteurs de l'α-glucosidase sera importante pour comprendre les mécanismes mis en jeu.

De ce fait, des études de modélisation et de simulation de dynamique moléculaire de l'inhibition de l'α-glucosidase par les peptides, se révèlent indispensables pour une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action et seront entreprises très prochainement en collaboration avec le Pr. Manuel Dauchez, Université de Reims. .

2.2. Action inhibitrice des cryptides marins sur l'activité de l'α-amylase

Nous avons testé dans notre étude l'effet des cryptides marins sur l'activité de l'α-amylase pancréatique porcine. L'acarbose a été inclus dans notre étude en tant que référence. Ce dernier en plus d'être un inhibiteur de l'α-glucosidase, est aussi connu pour être un puissant inhibiteur de l'α-amylase (Wilcox et Whitaker, 1984 ; Yoon et Robyt, 2003). Les cryptides VY, VW, KW, KY, IY, LKP, AKK, VIY, GPL, VAP et AP ainsi que l'acarbose ont été testés selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.2 du chapitre II « Matériels et méthodes ». Nous avons fait varier la concentration de ces peptides pour déterminer leurs CI 50 (Concentration en peptide nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de l'α-amylase pancréatique). Les CI 50 des échantillons peptidiques ainsi que celle de l'acarbose, sont représentées dans le tableau 19.

Tableau 19 : Concentration inhibitrice (mM) en acarbose et cryptides marins nécessaire pour inhiber 50% l'activité de l'α-amylase pancréatique dans nos conditions du test.

Inhibiteurs	**CI 50**
Acarbose	0,011±0,02
LKP	Pas d'inhibition*
GPL	9,25±0,32
VIY	12,53±1,36
AKK	7,79±0,07
VAP	8,53±0,54
AP	5,48±0,74
IY	Pas d'inhibition*
KY	Pas d'inhibition*
KW	Pas d'inhibition*
VW	Pas d'inhibition*
VY	Pas d'inhibition*

*Pas d'inhibition pour une concentration de 20 mM du cryptide.

D'après le tableau 19, certains cryptides ont montré une inhibition de l'activité de l'α-amylase *in vitro*. Parmi ces cryptides, AP présente l'activité inhibitrice la plus élevée comparée aux autres peptides testés avec une CI 50 de 5,48±0,74 mM. Une inhibition de l'activité de l'α-amylase a été obtenue avec les cryptides VAP, AKK, VIY et GPL. Les CI 50 de ces derniers sont du même ordre que celle du cryptide AP (les valeurs étaient comprises entre 7,79 et 12,53 mM respectivement pour AKK et VIY). Cependant aucune inhibition n'a été observée avec les dipeptides VY, VW, IY, KW et KY et le tripeptide LKP. En comparant l'activité inhibitrice de nos cryptides inhibiteurs avec celle de l'acarbose, il s'avère que l'activité inhibitrice de l'α-amylase de ce dernier est largement supérieure à celle déterminée avec les cryptides AP, VAP, AKK, VIY et GPL. En effet, la CI 50 de l'acarbose (CI 50=0,011±0,02 mM) est environ 500 fois plus faible que celle de AP, identifié comme présentant le potentiel inhibiteur le plus élevé relativement aux autres cryptides testés.

De précédentes études portant sur l'inhibition de l'α-amylase pancréatique ont rapportées un potentiel inhibiteur d'un certain nombre de composés d'origine naturelles tels que : le polysaccharide d'origine marine, le fucoidan (CI 50=0,12-4,64 mg/ml) (Kim *et al*., 2014), l'acétate d'éthyle extrait de la plante *Cynodon dactylon* (CI 50=387,97 µg/l) , le Diphlorethohydroxycarmalol, un lipide isolé de l'algue brune *Ishige okamurae* (CI 50= 0,53

mM) (Heo *et al*., 2009), l'acide chlorogénique (CI 50=1,4 mM) (Funke et Melzig, 2005) ou encore la phaséolamine, protéine isolée à partir de graines de haricots blancs (Marshall et Lauda, 1975). Un certain nombre d'inhibiteurs naturels de l'α-amylase ont été vérifiés sur des modèles animaux (Heo *et al*., 2009) mais très peu d'études cliniques quant à l'efficacité de ces substances sur les sujets humains ont été entreprises (Barrett et Udani, 2011). Le potentiel antidiabétique de l'inhibiteur protéique, la phaséolamine également, connue sous le nom de «Phase 2» a été confirmé par plusieurs études cliniques. En plus de réduire l'élévation de la glycémie post-prandiale chez des sujets humains diabétiques et non diabétiques, plusieurs travaux ont démontré que cet inhibiteur réduisait le taux de triglycérides plasmatique et conduisait à une perte significative de poids corporel comparativement au groupe traité avec un placebo (Barrett et Udani, 2011). Cette protéine est maintenant intégrée dans la formulation de produits de régime commercialisés notamment en France par les laboratoires Omega pharma (Produit XL-S médical). Ceci montre encore une fois le lien étroit qui existe entre les différentes anomalies du syndrome métabolique et prouve qu'un agent naturel est capable d'agir sur différents cibles liés au développement de ce syndrome.

A notre connaissance, seulement deux peptides d'origine alimentaire : KLPGF (CI 50=120 µM) et EAGVD (CI 50=110 µM) isolés à partir d'un hydrolysat de blanc d'œuf ont été identifiés comme inhibiteurs de l'α-amylase (Yu *et al*., 2012). Aucun peptide d'origine marine ne semble posséder ce rôle. Il est à souligner qu'il existe d'autres études qui ont identifié des peptides synthétiques capables d'inhiber efficacement l'α-amylase pancréatique. Alam *et al.* (2001) ont synthétisé des peptides sur la base des séquences du fragment N-terminal de l'inhibiteur protéique de l'α-amylase « ragi alpha-amylase/trypsin bifunctional inhibitor (RATI) ». Le RATI a été initialement isolé à partir de la céréale indienne *Eleucine coracana Gaertneri*. Les auteurs ont montré que les séquences peptidiques SVGTSCIPG et SVGTSCI étaient des inhibiteurs compétitifs puissants de l'α-amylase.

D'autres peptides linéaires et cycliques de différentes longueurs (de 5 à 15 acides aminés) dérivés de la séquence peptidique de l'inhibiteur protéique de l'α-amylase pancréatique, le tendamistat, ont été décrits. Les auteurs ont démontré que les peptides linéaires et leurs analogues cycliques pouvaient inhiber l'activité de l'enzyme sans différence significative entre les deux formes. Ils ont également vérifié que la séquence WRY de tendamistat était celle qui semblait interagir directement avec le site actif de l'enzyme (Ono *et al*., 2001). Ces études montrent que des acides aminés spécifiques pourraient être plus favorables à une inhibition de l'α-amylase que d'autres. Cependant, les études structure-fonction de l'inhibition

de cette enzyme par les inhibiteurs peptidiques n'ont pas encore été publiées. Toutefois, il se pourrait que des peptides d'origine marine renfermant une séquence d'acides aminés spécifiques comme le fragment WRY identifié dans la protéine tendamisat, soient de meilleurs inhibiteurs de l'α-amylase pancréatique que les peptides testés lors de notre étude.

3. Etude du potentiel inhibiteur des cryptides marins sur l'activité de la dipeptidyl peptidase IV

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'effet des cryptides marins et du tripeptide Ile-Pro-Ile (IPI) sur l'activité de la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV). Le tripeptide IPI (également appelé diprotine A), un inhibiteur spécifique de la DPPIV (Umezawa *et al*., 1984) est utilisé ici comme référence (contrôle positif). Les cryptides VY, VW, KW, KY, IY, LKP, AKK, VIY, GPL, VAP et AP ainsi que la diprotine A ont été testés selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.3 du chapitre II «matériels et méthodes ». Nous avons fait varier la concentration de ces cryptides pour déterminer leurs CI 50 (Concentration en peptide nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de la dipeptidyl peptidase IV). Les CI 50 de nos cryptides ainsi que celle du tripeptide IPI, sont présentées dans le tableau 20.

Tableau 20 : Concentration inhibitrice (mM) en diprotine A et cryptides marins nécessaire pour inhiber 50% l'activité de dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) dans nos conditions.

Inhibiteurs	**CI 50**
IPI (Diprotin A)	0,0121±0,0002
LKP	0,95±0,80
GPL	1,85±0,30
VIY	Pas d'inhibition
AKK	Pas d'inhibition
VAP	4,82±0,13
AP	4,77± 0,28
IY	Pas d'inhibition
KY	Pas d'inhibition
KW	Pas d'inhibition
VW	Pas d'inhibition
VY	Pas d'inhibition

*Pas d'inhibition pour une concentration de cryptides de 10 mM.

D'après nos résultats (tableau 20), seuls les cryptides LKP, GPL, AP et VAP semblent présenter un potentiel inhibiteur de la DPPIV. Le cryptide LKP a présenté le potentiel inhibiteur le plus élevé avec une valeur de CI 50=0,95±0,80 mM. Sa valeur de CI 50 est environ deux fois plus faible que celle du GPL (CI 50=1,85±0,30 mM) et environ 5 fois plus faible que celle de AP (CI 50=4,77± 0,28 mM) et de VAP (CI 50=4,82±0,13 mM).

Cependant, la CI 50 de la diprotine A était environ 80 fois plus faible que celle du cryptide LKP. La CI 50 de la diprotine A calculée dans notre étude était de 12,1 µM. Ce tripeptide a pour la première fois été isolé à partir des filtrats d'une culture de *Bacillus cereus* et a été considéré comme un puissant inhibiteur de la DPPIV (Umezawa *et al*., 1984). La CI 50 de ce contrôle positif calculée dans notre étude est du même ordre (micromolaires) que celles rapportés dans la plupart des études précédentes (Umezawa *et al*., 1984 ; Nongonierma *et al*. 2013).

D'après les résultats de notre étude (tableau 20), tous les peptides qui présentent un effet inhibiteur de l'activité de la DPPIV contiennent de la proline et un acide aminé hydrophobe dans leur séquence tels que l'alanine, la valine, la glycine ou encore la leucine. Ceci a déjà été constaté dans plusieurs études antérieures notamment celle de Lacroix et Li-Chan. (2012). Ces auteurs ont remarqué, dans leur étude *in silico,* que les di, tri et oligopeptides rapportés dans la littérature comme inhibiteurs de la DPPIV contiennent au moins un résidu proline dans leurs séquences et/ou un acide aminé hydrophobe. Les auteurs des brevets WO 2006/068480 (Boots, 2006) et WO 2009/128713 (Van Amerongen *et al*., 2009) ont démontré que les peptides dérivés respectivement des hydrolysats de la caséine et des hydrolysats d'œuf présentaient une activité inhibitrice de la DPPIV, et que ces derniers sont caractérisés par la présence d'au moins un résidu de proline dans leur séquence, généralement en seconde position de l'extrémité N-terminale. Cependant, nous constatons dans notre étude que la proline en seconde position de l'extrémité N-terminale pour les peptides inhibiteurs ne semble pas être corrélée avec une meilleure activité inhibitrice de ces derniers comme cela a été suggéré par les deux brevets précédemment cités ainsi que par d'autres études (Nongonierma et FitzGerald, 2014). En effet, dans notre étude, le cryptide GPL dont la proline est en seconde position de l'extrémité N-terminale présente une activité plus faible que le cryptide LKP.

Bien que dans notre étude, seuls les cryptides contenant de la proline présentaient une activité inhibitrice de la DPPIV, ceci ne semble pas être le cas de nombreux autres cryptides rapportés

lors de précédentes études comme étant de puissants inhibiteurs de la DPPIV. Par exemple, les dipeptides WR et WK avec des CI 50 respectives de 37,8 µM et de 40,6 µM (Nongonierma et Fitzgerald, 2013a) figurent parmi les inhibiteurs les plus puissant de la DPPIV dérivés de protéines alimentaire (Nongonierma et FitzGerald, 2014). Ces dipeptides semblent de meilleures inhibiteurs de la DPPIV que les cryptides testés ici et dont les CI 50 sont plutôt de l'ordre du millimolaire.

Dans notre étude, les cryptides marins LKP, VAP et GPL précédemment rapportés comme inhibiteurs de l'ECA sont pour la première fois identifiés comme présentant un potentiel inhibiteur de la DPPIV. Ce potentiel a déjà été identifié pour le cryptide AP dans des études antérieures visant à élucider le mécanisme catalytique de la DPPIV (Bella Jr. *et al*., 1982 ; Yan *et al*., 1992 ; Brandt *et al*., 1995). Plus récemment, le cryptide AP a aussi été isolé à partir de l'hydrolysat protéique du son de riz dégraissé et a été identifié comme inhibiteur de la DPPIV avec une CI 50 de 7,95 mM (Hatanaka *et al.*, 2012) proche de celle calculée au cours de ces travaux. Or en comparant la valeur de CI 50 de AP calculé dans notre étude (CI 50=4,77 mM) par rapport à notre référence IPI (CI 50=12,1 µM), ce cryptide ne peut être considéré comme un bon inhibiteur de la DPPIV.

De plus, un peptide présentant les même résidus aux extrémités N et C-terminales que LKP a été précédemment identifié comme inhibiteur de la DPPIV. En effet, Nongonierma et FitzGerald. (2013b) ont rapporté que le tripeptide LQP dérivé de la caséine présentait une activité inhibitrice de la DPPIV avec une valeur de CI 50 de 1,18 mM proche de celle calculée pour LKP (CI 50=0,95 mM). Nongonierma et Fitzgerald (2013a) ont aussi identifié les dipeptides WK (CI 50=40,6 µM) et WV (CI 50=65,7 µM) comme de puissants inhibiteurs de la DPPIV. Ces deux dipeptides correspondent à l'inverse des séquences des deux dipeptides KW et VW évalués dans notre étude. Or, aucune activité inhibitrice n'a été obtenue avec les deux. Nos résultats sont en accord avec cette dernière étude puisque les auteurs ont eux aussi conclu à une absence d'inhibition de la DPPIV par les peptides VW et KW. En effet, ils ont démontré que les dipeptides présentant un résidu de tryptophane en N-terminal étaient associés à une CI 50 faible de l'ordre du micomolaire et donc à un potentiel inhibiteur élevé contrairement à leurs inverses de la même séquence (Nongonierma et Fitzgerald, 2013a).

Ceci suggère que la composition en acides aminés, du moins pour les dipeptides, n'est pas l'élément principal qui gouverne les propriétés inhibitrices de la DPPIV de ces peptides. La longueur de la chaîne peptidique ne semble pas non plus être liée à l'activité inhibitrice de la

DPPIV des peptides identifiés. De gros peptides (> 10 acides aminés) ont été rapportés comme étant de puissants inhibiteurs de la DPPIV (Velarde-Salcedo *et al.*, 2013) tout comme les dipeptides (Nongonierma et Fitzgerald, 2013a).

La recherche de peptides inhibiteurs dérivés de protéines alimentaires a fait l'objet de nombreuses publications ces dernières années. Cependant, la corrélation entre la structure/composition en acides aminés et les propriétés inhibitrices des peptides n'est pas encore clairement établie. Nous avons identifié au cours de ce travail, 3 nouveaux cryptides d'origine marine LKP, GPL et VAP capables d'inhiber la DPPIV. Leur CI 50 est relativement élevée par rapport à celle de l'IPI, inhibiteur de référence. Ces nouvelles séquences pourraient enrichir la base de données des peptides d'origine marine inhibiteurs de la DPPIV dérivés d'hydrolysats de protéines marines mais ne peuvent sans être considérer pour autant comme de bons inhibiteurs.

