



HAL
open science

Etude comparative de l'implication des protéines alimentaires dans l'homéostasie énergétique

Léa Fleury

► **To cite this version:**

Léa Fleury. Etude comparative de l'implication des protéines alimentaires dans l'homéostasie énergétique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILR028 . tel-04550693

HAL Id: tel-04550693

<https://hal.science/tel-04550693v1>

Submitted on 2 Jan 2025

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.

Etude comparative de l'implication des protéines alimentaires dans l'homéostasie énergétique

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies agroalimentaires, sciences de l'aliment, physiologie

Préparée et soutenue publiquement par

Léa Fleury

Pour obtenir le grade de Docteur

Le 19 juillet 2022

Soutenance présidée par la professeure Claire Gaudichon

Composition du jury :

Didier Remond	Directeur de Recherche INRAE, UMR1019 (Clermont-Ferrand)	Rapporteur
Claude Knauf	Professeur, Université de Toulouse	Rapporteur
Claire Gaudichon	Professeure, AgroParisTech	Examineur
Michelle Bastide	Maitre de conférences (HDR), Université de Lille	Examineur
Rozenn Ravallec	Professeure, Université de Lille	Directrice de thèse
Benoît Cudennec	Maitre de conférences (HDR), Université de Lille	Directeur de thèse
Camille Dugardin	Docteur, Ingénieure de recherche, UMRT 1158	Invitée

Remerciements

Avant tout, je souhaite remercier sincèrement tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner mon travail en cette période estivale. Je tiens à remercier particulièrement Messieurs Claude Knauf et Didier Remond d'avoir accepté d'être rapporteurs au sein de ce jury et Mesdames Claire Gaudichon et Michelle Bastide, ainsi que Monsieur Pascal Dhulster pour leur investissement, leurs conseils, leur soutien et leur bienveillance tout au long de ma thèse au travers de mes CST.

J'aimerais également porter une attention plus particulière à Madame Claire Gaudichon qui m'a motivée à poursuivre mes études par un doctorat lors de mon stage de fin d'étude, réalisé au sein de son laboratoire, et qui m'en a offert l'opportunité. Je vous remercie sincèrement pour votre confiance et votre soutien lors de ma candidature pour cette thèse. Vous m'avez donné l'occasion de vivre une très belle aventure au sein de l'équipe 7 du laboratoire BioEcoAgro.

Je souhaite également remercier mes deux directeurs de thèse, Rozenn Ravallec et Benoit Cudennec, sans qui rien n'aurait été possible. Je me considère chanceuse de vous avoir eu tous les deux comme encadrants. Vous m'avez permis d'évoluer en confiance, sereinement, dans la joie et la bonne humeur. Merci de votre confiance, de m'avoir offert une grande autonomie, de votre soutien sans faille dans les moments heureux comme difficiles (et dieu seul sait combien il y en a eu), et de votre investissement total dans ma réussite. Votre duo complémentaire et vos nombreuses qualités m'auront permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possible.

Je dois également la réussite de ce projet à Camille Dugardin et à Mathie Tenenbaum qui m'ont soutenue infailliblement, qui ont participé à mon épanouissement au travail et qui sont devenues de réelles amies en plus d'être des collègues formidables. Merci à vous pour tous ces fous rires, cette complicité, et tous les bons moments partagés ensemble au laboratoire comme à l'extérieur.

Je remercie également les membres de mon équipe qui m'ont apporté beaucoup d'aide, de temps et de gentillesse : Hairati, Barbara, Sandy, Elodie, Pauline ainsi que tous les membres de l'équipe déinobioics avec qui nous avons partagés les locaux. Merci à Yannick, Paul, Louis, Vanessa et Marjo pour avoir participé à créer une ambiance des plus agréable au SN2 et pour votre amitié qui j'espère durera le plus longtemps possible.

Enfin je tiens à remercier ma famille et plus particulièrement ma mère, qui même en étant loin, a été présente au quotidien. Merci pour ton indéfectible soutien, ta patience, ton écoute, tes conseils, tes remobilisations et ton investissement. Sans toute ton aide, tes heures passées à retrouver mes fichiers disparus de façon incompréhensible, tes corrections, tes relectures à n'importe quelle heure du jour ou de la nuit, je n'en serais pas aussi loin. Tu m'as transmis de la force, tu m'as permis de rester positive malgré les aléas de la thèse et c'est entièrement grâce à toi que je suis là où j'en suis.

Avant-Propos

J'ai réalisé ce travail au sein de l'équipe 7 de l'UMRT INRAe 1158 BioEcoAgro à l'université de Lille, sous la co-direction de Rozenn Ravallec, Professeure des Universités et de Benoit Cudennec, Maître de conférences, HDR ainsi que sous la supervision de Camille Dugardin, Docteur et Ingénieure de recherche à l'Université de Lille.

Une partie des travaux de cette thèse a été réalisée en collaboration avec Jean Lesage, Professeur des Universités à Lille au sein de l'U1286 - INFINITE, avec l'équipe de Véronique Touche, Olivier Briand et Sophie Lestavel de l'UMR 1011 EGID à l'Université de Lille et de Nadia Everaert, Professeure à l'Université Catholique de Louvain (KU Leuven) en Belgique, au département des biosystèmes en ingénierie de la santé humaine et animale. L'ensemble de ces collaborations a abouti à la rédaction d'un article.



Note sur la rédaction

Ce manuscrit de thèse a été rédigé en français excepté la partie résultats qui a été rédigée sous forme d'articles scientifiques écrits en anglais, en vue d'être publiés.

Valorisations scientifiques

- **Article en préparation**

Fleury L, Dugardin C, Cudennec B, Ravallec R (2022). Study of the effect of dietary proteins of different origins on the regulation of short-term food intake in rats and intestinal hormone regulation in STC-1 cells. *En preparation*.

- **Articles publiés**

Dugardin C*, **Fleury L***, Touche V, Ahdach F, Lesage J, Tenenbaum M, Everaert N, Briand O, Lestavel S, Ravallec R and Cudennec B (2022) An Exploratory Study of the Role of Dietary Proteins in the Regulation of Intestinal Glucose Absorption. *Front. Nutr*, 8:769773. doi: 10.3389/fnut.2021.769773

Fleury L, Deracinois B, Dugardin C, Alice B. Nongonierma², Richard J. FitzGerald² Flahaut C, Cudennec B, Ravallec R (2022). *In vivo* and *in vitro* comparison on the DPP-IV inhibitory potential of food-proteins from different origins after gastro-intestinal digestion. *International Journal of Molecular Sciences Section Bioactive and Nutraceuticals Special Issue - Accepted*

- **Communications orales**

Fleury L, Dugardin C, Touche V, Ahdach F, Lesage J, Tenenbaum M, Everaert N, Briand O, Lestavel S, Ravallec R and Cudennec B. *Role of dietary proteins in the regulation of intestinal glucose absorption*. 3^e International Conference on Food Bioactives & Health. 21 – 24 juin 2022. Parme, Italie

Dugardin C, **Fleury L**, Touche V, Ahdach F, Lesage J, Tenenbaum M, Everaert N, Briand O, Lestavel S, Ravallec R and Cudennec B. *Role of dietary proteins in the regulation of intestinal glucose absorption*. International Conference on Food Digestion. 3-5 mai 2022, Cork, Irlande.

Fleury L, Deracinois B, Dugardin C, Flahaut C, Cudennec B, Ravallec R. *In vivo and in vitro comparison on the DPP-IV inhibitory potential of food-proteins from different origins after gastro-intestinal digestion*. Virtual International Conference on Food Digestion (#VICFD2021). 7 mai 2021.

Sommaire

Remerciements	2
Avant-Propos.....	4
Note sur la rédaction	4
Valorisations scientifiques	5
Sommaire	6
Liste des Figures.....	9
Liste des tableaux	11
Abréviations	12
Introduction générale.....	16
Synthèse Bibliographique	19
1 Enjeux autour de la valorisation des protéines.....	20
1.1 Augmentation rapide de la demande en protéines	20
1.2 Importance de la consommation de protéines et problèmes d’insécurité alimentaire dans le monde.....	25
1.3 Impact écologique de la production de protéines.....	27
1.4 Les protéines, une solution contre les maladies métaboliques ?.....	28
2. Les protéines : Composition, nature, variétés et intérêt nutritionnel	32
2.1. Les protéines alimentaires.....	32
2.2 Recommandations et habitudes de consommation	33
2.3 Classification : sources des protéines	33
2.4 Propriétés physico-chimiques des protéines alimentaires.....	35
3. La digestion et l’absorption des protéines par le tractus gastro-intestinal	37
3.1 Mécanisme de la digestion des protéines	38
3.2 Digestibilité et biodisponibilité des protéines	45
3.3 L’absorption des nutriment issus de la digestion des protéines	47

4. Implication des protéines dans la régulation de l'homéostasie énergétique	54
4.1 L'homéostasie énergétique	54
4.2 Régulation de la prise alimentaire.....	55
4.3 Impact de l'ingestion des protéines dans la régulation de la prise alimentaire.....	59
4.4 Impact de l'origine des protéines sur la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique	98
Les protéines sélectionnées et leurs caractéristiques.....	100
L'hémoglobine bovine	101
Les protéines du lait (Bovine)	102
Les caséines.....	102
Les protéines du lactosérum.....	104
L'ovalbumine	105
Les protéines de pois	106
Le gluten.....	108
La gélatine de poisson	110
Objectifs des travaux de thèse	112
Résultats	115
Chapitre 1 : Etude de l'effet des protéines alimentaires de différentes origines sur la régulation de la prise alimentaire à court terme	116
Contexte de l'article	116
Résumé.....	116
Chapitre 2 : Comparaison in vivo et in vitro du potentiel à inhiber la DPP-IV de protéines alimentaires de différentes origines après digestion gastro-intestinale.....	147
Contexte de l'article :	147
Résumé.....	147
Chapitre 3 : Etude exploratoire du rôle des protéines dans la régulation de l'absorption intestinale du glucose	181

Contexte de l'article	181
Résumé	181
Discussion générale & Perspectives	196
Références	207

Liste des figures

Figure 1: Transition nutritionnelle dans le monde	21
Figure 2: Approvisionnement en protéines par région de 1990 à 2013.	23
Figure 3: Evolution de la consommation en protéines animales et végétales dans le monde depuis 1961 et projection jusqu'à 2030	24
Figure 4: Causes de la malnutrition dans les pays en voie de développement.....	26
Figure 5: Causes et conséquences de l'obésité dans le développement du diabète de type 2..	30
Figure 6: Digestion de protéines alimentaires dans le tractus gastro-intestinal des hommes et des animaux.....	37
Figure 7: Schéma des principaux organes du tube digestif.....	38
Figure 8: Représentation schématique d'une coupe histologique du tube digestif.....	40
Figure 9: Schéma d'une villosité de la barrière intestinale avec les différentes cellules épithéliales.....	48
Figure 10: Absorption des acides aminés par transport spécifique.....	50
Figure 11: Les différentes voies de passage des peptides à travers l'épithélium gastro-intestinal	51
Figure 12: Schéma anatomique du système nerveux central	56
Figure 13: Schéma de la régulation périphérique de la prise alimentaire comprenant les signaux de la régulation à court et long terme	57
Figure 14: Interactions entre les hormones de la régulation périphérique de la prise alimentaire à court et long terme.....	58
Figure 15: Schéma anatomique des noyaux hypothalamiques	61
Figure 16: Interconnexion entre les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire	62
Figure 17: Mécanismes intracellulaires activés par la leucine	64
Figure 18: Principales hormones gastro-intestinales impliquées dans la régulation à court terme de la prise alimentaire et leur rôle sur le transit et la satiété	70

Figure 19: Structure primaire de la séquence d'acides aminés de l'heptapeptide O-sulfaté qui constitue la séquence active spécifique des CCK	74
Figure 20: Activation par les peptides bioactifs et les acides aminés des voies de signalisation à l'origine de la synthèse et de la sécrétion de CCK dans les cellules entéroendocrines.....	76
Figure 21: Conversion du proglucagon par les prohormones convertases dans le pancréas et l'intestin.....	77
Figure 22: Voies de signalisation à l'origine de la sécrétion de GLP-1 par les peptides bioactifs	80
Figure 23: Séquence en acides aminés des peptides de la famille NPY (PYY, NPY et PP) ..	81
Figure 24: Diagramme en ruban montrant la structure globale de l'homodimère DPP-IV, vu perpendiculairement entre les deux homodimères	84
Figure 25: Effets physiologiques de la ghréline sur les différents tissus	88
Figure 26: Rôle de l'insuline et du glucagon.	92
Figure 27: Absorption intestinale des monosaccharides	93
Figure 28: Impact du glucose sur les organes périphériques et la prise alimentaire.....	94
Figure 29: Molécule d'hémoglobine	102
Figure 30: Structure du réseau de gluten.....	108
Figure 31: Récapitulatif des objectifs de la thèse.....	114
Figure 32: Démarche expérimentale adoptée au cours de l'étude 1	117
Figure 33: Démarche expérimentale adoptée au cours de l'étude 2	148
Figure 34: Démarche expérimentale adoptée au cours de l'étude 3	182

Liste des tableaux

Tableau 1: Estimation de la population mondiale et régionale en 2030, 2050 et 2100 en fonction des projections de la variante moyenne.....	20
Tableau 2: Principales complications de l'obésité et maladies associées (Basdevant, 2006)	29
Tableau 3: Classement des différents acides aminés.....	32
Tableau 4: Digestibilité iléale réelle de différentes protéines chez l'Homme.	46
Tableau 5: Effet des acides aminés sur les récepteurs couplés aux protéines G (inspiré de Pizarroso et al. 2021).....	71
Tableau 6: Caractéristiques comparatives des différentes formes de caséines du lait de vache.	103
Tableau 7: Caractéristiques comparatives des protéines de lactosérum du lait de vache.	104
Tableau 8: Caractéristiques des principales protéines du pois jaune (d'après Lefranc-Millot et al, 2018).....	107
Tableau 9 : Tableau récapitulatif de l'impact des différentes protéines sur les mécanismes étudiés.....	206

Abréviations

AA Acide aminé
AAI Acide aminé indispensable

Acide glutamique	Glu	E	Leucine	Leu	L
Acide aspartique	Asp	D	Lysine	Lys	K
Alanine	Ala	A	Méthionine	Met	M
Arginine	Arg	R	Phénylalanine	Phe	F
Asparagine	Asn	N	Proline	Pro	P
Cystéine	Cys	C	Sérine	Ser	S
Glutamine	Gln	Q	Thréonine	Thr	T
Glycine	Gly	G	Tryptophane	Trp	W
Histidine	His	H	Tyrosine	Tyr	Y
Isoleucine	Ile	I	Valine	Val	V

AGCC Acides gras à chaîne courte
AgRP *Agouti Related Peptide* - Protéine apparentée à l'agouti
AMP_c Adénosine Monophosphate cyclique
APO-IV Apolipoprotéine IV
ARC Noyau arqué
ARNm Acide ribonucléique messager
ATP Adénosine triphosphate
 α -MSH Hormone stimulante de l'alpha-mélanocyte
BHE Barrière hémato-encéphalique
CART *Cocaine- and amphetamine- regulated transcript*
CaSR Récepteur sensible au calcium
CB1R Récepteur cannabinoïde de type 1
CCK Cholécystokinines
CCK-1/2R Récepteur 1 et 2 des cholécystokinines
CID Dissociation induite par collision
CREB Protéine de liaison aux éléments de réponse AMP_c
DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMH Noyau hypothalamique dorsomédian

DPP-IV	Dipeptidyl peptidase IV
DR	Noyau du raphé dorsal
EGCG	Epigallo-catechin 3-gallate
eIF2 α	Acteur d'initiation eucaryote 2 alpha
ERK	Kinase régulée par le signal extracellulaire
FDR	Taux de fausses découvertes
FPLC	<i>Fast protein liquid Chromatography</i> – Purification rapide des protéines par chromatographie liquide
GCGR	Récepteur du glucagon
GCN2	la kinase non dépressible 2
GHSR	Récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance
GIP	<i>Glucose-dependent Insulinotropic Polypeptide</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GLP-1R	Récepteur du glucagon-like peptide-1
GLP-2	<i>Glucagon-like peptide-2</i>
GLUT2	Transporteur de glucose 2
Gly-Pro AMC	Gly-Pro-7-amido-4-méthylcoumarine
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
GRPP	<i>Peptide pancréatique lié à la glicentine</i>
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Acide chlorhydrique
HMW-GS	<i>High molecular weight – Glutenin subunit</i>
IB	<i>Intestinal barrier</i>
IC ₅₀	Concentration inhibitrice de l'activité de 50%
IGF-1	Facteur de croissance analogue à l'insuline – somatomédine C
IMC	Indice de masse corporelle
IPANS	Neurones afférents primaires intrinsèques
IV	Intraveineuse
LCRF	Facteur luminale de libération de la CCK
LepR	Récepteur de la leptine
LHA	Aire latérale hypothalamique
LMW-GS	<i>Low molecular weight – Glutenin subunit</i>

LY	<i>Lucifer Yellow</i>
mLST8	Cible de la sous-unité LST8 du complexe de la Rapamycine
MOR	Récepteurs μ -opioïdes
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
mTORC1	Cible mécaniste du complexe de Rapamycine 1
Nacc	Noyau accumbens
NK2/NK3	Neurokinine 2 ou 3
NPY	Neuropeptide Y
NSC	Noyau suprachiasmatique
NTS	Noyau du tractus solitaire
Ox	Oxyntomoduline
PA1/2	Protéines albumine 1 ou 2
PAGvl	Région grise périaqueducale ventrolatérale
P _{app}	Perméabilité apparente
PB ^{pdyn}	Neurones exprimant la prodynorphine dans le noyau parabrachial
PC1/3	Prohormones convertases 1 et 3
PepT1	Peptide transporteur 1
PFC	Cortex préfrontal
pH	Potentiel hydrogène
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Phospholipase kinase A
Pm20d1	Peptidase M20 contenant le domaine 1
POMC	Pro-opiomélanocortine
PP	Polypeptide pancréatique
PRAS40	Substrat Akt de de 40 kDa riche en proline
PVN	Noyau paraventriculaire
PYY	Peptide YY
QSAR	Relation quantitative structure-activité
Raptor	Protéine de régulation associée au complexe mTOR
RER	Coefficient d'échange gazeux
RP- HPLC	Chromatographie liquide haute performance en phase inverse
S6K1	S6 kinase 1

SDS-PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium
SEC	Chromatographie par exclusion stérique
SESN2	Sestrine 2
SGLT1/3	Cotransporteur sodium-glucose de type 1 ou 3
SNAT2	Transporteur d'acides aminés neutres dépendant du sodium 2
SNC	Système nerveux central
T1R1/T1R3	Récepteur du goût de type 1 ou 3
T2D	Diabète de type 2
TAS2R	Récepteur du goût de type 2
TEER	Resistance électrique transépithéliale
TJs	Jonctions serrées - <i>Tight Junction</i>
TSC	complexe protéique de la sclérose tubéreuse
VMH	Noyau hypothalamique ventromédian
VTA	Aire tegmentale ventral
Y1 /2/5	Récepteur Y1-2 ou 5

Introduction générale

Ce projet s'inscrit dans un contexte mondial de transition alimentaire où la consommation en protéines ne cesse de croître entraînant une augmentation de la production avec un impact environnemental considérable. Nous sommes par ailleurs face à une modification des modes de vie et des habitudes alimentaires qui a conduit depuis plusieurs années à l'émergence d'une véritable épidémie d'obésité, associée à l'apparition de maladies métaboliques comme le diabète de type 2 (T2D). Dans ce contexte, le sujet de ce travail de thèse porte sur l'implication et la comparaison des protéines alimentaires de sources différentes dans la régulation de l'homéostasie énergétique et plus particulièrement dans la régulation périphérique de la prise alimentaire et du métabolisme glucidique. L'objectif à long terme est de mieux caractériser ces protéines afin de proposer une utilisation plus rationalisée, dans un contexte de raréfaction de ressources, avec un bénéfice santé potentiel, dans les domaines de la nutrition et des aliments fonctionnels.

Jusqu'à aujourd'hui, l'impact de la nature et de l'origine des protéines alimentaires dans la régulation de la prise alimentaire à court terme, a fait l'objet d'un nombre très restreint d'études, malgré l'effet démontré des protéines sur la satiété. Les recherches à ce sujet, sont limitées et les résultats souvent contradictoires. De plus, la majorité des études, lorsqu'elles sont comparatives, s'intéresse principalement aux protéines laitières en comparant les effets des protéines du lactosérum à ceux des caséines. Néanmoins, même si certains résultats sont contradictoires, il transparaît que les protéines n'agissent pas de façon identique.

Dans ce contexte, mon projet de thèse vise à comparer l'effet de protéines de sources variées dans la régulation de la prise alimentaire, l'activité de la dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) et l'inhibition de l'absorption intestinale du glucose, régulateur central de l'homéostasie énergétique.

Une partie de mes expérimentations de thèse a concerné l'étude des populations peptidiques générées au cours de la digestion gastro-intestinale et l'étude de leur impact sur les différents mécanismes intrinsèquement liés à la régulation de la prise alimentaire. Les activités de ces protéines en lien avec ces métabolismes ont d'une part été étudiées grâce à différents modèles cellulaires intestinaux, après avoir été digérées *in vitro* avec le protocole consensuel INFOGEST (Brodkorb et al., 2019a) adapté aux protéines seules (Atallah et al., 2020), simulant les conditions physiologiques de la digestion humaine, et d'autre part *in vivo* et *ex-vivo* chez le rat.

Ce travail a permis ainsi de mieux caractériser des protéines et de mettre en évidence des différences dues à leur nature et à leur origine.

Le manuscrit se présente sous la forme suivante : une première partie bibliographique présente le contexte général, la digestion des protéines et leur rôle dans les processus de régulation de la prise alimentaire. Cette première partie bibliographique est suivie d'un descriptif des protéines sélectionnées pour l'étude. Ensuite, après une présentation des objectifs de mes travaux de thèse, les méthodes et résultats sont présentés sous la forme de trois articles scientifiques, dont un publié dans *Frontiers in Nutrition* en 2022. Enfin, une discussion générale met en avant les résultats et leur place dans un contexte scientifique plus large et présente un ensemble de perspectives.

Synthèse bibliographique

1. Enjeux autour de la valorisation des protéines

1.1 Augmentation rapide de la demande en protéines

Nous sommes actuellement 7,8 milliards d'Hommes sur Terre et ce chiffre ne cesse d'augmenter puisqu'en 2050, le nombre d'habitants est estimé à 9,7 milliards et à 11 milliards en 2100 (**Tableau 1**).

Tableau 1: Estimation de la population mondiale et régionale en 2030, 2050 et 2100 en fonction des projections de la variante moyenne.

<i>Régions</i>	Population (millions)			
	<i>2017</i>	<i>2030</i>	<i>2050</i>	<i>2100</i>
Monde.....	7 794	8 548	9 735	10 875
Afrique.....	1 340	1 688	2 489	4 280
Asie.....	4 641	4 974	5 290	4 720
Europe.....	747	741	710	630
Amérique du sud.....	653	706	762	680
Amérique du nord.....	368	390	425	491
Océanie.....	42	48	57	75

Source: *United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2019). World Population Prospects 2019, Online Edition. Rev. 1.*

L'augmentation rapide de la population mondiale a entre autres, pour conséquence une augmentation globale de la demande en protéines à l'échelle mondiale. Cependant, la projection de cette demande en protéines n'est pas homogène dans le monde et dépend fortement du niveau de vie des habitants et du niveau de développement des pays. **La figure 1** illustre bien ce phénomène de transition nutritionnelle.

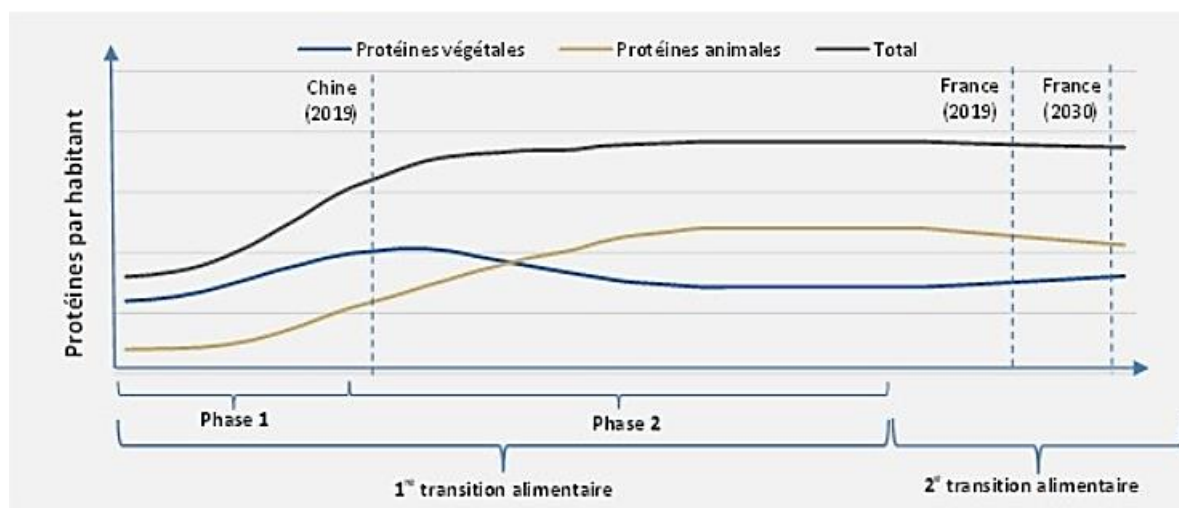


Figure 1: Transition nutritionnelle dans le monde (source BIPE d'après FAO). La première transition alimentaire concerne les pays en développement. L'augmentation du niveau de vie des habitants permet une augmentation générale de leur apport en protéines principalement induite par une augmentation considérable de la consommation de protéines animales. La seconde transition nutritionnelle concerne les pays développés qui vont réduire leur consommation de protéines animales en faveur des protéines végétales dans un souci écologique, sanitaire et de santé.

1.1.1 *Etat de la consommation en protéines dans les Pays développés :*

Dans les pays développés, la consommation en protéines animales est très élevée puisqu'elle est dépendante de facteurs socio-économiques tels que le niveau des revenus par habitant, de l'urbanisation ou encore du vieillissement de la population (Henchion, 2017). Historiquement, pour des raisons culturelles, gastronomiques et économiques, les personnes se tournent davantage vers les protéines animales, notamment celles contenues dans la viande. Il est reconnu qu'un apport en protéines suffisant et de bonne qualité (protéines animales principalement) joue un rôle capital dans le maintien en bonne santé (Strasser et al., 2018). De ce fait, avec le vieillissement de la population européenne, la production de protéines de bonne qualité en Europe est devenue un enjeu très important.

Cependant, dans les pays développés, en Europe principalement, il semble que la consommation de protéines animales ait atteint un pic de saturation et ne tend plus à augmenter malgré l'augmentation du niveau de vie. Les moteurs de choix de la consommation de protéines changent et se focalisent plus sur les bénéfices santé et l'impact environnemental (Aiking & de Boer, 2020; Fresan & Sabaté, 2019). L'augmentation de la demande en protéines animales dans les pays développés ne dépend donc quasiment plus que du faible taux d'accroissement démographique (Delgado, 2003a).

Depuis les années 1990, une baisse de la consommation de viande rouge est observée en Europe. La France a diminué de 12 % sa consommation de viande rouge ces dix dernières années (Tavoularis & Sauvage, 2019). Il existe en effet une augmentation de la prise de conscience de l'impact écologique de la production animale et des questions éthiques relatives au bien-être animal. Ces deux facteurs tendent à ralentir l'augmentation de la demande en protéines animales en Europe. Les préoccupations liées à la santé sont également responsables de ce ralentissement car il a récemment été montré que la consommation de protéines animales était associée à une consommation plus élevée d'acides gras saturés et de composés toxiques, notamment produits lors de la cuisson des viandes, vraisemblablement à l'origine d'une augmentation de la prévalence du diabète de type 2 (T2D), de maladies cardiovasculaires et de cancers (Domingo & Nadal, 2017; Lecerf, 2008; Micha et al., 2010; Pan et al., 2011, 2011; Q. Sun, 2012). Par exemple, il a été montré que les personnes consommant plus de 100 g de viande rouge par jour auraient un risque augmenté de 30 % de développer un cancer (Diallo et al., 2018). A contrario, la production de protéines végétales serait avantageuse d'un point de vue écologique et la consommation d'aliments végétaux bénéfique pour la santé. Ces raisons poussent les consommateurs des pays développés à substituer progressivement les protéines animales par des protéines végétales.

Dans les pays en voie de développement, la consommation de protéines ne suit pas la même tendance.

1.1.2 Etat de la consommation en protéines dans les pays en voie de développement.

Dans les pays en voie de développement, la sécurité alimentaire n'étant pas atteinte pour tous, l'augmentation de la consommation en protéines est nécessaire. Depuis ces vingt dernières années, la consommation en protéines dans les zones géographiques développées tend à se stabiliser alors que dans les zones géographiques qui rassemblent les pays en voie de développement, la consommation en protéines ne cesse d'augmenter (**Figure 2**).

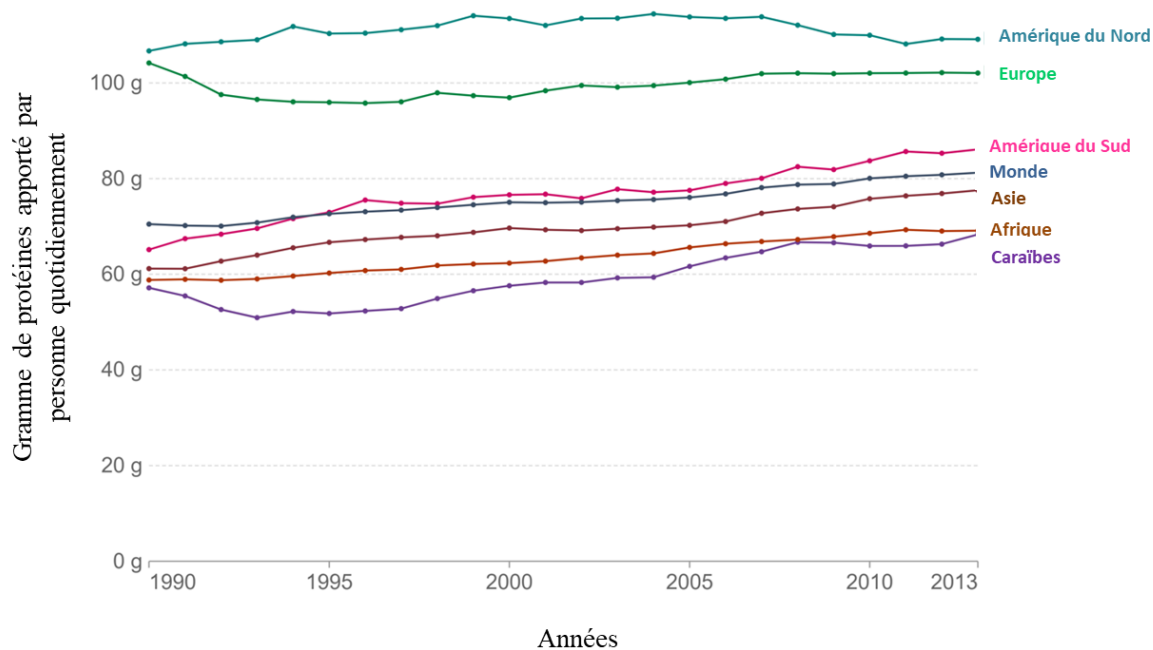


Figure 2: Approvisionnement en protéines par région de 1990 à 2013 (Source : FAO; Graphique issue de OurWorldInData). Approvisionnement mesuré en grammes de protéines par personne et par jour. A noter que cela mesure la nourriture disponible pour la consommation au niveau du ménage mais ne tient pas compte des aliments gaspillés ou non consommés.

L'augmentation de la consommation de protéines dans ces pays est principalement due à une augmentation de la consommation de protéines animales. Les pays pauvres ou à faibles revenus ont une croissance de consommation en protéines animales beaucoup plus forte que celle des pays riches ou à revenus modérés en raison de l'effet de saturation atteint dans les pays où la consommation de protéines est influencée par la volonté d'atteindre un système d'approvisionnement alimentaire plus durable (Andreoli et al., 2021).

La consommation de protéines animales dans les pays où les individus ont de faibles, voire très faibles revenus est influencée par des moteurs économiques mais également par des motifs religieux ou culturels. En effet, la consommation de certains types de protéines animales n'est pas la même suivant la région du monde. Certains pays d'Asie du Sud-Est ont enregistré une croissance rapide de la consommation de volailles et de poissons, mais pas de produits laitiers ; tandis que la croissance de la consommation de protéines animales en Asie de l'Est a été impactée par une croissance rapide de la consommation de porc, notamment en Chine. En revanche, la croissance de la consommation de protéines animales en Asie du Sud (Inde) a été provoquée par une plus forte consommation de lait et de produits laitiers (HLPE, 2017).

Dans ces pays, l'augmentation de la demande en protéines est principalement liée à l'augmentation du niveau de vie qui concerne les classes moyennes et riches et à l'accroissement démographique. En effet, la population des pays en voie de développement augmente beaucoup plus rapidement que celle des pays développés. Ainsi, la croissance de la population, associée à l'amélioration du niveau de vie de la classe moyenne des pays en voie de développement, induit une augmentation drastique de la demande mondiale en protéines et notamment d'origine animale (**Figure 3**), dont la demande, d'après les estimations, devrait augmenter de 60 % d'ici 2050 (FAO, 2016).

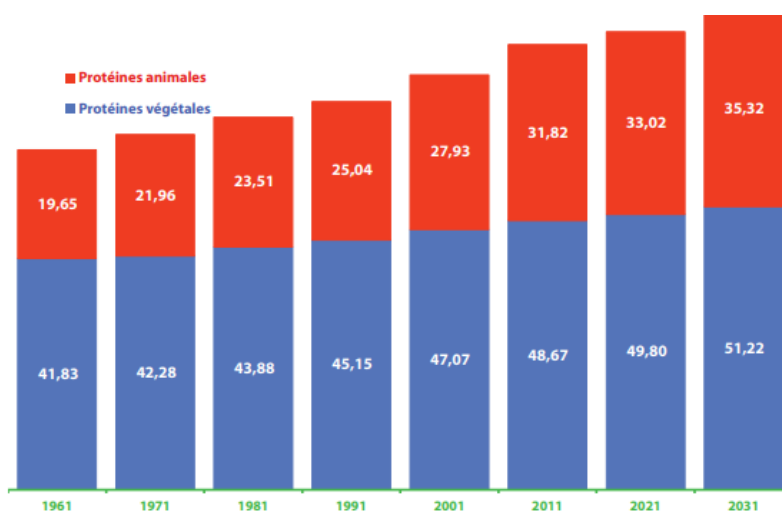


Figure 3: Evolution de la consommation en protéines animales et végétales dans le monde depuis 1961 et projection jusqu'à 2030 en gramme/habitant/jour. (FAOSTAT, 2017).

Le développement économique et l'augmentation de l'urbanisation conduisent les habitants des pays en voie de développement à une transition nutritionnelle au cours de laquelle les calories d'origine animale sont substituées de manière constante aux calories d'origine végétale. Les régimes traditionnels sont remplacés par des régimes plus riches en calories, en sucre raffiné, en gras et en viande copiant les régimes occidentaux (Tilman & Clark, 2014). L'augmentation des revenus encourage les individus à diversifier leur régime alimentaire avec des produits qu'ils n'avaient pas l'habitude de consommer régulièrement (Delgado, 2003b). De ce fait, les consommations de viande et de produits laitiers augmentent.

D'autre part, sans prendre en compte les projections futures, il existe déjà actuellement un besoin non satisfait en protéines pour une large partie de la population mondiale.

1.2 Importance de la consommation de protéines et problèmes d'insécurité alimentaire dans le monde

En 2018, 821 millions de personnes avaient encore un accès insuffisant aux ressources alimentaires et souffraient d'une sous-consommation de protéines de bonne qualité qui n'étaient pas disponibles en quantité suffisante dans une grande partie du monde (FAO et al., 2018). La dénutrition dans le monde continue d'ailleurs à être un problème majeur de santé publique.

La dénutrition est la conséquence d'un déficit en énergie, en protéines et/ou en micronutriments qui se traduit par une perte de poids portant principalement sur la masse musculaire (Haute Autorité de Santé 2007; Zazzo 2010). La dénutrition a pour conséquences d'altérer l'état général et d'augmenter la susceptibilité aux infections par une diminution des défenses immunitaires induite en partie par une perte de masse maigre (INPES, 2006). Chez les enfants, elle contribue à une mauvaise santé et à un retard de croissance (Semba et al., 2016). La dénutrition est souvent perçue comme une problématique des pays en voie de développement car elle concerne de 10 à 20 % de l'ensemble de cette population, notamment en Asie du sud et en Afrique sub-saharienne (FAO, 2017). La dénutrition est la conséquence de multiples causes directes et indirectes. La cause indirecte principale de dénutrition dans les pays en voie de développement est la pauvreté. La **figure 4**, schématise les causes et conséquences de la dénutrition.

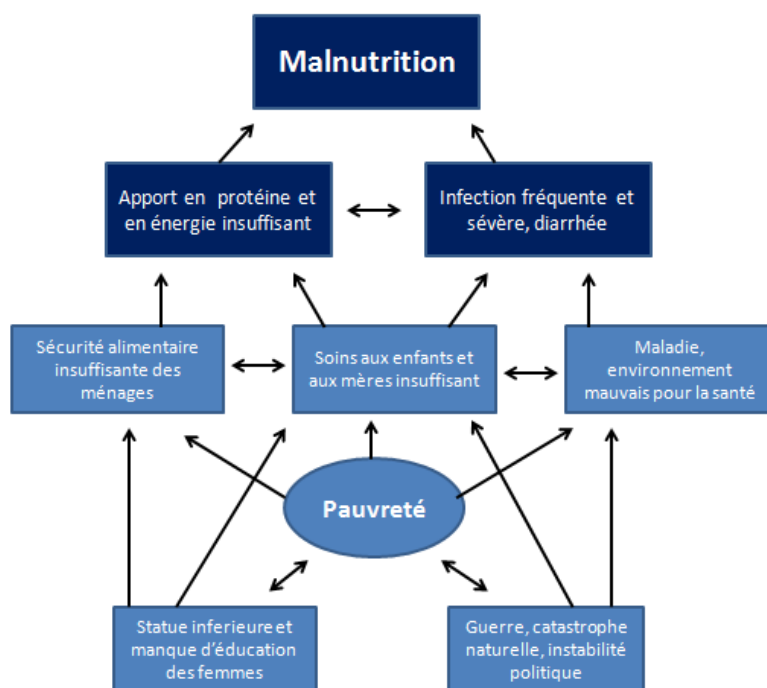


Figure 4: Causes de la malnutrition dans les pays en voie de développement (Muller, 2005). Les causes directes sont en bleu foncé et indirectes en bleu clair. La pauvreté est la principale cause indirecte de dénutrition dans le monde.

Ce problème de sous-nutrition dans le monde met en évidence ce que l'on peut appeler une insécurité alimentaire liée à nos moyens de production. Il est clair que la production actuelle ne satisfait pas les besoins en protéines d'une partie de la population. Il est donc nécessaire de développer la production et/ou de faciliter l'accès aux protéines de bonne qualité dans certaines parties du monde où le manque existe. Pour les près de 800 millions de personnes extrêmement pauvres qui vivent avec moins de 2 € par jour et qui consomment un régime alimentaire fortement basé sur les féculents, ainsi que pour des millions d'autres qui sont légèrement mieux lotis, les aliments d'origine animale sont nécessaires car ces produits fournissent des calories, mais plus important encore, des nutriments nécessaires au développement humain (Adesogan et al., 2020). La carence en protéines de bonne qualité cause une dénutrition qui est à l'origine de près de la moitié des décès d'enfants dans le monde et compromet la santé à long terme des populations ainsi que le développement cognitif des enfants (Black et al., 2008, 2013; Development Initiatives, 2018). Selon l'OMS, le retard de croissance (faible taille pour l'âge), qui est un indicateur important de la dénutrition chronique, a touché environ 150,8 millions d'enfants de moins de cinq ans en 2017, en particulier en Afrique sub-saharienne et en Asie, où il y a toujours des taux de retard de croissance de plus de 30 % (UNICEF et al., 2018).

Dans ce contexte général, il est nécessaire de trouver des solutions pour satisfaire les demandes actuelles et futures de la population mondiale en protéines de bonne qualité. Une augmentation de la production semble le moyen le plus évident pour y remédier mais malheureusement cette solution est difficilement envisageable d'un point de vue écologique. Une meilleure valorisation et une meilleure utilisation des sources protéiques est ainsi nécessaire pour répondre à cette problématique.

1.3 Impact écologique de la production de protéines

L'augmentation de la demande en protéines pose de sérieux problèmes environnementaux. D'un point de vue écologique et éthique, il n'est pas possible de répondre à cette demande par une augmentation de la production en protéines animales. Contrairement à la production de protéines végétales qui ne requiert que la lumière du soleil et l'eau comme source d'énergie primaire, l'élevage nécessite des prairies et des aliments d'origine végétale. La production de protéines d'origine animale est plus coûteuse en ressources agricoles, en eau et participe également davantage à la production de gaz à effet de serre, associés au réchauffement climatique par rapport à la production de protéines végétales (Godfray et al. 2018 ; Mouel et Mora 2019).

L'agriculture en général et la production d'aliments à destination de l'homme en particulier, représente plus de 25 % des émissions de gaz à effet de serre (dioxyde de carbone, protoxyde d'azote, méthane...), pollue les sols et les eaux douces et marines avec des composés chimiques et utilise la moitié des terres émergées non couvertes de glace de la planète (Tilman & Clark, 2014). Douze pour cent des gaz à effet de serre proviennent de l'élevage et 30 % des pertes de biodiversité sont causées par la transformation de forêts, de zones humides et de prairies naturelles en terres agricoles pour la production animale (Henchion et al., 2017). En Europe, deux tiers des surfaces agricoles sont utilisés pour le bétail (Henchion et al., 2017). L'augmentation de la production de produits animaux induit une augmentation de la production de ressources agricoles qui nécessite elle-même une augmentation des surfaces arables. Cette augmentation provoque une déforestation en masse menaçant ainsi la survie de certaines espèces animales. L'élevage participe donc à une accélération de la dégradation de l'environnement.

La production de lait, de viande ou de poisson se fait principalement en transformant des protéines végétales en protéines animales avec un rendement de transformation qui peut aller de 2,5 à 10 kg de protéines végétales pour produire 1 kg de protéines animales consommables (Chereau et al., 2015).

Bien que les produits animaux soient une source de protéines d'excellente qualité, il est nécessaire de raisonner leur production. La problématique actuelle concerne la recherche de solutions permettant d'augmenter la production de protéines, sans augmenter la production de protéines animales. De ce fait, pour répondre à ces nouveaux besoins en protéines et dans un souci écologique, il est nécessaire de mieux qualifier les protéines pour optimiser leur utilisation et raisonner la production de certaines sources. Une connaissance plus approfondie de ces sources protéiques permettra de mieux valoriser certains types de protéines, notamment les protéines végétales, ou alternatives comme les protéines d'insectes.

Ainsi, afin de répondre à cette problématique, un des objectifs de cette thèse est de caractériser les protéines pour leur implication dans l'homéostasie énergétique et les problèmes majeurs de santé publique, comme l'obésité et le T2D, qui émergent lorsque cette homéostasie est mise à mal.

1.4 Les protéines, une solution contre les maladies métaboliques ?

De nos jours, un des principaux problèmes de santé publique est l'obésité. A l'échelle mondiale, le surpoids et l'obésité font plus de victimes que la malnutrition avec tous les ans, 2,8 millions de décès. En 2016, 1,9 milliard de personnes étaient en surpoids soit environ 30 % de la population mondiale et 650 millions de personnes étaient obèses, soit 9,5 % de la population mondiale (World Health Organization, 2021). En 30 ans, la prévalence de l'obésité a triplé. L'obésité est une maladie en forte croissance qui concerne aussi bien les pays riches que les pays intermédiaires ou pauvres (Jackson et al, 2020). Dans les pays en voie de développement, la suralimentation est un symptôme de richesse, liée au développement économique rapide d'un pays et touche principalement les habitants en zone urbaine (M. Chan, 2017; Popkin, 2012). Par contre, dans les pays riches, les personnes les plus touchées par l'obésité sont les catégories d'individus les plus pauvres et vivant généralement en zone rurale (Popkin, 2012).

Plus largement, le surpoids et l'obésité s'expliquent par le développement des technologies, la sédentarité, le développement des transports et un changement des habitudes alimentaires qui ont pour conséquences de réduire la dépense énergétique des individus et d'augmenter leur consommation d'énergie. En parallèle, l'augmentation de la consommation de produits industriellement transformés, de plats préparés, de prise de repas à l'extérieur (fast-food, restaurants) conduit à une augmentation des consommations de sucre et de gras.