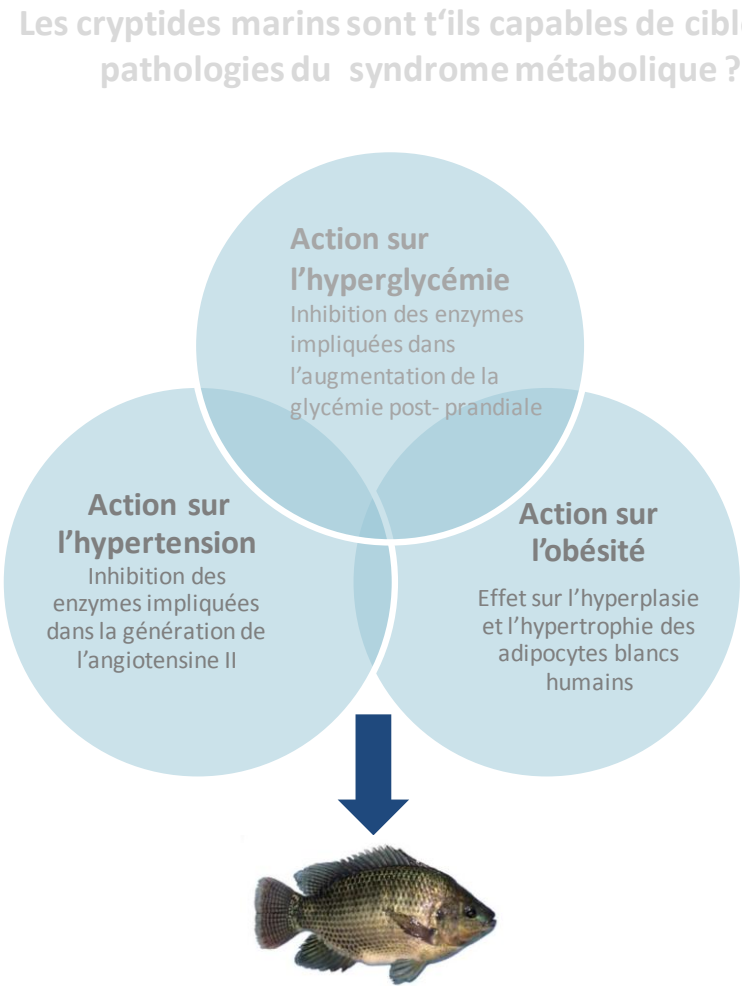
4. Conclusion

Nous avons montré dans cette étude, que certains cryptides marins étaient capables d'agir sur l'activité d'enzymes (α-glucosidase, α-amylase et DPPIV) impliquées dans la glycémie post-prandiale. Certains de nos cryptides testés, et plus particulièrement le cryptide AP présentent un potentiel antidiabétique intéressant qui a été confirmé par une étude *in vivo* sur des souris diabétiques. Ce peptide présente une activité inhibitrice intéressante sur l'α-glucosidase et une activité inhibitrice nettement moins importante sur l'α-amylase et la DPPIV.

En plus d'être un inhibiteur de l'ECA, nous avons démontré dans le précédent chapitre que le cryptide AP pouvait agir sur le développement des adipocytes blancs humains sous-cutanés. Dans cette étude nous avons démontré qu'il est aussi doté d'activité antidiabétique. Cette activité multifonctionnelle que semble détenir certains cryptides marins pourrait être un argument supplémentaire en faveur de l'effet bénéfique des hydrolysats protéique et peptides qui en sont dérivés dans la promotion de la santé humaine. Ces derniers pourraient probablement agir sur plusieurs cibles impliquées dans le développement du syndrome métabolique.

Dans le prochain chapitre nous allons chercher à identifier ces cryptides dont le potentiel semble prometteur dans un hydrolysat protéique modèle de poisson: un hydrolysat de co-produits de Tilapia du Nil.

Partie 4 : Identification des cryptides dans un hydrolysat protéique de poisson



1. Introduction

Le Tilapia du Nil *Oreochromis niloticus* est un poisson d'élevage très répandu et classé au deuxième rang mondial lors de ces dernières années (Ng et Romano, 2013). La transformation industrielle de ce poisson génère une grande quantité de co-produits (têtes, viscères, arêtes et peau). Compte tenu de l'importance de valoriser ces déchets protéiques industriels riches en cryptides potentiellement bioactifs, les hydrolysats des co-produits de Tilapia ont été étudiés par plusieurs chercheurs (Fan *et al*., 2012). La plupart de ces études se sont intéressées à l'activité antioxydante de ces hydrolysats (Fan *et al*., 2012 ; Ngo *et al*., 2010 ; Sun *et al*., 2013 ; Charoenphun *et al*., 2013). Certains auteurs ont étudié le potentiel inhibiteur de l'ECA de ces hydrolysats (Raghavan et Kristinsson, 2009 ; Charoenphun *et al*., 2013). Toutefois, à notre connaissance, les séquences des peptides bioactifs responsables de l'activité inhibitrice de l'ECA des hydrolysats protéiques de Tilapia n'ont pas encore été identifiées.

Après avoir identifié les activités biologiques de cryptides ubiquitaires, il nous a semblé pertinent de rechercher ces cryptides au sein d'un hydrolysat commercial. Cette démarche originale, pourrait aider à prédire l'activité biologique d'un hydrolysat dans la mesure où les peptides bioactifs qu'il renferme conditionneraient son activité biologique. Nous avons ainsi fractionné l'hydrolysat protéique de Tilapia en fonction du poids moléculaire par ultrafiltration et évalué l'activité inhibitrice de l'ECA des différentes fractions obtenues. La fraction la plus active a été par la suite purifiée et analysée par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF couplée à une UPLC. Les séquences peptidiques contenues dans les sous fractions majoritaires ont été identifiées par spectrométrie de masse en tandem.

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet collaboratif récemment entamé avec le Dr. Ortencia Da Silva Nunes, de l'Université d'Etat de l'ouest du Parana, Campus de Toledo, au Brésil. Ce projet vise à valoriser les hydrolysats protéiques de co-produits de Tilapia du Nil obtenus après filetage industriel.

2. Fractionnement de l'hydrolysat par ultrafiltration et activité inhibitrice de l'ECA

L'objectif premier de ce travail était de fractionner l'hydrolysat protéique suivant le poids moléculaire (PM) dans le but d'identifier la fraction la plus active dans l'inhibition de l'ECA. Nous avons solubilisé 2 g de poudre d'hydrolysat protéique de co-produits obtenu après filetage de Tilapia du Nil dans de l'eau ultrapure. Le surnageant obtenu après centrifugation a été fractionné par 3 ultrafiltrations successives (30, 10 et 1 kDa). Nous avons mesuré la concentration en protéine de l'hydrolysat non fractionné et de ses fractions, et évalué par la suite leurs activités inhibitrices de l'ECA en utilisant le HHL comme substrat, comme cela a été précédemment décrit dans le paragraphe 4.2 du chapitre II « matériels et méthodes ». Puis, nous avons fait varier la concentration de ces échantillons afin de déterminer leurs CI 50. Les CI 50 de l'hydrolysat avant ultrafiltration et ses fractions A, B, C et D et E sont récapitulées dans le tableau 21.

Tableau 21: Concentration inhibitrice (µg/ml) de l'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia et de ses différentes fractions obtenues par ultrafiltration. CI 50 : concentration nécessaire pour inhiber 50% l'activité de l'ECA dans nos conditions du test.

Fraction	**CI 50 (µg/ml)**
Hydrolysat non fractionné	36,14±2,02
Fraction A (PM ≥30 kDa)	173,52±10,25
Fraction B (PM ≤30 kDa)	36,62±0,07
Fraction C (PM entre 10kDa et 30 kDa)	38,78±1,13
Fraction D (PM ≤10 kDa)	30,69±0,98
Fraction E (PM ≤1 kDa)	2,56±1,29
Captopril	0,0325

D'après les résultats obtenus, l'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia non fractionné présente une activité inhibitrice de l'ECA avec une valeur de CI 50=36,14±2,02 µg/ml.
Cette CI 50 se révèle être intéressante si l'on se réfère à des CI 50 d'hydrolysats protéiques de co-produits de poisson rapportés dans de précédentes études (tableau 22). Ces CI 50 ont

étaient eux aussi calculées en utilisant le HHL comme substrat mais dans des conditions différentes (concentration en substrat, en enzyme).

Tableau 22 : CI 50 (µg/ml) d' hydrolysats protéiques de co-produits de poisson de différentes espèces rapportées dans la littérature.

Origine	**CI 50 (µg/ml)**	**Références**
Limande du Japon *Limanda aspera* (carcasse)	883	(Jung *et al*., 2006)
Colin d'Alaska *Theragra chalcogramma* (peau)	655-1500	(Byun et Kim, 2001)
Le saumon keta *Oncorhynchus keta* (peau)	1008	(Lee *et al*., 2014)
Dorade (écailles)	570	(Fahmi *et al*., 2004)
Bonite (intestin)	75-1200	(Fujii *et al*., 1993)
Morue (carcasse)	80-400	(Jeon *et al*., 1999)

La comparaison des CI 50 de l'hydrolysat avant et après fractionnement, montre que l'hydrolysat non fractionné présentait une activité inhibitrice plus élevée (CI 50=36,14±2,02 µg/ml), que dans la fraction A enrichie en peptides de haut poids moléculaire supérieur à 30 kDa (CI 50=173,52±10,25 µg/ml). Toutefois, l'activité inhibitrice de la fraction B ≤ 30 kDa (CI 50=36,62 ± 0,07 µg/ml) est presque égale à celle obtenue avec la fraction de l'hydrolysat non fractionné. Ceci indique que les peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 30 kDa seraient en grande partie à l'origine de l'importante activité inhibitrice de l'ECA obtenue avec l'hydrolysat de Tilapia non fractionné.

L'activité inhibitrice la plus élevée a été obtenue avec la fraction E, enrichie en peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 1 kDa. En effet, la valeur de CI 50 de la fraction E (CI 50=2,56±1,29 µg/ml) est environ 12 et 14 fois plus faible que celles respectivement de la fraction D (CI 50=30,69±0,98 µg/ml) et la fraction B (CI50=36,62±0,07 µg/ml). Nos résultats suggèrent que l'augmentation de l'activité inhibitrice de l'ECA de l'hydrolysat de Tilapia ultrafiltré est inversement proportionnelle au poids moléculaire des peptides contenues dans ce dernier : CI 50 fraction E (≤1 kDa) ≤ CI 50 fraction D (≤ 10 kDa) ≤ CI 50 fraction B (≤ 30 kDa).

L'ultrafiltration, une méthode simple à mettre en œuvre et largement utilisée dans les industries alimentaires pour la séparation rapide et la concentration de protéines alimentaires, est un moyen intéressant pour augmenter le potentiel inhibiteur de l'ECA de l'hydrolysat protéique commercial de co-produits de Tilapia.

Une telle augmentation de l'activité inhibitrice de l'ECA dans des hydrolysats protéiques ultra-filtrés enrichis en peptides à faible poids moléculaire a aussi été rapportée pour les hydrolysats protéiques du lactosérum (Pihlanto-Leppälä *et al*., 2000), pour les hydrolysats préparés à partir de la protéine de *limande du Japon* (Jung *et al*., 2006), pour les hydrolysats protéiques de carcasse de morue (Jeon *et al*., 1999) ou encore les hydrolysats d'intestin de bonite (Fujii *et al*., 1993). Pihlanto-Leppälä. (2000) ont montré que les peptides de faible poids moléculaire dérivés des protéines du lactosérum bovin avaient un potentiel inhibiteur de l'ECA plus important que ceux de haut poids moléculaire. Toutefois, Raghavan et Kristinsson. (2009) n'ont pas observé une telle augmentation de l'activité inhibitrice de l'ECA suite à une ultrafiltration quelque soit les hydrolysats protéiques de Tilapia testés. Ils ont montré que l'activité inhibitrice de l'ECA des hydrolysats avec un degré d'hydrolyse (DH) =25% avait augmenté dans la fraction ultrafiltrée de l'hydrolysat préparé par digestion à la cryotine-F mais pas dans celle préparée par digestion au Flavourzyme (DH) =25%.

Dans la mesure où la fraction E s'est révélée être la plus active, nous avons choisi de l'exploiter pour y rechercher les cryptides qui ont fait l'objet des parties précédentes.

3. Séparation et purification de l'hydrolysat enrichi en peptides ≤ 1 kDa (fraction E) par RP-HPLC

La fraction E de l'hydrolysat (riche en peptides dont le PM est inférieur à 1 kDa) a été séparée par HPLC en phase inverse à l'aide d'une colonne de type C 18 comme décrit dans le paragraphe 4.2.2 du chapitre II « matériels et méthodes ». Le chromatogramme d'analyse et la définition des sous fractions obtenues sont présentés figure 39.

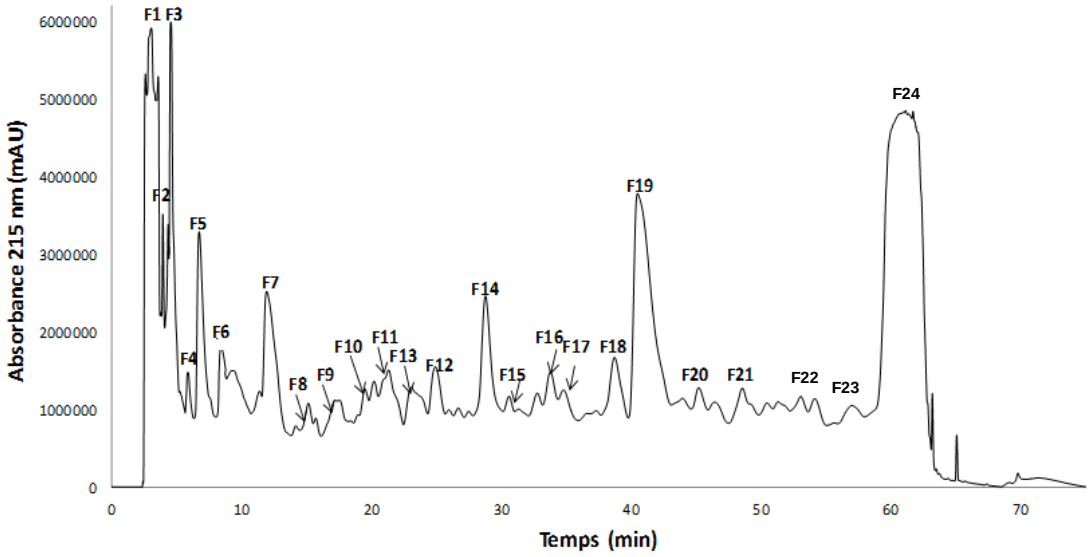


Figure 40 : Fractionnement par HPLC en phase inverse de l'hydrolysat protéique de coproduits de Tilapia du Nil obtenu après ultrafiltration sur membrane de 1 kDa (fraction E).

La fraction E de l'hydrolysat de Tilapia est un mélange complexe que la chromatographie HPLC en phase inverse nous a permis de séparer en 24 sous fractions. L'hydrolysat contient une grande variété de peptides bien que l'étape de purification antérieure nous a permis d'écarter la majeure partie des peptides dont le poids moléculaire est supérieur à 1 kDa. Chacun des pics a été récolté selon le profil d'élution en vue d'une analyse ultérieure en spectrométrie de masse ESI-Q-TOF.

4. Identification et caractérisation des peptides de la fraction (PM ≤1 kDa issue de l'hydrolysat protéique de Tilapia du Nil par UPLC-ESI-Q-TOF

Un double objectif guidait ce travail : identifier la présence des di et tripeptides dont les activités biologiques ont déjà été étudiées dans les précédentes sections du chapitre « Résultats et discussions » et en caractériser d'autres de très faibles poids moléculaire, potentiellement inhibiteurs de l'ECA dans les sous fractions majoritaires de l'hydrolysat (F1, F3, F5, F7, F14 et F19).

4.1. Identification de di et tripeptides spécifiques dans l'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia

La démarche que nous avions fixée initialement était d'identifier la présence de cryptides précédemment étudiés (VY, VW, KW, KY, IY, LKP, AKK, VIY, GPL, VAP et AP) dans l'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia.

Pour l'identification en UPLC-Q-TOF-MS, nous avons d'abord analysé les 11 cryptides synthétiques dans les conditions décrites dans le paragraphe 4.2.2 du chapitre II « matériels et méthodes ». Une banque de données a été créée avec les formules brutes, temps de rétention et la masse d'un des fragments des 11 cryptides synthétiques. Puis, nous avons analysé les sous fractions (F1 à F21) dans les mêmes conditions que les standards (cryptides synthétiques).

Nous avons restreint notre recherche aux 21 premières sous fractions (F1 à F21) collectées suite à la purification par RP-HPLC. Ce choix s'est basé sur une analyse antérieure des 11 cryptides précédemment analysés dans les mêmes conditions que les sous fractions (analyse par RP-HPLC). En effet, cette analyse a révélé que les di et tripeptides recherchés étaient élués à moins de 10 % d'acétonitrile (avant 50 minutes d'analyse).