Selon L'OMS, l'obésité et le surpoids se définissent comme une accumulation excédentaire de graisse qui peut nuire à la santé. Le diagnostic du surpoids et de l'obésité repose sur la mesure de l'Indice de Masse Corporelle (IMC). Lorsque qu'une personne a un IMC supérieur à 25 kg/m², elle est en surpoids et si son IMC est supérieur à 30, elle est obèse. Médicalement, l'obésité correspond à une inflammation des tissus adipeux aboutissant à une pathologie d'organes (Basdevant, 2006). Cette maladie résulte d'un déséquilibre entre les apports et la dépense énergétique et est associée à un risque important de développement de maladies métaboliques (**Tableau 2**) comme les problèmes cardio-vasculaires (hypertension artérielle, hyperlipidémies, insuffisance coronaire et cardiaque) (Basdevant, 2006; M. Sun et al., 2019), le T2D et certains cancers (œsophage, colon, rectum, foie, rein...) (Avgerinos et al., 2019).

Tableau 2: Principales complications de l'obésité et maladies associées (Basdevant, 2006)

Psychosociales	Altération de la qualité de vie, discrimination, préjudice ; altérations de l'image et de l'estime de soi, conséquences des régimes restrictifs.
Cardiovasculaires	Insuffisance coronaire, hypertension artérielle, accidents vasculaires cérébraux, thromboses veineuses profondes, embolies pulmonaires, insuffisances cardiaques, dysfonction végétative, insuffisance respiratoire.
Respiratoires	Syndrome d'apnée du sommeil ; hypoventilation alvéolaire ; hypertension artérielle pulmonaire.
Ostéoarticulaires	Gonarthrose, lombalgies troubles de la statique.
Digestives	Lithiase biliaire, stéatose hépatique, reflux gastro-œsophagien.
Cancers	Homme : prostate, colorectal, voies biliaires. Femme : endomètre, voies biliaires, col utérin, ovaires, sein, colorectal.
Métaboliques	Insulinorésistance, diabète de type 2, dyslipidémie, hyperuricémie, goutte, altérations de l'hémostase : fibrinolyse, PAII.
Endocriniennes	Infertilité, dysovulation.
Rénales	Protéinurie, glomérulosclérose.
Autres	Hypersudation, lympho-œdème, œdèmes, hypertension intracrânienne, complications obstétricales, risque opératoire.

L'obésité est considérée comme le facteur le plus important dans le développement de maladies métaboliques dont le T2D. L'excès de tissu adipeux affecte le métabolisme du glucose en provoquant la sécrétion de façon excessive, d'hormones telles que la leptine, de cytokines et des substances pro-inflammatoires. Chez les personnes obèses, la sécrétion de ces molécules est drastiquement augmentée et est fortement liée à la survenue d'une insulino-résistance puis d'un T2D (Algloblan, 2014; Karpe, 2011) comme le montre la **figure 5** ci-dessous. Cette

pathologie se caractérise par la combinaison d'une production insuffisante d'insuline par les cellules β du pancréas liée à une résistance des cellules gluco-dépendantes à l'insuline (Kasuga, 2006) qui conduit à une hyperglycémie chronique. Les personnes en surpoids ou obèses peuvent développer une insulino-résistance plus ou moins sévère. Les cellules β du pancréas compensent pendant un temps cette insulino-résistance en produisant plus d'insuline jusqu'au moment où le pancréas n'est plus en mesure d'en produire suffisamment.

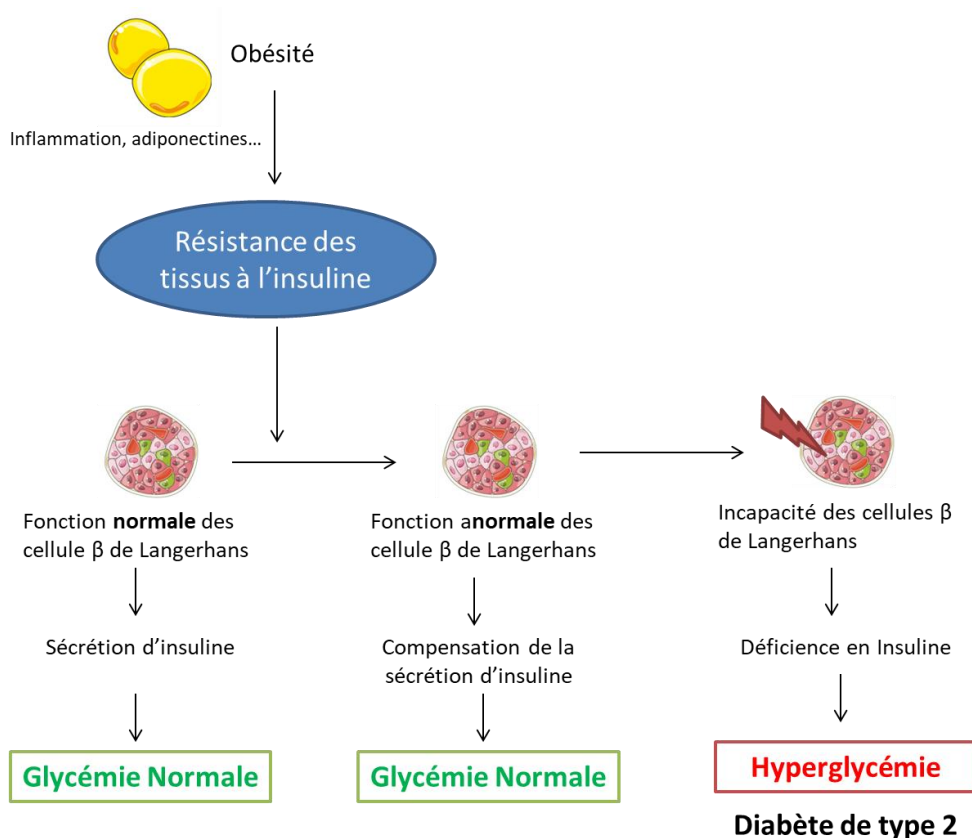


Figure 5: Causes et conséquences de l'obésité dans le développement du diabète de type 2. Le diabète de type 2 est principalement la résultante d'une mauvaise hygiène de vie. L'obésité induit une résistance des tissus à l'insuline qui amène les cellules β de Langerhans à surproduire de l'insuline pour maintenir une glycémie physiologique. Avec le temps, les cellules β de Langerhans n'arrivent plus à compenser et la glycémie n'est plus régulée correctement engendrant une hyperglycémie chronique et l'apparition du T2D.

Le T2D apparaît très lentement et a de graves conséquences à long terme comme l'apparition de maladies cardio-vasculaires, des troubles oculaires, des neuropathies et une sensibilité plus accrue aux infections telles que le COVID19 par exemple (Sultan & Bauduceau, 2020).

L'obésité étant le principal facteur d'apparition du T2D, sa prévalence a un taux de croissance aussi alarmant. A ce jour, 537 millions de personnes développent un T2D dans le monde et ce nombre est projeté à 643 millions d'ici 2030 et 783 millions d'ici 2045 (IDF, 2021). Le T2D apparaît avec l'âge et touche généralement les individus âgés de plus de 40 ans. Cependant, avec le changement rapide des habitudes alimentaires, de plus en plus de jeunes adultes (voire d'adolescents) développent un T2D prématurément.

Dans ce contexte, la compréhension des mécanismes physiologique liés à l'ingestion d'aliments, est devenue un enjeu essentiel. Les solutions envisagées se concentrent sur la découverte de molécules intervenant dans les métabolismes glucidiques et énergétiques. Ces dernières années, il a été découvert que les protéines agro-alimentaires libéraient, au cours de la digestion gastro-intestinale, des peptides susceptibles d'avoir une activité biologique. Ces peptides sont générés au cours de l'hydrolyse des protéines par les enzymes digestives et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, tels que la régulation de la prise alimentaire et le métabolisme du glucose, apportant un bénéfice santé (Dugardin et al., 2020)

2. Les protéines : Composition, nature, variétés et intérêt nutritionnel

2.1. Les protéines alimentaires

Les protéines font partie des trois macronutriments essentiels à la survie et au maintien d'une bonne santé grâce à leurs rôles énergétique et nutritionnel. Elles apportent de l'énergie sous forme d'azote et d'acides aminés (AA) indispensables à la croissance, au développement et au renouvellement des tissus, à la reproduction, et au fonctionnement de notre système immunitaire (Tomé, 2008, Wu et al. 2014). Elles jouent un rôle important dans la formation des structures cellulaires et extracellulaires, participent à de nombreux processus physiologiques sous la forme d'enzymes, d'hormones ou de récepteurs et permettent la régulation de l'expression des gènes (Wu et al., 2014a). Les protéines se composent d'AA reliés par des liaisons peptidiques. Les AA dits protéinogènes (inclus dans les protéines) sont au nombre de 20 et parmi ceux-ci, seulement 11 peuvent être synthétisés par l'organisme. Les 9 AA restants sont considérés comme des AA indispensables (AAI) chez l'Homme et doivent être apportés par l'alimentation (**Tableau 3**).

Tableau 3: Classement des différents acides aminés.

Acides aminés indispensables	Acides aminés non indispensables
Lysine (K), Méthionine (M), Thréonine (T), Tryptophane (W), Valine (V), Isoleucine (I), Leucine (L), Phénylalanine (F), Histidine (H)	Arginine (R), Alanine (A), Sérine (S), Tyrosine (Y), Asparagine (N), Acide glutamique (E), Cystéine (C), Acide aspartique (D), Proline (P), Glutamine (Q), Glycine (G)

(X) Abréviation attribuée aux différents acides aminés

Le caractère indispensable de ces AA vient de l'impossibilité pour l'organisme de les synthétiser à partir de composés normalement disponibles et/ou à une vitesse suffisante pour satisfaire le besoin (Hou & Wu, 2018). La capacité d'une protéine alimentaire à satisfaire les besoins en azote et en AAI est un déterminant majeur de sa qualité nutritionnelle. Actuellement, la qualité d'une source protéique est évaluée en comparant sa composition en AAI à un profil de référence appartenant à une protéine théorique, qui correspond à une couverture parfaite des

besoins. Il existe donc des différences en termes de qualité nutritionnelle entre les différentes protéines alimentaires, directement corrélées à la composition en acides aminés. Les besoins en AAI sont principalement satisfaits par la consommation de protéines animales mais peuvent être couverts par des associations de protéines végétales issues des céréales et des légumineuses.

2.2 Recommandations et habitudes de consommation

Les protéines représentent entre 15 à 20 % des apports énergétiques quotidiens en France soit environ 1,0 à 1,5 g.kg⁻¹.j⁻¹ (Tomé, 2009). Le besoin nutritionnel en protéines est estimé à 0,66 g.kg⁻¹.j⁻¹ et les recommandations nutritionnelles sont de 0,80 g.kg⁻¹.j⁻¹ (Richter et al., 2019). La consommation moyenne de protéines en France couvre ainsi parfaitement les besoins nutritionnels de la population et cela même quand ces besoins sont augmentés lors de situations physiologiques particulières comme le sport à haut niveau (>1,2 g.kg⁻¹.j⁻¹), la grossesse (0,65 - 0,72 g.kg⁻¹.j⁻¹) ou l'allaitement (1,1 g.kg⁻¹.j⁻¹) (Afssa, 2007).

En France, l'apport majoritaire de protéines est de source animale. Leur part dans l'alimentation est estimée à 68 % et celle des protéines végétales à 32 % alors que dans le monde, les protéines végétales et animales représentent respectivement 65 % et 35 % des protéines consommées par l'homme (Wu et al., 2014a). Toujours en France, les politiques actuelles en matière d'agriculture et d'alimentation préconisent de diminuer la consommation de protéines animales et d'appliquer les recommandations qui tendent à privilégier les protéines végétales par rapport aux protéines animales.

2.3 Classification : sources des protéines

Les protéines sont apportées dans notre alimentation principalement par des produits animaux (viande, poisson, œuf, lait) et dans une moindre mesure par des produits végétaux (céréales, légumineuses). Une première classification des protéines alimentaires peut être établie suivant l'origine de ces protéines : animale ou végétale.

- Les principales protéines animales consommées en France sont :

- **Les protéines musculaires**, originaires des viandes rouge ou blanche ou de poissons, sont les composantes principales des muscles squelettiques striés et

- peuvent être divisées en trois groupes suivant leur degré de solubilité : sarcoplasmique (myoglobine, hémoglobine), contractile ou myofibrillaire (actine, myosine) et stromale (collagène, élastine).
- **Les protéines de lait** de vache (*Bos taurus*) représentent environ 40 % (m/vol) du lait, comprennent de nombreuses protéines hétérogènes et sont représentées par les caséines (80 %) et les protéines du lactosérum (20 %).
 - Les caséines sont des phosphoprotéines et existent sous plusieurs formes : $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β - and κ -caséines. Elles se regroupent pour former des micelles de caséine.
 - Les protéines de lactosérum sont principalement représentées par les β -lactoglobulines et l' α -lactalbumine, mais d'autres protéines comme les albumines plasmatiques, les immunoglobulines, la lactoferrine se retrouvent dispersées dans la solution de lactosérum (P. F. Fox et al., 2015).
 - **Les protéines de l'œuf** de poule (*Gallus gallus domesticus*) représentent 13 % des macronutriments de l'œuf. Dans l'albumen, les plus présentes sont l'ovalbumine (54 %), l'ovotransferrine (12 %) et l'ovomucoïde (11 %) qui est très allergisante et des protéines comme le lysozyme, les G2- et G3-globulines et l'ovoinhibiteur (Jahan-Mihan et al., 2011). Les protéines du vitellus sont principalement des lipoprotéines : α - et β -lipoprotéines (70 %), phosvitine (16 %), des lipoprotéines à faible densité (LDL) (12 %) et des protéines en quantité mineure telles que le lipovitelline et la vitellogénine. Les protéines d'œuf sont d'excellente qualité par leur composition en AA, néanmoins certaines sont des anti-protéases (comme l'ovoinhibiteur qui participe à la défense de l'œuf contre les pathogènes qui ont la faculté d'inhiber les enzymes digestives telle que la trypsine ou la chymotrypsine ou encore des protéases à serine (Bourin, 2011).
 - **Les principales protéines végétales consommées en France** proviennent soit des céréales comme le blé, le riz, le maïs, soit de légumineuses comme les pois, les lentilles, les haricots blancs, etc...
 - Les **protéines issues des céréales** se distinguent par leur action : les céréales possèdent des protéines métaboliquement actives qui sont principalement des enzymes incluant des inhibiteurs de protéases et des protéines de stockage telles que des albumines, des globulines, des prolamines et des gluténines. Ces protéines sont riches en glutamine, en méthionine et en proline mais déficientes en lysine, arginine, thréonine et tryptophane (Botella, 2021; Lasztity, 1995).

- Les **protéines issues des légumineuses** sont principalement des globulines (légumine et viciline) et des albumines (Yada, 2017). Contrairement aux protéines céréalières, ces protéines sont pauvres en méthionine mais riches en lysine.

Il est reconnu que les protéines végétales sont de moins bonne qualité nutritionnelle que les protéines animales car elles peuvent présenter des déficiences en certains AAI (par exemple, la lysine pour les céréales et les AA soufrés pour les légumineuses). De plus, elles ont généralement une moins bonne digestibilité que les protéines animales et possèdent plus de facteurs antinutritionnels qui peuvent inhiber la trypsine et la chymotrypsine ce qui réduit leur biodisponibilité en AA (Gaudichon et al., 2002).

La classification à partir de l'origine des protéines est intéressante mais, comme présenté précédemment, il existe une grande diversité de protéines au sein d'une même source alimentaire. De ce fait, une classification des protéines en fonction de leurs caractéristiques biochimiques telles que leur structure (fibreuse ou globulaire), leur composition (holoprotéine ou hétéroprotéine), leur composition en acides aminés indispensables, ou encore en fonction de leur solubilité (albumine, globuline et scléroprotéine) peut être envisagée. En effet, bien que les protéines puissent être considérées comme similaires du fait de leur nature peptidique, elles présentent néanmoins des différences biochimiques qui peuvent leur conférer des propriétés spécifiques.

2.4 Propriétés physico-chimiques des protéines alimentaires

Les fonctions biologiques exercées par les protéines sont liées à leurs propriétés physico-chimiques. En effet, chaque protéine possède une composition en AA qui lui confère une structure tridimensionnelle propre, lui attribuant des propriétés physico-chimiques spécifiques, comme la solubilité, la résistance thermique, le point isoélectrique, la digestibilité. Ces propriétés vont déterminer leurs activités biologiques (Chobert, 2003). D'autres facteurs influencent leur activité. Les protéines peuvent subir des modifications post-traductionnelles qui vont activer ou inactiver leur fonction biologique et qui peuvent modifier leurs propriétés physico-chimiques. Les protéines peuvent également s'associer à des composés comme des facteurs antinutritionnels, des fibres insolubles, des molécules issues de paroi cellulaire, qui impactent leurs fonctions biologiques. En effet, l'ovalbumine par exemple, a une forte capacité

à se lier avec des polyphénols dont notamment l'epigallo-catechin 3-gallate (EGCG) qui se lie de façon covalente à la protéine. L'EGCG en se liant à l'ovalbumine entraîne un changement de la structure de la protéine et améliore son activité antioxydante (He et al., 2019).

Aussi, les protéines alimentaires tirent certaines propriétés physico-chimiques des interactions qu'elles sont capables d'avoir avec leur environnement (autres molécules, pH, température...) qui sont classées en trois groupes :

- **Propriétés d'hydratation** qui regroupent les relations de la protéine avec l'eau : cela recouvre les propriétés d'absorption, de rétention, de mouillabilité, de gonflement, d'adhérence, de dispersion et de viscosité.
- **Propriétés de structuration** qui regroupent les interactions protéine-protéine : cela implique les phénomènes de précipitation, de coagulation, de gélification.
- **Propriétés de surface** qui regroupent les interactions entre les protéines et d'autres structures polaires ou apolaires en phases liquide ou gazeuse. Les propriétés des protéines qui en découlent sont les suivantes :
 - Emulsions : stabilisation des phases huile/eau d'une émulsion, influencée par la concentration en protéines, le pH, la solubilité des protéines, la présence de sels ou d'autres solutés, la température et l'hydrolyse des protéines. Lors de l'hydrolyse, la séparation des différentes fractions et la dénaturation des protéines globulaires permet d'augmenter le caractère hydrophobe des protéines de surface et ainsi améliorer les propriétés interfaciales de ces protéines (Dagorn-Scaviner et al., 1986).
 - Moussantes : les protéines ont la capacité de se dénaturer sous l'action d'un cisaillement. Elles se déroulent et emprisonnent de l'air. Cette opération permet la formation d'une mousse (dispersion d'un gaz dans un liquide) et au foisonnement de la solution (augmentation du volume par ajout d'air).
 - Encapsulation : formation d'une couche protectrice autour d'une autre molécule.

Tous ces paramètres peuvent modifier leur vitesse de digestion et impacter la disponibilité de leurs AA (Landi et al., 2016).

3. La digestion et l'absorption des protéines par le tractus gastro-intestinal

Pour être utilisées par l'organisme, les protéines alimentaires doivent être digérées et absorbées par la muqueuse intestinale du tube digestif. La digestion est un ensemble de processus qui permet de transformer les macronutriments en molécules plus petites et utilisables par l'organisme (**Figure 6**).

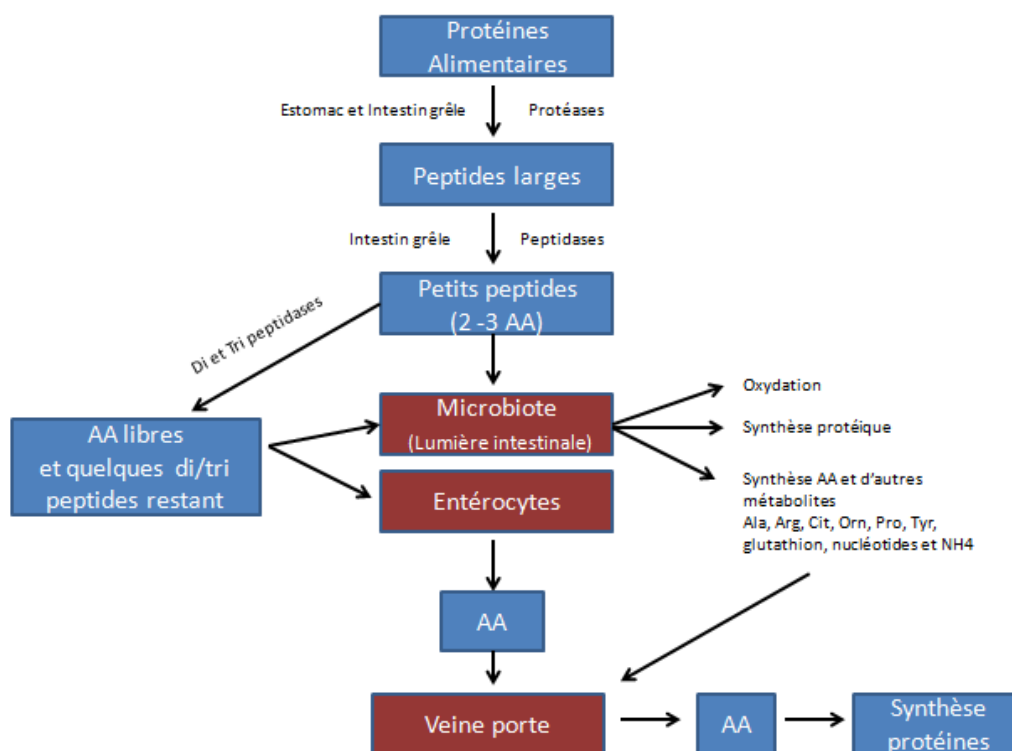


Figure 6: Digestion de protéines alimentaires dans le tractus gastro-intestinal des hommes et des animaux (d'après Wu et al. 2014). Les protéines sont digérées dans l'estomac et l'intestin grêle par des protéases et des peptidases qui génèrent des AA et des peptides. Ces AA et peptides sont soit utilisés par les bactéries du tube intestinal pour la synthèse de nouvelles protéines, de métabolites azotés ou oxydés, soit absorbés par les entérocytes pour la synthèse de protéines ou d'énergie.

La digestion des protéines dans le tractus digestif concerne les protéines alimentaires ingérées ($80-100 \text{ g}\cdot\text{j}^{-1}$) et les protéines endogènes (mucus, cellules intestinales, enzymes digestives, etc.) sécrétées dans la lumière intestinale ($20-50 \text{ g}\cdot\text{j}^{-1}$) (Afssa, 2007).

L'appareil digestif va digérer les protéines grâce à l'action conjointe de l'ensemble des organes et des glandes exocrines qui le constituent (**Figure 7**) :

- Les voies aérodigestives supérieures.
- Le tube digestif : estomac, intestin grêle (duodénum, jéjunum, iléon) et gros intestin.
- Organes digestifs accessoires : pancréas exocrine, foie et vésicule biliaire.

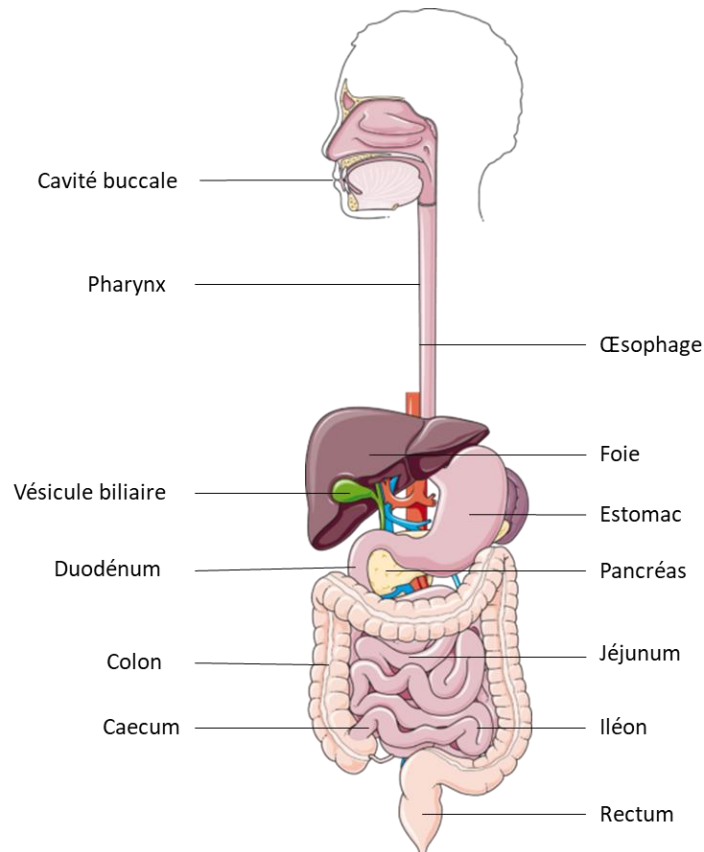


Figure 7: Schéma des principaux organes du tube digestif.

La digestion et l'absorption complète des protéines nécessitent leur passage dans tous les compartiments du tractus digestif, chaque organe jouant un rôle bien défini.

3.1 Mécanisme de la digestion des protéines

3.1.1 Les voies aérodigestives supérieures

L'appareil digestif débute par les voies aérodigestives supérieures, constituées du pharynx, partie commune entre les voies digestives et respiratoires et de la cavité buccale qui permet l'entrée des aliments vers le tractus digestif. La cavité buccale est le premier lieu de la digestion.

Elle permet d'initier la transformation des aliments en bol alimentaire par l'intermédiaire d'enzymes présentes dans la salive et par action mécanique grâce à la mastication.

Les glandes salivaires sécrètent entre 800 mL et 1500 mL de salive par jour afin de diluer et de lubrifier les aliments pour faciliter leur transport dans le tube digestif et d'amorcer la digestion des glucides et des lipides par la présence d'amylase et de lipases salivaires. La salive est une solution aqueuse à pH neutre qui contient une importante quantité d'ions potassium, de bicarbonate, d'ions sodium et de chlore en concentration inférieure à celle du plasma (Boland, 2016). Dans le cas des protéines, la digestion enzymatique ne commence que dans l'estomac (Goodman, 2010).

Néanmoins, les aliments vont commencer à être transformés en bol alimentaire par une action de mastication et la présence de papilles linguales va permettre de transformer les informations chimiques du bol alimentaire en influx nerveux. Ces messages nerveux vont préparer le tractus digestif à la digestion par l'initiation des contractions de la paroi du tube digestif et des sécrétions gastriques et intestinales. Les aliments sont réduits, broyés par les dents et mélangés à la salive afin de réduire leur consistance et faciliter la descente des aliments vers le tractus digestif (Carip & Louet, 2004).

3.1.2 Le tube digestif

Les voies aérodigestives supérieures sont suivies par le tube digestif qui peut être divisé en deux parties : la partie supérieure composée de l'œsophage et de l'estomac et la partie inférieure, elle-même subdivisée en deux parties : l'intestin grêle composé du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, et le gros intestin comprenant le caecum, le colon et le rectum. Le tube digestif peut mesurer jusqu'à 7 m et est continu de la bouche à l'anus. Il permet l'incorporation d'éléments extérieurs à l'organisme et leur transformation en molécules utilisables comme source d'énergie. Cet organe fait l'intermédiaire entre le milieu extérieur représenté par la lumière du tube digestif et le milieu intérieur (J. Campbell et al., 2019). Cette séparation est assurée par la paroi du tractus digestif qui protège le milieu intérieur des micro-organismes présents dans la lumière du tube digestif et des conditions de pH extrêmes qui interviennent durant la digestion. Cette barrière est formée de quatre couches de tissus qui sont (du milieu extérieur vers le milieu intérieur) (J. Campbell et al., 2019): la muqueuse, formée de cellules épithéliales en contact direct avec la lumière intestinale ; la sous muqueuse, couche de tissus conjonctifs richement

vascularisés de vaisseaux sanguins et lymphatiques, innervée par le plexus nerveux sous-muqueux ou plexus de Meissner ; la musculuse, couche de fibres musculaires lisses séparées par le plexus nerveux myentérique ; la séreuse ou adventice, membrane conjonctive séparant le tube digestif des organes voisins.

Cette structure, illustrée par la **Figure 8** est présente tout au long du tractus digestif avec certaines adaptations en fonction des parties et de leur spécificité.

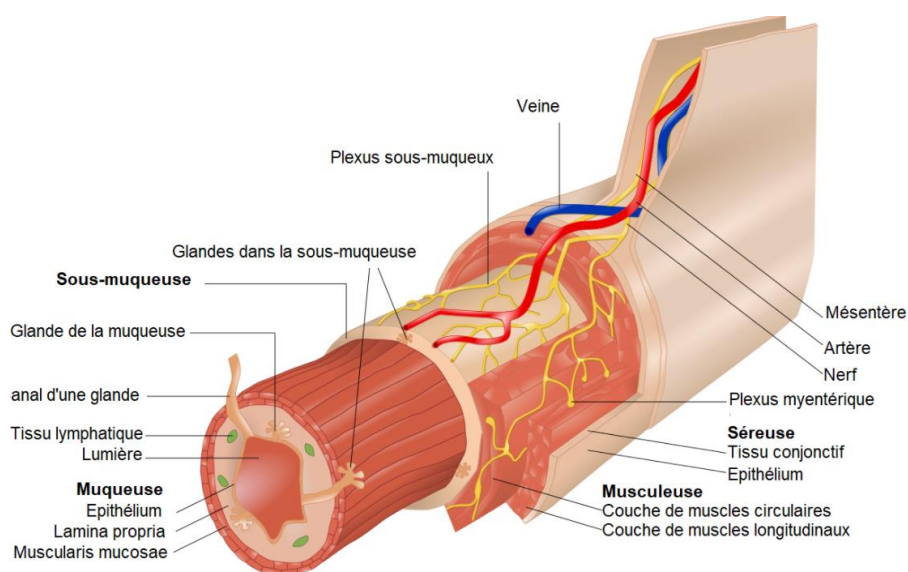


Figure 8: Représentation schématique d'une coupe histologique du tube digestif. Ce schéma représentant les quatre couches principales de l'intestin grêle (en gras). La couche la plus externe est la séreuse suivie de la musculuse constituée d'une couche longitudinale externe et d'une couche circulaire interne. Vient ensuite la sous-muqueuse puis la muqueuse, couche la plus interne qui se compose des villosités intestinales.

L'estomac, situé dans la cavité abdominale, commence à l'embouchure de l'œsophage au niveau de l'orifice du cardia. Ce sphincter empêche les reflux gastriques vers l'œsophage. L'estomac est une poche en forme de J qui peut être divisée en trois parties : le fundus (partie supérieure), le corps et l'antrum, région inférieure qui est responsable des contractions musculaires qui acheminent le bol alimentaire vers le duodénum. Le passage entre l'estomac et le duodénum est délimité par un autre sphincter, nommé pylore. Celui-ci est fermé en dehors des périodes de repas.

Le rôle de l'estomac est de finaliser la transformation des aliments en chyme par des processus chimiques, biochimiques et mécaniques. Du fait de son anatomie, l'estomac possède une motricité très importante qui permet d'initier la digestion de protéines par un brassage du bol alimentaire. Sa musculature, constituée de trois couches, alterne des contractions régulières et irrégulières permettant le remplissage gastrique, le stockage et le brassage des aliments avec les sucs gastriques sécrétés par les cellules de la muqueuse (Boland, 2016). L'arrivée des aliments augmente l'activité nerveuse de la musculature qui induit des ondes segmentaires et péristaltiques de contraction qui s'amplifient de la région médiale à la région antrale jusqu'à former un anneau de contraction. Les deux courbures de l'estomac étant inégales, la progression de l'onde se fait de manière asymétrique, ce qui produit des mouvements de flux et de reflux, facilitant la transformation des aliments en chyme gastrique (mélange de consistance semi-liquide).

La sécrétion des sucs gastriques par les glandes exocrines de l'estomac est déclenchée par le contact des aliments avec la muqueuse et la distension gastrique, elle-même provoquée par l'arrivée du bol alimentaire. La régulation de ces sécrétions est assurée par le plexus nerveux, le système nerveux végétatif et des mécanismes hormonaux (Camilleri & Vazquez Roque, 2014).

La distension de l'estomac, induite par le volume de nourriture ingéré, active les fibres afférentes vagales mécano-sensibles avec des terminaisons nerveuses dans la sous-muqueuse et les couches musculaires lisses de la paroi gastrique, et donne lieu à une sensation de plénitude. Les composants chimiques du repas, en particulier les macronutriments, modulent les fonctions gastro-intestinales postprandiales, comme la vidange gastrique, la motilité gastro-intestinale et la libération d'hormones gastro-intestinales. Ces fonctions gastro-intestinales sont associées à des modifications de la perception de l'appétit. En effet, la distension progressive de la paroi gastrique, induit la satiété et agit comme un premier signal pour contrôler la taille du repas (Hajishafiee et al., 2019).

Le suc gastrique est très riche en acide chlorhydrique (HCl), sécrété par les cellules bordantes, et permet d'aseptiser le bol alimentaire en abaissant le pH gastrique entre 1 et 5, de dénaturer les protéines et d'activer le pepsinogène en pepsine, enzyme qui initie l'hydrolyse des protéines en peptides (Carip & Louet, 2004). Les sucs gastriques sont également composés de mucus qui permet de protéger la muqueuse de l'estomac de l'acidité, d'un facteur intrinsèque qui est une

glycoprotéine indispensable à l'absorption de la vitamine B12 et du pepsinogène, produit par les cellules principales (Camilleri & Vazquez Roque, 2014).

L'épithélium de l'estomac possède également une fonction de sécrétion endocrine assurée par ses cellules entéroendocrines. Elles sont notamment responsables de la sécrétion de gastrine (cellules G) qui permet la sécrétion d'HCl et la vidange gastrique.

Le bol alimentaire passe ensuite le pylore (orifice terminal de l'estomac) pour arriver dans l'intestin grêle.

3.1.2.1 L'intestin grêle

3.1.2.1.1 Le duodénum

Le duodénum est le premier segment de l'intestin grêle et est en forme de fer à cheval. Il peut se scinder en quatre parties : une partie supérieure appelée ampoule duodénale, située juste après le pylore, une partie descendante, une partie horizontale et une partie ascendante qui se termine sur le jéjunum. Le duodénum possède la même structure stratifiée que l'ensemble du tube digestif mais contrairement à l'estomac, sa muqueuse n'a pratiquement pas de fonction exocrine et le mucus produit par les glandes tubuleuses, dites de Brunner, est alcalin afin de neutraliser l'acidité du bol alimentaire arrivant de l'estomac. La muqueuse présente également des cellules entéroendocrines qui sécrètent des hormones telles que la cholécystokinine (CCK) qui stimule la production des sucs pancréatiques et biliaires et la sécrétine qui stimule la sécrétion de bicarbonate par le pancréas en réponse à l'acidité dans la lumière duodénale.

Le duodénum n'a pas de fonction de digestion propre mais il joue un rôle clé dans la digestion des protéines en permettant le contact du chyme gastrique préalablement digéré avec les sucs pancréatiques et biliaires qui se déversent dans la partie descendante du duodénum au niveau du sphincter d'Oddi (Carip & Louet, 2004). Le duodénum est également le premier site d'absorption du glucose (Shi et al., 2021).

a) Sécrétion pancréatique

Le suc pancréatique, excrété par la partie exocrine du pancréas dans le duodénum, est une solution aqueuse iso-osmotique et alcaline (pH entre 8 et 8,5 permettant de tamponner l'acidité de l'estomac). Le suc pancréatique est très riche en minéraux, notamment en bicarbonates, en

chlore, en sodium, en calcium et en enzymes glycolytiques (α -amylase), lipolytiques (lipase) et protéolytiques (voir ci-dessous).

Les peptides et protéines non digérées issus de l'estomac vont donc subir de nouvelles hydrolyses par plusieurs enzymes protéolytiques présentes dans le suc pancréatique telles que :

- ❖ **La trypsine**, enzyme la plus présente dans le suc, et qui est sécrétée sous forme de trypsinogène, activé par les entérokinases libérées par les cellules de la muqueuse duodénale en contact du chyme. La trypsine est une endopeptidase qui agit sur les liaisons peptidiques impliquant des acides aminés basiques (arginine et lysine) (Kunitz, 1939).
- ❖ **La chymotrypsine**, enzyme sécrétée sous forme de chymotrypsinogène activé par la trypsine et qui agit sur des liaisons peptidiques impliquant des acides aminés polaires comme la tyrosine, le tryptophane, la phénylalanine et la leucine.
- ❖ **L'élastase**, présente en très faible quantité sous forme active est une endopeptidase spécifique des liaisons peptidiques reliant des AA aliphatiques (glycine, alanine, valine, isoleucine).
- ❖ **Les di-peptidases**, enzymes les moins abondantes du suc pancréatique, scindent les peptides par leur coté NH_2 terminal.

La sécrétion du suc pancréatique est induite par les stimulations nerveuses déclenchées par le goût et la vue des aliments, par la gastrine et les réflexes « courts » de la paroi gastrique et principalement par l'acidité du chyme arrivant dans le duodénum. La sécrétion de CCK par les cellules I du duodénum et la sécrétion de sécrétine par les cellules S contribuent également à l'arrivée du suc pancréatique dans l'intestin (Santos-Hernández et al., 2018a).

b) Sécrétion biliaire

Le suc biliaire est excrété par le foie et fournit des molécules hépatiques comme des protéines, du cholestérol ou encore des hormones stéroïdes et des sels biliaires qui permettent l'émulsion des graisses présentes dans l'intestin pour faciliter leur transport et leur absorption (Esteller, 2008). Les sécrétions biliaires sont déclenchées par l'arrivée des graisses dans le duodénum qui engendre un réflexe neuro-humoral à l'origine des contractions de la vésicule biliaire (Carip & Louet, 2004).

3.1.2.1.2 Jéjunum et iléon

Le jéjunum et l'iléon, comme le duodénum, sont des segments intestinaux responsables de l'absorption des nutriments et participent à la dernière étape de l'hydrolyse des peptides si l'on exclue celle réalisée par les microorganismes constituant le microbiote intestinal. Afin d'assurer l'absorption des nutriments, et en particulier ici des peptides et AA, le jéjunum et l'iléon possèdent une fonction de digestion assurée par les sécrétions intestinales, biliaires et pancréatiques et par les enzymes de la bordure en brosse des entérocytes. Les réactions de catalyse au niveau des entérocytes sont quasiment simultanées à l'absorption des nutriments. L'épithélium de cette partie du tube digestif comprend d'une part des glandes de Lieberkühn qui sécrètent du suc intestinal composé de mucus, de grandes quantités d'eau et d'électrolytes et d'autre part des cellules de Paneth qui sécrètent du lysozyme et des peptidases proches de la trypsine pancréatique (Carip & Louet, 2004).

Le processus final de digestion s'effectue principalement grâce aux enzymes présentes sur la bordure en brosse des cellules épithéliales du jéjunum et de l'iléon. De nombreuses enzymes telles que des peptidases, des disaccharidases et des lipases coupent les molécules alimentaires complexes en molécules absorbables par l'entérocyte. En ce qui concerne la digestion des protéines, elle se termine au niveau de la bordure en brosse des entérocytes où sont présentes des peptidases telles que les aminopeptidases N, A, P, W, les endopeptidases-24 et 2, la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et la carboxypeptidase P (Caron, 2016). Les peptidases les plus actives sont l'aminopeptidase neutre et la DPP-IV qui vont produire un mélange d'acides aminés (60 %) et de di- et tripeptides (40 %) (Lecleire, 2008).

3.1.2.2 Le colon

Le colon appartient au gros intestin et comprend le caecum qui fait la jonction avec l'iléon par la valve iléo-caecale, le colon et le rectum qui se termine par l'anus.

Le colon contrairement à l'intestin grêle n'a plus de fonction d'absorption des nutriments. Les peptides ou AA restants vont passer dans le colon où ils pourront être métabolisés par la flore colique. Ils ne pourront plus être directement utilisés par l'organisme car le colon ne peut pas absorber d'AA en quantité nutritionnellement significative (Van der Wielen, Moughan, et Mensink 2017). La muqueuse colique ne présente plus de villosités et son épithélium en plateau

strié est moins prononcé que celui de l'intestin. Le colon est colonisé par des micro-organismes, estimés à environ 10^{14} cellules chez l'homme adulte. Cette flore colique va permettre une utilisation des AA issus de l'alimentation ou des pertes endogènes pour synthétiser de nouvelles protéines ou des AAI *de novo*. Les AA, ou peptides non absorbés au niveau iléal ne se retrouvent pas nécessairement dans les fèces car ils sont transformés (via des transaminations pour les AA par exemple) par la flore colique (Lin et al. 2017). En effet une grande partie des peptides entrant dans le colon va être dégradée en acides aminés par des peptidases bactériennes pour la synthèse de protéines ou pour subir une fermentation qui aboutira à la formation d'acides gras à chaîne courte (AGCC), de gaz ou des métabolites azotés (R. Lin et al., 2017). La dégradation bactérienne des acides aminés aromatiques dans la lumière colique entraîne la production de composés phénoliques et indoliques tel que le 4-hydroxyphénylpyruvate, le 4-hydroxyphényllactate, phénylpyruvate etc. Il est estimé qu'environ 2/3 de l'azote retrouvé dans les fèces serait la conséquence du microbiote colique (Moughan, 2003).

3.2 Digestibilité et biodisponibilité des protéines

La digestibilité d'une protéine décrit la part de cette protéine qui est absorbée par le tractus gastro-intestinal. C'est une part importante de l'évaluation de la qualité d'une protéine. La digestibilité d'une protéine se fait en mesurant la quantité d'azote ou d'AA retrouvée au niveau fécal ou iléal, sachant que la digestibilité iléale est plus recommandée. Il est supposé que la quantité d'AA disparue a été absorbée (Moughan & Wolfe, 2019). La digestibilité d'une protéine s'exprime en pourcentage d'azote ingéré selon la formule suivante :

$$\text{Digestibilité (\%)} = \frac{\text{azote ingéré} - \text{azote digéré}}{\text{azote ingéré}} \times 100$$

La mesure de la digestibilité réelle d'une protéine prend en compte les pertes azotées endogènes de l'intestin grêle et s'obtient en corrigeant la digestibilité apparente avec l'intégration des pertes endogènes à l'équation précédente (Rowan et al., 1994).

La digestibilité des protéines n'est pas la même suivant leur origine. La **Tableau 4** présente la digestibilité iléale de certaines protéines :

Tableau 4: Digestibilité iléale réelle de différentes protéines chez l'Homme.

Origine des protéines	Digestibilité iléale	Méthode de détermination	Référence
Poulet	92,0 ± 2,8 %	Isotope marquage ¹³ C	(Kashyap et al., 2018)
Œuf	86,3 ± 4.6 %	Isotope marquage ¹³ C	(Kashyap et al., 2018)
Boeuf	89,6 ± 0,5 %	Ileostomie	(Silvester et als 1995)
Protéines de pois	93,6 ± 2,9 %	Isotope marquage ¹⁵ N	(Guillin et al., 2022)
Caséines	96,8 ± 1,0 %	Isotope marquage ¹⁵ N	(Guillin et al., 2022)
Protéines de lactosérum	91.2 ± 2.6 %	Sonde naso-iléale	(Calvez et al., 2021)
Zéine (maïs)	60.2 ± 4.5 %	Sonde naso-iléale	(Calvez et al., 2021)

Il est considéré que les protéines de sources animales présentent une meilleure digestibilité que la plupart des protéines végétales (Mariotti, 2017; Mathai et al., 2017). Ceci peut s'expliquer par la présence de facteurs antinutritionnels, associés aux protéines végétales, qui entravent le fonctionnement des enzymes protéolytiques et donc l'hydrolyse des protéines (Sarwar Gilani et al., 2012). Néanmoins, les protéines issues de légumineuses ont démontré une bonne digestibilité chez l'Homme, le porc ou le rat (Boutry et al., 2011; Gausserès et al., 1997; Grala et al., 1999), en particulier lorsqu'elles sont consommées sous une forme purifiée, telle que de la poudre protéinée, concentrée, ou isolée. L'équipe de Guillin et al, en comparant la digestibilité iléale des protéines purifiées de pois et de caséine (**Tableau 4**), ont montré que les caséines semblaient avoir une cinétique de digestion plus lente (retardée d'une heure) comparée aux protéines de pois mais que ceci n'avait aucun impact significatif sur la digestibilité (Guillin et al. 2022). Néanmoins, des études similaires ont évalué une digestibilité plus faible pour le pois (Gausserès et al., 1997). La protéine de maïs, la zéine, illustre bien les différences de digestibilité entre les protéines. Calvez et al. suggèrent que la structure hydrophobe et insoluble de la zéine pourrait participer à sa faible digestibilité puisque les protéases, qui fonctionnent dans des environnements aqueux, sont alors moins efficaces (Calvez et al., 2021).

L'exemple des protéines de lait permet d'illustrer l'importance de cette digestibilité. Les protéines de lactosérum et caséines présentent toutes deux une très bonne digestibilité, néanmoins les protéines de lactosérum étant plus solubles, elles sont plus rapidement digérées

et absorbées que les caséines. Après ingestion de protéines de lactosérum, les acides aminés sont disponibles dans les 20 à 30 min ce qui permet leur utilisation rapide en grande quantité contrairement aux caséines qui coagulent dans l'estomac et retardent la vidange gastrique (Dalziel et al., 2017) conduisant à une apparition d'AA dans le sang moins rapide et en quantité plus diffuse durant 1 à 2h après leur consommation (Boirie et al. 1997; Hall et al. 2003).