L'identification, réalisée avec le module Chromalynx du logiciel « MassLynx », nous a permis de collecter une liste des ions correspondants à notre recherche dans les sous fractions. Ces différents ions proposés ont été analysés par spectrométrie en tandem et les fragments ont été vérifiés par rapport à ceux obtenus théoriquement avec le module Biolynx et le logiciel « Ion Fragment Calculator » et ceux obtenus pour les cryptides synthétiques standards. Nous avons pu ainsi confirmer avec certitude la présence des dipeptides VY et VW respectivement dans les sous fractions F9 et F21. Ces dernières sont des sous fractions minoritaires de l'hydrolysat protéique de Tilapia enrichi en peptides de PM≤ 1 kDa comme montré dans le chromatogramme (figure 40). Les cryptides VY (figure 41.A) et VW (figure 41.B) se retrouvent aussi minoritaires dans ces sous fractions. Ceci suggère leur présence en très faible quantité dans l'hydrolysat.

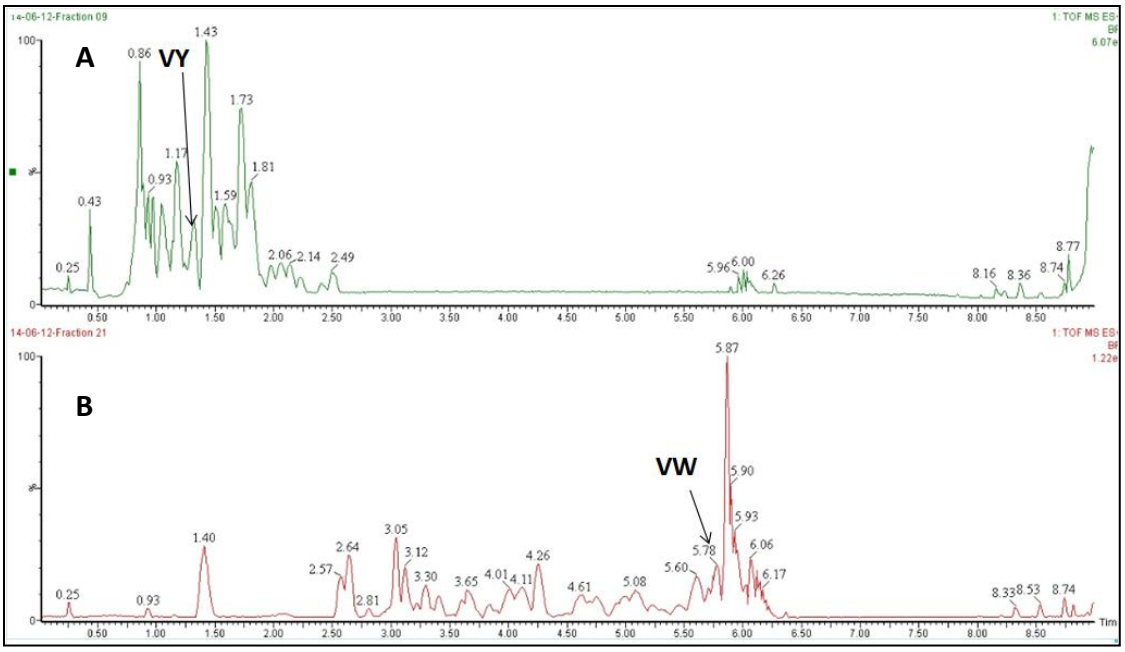


Figure 41 : Chromatogramme MS obtenu après séparation en UPLC sur C18 de la sous fraction 9 (A) et de la sous fraction 21 (B).

La figure 42 présente les deux spectres UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS du cryptide synthétique VY (figure 42.A) et de celui détecté dans la sous fraction F9 (figure 42.B). VY présente dans les deux spectres, l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à m/z=281,15. Parmi les fragmentations, on observe l'ion majoritaire y_1 à m/z=182, 08, l'ion a_1 à m/z=72,08 et z_1 à m/z=165, 05.

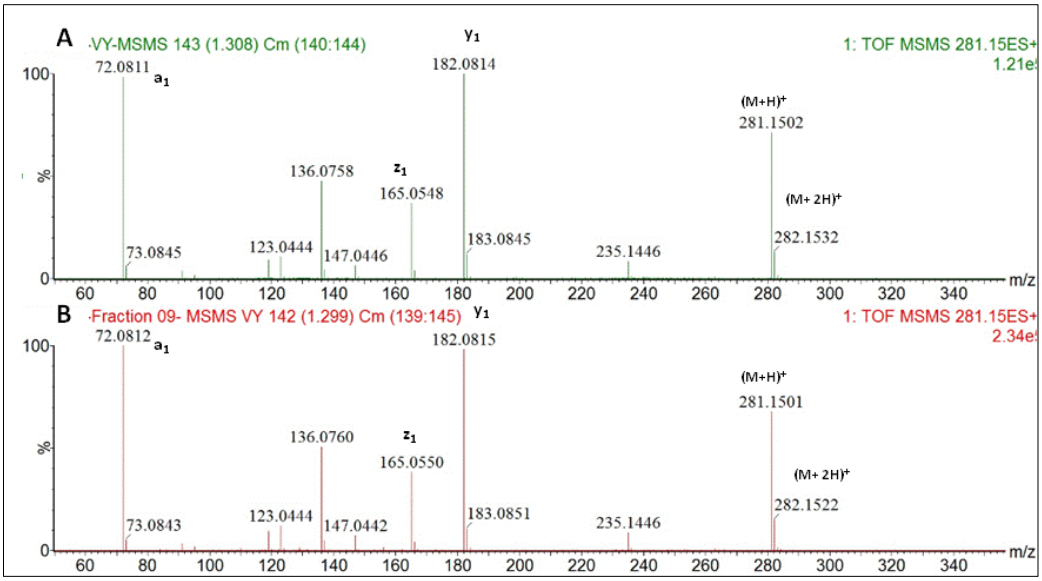


Figure 42 : Spectre d'analyse Q-TOF MS/MS du peptide VY. Masse moléculaire sous forme protonée obtenue [M+H]+ m/z=281,15. (A) VY synthétique (standard) et (B) VY identifié dans la sous fraction 9.

La figure 43 correspond aux deux spectres UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS du peptide synthétique VW (figure 43.A) et du VW identifié dans la sous fraction F21 (figure 43.B). VW présente dans les deux spectres l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ à m/z=304,16. Parmi les fragmentations, on observe dans les deux spectres l'ion majoritaire z_1 à m/z=188,07, l'ion a_1 à m/z=72,08 et l'ion y_1 à m/z=205,09.

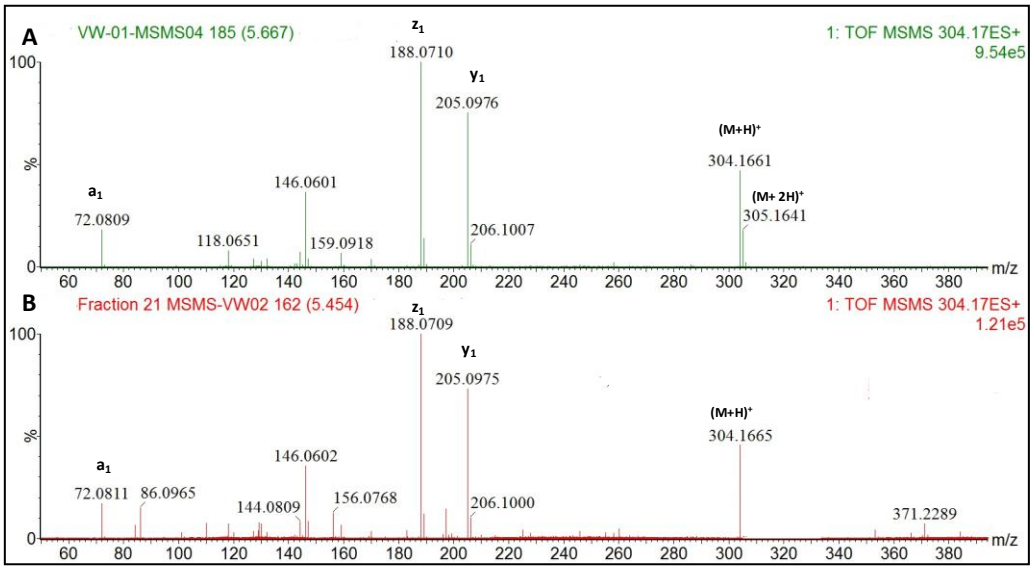


Figure 43 : Spectre d'analyse Q-TOF MS/MS du peptide VW. Masse moléculaire sous forme protonée obtenue [M+H]+ m/z=304,16. (A) VW synthétique (standard) et (B) VW identifié dans la sous fraction 21.

Nous avons ainsi démontré la présence des deux peptides VY et VW précédemment identifiés comme de puissants inhibiteurs de l'ECA dans l'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia. VY et VW ont précédemment été identifiés dans plusieurs autres ressources essentiellement d'origine marine mais aussi non marine. En effet, VY a été isolé à partir de l'hydrolysat protéique du muscle de la sardine (Matsufuji *et al.*, 1994), des écailles de dorade (Fahmi et *al*., 2004), de l'hydrolysat protéique de l'algue comestible *Undaria pinnatifida* (Suetsuna *et al*., 2004), ou encore de la boisson de riz fermenté japonaise (Saito *et al.*, 1994). VW a été identifié dans l'hydrolysat protéique de peau de saumon (Ono *et al*., 2003), dans l'algue *Undaria pinnatifida* (Suetsuna *et al.*, 2004) et également dans l'hydrolysat protéique de colza (Marczak *et al*., 2003). De plus VY (Matsui *et al.*, 2002b) et VW (Nii *et al*., 2008) résistent à la digestion gastro-intestinale et leurs activités antihypertensives ont été vérifiées *in vivo* sur des rats spontanément hypertensifs (Nii *et al*., 2008 ; Suetsuna *et al*., 2004). Le potentiel hypotenseur de VY a même été validé cliniquement (Kawasaki *et al*., 2000).

Nous avons au cours de ce travail validé la faisabilité d'une démarche originale. En effet, identifier la présence d'un ou de plusieurs peptides spécifiques dont l'activité biologique a précédemment été caractérisée dans une matrice complexe est tout à fait possible. Identifier de tels peptides bioactifs pourrait être un argument supplémentaire en faveur de la valorisation de l'hydrolysat et de sa promotion au service de la santé humaine. Une quantification de la concentration de ces cryptides devrait systématiquement être menée car les peptides doivent atteindre leurs cibles sous une forme active, et en concentration suffisante pour qu'un effet physiologique soit observé.

4.2. Identification des cryptides de faibles PM dans l'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia

Dans une démarche plus conventionnelle nous avons cherché à identifier quelques peptides contenus dans les sous fractions majoritaires F1, F3, F5, F7, F14 et F19, de l'hydrolysat riche en peptides dont le PM est inférieur à 1 kDa (fraction E). En effet, cette fraction était la plus active lors des mesures de l'inhibition de l'ECA.

L'analyse UPLC-ESI-Q-TOF-MS des fractions F1, F3, F5, F7, F14 et F19 a révélé la présence d'un total de 45 peptides dont 24 dipeptides, 14 tripeptides et 7 tétrapeptides dont les séquences sont récapitulées dans le tableau 23. La majorité de ces fractions s'est avérée extrêmement complexe, comme la fraction F7 qui contenait 11 peptides distincts dont 6

dipeptides et 5 tripeptides. L'analyse en mode tandem a permis de déterminer leurs séquences à l'aide du module « Biolynx » du logiciel « MassLynx ».

Cette méthode d'analyse par UPLC-ESI-Q-TOF MS/MS s'est révélée toute à fait adaptée à l'identification des peptides de très faible poids moléculaire. Cependant, la limite de cette méthode réside dans l'incertitude qui existe sur la présence respective des résidus Leu et Ile, puisqu'il n'est pas possible de distinguer les acides aminés isomères par la spectrométrie de masse dans ces conditions. En effet, dans des expériences de séquençage de peptides impliquant une seule étape d'acquisition de masse en tandem, la leucine et l'isoleucine sont indiscernables (Armirotti *et al*., 2007). Armirotti *et al*. (2007) proposent une solution pour résoudre cette problématique : Les ions moléculaires protonés de la Leu et Ile (132 Da) génèrent facilement l'ion immonium correspondant (86 Da) par la perte de l'acide formique. Les auteurs ont montré que lorsque l'ion immonium est également fragmenté, le spectre MS^3 montre des ions communs de 30 et 44 Da communs aux deux acides aminés. Cependant, Ile, contrairement à la Leu, génère un ion de 69 Da. Une application de cette technique aux peptides incertains nous permettra probablement de différencier ces deux isomères.

Tableau 23: Identification des peptides contenus dans les sous fractions majoritaires séparées par RP-HPLC (F1, F3, F5, F7, F14 et F19). Les ions majoritaires sont présentés en gras.

Fractions	Masse observée (ion [M+H]+ expérimentale)	Masse calculée* (ion [M+H]+ théorique)	Erreur (ppm)	Séquence	Fractions	Masse observée (ion [M+H]+ expérimentale)	Masse calculée* (ion [M+H]+ théorique)	Erreur (ppm)	Séquence
F1	219,1345	219,1345	0,0	SL/SI	**F7**	**247,1297**	**247,1294**	**1,21**	**DL/DI**
F1	**233,1500**	**233,1501**	**0,4**	**TL/TI**	F7	249,1277	249,1273	1,61	VM
F1	246,1566	246,1566	0,0	AR	F7	294,1825	294,1818	2,38	FK
F1	253,1189	253,1188	0,4	AY	F7	304,1870	304,1872	0,66	LAT/IAT
F1	**260,1975**	**260,1974**	**0,4**	**LK/IK**	F7	311,1246	311,1243	0,96	EY
F1	274,1877	274,1879	0,7	VR	F7	312,1787	312,1784	0,96	HR
F1	**288,2036**	**288,2036**	**0**	**LR/IR**	F7	322,1886	322,1879	2,17	FR
F1	306,1598	306,1600	0,7	MR	F7	389,2400	389,2400	0,00	KEL/KEI
					F7	398,2042	398,2040	0,50	HLE/HIE
F3	217,1550	217,1552	0,9	VV	F7	403,2307	403,2305	0,50	EVR
F3	**247,1294**	**247,1294**	**0,00**	**LD/ID**	F7	467,2257	467,2254	0,64	YER
F3	260,1610	260,1610	0,00	VAA					
F3	**260,1612**	**260,1610**	**0,8**	**LQ/IQ**	F14	253,1301	253,1300	0,40	PH
F3	326,1827	326,1828	0,3	GLH/GIH	**F14**	**295,1664**	**295,1658**	**2,03**	**LY/IY**
F3	348,1768	348,1771	0,9	TVE	F14	395,1935	395,1931	1,01	QTF
F3	418,2657	418,2666	2,1	GTLK/GTIK	F14	409,2201	409,2199	0,49	FSR
F3	317,1823	317,1825	0,6	VQA	F14	415,2558	415,2557	0,24	VPLS/VPIS
					F14	424,2089	424,2084	1,18	LYE/IYE
F5	219,1346	219,1345	0,46	LS/IS	F14	433,2302	433,2298	0,92	VDLS/VDIS
F5	261,1451	261,1450	0,38	LE/IE	F14	437,2519	437,2512	1,6	ALPH/AIPH
F5	269,1612	269,1614	0,74	HL/HI					
F5	288,2034	288,2036	0,69	LR/IR	F19	403,2551	403,2557	1,49	VALT/VAIT
F5	**311,1243**	**311,1243**	**0,00**	**YE**	**F19**	**445,2657**	**445,2662**	**1,12**	**ALLE/AIIE/AILE/ALIE**
F5	331,1981	331,1981	0,00	ALQ/AIQ	F19	449,2065	449,2070	1,11	ADLM/ADIM
F5	332,1825	332,1822	0,9	VVD					

En comparant nos 45 séquences identifiées à celles des peptides disponibles dans la base de données BioPep (Dziuba *et al*., 1999) accessible sur le site « www.uwm.edu.pl/biochemia » nous avons trouvé 4 dipeptides et un tripeptide qui ont déjà été identifiés dans de précédentes études comme des inhibiteurs de l'ECA. La séquence, l'origine ainsi que leurs CI 50 sont présentées dans le tableau 24.