Néanmoins, l'effet d'une protéine est difficile à évaluer car en condition de prise alimentaire physiologique, la protéine est consommée dans une matrice alimentaire complexe (fibre, acide gras, glucide, protéines d'autres sources...) et sous différentes formes (solide, liquide, hachée...). Tous ces paramètres peuvent influencer la durée du transit intestinal en accélérant ou ralentissant la digestion, ou encore en améliorant ou diminuant l'absorption des AA (Desai et al., 2019; Paddon-Jones et al., 2015; Pennings et al., 2013).

La rapidité d'une protéine alimentaire à être assimilée influence l'anabolisme des protéines indépendamment de leur composition en AA. Les protéines à digestion rapide optimisent la stimulation de la synthèse protéique et améliorent la fonction musculaire chez les personnes âgées (Boirie & Guillet, 2018).

3.3 L'absorption des nutriment issus de la digestion des protéines

3.4.1 Généralités sur l'absorption intestinale

L'absorption est le phénomène qui permet le passage des nutriments à travers la barrière intestinale vers le sang et le système lymphatique afin d'être utilisés par l'organisme.

Comme vu précédemment, les nutriments vont être absorbés au niveau de l'intestin grêle, du duodénum jusqu'à la partie terminale de l'iléon par les entérocytes. A ce niveau, la paroi intestinale forme de nombreux replis appelés villosités intestinales (**Figure 9**). Ces dernières permettent d'augmenter la surface de contact entre les nutriments et les entérocytes, cellules responsables de l'absorption des nutriments (J. Campbell et al., 2019).

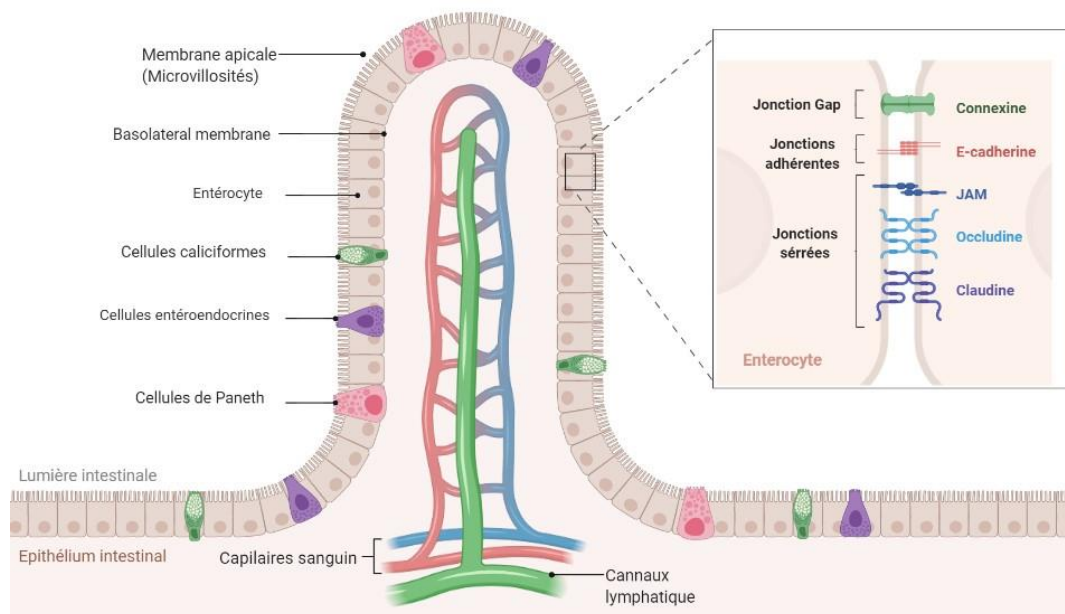


Figure 9: Schéma d'une villosité de la barrière intestinale avec les différentes cellules épithéliales.

Une villosité s'organise avec les entérocytes, responsable de l'absorption des nutriments ; les cellules entéroendocrines qui sécrètent des hormones intestinales, les cellules caliciformes qui produisent du mucus et les cellules de Paneth qui participent à la défense immunitaire. Ces cellules qui forment la barrière intestinale sont liées entre elles par des protéines formant des gap junctions, des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. La partie interne des microvillosités est richement vascularisée par des voies sanguine et lymphatique facilitant l'absorption des nutriments.

L'absorption des nutriments est déterminée par des variables physiologiques, biochimiques, et physicochimiques (Dressman et al., 1993). Les principaux facteurs qui influencent l'absorption sont le pH, le flux sanguin (Bohlen, 1980), la motilité gastro-intestinale, la perméabilité de la barrière gastro-intestinale, et la composition du bol alimentaire (interaction entre les composés) (Stillhart et al., 2020). Il a été montré qu'une inhibition de la motilité intestinale, « iléus postopératoire » chez le rat (Bueno et al., 1978), réduit le mélange efficace du bol alimentaire et modifie le temps de transit des nutriments le long de l'intestin et donc limite l'absorption. La motilité intestinale est positivement corrélée à l'absorption (Sababi & Bengtsson, 2001). Les ondes segmentaires et péristaltiques forment une activité pendulaire qui conduit à un écoulement tourbillonnaire régulier des nutriments dans la lumière intestinale, ce qui favorise le contact des nutriments avec les entérocytes (Y. Zhang et al., 2020).

Les entérocytes sont des cellules prismatiques polarisées avec un pôle apical du côté de la lumière du tube digestif caractérisé par la présence de microvillosités (replis de la membrane cellulaire) et un pôle basal. Ces cellules sont reliées entre elles latéralement par des jonctions

serrées ou « tight junctions » (TJs), des desmosomes et des jonctions de type *zonula adherens* qui garantissent l'intégrité du tissu, le maintien de la forme cellulaire et l'absorption de l'eau et d'électrolytes. Ces jonctions permettent de moduler le passage paracellulaire des molécules. Les entérocytes assurent également le passage des nutriments par une multitude de transporteurs présents à la surface du pôle apical (Rasoamanana et al., 2012)

L'absorption commence dans l'intestin grêle du duodénum jusqu'à la fin de l'iléon. La barrière intestinale à ce niveau est plutôt adaptée à l'absorption car elle forme des replis de 0,5 à 1 mm nommés villosités qui permettent de multiplier par 10 la surface intestinale. Les cellules de l'épithélium intestinal sont disposées en une seule couche de cellules qui présentent des jonctions intercellulaires spéciales qui délimitent les deux domaines de la membrane : le domaine apical en regard du milieu extérieur et le domaine basal en contact avec le milieu intérieur. Les cellules intestinales sont composées : d'entérocytes (90%), cellules les plus nombreuses et qui sont responsables de l'absorption ; de cellules caliciformes qui produisent du mucus ; de cellules entéroendocrines (< 1%) qui sécrètent des hormones digestives et des cellules de Paneth qui sécrètent du lysozyme (peptidases) dans le but de lyser la paroi des bactéries. Ces dernières appartiennent au système immunitaire (**Figure 9**).

3.4.2 Absorption des AA libres

Tous les AA alimentaires peuvent être absorbés par les entérocytes. Leurs voies d'absorption ne sont pas encore toutes connues. En revanche, on sait que les transporteurs d'acides aminés ont les propriétés suivantes : une stéréospécificité (les L-acides aminés sont transportés préférentiellement) ; une large spécificité de substrats (chaque transporteur absorbe différents acides aminés) et une spécificité de chevauchement (un même AA peut avoir accès à différents transporteurs) (Goodman, 2010). Le système de transport des acides aminés fait intervenir des co-transporteurs comme Na^+ , K^+ et Cl^- situés au niveau de la membrane apicale et spécifiques de certains AA. Il existe donc des co-transporteurs neutres spécifiques des acides aminés aromatiques et aliphatiques et des co-transporteurs spécifiques des acides aminés basiques et acides. Ces co-transporteurs dépendent d'un gradient de Na^+ , K^+ , et Cl^- , maintenu par une pompe Na^+/K^+ ATPase au pôle basal (Rérat, 1981). Une fois que les acides aminés ont pénétré dans l'entérocyte, ils traversent le pôle basolatéral par voie passive (**Figure 10**). L'absorption des acides aminés est un phénomène consommateur en énergie.

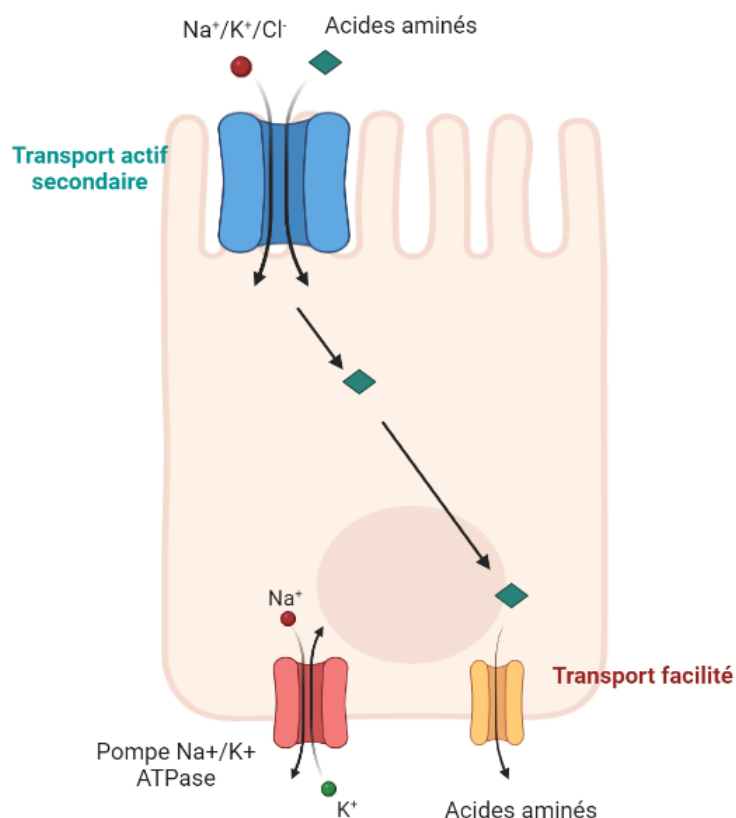


Figure 10: Absorption des acides aminés par transport spécifique. Les acides aminés traversent le pôle apical grâce à des co-transporteurs Na^+ , K^+ et Cl^- , le gradient de concentration est maintenu par une pompe Na^+/K^+ ATPase au pôle basal. Ils traversent ensuite le pôle basolatéral par voie passive.

3.4.3 Absorption des peptides

En fin de digestion, il ne reste qu'un mélange d'acides aminés et de peptides entre 2 et 20 acides aminés (Xu et al., 2019). L'absorption des peptides à travers la barrière intestinale s'opère alors de plusieurs manières : par l'intermédiaire d'un transporteur comme le peptide transporteur 1 (PepT1), par exemple, par transport paracellulaire via les jonctions serrées, par diffusion passive au travers de l'entérocyte et enfin par transcytose (Xu et al., 2019). Ces différentes voies de passage sont représentées dans la **Figure 11** ci-dessous.

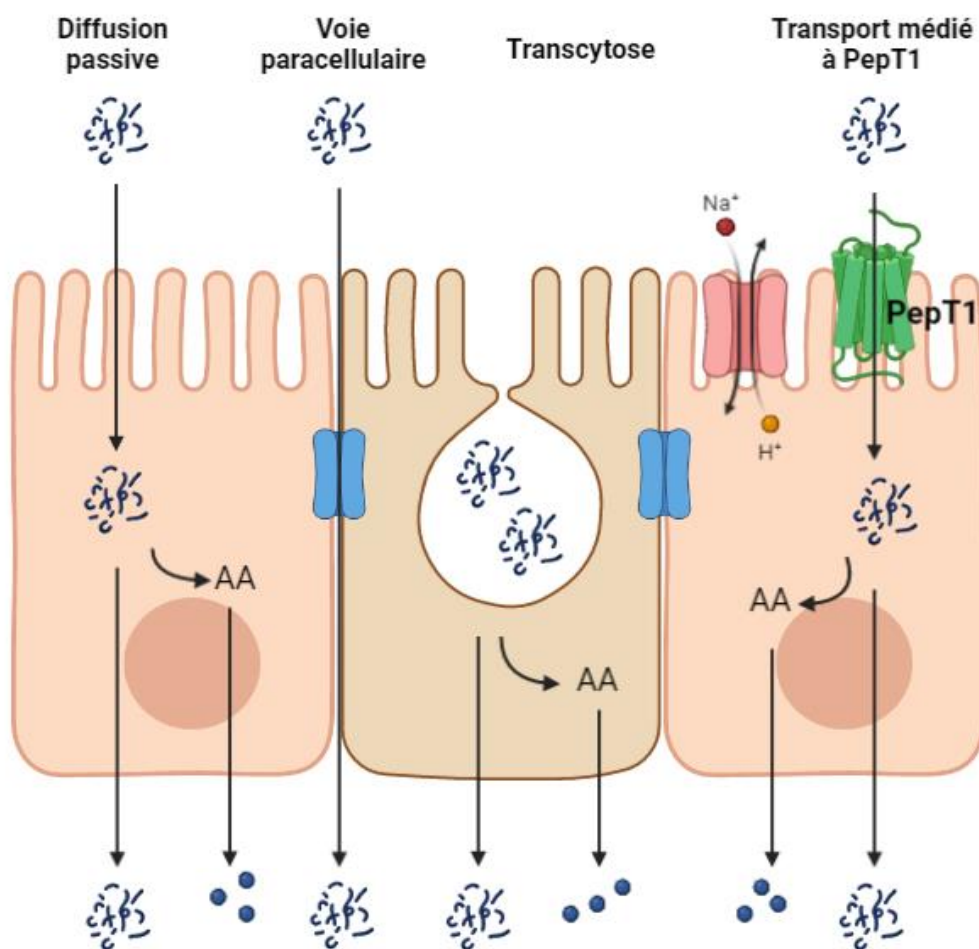


Figure 11: Les différentes voies de passage des peptides à travers l'épithélium gastro-intestinal. La diffusion passive permet aux peptides de traverser les entérocytes suivant leurs propriétés via les co-transporteurs Na^+ , K^+ et Cl^- ; la voie paracellulaire favorise le passage des peptides à travers les jonctions serrées qui module la perméabilité de la barrière intestinale ; la transcytose permet le transport des peptides via la formation d'une vésicule et le dernier mécanisme de passage des peptides fait intervenir le transporteur PepT1. Dans les entérocytes, les peptides peuvent être hydrolysés en acides aminés.

3.4.3.1 Passage médié par le transporteur *PepT1*

PepT1 est un transporteur de grande capacité et de faible affinité qui transporte activement certains peptides du pôle apical au pôle basolatéral des cellules épithéliales sur la base d'un gradient de protons maintenu par l'échangeur H^+/Na^+ (Xu et al., 2019). PepT1 se lie préférentiellement aux peptides avec des chaînes courtes (des dipeptides et des tripeptides), une charge neutre et une hydrophobie élevée (Vig et al., 2006). Il a été montré dans une étude chez la souris que l'inactivation du gène codant pour le transporteur PepT1 réduisait considérablement le transport des dipeptides dans l'intestin de la souris après gavage gastrique (de 50 %) et par voie orale (de 80 %) (Hu et al., 2008). La déficience en PepT1 chez les

mammifères altère l'absorption des nutriments et provoque une malabsorption qui devient symptomatique lorsque l'alimentation est trop riche en protéines et en graisses (Daniel & Zietek, 2015). Le transporteur PepT1 peut être régulé au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel par des dipeptides issus de protéines alimentaires, par une stimulation directe du gène PepT1 (Adibi, 2003; Shiraga et al., 1999).

3.4.3.2 Transport paracellulaire

Le transport paracellulaire est un processus de diffusion passif indépendant de l'énergie et médié par les TJs. Ces jonctions sont constituées de différentes protéines telles que zonula occludens-1, occludin et les claudines. Elles garantissent l'intégrité de la barrière intestinale et le passage sélectif de quelques molécules. Elles transportent préférentiellement des oligopeptides hydrophiles à charge nette négative (Aluko, 2015; Matsui, 2018). La diffusion des peptides par voie paracellulaire dépend principalement des TJs et des protéines qui les constituent. Néanmoins, la taille des peptides est déterminante puisque le diamètre des pores formés par les TJs sont de 5 à 6 nm dans les cryptes et de 0,4 à 0,9 nm dans les villosités de la membrane intestinale (Miner-Williams et al., 2014). Les TJs des monocouches de cellules Caco-2 contiennent un grand nombre de pores d'un diamètre de 1,2 à 2,1 nm (Linnankoski et al., 2010; Shimizu et al., 1997), ce qui indique que seuls des peptides inférieurs à une vingtaine d'AA peuvent être transportés. De ce fait, le passage des plus petits peptides (di-/tripeptides) est facilité par rapport aux oligopeptides (Shen & Matsui, 2017). De plus, le transport par voie paracellulaire permet aux peptides d'éviter la dégradation par les peptidases intracellulaires (Brandsch et al., 2010; Shimizu, 2004; Wada & Lønnerdal, 2014).

3.4.3.3 La transcytose

La transcytose est une voie de transport transcellulaire dépendante de l'énergie, qui favorise le transport des peptides à longue chaîne et à forte hydrophobie. Au cours du processus de transcytose, les peptides interagissent d'abord avec la bicouche lipidique apicale de l'épithélium intestinal par interaction hydrophobe avant d'être internalisés dans les cellules (Xu et al., 2019).

3.4.3.4 La diffusion transcellulaire passive

La diffusion transcellulaire passive des peptides correspond à l'absorption passive des peptides dans les cellules, le transport intracellulaire et la sécrétion basolatérale, qui tend à transporter préférentiellement les peptides hydrophobes (Miguel et al. 2008 ; Pappenheimer et Michel 2003). Néanmoins, les médiateurs impliqués dans le transport des peptides par cette voie n'ont pas été identifiés. Les peptides transportés avec succès peuvent être partiellement hydrolysés en fragments peptidiques et acides aminés plus petits par des peptidases à l'intérieur des cellules intestinales et de la circulation sanguine.

La compréhension actuelle des mécanismes de transport et de la biodisponibilité des peptides n'est pas complète, par rapport à leurs homologues médicamenteux rationnellement conçus (Sun et al., 2020). Par exemple, les couches de mucus agissent comme des barrières protectrices pour couvrir l'épithélium intestinal. Elles peuvent être divisées en couches de mucus externe (mucus lâche) et interne (mucus ferme) (Netsomboon & Bernkop-Schnürch, 2016). À ce jour, le processus par lequel les peptides d'origine alimentaire consommés par voie orale pénètrent dans les couches de mucus et atteignent l'épithélium sous-jacent n'est pas clairement défini. De plus, ce facteur n'est souvent pas pris en compte dans le modèle cellulaire Caco-2 actuellement utilisé pour évaluer le transport intestinal des peptides dérivés de protéines alimentaires.

La digestion des protéines libère des AA libres et des peptides bioactifs qui vont être reconnus par des récepteurs présents au niveau des cellules épithéliales. Ce mécanisme de reconnaissance, appelé « sensing intestinal » va être à l'origine de réactions en cascade impliquées dans les mécanismes de régulation de l'homéostasie glucidique et de la prise alimentaire.

4. Implication des protéines dans la régulation de l'homéostasie énergétique

4.1 L'homéostasie énergétique

La notion d'homéostasie, énoncée par Claude Bernard en 1865, se définit comme la capacité d'un système vital à maintenir en équilibre l'ensemble des paramètres devant rester constants ou s'adapter à des besoins spécifiques pour assurer les processus biologiques de la vie, quelques soient les contraintes extérieures. Dans le cas de l'homéostasie énergétique, ceci représente la capacité de l'organisme à mettre en jeu des mécanismes de régulation qui assurent un état d'équilibre entre les apports énergétiques fournis par la prise alimentaire (glucide, lipides et protéines) et les dépenses énergétiques, et ceci pour maintenir un poids corporel stable (Havel, 2001).

Cet équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques garantit une stabilité du poids corporel, de la masse maigre et de la masse grasse, suffisantes sur le long terme (Couvreur, 2011; Luquet, 2008). En effet, il est essentiel que l'organisme puisse conserver de l'énergie pour en avoir toujours à disposition si nécessaire, cette dernière étant majoritairement stockée sous forme de triglycérides dans les adipocytes, ou sous forme de glycogène dans le foie et les muscles. Ainsi, afin que l'organisme parvienne à maintenir un niveau de réserve énergétique stable, un contrôle très rigoureux de la prise alimentaire va être mis en place.

La prise alimentaire est un comportement physiologique vital, finement régulé par un système neuro-hormonal qui est initié par une sensation de faim générée par le système nerveux central (SNC) en réponse à un ensemble de stimuli venant du milieu intérieur renseignant sur les besoins de l'organisme en énergie (Cifuentes & Acosta, 2021; Waterson & Horvath, 2015).

La régulation de l'homéostasie énergétique se fait principalement par un contrôle de la prise alimentaire, le contrôle des dépenses énergétiques étant beaucoup moins efficaces.

Les dépenses énergétiques de l'organisme sont la résultante du métabolisme basal, de la thermogénèse induite par la digestion, et des dépenses énergétiques liées à l'activité physique. Le métabolisme basal ou encore appelé métabolisme de repos correspond à l'énergie consommée quotidiennement pour assurer les fonctions vitales de l'organisme telles que les fonctions cardiaque et cérébrale, la respiration ou encore la thermogénèse, et ce lorsque l'organisme est au repos. La dépense énergétique totale comprend le métabolisme basal qui est

positivement corrélé à la masse maigre et la dépense énergétique associée à l'activité physique qui représente généralement entre 65 % et 75 % de la dépense énergétique totale, bien que cette dépense énergétique soit relativement variable (Westerterp-Plantenga et al, 2008). Les dépenses associées au métabolisme de repos sont relativement stables d'un jour à l'autre, seule une variation de la quantité de masse musculaire peut influencer significativement la dépense énergétique totale (Wolfe, 2006).

La prise alimentaire incite à consommer des aliments afin d'absorber des nutriments qui vont être une source d'énergie utilisable par l'organisme. Ce mécanisme est finement régulé d'une part, par des facteurs homéostatiques tels que les variations du statut nutritionnel et des réserves énergétiques de l'organisme et d'autre part par des facteurs non homéostatiques comme l'aspect hédonique de la nourriture, ou encore des aspects environnementaux et sociétaux (Flores et al., 2013). Chez l'Homme, le contrôle homéostatique de l'appétit se fait à l'aide d'une série de processus physiologiques : la faim qui initie la prise alimentaire ; la satiété qui stoppe l'envie de manger grâce à une sensation de plénitude et la satiété qui supprime la sensation de faim entre les repas. La satiété est une période interprandiale dans laquelle ne dominent ni la sensation de faim, ni la sensation de plénitude. L'initiation des repas résulte ainsi d'une diminution de la satiété et d'une augmentation de la faim pendant la période interprandiale.

4.2 Régulation de la prise alimentaire

La régulation de la prise alimentaire se fait grâce un axe de communication entre l'intestin et le cerveau. Pour être plus précis, cette régulation se fait grâce à des signaux d'origines nerveuses ou métaboliques issus d'organes du tractus digestif qui sont intégrés par des neurones au niveau cérébral (Serrano et al. 2016 ; Timper et Brüning 2017).

Une part importante de cette régulation a lieu au niveau cérébral grâce au système nerveux central (SNC) représenté dans la **Figure 12**. Il se compose de la moelle épinière et de l'encéphale comprenant lui-même le tronc cérébral, le cervelet et le cerveau. L'ensemble du SNC est protégé par la colonne vertébrale et la boîte crânienne.

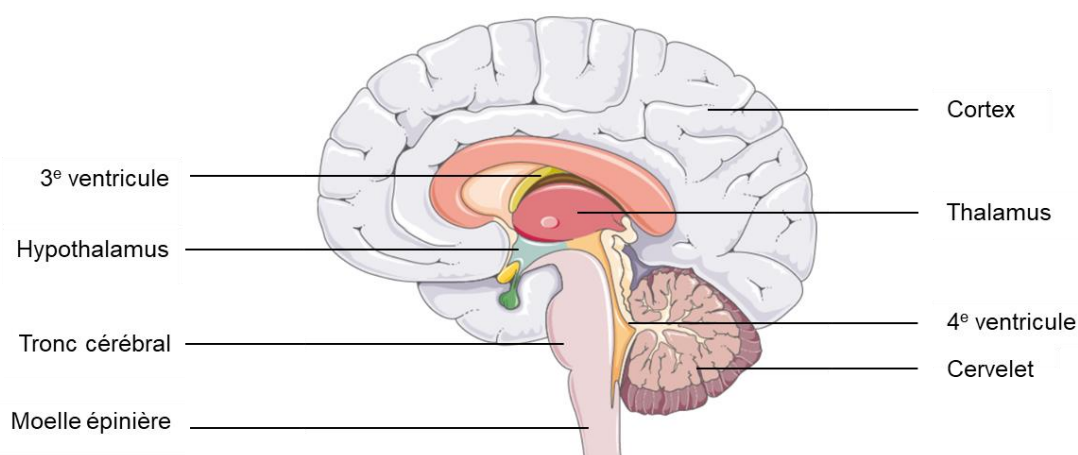


Figure 12: Schéma anatomique du système nerveux central. Localisé au niveau cérébral, il se compose de la moelle épinière et de l'encéphale comprenant lui-même le tronc cérébral, le cervelet et le cerveau. L'ensemble du SNC est protégé par la colonne vertébrale et la boîte crânienne.

Le SNC centralise tous les signaux périphériques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique et les coordonne pour influencer la prise alimentaire. Il reçoit et intègre des signaux périphériques d'origines mécanique, hormonale et neuronale et génère une réponse adaptée en stimulant ou inhibant la prise alimentaire grâce à un message de faim ou de satiété (Caron, 2016; Guerville, 2017; Hussain & Bloom, 2013). Les signaux de faim sont puissants car ils visent à reconstituer les réserves énergétiques sous forme de glycogène dans le foie et les muscles et sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux, réserves indispensables à notre survie. La régulation centrale de la prise alimentaire nécessite l'intégration de nombreux signaux provenant de la périphérie qui renseignent sur le statut de plusieurs organes essentiels à l'absorption, au stockage de l'énergie ou encore liés à la consommation d'énergie.

La prise alimentaire est régulée à court terme par des signaux mécaniques et hormonaux issus du tractus digestif produits en réaction à la prise d'un aliment ou à l'ingestion d'un repas et à long terme par des signaux hormonaux sécrétés par des organes de stockage (tissu adipeux et foie) ou relatifs à la glycémie. Les signaux à court terme visent à apporter de l'énergie en quantité juste nécessaire en stoppant la prise alimentaire, en limitant les quantités consommées et en retardant la prochaine prise alimentaire (Hussain & Bloom, 2013) tandis que les signaux à long terme permettent de conserver un poids corporel stable et des réserves d'énergie satisfaisantes.

Plus récemment, il a été mis en évidence que les mécanismes de régulation de l'homéostasie énergétique à long terme et court terme fonctionnaient de concert afin d'assurer une balance

énergétique toujours positive. Les signaux à court terme, issus du tractus digestif influencent fortement la régulation à long terme de la prise alimentaire au niveau périphérique. La **Figure 13** schématise l'ensemble des acteurs de cette régulation périphérique de la prise alimentaire.

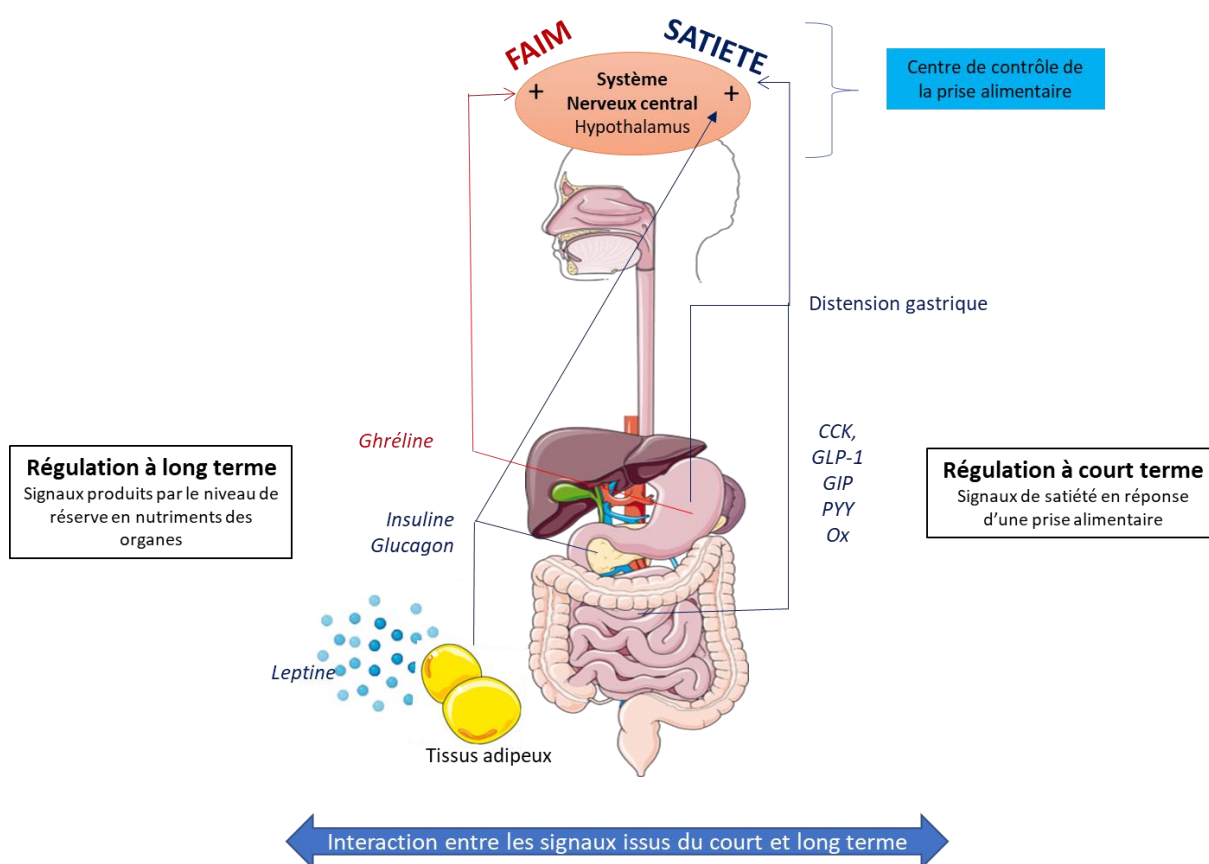


Figure 13: Schéma de la régulation périphérique de la prise alimentaire comprenant les signaux de la régulation à court et long terme. La régulation à court terme concerne les signaux de satiété mis en place directement après l'ingestion d'un repas ou d'un aliment. La régulation à long terme concerne les signaux reflétant les réserves énergétiques de l'organisme (glycogène, triglycérides). Les flèches rouges représentent les connexions qui stimulent la prise alimentaire (+), tandis que les bleues représentent les connexions qui l'inhibent (-). CCK, cholécystokinine ; GLP-1, glucagon-like peptide-1 ; GIP, peptide insulino-trope dépendant du glucose ; PYY, peptide YY ; Ox, oxyntomoduline.

Il a été mis en évidence, que les hormones gastro-intestinales impliquées dans la régulation à court terme agissaient en synergie ou en compétition avec les hormones de la régulation à long terme, pour potentialiser leur action sur la prise alimentaire ou au contraire affiner leur régulation sur la balance énergétique. Par exemple, au niveau hypothalamique, la leptine et l'insuline amélioraient la sensibilité centrale à l'entrée de signaux de satiété périphériques à courte durée d'action, tels que la CCK (Cummings & Overduin, 2007). L'action des hormones

de la régulation à long terme, dont le rôle principal est de maintenir un poids stable et/ou une glycémie constante, est plus faible que celle des hormones de la régulation à court terme mais plus durable dans le temps. Leurs actions sont complémentaires. La **Figure 14** schématise ses interactions entre ses différentes hormones.

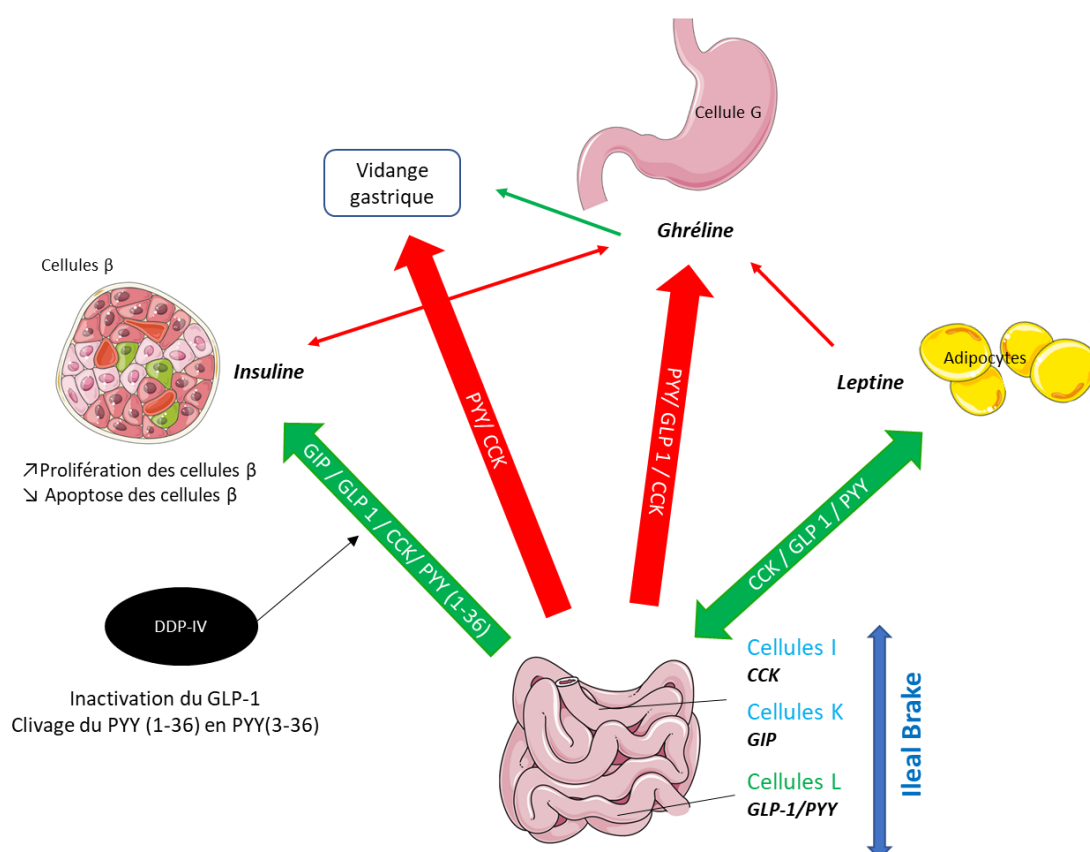


Figure 14: Interactions entre les hormones de la régulation périphérique de la prise alimentaire à court et long terme. Les flèches vertes représentent un effet stimulateur et les flèches rouges représentent un effet inhibiteur. La double flèche bleue, schématise la rétro-stimulation endocrinienne des cellules iléales vers les cellules de l'intestin proximal. Les hormones gastro-intestinales vont stimuler la sécrétion de leptine au niveau des adipocytes, la sécrétion d'insuline au niveau des cellules β -pancréatiques et inhiber la sécrétion de ghréline au niveau des cellules G de l'estomac. La DPP-IV inactive le GLP-1 qui perd ses fonctions anorexigènes et pancréatiques et modifie l'activité du PYY en clivant le PYY (1-36), qui stimule les fonctions pancréatiques en PYY (3-36) qui possède une action anorexigène. CCK, cholécystokinine ; GLP-1, glucagon-like peptide-1 ; GIP, peptide insulino-trope dépendant du glucose ; PYY, peptide YY ; DPP-IV, dipeptidyl peptidase-4.

Les récepteurs de ces différentes hormones, anorexigènes tels que la CCK et la leptine, ainsi qu'orexigènes, tels que la ghréline sont généralement colocalisées sur les fibres vagues afférentes du tractus gastro-intestinal (Burdyga et al., 2006). Ces récepteurs sont régulés de manière adaptative par des altérations de l'état nutritionnel, et ils interagissent les uns avec les

autres de manière coordonnée et logique. Par exemple, les récepteurs de la ghréline et de la famille des CCK sont co-exprimés sur les neurones afférents vagues, et ces deux ligands exercent des effets antagonistes sur les décharges afférentes vagues (Date et al., 2002). De même, les peptides intestinaux cataboliques ont tendance à supprimer la sécrétion des peptides intestinaux anabolisants et vice versa (Burdyga et al., 2006). Ces observations suggèrent que les hormones gastro-intestinales agissent de manière coordonnée, démentant leur distribution anatomique diffuse. De plus, les altérations de l'état nutritionnel influencent la signalisation de la satiété dans l'axe intestin-cerveau en recalibrant la sensibilité vagale aux signaux gastro-intestinaux.

4.3 Impact de l'ingestion des protéines dans la régulation de la prise alimentaire

L'effet satiétogène des protéines a été mis en évidence grâce à des recherches sur la composition optimale en macronutriments dans le cadre de régimes amaigrissants. Pour cela, deux types d'études ont été réalisées :

Le premier type a consisté à tester des régimes alimentaires restrictifs où les proportions en différents macronutriments varient par rapport à un groupe contrôle isocalorique. Dans le cadre de ces expériences, une perte de poids significative a été observée pour tous les régimes testés, mais aucune différence n'a été attribuée au régime, suggérant que la perte de poids n'était pas due à la composition en macronutriments mais à la restriction calorique (Layman et al., 2003; Noakes et al., 2005).

L'étude de Sacks et al. (2009) illustre parfaitement cet effet. Les auteurs ont testé quatre régimes isocaloriques de composition variable en macronutriments sur 811 individus en surpoids pendant 2 ans. La teneur énergétique en pourcentage issue des glucides, protéines et lipides de ces régimes était respectivement de : 65/15/20 ; 55/25/20 ; 45/15/40 et 35/25/40. A l'issue de cette étude, les individus ont tous perdu en moyenne 10 % de leur poids initial mais aucune différence significative en termes de perte de poids entre les groupes n'a pu être observée. Cependant, ce postulat est très contesté car n'a pas été démontré de manière systématique. D'autres études ont quant à elles montré une perte de poids significative entre les régimes riches en protéines et les régimes standards (Wycherley et al., 2012). Toutefois, il existe un consensus sur l'effet bénéfique des régimes riches en protéines sur l'optimisation de la composition

corporelle qui se manifeste par une amélioration du ratio perte de gras / perte de masse maigre. Les régimes riches en protéines permettent une meilleure utilisation des tissus gras tout en préservant la masse maigre grâce au maintien d'un bilan azoté positif qui stimule la synthèse protéique (Leidy et al., 2015; Westerterp-Plantenga et al., 2012). A long terme, ces régimes permettent de maintenir un métabolisme basal plus élevé ce qui facilite la perte de poids.

Le deuxième type d'études réalisé a consisté à comparer l'effet d'un régime riche en protéines à un régime normo-protéique en condition « *ad libitum* » sur la perte de poids. Dans toutes les études de ce genre, les régimes hyperprotéinés ont engendré une perte de poids significativement plus forte (Due et al., 2004; Neacsu et al., 2014b; Schiavo et al., 2017a; Skov et al., 1999; Weigle et al., 2005a). Cet effet sur la perte de poids peut s'expliquer par l'effet satiétogène des protéines.

L'ensemble des mécanismes par lesquels les protéines induisent une diminution de la prise alimentaire est décrit ci-après.

4.3.1 Effet du taux circulant d'acides aminés au niveau du SNC sur l'homéostasie énergétique

Un des mécanismes par lequel les protéines induisent la satiété est l'augmentation de la concentration plasmatique en AA après l'ingestion de protéines. En effet, les AA ne servant pas à la synthèse de nouvelles protéines vont pouvoir agir comme signal de satiété au niveau du système nerveux central (Potier et al., 2009a). Il est connu que le cerveau a la capacité de détecter des changements de concentration plasmatique en AA, car un déficit modifie le comportement alimentaire et diminue la durée du repas (Koehnle et al., 2003).

La concentration plasmatique en acides aminés est détectée au niveau du noyau arqué (ARC) de l'hypothalamus. Les centres du SNC impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire se trouvent principalement au niveau de l'hypothalamus, situé sous le cortex (partie externe du cerveau). L'hypothalamus est connecté directement ou indirectement à toutes les autres parties du SNC. Il est constitué de neurones regroupés en sept paires de noyaux spécifiques qui contrôlent, par l'intermédiaire du système nerveux autonome et du système endocrinien, des fonctions homéostatiques comme la satiété, la faim, la soif, le sommeil ou encore la thermorégulation. Il est également impliqué dans le circuit des sentiments, des émotions, du comportement et de l'apprentissage.

Les régions de l'hypothalamus impliquées dans l'homéostasie énergétique sont donc: le noyau arqué (ARC), les noyaux paraventriculaire (PVN) et ventromédial (VMH), le noyau dorsomédial (DMH), l'aire latérale hypothalamique (LHA) et le noyau suprachiasmatique (NSC) (Benyaich et Benyaich, 2017). Elles sont représentées dans la **Figure 15**.

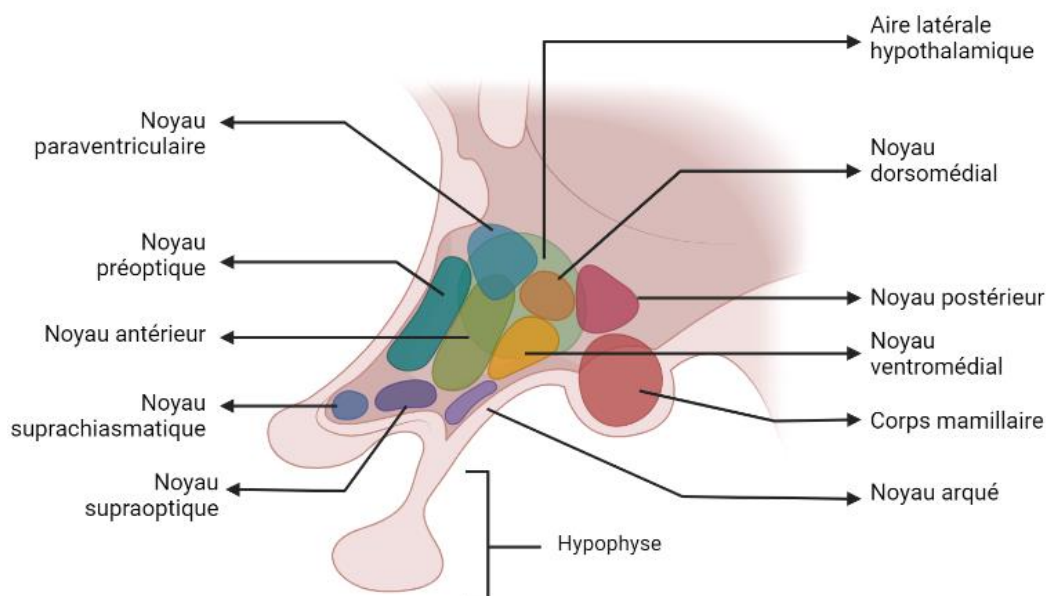


Figure 15: Schéma anatomique des noyaux hypothalamiques. Les régions de l'hypothalamus impliquées dans l'homéostasie énergétique sont : le noyau arqué (ARC), les noyaux paraventriculaire (PVN) et ventromédial (VMH), le noyau dorsomédial (DMH), l'aire latérale hypothalamique (LHA) et le noyau suprachiasmatique (NSC).

Ainsi l'ARC est capable d'intégrer les signaux périphériques arrivant par la circulation sanguine, grâce à sa localisation proche de l'éminence médiane qui est une structure riche en capillaires fenêtrés partiellement dépourvue de barrière hémato-encéphalique. L'ARC possède des récepteurs sensibles aux hormones intestinales comme le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), le peptide YY (PYY), la ghréline et les cholécystokinines (CCK), aux adipokines (leptine et insuline) ou encore aux nutriments qui ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique (Cani et al., 2019; Rodríguez et al., 2010). Il est l'un des rares noyaux cérébraux capable de mesurer directement les pics de glucose, d'acides aminés et d'hormones circulantes (Marty et al., 2007; Thorens, 2012). Parmi les acides aminés, il a été démontré pour l'instant que seule la leucine a la faculté d'induire la satiété en activant directement les neurones NPY/AgRP et POMC de l'ARC (Laeger et al., 2014). Ces deux populations de neurones, dits « neurones de

premier ordre », génèrent et transmettent un message coordonné vers les autres régions de l'hypothalamus impliquées dans la régulation de la prise alimentaire, incluant le PVN, le DMH, le LHA le VMH ou encore le tronc cérébral et la moelle épinière (Kumar et Singh 2020, Timper 2017, Kleinridders et al., 2009; Waterson and Horvath 2015, Flores, Maldonado, et Berrendero 2013). L'ensemble de ces voies de signalisation est schématisé par la **Figure 16**.