Tableau 24 : Les peptides précédemment identifiés comme inhibiteurs de l'ECA dans la littérature.

Séquences	**Origine**	**CI 50 (µM)**	**Références**
AR	Muscle du porc	95,5 (Abz)	(Sentandreu et Toldrá, 2007)
AY	Mais (α-Zein)	19 (HHL)	(Yano *et al*., 1996)
EY	Viande de requin	2,6 (HHL)	(Wu *et al*., 2008)
VR	Lait ovin (Ƙ-caseine)	52,8 (HHL)	(Gómez-Ruiz *et al*., 2007)
VAA	Mais α-Zein	13 (HHL)	(Miyoshi *et al*., 1991)

Il est possible que ces cryptides soient responsables de l'activité d'inhibition de l'ECA mesurée dans la fraction E. Cependant, une quantification de ces derniers dans l'hydrolysat et une évaluation de la synergie de ces cryptides devront être menée pour le vérifier.

5. Conclusion

L'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia du Nil a été d'abord fractionné selon le poids moléculaire par ultrafiltration. L'évaluation de l'activité inhibitrice de l'ECA dans les différentes fractions nous a permis de mettre en évidence que l'activité inhibitrice de l'ECA était corrélée au poids moléculaire des peptides contenus dans l'hydrolysat. La fraction enrichie en peptides à faible poids moléculaire ≤ 1 kDa présentait l'activité inhibitrice la plus élevée. Après fractionnement, l'analyse UPLC-ESI-Q-TOF nous a permis d'identifier la présence des deux dipeptides VW et VY à partir de base de données établie avec les 11 cryptides synthétiques. Nous avons également caractérisé à partir des fractions majoritaires de l'hydrolysat (≤ 1kDa) 45 peptides dont la masse moléculaire variait entre 217 et 449 Da.

Cet hydrolysat semble contenir plusieurs peptides d'intérêt auxquels nous allons nous intéresser pour la poursuite du projet qui vise à valoriser les hydrolysats protéiques de co-produits de Tilapia obtenus après filetage industriel.

Ce projet inclura également la caractérisation fine d'autres activités biologiques afin de vérifier si l'hydrolysat est doté d'activités multifonctionnelles.

Conclusions & perspectives

Les ressources marines constituent un réservoir considérable de substances actives, en particulier, de peptides bioactifs que nous appelons « Cryptides ». Ces derniers sont libérés à partir des protéines marines lors de procédés protéolytiques et ont un potentiel intéressant en tant que nutraceutique. Les cryptides marins ont été principalement identifiés et étudiés pour leur potentiel inhibiteur de l'ECA, enzyme clé de la régulation de la pression artérielle.

Si plusieurs études menées sur les ressources marines ont permis d'identifier un grand nombre de cryptides potentiellement antihypertensifs *in vitro*, rares sont celles qui ont cherché à évaluer leurs capacités à lutter également contre le développement de l'obésité et du diabète. Ces pathologies souvent associés à l'hypertension sont rassemblées sous le nom de syndrome métabolique.

L'objectif global de notre étude était d'évaluer si 11 cryptides : 6 dipeptides (VW, KW, VY, KY, IY et AP) et 5 tripeptides (GPL, LKP, VIY, AKK et VAP), identifiés dans des ressources marines et présentés dans la littérature comme de puissants inhibiteurs de l'ECA étaient capables d'exercer une ou des actions sur des cibles impliquées dans les désordres du syndrome métabolique. Nous avons également tenté d'élucider leurs mécanismes d'action.

Bien que ce travail ne soit pas totalement achevé, il a apporté un ensemble de résultats originaux qui devraient permettre de mieux exploiter le grand potentiel des cryptides, notamment ceux dérivés de ressources marines.

Nous avons d'abord réalisé une étude comparative de 3 méthodes de criblage d'activités inhibitrices de l'ECA réalisées en microplaques. Ces méthodes diffèrent essentiellement par la nature du substrat utilisé et par le moyen d'identification de l'activité. Nos résultats montrent que la mesure de l'activité inhibitrice de l'ECA exprimée en valeur de CI 50 est dépendante du substrat mis en œuvre et donc que ces valeurs déterminées doivent être systématiquement accompagnées de références choisies judicieusement. Nous avons choisi comme molécule témoin non inhibitrice le losartan. Considérant les CI 50 mesurées, les cryptides : VW, VY, LKP et KW ont été considérés comme de bons inhibiteurs de l'ECA dans la mesure où leurs CI 50 étaient inférieures à celles du losartan quel que soit le substrat mis en œuvre.

Les résultats de notre étude confirment que des tests *in vitro* sont utiles pour le criblage de peptides inhibiteurs de l'ECA dans les fractions d'hydrolysats protéiques. Toutefois, les tests *in vivo* sont toujours nécessaires pour qu'un peptide soit proposé comme un potentiel agent antihypertensif. D'autres études, utilisant la bradykinine comme substrat de l'ECA, et d'autres

cryptides vont être réalisées. Elles incrémenteront la base de données des inhibiteurs de l'ECA d'origine marine. La caractérisation des paramètres cinétiques de l'ECA avec tous les substrats mentionnés ainsi que le type d'inhibition des cryptides devrait être très prochainement entreprise dans le but de mieux comprendre les résultats obtenus. De plus, les tests de résonance plasmonique de surface qui ont été entamés par le Dr. Celine Cakir Kiefer (Unité : Animal Et Fonctionnalités Des Produits Animaux, Université de Lorraine), nous permettra probablement de mieux éclaircir les interactions qui se produisent entre l'ECA humaine et les cryptides inhibiteurs.

En plus de leurs activités inhibitrices de l'ECA, nous avons évalué la capacité de ces cryptides à inhiber les principales alternatives à l'ECA dans la conversion de l'angiotensine I en II : la chymase et la cathepsine G. Les résultats obtenus montrent que les cryptides testés ne présentent pas un potentiel inhibiteur intéressant. Par conséquent, l'activité antihypertensive *in vivo* qui a été mise en évidence dans de précédents travaux pour certains d'entre eux dont notamment VY, VW et LKP semble être médiée par une inhibition sélective de l'ECA. Cependant, cette hypothèse reste à vérifier dans la mesure où l'activité des cryptides sur les autres composantes du système rénine-angiotensine, dont notamment, la rénine, n'a pas encore été testée.

Nous avons étudié l'effet des 11 cryptides marins sur l'hyperplasie et l'hypertrophie d'adipocytes blancs humains sous-cutanés. Nous avons pu examiner si leur activité inhibitrice de l'ECA était corrélée à une inhibition de la différenciation adipocytaire comme cela a été évoqué par de précédentes études, notamment une, menée au sein de notre laboratoire. Nos résultats indiquent que les cryptides AP, VAP et AKK exercent un effet cytotoxique et antiprolifératif important sur les pré-adipocytes en phase de multiplication. Par ailleurs, VW et KW réduisent significativement le nombre d'adipocytes pendant la phase précoce de la différenciation adipocytaire. Ces cryptides semblent ainsi agir sur l'hyperplasie adipocytaire. Les cryptides IY et GPL agiraient plutôt sur la différenciation adipocytaire et moduleraient donc l'hypertrophie adipocytaire. Cette modulation de la différenciation observée suite à une incubation des adipocytes pendant les 8 premiers jours de la différenciation s'est révélée être médiée par une inhibition de l'expression des facteurs de transcription PPARγ et C/EBPα.

Ces résultats ont permis de démonter que les cryptides marins étaient capables d'agir sur le cycle de vie des adipocytes humains blancs sous-cutanés mais cet effet ne semble pas être dû

à leurs activités inhibitrices de l'ECA dans la mesure où les cryptides VY et LKP de puissants inhibiteurs de l'ECA *in vitro* n'ont montré aucun effet sur ces adipocytes.

Ces résultats ouvrent un certain nombre de perspectives qui rendent nécessaire une validation sur les adipocytes viscéraux, qui seraient plus impliqués dans les désordres du syndrome métabolique. Une action de leur effet *in vivo* sur des modèles d'animaux obèses tels que les rats ZUCKERS (modèle de rat obèse) est aussi indispensable. En effet, les lignées d'adipocytes ne représentent qu'une composante du tissu adipeux. Ces cellules ne peuvent en aucun cas mimer le comportement du tissu adipeux *in vivo*.

Nous nous sommes par la suite intéressés à l'action antidiabétique de ces 11 cryptides marins via l'inhibition de l'α-glucosidase, de l'α-amylase et de la dipeptidyl peptidase IV, enzymes impliquées dans la régulation de la glycémie post-prandiale. Les résultats obtenus témoignent d'une faible action inhibitrice *in vitro* des cryptides sur l'activité de l'α-amylase pancréatique et sur la dipeptidyl peptidase IV comparée aux inhibiteurs de référence respectifs à ces deux enzymes : l'acarbose et la diprotine A. Cependant, les résultats obtenus avec l'α-glucosidase se révèlent être beaucoup plus encourageants. Les plus intéressants ont été obtenus avec les deux cryptides AP et VAP. En effet, l'activité inhibitrice de ces deux derniers a été même nettement supérieure à celle obtenue avec le voglibose, le miglitol ou encore l'acarbose, des inhibiteurs spécifiques de l'α-glucosidase présents sur le marché. L'action *in vivo* des cryptides AP et VAP sur la glycémie post-prandiale a été menée sur des modèles de souris diabétiques. A travers ces études, la réduction de la glycémie post-prandiale pour les souris traitées avec AP a pu être démontrée et se révèle du même ordre que celle obtenue avec les souris traitées avec l'acarbose. Aucun effet significatif n'a été observé sur les souris traitées par le VAP.

AP, pourrait donc être considéré comme un agent inhibiteur naturel de l'α-glucosidase et se présenterait comme une alternative aux agents inhibiteurs chimiques présents sur le marché. Nous allons approfondir cette partie, d'un point de vue fondamental, par une étude de modélisation moléculaire qui sera très prochainement entreprise. Ceci nous permettra d'élucider le mécanisme d'action par lequel le cryptide AP pourrait agir pour inhiber l'α-glucosidase. Une étude structure-fonction avec un plus grand nombre de peptides sera menée pour mieux comprendre les résultats obtenus et orienter les recherches vers la découverte de puissants inhibiteurs peptidiques de l'α-glucosidase.

En dernière partie de ces travaux, nous avons cherché à identifier dans un hydrolysat protéique modèle les cryptides marins connus. L'hydrolysat protéique de co-produits de Tilapia du Nil a été choisi comme matrice. L'analyse UPLC-ESI-Q-TOF de la fraction de l'hydrolysat ultrafiltrée sur membrane de 1 kDa nous a permis d'identifier la présence de VW et VY. Parallèlement à cela, nous avons pu caractériser à partir des fractions majoritaires de l'hydrolysat (≤ 1kDa) 45 peptides dont la masse moléculaire varie entre 217 et 449 Da. Le potentiel de l'hydrolysat de Tilapia à cibler les pathologies du syndrome métabolique sera évalué. Ceci va être entrepris dans le cadre d'un projet collaboratif entamé avec l'Université d'Etat de l'ouest du Parana, Campus de Toledo, au Brésil visant à valoriser les hydrolysats protéiques de co-produits de Tilapia générés après filetage industriel.

Une autre étude évaluant l'action des cryptides sur la stimulation de la sécrétion de CCK et GLP-1 par les cellules STC-1 est en cours. Cette étude est réalisée en collaboration avec le Dr. Rozenn Ravallec-Plé (Laboratoire ProBioGEM, Université de Lille 1) Les résultats préliminaires montrent un potentiel prometteur du cryptide VIY. En effet, VIY a stimulé significativement la sécrétion de ces deux hormones avec un effet dose dépendant. Ce cryptide pourrait donc moduler la prise de poids en agissant sur les signaux de la faim et de la satiété.

Au vu de ces résultats et des données de la littérature, il apparaît que les cryptides marins possèdent un potentiel prometteur dans la prévention du syndrome métabolique et que certains cryptides seraient capables d'agir sur plusieurs cibles impliquées dans la régulation des anomalies métaboliques. Il est à envisager désormais d'étudier l'action multifonctionnelle de ces cryptides sur des modèles de rats atteint du syndrome métabolique (rats Wistar Ottawa Karlsbur) avant de les valider cliniquement. Cette étape pourrait, à terme, permettre leur utilisation en tant qu'agent nutraceutique visant à préserver la santé humaine.

Les principaux résultats obtenus lors de ce projet sont illustrés par la figure 44.

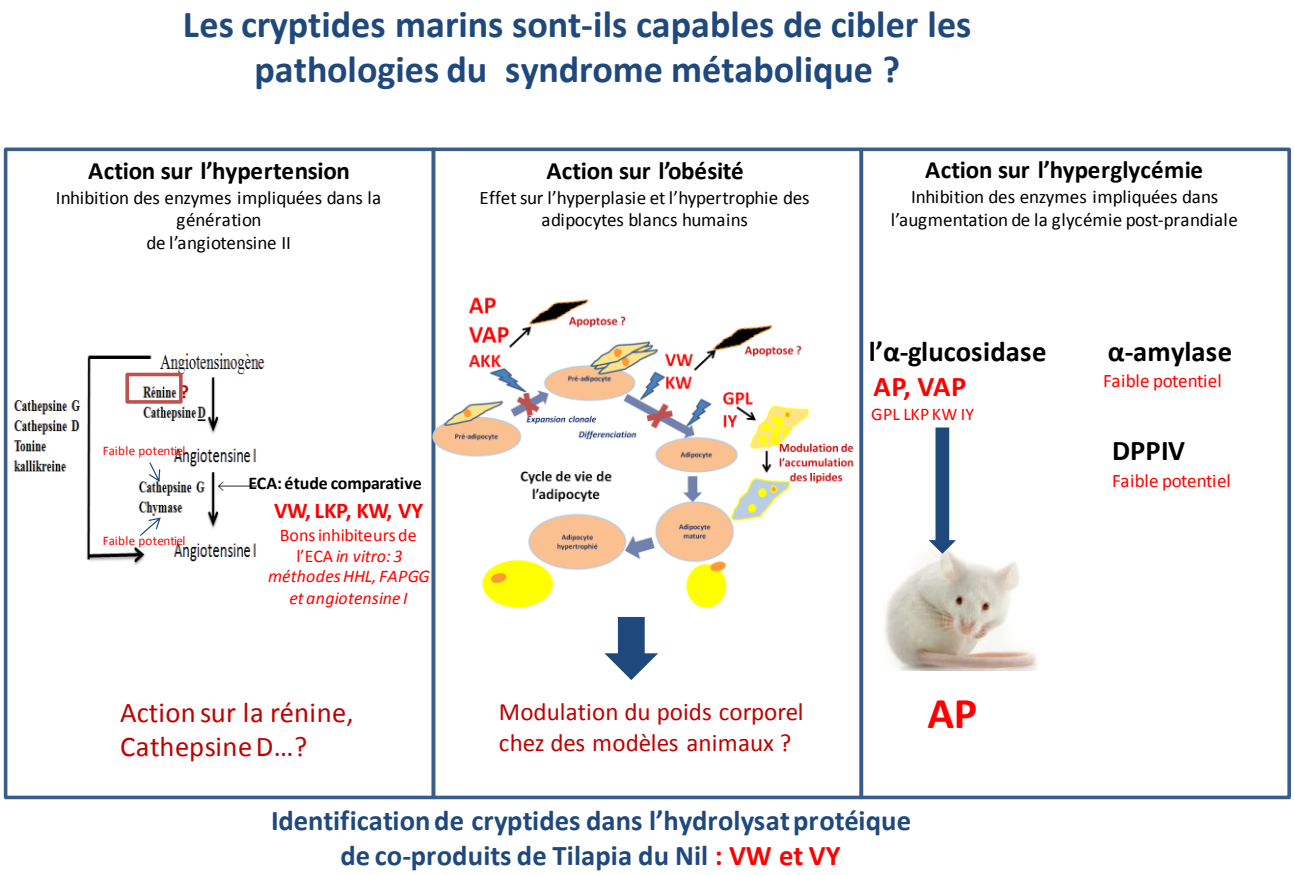


Figure 44 : Présentation schématique des principaux résultats obtenus dans cette étude

Annexes

Annexe 1 : Cryptides inhibiteurs de l'ECA sélectionnés dans notre étude.