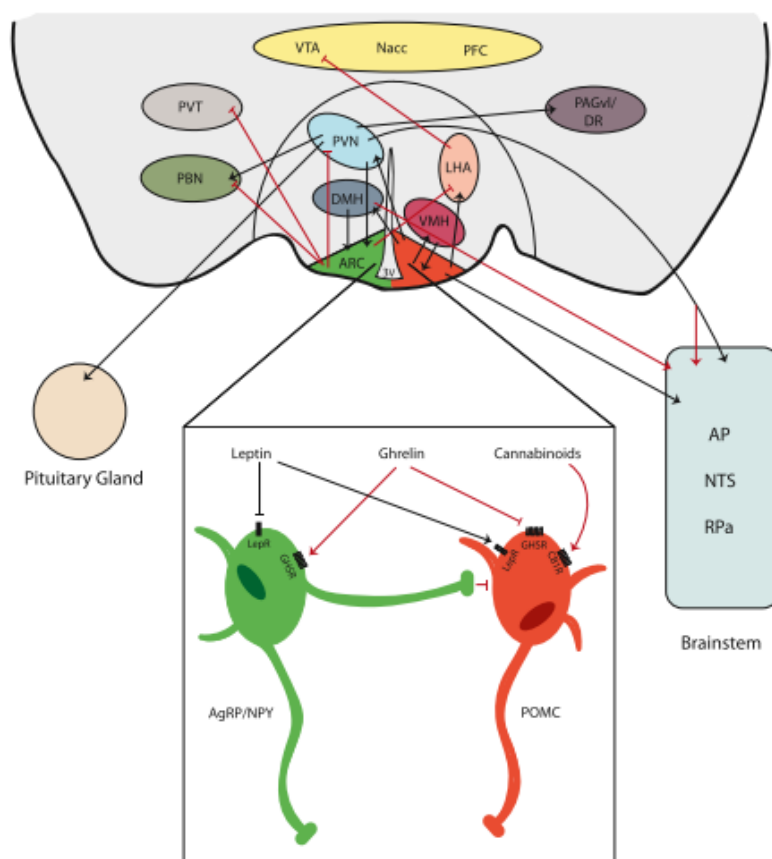


Figure 16: Interconnexion entre les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (issus de Waterson et Horvath 2015). Le rouge représente les connexions qui favorisent un bilan énergétique positif, tandis que le noir représente les connexions qui favorisent un bilan énergétique négatif. L'activation des neurones à POMC contribue à réduire la prise alimentaire et à augmenter la dépense énergétique et vont stimuler le VMH, le DMH et le PVN principalement. L'activation des neurones AgRP/NPY va initier la sécrétion de NPY qui stimule la prise alimentaire et réduit la dépense énergétique. 3V, troisième ventricule ; AgRP, protéine apparentée à l'agouti ; AP, *area postrema* ; ARC, noyau arqué ; CB1R, récepteur cannabinoïde 1 ; DMH, hypothalamus dorsomédian ; GHSR, récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance ; LepR, récepteur de la leptine ; LHA, zone hypothalamique latérale ; Nacc, noyau accumbens ; NPY, neuropeptide Y ; NTS, noyau tractus solitarius ; PAGvl/DR, complexe gris périaqueducal ventrolatéral et raphé dorsal ; PBN, noyau parabrachial ; PFC, cortex préfrontal ; POMC, proopiomélanocortine ; PVN, noyau paraventriculaire ; TVP, thalamus paraventriculaire ; RPa, raphé pallidus ; VMH, hypothalamus ventromédian ; VTA, aire tegmentale ventrale

Le processus par lequel agit la leucine au niveau hypothalamique n'est pas encore complètement compris. Une augmentation de la concentration en leucine serait à l'origine d'une augmentation de l'expression des ARNm des neuropeptides satiétogènes POMC/CART et inhiberait l'expression des neuropeptides orexigènes AgRP et NPY en partie via :

- ❖ L'activation du métabolisme des acides aminés à chaînes ramifiées ;
- ❖ L'activation du métabolisme de la glutamine ;
- ❖ Un contrôle de la kinase non dépressible 2 (GCN2), du facteur d'initiation eucaryote 2 α (eIF2 α), de la sestrine 2 (SESN2) et du transporteur d'acides aminés neutres dépendant du sodium 2 (SNAT2) ;
- ❖ Le récepteur du goût umami ;
- ❖ L'activation du complexe Rapamycine 1 (mTORC1) qui comprend les voies de signalisation mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40 et DEPTOR.

Le complexe mTORC1 serait régulé par les acides aminés (spécifiquement par la leucine), des facteurs de croissance et par des hormones comme la leptine ou l'insuline (Comesaña et al., 2021). Il régulerait la prise alimentaire, la synthèse de protéines et l'homéostasie énergétique au niveau du tissu adipeux blanc, des muscles squelettiques, du foie, des reins, du pancréas et au niveau du système nerveux central dans les noyaux hypothalamiques (PVN, ARC) et extra-hypothalamiques comme le noyau du tractus solitaire (NTS) et *l'area postrema* détaillé par la suite (Pedroso et al., 2015a). L'ensemble de ces mécanismes est schématisé sur la **Figure 17**.

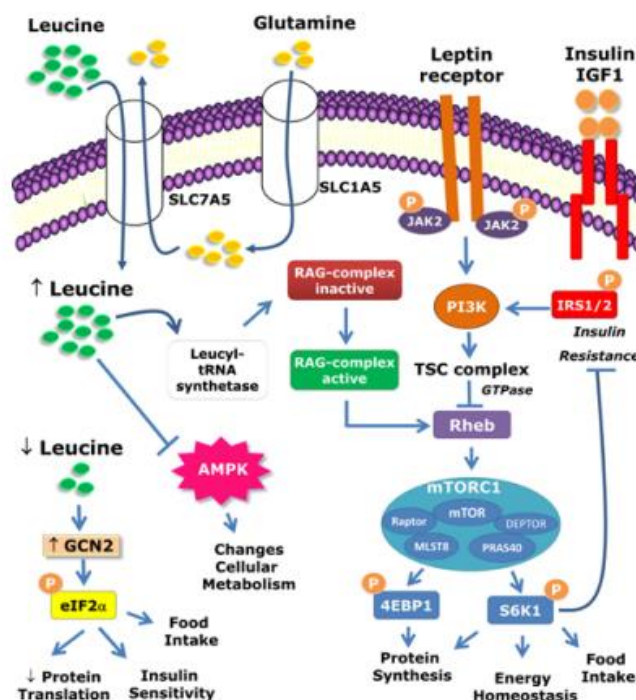


Figure 17: Mécanismes intracellulaires activés par la leucine (issus de Pedroso et al., 2015b). Le complexe mTORC1 est activé par la leucine ainsi que par des hormones telles que la leptine, l'insuline et l'IGF-1. L'activation hormonale se produit principalement par le complexe TSC. Cependant, l'activation de mTORC1 dépendante des acides aminés se produit via le complexe Rag. La leucyl-ARNt synthétase est responsable de la détection des niveaux cellulaires de leucine et de l'activation du complexe Rag. L'absorption cellulaire de L-glutamine et son efflux rapide ultérieur en présence de leucine représentent l'étape limitant le taux d'activation de mTOR1. La protéine p70-S6 kinase 1 (S6K1) et les protéines de liaison au facteur d'initiation eucaryote 4E (eIF4E) 1 (4E-BP1) sont des cibles clés en aval de mTORC1. S6K1 phosphoryle également des composants de la voie de signalisation de l'insuline, ce qui peut conduire à une résistance à l'insuline dans des situations d'abondance de nutriments comme l'obésité. Les effets anorexigènes de la leptine nécessitent à la fois les voies de signalisation phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) et mTOR/S6K1. Etant donné que mTOR1 est une cible en aval de la signalisation PI3K, les effets anorexigènes aigus de la leptine peuvent dépendre de la voie PI3K/mTOR/S6K1.

L'effet de la leucine sur la prise alimentaire est encore très controversé. Toutes les études où la leucine est administrée directement au niveau central montrent une réduction de la prise alimentaire tandis que cet effet n'est pas systématiquement retrouvé dans les études où la leucine est administrée oralement (Pedroso et al., 2015a).

De manière plus évidente, il a été démontré que la leucine impacte l'homéostasie énergétique en stimulant la synthèse de protéines et donc la prise de masse maigre au niveau des organes périphériques ce qui favorise l'augmentation du métabolisme au repos. La leucine aurait

également la capacité de stimuler la sécrétion de leptine et d'insuline ce qui est en faveur d'une réduction de la prise alimentaire et d'une perte de poids. La leucine agirait aussi comme régulateur de l'homéostasie du glucose via la sécrétion d'insuline, en améliorant la sensibilité des organes à cette dernière et en réduisant la néoglucogénèse (Y. Zhang et al., 2007).

Les acides aminés agiraient également de manière indirecte sur la prise alimentaire en régulant la température corporelle. L'ingestion d'acides aminés servirait à activer les récepteurs Ucp1 présents dans le tissu adipeux brun. Leur activation entraîne alors une consommation accrue d'oxygène qui mène à une production de chaleur qui agirait comme inhibiteur de la prise alimentaire au niveau du SNC. La thermogénèse induite par Ucp1 est activée par la sérotonine, les hormones thyroïdiennes, la leptine, les acides biliaires, et par la conversion d'acides gras et d'acides aminés en N-acyl aminés tels que C18 :1-Ala, C18 :1-Gln/lys, C18 :1-Gly, C18 :1-val et C18 :-Leu/Ile par la peptidase M20 contenant le domaine 1 (Pm20d1) (Chang et al., 2019).

Néanmoins, d'autres régions extra-hypothalamiques sont capables d'être activées par les hormones plasmatiques, les nutriments et donc potentiellement par les acides aminés venant de la périphérie. Parmi eux, le NTS, situé dans le tronc cérébral est une région importante de l'homéostasie énergétique. Il reçoit les signaux venant du tractus gastro-intestinal par l'intermédiaire du nerf vague. Ce dernier innerve l'ensemble du tractus digestif et est activé par des mécanorécepteurs et des chémorécepteurs sensibles à la distension gastrique, aux hormones intestinales et aux taux de nutriments circulants. Le NTS reçoit ces signaux postprandiaux et participe à la régulation de la taille et de la durée du repas. Sa localisation proche de *l'area postrema* qui est un organe circonventriculaire, lui permet également de détecter des hormones intestinales et les adipokines comme la leptine, l'insuline ou des incrétines (Cani et al., 2019; Grill, 2006). *L'area postrema* (AP), autre noyau extra-hypothalamique, a la capacité de recevoir les signaux endocriniens circulants et neuronaux.

4.3.2 Implication des protéines dans la régulation périphérique à court terme de la prise alimentaire

La régulation à court terme de la prise alimentaire fait intervenir un ensemble complexe de mécanismes endocriniens et mécaniques, déclenchés par l'ingestion des protéines. Seuls les mécanismes influencés par les protéines seront présentés dans ce manuscrit.

Lors de la digestion, un grand nombre de peptides et d'acides aminés sont générés. Ces peptides vont soit être biodisponibles, pour répondre aux besoins nutritionnels de l'organisme, soit exercer une activité biologique. On parle alors de peptides bioactifs. Ils apportent, au-delà de leur valeur nutritionnelle, des avantages supplémentaires pour la santé. Récemment, les protéines alimentaires ont été reconnues comme une source de peptides biologiquement actifs et sont à l'avant-garde des tendances alimentaires. En effet, les protéines alimentaires contiennent des peptides encryptés qui, lorsqu'ils sont libérés par les protéases endogènes et exogènes, ou par l'action du microbiote lors de la digestion et/ou de l'absorption, sont capables d'exercer une activité biologique (Xu et al., 2019). Ces peptides, généralement constitués de 2 à 20 acides aminés, ont été identifiés pour leur activité antihypertensive, antioxydante, anti-inflammatoire, immunomodulatrice, anti-cholestérolémiant, anti-diabétique, anti-cancéreuse, antiadhésive, etc... (Sun & Wu, 2017; Udenigwe & Fogliano, 2017). Un même peptide peut avoir plusieurs fonctions biologiques différentes.

Comme pour les protéines, l'activité biologique de ces peptides dépend de leur structure, de leur composition en acides aminés, de leur séquence, de leur taille moléculaire, de leur caractère hydrophobe, de leur charge nette et de leur conformation spatiale (Udenigwe & Fogliano, 2017). La population peptidique générée lors de la digestion et son potentiel bioactif dépend de la source protéique et des procédés de transformation appliqués (Nongonierma et FitzGerald 2016; Kopf-Bolanz et al. 2014).

Il a été découvert que certains de ces peptides bioactifs, dérivés de protéines animales et végétales, modulent les fonctions gastro-intestinales et influencent la prise alimentaire en favorisant la sécrétion des hormones intestinales et en interagissant également avec les récepteurs des neuropeptides endogènes de ces hormones.

Les cellules entéroendocrines présentes dans l'ensemble du tractus gastro-intestinal et spécialisées dans la synthèse et la sécrétion d'hormones vont agir comme « senseurs » des nutriments et autres métabolites présents dans la lumière intestinale. Ces cellules possèdent des récepteurs spécifiques capables de reconnaître certains types de composés tels que les peptides. L'interaction entre les peptides et acides aminés libres générés par la digestion et ces cellules va engendrer une modulation de la synthèse et de la sécrétion des hormones gastro-intestinales ainsi que la différenciation des cellules entéroendocrines (Lecerf & Delzenne, 2021).

4.3.2.1 Effet des peptides et acides aminés sur les mécanismes satiétogènes à court terme d'origine mécanique

Il a été mis en évidence que des peptides bioactifs étaient capables de réguler la motilité gastrique et intestinale via les récepteurs μ -opioïdes (MOR). Les MOR appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et sont localisés dans le système nerveux entérique et sur des cellules immunitaires du tractus gastro-intestinal et des muscles longitudinaux de l'iléon (Sternini et al., 2004). L'activation du système opioïde stimule la prise alimentaire au niveau du SNC et au niveau périphérique en ralentissant la vidange gastrique.

Au moment d'une prise alimentaire, l'estomac va se remplir et son volume va augmenter. Dès lors que les mécanorécepteurs de la muqueuse présents de la bouche à l'estomac vont percevoir une sensation d'étirement, ou de distension gastrique, il va y avoir un retour d'information vers le cerveau par l'intermédiaire des neurones afférents primaires intrinsèques (IPANs) qui sont des neurones entériques sensoriels. Ces derniers intègrent les signaux générés par les mécano et chémorécepteurs présents dans le tube gastro-intestinal et les transmettent au nerf vague qui va activer les neurones PB^{dyn} localisés dans le noyau du tractus solitaire et ainsi réduire l'appétit par la production d'un signal de satiété ou d'aversion. Plus forte est la distension, plus forte est l'activation des neurones PB^{dyn} (D.-Y. Kim et al., 2020). Ils régulent également la motilité intestinale, la sécrétion et le flux sanguin. Bien qu'il y ait des mécanorécepteurs tout le long du tractus digestif, il a été montré dans l'étude de Kim et al, que la distension du duodénum ou du colon n'avait aucun effet sur l'activation de ces neurones. Le signal de satiété induit par la distension gastrique provoque la vidange du contenu gastrique dans le duodénum. La distension de l'estomac n'est pas le seul mécanisme à induire une réduction de la prise alimentaire, nous pouvons également citer la vitesse de vidange gastrique.

La vidange gastrique, qui détermine le taux d'apparition des nutriments dans l'intestin grêle, est impactée par la motilité intestinale qui contrôle le mouvement des aliments dans tout le tube digestif. Elle est régulée par le système nerveux entérique, les neurones somatiques et autonomes (système nerveux autonome), le système nerveux central et par certaines hormones gastro-intestinales. La vitesse de vidange gastrique régule la satiété. En effet, la vitesse de libération du contenu gastrique dans le duodénum va moduler le volume, l'osmolalité et la densité calorifique du bol alimentaire qui vont eux même rétro-inhiber la vidange gastrique par des mécanismes de contrôle neuro-hormonaux (Goyal et al., 2019). Les signaux physiques et chimiques induisant ce rétrocontrôle agissent sur des récepteurs hormonaux et mécano-

sensibles qui communiquent via le circuit vagal. Le nerf vague exerce à la fois des effets inhibiteurs et excitateurs sur l'estomac via le circuit moteur vagal inhibiteur gastrique et le circuit vagal excitateur gastrique (Cifuentes & Acosta, 2022). La régulation précise du taux de vidange gastrique du chyme (masse semi-fluide d'aliments partiellement digérés) dans le duodénum est essentielle pour une digestion et une absorption efficace des nutriments dans l'intestin grêle. Cette régulation est assurée par la sécrétion d'une variété d'hormones gastro-intestinales induite par la nature du bol alimentaire (Goyal et al., 2019). Par exemple, le taux de vidange gastrique des glucides est un déterminant important de la glycémie postprandiale. Une vidange gastrique lente peut provoquer une hypoglycémie, alors qu'une vidange gastrique rapide peut provoquer une hyperglycémie postprandiale (Kamvissi-Lorenz et al., 2017). Cependant, une vidange gastrique rapide peut également perturber la régulation de la prise alimentaire par une diminution de la libération d'hormones intestinales satiétogènes.

L'effet des agonistes du MOR sur la motilité intestinale a été mis en évidence grâce aux effets secondaires engendrés par la prise de ces agonistes dans le cadre d'une médication contre la douleur. Ces molécules provoquent une constipation par différents mécanismes, dont un ralentissement de la motilité intestinale (Mori et al., 2013).

Ainsi, les peptides bioactifs identifiés comme agonistes ou antagonistes des opioïdes peuvent, par l'intermédiaire des MOR, moduler la motilité gastro-intestinale. Le premier peptide d'origine alimentaire à avoir été découvert est la β -casomorphine (YPPFGPI) isolée de la β -caséine du lait (L. Lin et al., 1998). Kaneko et son équipe ont, quant à eux, montré qu'une administration orale de soymorphines (soymorphines-5, -6 et -7 : YPFVV, YPFVVN et YPFVVNA, respectivement) qui sont des agonistes des récepteurs μ -opioïdes issus de la sous-unité β -conglycinine de soja, a permis de supprimer le transit gastro-intestinal chez les souris à jeun et, en agissant via le récepteur μ opioïdes, de réguler la prise alimentaire et la digestion (Kaneko et al., 2010). A l'inverse, certains peptides alimentaires accélèrent la motilité gastro-intestinale et réduisent le temps de transit intestinal. Il a été rapporté que la casoxine 4 (Tyr-Pro-Ser-Tyr-OCH₃), antagoniste des récepteurs opioïdes isolé de la fraction κ -caséine du lait bovin, pourrait surmonter l'inhibition de la contraction par la morphine dans les tissus intestinaux isolés des souris et accélérer la vidange gastrique (Patten et al., 2011).

4.3.2.2 Effet des peptides et acides aminés sur les mécanismes endocriniens impliqués dans la régulation de la prise alimentaire à court terme

4.3.2.2.1 Généralités sur la sécrétion des hormones gastro-intestinales

Le tractus gastro-intestinal est le plus gros producteur d'hormones de l'organisme en termes de population de cellules endocrines présentes et en termes de nombre d'hormones produites. Les cellules entéroendocrines sont situées dans l'estomac, l'intestin et le pancréas. Elles représentent seulement 1 % des cellules intestinales et sont à l'origine de la sécrétion d'hormones qui vont réguler les différentes fonctions du tractus telles que la digestion, la régulation de la prise alimentaire, la régulation de l'homéostasie glucidique, etc.... (Rehfeld, 1998). Ces hormones peptidiques vont agir soit de façon systémique via la circulation sanguine, soit localement par effet paracrine ou via le système nerveux entérique. Actuellement, plus d'une trentaine d'hormones sont connues pour être sécrétées par les cellules entéroendocrines qui sont présentes tout au long du tractus gastro-intestinal. Depuis 2000, au moins une dizaine d'hormones a été identifiée comme agissant sur la prise alimentaire de façon directe ou indirecte. La **Figure 18** présente les principales hormones gastro-intestinales, distribuées le long du tractus, et fonction.

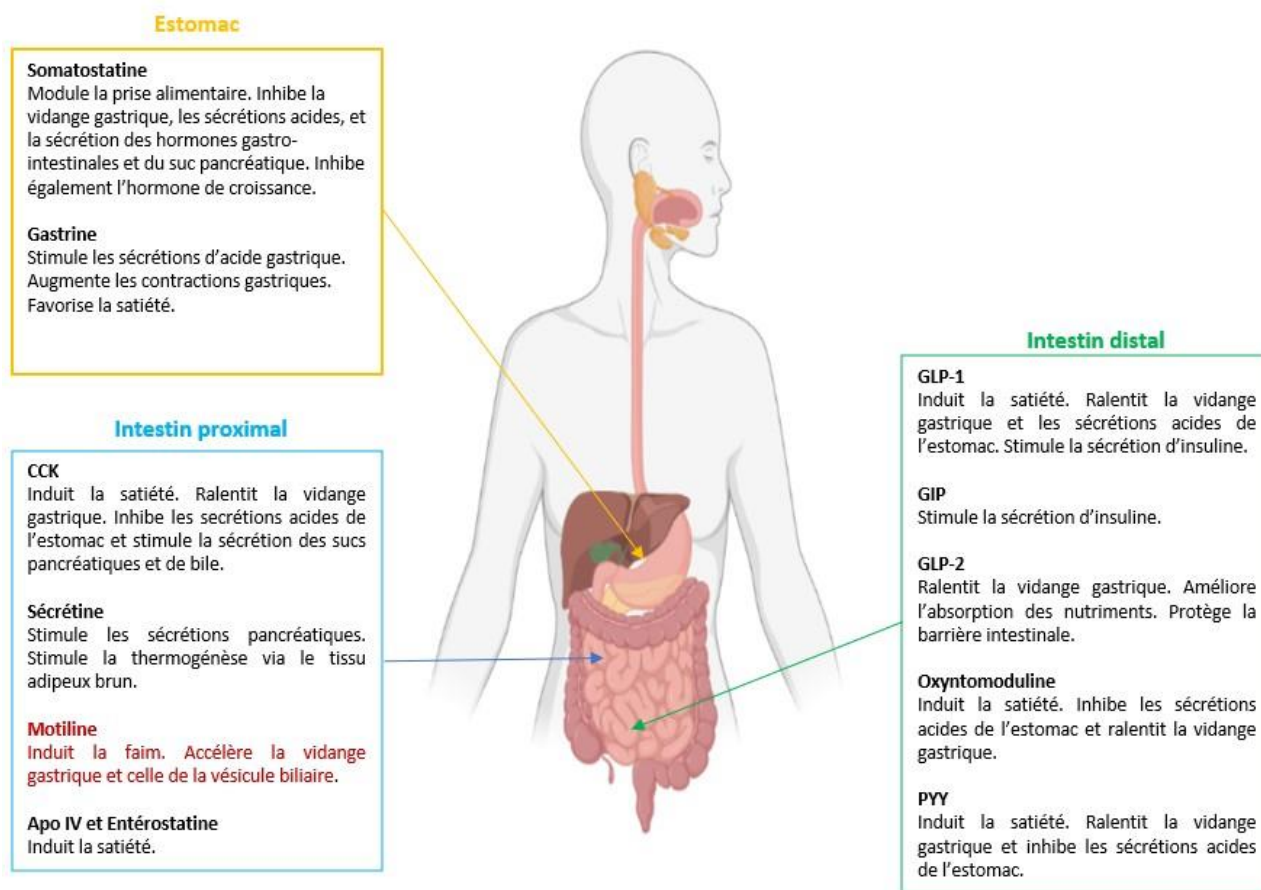


Figure 18: Principales hormones gastro-intestinales impliquées dans la régulation à court terme de la prise alimentaire et leur rôle sur le transit et la satiété. Toutes ces hormones sont produites en réponse à l'ingestion d'aliments, au niveau de l'estomac (Jaune), de l'intestin proximal (Bleu), comprenant le duodénum et le jéjunum et au niveau de l'intestin distal (Vert) qui s'étend de la fin du jéjunum au rectum. La motiline (en rouge) est la seule hormone de l'intestin à stimuler la faim.

Leur sécrétion survient généralement soit après contact direct des cellules entéroendocrines avec les nutriments, soit après contact avec d'autres hormones gastro-intestinales, soit encore via une stimulation par le nerf vague (Prinz & Stengel, 2017). Bien que la sécrétion de ces hormones soit un phénomène biologique déterminé et un processus prévisible, elle peut, à court terme, être modulée par d'autres facteurs relatifs au système sensoriel comme le goût, l'odeur et l'aspect des aliments ou encore des facteurs relatifs au stress, à l'anxiété (Onaka et Takayanagi, 2019) ou à l'activité physique (P. S. Larsen et al., 2017). La nature gustative des aliments peut agir comme un stimulant de la prise alimentaire (Luquet, 2008), contrairement à l'activité physique aérobie qui va stimuler la sécrétion de certaines hormones satiétogènes (Kawano et al., 2013).

Parmi ces hormones gastro-intestinales à court terme, les plus connues sont les CCK (-8 et -33), le GLP-1 et le PYY (3-36). Il est admis que leur sécrétion est stimulée par la consommation de protéines et elles sont considérées comme d'excellents marqueurs de satiété. Elles permettent de contrôler l'initiation, le temps et la taille du repas (K.-S. Kim et al., 2018). Seules les informations sur les hormones étudiées dans ce travail de thèse au cours des expérimentations menées seront décrites dans la suite de cette introduction bibliographique.

4.3.2.2.2 *Effet des peptides et acides aminés sur les principales hormones gastro-intestinales qui interviennent dans la régulation de la prise alimentaire à court terme*

La digestion des protéines a un effet stimulateur de la sécrétion d'hormones telles que le GLP-1, le GIP, les CCK et le PYY par contact direct avec des récepteurs présents sur les cellules entéroendocrines (Pizarroso et al., 2021). On parle de « sensing intestinal ». Il a été mis en évidence que des acides aminés pouvaient stimuler la sécrétion d'hormones gastro-intestinales directement impliquées dans la régulation de la prise alimentaire via des récepteurs présents sur les cellules intestinales. Les récepteurs impliqués dans la sécrétion de ces hormones satiétogènes sont résumés dans le **Tableau 5** suivant.

Tableau 5: Effet des acides aminés sur les récepteurs couplés aux protéines G (inspiré de Pizarroso et al. 2021).

Récepteurs	Cellules	Substrat présent dans la lumière intestinale	Hormones sécrétées	Références
GPRC6A	Cellules L	Acides aminés basiques (L-Lys, L-Arg et L-Orn) et Acides aminés soufrés	GLP-1	(Pi et al., 2016; Spreckley & Murphy, 2015)
T1R1/T1R3	Cellules I	Tous les acides aminés	GLP-1 et CCK	(Daly et al., 2013; Wauson et al., 2013)
GPR142	Cellules K et L	Acides aminés aromatiques (L-Phe et L-Trp)	GLP-1 et GIP	(Covasa et al., 2019; Norton et al., 2019)
CaSR	Cellules K et L	Acides aminés aromatiques et aliphatiques	CCK, GLP-1, GIP et PYY	(Mace et al., 2012; Psichas et al., 2015; Wauson et al., 2013)

Bien qu'il soit admis que les acides aminés aient une action sur la sécrétion des hormones du tractus gastro-intestinal, il a également été montré que les mélanges peptidiques avaient une action bien plus significative dans la sécrétion de ces hormones. En effet, Cudennec et al. ont mis en évidence « un effet peptide » sur la sécrétion des hormones gastro-intestinales par la lignée STC-1 (Cudennec et al., 2008, 2012a). Ils ont montré *in vitro* que les hydrolysats de protéines de poisson stimulaient significativement et de manière plus importante la sécrétion de GLP-1 et de CCK qu'un mélange d'acides aminés de même composition. Une hydrolyse trop importante, peut entraîner une perte de bioactivité. Les acides aminés libres stimuleraient de manière moins efficace la sécrétion de GLP-1 (Cordier-Bussat, 1998; Cudennec et al., 2012a). Geraedts et al. (2011) ont également rapporté que la digestion intestinale de protéines de cabillaud par la trypsine réduisait la sécrétion de GLP-1 par les cellules STC-1 (Geraedts et al., 2011a). Il a également été montré que la sécrétion des hormones satiétogènes était plus fortement stimulée par les peptides que par un mélange d'AA ou la protéine intacte. Des peptides issus de la digestion de blanc d'œuf ont montré un puissant effet sécrétagogue du GLP-1 et de CCK, contrairement aux acides aminés libres qui n'ont eu aucun effet, et à la protéine intacte qui n'a présenté qu'un effet modéré (Santos-Hernández, Tomé, et al., 2018). Caron et al, mettent également en évidence que les digestats intestinaux d'hémoglobine sont à l'origine d'une plus forte sécrétion d'hormones que les digestats salivaires de cette même protéine (Caron, Domenger, et al., 2016).

Une digestion plus lente des protéines semble potentialiser l'effet des peptides générés sur la stimulation de la sécrétion des hormones gastro-intestinales (Nishi et al., 2001). D'autres études ont suggéré que la longueur des fragments peptidiques, issus de la digestion enzymatique des protéines, avait un impact sur la sécrétion de ces hormones et que seuls les peptides composés de cinq acides aminés ou plus étaient efficaces pour stimuler la libération de CCK par les cellules STC-1 (Tulipano et al., 2017).

Quelques études *in vitro* ont montré que des peptides issus de protéines des sources différentes : gluten, soja, blanc d'œuf, poulet, porc, bœuf, lait, haricot, poisson et pomme de terre stimulaient la sécrétion des hormones satiétogènes CCK et GLP-1 (Caron, Domenger, et al., 2016; Hira et al., 2009; Nakajima et al., 2010; Santos-Hernández et al., 2020; Sufian et al., 2006; Theysgeur et al., 2020). De la même manière, des peptides issus de gluten auraient la capacité d'augmenter la sécrétion de PYY chez le rat (W. Chen et al., 2018a).

De ce fait, il existe un intérêt croissant pour l'identification de peptides alimentaires capables de réguler la sécrétion d'hormones intestinales, présentées ci-après. Ces hormones régulent la prise alimentaire et un grand nombre de fonctions intestinales.

- **La famille des CCK**

Les CCK ont été découvertes en 1928 par Ivy et Oldberg pour leur capacité à jouer un rôle central dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Ivy & Oldberg, 1928). Ce sont les premières hormones à avoir été identifiées comme inhibitrices de la prise alimentaire. Il s'agit d'hormones peptidiques synthétisées et sécrétées par des neurones cérébraux et des cellules endocrines I, dispersées principalement dans la partie supérieure de l'intestin grêle. Leur présence diminue au fur et à mesure de leur progression dans l'intestin. La sécrétion de CCK par ces cellules est stimulée par l'ingestion de protéines et de lipides (Miller et al., 2021). Ces hormones peptidiques sont initialement synthétisées sous forme de pré-pro-cholécystokinine de 115 acides aminés qui, par des modifications post-traductionnelles, va donner lieu aux différentes formes bioactives de CCK dont les peptides CCK-8, CCK-22, CCK-33 et CCK-58, les formes les plus longues étant les formes prédominantes de CCK sécrétées par les cellules intestinales (Noble et al., 1999; Rehfeld, 2021). Toutes les formes de CCK bioactives ont une extrémité C-terminal identique et une séquence active constituée d'un amide O-Sulfaté. Le dosage des CCK se fait par des méthodes immunologiques (RIA, ELISA) qui nécessitent des anticorps, de haute affinité pour les différentes formes de CCK, qui ne croisent pas avec la gastrine. Les CCK possèdent une analogie de séquence, représentée par la **Figure 19**, qui rend très difficile le développement d'un anticorps qui ne croise pas avec la gastrine qui est 10 à 20 fois plus concentrée que les CCK dans le sang (Rehfeld, 2020). L'heptapeptide amide sulfaté présent dans toutes les formes de CCK est le plus petit agoniste complet du récepteur CCK1 qui intervient dans la médiation du signal de satiété du sang vers le cerveau via les neurones vagues afférents. Il est prolongé à l'extrémité N terminale de 1 résidu d'acides aminés (CCK-8), 15 résidus d'acides aminés (CCK-22), 26 résidus d'acides aminés (CCK-33) ou de 51 résidus d'acides aminés (CCK-58) (Smith et al., 1985).

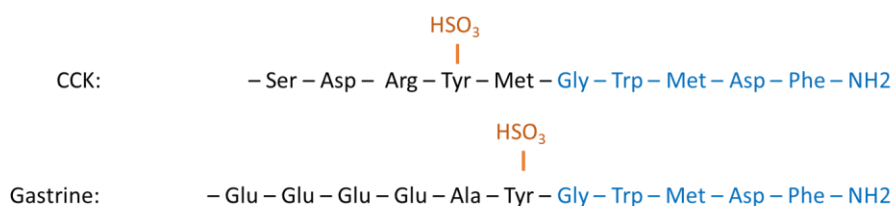


Figure 19: Structure primaire de la séquence d'acides aminés de l'heptapeptide O-sulfaté qui constitue la séquence active spécifique des CCK. La séquence homologue de la gastrine correspondante est également présentée.

Les CCK intestinales jouent un rôle important dans le maintien d'un état nutritionnel normal et possèdent de nombreux rôles physiologiques bien connus. Elles stimulent les contractions de la vésicule biliaire, la sécrétion des enzymes pancréatiques et inhibent les sécrétions acides de l'estomac (Rehfeld, 2020). Elles modulent également la vidange gastrique afin de permettre une digestion et une absorption optimale des nutriments (Miller et al., 2021). Elles interfèrent également dans la fertilité, l'inflammation, les fonctions cardiovasculaires, et la satiété (Pathak et al., 2018). Concernant le rôle des CCK sur la prise alimentaire, il a été mis en évidence que les CCK-8 et -33 diminuent l'appétit, limitent la suralimentation et la prise de poids (Smith et al., 1981; Warrilow et al., 2022). Il a également été montré récemment que ces CCK potentialisent l'action du GLP-1 pour favoriser la satiété via le nerf vague (Vana et al., 2022).

Les CCK exercent leurs activités satiétogènes via l'activation des récepteurs spécifiques CCK-1R et CCK-2R, ce dernier étant souvent appelé récepteur de la gastrine (Pathak et al., 2018). Le récepteur CCK-1R est la cible dominante des CCK et est principalement présent sur les neurones afférents vagues localisés dans la paroi intestinale supérieure (Owyang & Heldsinger, 2011). Ces neurones permettent de moduler les sécrétions digestives et la motilité gastrique au niveau périphérique et affectent ensuite les noyaux du SNC impliqués dans la régulation de l'appétit. Les CCK ont également une affinité élevée avec le récepteur CCK-2R localisé sur les cellules pariétales où il médie les sécrétions d'acide gastrique, sur divers neurones au niveau périphérique et cérébral (Dong et al., 2005). L'activation du récepteur CCK-1R nécessite la présence de l'heptapeptide amide sulfaté sur la partie C-terminale des CCK, tandis que le récepteur CCK-2R ne nécessite que la séquence tétra peptidique carboxy-terminale commune aux CCK et à la gastrine (Johnsen, 1998). De ce fait, le récepteur CCK-1R a une spécificité beaucoup plus importante pour les CCK que pour la gastrine.

Les CCK sont des hormones impliquées dans la régulation à court terme de la prise alimentaire. Elles sont sécrétées dans les 10 à 15 min après l'ingestion d'un repas grâce à un contact direct des nutriments avec les cellules entéroendocrines I présentes dans la partie supérieure de l'intestin.

Les CCK interfèrent également avec les signaux de la régulation de la prise alimentaire à long terme en stimulant la sécrétion de leptine par le tissu adipeux via les récepteurs CCK-1R présents sur les adipocytes (Pathak et al., 2018) et en améliorant la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique à la leptine pour qu'elle atteigne plus facilement l'hypothalamus (Cano et al., 2008). En outre, la CCK agit également au niveau pancréatique en modulant la sécrétion d'insuline (Pathak et al., 2018; Rehfeld, 2019). La CCK stimule les sécrétions d'insuline en condition d'hyperglycémie. Ceci a été montré chez l'homme, où des perfusions de CCK à $24 \text{ pmol.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ont permis de stimuler les sécrétions d'insuline (Ahrén et al., 2000). La CCK favorise également la prolifération des cellules β et limite leur apoptose (Lavigne et al., 2015).

Les peptides libérés par la digestion intestinale peuvent stimuler la production de CCK via les récepteurs sensibles au calcium (CaSR) ou le récepteur couplé aux protéines G, GPR93. Ces deux groupes de récepteurs activent les canaux calciques voltage dépendant qui induisent l'absorption du Ca^{2+} dans la cellule provoquant une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, qui déclenche la transcription du gène codant pour les CCK et la sécrétion de CCK par ERK 1/2 ou l'activation de la voie de signalisation de la phosphokinase A (Caron et al., 2017d). Le passage de peptides à travers PepT1 active également les canaux calciques par dépolarisation de la membrane et agit donc sur la sécrétion de CCK. La sécrétion d'hormones par les peptides et acides aminés se produit aussi bien du côté apical que du côté basolatéral des cellules entéroendocrines (Modvig et al., 2021).

La **Figure 20**, extraite de l'article de Caron et al, 2017 détaille les voies de signalisation impliquées dans le « sensing intestinal » des acides aminés et des peptides qui conduisent à la sécrétion de CCK.

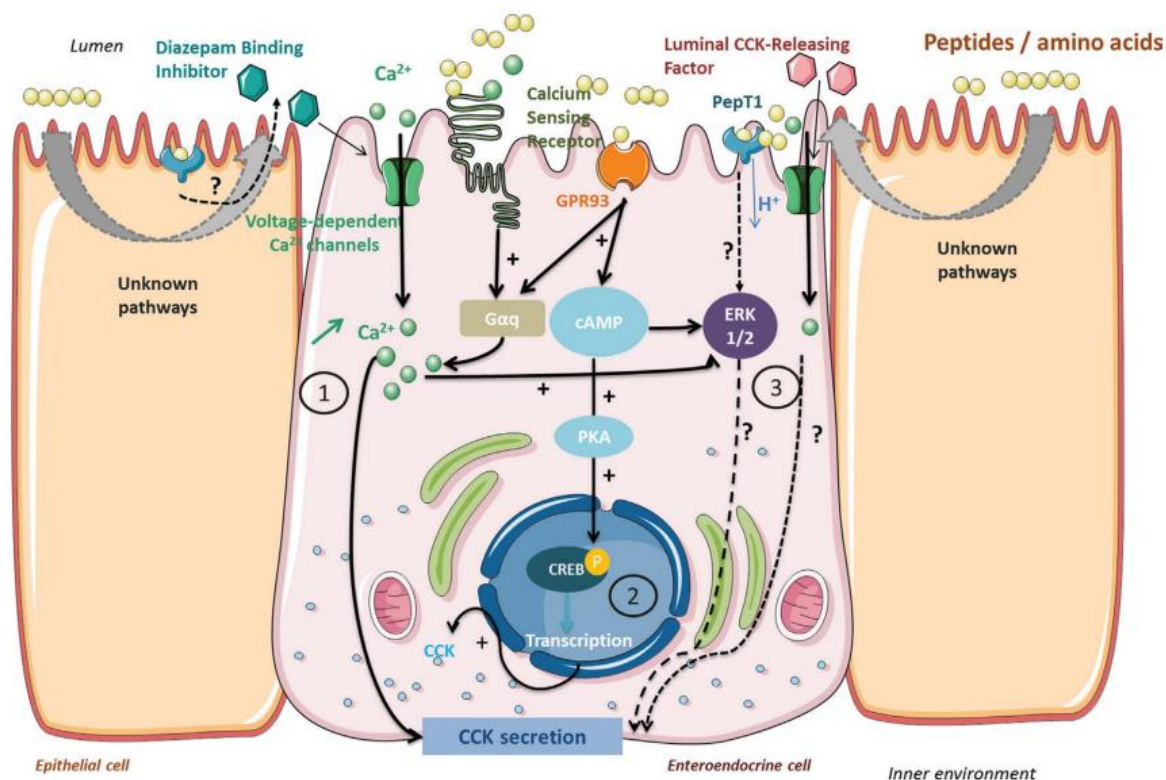


Figure 20: Activation par les peptides bioactifs et les acides aminés des voies de signalisation à l'origine de la synthèse et de la sécrétion de CCK dans les cellules entéroendocrines (Issu de Caron et al. 2017b). Les peptides présents dans la lumière intestinale peuvent activer la sécrétion des CCK par (1) une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire résultant d'une activation du CaSR ou de GPR93. Les canaux Ca^{2+} voltage dépendant permettent une entrée de Ca^{2+} intracellulaire sous l'action des récepteurs CaSR et GPR93 ou d'une dépolarisation de membrane provoquée par le transport de dipeptides par PepT1. L'activation de GPR93 par les peptides peut engendrer une activation de la transcription du gène CCK (2) en activant les voies de signalisation ERK 1/2 et PKA. D'autres voies de signalisation inconnues à ce jour (3) impliquent le transporteur PepT1 de manière indirecte ou le facteur LCRF dans la stimulation de la sécrétion des CCK.

Le récepteur CaSR est activé par divers métabolites dont le Ca^{2+} extracellulaire et les AA basiques qui possèdent un domaine Venus Fly Trap (VFT) (Li et al., 2022). Parmi ces acides aminés, la L-phénylalanine est un stimulateur bien connu de la sécrétion de CCK par les cellules entéroendocrines (Mangel et al., 1995). Outre les acides aminés, il a été montré que le peptide β 51–63 de la β -conglycinine de soja pouvait avoir le même effet cellulaire (Nakajima et al., 2010). Il a été suggéré que même si les hydrolysats de protéines contiennent une part importante d'acides aminés libres, les peptides de faible poids moléculaire (> 1 000 Da) sont de meilleurs stimuli de la sécrétion de CCK via l'activation du CaSR. Parmi les peptides activant CaSR, les peptides γ -glutamyl semblent avoir une spécificité pour CaSR (Li et al., 2022).

- **Le GLP-1, hormone dérivée du proglucagon**

Le GLP-1 est un dérivé du proglucagon qui est un peptide de 160 acides aminés, synthétisé par les cellules α des îlots de Langerhans et par les cellules L entéroendocrines. Il est le précurseur de plusieurs peptides dont le glucagon, le GLP-1, le glucagon-like peptide-2 (GLP-2) et l'oxyntomoduline qui sont tous impliqués dans la régulation périphérique de la prise alimentaire.

Ces différents peptides vont être synthétisés à partir d'une modification post traductionnelle du proglucagon par les prohormones convertases 1 et 3 (PC1/3) présentes dans le tissu intestinal et cérébral et par la prohormone convertase 2 localisée dans le tissu pancréatique (**Figure 21**).

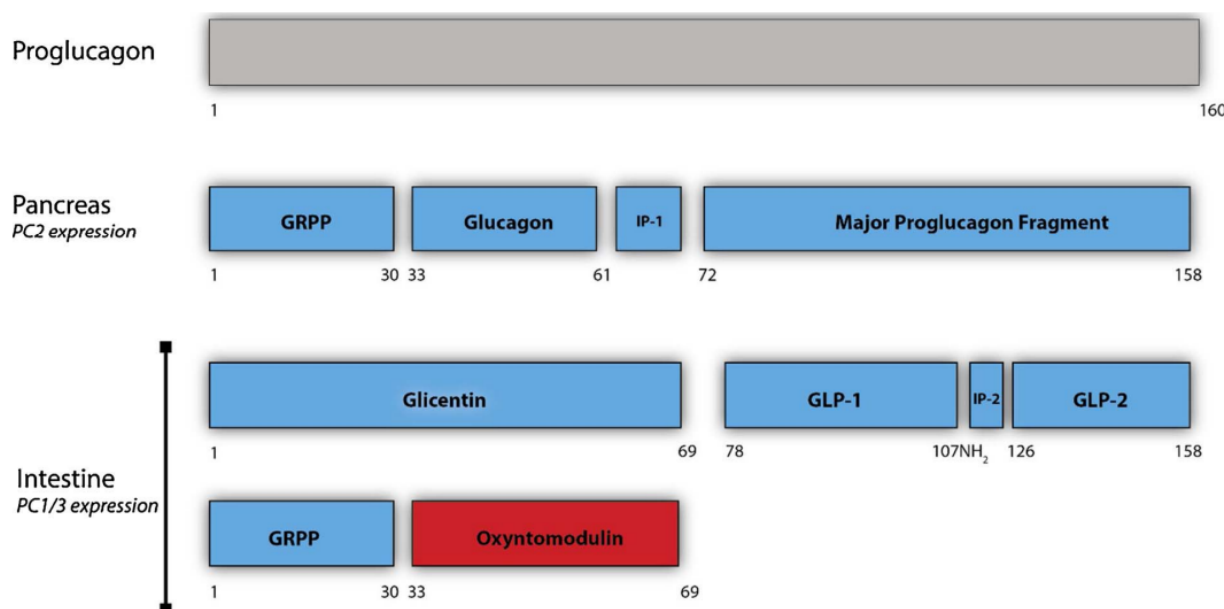


Figure 21: Conversion du proglucagon par les prohormones convertases dans le pancréas et l'intestin (d'après Holst et al, 2018). GRPP, Glicentin-related pancreatic peptide ; IP1/2 : Intervening peptide 1/2.

Le GLP-1 est une hormone gastro-intestinale également impliquée dans la régulation de la prise alimentaire. Elle diminue la motilité gastrique et les sécrétions acides de l'estomac, réduit la prise alimentaire et favorise la perte de poids lorsqu'elle est administrée en intraveineuse (IV) comme traitement chez des individus obèses (Kanoski et al., 2016). Lorsqu'elle est administrée dans le système nerveux central (Secher et al., 2014), mais aussi dans la circulation générale (Flint et al., 1998), elle réduit la prise alimentaire et augmente la satiété.

En plus d'être une hormone satiétogène, le GLP-1 est une hormone particulièrement intéressante pour son rôle dans le métabolisme glucidique. En effet, le GLP-1 est une incrétine dont le rôle principal est de potentialiser la sécrétion d'insuline après ingestion de nutriments. Le GLP-1 est sécrété par les cellules entéroendocrines L, localisées principalement dans la partie distale de l'intestin, suivant un gradient de faible densité dans le duodénum et de plus haute densité dans l'iléon, mais aussi le colon et le rectum (Eissele et al., 1992). Les cellules L peuvent coexprimer et co-sécréter du GLP-2, du PYY, de la CCK et du GIP (Steinert et al. 2017 ; Campbell et Drucker 2013). Le GLP-1 est également produit au niveau cérébral par quelques neurones du NTS (Kanoski et al., 2016.). Le GLP-1 est sécrété en réponse à l'ingestion de nutriments tels que le glucose, d'autres glucides, les triglycérides et les protéines et acides aminés (Nauck et Meier 2016; Parker et al, 2010) et agit comme signal endocrine sur les cellules pancréatiques en stimulant la sécrétion d'insuline et en supprimant celle de glucagon (Nauck & Meier, 2018). Chez l'Homme à jeun, la concentration plasmatique de GLP-1 est de 5 à 10 pmol.L⁻¹ (Philippe, 2009). Après ingestion d'aliments, la concentration plasmatique commence à augmenter entre 5 et 15 min seulement pour atteindre un pic entre 30 min et 1h et retrouver sa concentration basale après quelques heures (< 3h) (Nauck & Meier, 2018; Steinert et al., 2017).

Le GLP-1 agit par l'intermédiaire du récepteur GLP-1R qui est exprimé dans l'ensemble du tractus gastro-intestinal, dans les cellules pancréatiques, cardiaques, du nerf vagal afférent et dans plusieurs régions cérébrales (Drucker, 2018). Le GLP-1 agit principalement de manière paracrine en stimulant les récepteurs GLP-1R exprimés sur les terminaisons afférentes vagales innervant l'intestin. Cette activation vagale réduit l'apport alimentaire via la voie de signalisation glutamatergique au niveau du NTS, et aussi putativement via la libération d'insuline médiée par les réflexes vago-vagaux. En plus des voies vagales paracrines décrites ci-dessus, le GLP-1 peut traverser facilement la barrière hémato-encéphalique (Kastin et al., 2002) et agir directement au niveau du SNC. Cependant, étant donnée la demi-vie très courte du GLP-1 (1 à 2 min), il est admis que la source de GLP-1 agissant sur les récepteurs GLP-1R exprimés dans le cerveau peut être principalement dérivée des neurones exprimant le GLP-1 (Kanoski, et al, 2016).

En effet, le GLP-1 est très vite dégradé par la DPP-IV en un peptide tronqué inactif (GLP-1₉₋₃₆), ce qui réduit considérablement les actions satiétogène et incrétine du GLP-1.

Des peptides stimulant la sécrétion de GLP-1, ont été découverts au sein du laboratoire (Caron, Cudennec, et al., 2016a; Domenger et al., 2017a; Theysgeur et al., 2020). En effet, plusieurs peptides issus de la digestion *in vitro* d'hémoglobine ou d'hydrolysats de protéines de poisson, ont été identifiés et testés sur leur capacité à induire une sécrétion de GLP-1 et de CCK. Les peptides YGAE, LLVV et LKPT, ont significativement induit une augmentation de la sécrétion de GLP-1 par des STC-1 à une concentration de 1 mM.

Cet effet a également été démontré *in vitro* avec un peptide synthétique, le β -caséine décapeptide qui induit une augmentation significative de la sécrétion de GLP-1 par la lignée cellulaire GLUTag (Komatsu et al., 2019) et par l'équipe de Heffernan qui a également démontré que les peptides BWSPHs issues de gélatine de poisson présentaient un potentiel de satiété en synthétisant le peptide précurseur du GLP-1, le proglucagon, et en stimulant la sécrétion de GLP-1 actif au contact des cellules STC-1. Elle démontre ainsi que des peptides peuvent réguler la sécrétion de GLP-1 aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel (Heffernan et al., 2022).

Theysgeur et al. mettent également en évidence que des peptides stimulant la sécrétion de GLP-1, ne stimulent pas forcément la sécrétion de CCK (Theysgeur et al., 2020). O'Halloran et al. montrent également que des hydrolysats de caséine stimulent la sécrétion de GLP-1, sans affecter celles CCK et de PYY (O'Halloran et al., 2018). Ces résultats mettent ainsi en lumière une différence des peptides à initier les mécanismes à l'origine des sécrétions de ces différentes hormones.

Les peptides issus de la digestion gastro-intestinale des protéines, libérés dans la lumière, stimulent également la sécrétion de GLP-1 via le récepteur sensible au calcium (CaSR) ou via l'activation du GPRC6A. L'ensemble des réactions qui en découle est schématisé par la **Figure 22**. Cette fixation a pour conséquence l'activation des voies de signalisation PLC et IP3 qui provoquent une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. L'activation des canaux Ca^{2+} par le CaSR ou les canaux potentiels des récepteurs transitoires permet l'absorption du Ca^{2+} , ce qui déclenche la sécrétion de GLP-1. En ce qui concerne la synthèse de GLP-1, celle-ci est initiée directement par les peptides qui activent la transcription du gène du proglucagon via une voie dépendante de l'AMPc conduisant à la phosphorylation de CREB. Toutes les voies impliquées dans la sécrétion de GLP-1 ne sont pas encore connues mais elles pourraient impliquer la phosphorylation de ERK 1/2 ou l'absorption de protons couplée au transport de peptides par PepT1 (Caron et al., 2017d).

Il semblerait également que la sécrétion de GLP-1 soit stimulée via le récepteur du goût TAS2R présent dans le tractus gastro-intestinal. Grau-Bové et al. (2020) ont mis en évidence l'implication de l'agoniste hTAS2R14 sur sa capacité à stimuler la sécrétion de GLP-1 chez le rat.

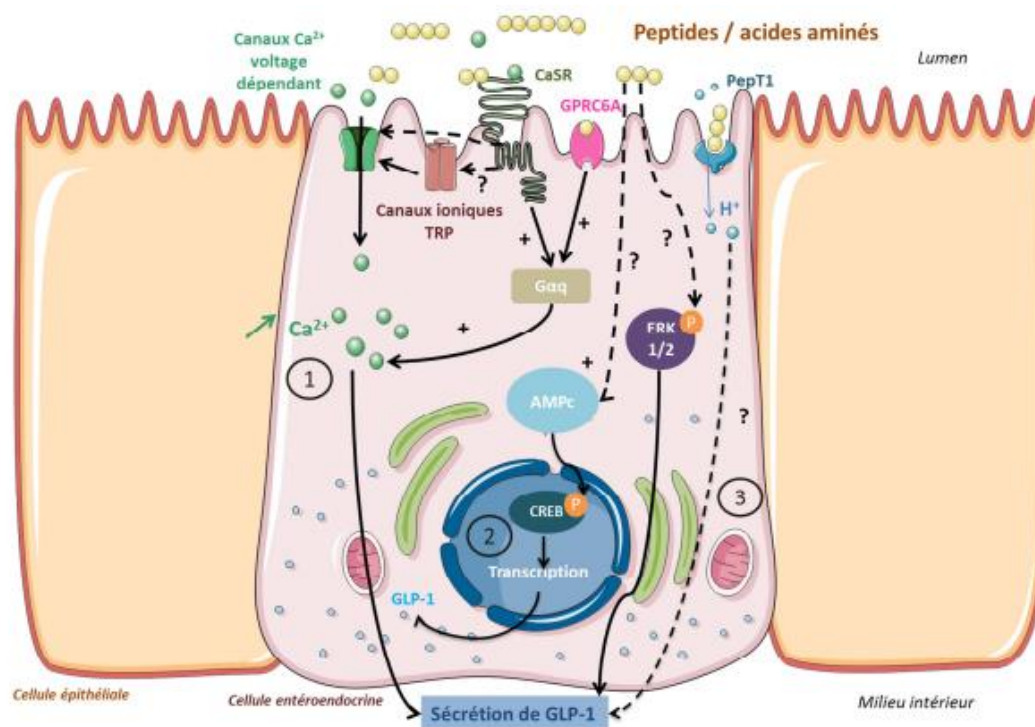


Figure 22: Voies de signalisation à l'origine de la sécrétion de GLP-1 par les peptides bioactifs (issu de Caron et al. 2017b). Les acides aminés libres et peptides présents au niveau du lumen intestinal peuvent stimuler la sécrétion de GLP-1 en activant les récepteurs CaSR et GPRC6A (1). Ces derniers activent la sous-unité α Gq déclenchant elle-même une voie de signalisation PLC et IP3 dépendante menant à une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire. Cette dernière résulte également de l'activation des canaux Ca^{2+} voltage dépendant par les canaux TRP ou le CaSR. Les peptides peuvent favoriser la synthèse du gène proglucagon par une voie AMPc dépendante activant la phosphorylation de CREB (2). Certaines voies impliquées dans la stimulation de la sécrétion de GLP-1 ne sont pas encore caractérisées et pourraient impliquer la phosphorylation des ERK 1/2 ou l'entrée de protons couplée au transport des peptides par PepT1 (3).

- **Le PYY (3-36)**

Le polypeptide YY (PYY) est une hormone polypeptidique, découverte en 1982, sur des échantillons de tissus intestinaux de porc. Lors de sa découverte, il a été suggéré que ce peptide appartenait à la même famille de peptides que le polypeptide pancréatique (PP) étant donné leur fort degré d'homologie de séquence en acides aminés (Tatemoto, 1982).

Cette famille, récemment renommée « famille NPY », regroupe le polypeptide YY (PYY), le polypeptide pancréatique (PP) et l'hormone peptidique neuropeptide Y (NPY). Elle a été récemment renommée famille NPY car bien que découvert récemment, le NPY est en fait le plus ancien d'un point de vue évolutif (Michael Conlon, 2002). Les peptides issus de cette famille ont tous une relative homologie de séquence en acides aminés comme le montre la **Figure 23** ci-dessous.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
PYY	Y	P	I	K	P	E	A	P	G	E	D	A	S	P	E	E	L	N	R	Y	Y	A	S	L	R	H	Y	L	N	L	V	T	R	Q	R	Y	NH ₂
NPY	Y	P	S	K	P	D	N	P	G	E	D	A	P	A	E	D	M	A	R	Y	Y	S	A	L	R	H	Y	I	N	L	I	T	R	Q	R	Y	NH ₂
PP	A	P	L	E	P	V	Y	P	G	D	N	A	T	P	E	Q	M	A	Q	Y	A	A	D	L	R	R	Y	I	N	M	L	T	R	P	R	Y	NH ₂

Figure 23: Séquence en acides aminés des peptides de la famille NPY (PYY, NPY et PP), d'après Ueno et al. 2008. Les AA communs aux trois membres de la famille NPY sont colorés en bleu.

En revanche, ces trois hormones possèdent toutes une structure de 36 AA avec de nombreux domaines communs et partagent une structure tertiaire commune (Ueno et al., 2008).

Le PYY est produit par les cellules L entéroendocrines situées principalement dans la région distale de l'intestin et qui produisent également le GLP-1 (Spreckley & Murphy, 2015) et tous les peptides issus du proglucagon. La densité des cellules L est maximale dans le rectum, puis l'iléon et enfin le colon (El-Salhy et al., 2020). Le PYY est également sécrété par des neurones au niveau cérébral et par les cellules α , PP, et delta pancréatiques (Lafferty et al., 2018a). Le PYY est sécrété en réponse à l'ingestion de nutriments surtout celle de lipides et de protéines (El-Salhy et al., 2016). Le PYY est libéré dans la circulation sous la forme PYY (1-36) mais cette forme est rapidement dégradée par l'enzyme DPP-IV en PYY(3-36), forme plasmatique active la plus abondante et possédant une action satiétogène (Tan & Bloom, 2013). Les différentes formes de PYY sont difficiles à doser séparément et les taux plasmatiques se réfèrent généralement au PYY totaux. Après ingestion d'aliments, le taux plasmatique de PYY commence à augmenter entre 15 et 30 min et atteint un pic entre 60 et 90 min aux alentours de 16 et 30 pM. Le taux plasmatique de PYY reste élevé pendant plusieurs heures après le repas (Steinert et al., 2017).

Le PYY est très connu pour son rôle satiétogène (Kjaergaard et al., 2019) et agit en activant les récepteurs Y1, Y2 et Y5 (Lafferty et al., 2018a) mais il semblerait que le PYY₃₋₃₆ inhibe la

prise alimentaire via le récepteur Y2 avec qui il se lie préférentiellement. Les récepteurs Y1 et Y2 sont localisés dans les cellules épithéliales et les neurones du plexus sous-muqueux et myentérique de l'intestin grêle et du côlon (Cox & Tough, 2002) et vont interagir avec le NTS.

Il exerce également d'autres effets physiologiques dans le tractus gastro-intestinal. Il retarde la vidange gastrique, inhibe les sécrétions gastriques et pancréatiques, et stimule l'absorption d'eau et d'électrolytes (El-Salhy et al., 2020). Il semble également jouer un rôle important dans la modulation de la libération de sérotonine par les cellules entérochromaffines coliques via le système de cascade NK2/NK3 endogène (S. Kojima et al., 2015). La sérotonine est connue pour moduler la sensibilité viscérale et augmenter la motilité gastro-intestinale et les sécrétions intestinales (Kendig & Grider, 2015).

Bien que le PYY soit co-sécrété avec le GLP-1 par les cellules L, les mécanismes à l'origine de ces sécrétions ne sont toutefois pas exactement les mêmes. Comme pour le GLP-1, la sécrétion de PYY peut être médiée via les récepteurs GPR41 et 43 qui sont activés par les acides gras à chaîne courte ou via le récepteur TGR5, activé par les acides biliaries (Lecerf & Delzenne, 2021). En ce qui concerne l'influence des AA ou des peptides sur la sécrétion de PYY, celle-ci reste encore controversée, même si quelques études semblent aller dans ce sens (Greeley et al., 1989; van der Klaauw et al., 2013).

4.3.2.2.3 Effets agonistes des peptides bioactifs avec les récepteurs des hormones gastro-intestinales

Remarquablement, les peptides alimentaires peuvent également se comporter comme des agonistes du récepteur CCK-1R. Il a été montré par l'équipe de Staljanssens que les hydrolysats de protéines de soja ou de pomme de terre, déjà connus pour stimuler la sécrétion de CCK par leur action sur CaSR, agissent en outre comme des agonistes partiels de CCK-1R dans les cellules CHO surexprimant ce récepteur (Staljanssens et al., 2012). Comme la muqueuse intestinale est densément innervée, les afférences vagales exprimant CCK-1R pourraient être accessibles au contenu luminal et être directement activées par les peptides alimentaires (Foltz et al. 2008). Dernièrement, une étude chez des porcs vagotomisés a remis en cause le rôle prédominant du nerf vague. Le blocage de CCK-1R dans les afférences vagales abdominales n'a pas empêché l'augmentation du niveau plasmatique de CCK et la satiété après un repas liquide (Ripken et al., 2015). Cela met en évidence que d'autres récepteurs CCK-1R

périphériques ou centraux pourraient être impliqués et jouer un rôle plus important que ceux situés dans les neurones afférents vagues.

4.3.2.3 Action des protéines sur la dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), enzyme clé de l'homéostasie énergétique

La dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) est une enzyme impliquée dans l'homéostasie énergétique qui agit sur la prise alimentaire en modifiant l'activité satiétogène des hormones GLP-1 et PYY notamment. En effet, une étude de Fujiwara (2012), montre que l'administration intra portale d'un inhibiteur de la DPP-IV chez des rats augmente les concentrations plasmatiques de GLP-1 et d'insuline et réduit la prise alimentaire entre 1 à 12h (Fujiwara et al., 2012). Dans le cas de la régulation de l'homéostasie du glucose, la DPP-IV joue un rôle important en inactivant les incrétines GLP-1 et GIP, menant ainsi à une perte de leur activité insulinothropique. Le clivage du PYY₁₋₃₆ par la DPP-IV en PYY₃₋₃₆ ne modifie pas l'activité pancréatique qui est conservée (Lafferty et al., 2018b).

Cette enzyme est également impliquée dans de nombreux mécanismes impliqués dans l'immunité, le cancer, la neuroendocrinologie ou encore l'inflammation. C'est une enzyme largement exprimée dans l'organisme, présente dans une grande variété de tissus. Elle est principalement exprimée sous forme transmembranaire notamment par les cellules endothéliales et intestinales, mais il existe également une forme soluble de la DPP-IV dans le plasma et d'autres fluides corporels (Lambeir et al., 2003).

La DPP-IV est une aminopeptidase stricte appartenant à la famille des protéases à sérine, responsable de l'activation ou de l'inactivation d'un grand nombre de peptides bioactifs. Elle libère un dipeptide en clivant sélectivement le dipeptide N-terminal des peptides ayant une proline ou une alanine placée en deuxième position. Le remplacement de l'avant dernier résidu par une sérine, une glycine, une valine ou une isoleucine ne supprime pas complètement le clivage par la DPP-IV, mais celle-ci présente une affinité plus faible que pour son substrat préférentiel. Par contre, un résidu de proline ou d'hydroxyproline en troisième position inactive totalement la DPP-IV. Il s'agit d'une enzyme peu spécifique qui connaît un large éventail de substrats peptidiques. La DPP-IV, représentée par la **Figure 24**, est une glycoprotéine possédant 766 AA et composé de deux homodimères, liés symétriquement et ayant chacun une masse moléculaire de 110 kDa (Engel et al., 2006).

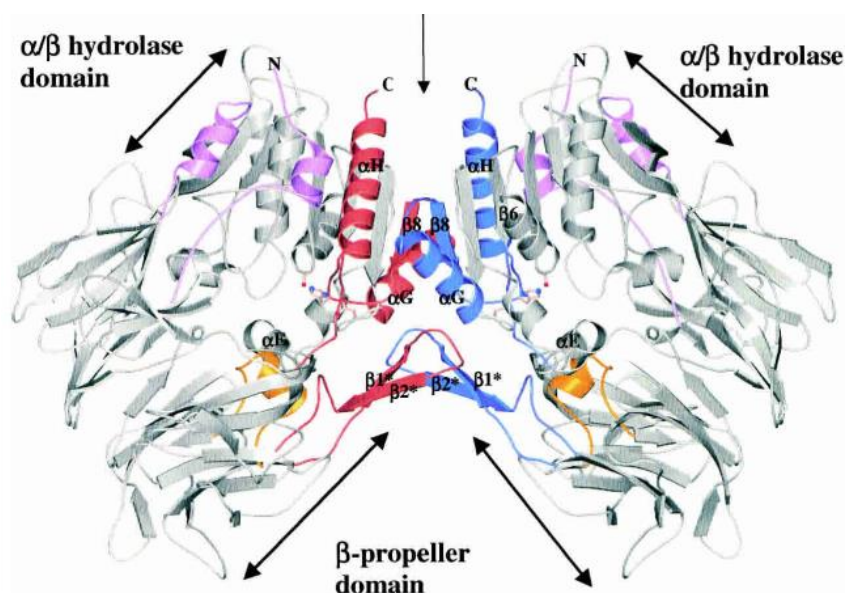


Figure 24: Diagramme en ruban montrant la structure globale de l'homodimère DPP-IV, vu perpendiculairement entre les deux homodimères (issu de Aertgeerts et al. 2004) Les éléments structuraux secondaires impliqués dans la formation des dimères sont représentés en rouge et en bleu. Les résidus du site actif sont indiqués par (*). Les hélices α -E contenant les résidus E205 et E206 sont indiquées en couleur or et déterminent la fonction aminopeptidase de la DPP-IV.

Sa forme transmembranaire possède un domaine extracellulaire (résidus 39–766) constitué d'un domaine hydrolase α/β et d'un domaine β -propeller recouvrant le site actif. Le domaine β -propeller contrôle l'accès des substrats au site actif qui peuvent théoriquement y accéder de deux manières possibles : par une ouverture dans le domaine β -propeller ou par une ouverture latérale formée à l'interface des domaines β -propeller et hydrolase α/β .

L'inhibition de l'activité de la DPP-IV est devenue une cible thérapeutique pour le T2D car elle permet de prolonger l'action des incrétines et ainsi d'améliorer la tolérance au glucose (R. Liu et al., 2019). Par conséquent, les inhibiteurs de la DPP-IV protègent les incrétines du clivage enzymatique et augmentent la demi-vie des hormones actives. Les inhibiteurs de la DPP-IV (communément appelés gliptines) sont une classe de médicaments émergents qui peuvent être classés, en fonction de leur structure, en inhibiteurs peptidomimétiques ou non peptidomimétiques (Gupta & Kalra, 2011). Les composés peptidomimétiques sont conçus pour imiter le dipeptide N-terminal qui est clivé par la DPP-IV. La plupart de ces inhibiteurs synthétiques de la DPP-IV sont généralement plutôt bien tolérés, cependant, ils peuvent

entraîner des effets indésirables importants, comme des maux de tête, des infections urinaires et des voies respiratoires supérieures (Vernooy et al., 2009).

Pour contrer ces effets indésirables, la recherche s'est actuellement orientée vers la découverte d'inhibiteurs naturels de la DPP-IV. Dans cette nouvelle stratégie, les protéines semblent être de bonnes candidates par la production de peptides inhibiteurs de la DPP-IV. Ces dernières années, de nombreux peptides issus des protéines agro-alimentaires ont été identifiés comme inhibiteurs de cette enzyme (Theysgeur et al. 2020 ; Rivero-Pino 2021; Jin et al. 2020 ; Amini Sarteshnizi et al. 2021 ; Harnedy-Rothwell et al. 2020). Bien qu'ils soient moins puissants que les médicaments, ils ont montré un intérêt croissant en tant qu'alternative naturelle aux inhibiteurs chimiques de la DPP-IV qui peuvent présenter des effets secondaires importants (Nongonierma & FitzGerald, 2016c). Ils sont envisagés comme une nouvelle perspective thérapeutique dans la prévention et le traitement du T2D.

Dans la littérature, les valeurs d'IC₅₀, valeur mesurant la concentration médiane pour inhiber une fonction biologique, mesurées pour des hydrolysats protéiques varient de 0,5 mg.mL⁻¹ à environ 5 mg.mL⁻¹ (Dugardin et al., 2020; Rivero-Pino, 2021; Santos-Hernández et al., 2021; Theysgeur et al., 2020). Les mesures d'IC₅₀ sont réalisées par des test *in vitro* suivant la méthode décrite par Lacroix et Li-Chan (2012) et/ou plus récemment par une méthode utilisant la lignée cellulaire Caco-2, méthode développée au laboratoire par Caron et al. (2017a).

Grâce au nombre important de peptides identifiés pour leur action inhibitrice de la DPP-IV, des études ont développé un modèle *in silico* (QSAR) capable de prédire l'IC₅₀ potentielle de nouveaux peptides à partir d'un modèle mathématiques capable de relier structure et activité (Nongonierma & FitzGerald, 2016a). En effet, il a été mis en évidence que les peptides présentant la plus forte inhibition de l'activité DPP-IV, sont de faible poids moléculaire et possèdent un AA à chaîne ramifiée tel que la leucine, l'isoleucine ou la valine, ou encore un résidu aromatique avec un groupe polaire dans la chaîne latérale (principalement le tryptophane) en position N-terminale et la présence de proline ou d'alanine en seconde position du coté C-terminale. Grâce à cette méthode, de nouveaux peptides ont pu être découverts *in silico* et testés *in vitro*.

4.3.3 Implication de l'ingestion des protéines dans la régulation à long terme de la prise alimentaire

La régulation à long terme de la prise alimentaire a pour rôle le maintien d'un poids corporel adapté et stable et le contrôle de la composition en graisses de l'organisme. Cette régulation implique des hormones issues de la périphérie apportant des informations sur les réserves en énergie de l'organisme. Cela implique, le stockage de l'énergie sous forme de triglycérides par le tissu adipeux, le taux de glucose disponible via tous les organes impliqués dans la régulation de la glycémie et l'état nutritionnel de l'organisme impliquant la vidange de l'estomac. Les hormones impliquées dans cette régulation dite à « long terme », sont sécrétées proportionnellement aux réserves adipeuses et à la quantité d'énergie consommée sur une période plus prolongée. Ces hormones sont principalement la ghréline, la leptine et les hormones pancréatiques telles que l'insuline et le glucagon.

4.3.3.1 Les hormones de la régulation à long terme de la prise alimentaire

4.3.3.1.1 La ghréline

La ghréline a la particularité d'être la seule hormone gastro-intestinale orexigène. Elle a été découverte en 1999 pour sa capacité à stimuler la sécrétion de l'hormone de croissance et de l'ACTH (M. Kojima et al., 1999). Depuis, de nombreux rôles physiologiques ont pu lui être attribués. Elle augmente l'appétit et l'apport en nutriments, diminue la pression artérielle moyenne, augmente le débit cardiaque, améliore la motilité intestinale et la sécrétion d'acide gastrique, influence la dépense énergétique en favorisant la prise de poids, affecte l'apprentissage et la mémoire et contribue aux aspects hédoniques de la nourriture (Gray et al., 2019). La ghréline est une hormone peptidique de 28 AA, sécrétée sous la forme de proghréline par les cellules P/D1 (ou X/A-like) et par les cellules ϵ du pancréas en infime proportion (Poher et al., 2018). La proghréline est clivée en ghréline et en obéstatine (J. V. Zhang et al., 2005). La ghréline est sécrétée de façon épisodique et la fluctuation de ces épisodes dépend du niveau des réserves énergétiques. Un bilan énergétique négatif provoqué par une privation de nourriture induit des épisodes de sécrétion de plus haute amplitude et à fréquence accélérée (Kalra et al., 2005). L'ingestion de nourriture diminue fortement sa sécrétion. La ghréline induit son activité orexigène via le récepteur de l'hormone de croissance GHSR1a qui est fortement exprimé au niveau central dans l'hypophyse, l'ARC, l'hippocampe, la substance noire (SN), le VTA et les

noyaux du raphé et au niveau périphérique dans les îlots pancréatiques, les glandes surrénales, la thyroïde et le myocarde (Gnanapavan et al., 2002; Guan et al., 1997). Une fois produite, la ghréline a une demi-vie qui varie de 30 min chez le rat à 240 min chez l'homme (De Vriese et al., 2004).

La ghréline agit sur la prise alimentaire via l'activation des neurocircuits hypothalamiques (Tschöp et al., 2000). Elle active les neuropeptides NPY/AgRP et inhibe en parallèle les neurones POMC (Cowley et al., 2003; Willesen et al., 1999).

Au regard de son effet sur le système mélanocortinergique, la ghréline semble contrecarrer l'inhibition de la prise alimentaire par la leptine (Kalra et al., 2005). Outre sa capacité à stimuler la prise alimentaire, la ghréline active la vidange gastrique, la motilité gastro-intestinale, ainsi que la sécrétion d'acide gastrique (Asakawa et al., 2001; Masuda et al., 2000). Elle module également le système de récompense alimentaire en favorisant les sensations gustatives, la motivation envers la récompense alimentaire et en améliorant la sensibilité olfactive (Cai et al., 2013; Overduin et al., 2012; Skibicka et al., 2012; Tong et al., 2011). Les fonctions de la ghréline sont schématisées sur la **Figure 25**. La ghréline a également un impact dans la régulation du glucose à la fois pendant les phases de jeûne que d'alimentation ou de stress (Poher et al., 2018). Des effets sur la dépense énergétique sont fréquemment rapportés lors de l'administration de ghréline. Une injection périphérique ou centrale (IV) unique de ghréline supprime l'activité nerveuse sympathique du tissu adipeux brun et diminue ainsi la thermogénèse induite via des mécanismes dépendants du SNC (Mano-Otagiri et al., 2009; Yasuda et al., 2003). Une administration chronique de ghréline diminue l'expression des ARNm e l'Ucp1 dans le BAT (Tsubone et al., 2005).

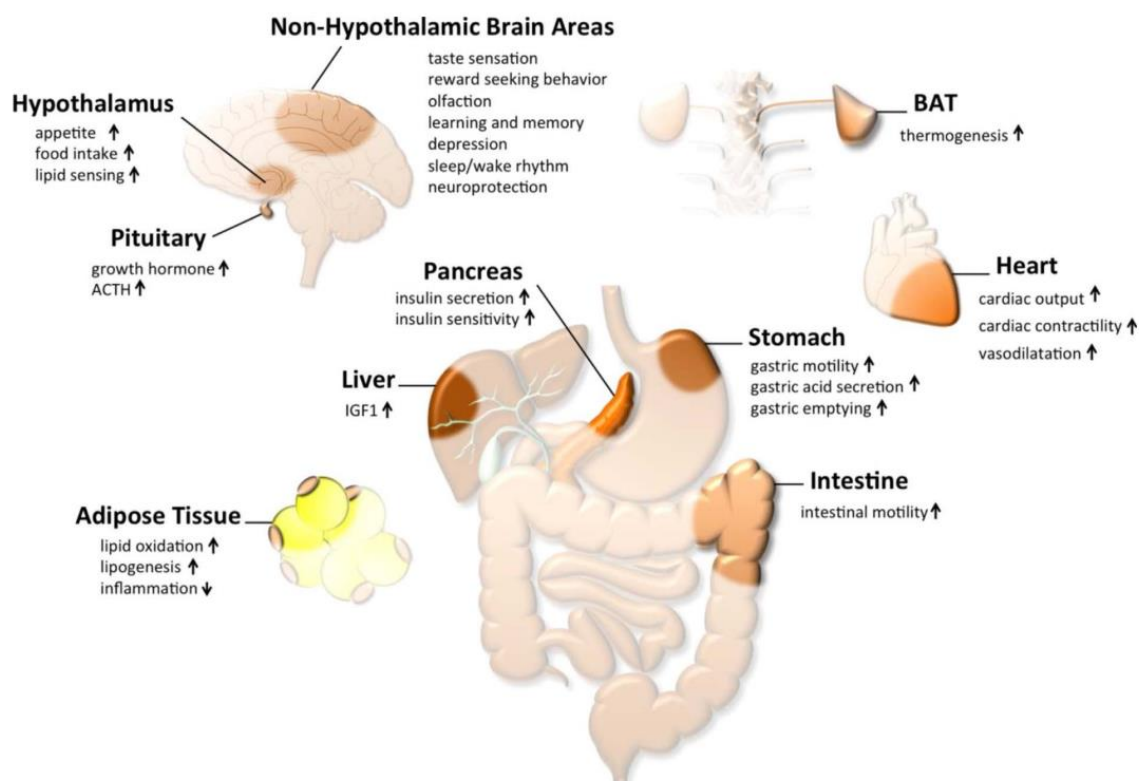


Figure 25: Effets physiologiques de la ghréline sur les différents tissus (issus de Poher, 2018). Les flèches vers le haut représentent un effet stimulateur tandis que celle vers le bas représentent un effet inhibiteur. BAT : tissu adipeux bruns ; IGF1 : Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline ; ACTH : hormone adrénocorticotrope.

4.3.3.1.2 La leptine : hormone du signal adipeux

La leptine, dite « hormone de la satiété » régule les réserves de graisse de l'organisme et la prise alimentaire en contrôlant la sensation de satiété. C'est une hormone clé de la régulation à long terme de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique. Elle agit comme un signal de rétrocontrôle inhibiteur dans la régulation de la balance énergétique (Harris, 2014).

Le premier site de production de la leptine est le tissu adipeux blanc, bien qu'elle soit également sécrétée de façon plus anecdotique dans d'autres tissus tels que l'estomac (Owyang & Heldinger, 2011) les poumons (Vernooy et al., 2009), le placenta (Hoggard et al., 1997) et possiblement le cerveau (Wiesner et al., 1999). Sa sécrétion est positivement corrélée au volume de graisse de l'organisme, et ses niveaux chutent durant les périodes de jeûne (Considine et al., 1996). Elle est sécrétée de manière pulsatile avec une fréquence de décharge similaire à celle de la ghréline. Cependant, contrairement à l'accélération de la sécrétion de ghréline lors d'une privation d'énergie, la fréquence des impulsions de leptine ralentit, diminuant ainsi la

production globale de leptine. L'hypersécrétion de ghréline préprandiale coïncide avec de faibles niveaux circulants de leptine. D'autre part, une augmentation progressive de l'hypersécrétion de leptine précède la baisse postprandiale de la sécrétion de ghréline (Kalra et al., 2005).

La leptine agit sur le tissu adipeux en stimulant la lipolyse, en inhibant la lipogénèse et en augmentant la sensibilité à l'insuline (Harris, 2014). Elle contrôle également la taille et la prolifération des adipocytes (Harris, 2014). Ainsi un déficit en leptine peut favoriser une prise de masse grasse et peut conduire à une obésité. Elle agit également sur le pancréas, où elle inhibe la sécrétion d'insuline (Shimomura et al., 1999).

Le deuxième rôle de la leptine est de réguler la prise alimentaire en favorisant la satiété lorsque le bilan énergétique est positif (Rosenbaum & Leibel, 2014). Sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique lui permet de communiquer le niveau des réserves en graisses du tissu adipeux au cerveau. Ainsi, elle agit directement en inhibant l'action orexigène de la ghréline et en favorisant la dépense énergétique via les récepteurs Lep_b présents au niveau des neurones hypothalamiques et des voies afférentes vagues (Cifuentes & Acosta, 2022). La leptine augmenterait également la dépense énergétique en stimulant la thermogénèse des muscles squelettiques via son action sur le SNC (Dulloo et al., 2002). Au niveau périphérique, il a été montré que la leptine modulait l'absorption des macronutriments en diminuant l'absorption des glucides et en améliorant l'absorption des peptides par le transporteur PepT1 (Yarandi et al., 2011). La leptine potentialise également l'action de la CCK sur le nerf vague pour réduire l'apport alimentaire à court terme chez les rongeurs (Koizumi et al. 2020). De cette manière, la leptine, en interagissant avec la CCK, devient un médiateur majeur du contrôle de la prise alimentaire à court terme et un régulateur de l'homéostasie énergétique à long terme. (Owyang & Heldsinger, 2011)

4.3.3.1.3 *L'Insuline*

L'insuline est une hormone peptidique endocrinienne hypoglycémiante. C'est une hormone centrale du métabolisme glucidique. Elle est sécrétée par les cellules β du pancréas en réponse à une élévation de la glycémie. Elle agit principalement sur les tissus périphériques hépatiques, musculaires et adipeux où elle exerce son action hypoglycémiante par un effet direct en favorisant l'anabolisme du glucose en glycogène par les cellules hépatiques et musculaires et

les lipides en triglycérides par les adipocytes. Elle inhibe également les voies métaboliques antagonistes de la glycogénolyse et de la lipolyse dans ces mêmes tissus et diminue la sécrétion de glucagon de manière paracrine (Petersen & Shulman, 2018)

L'insuline est également impliquée dans la régulation de la prise alimentaire où elle reflète le niveau des réserves de glucose de l'organisme. Elle agit directement au niveau central en supprimant la faim (Benedict et al., 2008). Elle freine l'apport alimentaire pour maintenir un poids corporel sain. De plus, il a été mis en évidence qu'il y avait une forte corrélation entre le degré d'adiposité et les taux de sécrétion d'insuline (Porte & Woods, 1981). L'insuline, par sa faculté à traverser la barrière hémato-encéphalique par transcytose (Baura et al., 1993), agit sur le SNC en modulant des fonctions relatives à la mémoire, la perception olfactive, la régulation de la prise alimentaire car elle contrôle les émotions et le comportement alimentaire (Kullmann et al., 2016). Chez des primates, des infusions d'insuline dans le PVN réduisent la prise alimentaire (Woods et al., 1979), tandis qu'une diminution des récepteurs à l'insuline induit une hyperphagie chez les rats (Obici et al., 2002).

4.3.3.1.4 *Glucagon*

Le glucagon est une hormone clé du métabolisme du glucose et un acteur central de la régulation de l'homéostasie énergétique. Ce peptide est sécrété principalement par les cellules α pancréatiques mais peut aussi être sécrété au niveau du tractus gastro-intestinal en quantité moindre par un clivage du proglucagon par l'enzyme PC2. Du glucagon est également exprimé au niveau du NTS (P. J. Larsen et al., 1997; Lovshin & Drucker, 2000). Le glucagon est une hormone hyperglycémiant connue pour avoir les fonctions métaboliques opposées à celles de l'insuline. Il stimule la production de glucose via la glycogénolyse hépatique ou la gluconéogenèse, aidant ainsi à maintenir une glycémie constante pendant les états d'utilisation rapide du glucose ou de jeûne. La sécrétion de glucagon est gluco-dépendante. L'hypoglycémie est à l'origine d'une forte augmentation des sécrétions de glucagon contrairement à l'hyperglycémie. Néanmoins, du glucagon est également sécrété immédiatement après un repas, notamment lors de repas riches en protéines et pauvres en glucides (de Jong et al., 1977; Langhans et al., 1984) ou après une simulation d'alimentation (Nilsson & Uvnäs-Wallensten, 1977). En condition postprandiale, le glucagon participerait à réduire la glycémie en stimulant la sécrétion d'insuline (Capozzi et al., 2019). Il est admis que cette sécrétion prandiale de glucagon agirait comme un signal de satiété conduisant à l'arrêt du repas. Une administration répétée de glucagon en quantité suffisante réduit l'apport alimentaire sans aucun autre effet

métabolique secondaire (Geary, 1990, 1996). De plus, contrairement à l'insuline et à l'amyline, la sécrétion basale et prandiale de glucagon n'est pas liée au degré d'adiposité corporelle (Holst et al., 1983; Raben et al., 1994).

Le glucagon induit ses effets grâce au récepteur GCGR qui est exprimé principalement dans le foie et les reins et de manière plus faible dans les muscles intestinaux, le cerveau, le tissu adipeux, le cœur et les cellules α et β pancréatiques (Kieffer et al., 1996; Svoboda et al., 1994). Le glucagon module la satiété chez l'Homme (Penick & Hinkle, 1961; Schulman et al., 1957) et chez le rat (Geary & Asarian, 2001; Quiñones et al., 2015), principalement en réduisant la taille du repas via une action sur l'axe foie-cerveau (Geary et al., 1993). L'action anorexigène du glucagon est initiée dans le foie, qui est capable de détecter les niveaux de glucagon dans la veine porte hépatique et d'envoyer l'information par les afférences vagues au SNC. Ainsi, la branche hépatique du nerf vague véhicule le signal de satiété vers *l'area postrema* et le NTS, et de là, le signal neuronal est transporté vers l'hypothalamus. Il est important de noter que l'effet du glucagon sur l'inhibition de la prise alimentaire n'est pas toujours retrouvé. Par exemple, l'administration de glucagon pendant plus de six mois n'affecte pas l'alimentation dans un modèle de rats Zucker obèses présentant une altération de la signalisation de la leptine (E. K. Chan et al., 1984). Le glucagon favorise également une perte de poids dans des conditions physiologiques saines et pathologiques chez l'Homme et les rongeurs (Bloom & Polak, 1987; de Castro et al., 1978; Schulman et al., 1957) probablement en stimulant la dépendance énergétique et l'oxydation des lipides (T. Kim et al., 2018). La **Figure 26**, ci-dessous schématise l'ensemble des actions de l'insuline et du glucagon sur les tissus périphériques.

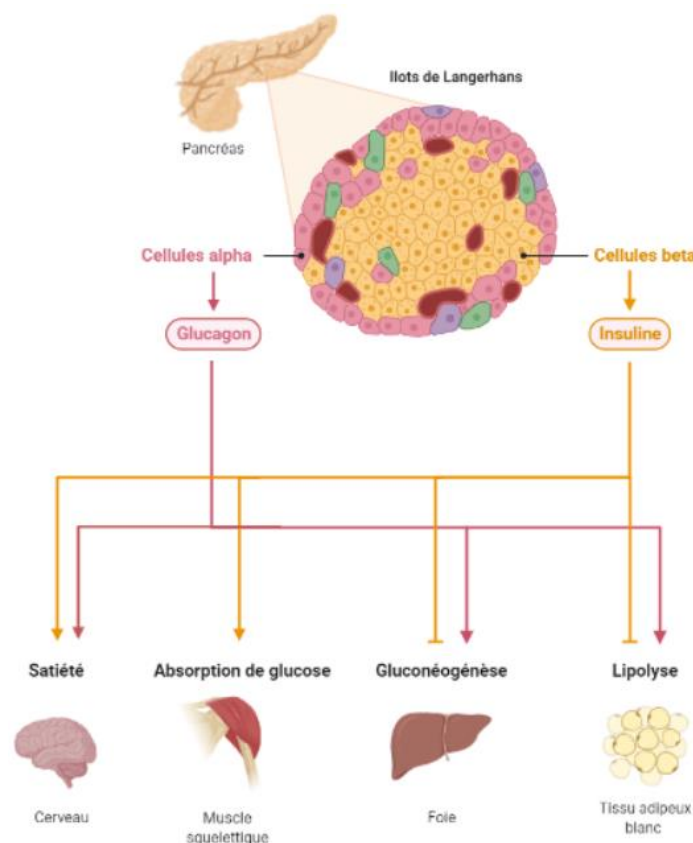


Figure 26: Rôle de l'insuline et du glucagon. Les traits de couleur jaune se réfèrent à l'action stimulatrice ou inhibitrice de l'insuline sur les tissus périphériques et les traits de couleur rouge correspondent à l'action du glucagon. L'insuline, sécrétée par les cellules β , favorise l'absorption de glucose par les tissus musculaires et la satiété et inhibe la gluconéogenèse et la lipolyse. Le glucagon, sécrété par les cellules α , stimule la lipolyse, la gluconéogenèse et la satiété.

4.3.3.2 Influence de l'homéostasie glucidique dans la régulation de la prise alimentaire

La glycémie reflète et contrôle la quantité d'énergie stockée sous formes de triglycérides et de glycogène. La glycémie est un signal important qui contrôle la sécrétion d'hormones par diverses cellules endocrines et active les neurones des systèmes nerveux périphérique et central. Parce que le cerveau tire son énergie métabolique presque exclusivement du glucose, il y a une exigence à ce que les niveaux glycémiques restent stables. Pour cela, le système nerveux central possède un système critique de détection du glucose qui contrôle l'homéostasie du glucose, le comportement alimentaire et le stockage de l'énergie (Marty et al., 2007).

A partir du moment où du glucose est consommé, celui-ci va stimuler les récepteurs du goût présent dans la cavité buccale et les fibres neuronales afférentes qui se projettent vers le SNC initiant une sécrétion d'insuline (Ahrén et al., 2000).

Le glucose est absorbé au niveau des entérocytes principalement par le transporteur SGLT1 au niveau apical et par le transporteur GLUT2 au niveau basal (**Figure 27**). Le transporteur GLUT2 peut être transloqué au pôle apical des entérocytes pour participer à l'absorption de glucose en condition d'hyperglycémie ou dans certaines conditions pathologiques (Koepsell, 2020; Lehmann & Hornby, 2016).

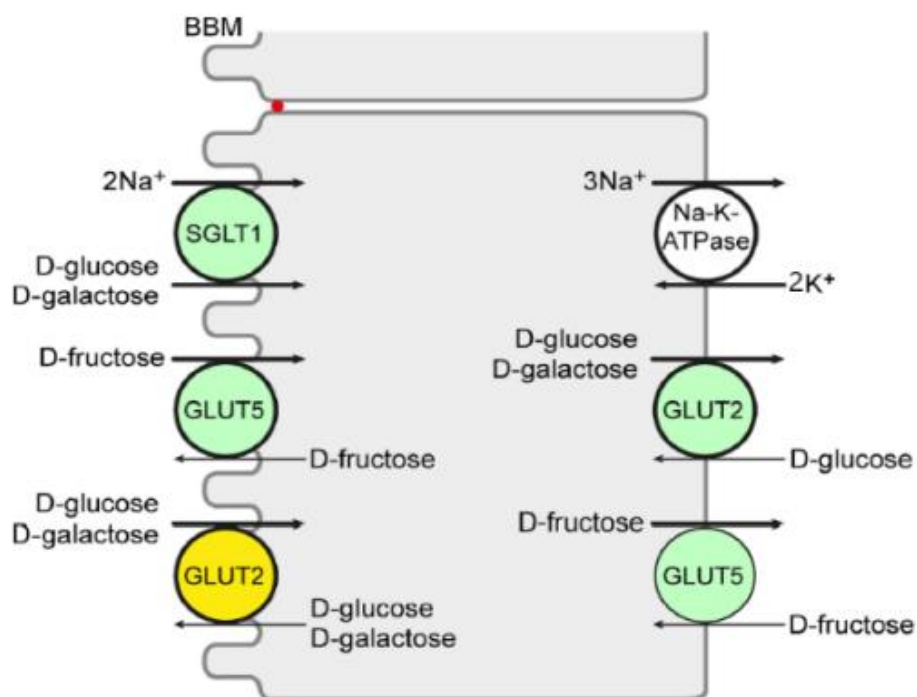


Figure 27: Absorption intestinale des monosaccharides, d'après Koepsell 2020 . Le D-glucose est absorbé au niveau de la bordure en brosse (BBM) principalement par le transporteur SGLT1. Il rejoint la circulation générale grâce au transporteur GLUT2 du côté basolatéral des entérocytes. Dans des conditions d'hyperglycémie ou dans certaines conditions pathologiques (représenté en jaune), le transporteur GLUT2 se délocalise vers la bordure en brosse pour absorber du glucose. Le D-fructose est transporté par GLUT5 au niveau apical. Une pompe Na^+/K^+ ATPase est présente au niveau basolatéral pour entretenir un gradient de Na^+ .