Cryptides	**Sources**	**Mode de génération**	**CI 50 (µM)**	**Digestion gastro-intestinale**	**Test *in vivo* (SHR) Diminution de SBP (mmHg)**	**Références**
VW	Wakame *(Undaria pinnatifida*)	Extraction par eau chaude	10.8 (HHL)	-	-	(Suetsuna *et al.*, 2004)
VW	Sauce de saumon fermentée	Fermentation	2 (HHL)	-	-48 après 3 h d'administration (200mg/kg)	(Kainuma *et al.*, 1995)
VW	Boisson alcoolisée japonaise à base de riz	Fermentation	1.4	-	-26 après 4h d'administration (100mg/kg)	(Saito *et al*., 1994)
VW	Colza	Trypsine, + chymotrypsine, + pancreatine, + subtilisine et thermolysine	1.6 (HHL)	-	-10,8 après 2h d'administration (7.5mg/kg)	(Marczak *et al.*, 2003)
VW	Crevette (*Plesionika izumiae Omori*)	Protéase S	6.6. (HHL)	Stable	Diminution significative après 1 h d'administration (10mg/ml).	(Nii *et al*., 2008)
VW	Krill antarctique (*Euphausia superba*)	-	12.9 (FAPGG)	-	-	(Hatanaka *et al*., 2009)
VW	Peau de saumon	Thermolysine	2.5 (HHL)		-	(Ono *et al.*, 2003)
KY	Wakame *(Undaria pinnatifida*)	Extraction par eau chaude	7.7 (HHL)	-	-46 après 3h d'administration (50mg/kg).	(Suetsuna *et al*., 2004)

KY	Sardine	Protéase alcaline	1.63 (HHL)	-	-	(Matsufuji *et al.*, 1994)
VY	Wakame	Extraction par eau chaude	11.3 (HHL)	-	-	(Suetsuna *et al.*, 2004)
VY	Boisson alcoolisée japonaise à base de riz	Fermentation	7.1	-	-16 après 4h d'administration (100 mg/kg)	(Saito *et al.*, 1994)
VY	Muscle de sardine	Protéase alcaline		-	-	(Matsufuji *et al.*, 1994)
VY	Ecailles de dorade	Protéase alcaline	16 (HHL)	-	-	(Fahmi *et al.*, 2004)
IY	Wakame	Extraction par eau chaude	2.7 (HHL)	-	-33 après 3h d'administration (50 mg/kg).	(Suetsuna *et al.*, 2004)
IY	Bonite	Thermolysine	1.9 (HHL)	-	-19 après 2h d'administration (60 mg/kg)	(Fujita et Yoshikawa, 1999)
IY	Sardine (muscle)	Protéase alcaline	10.5 (HHL)	-	-	(Matsufuji *et al.*, 1994)
IY	Colza	Trypsine, chymotrypsine, pancreatine, subtilisine et thermolysine	3.7 (HHL)	-	-10 après 2h d'administration (7 mg/kg)	(Marczak *et al.*, 2003)
AP	Saumon de l'atlantique (peau)	Alcalase +papaine	0.060 (mg/ml) (HHL)	-	-	(Gu *et al.*, 2011)
AP	Lait	_	11,4 % à 20 µM	-	-	(Platerink *et al.*, 2008)
AP	Sauce fermentée d'anchois, de	Fermentation	29 (HHL)	-	-	(Ichimura *et al.*, 2003)

	bonite et de sardine					
VAP	Carpe	Alcalase	18.6 (HHL).	Stable		(Chen *et al*., 2012)
VAP	Caséine	Synthétique	2.0 (HHL)		Pas d'effet (à 17,9 mg/kg)	(Wang *et al*., 2011)
LKP	Bonite séchée	Thermolysine	0.32 (HHL)		-16 après 2 h d'administration de (9mg/kg)	(Fujita et Yoshikawa, 1999)
LKP	Poulet	-	2.94 (HHL)	Stable	-	(Majumder et Wu, 2011)
KW	Wakame *(Undaria pinnatifida*)	Extraction par eau chaude	10.8 (HHL)	-	-	(Suetsuna et *al.*, 2004)
KW	Sardine (muscle)	Protéase alcaline	1.63 (HHL)	-	-	(Matsufuji et *al*., 1994)
GPL	Colin d'Alaska	Alcalase + pronase+ collagenase	2.65 (HHL)	-	-	(Byun et Kim, 2001)
GPL	Vache (gélatine de peau)	Alcalase + pronase E + collagenase	2.55	-	-	(Kim *et al*., 2001)
AKK	Sardine (muscle)	Alcalase	3.13 (HHL)	-	-	(Matsufuji *et al*., 1994)
VIY	Dorade (écailles)	Protéase alcaline	7.5 (HHL)	-	-	(Fahmi *et al*., 2004)
VIY	sésame	-	4.50 (HHL)	-	-	(Nakano *et al*., 2006)

SRH : Rats spontanément hypertendus, **SBP** : Systolic blood pressure

Références bibliographiques

A

Addison, D., Aguilar, D., 2011. Diabetes and cardiovascular disease: the potential benefit of incretin-based therapies. *Curr. Atheroscler. Rep*. 13, 115–122.

Adibi, S.A., Morse, E.L., 1971. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *J. Clin. Invest*. 50, 2266–2275.

Adisakwattana, S., Jiphimai, P., Prutanopajai, P., Chanathong, B., Sapwarobol, S., Ariyapitipan, T., 2010. Evaluation of α-glucosidase, α-amylase and protein glycation inhibitory activities of edible plants. *Int. J. Food Sci. Nutr*. 61, 295–305.

Alam, N., Gourinath, S., Dey, S., Srinivasan, A., Singh, T.P., 2001. Substrate-inhibitor interactions in the kinetics of alpha-amylase inhibition by ragi alpha-amylase/trypsin inhibitor (RATI) and its various N-terminal fragments. *Biochemistry (Mosc).* 40, 4229–4233.

Ali, A.T., Hochfeld, W.E., Myburgh, R., Pepper, M.S., 2013. Adipocyte and adipogenesis. *Eur. J. Cell Biol*. 92, 229–236.

Ali Bougatef, R.R., 2010. Evidence of in vivo satietogen effect and control of food intake of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysate in rats. *J. Funct. Foods* 2, 10–16.

Arakawa, K., Maruta, H., 1980. Ability of kallikrein to generate angiotensin II-like pressor substance and a proposed "kinin-tensin enzyme system." *Nature.* 288, 705–706.

Armirotti, A., Millo, E., Damonte, G., 2007. How to Discriminate Between Leucine and Isoleucine by Low Energy ESI-TRAP MSn. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 18, 57–63.

Arsenault, P., Cloutier, L., Longpré, S., 2012. Metabolic syndrome: precursor to diabetes and cardiovascular diseases. *Perspect. Infirm. Rev*. 9, 30–34.

Atkinson, A., Robertson, J.I., 1979. Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. *The Lancet.* 314, 836–839.

Autelitano, D.J., Rajic, A., Smith, A.I., Berndt, M.C., Ilag, L.L., Vadas, M., 2006. The cryptome: a subset of the proteome, comprising cryptic peptides with distinct bioactivities. *Drug Discov. Today.* 11, 306–314.

Azizi, M., Chatellier, G., Guyene, T.-T., Murieta-Geoffroy, D., Ménard, J., 1995. Additive Effects of Combined Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin II Antagonism on Blood Pressure and Renin Release in Sodium-Depleted Normotensives. *Circulation.* 92, 825–834.

B

Bakhit, R.M., Klein, B.P., Essex-Sorlie, D., Ham, J.O., Erdman, J.W., Potter, S.M., 1994. Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J. Nutr*. 124, 213–222.

Balcells, E., Meng, Q.C., Johnson, W.H., Oparil, S., Dell'Italia, L.J., 1997. Angiotensin II formation from ACE and chymase in human and animal hearts: methods and species considerations. *Am. J. Physiol.* 273, H1769–1774.

Balfour, J.A., McTavish, D., 1993**.** Acarbose. An update of its pharmacology and therapeutic use in diabetes mellitus. *Drugs*. 46, 1025–1054.

Barceló-Batllori, S., Gomis, R., 2009. Proteomics in obesity research. PROTEOMICS – *Clin. Appl*. 3, 263–278.

Barrett, M.L., Udani, J.K., 2011. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (Phaseolus vulgaris): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr. J.* 10, 24.

Battu, C., 2014. La prise en charge nutritionnelle d'un adulte présentant un syndrome métabolique. *Actual. Pharm*. 53, 57–60.

Bella Jr., A.M., Erickson, R.H., Kim, Y.S., 1982. Rat intestinal brush border membrane dipeptidyl-aminopeptidase IV: Kinetic properties and substrate specificities of the purified enzyme. *Arch. Biochem. Biophys*. 218, 156–162.

Beltrán-Sánchez, H., Harhay, M.O., Harhay, M.M., McElligott, S., 2013. Prevalence and Trends of Metabolic Syndrome in the Adult U.S. Population, 1999–2010. *J. Am. Coll. Cardiol*. 62, 697–703.

Ben Khaled, H., Ghlissi, Z., Chtourou, Y., Hakim, A., Ktari, N., Fatma, M.A., Barkia, A., Sahnoun, Z., Nasri, M., 2012. Effect of protein hydrolysates from sardinelle (Sardinella aurita) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. *Food Res. Int.* 45, 60–68.

Berhanu, P., Anderson, C., Paynter, D.R., Wood, W.M., 1995. The amino acid sequence GPLY is not necessary for normal endocytosis of the human insulin receptor B isoform. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 209, 730–738.

Bharatham, K., Bharatham, N., Park, K.H., Lee, K.W., 2008. Binding mode analyses and pharmacophore model development for sulfonamide chalcone derivatives, a new class of alpha-glucosidase inhibitors. *J. Mol. Graph. Model*. 26, 1202–1212.

Boots, J.-W.P., 2006. Protein Hydrolysate Enriched in Peptides Inhibiting Dpp-Iv and Their Use. WO/2006/068480.

Bordenave, S., Sannier, F., Ricart, G., Piot, J.M., 1999. Continuous hydrolysis of goat whey in an ultrafiltration reactor: generation of alpha-lactorphin. *Prep. Biochem. Biotechnol*. 29, 189–202.

Boucher, R., Demassieux, S., Garcia, R., Genest, J., 1977. Tonin, angiotensin II system. A review. *Circ. Res.* 41, 26–29.

Bouglé, D., 2007. Peptides fonctionnels marins. *Phytothérapie* 5, 22–26.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72, 248–254.

Byun, H.-G., Kim, S.-K., 2001. Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (Theragra chalcogramma) skin. *Process Biochem*. 36, 1155–1162.

C

Calle, M.C., Fernandez, M.L., 2012. Inflammation and type 2 diabetes. *Diabetes Metab*. 38, 183–191.

Carlyle, M., Jones, O.B., Kuo, J.J., Hall, J.E., 2002. Chronic cardiovascular and renal actions of leptin: role of adrenergic activity. *Hypertension.* 39, 496–501.

Carter, C.S., Cesari, M., Ambrosius, W.T., Hu, N., Diz, D., Oden, S., Sonntag, W.E., Pahor, M., 2004. Angiotensin-converting enzyme inhibition, body composition, and physical performance in aged rats. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci*. 59, 416–423.

Casteilla, L., Cousin, B., Viguerie-, N., Larrouy, D., Penicaud, L., 1994. Hétérogénéité et plasticité cellulaires des tissus adipeux. *m/s*. 10, 1099–1106.

Casteilla, L., Planat-Bénard, V., Silvestre, J.-S., Cousin, B., Charrière, G., Carrière, A., Levy, B., Tedgui, A., Pénicaud, L., 2005. Plasticité et potentiel angiogénique des cellules des tissus adipeux : perspectives physiologiques et thérapeutiques. *Sang Thromb. Vaiss.* 17, 101–108.

Charoenphun, N., Youravong, W., Cheirsilp, B., 2013. Determination of reaction kinetics of hydrolysis of tilapia (Oreochromis niloticus) protein for manipulating production of bioactive peptides with antioxidant activity, angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and Ca-binding properties. *Int. J. Food Sci. Technol*. 48, 419–428.

Chen, J., Wang, Y., Zhong, Q., Wu, Y., Xia, W., 2012. Purification and characterization of a novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysate of grass carp protein. *Peptides.* 33, 52–58.

Chen, T.-L., Lo, Y.-C., Hu, W.-T., Wu, M.-C., Chen, S.-T., Chang, H.-M., 2003. Microencapsulation and modification of synthetic peptides of food proteins reduces the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem*. 51, 1671–1675.

Chiasson, J.-L., Josse, R.G., Gomis, R., Hanefeld, M., Karasik, A., Laakso, M., STOP-NIDDM Trial Research Group, 2003. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance: the STOP-NIDDM trial. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 290, 486–494.

Choi, M., Moschetta, A., Bookout, A.L., Peng, L., Umetani, M., Holmstrom, S.R., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Richardson, J.A., Gerard, R.D., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2006. Identification of a hormonal basis for gallbladder filling. *Nat. Med*. 12, 1253–1255.

Cockcroft, J. R., Sciberras, D. G., Goldberg, M. R. and Ritter, J. M. 1993. Comparison of angiotensin-converting enzyme inhibition with angiotensin II receptor antagonism in the human forearm. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 22, 579-584.

Cooper, S.A., Whaley-Connell, A., Habibi, J., Wei, Y., Lastra, G., Manrique, C., Stas, S., Sowers, J.R., 2007. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 293, H2009–2023.

Crandall, D.L., Armellino, D.C., Busler, D.E., McHendry-Rinde, B., Kral, J.G., 1999. Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. *Endocrinology.* 140, 154–158.

Cristancho, A.G., Lazar, M.A., 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 12, 722–734.

Cristovam, P.C., Arnoni, C.P., de Andrade, M.C.C., Casarini, D.E., Pereira, L.G., Schor, N., Boim, M.A., 2008. ACE-dependent and chymase-dependent angiotensin II generation in normal and glucose-stimulated human mesangial cells. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ.* 233, 1035–1043.

Cudennec, B., Fouchereau-Peron, M., Ferry, F., Duclos, E., Ravallec, R., 2012. In vitro and in vivo evidence for a satiating effect of fish protein hydrolysate obtained from blue whiting (Micromesistius poutassou) muscle. *J. Funct. Foods.* 4, 271–277.

Cudennec, B., Ravallec-Plé, R., Courois, E., Fouchereau-Peron, M., 2008. Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chem*. 111, 970–975.

Cushman, D.W., Cheung, H.S., 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol*. 20, 1637–1648.

Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F., Ondetti, M.A., 1977. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. *Biochemistry (Mosc).* 16, 5484–5491.

D

Dallas, C., Gerbi, A., Tenca, G., Juchaux, F., Bernard, F.-X., 2008. Lipolytic effect of a polyphenolic citrus dry extract of red orange, grapefruit, orange (SINETROL) in human body fat adipocytes. Mechanism of action by inhibition of cAMP-phosphodiesterase (PDE). *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm*. 15, 783–792.

Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G.M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J., Lin, J.K., Farzadfar, F., Khang, Y.-H., Stevens, G.A., Rao, M., Ali, M.K., Riley, L.M., Robinson, C.A., Ezzati, M., Global Burden of Metabolic Risk Factors of Chronic Diseases Collaborating Group (Blood Glucose), 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *Lancet*. 378, 31–40.

Daniel, H., 2004. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol*. 66, 361–384.

Daniel, H., Kottra, G., 2004. The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in physiology and pharmacology. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol*. 447, 610–618.

Darlington, G.J., Ross, S.E., MacDougald, O.A., 1998. The Role of C/EBP Genes in Adipocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* 273, 30057–30060.

Davies, B.S.J., Beigneux, A.P., Barnes, R.H., Tu, Y., Gin, P., Weinstein, M.M., Nobumori, C., Nyrén, R., Goldberg, I., Olivecrona, G., Bensadoun, A., Young, S.G., Fong, L.G., 2010. GPIHBP1 is responsible for the entry of lipoprotein lipase into capillaries. *Cell Metab*. 12, 42–52.