L'arrivée de glucose dans l'intestin va stimuler la sécrétion de GLP-1, de PYY, de PP et de GIP par les cellules entéroendocrines par un mécanisme qui dépend partiellement des transporteurs SGLT1 et GLUT2 et des récepteurs du goût (Gerspach et al., 2011; Kuhre et al., 2015, 2017; Mabileau et al., 2018). Il y a également une activation des neurones entériques via le co-transporteur SGLT3 (Díez-Sampedro et al., 2003). Une fois que le glucose atteint la circulation sanguine, l'augmentation de la glycémie va être détectée par le pancréas endocrine qui va

induire une libération de la somatostatine par les cellules δ et de l'insuline par les cellules β (B. Singh et al., 2021), par le foie qui va favoriser le stockage du glucose en glycogène et par les fibres afférentes vagues qui se projettent vers le NTS et l'hypothalamus délivrant un sentiment de satiété (Marty et al., 2007).

L'homéostasie énergétique et le métabolisme du glucose sont intimement liés. Beaucoup d'hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire sont également impliquées dans la régulation du glucose par une action sur l'activité pancréatique, hépatique, intestinale ou encore cérébrale, comme le résume la **Figure 28**.

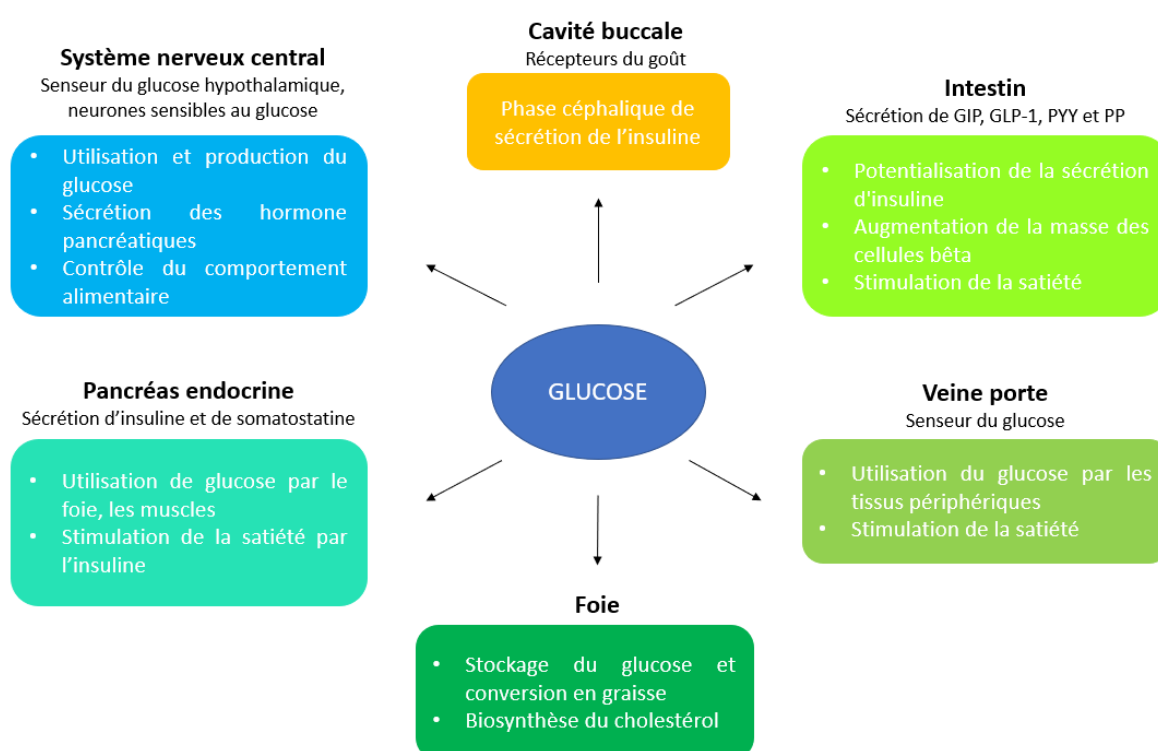


Figure 28: Impact du glucose sur les organes périphériques et la prise alimentaire (issus de Marty, Dallaporta, et Thorens 2007). Dans la bouche, le glucose active les récepteurs du goût qui stimulent la sécrétion d'insuline par un réflexe vagal impliquant le tronc cérébral et l'hypothalamus. Dans l'intestin, le glucose déclenche la libération des hormones GIP, GLP-1, PYY et PP par les cellules entéroendocrines, respectivement. Ces hormones potentialisent la sécrétion d'insuline, régulent la vidange gastrique, inhibent la prise alimentaire et ont également des effets trophiques sur la masse et la fonction des cellules bêta. Le glucose régule également les neurones du système nerveux autonome présents dans la paroi intestinale via des mécanismes nécessitant le cotransporteur $\text{Na}^+ / \text{glucose}$ SGLT3, qui est une isoforme SGLT jouant plus le rôle de détection plutôt que de transport du glucose. L'entrée du glucose dans la veine porte active un capteur de glucose qui est lié aux nerfs afférents vagues se projetant vers le cerveau et l'hypothalamus et qui contrôle l'utilisation du glucose par plusieurs tissus, la première phase de sécrétion d'insuline et la satiété. Dans le foie, le glucose stimule le stockage du

glycogène. Le glucose active également le récepteur nucléaire LXR et donc peut lier l'augmentation du glucose à la stimulation de la biosynthèse du cholestérol. Enfin une augmentation de la glycémie systémique entraîne la stimulation de la sécrétion d'insuline par les cellules bêta pancréatiques et supprime celle du glucagon.

4.3.3.3 Impact de l'ingestion des protéines dans la régulation de l'homéostasie glucidique

Il a été montré que les protéines alimentaires amélioreraient la régulation du glucose et sont de ce fait une cible intéressante dans un contexte de lutte contre l'obésité et le T2D. En effet, plusieurs études menées chez des rongeurs et des humains ont montré que les régimes hyperprotéinés améliorent l'homéostasie du glucose (Boden et al., 2005; Gannon et al., 2003; Luger et al., 2013). Certains travaux ont mis en évidence que l'ingestion de protéines avant un repas permettait de diminuer la glycémie post-prandiale chez des sujets sains et diabétiques (Dale et al., 2018). Elles limiteraient l'augmentation de la glycémie en augmentant la sécrétion d'insuline. (Akhavan et al., 2014; Drummond et al., 2018; Gunnerud et al., 2013; J. S. Kim et al., 2019). L'effet hypoglycémiant des protéines a particulièrement été observé avec les protéines laitières (Drummond et al., 2018; Kung et al., 2018; Malik et al., 2016), les protéines de soja (Kashima et al., 2016), la gélatine de poisson (Dale et al., 2018; Lavigne et al., 2000) et les protéines de pois (Johnston et al., 2021)

Les protéines agissent sur l'homéostasie glucidique en contrôlant l'absorption du glucose au niveau intestinal de plusieurs manières et en régulant les hormones intestinales et pancréatiques impliquées dans le métabolisme.

4.3.3.3.1 Effet inhibiteur des peptides sur l'absorption du glucose

Il a récemment été mis en évidence que les peptides générés par l'hydrolyse des protéines de haricot induisaient une diminution de l'absorption du glucose dans des cellules Caco-2 (Mojica et al. 2018), suggérant que la détection de ces peptides au niveau intestinal pouvait réguler l'expression des gènes des transporteurs GLUT2 et SGLT1 et moduler la localisation de ces transporteurs à partir de la lumière intestinale vers pole basale. En effet, la présence des peptides semble bloquer le processus de translocation de GLUT2 vers le pôle apical et inhiber l'expression des gènes SGLT1 et GLUT2. Cette inhibition se ferait via un blocage des voies de signalisations PKC et AMPK.

4.3.3.3.2 *Stimulation des incrétines et de l'insuline*

Comme vu précédemment, les peptides issus de la digestion des protéines alimentaires stimulent la libération des hormones GLP-1 et CCK par les cellules entéroendocrines de l'intestin au cours d'un repas.

Santos-Hernández et al. (2021) ont mis en évidence l'effet positif des digestats protéiques d'œuf, de caséines et de lactosérum sur l'augmentation intracellulaire de calcium à l'origine de la sécrétion de GLP-1, de CCK et d'insuline, respectivement par les cellules STC-1 et BRIN-BD11. Cette étude a également montré que ces digestats protéiques étaient à l'origine d'une sécrétion indirecte d'insuline par les BRIN-BD11 due au GLP-1 sécrété par une co-culture de Caco-2/STC-1 mimant la barrière intestinale.

L'équipe de Dranse et al. ont également mis en évidence que l'administration aiguë d'hydrolysats de caséine, directement dans la partie supérieure de l'intestin grêle améliorait la tolérance au glucose via le transporteur PepT1 qui est impliqué dans la libération des incrétines et qui serait à l'origine d'une diminution de la production de glucose hépatique. Le rôle glucorégulateur de PepT1 dans la partie supérieure de l'intestin grêle de rats sains a été démontré par la perturbation de l'homéostasie du glucose après une alimentation riche en protéines lorsque PepT1 était inhibé. Les mécanismes de détection des protéines médiés par PepT1 ont également participé à améliorer l'homéostasie du glucose dans les modèles de résistance précoce à l'insuline et d'obésité (Dranse et al., 2018).

4.3.3.3.3 *Inhibition de l'alpha-amylase et de l'alpha glucosidase*

L' α -amylase et l' α -glucosidase sont deux enzymes digestives qui participent à la digestion des glucides. L' α -amylase est sécrétée par les glandes salivaires et le pancréas pour convertir l'amidon et le glycogène en glucose ou en maltose et de façon similaire, l' α -glucosidase est une enzyme de l'épithélium intestinal qui hydrolyse l'amidon et les disaccharides en glucose. Ces deux enzymes facilitent l'absorption du glucose et augmentent ainsi la glycémie (Zambrowicz et al., 2015). De ce fait, les inhibiteurs de ces deux enzymes participent à réduire l'absorption de glucose et les pics de glycémie.

Ces 5 dernières années, de nombreux peptides issus de protéines alimentaires ont été identifiés pour leur capacité à inhiber l' α -amylase et l' α -glucosidase. A titre d'exemple, l'équipe de Siow, et al (2017) a découvert deux peptides inhibiteurs de l' α -amylase (CSP4: RCMAFLSDGAAAAQQLLPQYW et CSP6: DPAQPNYPWTAVLVFRH) issus de la graine de cumin. Ces peptides avaient des valeurs respectives d'IC₅₀ de 0,04 μ M et 0,15 μ M. Evaristus, et al (2018) ont également identifié des peptides inhibiteurs de l' α -amylase à partir de vingt protéines de graines de *Nephelium* grâce à une approche bio-informatique. Admassu et al. (2018) ont identifié deux peptides inhibiteurs de l' α -amylase, GGSK et ELS, dans des hydrolysats de protéines d'algue rouge (*Porphyra sp*). Après synthèse chimique, les deux peptides présentaient toujours une activité inhibitrice, avec des valeurs respectives d'IC₅₀ de 2,58 \pm 0,08 mM pour GGSK et de 2,62 \pm 0,05 mM pour ELS. De plus, d'autres peptides inhibiteurs de l' α -amylase ont été extraits avec succès d'un isolat de protéines de haricot pinto (Ngoh et al. 2017), à partir d'albumine (Yu et al. 2012), à partir de lait (Mohanty et al., 2016), de quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild.) (Vilacundo, 2017) et de *Phaseolus vulgaris* L (Haricot) (Cian et al., 2019; Oseguera-Toledo, 2015). La plupart des études menées sur les peptides inhibiteurs de l' α -amylase se sont principalement concentrées sur l'activité inhibitrice sur des modèles *in vitro*. Peu d'études ont étudié leurs effets potentiels *in vivo*. Seuls D'Souza et al. (2012) ont testé, sur des souris diabétiques, un peptide inhibiteur de l' α -amylase, GHWYYRCW, surexprimé dans une souche de *Lactococcus lactis* modifiée. Après 20 jours de consommation de yaourt fermenté par le *Lactococcus lactis* producteur de peptide inhibiteur de l' α -amylase, les souris ont montré une réduction de leur glycémie. Dans ce contexte, une étude plus approfondie de l'effet de ces peptides inhibiteurs *in vivo* semble nécessaire.

En ce qui concerne les inhibiteurs de l' α -glucosidase, ils limitent également l'absorption des glucides dans l'intestin et contrôlent la glycémie. Cette activité implique l'inhibition compétitive de l' α -glucosidases dans l'intestin grêle, réduisant le taux de décomposition de l'amidon en glucose, ralentissant ainsi l'absorption du glucose dans l'intestin et réduisant l'hyperglycémie postprandiale. Les inhibiteurs de l' α -glucosidase peuvent également réduire les niveaux d'insuline postprandiale et augmenter la sensibilité à l'insuline. Dans l'ensemble, les inhibiteurs de l' α -glucosidase ont un grand potentiel en tant que médicaments hypoglycémisants et plusieurs peptides, ayant une activité inhibitrice, ont été isolés à partir de protéines alimentaires et de plantes. Les peptides KLPGF et NVLQPS dérivés de l'albumine ont présenté une activité d'inhibition de l' α -glucosidase, avec des valeurs IC₅₀ de 59,5 \pm 5,7 et 100,0 \pm 5,7 μ M, respectivement. L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase du KLPGF était comparable à celle de

l'acarbose, un inhibiteur thérapeutique de l' α -glucosidase ($IC_{50} = 60,8 \mu M$) (Yu et al., 2012). Trois peptides isolés du quinoa, IQAEGGLT, DKDYPK et GEHGSDGNV, ont montré une activité similaire contre l' α -glucosidase (Vilacundo, 2017). La fraction a montré une capacité d'inhibition de l'activité de l' α -glucosidase de $76,4 \pm 0,5 \%$ (Oseguera-Toledo, 2015).

4.4 Impact de l'origine des protéines sur la prise alimentaire et l'homéostasie glucidique

Les protéines alimentaires sont considérées comme le macronutriment le plus satiétogène (Bensaïd et al., 2002; Hill & Blundell, 1986; Stubbs et al., 1995). Cependant, les études sur le pouvoir satiétogène en lien avec la qualité et la source protéique sont limitées et parfois incohérentes (Hall et al. 2003; Bohl et al. 2016; Burton-Freeman, Gietzen, et Schneeman 1997; Geraedts et al. 2011).

Les travaux portant sur cette thématique sont relativement peu nombreux et difficiles à comparer puisque les protocoles utilisés, les sujets d'étude et les paramètres étudiés ne sont pas systématiquement les mêmes. Certains d'entre eux s'intéressent à l'effet satiétogène des protéines à long terme sur la perte de poids tandis que d'autres, à l'effet satiétogène à court terme qui peut être étudié de 30 min, jusqu'à 4h après le repas, soit chez des individus obèses ou diabétiques, soit chez des individus sains (Bendtsen et al., 2013a; Bowen et al., 2006; Kung et al., 2018; Pal et al., 2014). Les outils utilisés diffèrent également pour mesurer la satiété (questionnaires, mesure de la prise alimentaire, dosage des hormones satiétogènes). Dans les études cliniques, les protéines peuvent être ingérées de manière différente, à savoir sous formes liquide ou solide, dans une matrice alimentaire en proportions différentes ou seules, en précharge avant un repas ou intégrées dans le repas, en quantités différentes sous formes native ou hydrolysée.

La majorité des études, lorsqu'elles sont comparatives, s'intéresse principalement aux protéines laitières en comparant les effets des protéines du lactosérum à celles des caséines (Bendtsen et al., 2013b; Hall et al., 2003b; Kung et al., 2018; Pal et al., 2014; Santos-Hernández, Tomé, et al., 2018). Les études comparant plus de trois sources protéiques autres que les protéines de lait sont rares, et ne sont pas réalisées systématiquement sur les mêmes modèles (Abou-Samra et al. 2011; Neacsu et al. 2014; Chen et al. 2018; Geraedts et al. 2011). Néanmoins, même si certains résultats sont contradictoires, une tendance suggère que les protéines laitières, de pois

et de soja auraient un effet plus satiétogène que d'autres protéines comme les protéines d'œuf, de gluten ou de poisson (Abou-Samra et al., 2011a; Bowen et al., 2006; W. Chen et al., 2018a; Westerterp-Plantenga, 2008).

L'ingestion de protéine influence directement la régulation de la prise alimentaire par une action sur des mécanismes homéostasiques tels que la régulation de la glycémie, l'activité de la DPP-IV et la sécrétion des hormones satiétogènes gastro-intestinales.

Bien que l'impact des protéines sur la prise alimentaire soit étudié depuis de nombreuses années, des zones d'ombre persistent quant à leur influence dans cette régulation. En effet, de nombreux mécanismes restent encore à explorer et l'influence de la nature et de l'origine des protéines reste à déterminer. Dans ce contexte, au cours de ce travail, nous avons comparé les effets de différentes protéines sur les mécanismes homéostasiques liés à la régulation de la prise alimentaire et à l'homéostasie énergétique.

Les protéines sélectionnées et leurs caractéristiques

Au cours de cette étude, nous avons choisi de travailler avec des protéines d'origines variées ayant des caractéristiques différentes et représentatives de la diversité des protéines consommées en France.

Ainsi, nous avons sélectionné les protéines suivantes :

- ❖ Protéines d'origine animale :
 - Hémoglobine bovine (bœuf)
 - Caséines (lait de vache)
 - Protéines de lactosérum (lait de vache)
 - Ovalbumine (blanc d'œuf)
 - Gélatine de poisson (cabillaud)

- ❖ Protéines d'origine végétale
 - Gluten (céréale)
 - Protéines de pois (légumineuse)

L'hémoglobine bovine

L'hémoglobine, représentée sur la **Figure 29**, est une protéine essentiellement présente dans le sang qui sert à transporter l'oxygène de l'appareil respiratoire au reste de l'organisme. C'est une protéine hétéro-tétramérique puisqu'elle est constituée de quatre sous-unités globulaires identiques deux à deux (deux chaînes α et deux chaînes β respectivement de 141 et 146 AA, chacune associée à groupe prosthétique appelé hème, et composé d'un cation de fer associé à une porphyrine. L'hémoglobine est une hémoprotéine de la famille des métalloprotéines. Elle a une masse moléculaire d'environ 64 kDa ($64\,500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et est très soluble dans l'eau ($20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

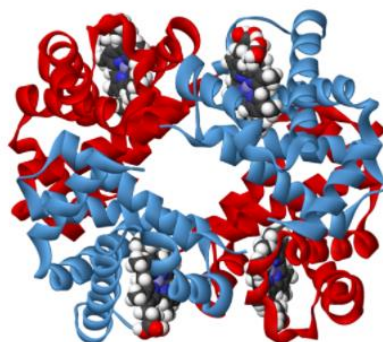


Figure 29: Molécule d'hémoglobine. Représentation en ruban d'une molécule d'hémoglobine montrant les quatre sous-unités, identiques deux à deux. Les chaînes α et β sont en rouge et bleu et les atomes constitutants des hèmes représentés en blanc, bleu et noir. (Image extraite de (Fermi et al., 1984))

L'hémoglobine est un constituant essentiel de la viande rouge et sa consommation est donc relativement fréquente. Cependant, l'hémoglobine est également un co-produit des abattoirs non ou peu valorisé au regard de son haut potentiel. En effet, l'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine permet de générer de nombreux peptides bioactifs ayant des fonctions opioïdes-like, stimulatrices de la sécrétion des hormones intestinales, inhibitrices de la DPP-IV, analgésiques, stimulatrices de la croissance bactérienne, et antimicrobiennes (Abou-Diab et al., 2020; Caron, Cudennec, et al., 2016a; Domenger et al., 2017a).

Les protéines du lait (Bovine)

Les caséines

Les caséines sont des phosphoprotéines qui représentent 80 % (m/m) des protéines du lait. Il existe cinq formes différentes de caséines (**Tableau 6**) : $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, κ - et γ -. Ces différentes formes sont reliées entre elles par des liaisons hydrophobes, hydrogènes et des interactions électrostatiques pour former des structures sphériques, appelées micelles (Sadiq et al., 2021). Les micelles forment un agrégat dont le diamètre varie entre 150 et 200 nm (Broyard & Gaucheron, 2015). Elles présentent une grande stabilité à des températures $> 100^{\circ}\text{C}$ et des pressions jusqu'à 100 MPa (Gebhardt et al., 2006). Les caséines sont solubles dans des solutions alcalines ou dans l'eau à hauteur de $0,11 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ce qui est très peu soluble) et précipitent facilement au voisinage de leur point isoélectrique à pH 4,6. En effet, les micelles de caséine ont une structure dépendante du pH puisque l'on peut observer un resserrement de la structure

à un pH acide et un gonflement à des valeurs de pH plus élevées. La chute du pH en dessous du point isoélectrique entraîne l'agrégation des micelles de caséine avec la libération de calcium (Ye et Harte, 2013).

Tableau 6: Caractéristiques comparatives des différentes formes de caséines du lait de vache.

Forme	Abondance relative aux caséines (%)	Longueur de la chaîne primaire (AA)	Masse moléculaire (kDa)
α_{s1}	40	199	23,6
α_{s2}	10	207	25
β	35	209	24
κ	12	169	19
γ	3 à 7	Variable	Variable

Les caséines possèdent des régions hydrophobes et hydrophiles et peuvent aussi être glycosylées, ce qui est le cas de la caséine κ (Phadungath, 2005). Elles présentent des teneurs élevées en acide glutamique, proline, leucine, lysine, sérine et thréonine. Les résidus de proline sont dispersés tout au long de leurs chaînes polypeptidiques et empêchent la formation de structures secondaires telles que les hélices- α ou les feuillets- β . Cette proportion importante de proline confère aux caséines une conformation dite ouverte et lâche. Ceci est particulièrement le cas pour les caséines- β , les plus riches en proline (Swaisgood, 1993).

Les caséines sont des protéines présentent un grand intérêt pour l'industrie agro-alimentaire en raison de leur valeur nutritionnelle élevée et de leurs nombreuses propriétés fonctionnelles : émulsifiantes, moussante, hydratante et possèdent des capacités d'encapsulation. Les caséines sont également une source intéressante de peptides bioactifs ayant des rôle antithrombotique, antihypertensif, antidouleur, antimicrobien et dans les systèmes nerveux, cardiovasculaire, digestif et modulateur de l'activité immunitaire (Silva & Malcata, 2005).

Les protéines du lactosérum

Le lactosérum représente la partie soluble du lait. Les protéines qu'il contient représentent 14 à 20% des protéines totales du lait. Le lactosérum est composé des protéines présentées dans le **Tableau 7** ci-dessous :

Tableau 7: Caractéristiques comparatives des protéines de lactosérum du lait de vache.

Forme	Abondance relative aux protéines de lactosérum (%)	Longueur de la chaîne primaire (AA)	Masse moléculaire (kDa)
α -lactoglobuline	25	123	14,2
β -lactoglobuline	65	102	18
Albumine et immunoglobine	10	-	-

La β -lactoglobuline comporte 15 % d'hélices alpha, 50 % de feuillet beta et 35 % du reste de la structure serait désordonné et dépendrait de la température et du pH (Creamer et al., 1983). De plus, c'est une protéine fortement immunogène qui possède un caractère allergénique très puissant. La α -lactalbumine est constituée d'un ion Ca^{2+} qui favorise son repliement et la formation de ponts disulfures (Anema, 2020). Elle est dénaturée vers 65°C, mais si le milieu est refroidi, il peut y avoir une renaturation de 80 à 90 % de la protéine. Sa dénaturation est accentuée en milieu acide, et à pH 4, il y a une dissociation de l'ion calcium qui entraîne une modification de sa conformation, alors moins stable à une élévation de température, et pouvant donner des agrégats.

Le lactosérum contient également d'autres fractions mineures comme la lactoferrine ou des lysozymes. Les protéines du lactosérum sont globulaires et sont présentes dans le lait sous forme de monomères ou d'oligomères (Ribadeau-Dumas & Grappin, 1989). Contrairement aux caséines, les protéines du lactosérum ne précipitent pas en dessous de leur point isoélectrique mais sont complètement dénaturées à des températures avoisinant les 90°C (Qian et al., 2017).

Les protéines du lactosérum ont une teneur en proline beaucoup plus faible que celle des caséines mais ont une composition plus riche en AA soufrés provenant majoritairement de la méthionine. Elles sont également très riches en cystéine et cystine, ce qui leur confère une très bonne valeur nutritionnelle (Anema, 2020).

Comme les protéines de caséines, l'hydrolyse des protéines de lactosérum génère un grand nombre de peptides bioactifs apportant de nombreux bénéfices santé. Les peptides bioactifs issus du lactosérum sont connus pour posséder des effets antimicrobiens, antihypertensifs, antioxydants, antithrombotiques, hypocholestérolémiants, satiétogène, fixateur de minéraux, etc (Madureira et al., 2010).

L'ovalbumine

L'ovalbumine est la protéine la plus abondante de l'albumen (50 à 60 % des protéines de l'albumen). C'est une glycoprotéine globulaire constituée de quatre chaînes polypeptidiques identiques et sa masse moléculaire est de 45 kDa (Martos et al., 2010). Sa séquence comprend 385 AA dont six cystéines avec un seul pont disulfure entre Cys73 et Cys120. L'ovalbumine est sensible à la chaleur et coagule à 84,5°C. Cette caractéristique lui confère un rôle important dans l'agro-alimentaire pour ses facultés à former un gel après dénaturation. L'ovalbumine est également utilisée pour son rôle de tensioactif et ses propriétés moussantes (He et al., 2019). Elle possède une structure similaire à celle des serpins (inhibiteur des protéases à sérine) mais ne présente pas la même fonction d'inhibiteur de protéase à sérines. C'est une protéine très soluble dans l'eau (20 mg.ml⁻¹).

L'ovalbumine est une protéine à haute valeur nutritionnelle puisqu'elle contient tous les AAI. Cependant elle peut induire un grand nombre de réactions allergiques, spécialement chez les enfants (Wei-Liang Tan et al., 2017).

Le traitement thermique de l'ovalbumine expose les quatre groupes sulfhydriles libres enfouis dans le noyau de la protéine et entraîne la formation de liaisons disulfures qui peuvent modifier les propriétés fonctionnelles de l'ovalbumine (Pathania et al, 2019). Ce changement de conformation améliore l'accessibilité des protéases digestives aux sites de clivage et certaines protéines de l'œuf, inhibitrices des enzymes digestives peuvent être inactiver, ce qui facilite la digestion de l'ovalbumine (Bhat et al., 2021). Le pH détermine également la faculté des molécules d'ovalbumine à s'agréger entre elles durant la digestion ainsi que la taille de ces agrégats. Un pH acide favorise la formation d'agrégats (Claude et al. 2017 ; Nyemb et al. 2014). Cette caractéristique lui permet de résister partiellement à l'hydrolyse par la pepsine et donc à la digestion dans le tractus gastro-intestinal. Elle conserve ainsi un certain degré d'intégrité structurale tridimensionnelle durant la digestion (Martos et al., 2010).

Les protéines de pois

Les protéines de pois étudiées au cours de cette études proviennent du pois jaune (*Pisum sativum*) et sont très intéressantes pour leur équilibre en AA, leur propriété hypoallergénique et leur faible coût de production (Parihar et al., 2021). Les protéines de pois jaune sont riches en lysine mais déficientes en méthionine et en tryptophane qui sont des AA essentiels. Néanmoins, comme pour la plupart des protéines végétales, l'utilisation des protéines de pois en agro-alimentaire est limitée par leur faible solubilité dans l'eau, leurs faibles propriétés fonctionnelles et leur moins bonne digestibilité (définie dans la section 3.2) par rapport aux protéines animales (Rutherford et al., 2015). Les protéines de pois jaune possèdent un profil en AA particulièrement bien équilibré contenant de nombreux AA essentiels. Elles sont présentées dans le **Tableau 8** ci-dessous.

Les légumineuses sont des protéines polymériques très compactes de forme globulaire. Elles possèdent des domaines hydrophiles α situés à l'extérieur et des polypeptides β formant un cœur hydrophobe. Elles s'apparentent à des caséines végétales. Elles sont riches en acide aspartique, glutamique et en arginine. Les vicilines et les convicilines sont des protéines trimériques stabilisées par des liaisons de faible énergie et ayant un fort pouvoir tensio-actif. Ces deux familles de protéines contiennent des AA soufrés et un grand nombre d'AA hydrophobes (Aubry & Boucrot, 1986).

PA1 et PA2 sont les deux albumines majeures du pois. Elles possèdent trois résidus de cystéine leur permettant de former des ponts disulfures. Elles ont une structure compacte, riche en feuillets β (Perrot, 1995). Quant aux lectines, elles sont de faible poids moléculaire mais possèdent des teneurs élevées en AA soufrés (méthionine et tryptophane) et en lysine et se lient facilement à certains glucides (Perrot, 1995).

De plus, on retrouve des facteurs antinutritionnels associés aux protéines de pois comme des chélateurs de cation bivalent ou des protéines antigéniques qui entraînent une réduction de l'absorption des minéraux et des réactions d'hypersensibilité (Amarakoon et al., 2012). Le caractère amphiphile des légumineuses confère aux protéines de pois des propriétés émulsifiantes. Et comme précédemment mentionné, l'hydrolyse des protéines de pois favorise leur propriété moussante et augmenterait leur pouvoir antioxydant (Wang et al., 2017).

Tableau 8: Caractéristiques des principales protéines du pois jaune (d'après Lefranc-Millot et al, 2018)

Classe	Protéines	Structure	PM (kDa)	Fonction	Proportion (%)
<i>Globulines</i> 70-80 % des protéines totales de pois	Légumine	Hexamère	330-400	Réserve	6-24,5
	Viciline	Trimère	150-170	Réserve	21-55
	Convicine	Trimère	±210	Réserve	3,9-8,3
Albumines 20-30 % des protéines totales de pois	PA1	Dimère	±10	Réserve	5-9
	PA2	Dimère	±50	Inconnue	10-20
	Lectines	Tetramère	±51	Protection contre les protéase endogène	2,5
	Lipoxygénase	/	/	Oxydation des acides gras	<1
	Inhibiteur des protéases à sérine/trypsine	Monomère	10-16	Activité antitrypsique	<2

Les légumine sont des protéines polymériques très compactes de forme globulaire. Elles possèdent des domaines hydrophiles α situés à l'extérieur et des polypeptides β formant un cœur hydrophobe. Elles s'apparentent à des caséines végétales. Elles sont riches en acide aspartique, glutamique et en arginine. Les vicilines et les convicilines sont des protéines trimériques stabilisées par des liaisons de faible énergie et ayant un fort pouvoir tensio-actif. Ces deux familles de protéines contiennent des AA soufrés et un grand nombre d'AA hydrophobes (Aubry & Boucrot, 1986).

PA1 et PA2 sont les deux albumines majeures du pois. Elles possèdent trois résidus de cystéine leur permettant de former des ponts disulfures. Elles ont une structure compacte, riche en feuillets β (Perrot, 1995). Quant au lectines, elles sont de faible poids moléculaire mais possèdent des teneurs élevées en AA soufrés (méthionine et tryptophane) et en lysine et se lient facilement à certains glucides (Perrot, 1995).

De plus, on retrouve des facteurs antinutritionnels associés aux protéines de pois comme des chélateurs de cation bivalent ou des protéines antigéniques qui entraînent une réduction de la l'absorption des minéraux et des réactions d'hypersensibilité (Amarakoon et al., 2012). Le caractère amphiphile des légumine confère aux protéines de pois des propriétés émulsifiantes. Et comme précédemment mentionné, l'hydrolyse des protéines de pois favorise leur propriété moussante et augmenterait leur pouvoir antioxydant (Wang et al., 2017).

Le gluten

Les protéines de gluten sont les composés protéiques majeurs du blé qui est l'une des plantes céréalières la plus cultivée dans le monde (AMIS, 2022). Les protéines de gluten sont des protéines insolubles faisant partie de la famille des prolamines (protéines de réserve). Ces protéines représentent entre 80 et 90 % de l'ensemble des protéines du blé. Le gluten est constitué de deux protéines : les gliadines (30 – 40 %) et les gluténines (60 – 70 %). Le gluten est insoluble dans l'eau et forme un maillage viscoélastique à son contact comme le montre la **Figure 30**. Plus la teneur est forte en gliadine, plus le maillage est visqueux et extensible et plus la teneur est forte en gluténine, plus le maillage est tenace et élastique. Les protéines du gluten sont riches en glutamine et proline qui forment des séquences peptidiques très résistantes à la digestion protéolytique dans le tractus gastro-intestinal (Biesiekierski, 2017).

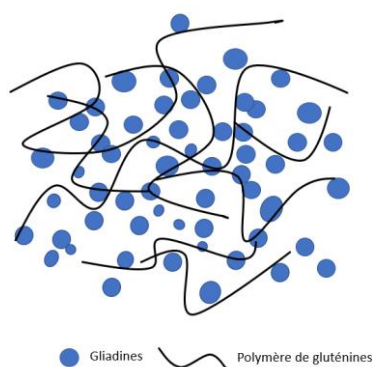


Figure 30: Structure du réseau de gluten.

Les gliadines

Les gliadines appartiennent à la famille des prolamines et sont des molécules monomériques solubles dans l'éthanol à 70 %. Il existe plusieurs formes de gliadines : α -, β -, γ - et ω -gliadine. Elles ont un poids moléculaire compris entre 30 et 80 kDa (Goesaert et al., 2005.). Les gliadines sont des molécules très repliées sur elles-mêmes en raison de nombreuses liaisons intramoléculaires induites par leur riche composition en cystéine et en proline qui favorise la formation d'hélices α et de feuillets β . La structure repliée de ces molécules ne permet pas la formation de liaison avec d'autres protéines. Les gliadines ont un excellent pouvoir moussant en condition de pH neutre ou alcalin et sont solubles à pH acide ou alcalin (Thewissen et al., 2011).

Les gluténines

Les gluténines sont de grosses molécules polymériques ayant des masses moléculaires comprises entre 500 et 10 000 kDa. Ce sont des molécules insolubles dans l'eau mais solubles dans des solutions acides ou basiques diluées. De plus, comme les gliadines, les gluténines sont riches en cystéine ce qui favorise les liaisons intramoléculaires mais leur conformation n'est pas aussi repliée que ces dernières, ce qui autorise les liaisons avec d'autres protéines. C'est la capacité de leurs ponts disulfures à s'allonger qui confère de l'élasticité au gluten. Les gluténines se divisent en deux classes qui sont présentées ci-dessous.

- Les gluténines de faible poids moléculaire (LMW-GS)

Les LMW-GS représentent 60 % des gluténines et 20 % des protéines totales du grain de blé. Il existe 3 types de LMW-GS (LMW-m, LMW-s et LMW-i). Elles contiennent 8 résidus de cystéines leur permettant de former des liaisons intra et intermoléculaire grâce à des ponts disulfures (Du et al., 2020).

- Les gluténines de haut poids moléculaire (HMW-GS)

Les HMW-GS représentent 12 % des protéines totales du grain de blé (Bailey et al., 2002). On distingue deux classes de HMW-GS : les γ et les κ HMW-GS. Les HMW-GS sont constituées de trois domaines structuraux : un domaine N-terminal non répétitif comprenant environ 81 à 104 résidus et un domaine C-terminal de 42 résidus, entourant un domaine central répétitif de 481 à 872 résidus. Le domaine central répétitif représente la plus grande partie des HMW-GS et il est défini par trois types d'unités de répétition primaires dans les sous-unités de type x et de deux types d'unités de répétition primaires dans les sous-unités de type y. Dans les sous-unités de type x, les unités répétées sont les tripeptides (GQQ), les hexapeptides (PGQGQQ) et les nonapeptides (GYYPTSPQQ). Dans les sous-unités de type y, les unités répétées sont les hexapeptides (PGQGQQ) et les nonapeptides (GYYPTSLQQ). Le domaine répétitif central présente des propriétés hydrophiles tandis que les domaines N-terminal et C-terminal présentent des caractéristiques plutôt hydrophobes. Une étude récente montre que le domaine répétitif central pourrait être replié sous l'action de la disulfure isomérase de la protéine de blé, qui sert de base à l'extension du maillage gluténique (Li et al., 2021). Ces deux classes de gluténines possèdent des cystéines formant des ponts disulfures intra-chaines ou extra-chaines avec d'autres HMW-GS ou des LMW-GS. De plus, les domaines N- et C-terminaux sont tous deux

considérés comme riches en hélices α et les domaines répétitifs centraux sont riches en chaînes β -inverses et feuilletts β intermoléculaires.

La gélatine de poisson

La gélatine est un ingrédient multifonctionnel qui n'existe pas à l'état naturel. La gélatine est produite à partir d'une dénaturation thermique du collagène qui est une protéine de structure, principalement trouvée dans les tissus conjonctifs d'animaux. Elle est largement utilisée dans les aliments, les produits pharmaceutiques ou les cosmétiques pour ses propriétés fonctionnelles et technologiques uniques qui lui confèrent un rôle de stabilisateur et qui améliorent l'élasticité et l'homogénéité des produits (Ahmad et al. 2017 ; Karim et Bhat 2009; Nieto-Suárez et al, 2016; Van Nieuwenhove et al. 2016). La gélatine est capable de former une solution à haute viscosité dans l'eau chaude, qui se fixe en gel lors du refroidissement. Elle est obtenue à partir de la peau ou d'os de porc, poulet, ou de poisson. Il existe plusieurs types de gélatines différentes : la gélatine obtenue par extraction acide, appelée gélatine de type A et la gélatine extraite par un alcali, nommée gélatine de type B (Ahmad et al., 2017). Ces deux types de gélatines présentent des propriétés physico-chimiques différentes et peuvent être utilisés dans différentes applications.

Le collagène est une combinaison de chaînes de polymères hydrolysés ayant des poids moléculaires différents, comprenant des chaînes α (80 ~ 125 kDa), des chaînes β (160 ~ 250 kDa), des chaînes γ (240 ~ 375 kDa) (Gudipati, 2013). Le collagène est principalement constitué d'AA de faible poids moléculaire dont la glycine (27 ~ 35 %), la proline (Pro) et l'hydroxyproline (Hyp) (20 ~ 24 %) qui sont les AA majoritaires (Boran & Regenstein, 2010; Gudipati, 2013). La composition en AA de la gélatine se caractérise principalement par la répétition multiple d'une séquence "Glycine-X-Y", où "X" est souvent une proline et "Y" est principalement de l'hydroxyproline (Boran & Regenstein, 2010; Karim & Bhat, 2009; D. Liu et al., 2015).

Le collagène d'origine marine, même si il est similaire au collagène de mammifère, présente une teneur en AA légèrement différente (Ferraro et al., 2010; Jongjareonrak et al., 2006; Mohtar et al., 2013). Le collagène marin possède une teneur en proline et en hydroxyproline inférieure au collagène de mammifère. Cette caractéristique est à l'origine d'une diminution de la température de gélification qui se fait entre 4 et 8°C pour le collagène issu de poisson d'eau froide, entre 21°C pour le collagène issu de poisson d'eau chaude, contre 26°C pour le collagène

de mammifère. De plus, le collagène marin possède un plus faible poids moléculaire qui lui permet d'être plus facilement absorbé et de diminuer sa réponse inflammatoire et immunitaire. Il présente également une absence de risque sanitaire comparé au collagène de mammifère qui est plus susceptible d'être porteur de contaminants biologiques ou de toxines (Bhagwat & Dandge, 2018; M.-M. Chen et al., 2014; Huang et al., 2014; Lim et al., 2019; Silvipriya et al., 2015).

Objectifs des travaux de thèse

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre comment les protéines agro-alimentaires, de différentes origines, peuvent exercer des effets différents, bénéfiques ou non, sur la régulation de la prise alimentaire et sur l'absorption du glucose. Cet objectif s'inscrit dans un contexte plus large ou une rationalisation et une meilleure utilisation des ressources protéiques dans l'alimentation humaine et/ou dans les domaines de la santé, devient indispensable. Pour cela, il est nécessaire de mieux caractériser les protéines, en prenant en compte leur origine. Ce projet a donc pour but de comparer et de comprendre l'implication des protéines alimentaires d'origines variées dans les mécanismes de régulation de l'homéostasie énergétique. Il est aujourd'hui admis que les protéines exercent un pouvoir satiétogène supérieur à ceux des glucides et des lipides et qu'elles améliorent la tolérance au glucose. Cependant, l'effet « source » des protéines sur ces mécanismes est encore très mal renseigné. Au cours de la digestion des protéines, les mécanismes qui prennent place au niveau intestinal et qui conduisent à l'absorption du glucose et à la libération des signaux périphériques (e.g. hormones) impliqués dans la régulation à court terme de la prise alimentaire demeurent encore mal connus.

Ce projet de thèse concerne l'étude de l'impact de différentes protéines alimentaires sur trois mécanismes impliqués dans l'homéostasie énergétique qui ont constitué les trois axes de l'étude:

- 1) La régulation de la prise alimentaire à court terme
- 2) La modulation de l'activité de la DPP-IV
- 3) La régulation de l'homéostasie glucidique

L'effet des protéines sur ces mécanismes a été étudié par une approche *in vivo* chez le rat permettant de mesurer l'effet global des protéines dans un contexte physiologique, et par une approche *in vitro* permettant d'appréhender certains mécanismes moléculaires et cellulaires au niveau intestinal. Ces axes font chacun l'objet d'un article scientifique.

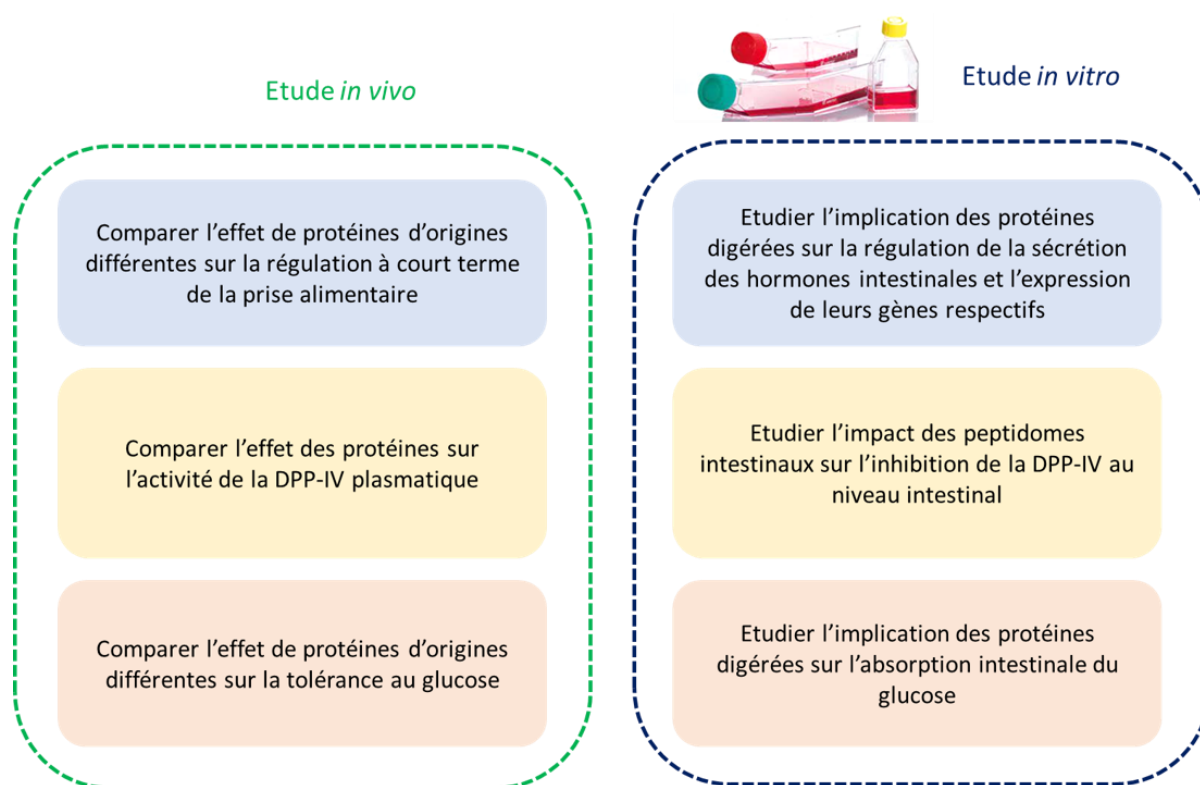


Figure 31: Récapitulatif des objectifs de la thèse.

Sept extraits protéiques d'origines animales et végétales ont été sélectionnés pour l'ensemble de l'étude. Notre choix s'est porté sur l'hémoglobine bovine qui a été très largement étudiée au sein de notre laboratoire, sur des isolats de caséines et de lactosérum gracieusement donnés par l'entreprise Ingredia (Arras, France), sur de l'ovalbumine et du gluten achetés chez Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France), sur de la gélatine de poisson issue de Kenney & Ross (Port saxon, Canada) et sur des protéines de pois, offertes par Roquette (Lestrem, France). Avant de commencer les expérimentations, ces extraits ont d'abord été caractérisés pour leur teneur en protéine grâce à des dosages Kjeldahl, et pour leur composition protéique grâce à un SDS-PAGE couplé à une analyse en spectrométrie de masse. Ces premières analyses ont permis d'utiliser tous les extraits protéiques, en prenant en compte leur teneur exacte en protéines. En ce qui concerne les études *in vitro*, les extraits ont tous été digérés suivant le protocole de digestion *in vitro* statique INFOGEST, adapté à la digestion des protéines uniquement.

Résultats

Chapitre 1 : Etude de l'effet des protéines alimentaires de différentes origines sur la régulation de la prise alimentaire à court terme

Contexte de l'article :

Cet article est en cours de rédaction. Des études complémentaires doivent encore être réalisées avant soumission à un journal.

Résumé

Introduction : Les protéines sont connues pour réduire la prise alimentaire en stimulant la satiété, mais l'impact de la source protéiques sur la satiété a été beaucoup moins bien caractérisé. Dans un contexte où la couverture des besoins en protéines devient un enjeu sociétal majeur puisque la production doit répondre à une augmentation de la demande tout en devant être raisonnée du fait de son impact néfaste sur l'environnement, il est nécessaire de mieux caractériser les protéines et de diversifier les sources protéiques pouvant être utilisées dans les domaines de la nutrition animale et humaine et de la santé.

Objectif : L'objectif de cette étude est de comparer l'impact de sept protéines d'origines différentes (hémoglobine bovine, caséines, ovalbumine, lactosérum, gélatine de poisson, protéines de pois et de gluten) sur la régulation de la prise alimentaire, notamment via l'étude des hormones gastro-intestinales.

Méthode : La démarche expérimentale adoptée pour cette étude est schématisée ci-après.

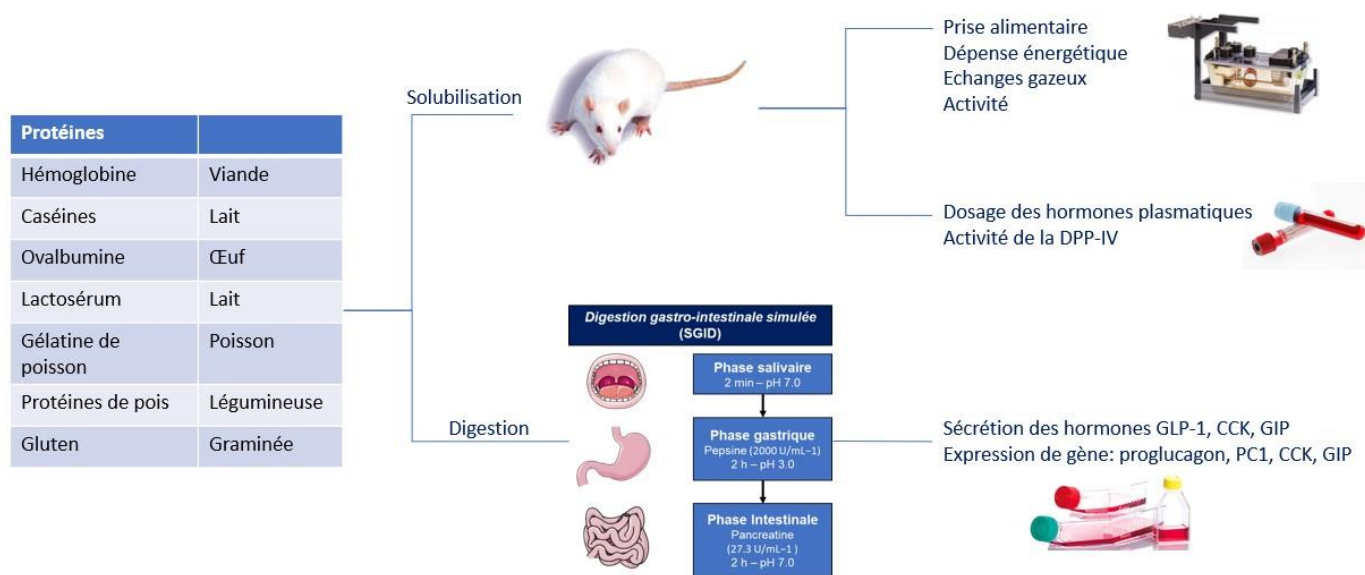


Figure 32: Démarche expérimentale adoptée au cours de l'étude 1.

Une première étude *in vivo* a été réalisée chez le rat pour comparer l'effet satiétogène des protéines choisies. Pour cela, des rats ont été placés trois jours en cage métabolique et ont reçu quotidiennement, par gavage intragastrique, une quantité de protéine équivalente à 1 g.kg^{-1} de poids corporel. Des données de prise alimentaire, d'activité, de dépense énergétique et des mesures d'échange de gaz respiratoires ont été collectées en continu. Cette première expérience a été complétée par une mesure des concentrations plasmatiques en hormones gastro-intestinales sécrétées 30 min après un gavage avec les différentes protéines. La mesure de l'activité de la DPP-IV plasmatique a également été réalisée. Pour donner suite à cette première expérience, des tests *in vitro* ont été réalisés afin d'explorer plus en détail les mécanismes à l'origine de la sécrétion des hormones gastro-intestinales. Pour cela, les protéines ont d'abord été digérées *in vitro* suivant le protocole de digestion statique INFOGEST adapté à la digestion de protéines seules. Puis les digestats intestinaux des différentes protéines ont été mis en contact avec les cellules entéroendocrines murines STC-1 afin de mesurer leur effet sur la sécrétion de certaines hormones intestinales et l'expression de leur gène.

Résultats : L'ingestion par gavage de tous les extraits de protéines a permis de diminuer significativement la prise alimentaire à un temps donné sur la période observée. Les protéines de lactosérum ont diminué significativement la prise alimentaire à court terme comparé aux autres sources. De manière inverse, les protéines de gluten ont favorisé une diminution de la

prise alimentaire à partir de six heures après leur ingestion. L'ovalbumine est la seule protéine à avoir diminué de manière significative la prise alimentaire sur toute la durée d'observation. Ces résultats sont corrélés aux ratios d'échanges gazeux qui donnent des informations sur la métabolisation des nutriments. Une augmentation significative des concentrations plasmatiques de GIP, de glucagon et d'insuline a également été observée pour quelques protéines *in vivo*. Globalement, toutes les protéines ont montré un effet sur la sécrétion des hormones gastro-intestinales GIP, GLP-1 et CCK *in vitro* mais ces effets diffèrent d'une protéine à l'autre en termes de concentrations. Des résultats supplémentaires mettent en évidence un effet de la source des protéines sur l'inhibition de la DPP-IV, la dépense énergétique et l'activité locomotrice.

Conclusion : Les protéines ingérées possèdent bien un effet satiétogène qui s'exprime différemment selon la source protéique consommée. L'ovalbumine est la seule source protéique étudiée qui diminue la prise alimentaire sur une période de 8h. Des différences intéressantes ont pu être mises en évidence entre les sources protéiques *in vivo* et *in vitro*

Study of the effect of dietary proteins of different origins on the regulation of short-term food intake in rats and intestinal hormone regulation in STC-1 cells

Léa Fleury¹, Camille Dugardin¹, Benoit Cudennec^{1*}, Rozenn Ravallec^{1*}

¹Univ. Lille, UMR-T 1158, BioEcoAgro, F-59000 Lille, France.

Abstract

It's known that digested-dietary proteins exert a satiating effect by the stimulation of gut hormone signals (CCK, GLP-1, and GIP). This study compares the effects of proteins from different origins (bovine hemoglobin, caseins, ovalbumin, whey proteins, fish gelatin, pea proteins and gluten) on short-term food intake regulation. To do that, two in vivo experiments involving Wistar rats were performed. In a first experiment, the effect of a protein preload administration on food intake was followed using metabolic cages. Diet consumption was measured over 8 h after orally administering protein preload. In a second experiment, plasma hormone levels (GLP-1, GIP, CCK, PYY, insulin and glucagon) were measured 30 min after protein administration. In parallel, all proteins were digested in vitro using the INFOGEST static gastro-intestinal digestion protocol. Peptides generated by protein digestion were analyzed using size exclusion chromatography, and their effects on CCK, GLP-1 and GIP secretion in STC-1 cells were studied. The results obtained showed that dietary proteins differently decreased short-term food intake, respiratory gas exchange ratio (RER) and increased plasma levels of GIP, insulin and glucagon in rats. Ovalbumin, whey proteins and gluten proteins stand out from the other protein sources because of their superior satiety effect. The results observed in vitro globally corroborate the in vivo results. Digested proteins stimulate the secretion of GLP-1, CCK and GIP hormones in vitro with a more pronounced effect for hemoglobin. In addition, digested proteins appear to have a regulatory effect on the expression of genes encoding the proteins that produce these hormones.

Keywords: Energy homeostasis; food intake regulation; protein sources; DPP-IV; gastro-intestinal hormones; glucose homeostasis

1 Introduction

Currently, faced with the increase in the world population combined with an increase in the general standards of living populations, the demand for good quality dietary proteins is increasing (Godfray et al., 2018). Unfortunately, the production of these good quality proteins, particularly of animal origin, is harmful to the environment, and it becomes a major problem regarding environmental pollution, climate change, resource use and supply of sustainable proteins (Wu et al., 2014b). About one-third of vegetable proteins against two-thirds of animal proteins are consumed in developing countries, while international recommendations are to consume half of each source. From an ecological point of view, the production of vegetable

proteins leads to about 250 times fewer emissions, per gram of proteins, than for animal ones (Tilman & Clark, 2014). Moreover, 2.5 to 10 kg of vegetable proteins are needed to produce 1 kg of edible animal proteins (Chereau et al. 2015). Unfortunately, the production of food of animal origin remains one of the essential sectors concerning the economy, food security, and people's livelihoods (Hoque et al., 2022).

In parallel, the worldwide rise of obesity is of great concern, as in 2016, more than 650 million people were obese, representing approximately 13 % of the world's population (OMS, 2020). Once obesity was specific to rich countries, low-income and middle-income countries are today impacted (Jackson et al., 2020). Another worrying fact is that the obesity epidemic is affecting more and more children (Nittari et al., 2019). In 2016, 41 million children under the age of 5 years and 340 million of those aged 5–19 years had developed overweight or obesity (Jackson et al., 2020). Obesity results from an increasingly sedentary lifestyle and a caloric diet, a direct consequence of socio-economic progress and changes in the lifestyles of the entire world population (Dramane et al., 2017; Tilman & Clark, 2014). Obesity is a significant public health problem because linked to the appearance of metabolic diseases such as type II diabetes, which is associated with the development of cardiovascular diseases and certain types of cancer (Blüher, 2020). These comorbidities, such as diabetes, reduce life expectancy by increasing the risk factors for mortality from many infections such as Covid 19 (Zhou et al., 2021). Thus, faced with these two observations, it is necessary to find solutions guaranteeing healthy and sufficient food, respecting the environment and sustainable development. For this, French governmental strategies promote vegetable proteins and better qualify proteins in general (Ministère de l'agriculture et de l'alimentation, 2021).

In addition to their nutritional function, proteins are known to intervene in short- and long-term energy homeostasis regulation. High protein diets have been shown to promote short- and long-term weight loss (Due et al., 2004; Leidy et al., 2015; Neacsu et al., 2014a; Schiavo et al., 2017b; Skov et al., 1999; Weigle et al., 2005b). These studies provided proteins via a conventional diet comprising various protein sources. Studies on the satietogenic efficacy of proteins regarding their quality and origin are limited and often incomparable from one study to another (Bohl et al., 2016; Burton-Freeman et al., 1997; Geraedts et al., 2010; Hall et al., 2003c). Most of these studies compared milk proteins and highlighted a higher satietogenic power of whey than caseins (Bendtsen et al., 2013b; Hall et al., 2003c; Kung et al., 2018; Pal et al., 2014; Santos-Hernández, Miralles, et al., 2018b). Studies comparing more than three protein sources other than milk proteins are rare and not systematically carried out on the same models, making comparisons difficult (Abou-Samra et al., 2011b; W. Chen et al., 2018a; Geraedts et al., 2010; Neacsu et al., 2014a). Moreover, the protocols used, the subjects, and the studied parameters are different. Some researchers focused on the long-term protein

effects on satiety and/or weight loss, while others looked at the short-term satietogenic effect, either in obese, diabetic or healthy individuals (Bendtsen et al., 2013b; Bowen et al., 2006; Kung et al., 2018; Pal et al., 2014). Nevertheless, they all highlighted the potential impact of protein sources on food intake. Indeed, even if some results are contradictory, a trend emerges that dairy and vegetable proteins would exert significant satietogenic effects (Abou-Samra et al., 2011a; Bowen et al., 2006; W. Chen et al., 2018a; Westerterp-Plantenga, 2008).

The effect of proteins on weight loss is attributed to the high satietogenic power of proteins compared to other macronutrients (Bensaïd et al., 2002; Hill & Blundell, 1986; Stubbs et al., 1995). Proteins induce their satiety effects via several mechanisms: 1) Protein consumption leads to an increase in body temperature induced by an increase in oxygen consumption. This increase in thermogenesis increases energy expenditure and leads to a decrease in food intake and an increase in the satiety feeling (Halton & Hu, 2004; Youngtob et al., 2021) ; 2) The increase in plasma amino acid concentration after protein ingestion is detected at the hypothalamic level and directly stimulates satiety (Fromentin et al., 2012); 3) Proteins increase satiety partly through the secretion of gastro-intestinal hormones such as CCK, GLP-1 and PYY (Geraedts et al. 2010; Van der Klaauw et al. 2013). These hormones act either via the vagus nerve or directly at the hypothalamic level to induce satiety feeling and delay gastric emptying, prolonging the satiation signals induced by gastric distension (Janssen & Depoortere, 2013). The secretion of these satietogenic hormones and the effect on intestinal motility is initiated during the “intestinal sensing” by contact between a wide variety of bioactive peptides produced during protein digestion with receptors, channels, and transporters present at the apical side of enteroendocrine cells distributed along the gastro-intestinal tract (Caron, Cudennec, et al., 2016a; Heffernan et al., 2022; Lu et al., 2021; Santos-Hernández et al., 2020). However, very few studies compare the ability of digested proteins from different sources to stimulate gastro-intestinal hormones involved in short-term food intake regulation. In this context, this article aims to compare seven food proteins of different origins (bovine, egg, milk, fish, peas, wheat) on short-term food intake regulation in Wistar rats. Rats were placed in metabolic cages to measure their food intake and the respiratory gas exchange ratio. After protein administration, several hormones involved in food intake regulation were dosed in rat plasma. In parallel, the same proteins were digested *in vitro* following the INFOGEST protocol (Brodkorb et al. 2019) adapted to proteins only (Atallah et al., 2020). The digested proteins modulation of the intestinal hormone secretion and gene expression were then studied in STC-1 cells.

2 Materials et methods

2.1 Samples

Proteins and dextrin were purchased or provided by industrial companies (Table 1):

- Hemoglobin from bovine blood (H2625, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France);
- Caseins (Prodiet® 85B, Ingredia, Arras, France);
- Ovalbumin from chicken egg white (A5503, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France);
- Whey proteins (Promilk® 852FB, Ingredia, Arras, France);
- High molecular weight dried fish gelatin (Kenney & Ross, Port Saxon, Canada);
- Pea proteins (Nutralys® S85F, Roquette, Lestrem, France);
- Gluten proteins (G5004, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France);
- Dextrin from maize starch (31410, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France).

Table 1: Protein content (%) of the different protein powders.

Protein Samples	Protein content (%)
Hemoglobin	92.7
Caseins	76.7
Ovalbumin	76.4
Whey proteins	80.3
Fish gelatin	99.0
Pea proteins	71.1
Gluten proteins	76.5

The total nitrogen content of powders was evaluated by Kjeldahl method (Bradstreet, 1954) and converted into protein content with conversion factors of 6.06 for animal proteins and 5.68 for vegetal proteins.

2.2 Materials

The following chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France, France): porcine pepsin (P6887), pancreatin from porcine pancreas (P1750), Gly-Pro-AMC substrate (G2761), and DPP-IV inhibitor (DPP4). For cell culture, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), L-glutamine, penicillin and streptomycin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Foetal bovine serum (FBS) was from GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, Germany). Water was purified using the Milli-Q system.

2.3 *In vivo* experiment

2.3.1 *Animals*

Male Wistar rats, aged of 10 to 12 weeks, were purchased from Envigo (Gannat, France). Rats were housed in a temperature and humidity-controlled rooms ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \% \pm 5 \%$). All rats were provided with food (SAFE® A04) and water *ad libitum* and maintained on a 12-h light/dark cycle (dark cycle 10:30 - 22:30). After 7 days of acclimatization, rats were daily trained for intra-gastric administration using 1 to 3 mL of water through a feeding tube (7917, Cadence Science, Cranston, USA). This protocol was carried out according to the French ethical guidelines for studies on experimental animals and approved by our local ethical committee no. CEEA75 (Animal house agreement no. 59-00913, Authorization for Animal Experimentation no. 20992-201906031147321 v6, project). All precautions were taken to prevent any potential animal suffering. Before starting each experiment, rats were weighed to adjust the administered volume solution (1 mL / 100 g of rat).

2.3.2 *Food intake experiment in metabolic cages*

Rats were placed individually in metabolic cages (Phenomaster TSE system, Phymep, Paris, France) for three non-consecutive days to get used to the cages before the experiment. Then rats were placed for four consecutive days in metabolic cages. The first day was for acclimatization, and the following three days, rats were force-fed once a day (1 hour after the start of the dark cycle) with the same protein (hemoglobin, caseins, ovalbumin, whey proteins, fish gelatin, pea and gluten proteins) or control (hypocaloric control (water) and isocaloric control (dextrin)) solution ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). The given volume was adjusted to the weight of each rat to receive $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (N=9). Each rat was fed with a maximum of 4 different proteins non-consecutively. Food intake and respiratory exchange ratio (RER) were recorded every 20 min during the 4 days of experimentation.

Food intake was recorded using weight sensors that hold the feeders (1mg sensitivity). The respiratory exchange ratio was determined by indirect calorimetry using both VO_2 (oxygen consumption) and VCO_2 (carbon dioxide production) measurements, according to the following equations (1). VO_2 and VCO_2 values were normalized to total body weight.

$$(1) \text{ RER} = \text{VCO}_2/\text{VO}_2$$

$$(\text{VO}_2 = \text{O}_2 \text{ consumption (mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}); \text{VCO}_2 = \text{CO}_2 \text{ production (mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}))$$

2.3.3 *Assay of plasma hormones in rat*

Rats were fasted 8 hours before the experiment and force-fed with the protein or control solution at $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Blood samples were collected 30 minutes after gavage through the tail vein in heparin tubes containing 10 μl of DPP-IV inhibitor. Then tubes were centrifuged and

supernatants stored at -80 °C before plasma hormone quantification. GIP, insulin and glucagon concentrations were determined simultaneously in 25 µL of plasma using a rat hormone multiplex kit (RMHMAG-84K, Millipore) and Luminex Technology (Bio-Plex; Bio-Rad, Nazareth, Belgium). CCK, GLP-1 and PYY plasma concentrations were measured using Fluorescent EIA Kit (ref: FEK-069-04; FEK-028-11CE; FEK-027-12; Phoenix).

2.4 In vitro simulated protein gastro-intestinal digestion

For in vitro experiments, protein powders were digested according to the simulated gastro-intestinal digestion INFOGEST harmonized protocol (Brodkorb et al., 2019b) adapted for protein alone (Atallah et al. 2020). The protocol was slightly modified (Dugardin et al., 2022) because amylase and bile salts were not used, and pepsin and pancreatin were added at 6500 U.mL⁻¹ and 45 U.mL⁻¹ respectively. A control blank simulated gastro-intestinal digestion (Blk SGID) was performed in the same conditions but without proteins. Protein digestions were performed in triplicate.

2.5 Size Exclusion Chromatography by Fast Protein Liquid Chromatography (SEC-FPLC)

Intestinal digests were analyzed for the apparent molecular weight of their peptide and amino acid content by SEC using a Superdex Peptide 10/300 GL column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) on an AKTA Purifier system (GE Healthcare). SEC was carried out in isocratic conditions with 30 % acetonitrile, 69.9 % ultrapure water and 0.1 % TFA solvent at a flow rate of 0.5 mL.min⁻¹. Intestinal digests from in vitro SGID were first diluted in ultrapure water (15 mg.mL⁻¹, w/v). The diluted samples were then centrifuged at 15,000 × g for 15 min, and 50 µL of supernatant was injected. The column was calibrated with the following standards: cytochrome C (12.327 Da), aprotinin (6511.5 Da), Glutathione (612.32 Da), B12 vitamin (1355.4 Da) and BSA (66400 Da).

2.6 STC-1 cell line and culture condition

Murine STC-1 cells were purchased from Sigma-Aldrich (Villefranche-sur-Saône, France). Cells were routinely cultivated twice a week in 75 cm² flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), under 5 % CO₂, at 37°C, in DMEM (PAN Biotech, Aidencach, Germany) supplemented with penicillin/streptomycin (100 U.mL⁻¹), 2 mM L-glutamine, and 10 % heat-inactivated fetal bovine serum.

2.7 CCK, GLP-1 and GIP secretion study

STC-1 cells were seeded at 50,000 cells per well into 24-well culture plates in complete DMEM and allowed to grow until they reached 60-80 % confluence. The day of the experiment, cells were washed with phosphate saline buffer (PBS, 10 mM, pH 7.4) and 250 μ L of intestinal digests from in vitro SGID, diluted in Hepes buffer (4.5 mM KCl, 1.2 mM CaCl₂, 140 mM NaCl and 20 mM Hepes, pH 7.4) at 10 mg.mL⁻¹ were added to wells. Hepes buffer or Blk SGID was used as a negative control. After 2 h of incubation, supernatants were collected on ice, centrifuged (1500 \times g for 5 min) and stored at -20°C for further CCK, GLP-1 and GIP measurements using a specific EIA kit (Phoenix).

2.8 CCK, GLP-1 and GIP gene expression

STC-1 cells were seeded at 50 000 cells per well into 24-well culture plates in complete DMEM and allowed to grow until they reached 60-80 % confluence. The day of the experiment, cells were washed twice with PBS before being incubated with 500 μ L of intestinal digested (2.5 mg.mL⁻¹), buffer, and diluted Blank SGID. After 12 and 24 h of incubation, RNA was extracted using the modified NucleoZOL (Macherey-Nagel, Düren, Germany) protocol. First, RNA concentration and purity were assessed using the Nanodrop lite spectrophotometer (ThermoFisher scientific, Waltham, USA). The reverse transcription was then performed using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), and mRNA levels were determined by qPCR on a CFX Connect Real-Time PCR detection system (Biorad) using the Takyon™ No Rox SYBR® MasterMix dTTP Blue (Eurogentec) and specific primers (Table 2).

Table 2: Primers used for qPCR experiments.

	Genes	Forward primers	Reverse primers
<i>Mus musculus</i>	Proglucagon	AGA GAC ATG CTG AAG GGA CC	CTT TCA CCA GCC ACG CAA TG
	PC1	GCC GAA GAA CTG GGG TAT GA	CCC ACG TCA CAC GAT CAT CA
	CCK	CCA ATT TTT CCT GCC CGC AT	AGA AGG AGC AGT CAA GCC AAA
	GIP	AACTGTTGGCTAGGGGACAC	AGCATGGGATCGGAACTCAAC

2.9 Statistical analysis

Statistical analysis was done using GraphPad Prism 8 software. A Shapiro-Wilk test was systematically performed to check the normal distribution of values. One-way or two-way ANOVA was then used, followed by a Tukey or a Dunnett test for mean comparisons. When the values did not follow a normal distribution, a Kruskal Wallis test was performed, followed by a Dunn test for pairwise comparison. The differences were considered significant for a p-value < 0.5. Values were expressed as mean \pm SD.

3 Results

3.1 The satiety effect of proteins depends on their origin

Figure 1 shows the effect of the different proteins on cumulative food intake for 8 hours after their oral administration. Overall, all proteins tend to decrease food intake compared to carbohydrate and water control (**Figure 1A**).

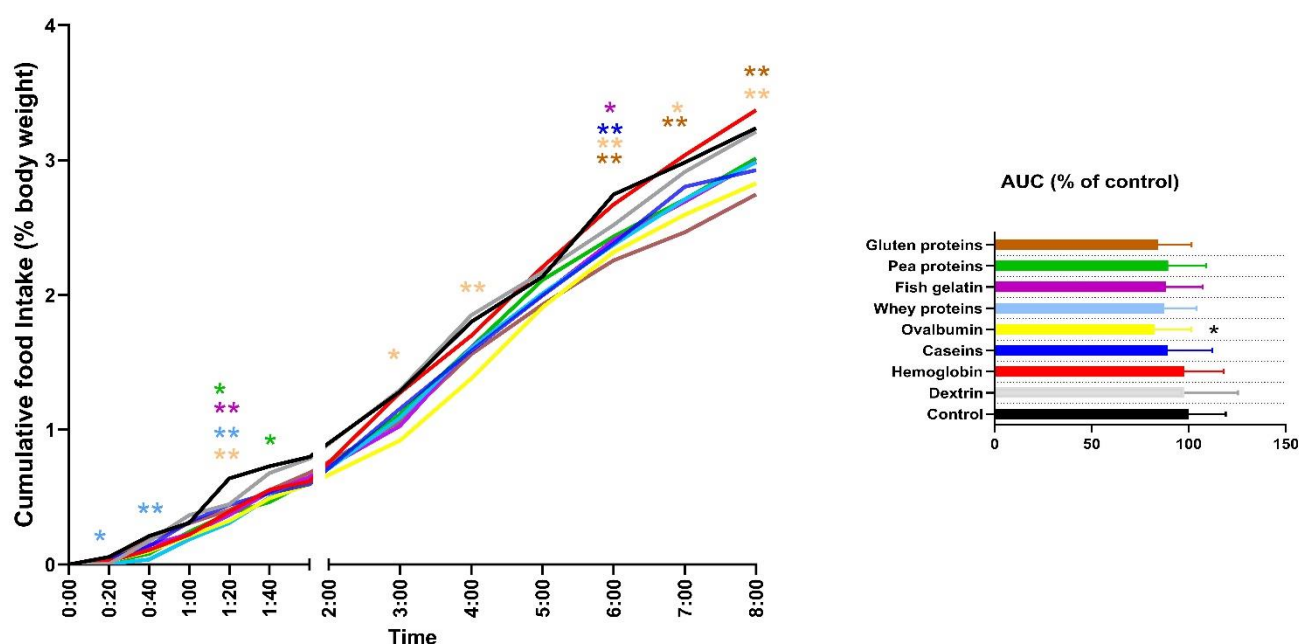


Figure 1: Impact of protein source on short-term food intake in Wistar rats. Male rats were placed in metabolic cages and force-fed once a day with an intragastric tube with different protein preparations (1 g.kg⁻¹) or either isocaloric dextrin or water control. Food intake data and the respiratory gazes were recorded every 20 min. The RER was normalized to the weight of rats and determined by indirect calorimetry using VO₂ (oxygen consumption) and VCO₂ (carbon dioxide production) measurements. Each protein was administered to 9 different rats (n=3, N=9). **A)** Cumulative food intake evolution after protein administration over 8 hours. Data are expressed in % of rat body weight. Statistical analysis was performed with a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison post-hoc test to compare protein to control group values (*p<0,05; **p<0,01). **B)** The corresponding iAUC values are expressed as % of control (water) ± SD. A Kruskal-Wallis test, followed with Dunn's multiple comparison post-hoc test was performed to compare protein to control group values (*p<0,05). **C)** RER evolution after protein administration over 8 hours. A Kruskal-Wallis test, followed with Dunn's multiple comparison post-hoc test was performed to compare protein to control group values (*p<0,05; **p<0,01).

Three proteins particularly stand out from the others by their satietogenic effect. Whey proteins caused a rapid decrease in food intake between 20 min and 1h20 (00:20 h, $p=0.03$; 0:40/1:20 h, $p=0.0012$), and gluten proteins led to a later decrease from 6 until 8 h after protein administration (6:00 h, $p=0.0037$; 7:00 h, $p=0.0063$ and 8:00 h, $p=0.0056$). Ovalbumin significantly reduced food intake over the entire experiment time, as shown in **Figure 1B**.

Figure 1C shows the effect of protein on the RER for 8 hours after protein administration. The average initial RER value was 0.92, and there was no significant difference between groups. Similarly to food intake, whey proteins rapidly decreased the RER and ovalbumin led to a later decrease in RER. Whey proteins administration decreased RER values by about 0.05 between 40 min and 1h20 ($p<0.01$) and about 0.025 from 1h20 h to 1h40 ($p<0.5$). Ovalbumin administration significantly decreased the RER, by about 0.025, between 1h40 h and 4 h ($p<0.05$). Pea and casein proteins decreased RER between 1h20 and 1h40, and a tendency of dextrin to increase RER from 40 min to 1h20 was observed.

3.2 Dietary proteins from different origins differently impact the plasma hormone profile

Figure 2 shows the effects of the different dietary proteins on plasma hormone levels involved in food intake regulation. Protein ingestion did not significantly increase GLP-1, CCK and PYY plasma concentrations.

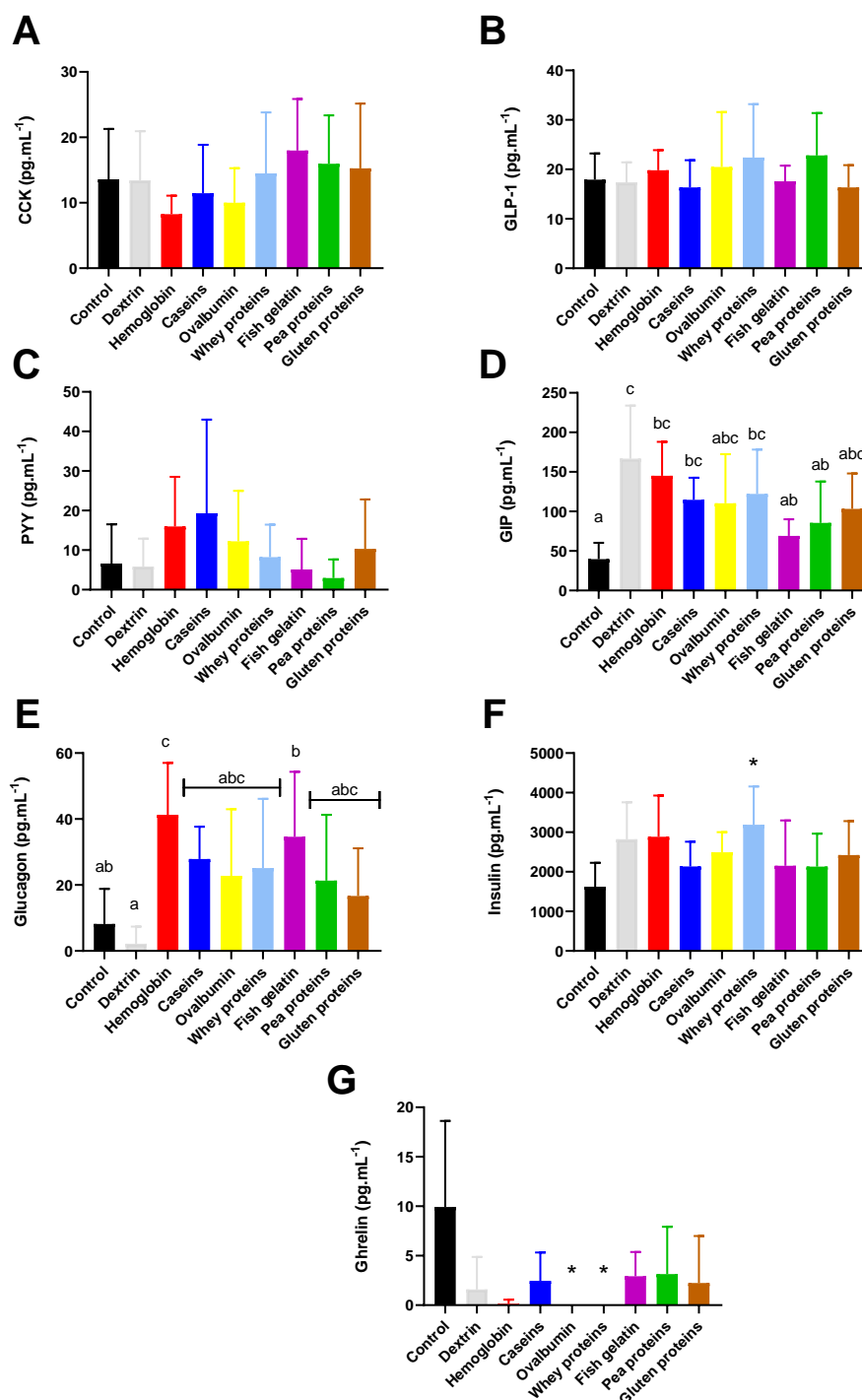


Figure 2: Impact of protein source on plasma hormones involved in food intake regulation. The different proteins (1 g.kg⁻¹) or either an isocaloric dextrin control or a water control were orally administrated once a day (N< 6), and plasma samples were collected after 30 min by the tail vein. **A and D**) CCK and GIP plasma concentration (pg.mL⁻¹). Statistical analysis was performed with a one-way ANOVA analysis, followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test to compare all conditions. Means without a common letter are statistically different (p<0,05). **B, C, E-G**) GLP-1, PYY, insulin, glucagon and ghrelin plasmatic concentration (pg.mL⁻¹). Statistical analysis was performed with a

Kruskall-Wallis analysis, followed by Dunn's multiple comparison post-hoc test to compare all conditions. Means without a common letter are statistically different ($p < 0,05$), and means with an asterisk are only different from the control ($* p < 0,05$).

However, dietary proteins tended to increase plasma GIP, glucagon and insulin concentrations. GIP concentration value was almost tripled after dextrin, hemoglobin, caseins, and whey protein ingestion ($p < 0.05$). The oral administration of proteins or carbohydrates tended to decrease ghrelin plasma concentration. Ovalbumin and fish gelatin administration caused the drop of ghrelin secretion to undetectable levels (**Figure 2G**). Proteins and carbohydrates consumption slightly increased insulin concentration, but this was only significant for whey proteins ($p = 0.0251$) (**Figure 2F**). Similarly, Figure 2E shows that protein consumption increased plasma glucagon concentration compared to carbohydrates and water control. In addition, the origin of the proteins influenced the plasma glucagon levels differently.

3.3 Peptidome analysis of the digested proteins after *in vitro* SGID

Intestinal digests were analyzed by SEC to compare peptide apparent molecular weight (MW) distribution (**Figure 3 A**).

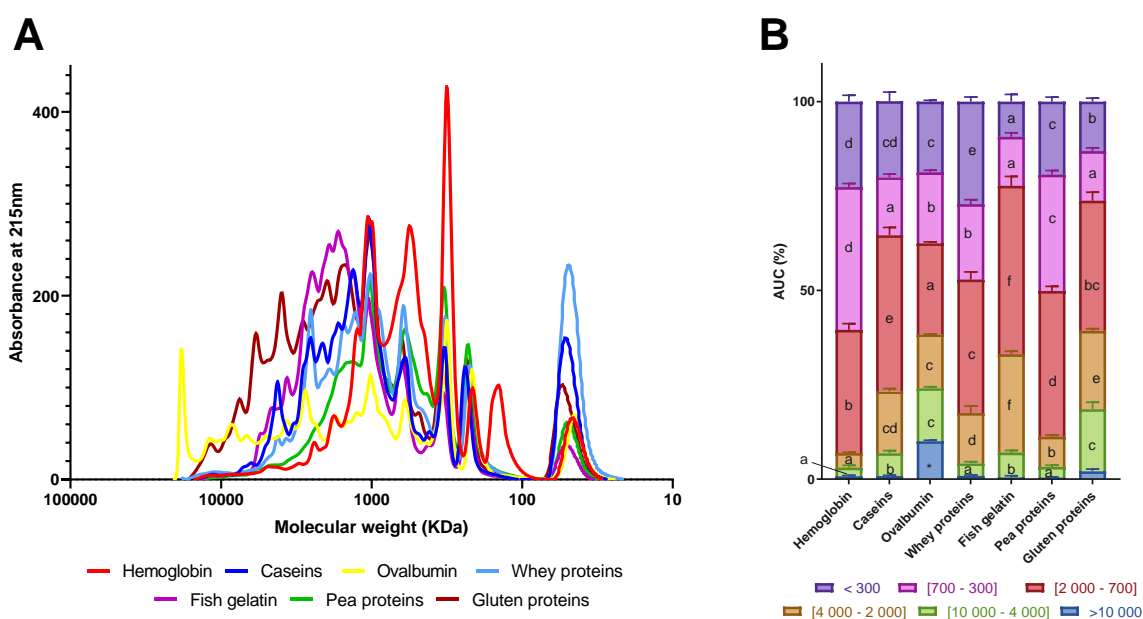


Figure 3: Peptidome characterization by SEC of SGID digested proteins. A) MW profiles of the SGID intestinal peptidomes of the different dietary proteins ($N > 3$). Values were averaged per group. **B)** The mean (\pm SD) molecular weight distribution of peptides, expressed in the percentage of the total area under the curve (AUC), was calculated from the linear regression relationship, which correlates with the Log of known MW standards and the elution volume. In the same molecular weight range, bars with

different letters are significantly different ($p < 0.05$). Statistical analysis was performed with a two-way ANOVA analysis, followed by Tukey's multiple comparison post-hoc test ($p < 0.05$).

The digested protein profiles differed from one protein to another but similarities exist such as for pea, whey and hemoglobin, suggesting that these proteins were more digestible than the others. In contrast, ovalbumin appeared to be not wholly digested at the end of the SGID. The calculation of the area under the curve permitted representing the peptide MW distribution by MW classes and highlighting the differences between all intestinal digests (**Figure 3B**). Hemoglobin, whey and pea protein digestion generated more small peptides (< 700 Da), whereas ovalbumin and gluten digestion led to larger peptides (> 4000 kDa). Ovalbumin was the protein exhibiting the largest peptide fraction (above 10,000 kDa) at the end of digestion ($p < 0.0001$).

Then the proteins for which the proportion of peptides greater than 4000 kDa is significantly higher after digestion are ovalbumin and gluten ($p < 0.0001$). In contrast, the digestion of whey proteins produced significantly smaller peptides (< 300 kDa) ($p < 0.0001$) and the digestion of hemoglobin and pea proteins was responsible for the highest production of peptides with an apparent mass between 300 and 700 kDa ($p < 0.0001$).

3.4. Dietary proteins modulate intestinal hormone secretion in STC-1 cells.

Digested proteins were incubated for 2 hours with STC-1 cells to determine their impact on CCK, GLP-1 and GIP secretion. Digested hemoglobin, whey, pea and gluten proteins significantly increased GLP-1 secretion compared to control groups (**Figure 4A**), and digested proteins of hemoglobin, caseins, whey proteins and ovalbumin significantly increased CCK secretion compared to the buffer control group only (**Figure 4C**).

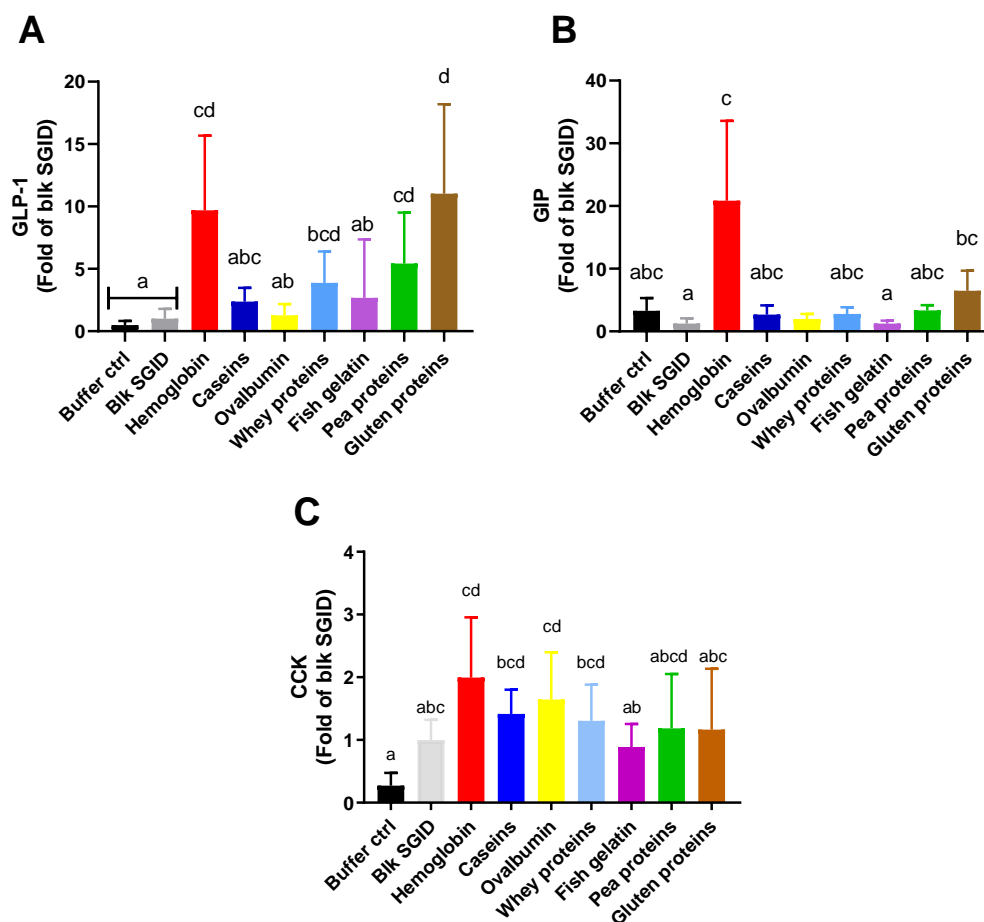


Figure 4: Effect of digested proteins on GLP-1, GIP and CCK secretion by STC-1 cells. Intestinal hormone released by STC-1 cells was determined, after 2h of incubation with digested proteins at 10 mg.mL⁻¹, by EIA kits. Values are mean (N=3 and n=3) ± SD and are expressed in the blk SGID mean value fold. Means without a common letter within the same graph are significantly different ($p < 0.05$) using Kruskal-Wallis analysis followed by Dunn post-hoc test for pairwise comparisons.

Regarding the effect of digested proteins on GIP secretion by STC-1 cells (**Figure 4B**), there were only significant differences between digested hemoglobin and gluten compared to digested fish gelatin and Blk SGID.

The effect of digested proteins on the expression of genes encoding for these intestinal hormones was then carried out. The digested proteins were incubated with STC-1 cells at 2.5 mg.mL⁻¹ for 12 and 24 hours, and mRNA expression of proglucagon, PC1, GIP and CCK was quantified by RT-qPCR. The results obtained after 12 and 24 h of incubation were quite similar. For the proglucagon gene (**Figure 5A**), only digested pea proteins significantly increased the mRNA level compared to the control group (12 h, $p=0.0005$ and 24 h, $p=0.0002$).

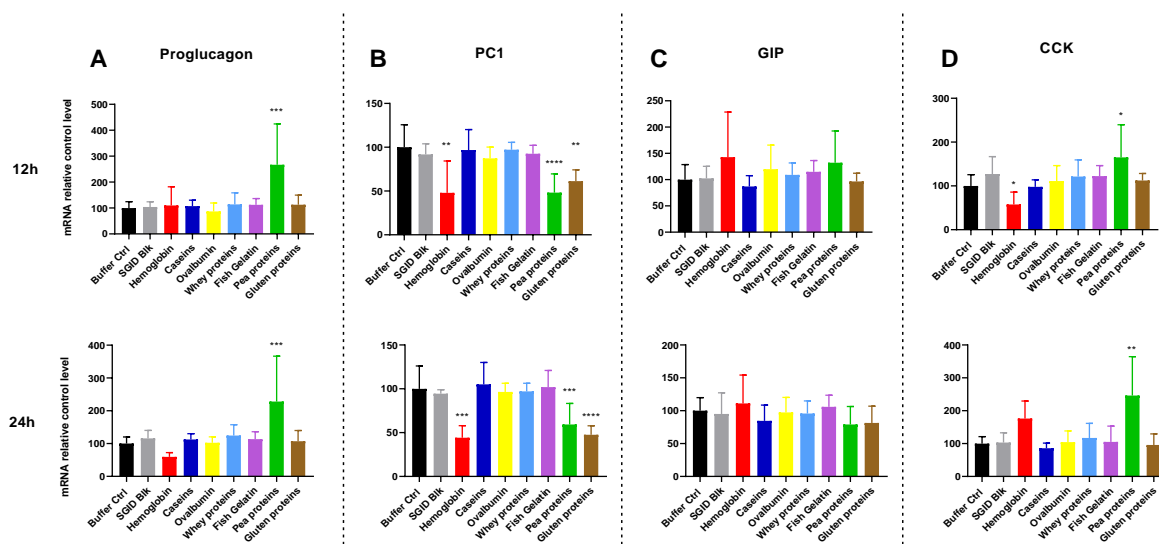


Figure 5. Digested proteins modulate intestinal hormone gene mRNA expression.