Deacon, C.F., 2011. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes: a comparative review. *Diabetes Obes. Metab*. 13, 7–18.

De Barros, S., 2007. Les métalloprotéases matricielles 2 et 9 et la différenciation des cellules progénitrices du tissu adipeux huamin. (Thèse). Université de Toulouse III.

Delarue, J., Allain, G., Guillerm, S., 2006. Le syndrome métabolique. *Nutr. Clin. Métabolisme*. 20, 114–117.

Depoortere, I., 2009. Targeting the ghrelin receptor to regulate food intake. *Regul. Pept*. 156, 13–23.

Desruisseaux, M.S., Nagajyothi, Trujillo, M.E., Tanowitz, H.B., Scherer, P.E., 2007. Adipocyte, Adipose Tissue, and Infectious Disease. *Infect. Immun*. 75, 1066–1078.

Dicpinigaitis, P.V., 2006. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced cough: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*. 129, 169S–173S.

Diniz, F.M., Martin, A.M., 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (Squalus acanthias) muscle. *Int. J. Food Sci. Technol*. 31, 419–426.

D'Orazio, N., Gammone, M.A., Gemello, E., De Girolamo, M., Cusenza, S., Riccioni, G., 2012. Marine bioactives: pharmacological properties and potential applications against inflammatory diseases. *Mar. Drugs.* 10, 812–833.

E, F

Erdmann, K., Cheung, B.W.Y., Schröder, H., 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *J. Nutr. Biochem*. 19, 643–654.

Erdmann, K., Grosser, N., Schipporeit, K., Schröder, H., 2006. The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. *J. Nutr.* 136, 2148–2152.

Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H.C., Shigematsu, T., Kida, K., Uemura, Y., 2004. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochem*. 39, 1195–1200.

Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P., Bahouth, S.W., 2004. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 145, 2273–2282.

Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J.B., Najib, J., Martin, G., Fruchart, J.C., Briggs, M., Spiegelman, B.M., Auwerx, J., 1999. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell. Biol*. 19, 5495–5503.

Fan, J., He, J., Zhuang, Y., Sun, L., 2012. Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Frame Protein. *Molecules.* 17, 12836–12850.

Fayez, M.F.A., Abd El-Rahman, M.N., Abdin, A.A., Taha, A.-S., 2011. Role of renin angiotensin system and its inhibition by perindopril and irbesartan in non alcoholic steatohepatitis induced experimentally in rats. *Asian J. Med. Pharm. Res*. 1, 39–47.

Fève, B., 2005. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 19, 483–499.

FitzGerald, R.J., Meisel, H., 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br. J. Nutr*. 84 Suppl 1, S33–37.

Frayn, K.N., Karpe, F., Fielding, B.A., Macdonald, I.A., Coppack, S.W., 2003. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int. J. Obes*. 27, 875–888.

Friedman, J.M., 2000. Obesity in the new millennium. *Nature.* 404, 632–634.

Fujii, M., Matsumura, N., Mito, K., Shimizu, T., Kuwahara, M., Sugano, S., Karaki, H., 1993. Antihypertensive Effects of Peptides in Autolysate of Bonito Bowels on Spontaneously Hypertensive Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 57, 2186–2188.

Fujita, H., Yamagami, T., Ohshima, K., 2001. Effects of an ace-inhibitory agent, katsuobushi oligopeptide, in the spontaneously hypertensive rat and in borderline and mildly hypertensive subjects. *Nutr. Res.* 21, 1149–1158

Fujita, H., Yoshikawa, M., 1999. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology.* 44, 123–127.

Funke, I., Melzig, M.F., 2005. Effect of different phenolic compounds on alpha-amylase activity: screening by microplate-reader based kinetic assay. *Pharm*. 60, 796–797.

Furuyashiki, T., Nagayasu, H., Aoki, Y., Bessho, H., Hashimoto, T., Kanazawa, K., Ashida, H., 2004. Tea catechin suppresses adipocyte differentiation accompanied by down-regulation of PPARgamma2 and C/EBPalpha in 3T3-L1 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 68, 2353–2359.

G

Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M., Recio, I., 2007. Identification of novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis.* 28, 4202–4211.

Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.S., 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev*. 78, 783–809.

Grundy, S.M., Cleeman, J.I., Daniels, S.R., Donato, K.A., Eckel, R.H., Franklin, B.A., Gordon, D.J., Krauss, R.M., Savage, P.J., Smith, S.C., Spertus, J.A., Costa, F., American Heart Association, National Heart, Lung, and Blood Institute, 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.*112, 2735–2752.

Guang, C., Phillips, R.D., Jiang, B., Milani, F., 2012. Three key proteases – angiotensin-I-converting enzyme (ACE), ACE2 and renin – within and beyond the renin-angiotensin system. *Arch. Cardiovasc. Dis*. 105, 373–385.

Gu, R.-Z., Li, C.-Y., Liu, W.-Y., Yi, W.-X., Cai, M.-Y., 2011. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (Salmo salar L.) *skin. Food Res. Int*. 44, 1536–1540.

H

Hackenthal, E., Hackenthal, R., Hilgenfeldt, U., 1978. Isorenin, pseudorenin, cathepsin D and renin. A comparative enzymatic study of angiotensin-forming enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*. 522, 574–588.

Hai-Lun, H., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., Bai-Cheng, Z., 2006. Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from protease-hydrolyzed marine shrimp Acetes chinensis. *J. Pept. Sci. Off. Publ. Eur. Pept. Soc*. 12, 726–733.

Hammé, V., Sannier, F., Piot, J.-M., Bordenave-Juchereau, S., 2010. Effects of lactokinins from fermented acid goat whey on lipid content and adipogenesis of immortalised human adipocytes. *Int. Dairy J*. 20, 642–645.

Harnedy, P.A., FitzGerald, R.J., 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *J. Funct. Foods.* 4, 6–24.

Hatanaka, A., Miyahara, H., Suzuki, K.I., Sato, S., 2009. Isolation and Identification of Antihypertensive Peptides from Antarctic Krill Tail Meat Hydrolysate. *J. Food Sci*. 74, H116–H120.

Hatanaka, T., Inoue, Y., Arima, J., Kumagai, Y., Usuki, H., Kawakami, K., Kimura, M., Mukaihara, T., 2012. Production of dipeptidyl peptidase IV inhibitory peptides from defatted rice bran. *Food Chem.* 134, 797–802.

Heal, D.J., Gosden, J., Smith, S.L., 2012. What is the prognosis for new centrally-acting anti-obesity drugs? *Neuropharmacology*. 63, 132–146.

Heo, S.-J., Hwang, J.-Y., Choi, J.-I., Han, J.-S., Kim, H.-J., Jeon, Y.-J., 2009. Diphlorethohydroxycarmalol isolated from Ishige okamurae, a brown algae, a potent

alpha-glucosidase and alpha-amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol*. 615, 252–256.

Holman, R.R., Cull, C.A., Turner, R.C., 1999. A randomized double-blind trial of acarbose in type 2 diabetes shows improved glycemic control over 3 years (U.K. Prospective Diabetes Study 44). *Diabetes Care.* 22, 960–964.

Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest*. 109, 1125–1131.

Hosomi, R., Fukunaga, K., Arai, H., Kanda, S., Nishiyama, T., Yoshida, M., 2012. Fish Protein Hydrolysates Affect Cholesterol Metabolism in Rats Fed Non-Cholesterol and High-Cholesterol Diets. *J. Med. Food.* 15, 299–306.

Hsu, C.-L., Yen, G.-C., 2006. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol. Nutr. Food Res*. 50, 1072–1079.

Huang, F.-J., Wu, W.-T., 2010. Purification and Characterization of a New Peptide (s-8300) from Shark Liver. *J. Food Biochem*. 34, 962–970.

Huang, F., Wu, W., 2005. Antidiabetic effect of a new peptide from Squalus mitsukurii liver (S-8300) in streptozocin-induced diabetic mice. *J. Pharm. Pharmacol*. 57, 1575–1580.

Huang, F., Wu, W., 2009. Study on the antidiabetic mechanism of a shark liver peptide, S-8300, in alloxan-induced diabetes. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 789–794.

Huang, S.-L., Jao, C.-L., Ho, K.-P., Hsu, K.-C., 2012. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides* 35, 114–121.

Hu, G., Qiao, Q., Tuomilehto, J., Balkau, B., Borch-Johnsen, K., Pyorala, K., 2004. Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch. Intern. Med*. 164, 1066–1076.

Hutley, L., Prins, J.B., 2005. Fat as an endocrine organ : relationship to the metabolic syndrome. *Am. J. Med. Sci*. 330, 280–289.

Hu, Y., Davies, G.E., 2009. Berberine increases expression of GATA-2 and GATA-3 during inhibition of adipocyte differentiation. Phytomedicine Int. *J. Phytother. Phytopharm. 16, 864–873.*

Hu, Y., Fahmy, H., Zjawiony, J.K., Davies, G.E., 2010. Inhibitory effect and transcriptional impact of berberine and evodiamine on human white preadipocyte differentiation. *Fitoterapia.* 81, 259–268.

Hwang, J.-S., Tsai, Y.-L., Hsu, K.-C., 2010. The feasibility of antihypertensive oligopeptides encapsulated in liposomes prepared with phytosterols-β-sitosterol or stigmasterol. *Food Res. Int*. 43, 133–139.

I

Ibrahim, M.M., 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes. Rev*. 11, 11–18.

Ichimura, T., Hu, J., Aita, D.Q., Maruyama, S., 2003. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity and Insulin Secretion Stimulative Activity of Fermented Fish Sauce. *J. Biosci. Bioeng*. 96, 496–499.

IDF Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome [WWW Document], n.d. URL http://www.idf.org/metabolic-syndrome (accessed 7.6.14).

Inouye, K., Nakano, M., Nakano, K., Asaoka, K., Yasukawa, K., 2009. Effects of thermal treatment on the coagulation of soy proteins induced by subtilisin Carlsberg. *J. Agric. Food Chem.* 57, 717–723.

Issemann, I., Prince, R.A., Tugwood, J.D., Green, S., 1993. The peroxisome proliferator-activated receptor:retinoid X receptor heterodimer is activated by fatty acids and fibrate hypolipidaemic drugs. *J. Mol. Endocrinol*. 11, 37–47.

J

Jeon, Y.-J., Byun, H.-G., Kim, S.-K., 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochem.* 35, 471–478.

Jo, H.-Y., Jung, W.-K., Kim, S.-K., 2008. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, Urechis unicinctus. *Process Biochem*. 43, 179–184.

Jones, B.H., Standridge, M.K., Moustaid, N., 1997. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology.* 138, 1512–1519.

Jullien, D., 2008. Physiopathologie du syndrome métabolique. Ann. Dermatol. Vénéréologie, Co-morbidités du psoriasis 135. *Supplement.* 4, 243–248.

Jung, S.-R., Song, N.-J., Hwang, H.S., An, J.J., Cho, Y.-J., Kweon, H.Y., Kang, S.-W., Lee, K.G., Yoon, K., Kim, B.-J., Nho, C.W., Choi, S.Y., Park, K.W., 2011. Silk peptides inhibit adipocyte differentiation through modulation of the Notch pathway in C3H10T1/2 cells. *Nutr. Res. N. Y. N.* 31, 723–730.

Jung, W.-K., Je, J.-Y., Kim, H.-J., Kim, S.-K., 2002. A novel anticoagulant protein from Scapharca broughtonii. *J. Biochem. Mol. Biol*. 35, 199–205.

Jung, W.-K., Jo, H.-Y., Qian, Z.-J., Jeong, Y.-J., Park, S.-G., Choi, I.-W., Kim, S.-K., 2007. A novel anticoagulant protein with high affinity to blood coagulation factor Va from Tegillarca granosa. *J. Biochem. Mol. Biol*. 40, 832–838.

Jung, W.-K., Kim, S.-K., 2009. Isolation and characterisation of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel, Mytilus edulis. *Food Chem*. 117, 687–692.

Jung, W.-K., Mendis, E., Je, J.-Y., Park, P.-J., Son, B.W., Kim, H.C., Choi, Y.K., Kim, S.-K., 2006. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from yellowfin sole (Limanda aspera) frame protein and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem*. 94, 26–32.

Jung, W.-K., Park, P.-J., Byun, H.-G., Moon, S.-H., Kim, S.-K., 2005. Preparation of hoki (Johnius belengerii) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. *Food Chem*. 91, 333–340.

Junquero, D., Rival, Y., 2006. Syndrome métabolique : quelle définition pour quel(s) traitement(s) ? *MS Médecine Sci*. 21, 1045–1053.

K

Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., Tobe, K., 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest*. 116, 1784–1792.

Kainuma, A.O., Matsumoto, E., Iwashita, A., Yasuhara, T., Kawamura, Y., Koizumi, Y., Yanagida, F., 1995. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Action of Fish Sauce. *Food Sci. Technol. Int. Tokyo.* 1, 101–106.

Katano, S., Oki, T., Matsuo, Y., Yoshihira, K., Nara, Y., Miki, T., Matsui, T., Matsumoto, K., 2003. Antihypertensive effect of alkaline protease hydrolysate of the pearl oyster Pinctada fucata martencii & separation and identification of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 69, 975–980.

Kang, W, Song, Y., Gu, X., 2012. α-glucosidase inhibitory in vitro and antidiabetic activity in vivo of Osmanthus fragrans. *J. Med. Plants Res*. 6, 2850–2856.

Kaur, J., 2014. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* 2014.

Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., Hinuma, S., Fujisawa, Y., Fujino, M., 2003. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J. Biol. Chem*. 278, 9435–9440.

Kawasaki, T., Seki, E., Osajima, K., Yoshida, M., Asada, K., Matsui, T., Osajima, Y., 2000. Antihypertensive effect of valyl-tyrosine, a short chain peptide derived from sardine muscle hydrolyzate, on mild hypertensive subjects. *J. Hum. Hypertens*. 14, 519–523.

Kersten, S., 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2, 282–286.

Ketnawa, S., Rawdkuen, S., 2013. Purification And Characterization Of Ace Inhibitory Peptide From Aquatic Resources: A Review. *Int. J. Plant, Animal, Environ*. 3, 220–233.

Kim, H.J., Bae, I.Y., Ahn, C.-W., Lee, S., Lee, H.G., 2007. Purification and identification of adipogenesis inhibitory peptide from black soybean protein hydrolysate. *Peptides.* 28, 2098–2103.

Kim, H.-K., Della-Fera, M., Lin, J., Baile, C.A., 2006a. Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Nutr*. 136, 2965–2969.

Kim, H.-K., Nelson-Dooley, C., Della-Fera, M.A., Yang, J.-Y., Zhang, W., Duan, J., Hartzell, D.L., Hamrick, M.W., Baile, C.A., 2006b. Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *J. Nutr*. 136, 409–414.

Kim, K.-T., Rioux, L.-E., Turgeon, S.L., 2014. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from Fucus vesiculosus and Ascophyllum nodosum. *Phytochemistry*. 98, 27–33.

Kim, S.K., Byun, H.G., Park, P.J., Shahidi, F., 2001. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2992–2997.

Kim, S.-K., Wijesekara, I., 2010. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J. Funct. Foods.* 2, 1–9.

Kisselev, A.F., Garcia-Calvo, M., Overkleeft, H.S., Peterson, E., Pennington, M.W., Ploegh, H.L., Thornberry, N.A., Goldberg, A.L., 2003. The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J. Biol. Chem*. 278, 35869–35877.

Kletzien, R.F., Clarke, S.D., Ulrich, R.G., 1992. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. Mol. *Pharmacol*. 41, 393–398.

Klickstein, L.B., Kaempfer, C.E., Wintroub, B.U., 1982. The granulocyte-angiotensin system. Angiotensin I-converting activity of cathepsin G. *J. Biol. Chem.* 257, 15042–15046.

Korkmaz, B., Jégot, G., Lau, L.C., Thorpe, M., Pitois, E., Juliano, L., Walls, A.F., Hellman, L., Gauthier, F., 2011. Discriminating between the activities of human cathepsin G and chymase using fluorogenic substrates. *FEBS J.* 278, 2635–2646.

Kosikowska, P., Lesner, A., 2013. Inhibitors of cathepsin G: a patent review (2005 to present). *Expert Opin. Ther. Pat.* 23, 1611–1624.

Koyama, T., Noguchi, K., Aniya, Y., Sakanashi, M., 1998. Analysis for sites of anticoagulant action of plancinin, a new anticoagulant peptide isolated from the starfish Acanthaster planci, in the blood coagulation cascade. *Gen. Pharmacol*. 31, 277–282.

Krauss, R.M., 2004. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27, 1496–1504.

Kristinsson, H.G., Rasco, B.A., 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 40, 43–81.

Kumar, V., Prakash, O., Kumar, S., Narwal, S., 2011. α-glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacogn. Rev*. 5, 19.

L

Lacroix, I.M.E., Li-Chan, E.C.Y., 2012. Evaluation of the potential of dietary proteins as precursors of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV inhibitors by an in silico approach. *J. Funct. Food.* 4, 403–422.

Lafontan, M., 2005. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. Annu. *Rev. Pharmacol. Toxicol*. 45, 119–146.

Lafontan, M., 2012. Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 302, C327–359.

Lafontan, M., Berlan, M., 2003. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol. Sci*. 24, 276–283.

Lahogue, V., Réhel, K., Taupin, L., Haras, D., Allaume, P., 2010. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Food Chem.* 118, 870–875.

Lakka, H.-M., Laaksonen, D.E., Lakka, T.A., Niskanen, L.K., Kumpusalo, E., Tuomilehto, J., Salonen, J.T., 2002. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA J. Am. Med. Assoc*. 288, 2709–2716.

Lameira, D., Lejeune, S., Mourad, J.-J., 2008. Le syndrome métabolique : son épidémiologie et ses risques. Ann. Dermatol. Vénéréologie, Co-morbidités du psoriasis 135. *Supplement*. 4, 249–253.

Langin, D., Dicker, A., Tavernier, G., Hoffstedt, J., Mairal, A., Rydén, M., Arner, E., Sicard, A., Jenkins, C.M., Viguerie, N., van Harmelen, V., Gross, R.W., Holm, C., Arner, P., 2005. Adipocyte lipases and defect of lipolysis in human obesity. *Diabetes*. 54, 3190–3197.

Langin, D., Holm, C., Lafontan, M., 1996. Adipocyte hormone-sensitive lipase : a major regulator of lipid metabolism. *Proc. Nutr. Soc*. 55, 93–109.

Laracine, F., 2009. Rôle des Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) dans le métabolisme lipidique. (Thèse). Faculte De Pharmacie De Grenoble.

Laube, P.D.H., 2002. Acarbose. *Clin. Drug Investig*. 22, 141–156.

Lau, D.C.W., Dhillon, B., Yan, H., Szmitko, P.E., Verma, S., 2005. Adipokines: molecular links between obesity and atheroslcerosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 288, H2031–2041.

Lavigne, C., Tremblay, F., Asselin, G., Jacques, H., Marette, A., 2001. Prevention of skeletal muscle insulin resistance by dietary cod protein in high fat-fed rats. Am. J. Physiol. *Endocrinol. Metab*. 281, E62–71.

Lee, H.J., Lee, H.-S., Choi, J.W., Ra, K.S., Kim, J.-M., Suh, H.J., 2011. Novel tripeptides with α-glucosidase inhibitory activity isolated from silk cocoon hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11522–11525.

Lee, J.K., Jeon, J.-K., Byun, H.-G., 2014. Antihypertensive effect of novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from chum salmon (Oncorhynchus keta) skin in spontaneously hypertensive rats. *J. Funct. Foods.* 7, 381–389.

Lefebvre, A.-M., Laville, M., Vega, N., Riou, J.P., Gaal, L. v., Auwerx, J., Vidal, H., 1998. Depot-Specific Differences in Adipose Tissue Gene Expression in Lean and Obese Subjects. *Diabetes.* 47, 98–103.

Lefterova, M.I., Zhang, Y., Steger, D.J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C.J., Liu, X.S., Lazar, M.A., 2008. PPAR gamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev.* 22, 2941–2952.

Lehtinen, R., Jauhiainen, T., Kankuri, E., Lindstedt, K., Kovanen, P.T., Kerojoki, O., Korpela, R., Vapaatalo, H., 2010. Effects of milk casein-derived tripeptides Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro, and Leu-Pro-Pro on enzymes processing vasoactive precursors in vitro. *Arzneimittelforschung*. 60, 182–185.

Lejeune, H., Descazeaud, A., 2007. Le syndrome métabolique: épidémiologie et physiopathologie. Sexologies 16, *Supplement* 1, S1–S5.

Liaset, B., Espe, M., 2008. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. *Process Biochem*. 43, 42–48.

Li-Chan, E.C.Y., Hunag, S.-L., Jao, C.-L., Ho, K.-P., Hsu, K.-C., 2012. Peptides Derived from Atlantic Salmon Skin Gelatin as Dipeptidyl-peptidase IV Inhibitors. *J. Agric. Food Chem.* 60, 973–978.

Li, H., Aluko, R.E., 2010. Identification and Inhibitory Properties of Multifunctional Peptides from Pea Protein Hydrolysate. *J. Agric. Food Chem*. 58, 11471–11476.

Li, M., Liu, K., Michalicek, J., Angus, J.A., Hunt, J.E., Dell'Italia, L.J., Feneley, M.P., Graham, R.M., Husain, A., 2004. Involvement of chymase-mediated angiotensin II generation in blood pressure regulation. *J. Clin. Invest.* 114, 112–120.

Li, T., Holmstrom, S.R., Kir, S., Umetani, M., Schmidt, D.R., Kliewer, S.A., Mangelsdorf, D.J., 2011. The G protein-coupled bile acid receptor, TGR5, stimulates gallbladder filling. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 25, 1066–1071.

Liu, X., Zhang, M., Zhang, C., Liu, C., 2012. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory, antihypertensive and antihyperlipidaemic activities of protein hydrolysates from Rhopilema esculentum. *Food Chem*. 134, 2134–2140.

Lu, Y., Yang, J., Sega, E., 2006. Issues related to targeted delivery of proteins and peptides. *AAPS J*. 8, E466–E478.

M

Majumder, K., Wu, J., 2011. Purification and characterisation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysate of ovotransferrin. *Food Chem*. 126, 1614–1619.

Manninen, A.H., 2009. Protein hydrolysates in sports nutrition. *Nutr. Metab*. 6, 38.

Marczak, E.D., Usui, H., Fujita, H., Yang, Y., Yokoo, M., Lipkowski, A.W., Yoshikawa, M., 2003. New antihypertensive peptides isolated from rapeseed. *Peptides* 24, 791–798.

Mårin, P., Högh-Kristiansen, I., Jansson, S., Krotkiewski, M., Holm, G., Björntorp, P., 1992. Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides in vivo in humans. *Am. J. Physiol*. 263, E473–480.

Marshall, J.J., Lauda, C.M., 1975. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of alpha-amylase, from the kidney bean, Phaseolus vulgaris. *J. Biol. Chem*. 250, 8030–8037.

Maruyama, S., Mitachi, H., Tanaka, H., Tomizuka, N., Suzuki, H., 1987. Studies on the Active Site and Antihypertensive Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors Derived from Casein. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51, 1581–1986.

Maruyama, T., Tanaka, K., Suzuki, J., Miyoshi, H., Harada, N., Nakamura, T., Miyamoto, Y., Kanatani, A., Tamai, Y., 2006. Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice. *J. Endocrinol*. 191, 197–205.

Matsufuji, H., Matsui, T., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., Osajima, Y., 1994. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 2244–2245.

Matsui, T., Oki, T., Osajima, Y., 1999. Isolation and identification of peptidic alpha-glucosidase inhibitors derived from sardine muscle hydrolyzate. Z. *Für Naturforschung C J. Biosci.* 54, 259–263.

Matsui, T., Tamaya, K., Seki, E., Osajima, K., Matsumo, K., Kawasaki, T., 2002a. Absorption of Val-Tyr with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity into the circulating blood system of mild hypertensive subjects. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 1228–1230.

Matsui, T., Tamaya, K., Seki, E., Osajima, K., Matsumoto, K., Kawasaki, T., 2002b. Val-Tyr as a natural antihypertensive dipeptide can be absorbed into the human circulatory blood system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 29, 204–208.

Matsui, T., Yoshimoto, C., Osajima, K., Oki, T., Osajima, Y., 1996. In vitro survey of alpha-glucosidase inhibitory food components. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 60, 2019–2022.

McDonald, J.E., Padmanabhan, N., Petrie, M.C., Hillier, C., Connell, J.M., McMurray, J.J., 2001. Vasoconstrictor effect of the angiotensin-converting enzyme-resistant, chymase-specific substrate [Pro(11)(D)-Ala(12)] angiotensin I in human dorsal hand veins: in vivo demonstration of non-ace production of angiotensin II in humans. *Circulation.* 104, 1805–1808.

Michaud, A., Williams, T.A., Chauvet, M.T., Corvol, P., 1997. Substrate dependence of angiotensin I-converting enzyme inhibition: captopril displays a partial selectivity for inhibition of N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline hydrolysis compared with that of angiotensin I. *Mol. Pharmacol*. 51, 1070–1076.

Miyazaki, M., Takai, S., 2000. Role of chymase on vascular proliferation. J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. *JRAAS* 1, 23–26.

Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H., Maruyama, S., 1991. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agric. Biol. Chem*. 55, 1313–1318.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.

Murray, B.A., Walsh, D.J., FitzGerald, R.J., 2004. Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanylglycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 59, 127–137.

N

Nakano, D., Ogura, K., Miyakoshi, M., Ishii, F., Kawanishi, H., Kurumazuka, D., Kwak, C.-J., Ikemura, K., Takaoka, M., Moriguchi, S., Iino, T., Kusumoto, A., Asami, S., Shibata, H., Kiso, Y., Matsumura, Y., 2006. Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from a sesame protein hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70, 1118–1126.

Ngo, D.-H., Qian, Z.-J., Ryu, B., Park, J.W., Kim, S.-K., 2010. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (Oreochromis niloticus) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *J. Funct. Foods*. 2, 107–117.

Ng, W.-K., Romano, N., 2013. A review of the nutrition and feeding management of farmed tilapia throughout the culture cycle. *Rev. Aquac*. 5, 220–254.

NHANES - National Health and Nutrition Examination Survey Homepage [WWW Document], n.d. URL http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm (accessed 9.13.14).

Nii, Y., Fukuta, K., Yoshimoto, R., Sakai, K., Ogawa, T., 2008. Determination of antihypertensive peptides from an izumi shrimp hydrolysate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 861–864.

Nongonierma, A.B., Fitzgerald, R.J., 2013a. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by tryptophan containing dipeptides. *Food Funct*. 4, 1843–1849.

Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2013b. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) by proline containing casein-derived peptides. *J. Funct. Foods* 5, 1909–1917.

Nongonierma, A.B., FitzGerald, R.J., 2014. An in silico model to predict the potential of dietary proteins as sources of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides. *Food Chem*. 165, 489–498.

Nongonierma, A.B., Mooney, C., Shields, D.C., Fitzgerald, R.J., 2013. Inhibition of dipeptidyl peptidase IV and xanthine oxidase by amino acids and dipeptides. *Food Chem*. 141, 644–653.

Ntambi, J.M., Young-Cheul, K., 2000. Adipocyte Differentiation and Gene Expression. *J. Nutr*. 130, 3122S–3126S.

O

ObEpi-Roche, enquête épidémiologique de référence sur l'évolution de l'obésité et du surpoids en France [WWW Document], n.d. URL http://eipf.bas.roche.com/fmfiles/re7199006/obepi2012/index.html?module1&module2&module3&module4&module5&module6.

Ohara, H., Matsumoto, H., Ito, K., Iwai, K., Sato, K., 2007. Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J. Agric. Food Chem*. 55, 1532–1535.

Oki, T., Matsui, T., Osajima, Y., 1999. Inhibitory effect of alpha-glucosidase inhibitors varies according to its origin. *J. Agric. Food Chem*. 47, 550–553.

Ono, S., Hosokawa, M., Miyashita, K., Takahashi, K., 2003. Isolation of Peptides with Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Effect Derived from Hydrolysate of Upstream Chum Salmon Muscle. *J. Food Sci.* 68, 1611–1614.

Ono, S., Hosokawa, M., Miyashita, K., Takahashi, K., 2006. Inhibition properties of dipeptides from salmon muscle hydrolysate on angiotensin I-converting enzyme. *Int. J. Food Sci. Technol*. 41, 383–386.

Ono, S., Umezaki, M., Tojo, N., Hashimoto, S., Taniyama, H., Kaneko, T., Fujii, T., Morita, H., Shimasaki, C., Yamazaki, I., Yoshimura, T., Kato, T., 2001. Cyclic and linear peptides derived from alpha-amylase inhibitory protein tendamistat. *J. Biochem. (Tokyo)*. 129, 783–790.

Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F.B., Tsutsumi, O., Yamada, N., 2000. Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 787–792.

Otani, L., Ninomiya, T., Murakami, M., Osajima, K., Kato, H., Murakami, T., 2009. Sardine peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity improves glucose tolerance in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 73, 2203–2209.

Ouellet, V., Marois, J., Weisnagel, S.J., Jacques, H., 2007. Dietary cod protein improves insulin sensitivity in insulin-resistant men and women: a randomized controlled trial. *Diabetes Care* 30, 2816–2821.

Ouellet, V., Weisnagel, S.J., Marois, J., Bergeron, J., Julien, P., Gougeon, R., Tchernof, A., Holub, B.J., Jacques, H., 2008. Dietary cod protein reduces plasma C-reactive protein in insulin-resistant men and women. *J. Nutr.* 138, 2386–2391.

P

Pairault, J., Green, H., 1979. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5138–5142.

Pappenheimer, J.R., Dahl, C.E., Karnovsky, M.L., Maggio, J.E., 1994. Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1942–1945.

Park, M.H., Jeon, Y.-J., Kim, H.-J., Han, J.S., 2013. Effect of Diphlorethohydroxycarmalol Isolated From Ishige okamurae on Apoptosis in 3 t3-L1 Preadipocytes. *Phytother. Res.* 27, 931–936.

Park, Y.J., Volpe, S.L., Decker, E.A., 2005. Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. *J. Agric. Food Chem*. 53, 4736–4739.

Pihlanto-Leppälä, A., 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 11, 347–356.

Pihlanto-Leppälä, A., Koskinen, P., Piilola, K., Tupasela, T., Korhonen, H., 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *J. Dairy Res.* 67, 53–64.

Platerink, C.J. van, Janssen, H.-G.M., Haverkamp, J., 2008. Application of at-line two-dimensional liquid chromatography–mass spectrometry for identification of small hydrophilic angiotensin I-inhibiting peptides in milk hydrolysates. *Anal. Bioanal. Chem*. 391, 299–307.

Poissonnet, C.M., Burdi, A.R., Bookstein, F.L., 1983. Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum. Dev*. 8, 1–11.

Porter, M.H., Cutchins, A., Fine, J.B., Bai, Y., DiGirolamo, M., 2002. Effects of TNF-alpha on glucose metabolism and lipolysis in adipose tissue and isolated fat-cell preparations. *J. Lab. Clin. Med*. 139, 140–146.

Prockop, D.J., Keiser, H.R., Sjoerdsma, A., 1962. Gastrointestinal absorption and renal excretion of hydroxyproline peptides. *Lancet* 2, 527–528.

Q, R

Quirós, A., Chichón, R., Recio, I., López-Fandiño, R., 2007. The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. *Food Chem*. 104, 1734–1739.

Raghavan, S., Kristinsson, H.G., 2009. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chem*. 117, 582–588.

Rahman, A., Kumar, S.G., Kim, S.W., Hwang, H.J., Baek, Y.M., Lee, S.H., Hwang, H.S., Shon, Y.H., Nam, K.S., Yun, J.W., 2008. Proteomic analysis for inhibitory effect of chitosan oligosaccharides on 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Proteomics.* 8, 569–581.

Rajapakse, N., Jung, W.-K., Mendis, E., Moon, S.-H., Kim, S.-K., 2005. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sci*. 76, 2607–2619.

Rayalam, S., Della-Fera, M.A., Baile, C.A., 2008. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J. Nutr. Biochem.* 19, 717–726.

Reaven, G.M., 2005. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu. Rev. Nutr*. 25, 391–406.

Reilly, C.F., Schechter, N.B., Travis, J., 1985. Inactivation of bradykinin and kallidin by cathepsin G and mast cell chymase. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 127, 443–449.

Reilly, C.F., Tewksbury, D.A., Schechter, N.M., Travis, J., 1982. Rapid conversion of angiotensin I to angiotensin II by neutrophil and mast cell proteinases. *J. Biol. Chem*. 257, 8619–8622.

Rosen, E.D., Spiegelman, B.M., 2000. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 16, 145–171.

Ruiz-Giménez, P., Marcos, J.F., Torregrosa, G., Lahoz, A., Fernández-Musoles, R., Valles, S., Alborch, E., Manzanares, P., Salom, J.B., 2011. Novel antihypertensive hexa- and heptapeptides with ACE-inhibiting properties: from the in vitro ACE assay to the spontaneously hypertensive rat. *Peptides.* 32, 1431–1438.

S

Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., Imayasu, S., 1994. Antihypertensive effects of peptide in sake and its by-products on spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 812–816.

Samonina, G., Ashmarin, I., Lyapina, L., 2002. Glyproline peptide family: review on bioactivity and possible origins. *Pathophysiol. Off. J. Int. Soc. Pathophysiol*. 8, 229–234.

Sarmadi, B.H., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*. 31, 1949–1956.

Sarzani, R., Marcucci, P., Salvi, F., Bordicchia, M., Espinosa, E., Mucci, L., Lorenzetti, B., Minardi, D., Muzzonigro, G., Dessì-Fulgheri, P., Rappelli, A., 2008. Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth. *Int. J. Obes*. 32, 259–267.

Schrager, S., 2005. Dietary calcium intake and obesity. *J. Am. Board Fam. Pract*. 18, 205–210.

Seidowsky, A., Massy, Z.A., Metzger, M., Stengel, B., 2014. Hypertension résistante et maladie rénale chronique : épidémiologie et pronostic. *Néphrologie Thérapeutique.* 10, 137–144.

Sengenes, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M., Galitzky, J., 2003. Involvement of a cGMP-dependent pathway in the natriuretic peptide-mediated hormone-sensitive lipase phosphorylation in human adipocytes. *J. Biol. Chem*. 278, 48617–48626.

Sentandreu, M.A., Toldrá, F., 2007. Evaluation of ACE inhibitory activity of dipeptides generated by the action of porcine muscle dipeptidyl peptidases. *Food Chem*. 102, 511–515.

Shahidi, F., Zhong, Y., 2008. Bioactive peptides. *J. AOAC Int*. 91, 914–931.

Sharma, A.M., Pischon, T., Engeli, S., Scholze, J., 2001. Choice of drug treatment for obesity-related hypertension: where is the evidence? *J. Hypertens*. 19, 667–674.

Sheih, I.C., Fang, T.J., Wu TungKung, 2009. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from the algae protein waste. *Food Chem.* 115, 279–284.

Shimatani, T., Hosotani, N., Ohnishi, M., Kumagai, K., Saji, I., 2006. SPF-32629 A and B, novel human chymase inhibitors produced by Penicillium sp. *J. Antibiot. (Tokyo).* 59, 29–34.

Shimomura, I., Funahasm, T., Takahashi, M., Maeda, K., Kotani, K., Nakamura, T., Yamashita, S., Miura, M., Fukuda, Y., Takemura, K., Tokunaga, K., Matsuzawa, Y., 1996. Enhanced expression of PAI–1 in visceral fat: Possible contributor to vascular disease in obeisty. *Nat. Med*. 2, 800–803.

Shoelson, S.E., Lee, J., Goldfine, A.B., 2006. Inflammation and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 116, 1793–1801.

Sottile, V., Seuwen, K., 2001. A high-capacity screen for adipogenic differentiation. *Anal. Biochem*. 293, 124–128.

Strader, A.D., Woods, S.C., 2005. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology.* 128, 175–191.

Suetsuna, K., Maekawa, K., Chen, J.-R., 2004. Antihypertensive effects of Undaria pinnatifida (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr. Biochem.* 15, 267–272.

Sun, L., Zhang, Y., Zhuang, Y., 2013. Antiphotoaging effect and purification of an antioxidant peptide from tilapia (Oreochromis niloticus) gelatin peptides. *J. Funct. Foods*. 5, 154–162.

Su, S.-H., Shyu, H.-W., Yeh, Y.-T., Chen, K.-M., Yeh, H., Su, S.-J., 2013. Caffeine inhibits adipogenic differentiation of primary adipose-derived stem cells and bone marrow stromal cells. Toxicol. Vitro Int. *J. Publ. Assoc. BIBRA*. 27, 1830–1837.

Suzuki, Y., Aoki, R., Hayashi, H., 1982. Assignment of a p-nitrophenyl-α-d-glucopyranoside-hydrolyzing α-glucosidase of Bacillus cereus ATCC 7064 to an exo-oligo-1,6-glucosidase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol*. 704, 476–483.

Swynghedauw, B., 1999. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol. Rev*. 79, 215–262.

$\mathcal{T}$

Tahrani, A.A., Bailey, C.J., Del Prato, S., Barnett, A.H., 2011. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment. *The Lancet.* 378, 182–197.

Takai, S., Jin, D., Nishimoto, M., Yuda, A., Sakaguchi, M., Kamoshita, K., Ishida, K., Sukenaga, Y., Sasaki, S., Miyazaki, M., 2001a. Oral administration of a specific

chymase inhibitor, NK3201, inhibits vascular proliferation in grafted vein. *Life Sci*. 69, 1725–1732.

Takai, S., Jin, D., Sakaguchi, M., Kirimura, K., Miyazaki, M., 2001b. An orally active chymase inhibitor, BCEAB, suppresses heart chymase activity in the hamster. *Jpn. J. Pharmacol*. 86, 124–126.

Takai, S., Jin, D., Sakaguchi, M., Miyazaki, M., 2004. A single treatment with a specific chymase inhibitor, TY-51184, prevents vascular proliferation in canine grafted veins. *J. Pharmacol. Sci*. 94, 443–448.

Takai, S., Shiota, N., Yamamoto, D., Okunishi, H., Miyazaki, M., 1996. Purification and characterization of angiotensin II-generating chymase from hamster cheek pouch. *Life Sci*. 58, 591–597.

Takai, S., Yuda, A., Jin, D., Nishimoto, M., Sakagichi, M., Sasaki, S., Miyazaki, M., 2000. Inhibition of chymase reduces vascular proliferation in dog grafted veins. *FEBS Lett*. 467, 141–144.

Tang, Q.Q., Lane, M.D., 1999. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev*. 13, 2231–2241.

Tang, Q.-Q., Otto, T.C., Lane, M.D., 2003. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 44–49.

Terashima, M., Oe, M., Ogura, K., Matsumura, S., 2011. Inhibition strength of short peptides derived from an ACE inhibitory peptide. *J. Agric. Food Chem*. 59, 11234–11237.

Thoma, R., Löffler, B., Stihle, M., Huber, W., Ruf, A., Hennig, M., 2003. Structural basis of proline-specific exopeptidase activity as observed in human dipeptidyl peptidase-IV. *Struct. Lond. Engl*. 1993. 11, 947–959.

Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., **Macchiarulo, A., Yamamoto, H., Mataki, C., Pruzanski, M., Pellicciari, R., Auwerx, J., Schoonjans, K.,** 2009. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab*. 10, 167–177.

Tontonoz, P., Kim, J.B., Graves, R.A., Spiegelman, B.M., 1993. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol. Cell. Biol*. 13, 4753–4759.

Townsend, R.R., 2001. The effects of angiotensin-II on lipolysis in humans. *Metabolism.* 50, 468–472.

Tremblay, F., Lavigne, C., Jacques, H., Marette, A., 2003. Dietary cod protein restores insulin-induced activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and GLUT4 translocation to the T-tubules in skeletal muscle of high-fat-fed obese rats. *Diabetes* 52, 29–37.

Tsai, J.-S., Chen, J.-L., Pan, B.S., 2008. ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (Meretrix lusoria). *Process Biochem*. 43, 743–747.

U

Uehara, Y., Urata, H., Ideishi, M., Arakawa, K., Saku, K., 2002. Chymase inhibition suppresses high-cholesterol diet-induced lipid accumulation in the hamster aorta. *Cardiovasc. Res*. 55, 870–876.

Uhe, A.M., Collier, G.R., O'Dea, K., 1992. A comparison of the effects of beef, chicken and fish protein on satiety and amino acid profiles in lean male subjects. *J. Nutr*. 122, 467–472.

Umezawa, H., Aoyagi, T., Ogawa, K., Naganawa, H., Hamada, M., Takeuchi, T., 1984. Diprotins A and B, inhibitors of dipeptidyl aminopeptidase IV, produced by bacteria. *J. Antibiot. (Tokyo).* 37, 422–425.

Urata, H., Boehm, K.D., Philip, A., Kinoshita, A., Gabrovsek, J., Bumpus, F.M., Husain, A., 1993. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J. Clin. Invest*. 91, 1269–1281.

V

Van Amerongen, A., Beelen - Thomissen, M.J.C., Van Zeeland-Wolbers, L.A.M., Van Gilst, W.H., Buikema, J.H., Nelissen, J.W.P.M., 2009. Egg Protein Hydrolysates. WO/2009/128713.

Velarde-Salcedo, A.J., Barrera-Pacheco, A., Lara-González, S., Montero-Morán, G.M., Díaz-Gois, A., González de Mejia, E., Barba de la Rosa, A.P., 2013. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of amaranth (Amaranthus hypochondriacus L.) proteins. *Food Chem*. 136, 758–764.

Velkoska, E., Warner, F.J., Cole, T.J., Smith, I., Morris, M.J., 2010. Metabolic effects of low dose angiotensin converting enzyme inhibitor in dietary obesity in the rat. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD*. 20, 49–55.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W., 2002. Optimisation and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 51, 75–87.

Vermeirssen, V., Van Camp, J., Verstraete, W., 2004. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br. J. Nutr*. 92, 357–366.

Vohl, M.-C., Sladek, R., Robitaille, J., Gurd, S., Marceau, P., Richard, D., Hudson, T.J., Tchernof, A., 2004. A Survey of Genes Differentially Expressed in Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue in Men. *Obes. Res.* 12, 1217–1222.

W

Wahli, W., Braissant, O., Desvergne, B., 1995. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more... *Chem. Biol*. 2, 261–266.

Wajchenberg, B.L., 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev*. 21, 697–738.

Wang, Y.-K., He, H.-L., Chen, X.-L., Sun, C.-Y., Zhang, Y.-Z., Zhou, B.-C., 2008. Production of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides by fermentation of marine shrimp Acetes chinensis with Lactobacillus fermentum SM 605. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79, 785–791.

Wang, Z., Zhang, S., Wang, W., Feng, F., Shan, W., 2011. A Novel Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from the Milk Casein: Virtual Screening and Docking Studies. *Agric. Sci. China.* 10, 463–467.

Watanabe, M., Houten, S.M., Mataki, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., Schoonjans, K., Bianco, A.C., Auwerx, J., 2006. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature.* 439, 484–489.

Wergedahl, H., Gudbrandsen, O.A., Røst, T.H., Berge, R.K., 2009. Combination of fish oil and fish protein hydrolysate reduces the plasma cholesterol level with a concurrent increase in hepatic cholesterol level in high-fat-fed Wistar rats. *Nutr*. 25, 98–104.

Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, O.A., Lied, E., Espe, M., Muna, Z., Mørk, S., Berge, R.K., 2004. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol, and lowers acyl-CoA:cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. *J. Nutr*. 134, 1320–1327.

WHO | Global status report on noncommunicable diseases 2010 [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/ (accessed 6.19.14).

Wilcox, E.R., Whitaker, J.R., 1984. Some aspects of the mechanism of complexation of red kidney bean alpha-amylase inhibitor and alpha-amylase. *Biochemistry (Mosc)*. 23, 1783–1791.

Wintroub, B.U., Klickstein, L.B., Dzau, V.J., Watt, K.W., 1984. Granulocyte-angiotensin system. Identification of angiotensinogen as the plasma protein substrate of leukocyte cathepsin G. *Biochemistry (Mosc).* 23, 227–232.

Witt, K.A., Davis, T.P., 2006. CNS drug delivery: Opioid peptides and the blood-brain barrier. *AAPS J*. 8, E76–E88.

Wolf-Maier, K., Cooper, R.S., Banegas, J.R., Giampaoli, S., Hense, H.-W., Joffres, M., Kastarinen, M., Poulter, N., Primatesta, P., Rodríguez-Artalejo, F., Stegmayr, B., Thamm, M., Tuomilehto, J., Vanuzzo, D., Vescio, F., 2003. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 289, 2363–2369.

Wu, H., He, H.-L., Chen, X.-L., Sun, C.-Y., Zhang, Y.-Z., Zhou, B.-C., 2008. Purification and identification of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from shark meat hydrolysate. *Process Biochem*. 43, 457–461.

Wu, J., Aluko, R.E., Muir, A.D., 2002. Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *J. Chromatogr. A* 950, 125–130.

$\mathcal{Y}$

Yang, Q., Graham, T.E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, J.M., Kotani, K., Quadro, L., Kahn, B.B., 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 436, 356–362.

Yano, S., Suzuki, K., Funatsu, G., 1996. Isolation from alpha-zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 60, 661–663.

Yan, T.R., Ho, S.C., Hou, C.L., 1992. Catalytic properties of X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase from Lactococcus lactis subsp. cremoris nTR. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 56, 704–707.

Yavin, E.J., Yan, L., Desiderio, D.M., Pontet, M., Fridkin, M., 1997. Inhibition of human leukocyte elastase and cathepsin G by extended peptides and subunits derived from human C-reactive protein. *Lett. Pept. Sci*. 4, 157–166.

Yokoyama, K., Chiba, H., Yoshikawa, M., 1992. Peptide inhibitors for angiotensin I-converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1541–1545.

Yoon, S.-H., Robyt, J.F., 2003. Study of the inhibition of four alpha amylases by acarbose and its 4IV-alpha-maltohexaosyl and 4IV-alpha-maltododecaosyl analogues. *Carbohydr. Res.* 338, 1969–1980.

Young, D., Mine, Y., 2009. Functional Bioactive Proteins and Peptides in Nutrigenomics, in: Mine, Y., Miyashita, K., Shahidi, F. (Eds.), Nutrigenomics and Proteomics in Health and Disease. Wiley-Blackwell, pp. 129–144.

Young, S.G., Davies, B.S.J., Fong, L.G., Gin, P., Weinstein, M.M., Bensadoun, A., Beigneux, A.P., 2007. GPIHBP1: an endothelial cell molecule important for the lipolytic processing of chylomicrons. *Curr. Opin. Lipidol.* 18, 389–396.

Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J., Chen, F., 2012. Anti-diabetic activity peptides from albumin against α-glucosidase and α-amylase. *Food Chem*. 135, 2078–2085.

Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Yu, Y., Liu, B., Liu, J., Chen, F., 2011. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chem*. 129, 1376–1382.

Z

Zemel, M.B., 2005. The role of dairy foods in weight management. *J. Am. Coll. Nutr.* 24, 537S–46S.

Zhu, C.-F., Li, G.-Z., Peng, H.-B., Zhang, F., Chen, Y., Li, Y., 2010a. Therapeutic effects of marine collagen peptides on Chinese patients with type 2 diabetes mellitus and primary hypertension. *Am. J. Med. Sci*. 340, 360–366.

Zhu, C.-F., Li, G.-Z., Peng, H.-B., Zhang, F., Chen, Y., Li, Y., 2010b. Effect of marine collagen peptides on markers of metabolic nuclear receptors in type 2 diabetic patients with/without hypertension. *Biomed. Environ. Sci. BES.* 23, 113–120.

Zhu, C.-F., Peng, H.-B., Liu, G.-Q., Zhang, F., Li, Y., 2010c. Beneficial effects of oligopeptides from marine salmon skin in a rat model of type 2 diabetes. *Nutr.* 26, 1014–1020.