Proglucagon, PC1, GIP and CCK mRNA relative levels were normalized to HPRT1 in STC-1 cells incubated for 12 and 24h with 2.5 mg.mL⁻¹ of the different digested proteins. Values are means (N=3, n=3) ± SD and are expressed in the percentage of control (Buffer control). Statistical analysis was performed with a Kruskal-Wallis analysis, followed by Dunn's multiple comparison post-hoc test (*p<0,05, **p<0.01; ***p<0.001 and ****p<0.0001).

For the PC1 gene (**Figure 5B**), digested hemoglobin, pea and gluten decreased mRNA expression. There was no effect of digested proteins on mRNA expression of GIP (**Figure 5C**). Regarding CCK (**Figure 5D**), digested hemoglobin decreased gene mRNA expression after 12h incubation inversely to digested pea proteins. The effect of hemoglobin was not recovered after 24 h.

4 Discussion

This study first aimed to measure the effects of dietary proteins from different origins on short-term food intake regulation. Seven proteins from different origins (hemoglobin, caseins, ovalbumin, whey proteins, fish gelatin, pea and gluten proteins) were evaluated in male Wistar rats for their satietogenic effects compared to isocaloric carbohydrate and water controls by measuring food intake, RER and plasma levels of several hormones involved in food intake regulation. In parallel, the dietary proteins were in vitro digested using the INFOGEST protocol adapted to proteins only (Atallah et al., 2020; Brodkorb et al., 2019b), and the MW distribution of the intestinal peptidomes was compared using SEC. The ability of the digested proteins to modulate intestinal hormone secretion and their respective gene expression was then

investigated using enteroendocrine STC-1 cells. It is important to consider that the rats were force-fed with a quantity of the different proteins equivalent to 1 g.kg⁻¹ of their weight, representing around 11 % of their daily protein intake and 1.5 % of their daily energy intake. The proteins provided by their ad libitum food consumption are a mixture of hydrolysed fish proteins (33 %) and vegetable proteins (66 %). It was chosen not to fast the rats before gavage during the food intake study not to induce stress and maintain their natural eating habits. Results showed that all proteins tended to decrease food intake more than water or carbohydrate intake over 8 hours. In addition, all proteins reduced food intake over the observed period compared to dextrin equicaloric control. These results confirmed the role of proteins in the satietogenic effect compared to non or iso-caloric solutions (Anderson et al., 2004a; Geliebter, 1979). However, the observed differences were not significant at the studied times and for all proteins. The high intragroup variability could partially explain these results observed probably due to a difference in the rat metabolic states at T₀ because rats did not fast.

These results also highlight different satiety-response profiles depending on the protein origins. Indeed, whey proteins reduced food intake as early as 20 min after ingestion, in contrast to gluten proteins, for which the decrease in food intake appeared after six hours. Ovalbumin decreased food intake homogeneously between one to eight hours after ingestion and was the sole protein preparation reducing rat food intake significantly over the entire experiment, which was evaluated with the AUC.

The satietogenic effect of whey proteins has been extensively studied and is consistent with the results obtained. Indeed, several works evidenced that whey proteins exerted satiety in a short time compared to caseins in different models (Healthy and obese human, and intestinal cells) (Bendtsen et al., 2013b; Hall et al., 2003c; Kung et al., 2018; Pal et al., 2014; Santos-Hernández, Tomé, et al., 2018). A few studies compared different protein sources on short-term satiety (<2h) (Abou-Samra et al., 2011b; G. H. Anderson et al., 2004b; W. Chen et al., 2018b). However, the results are sometimes contradictory and challenging to compare mainly due to the different protein states (hydrolysate, intact protein, sole or in food matrice) and the chosen models (rat, human, porc, mice). However, these studies highlighted a dietary protein source effect on short-term food intake. For instance, Chen et al. evidenced a more pronounced satietogenic effect for a gluten protein hydrolysate than for whey protein hydrolysate one hour after ingestion in rats (W. Chen et al., 2018b), which is not consistent with our results but highlights the importance of hydrolysis protein pre-treatment on food intake regulation. In humans, Abou-Samra et al. highlighted a more substantial satietogenic effect of casein and pea proteins than egg and whey proteins 30 min after ingestion, and Hall et al. showed that whey proteins were more satietogenic than caseins after 1h30 (Hall et al. 2003;

Abou-Samra et al. 2011). Anderson et al. evidenced that whey proteins are more satietogenic than egg proteins but not soy in humans after one hour (Anderson et al. 2004b), which is more consistent with the results obtained in the present study. However, little is known about the differences in the acute effects of dietary proteins, depending on their origins, in satiety and metabolic markers of food intake regulation over two hours after their administration.

The use of metabolic cages permitted a more in-depth study of the effect of proteins on energy homeostasis since information on respiratory quotient, energy expenditure and activity were measured. In addition, the RER calculation provides information on the oxidation of nutrients. Indeed, the chemical transformation of macronutrients into chemical energy usable by the body (ATP) goes through oxidative phosphorylation reactions that will consume oxygen and produce carbon dioxide. Thus, thanks to the evaluation of the RER, we can distinguish which nutrient source is metabolized by the body. The RER generally ranges from 1.0 to 0.7. The RER is around 0.85 in a stable state, around 1 when the metabolized source is carbohydrates, less than 0.7 for lipids and from 0.8 to 0.9 for proteins (Petr et al., 2021).

In the present study, RER results were pretty correlated to food intake giving information on the ability of proteins to be digested and metabolized. RER values obtained, considering all the groups, ranged between 0.85 and 0.95 and corresponded to typical values. As expected, the carbohydrate control group had higher RER values during the first two hours following the preload ingestion. The RER values obtained show that whey proteins were metabolized very quickly compared to ovalbumin proteins, which are metabolized between 1h30 and 4h after ingestion, corroborating the food intake results. The SEC analysis of in vitro digested protein profiles shows that the different proteins were not digested at the same rate and did not produce similar peptidomes. The digestion rate of proteins will determine the kinetics of amino acids and small peptides' appearance in the blood and the intestinal peptide sensing leading to intestinal hormone secretion. The digestion rate thus impacts their effect on short-term food intake regulation through the release of amino acids or peptides that will stimulate the secretion of anorexigenic hormones (Santos-Hernández, Amigo, et al., 2018), and the plasma concentration of amino acids stimulates satiety directly in the central nervous system (Potier et al., 2009b). Ovalbumin protein digestion led to a more significant proportion of large resistant peptides, which could partially explain the delayed effect of ovalbumin on food intake. In addition, it is known that ovalbumin can form disulphide bonds that participate in solid gel conformation, reducing accessibility to enzymatic cleavage sites and consequently the digestion of this protein (Pathania 2019). Surprisingly we did not find the same digestion profile for caseins known to be "slow" proteins. Indeed, it is known that caseins form solid coagulates resistant to gastric digestion, which causes a delay in the gastric emptying of nutrients, and a slower digestion and amino acid absorption kinetics. (Mulet-Cabero et al., 2020). This

difference can be explained by the fact that protein samples did not undergo any heat treatment before their administration, and we know that the proteins of egg white are more digestible when they are treated by technological processes (Bhat et al., 2021) contrary to caseins, which are more digestible after heat treatment (Li et al., 2021) .

The effects of proteins 30 min after ingestion, on the secretion of hormones involved in short-term peripheral food intake regulation were different from what we expected, except for GIP, which evidenced the secretion-stimulating effect of proteins and carbohydrates. Indeed, despite a trend, proteins did not increase the plasma concentrations of GLP-1, CCK and PYY contrary to what has already been demonstrated (Belza et al., 2013; Diepvens et al., 2008; Ishikawa et al., 2015a; Rigamonti et al., 2019). Nevertheless, this effect is not consistently demonstrated in vivo, as shown by the studies of Chen et al. (2018).

Here we observed that the ingestion of proteins alone globally inhibited ghrelin and increased insulin and glucagon plasma concentrations, 30 minutes after administration. However, a protein-origin effect was observed. Indeed, ovalbumin and whey proteins significantly reduced plasma ghrelin levels compared to others. Furthermore, only whey protein significantly increased insulin plasma levels, and hemoglobin and fish gelatin proteins significantly increased plasma glucagon levels compared to other proteins. It is documented that the ingestion of proteins inhibits ghrelin (Koliaki et al., 2010) and stimulates glucagon when blood glucose is low (Calbet & MacLean, 2002). Moreover, ingestion of whey and peas increases insulin plasma concentration (Calbet & MacLean, 2002; Hoppe et al., 2009).

In vitro study highlights the direct effect of digested protein on satietogenic hormones GLP-1, and CCK. Digested hemoglobin, pea and gluten stimulate GLP-1 and CCK secretion and regulate directly the associated gene expression as already suggested by several studies (Caron, Cudennec, et al., 2016a; Dugardin et al., 2020; Santos-Hernández, Amigo, et al., 2018) even if some results differ. Although a trend is observed for egg and fish gelatin proteins, there is no evidence of a significant difference as suggested by the studies of Santos-Hernández et al. (2018) and Cudennec et al. (2012). It can also be added that the effect of digested proteins on the secretion of gut hormones is well correlated with the effect of the same digested proteins on the associated gene expression, even if this tendency was unexpected. The results obtained on the modulation of orexigenic hormone gene expression (12 to 24h contact) are yet incomparable to those observed for the hormone secretion (2h of contact). The contact time between digested proteins and the STC-1 cells for the secretion study was too short to be tested in gene expression quantification experiments. Except for digested pea proteins, digested proteins do not seem to influence the proglucagon gene, the precursor of the GLP-1. Moreover, some digested proteins downregulate PC1 transcript levels,

which encodes the enzyme responsible for the GLP-1 release from the proglucagon in the intestine (Holst et al., 2018). Similar results were found by Domenger et al. concerning the effect of hemoglobin-derived peptides on mRNA expression of CCK, PC1 and proglucagon (Domenger et al., 2017a). They observed a decrease of about 25 % in the transcript levels encoding PC1. The assumptions presented are a compensatory inhibitory response on PC1 to limit excessive GLP-1 release over prolonged times or a GLP-1 concentration downregulation. However, some studies observed the expected effect, whereby the proteins upregulated the expression of genes coding for gut hormones. Indeed, Heffernan et al (2022) showed that blue whiting protein hydrolysates upregulated the proglucagon gene expression but down regulated CCK and PYY gene expression after 4 h of contact with STC-1 cells. Santos-Hernandez et al (2018), showed that caseins digested at 2 mg.mL⁻¹ increased the expression of CCK mRNA by a fold of 1.7 after 2 hours of incubation with STC-1, and Caron et al. (2016) showed that hemoglobin intestinal digest upregulated the gene expression of CCK and proglucagon after 24h of treatment on STC-1 cells (Caron, Domenger, et al., 2016; Santos-Hernández, Tomé, et al., 2018). The stimulatory or inhibitory effect of proteins on gene expression may depend on concentration, time or other factors. Nevertheless, it can be highlighted that proteins exert an effect that is source dependent.

This study shows that digested pea proteins upregulated proglucagon and CCK transcript levels compared to others, and that digested hemoglobin, pea and gluten proteins down regulated PC1 transcript levels compared to other protein sources. It can be concluded that proteins directly affect the modulation of genes encoding satietogenic hormones and regulators in vitro.

The comparison between in vivo and in vitro results is not obvious. In vivo, ovalbumin and whey proteins appear to be the most satietogenic sources when gluten acts later. Unfortunately, none of these proteins increased the plasma concentrations of CCK and GLP-1, although this effect is evident in vitro. Moreover, in in vitro studies, digested hemoglobin and gluten proteins exerted the most significant effect on intestinal hormone secretion stimulation.

The difference in the study's parameters or conditions could explain that the observed effects do not overlap. Indeed, the food intake was observed over 8 hours and the hormones were only measured 30 minutes after ingestion, whereas in vitro, hormone levels were determined with fully digested proteins after 2 h of contact.

Conclusion

To conclude, this study shows the effect of proteins on energy homeostasis through their effect on short-term food intake regulation correlated with the modulation of metabolic markers. It also highlights the influence of the protein origin on these different mechanisms. Ovalbumin generated a much more pronounced satietogenic over 8 h and whey proteins decreased food intake very quickly after ingestion, contrary to gluten which acted later. The difference between proteins in their satiety effects can be explained by a difference in their digestibility speed and their impact on intestinal and pancreatic hormone plasma levels. Hemoglobin and whey proteins favoured the increase of plasma insulin and GIP concentration, and there is a tendency of digested plant proteins to increase CCK concentration in vivo and GLP-1 in vitro. Fish gelatin showed a greater effect on increasing plasma glucagon concentration than the others. Digested hemoglobin stimulated more anorexigenic hormone secretion in vitro than any other protein source. Thus, dietary proteins enhance satiety in nature and origin-dependent manner.

References

- Abou-Samra, R., Keersmaekers, L., Brienza, D., Mukherjee, R., & Macé, K. (2011). Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter. *Nutrition Journal*, 10(1), 139. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-139>
- Anderson, G. H, Moore, S. E.. (2004a). Dietary Proteins in the Regulation of Food Intake and Body Weight in Humans, *The Journal of Nutrition*, Volume 134, Issue 4, Pages 974S–979S, <https://doi.org/10.1093/jn/134.4.974S>
- Anderson, G. H., Tecimer, S. N., Shah, D., & Zafar, T. A. (2004b). Protein source, quantity, and time of consumption determine the effect of proteins on short-term food intake in young men. *The Journal of Nutrition*, 134(11), 3011-3015. <https://doi.org/10.1093/jn/134.11.3011>
- Atallah, N., Deracinois, B., Boulier, A., Baniel, A., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Ravallec, R., Flahaut, C., & Cudennec, B. (2020). In Vitro Assessment of the Impact of Industrial Processes on the Gastro-intestinal Digestion of Milk Protein Matrices Using the INFOGEST Protocol. *Foods*, 9(11), 1580. <https://doi.org/10.3390/foods9111580>
- Belza, A., Ritz, C., Sørensen, M. Q., Holst, J. J., Rehfeld, J. F., & Astrup, A. (2013). Contribution of gastroenteropancreatic appetite hormones to protein-induced satiety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(5), 980-989. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.047563>
- Bendtsen, L. Q., Lorenzen, J. K., Bendtsen, N. T., Rasmussen, C., & Astrup, A. (2013). Effect of Dairy Proteins on Appetite, Energy Expenditure, Body Weight, and Composition : A Review of the Evidence from Controlled Clinical Trials. *Advances in Nutrition*, 4(4), 418-438. <https://doi.org/10.3945/an.113.003723>
- Bensaïd, A., Tomé, D., Gietzen, D., Even, P., Morens, C., Gausseres, N., & Fromentin, G. (2002). Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiology & Behavior*, 75(4), 577-582. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00646-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00646-7)
- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Bekhit, A. E.-D. A., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2021). Effect of processing technologies on the digestibility of egg proteins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(5), 4703-4738. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12805>
- Blüher, M. (2020). Metabolically Healthy Obesity. *Endocrine Reviews*, 41(3), 405-420. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa004>
- Bohl, M., Bjørnshave, A., Gregersen, S., & Hermansen, K. (2016). Whey and Casein Proteins and Medium-Chain Saturated Fatty Acids from Milk Do Not Increase Low-Grade Inflammation in Abdominally Obese Adults. *The Review of Diabetic Studies : RDS*, 13(2-3), 148-157. <https://doi.org/10.1900/RDS.2016.13.148>
- Bowen, J., Noakes, M., & Clifton, P. M. (2006). Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad libitum energy intake. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(8), 2913-2919. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0609>
- Bradstreet. (1954). Kjeldahl Method for Organic Nitrogen | *Analytical Chemistry*. 26(1). <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60085a028>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastro-intestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Burton-Freeman, B., Gietzen, D. W., & Schneeman, B. O. (1997). Meal pattern analysis to investigate the satiating potential of fat, carbohydrate, and protein in rats. *The American Journal of Physiology*, 273(6), R1916-1922. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.6.R1916>
- Calbet, J. A. L., & MacLean, D. A. (2002). Plasma Glucagon and Insulin Responses Depend on the Rate of Appearance of Amino Acids after Ingestion of Different Protein Solutions in Humans. *The Journal of Nutrition*, 132(8), 2174-2182. <https://doi.org/10.1093/jn/132.8.2174>
- Caron, J., Cudennec, B., Domenger, D., Belguesmia, Y., Flahaut, C., Kouach, M., Lesage, J., Goossens, J.-F., Dhulster, P., & Ravallec, R. (2016). Simulated GI digestion of dietary protein : Release of new bioactive peptides involved in gut hormone secretion. *Food Research International*, 89, 382-390. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.033>

- Caron, J., Domenger, D., Belguesmia, Y., Kouach, M., Lesage, J., Goossens, J.-F., Dhulster, P., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2016). Protein digestion and energy homeostasis : How generated peptides may impact intestinal hormones? *Food Research International*, 88, 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.018>
- Chen, W., Hira, T., Nakajima, S., & Hara, H. (2018). Wheat gluten hydrolysate potently stimulates peptide-YY secretion and suppresses food intake in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82(11), 1992-1999. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1505482>
- 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. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.003>
- Diepvens, K., Häberer, D., & Westerterp-Plantenga, M. (2008). Different proteins and biopeptides differently affect satiety and anorexigenic/orexigenic hormones in healthy humans. *International Journal of Obesity*, 32(3), 510-518. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803758>
- Domenger, D., Caron, J., Belguesmia, Y., Lesage, J., Dhulster, P., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2017). Bioactivities of hemorphins released from bovine haemoglobin gastro-intestinal digestion : Dual effects on intestinal hormones and DPP-IV regulations. *Journal of Functional Foods*, 36, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.047>
- Dramane, G., Ahyi, V., & Akpona, S. (2017). L'obésité dans les pays en développement : Causes et implications au Bénin. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 11(7), 657-663. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(17\)30158-X](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(17)30158-X)
- Due, A., Toubro, S., Skov, A. R., & Astrup, A. (2004). Effect of normal-fat diets, either medium or high in protein, on body weight in overweight subjects : A randomised 1-year trial. *International Journal of Obesity*, 28(10), 1283-1290. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802767>
- Dugardin, C., Cudennec, B., Turrett, M., Caron, J., Guérin-Deremaux, L., Behra-Miellet, J., Lefranc-Millot, C., & Ravallec, R. (2020). Explorative Screening of Bioactivities Generated by Plant-Based Proteins after In Vitro Static Gastro-intestinal Digestion. *Nutrients*, 12(12), 3746. <https://doi.org/10.3390/nu12123746>
- Dugardin, C., & Fleury, L. (2022). An Exploratory Study of the Role of Dietary Proteins in the Regulation of Intestinal Glucose Absorption. *Frontiers in Nutrition*, 8, 769773. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.769773>
- Fromentin, G., Darcel, N., Chaumontet, C., Marsset-Baglieri, A., Nadkarni, N., & Tomé, D. (2012). Peripheral and central mechanisms involved in the control of food intake by dietary amino acids and proteins. *Nutrition Research Reviews*, 25(1), 29-39. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000175>
- Geliebter, A. A. (1979). Effects of equicaloric loads of protein, fat, and carbohydrate on food intake in the rat and man. *Physiology & Behavior*, 22(2), 267-273. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(79\)90086-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(79)90086-6)
- Geraedts, M. C. P., Troost, F. J., Tinnemans, R., Söderholm, J. D., Brummer, R.-J., & Saris, W. H. M. (2010). Release of satiety hormones in response to specific dietary proteins is different between human and murine small intestinal mucosa. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 56(4), 308-313. <https://doi.org/10.1159/000312664>
- Godfray, H. C. J., Aveyard, P., Garnett, T., Hall, J. W., Key, T. J., Lorimer, J., Pierrehumbert, R. T., Scarborough, P., Springmann, M., & Jebb, S. A. (2018). Meat consumption, health, and the environment. *Science*, 361(6399), eaam5324. <https://doi.org/10.1126/science.aam5324>
- Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J., & Morgan, L. M. (2003). Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastro-intestinal hormone secretion and appetite. *The British Journal of Nutrition*, 89(2), 239-248. <https://doi.org/10.1079/BJN2002760>
- Halton, T. L., & Hu, F. B. (2004). The Effects of High Protein Diets on Thermogenesis, Satiety and Weight Loss : A Critical Review. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(5), 373-385. <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719381>
- Heffernan, S., Nunn, L., Harnedy-Rothwell, P. A., Gite, S., Whooley, J., Giblin, L., FitzGerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2022). Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*) Protein Hydrolysates Increase GLP-1 Secretion and Proglucagon Production in STC-1 Cells Whilst Maintaining Caco-2/HT29-MTX Co-Culture Integrity. *Marine Drugs*, 20(2), 112. <https://doi.org/10.3390/md20020112>
- Hill, A. J., & Blundell, J. E. (1986). Macronutrients and satiety: The effects of a high-protein or high-carbohydrate meal on subjective motivation to eat and food preferences. *Nutrition and Behavior (USA)*.

- Holst, J. J., Albrechtsen, N. J. W., Gabe, M. B. N., & Rosenkilde, M. M. (2018). Oxyntomodulin: Actions and role in diabetes. *Peptides*, 100, 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.09.018>
- Hoppe, C., Mølgaard, C., Dalum, C., Vaag, A., & Michaelsen, K. F. (2009). Differential effects of casein versus whey on fasting plasma levels of insulin, IGF-1 and IGF-1/IGFBP-3 : Results from a randomized 7-day supplementation study in prepubertal boys. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(9), 1076-1083. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.34>
- Hoque, M., Akash, Mondal, S., & Adusumilli, S. (2022). Chapter Eighteen—Way forward for sustainable livestock sector. In S. Mondal & R. L. Singh (Éds.), *Emerging Issues in Climate Smart Livestock Production* (p. 473-488). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822265-2.00016-8>
- Ishikawa, Y., Hira, T., Inoue, D., Harada, Y., Hashimoto, H., Fujii, M., Kadowaki, M., & Hara, H. (2015). Rice protein hydrolysates stimulate GLP-1 secretion, reduce GLP-1 degradation, and lower the glycemic response in rats. *Food & Function*, 6(8), 2525-2534. <https://doi.org/10.1039/C4FO01054J>
- Jackson, S. E., Llewellyn, C. H., & Smith, L. (2020). The obesity epidemic – Nature via nurture: A narrative review of high-income countries. *SAGE Open Medicine*, 8, 2050312120918265. <https://doi.org/10.1177/2050312120918265>
- Janssen, S., & Depoortere, I. (2013). Nutrient sensing in the gut: New roads to therapeutics? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(2), 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.006>
- Koliaki, C., Kokkinos, A., Tentolouris, N., & Katsilambros, N. (2010). The Effect of Ingested Macronutrients on Postprandial Ghrelin Response: A Critical Review of Existing Literature Data. *International Journal of Peptides*, 2010, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2010/710852>
- Kung, B., Anderson, G. H., Paré, S., Tucker, A. J., Vien, S., Wright, A. J., & Goff, H. D. (2018). Effect of milk protein intake and casein-to-whey ratio in breakfast meals on postprandial glucose, satiety ratings, and subsequent meal intake. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 8688-8701. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14419>
- Leidy, H. J., Clifton, P. M., Astrup, A., Wycherley, T. P., Westerterp-Plantenga, M. S., Luscombe-Marsh, N. D., Woods, S. C., & Mattes, R. D. (2015). The role of protein in weight loss and maintenance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(6), 1320S-1329S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.084038>
- Li, S., Ye, A., & Singh, H. (2021). Impacts of heat-induced changes on milk protein digestibility: A review. *International Dairy Journal*, 123, 105160. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105160>
- Lu, V. B., Gribble, F. M., & Reimann, F. (2021). Nutrient-Induced Cellular Mechanisms of Gut Hormone Secretion. *Nutrients*, 13(3), 883. <https://doi.org/10.3390/nu13030883>
- Ministère de l'agriculture et de l'alimentation. (2021). Stratégie nationale sur les protéines végétales. <https://agriculture.gouv.fr/plan-proteines-vegetales>
- Mulet-Cabero, A.-I., Torcello-Gómez, A., Saha, S., Mackie, A. R., Wilde, P. J., & Brodkorb, A. (2020). Impact of caseins and whey proteins ratio and lipid content on in vitro digestion and ex vivo absorption. *Food Chemistry*, 319, 126514. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126514>
- Neacsu, M., Fyfe, C., Horgan, G., & Johnstone, A. M. (2014). Appetite control and biomarkers of satiety with vegetarian (soy) and meat-based high-protein diets for weight loss in obese men: A randomized crossover trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100(2), 548-558. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.077503>
- Nittari, G., Scuri, S., Petrelli, F., Pirillo, I., Luca, N. M. di, & Grappasonni, I. (2019). Fighting obesity in children from European World Health Organization member states. Epidemiological data, medicalsocial aspects, and prevention programs: Doi: 10.7417/CT.2019.2137. *La Clinica Terapeutica*, 170(3), e223-e230. <https://clincaterapeutica.it/ojs/index.php/1/article/view/111>
- OMS. (2020). Obésité et surpoids. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Pal, S., Radavelli-Bagatini, S., Hagger, M., & Ellis, V. (2014). Comparative effects of whey and casein proteins on satiety in overweight and obese individuals: A randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 68(9), 980-986. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.84>
- Pathania, H. (2019). Stability of proteins during processing and storage. (In C. M. Galanakis). Academic Press. <https://dokumen.pub/qdownload/proteins-9780128172865-012817286x-9780128166956.html>

- Petr, M. A., Alfaras, I., Krawczyk, M., Bair, W.-N., Mitchell, S. J., Morrell, C. H., Studenski, S. A., Price, N. L., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Scheibye-Knudsen, M., Lakatta, E. G., Ferrucci, L., Aon, M. A., Bernier, M., & de Cabo, R. (2021). A cross-sectional study of functional and metabolic changes during aging through the lifespan in male mice. *eLife*, 10, e62952. <https://doi.org/10.7554/eLife.62952>
- Potier, M., Darcel, N., & Tomé, D. (2009). Protein, amino acids and the control of food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 12(1), 54-58. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32831b9e01>
- Rigamonti, A. E., Leoncini, R., Casnici, C., Marelli, O., Col, A. D., Tamini, S., Lucchetti, E., Cicolini, S., Abbruzzese, L., Cella, S. G., & Sartorio, A. (2019). Whey Proteins Reduce Appetite, Stimulate Anorexigenic Gastro-intestinal Peptides and Improve Glucometabolic Homeostasis in Young Obese Women. *Nutrients*, 11(2), 247. <https://doi.org/10.3390/nu11020247>
- Santos-Hernández, M., Amigo, L., & Recio, I. (2018). Influence of the food peptide size in the release of gastro-intestinal hormones in enteroendocrine cells. <https://digital.csic.es/handle/10261/194835>
- Santos-Hernández, M., Amigo, L., & Recio, I. (2020). Induction of CCK and GLP-1 release in enteroendocrine cells by egg white peptides generated during gastro-intestinal digestion. *Food Chemistry*, 329, 127188. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127188>
- Santos-Hernández, M., Miralles, B., Amigo, L., & Recio, I. (2018). Intestinal Signaling of Proteins and Digestion-Derived Products Relevant to Satiety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(39), 10123-10131. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02355>
- Santos-Hernández, M., Tomé, D., Gaudichon, C., & Recio, I. (2018). Stimulation of CCK and GLP-1 secretion and expression in STC-1 cells by human jejunal contents and in vitro gastro-intestinal digests from casein and whey proteins. *Food & Function*, 9(9), 4702-4713. <https://doi.org/10.1039/C8FO01059E>
- Schiavo, L., Scalerà, G., Pilone, V., De Sena, G., Quagliariello, V., Iannelli, A., & Barbarisi, A. (2017). A Comparative Study Examining the Impact of a Protein-Enriched Vs Normal Protein Postoperative Diet on Body Composition and Resting Metabolic Rate in Obese Patients after Sleeve Gastrectomy. *Obesity Surgery*, 27(4), 881-888. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2382-y>
- Skov, A., Toubro, S., Rønn, B., Holm, L., & Astrup, A. (1999). Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *International Journal of Obesity*, 23(5), 528-536. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800867>
- Stubbs, R. J., Harbron, C. G., Murgatroyd, P. R., & Prentice, A. M. (1995). Covert manipulation of dietary fat and energy density: Effect on substrate flux and food intake in men eating ad libitum. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(2), 316-329. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.2.316>
- Tilman, D., & Clark, M. (2014). Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature*, 515(7528), 518-522. <https://doi.org/10.1038/nature13959>
- van der Klaauw, A. A., Keogh, J. M., Henning, E., Trowse, V. M., Dhillo, W. S., Ghatei, M. A., & Farooqi, I. S. (2013). High protein intake stimulates postprandial GLP1 and PYY release: PYY and GLP-1 After High Protein Meals. *Obesity*, 21(8), 1602-1607. <https://doi.org/10.1002/oby.20154>
- Weigle, D. S., Breen, P. A., Matthys, C. C., Callahan, H. S., Meeuws, K. E., Burden, V. R., & Purnell, J. Q. (2005). A high-protein diet induces sustained reductions in appetite, ad libitum caloric intake, and body weight despite compensatory changes in diurnal plasma leptin and ghrelin concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(1), 41-48. <https://doi.org/10.1093/ajcn/82.1.41>
- Westerterp-Plantenga, M. S. (2008). Protein intake and energy balance. *Regulatory Peptides*, 149(1-3), 67-69. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.08.026>
- Wu, G., Fanzo, J., Miller, D. D., Pingali, P., Post, M., Steiner, J. L., & Thalacker-Mercer, A. E. (2014). Production and supply of high-quality food protein for human consumption: Sustainability, challenges, and innovations: Sustainability, challenge and innovations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1321(1), 1-19. <https://doi.org/10.1111/nyas.12500>
- Youngentob, K. N., Lindenmayer, D. B., Marsh, K. J., Krockenberger, A. K., & Foley, W. J. (2021). Food intake: An overlooked driver of climate change casualties? *Trends in Ecology & Evolution*, 36(8), 676-678. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.04.003>

Zhou, Y., Chi, J., Lv, W., & Wang, Y. (2021). Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 37(2), e3377. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3377>

Supplemental Material and Methods

Plasma DPP-IV Inhibition study

During the same blood sampling experiment as for the hormone assay, heparin tubes to assay DPP-IV activity were collected at 0, 15, 30 and 60 min. Then, tubes were centrifuged and stored at -80 °C before being used. DPP-IV activity in rat plasma was assessed by fluorescent method described by Fleury et al, 2022. A DPP-IV activity kinetic was carried out for the times T0, T15, T30 and T60 (minutes) by expressing results in fold of control group. The AUCs for each rat were also calculated by expressing results at T15, T30 and T60 in fold of T0.

Energy expenditure and locomotor activity measurement in metabolic cages

During the food intake experiment energy expenditure (EE), and locomotor activity data were recorded every 20 min during the 4 days of experimentation in metabolic cages.

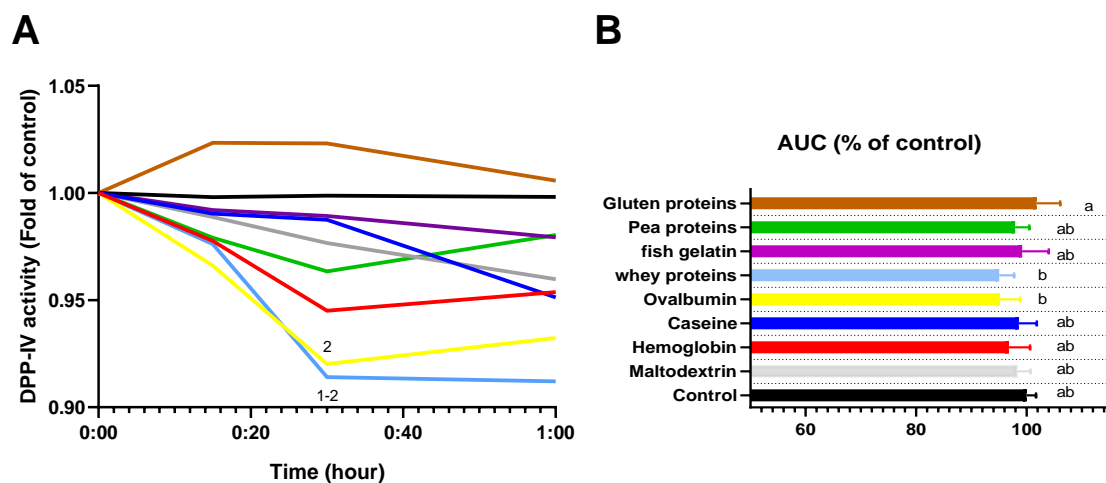
Energy expenditure was determined by indirect calorimetry using both VO_2 (oxygen consumption) and VCO_2 (carbon dioxide production) measurements, according to the following equation (2). VO_2 and VCO_2 values were normalized to total body weight.

$$(1) EE = [CVO_2 * VO_2 + CVCO_2 * VCO_2] / 1000$$

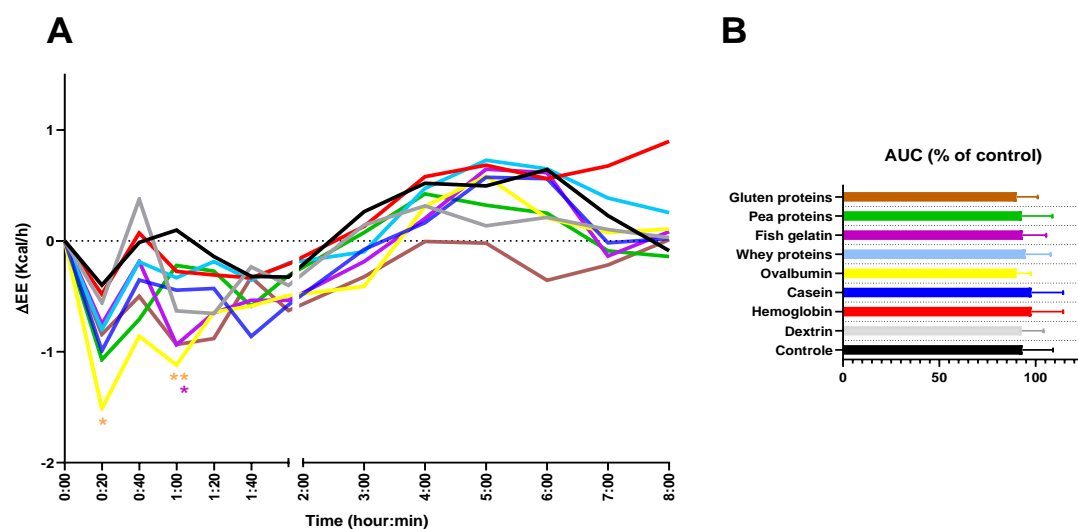
(VO_2 = Volume O_2 (mL/h/kg); VCO_2 = Volume CO_2 (mL/h/kg); CVO_2 = Constant VO_2 ; $CVCO_2$ = Constant VCO_2)

Locomotor activity was measured in count thanks to infrared sensors placed in the frame of the cage. A count is recorded when one of the light beams is interrupted that was previously uninterrupted. The movement of the animal is captured in one of the two spatial axes x and y.

Supplemental Results data

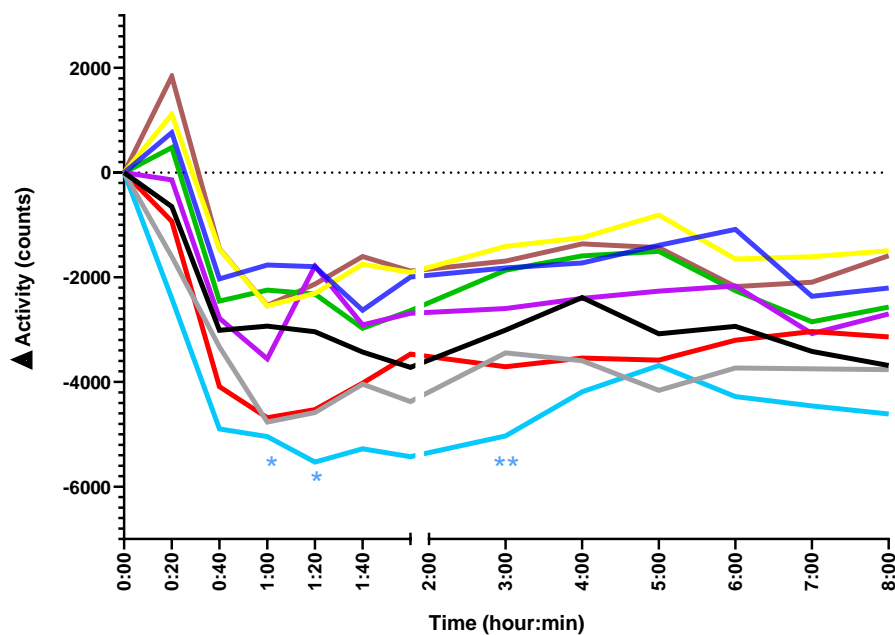


Supplemental figure 1: Impact of protein source on plasma DPP-IV activity in Wistar rats over 1h. During active cycle, male rats were force-fed with intragastric tube with different protein solution of hemoglobin, caseins, ovalbumin, whey proteins, pea proteins and gluten proteins (1 g.kg^{-1}) or either an isocaloric dextrin control or a water control once a day ($N=8$). Plasma samples were collected at 0, 15, 30 and 60 min by the vein tail. A) Kinetic of DPP-IV activity obtained by expressing results at 15, 30 and 60 min in fold of T0 of each rat then by expressing results of DPP-IV activity inhibition of each protein in fold of the control group (water) at 0, 15, 30 and 60 min. Statistical analysis was performed with a Kruskal-Wallis analysis, followed with Dunn's multiple comparison post-hoc test ($p < 0,05$; 1- compared to control 2- compared to gluten).



Supplemental figure 2: Impact of protein source on energy expenditure (Kcal/h) in wistar rats over 8h. In metabolic cages, energy expenditure of rats after protein gavage was determined by indirect calorimetry using both VO_2 (oxygen consumption) and VCO_2 (carbon dioxide production)

measurements. VO_2 and VCO_2 values were normalized to total body weight. A) Data were expressed in ΔEE (TX-T0). Statistical analysis was performed with a Kruskal-Wallis analysis, followed with Dunn's multiple comparison post-hoc test to compare protein condition to control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) B) The corresponding iAUC values expressed as % of control (water). Values were expressed as a percentage of T0 (100 %) and the baseline chosen was 0, mean \pm SD (*, $p < 0.05$ compared to control, Kruskal-Wallis, followed by Dunn's test).



Supplemental figure 3: Impact of protein source on Locomotor activity (counts) in Wistar rats over 8h. In metabolic cages, locomotor activity of rats after protein gavage was measured in counts thanks to infrared sensors placed in the frame of the cage. Data are expressed in Δ activity (TX-T0). Statistical analysis was performed with a Kruskal-Wallis analysis, followed with Dunn's multiple comparison post-hoc test to compare protein condition to control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

A retenir

- ❖ Les protéines montrent une tendance à diminuer la prise alimentaire à court terme.
- ❖ Les protéines exercent un effet satiétogène différent selon leur origine.
 - Les protéines de lactosérum agissent très rapidement sur la satiété.
 - Les protéines de gluten agissent à plus long terme sur la satiété.
 - L'ovalbumine présente le meilleur effet satiétogène global.
- ❖ La digestibilité et de la vitesse d'absorption des protéines impactent leur effet satiétogène.
- ❖ Impact de l'origine des protéines sur la sécrétion des hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et sur l'expression des gènes associés à ces hormones.

Chapitre 2 : Comparaison *in vivo* et *in vitro* du potentiel à inhiber la DPP-IV de protéines alimentaires de différentes origines après digestion gastro-intestinale

Contexte de l'article :

L'article a été publié dans le Journal of Molecular Sciences dans l'issue spéciale : *Bioactives peptides in Human Health and Disease* en juillet 2022.

Les analyses menées en spectrométrie de masse ont été réalisées par Barbara Deracinois, spécialiste de la masse au sein de notre équipe.

Résumé

Introduction : La DPP-IV est une enzyme clé des métabolismes énergétique et glucidique. Elle est responsable de l'inactivation des incrétines GLP-1 et GIP qui participent à réduire la glycémie postprandiale et sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire. De ce fait, elle représente une cible de recherche de plus en plus intéressante dans le cadre de la prévention et de la lutte contre l'obésité et le diabète de type 2, dont la prévalence ne cesse de croître. L'hydrolyse des protéines alimentaires au cours de la digestion gastro-intestinale produit naturellement des peptides dont certains sont des inhibiteurs de l'activité de la DPP-IV.

Objectif : Dans ce contexte, le but de cette étude est de comparer l'effet de sept protéines d'origines différentes quant à leur capacité à inhiber l'activité de la DPP-IV plasmatique chez le rat et d'essayer de comprendre l'origine de cette activité par une étude *in vitro* explorant l'action des populations peptidiques générées au cours de la digestion avant et après passage de la barrière intestinale.

Méthode : La méthode expérimentale est schématisée par la **Figure 32** ci-dessous. Le potentiel inhibiteur de l'hémoglobine bovine, de la caséine, de l'ovalbumine, de la gélatine de poisson et des protéines de pois a été déterminé dans le plasma de rats, 30 min après une administration orale par gavage des différentes protéines. En parallèle, ces mêmes protéines mais aussi le lactosérum et le gluten ont été digérés à l'aide du protocole harmonisé INFOGEST adapté aux protéines, et les IC_{50} de chaque protéine pour l'activité de la DPP-IV ont été déterminées *in situ* grâce à la culture de la lignée cellulaire épithéliale intestinale Caco-2. L'activité inhibitrice de la DPP-IV a également été mesurée après un passage de la barrière intestinale, mimée par un

modèle de coculture cellulaire Caco-2/HT29-MTX (cellules épithéliales/cellules caliciformes à mucus). Enfin, les peptidomes générés par la digestion *in vitro* ont été analysés par LC/MSMS et des IC₅₀ potentielles ont été attribuées, *in silico*, aux peptides identifiés grâce à un modèle de prédiction de type relation quantitative structure – activité (QSAR).

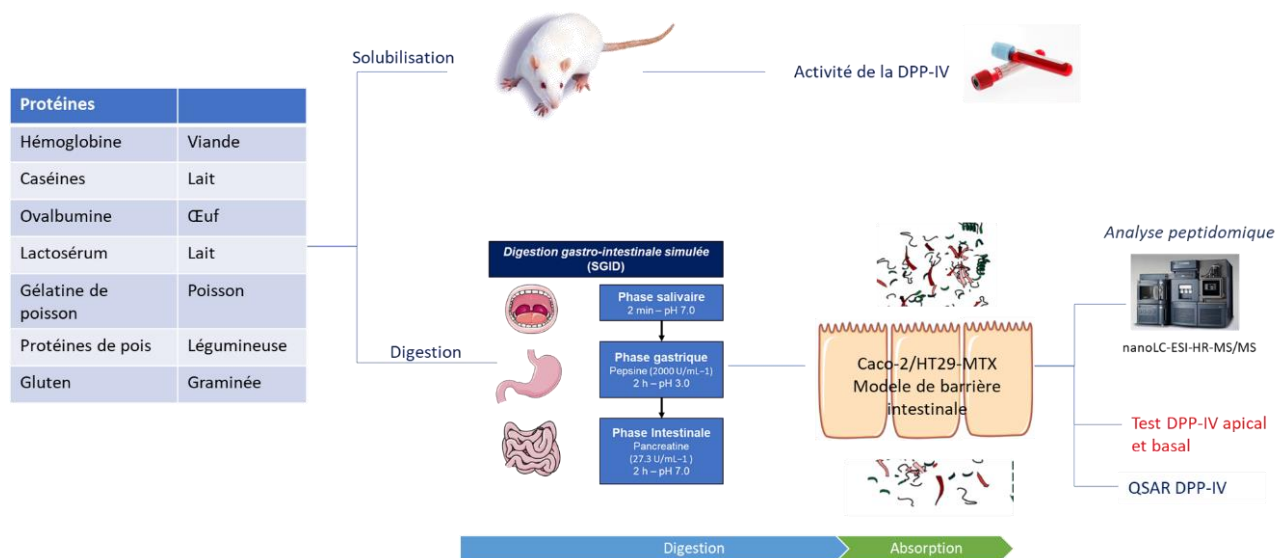


Figure 33: Démarche expérimentale adoptée au cours de l'étude 2.

Résultats : *In vivo*, l'ingestion de toutes les protéines provoque une diminution de l'activité de la DPP-IV plasmatique, à l'exception de l'ingestion des caséines. Les protéines de pois ont montré le pouvoir inhibiteur le plus grand, comparé aux autres protéines. Les études *in vitro* ont mis en évidence que toutes les protéines digérées inhibaient l'activité de la DPP-IV avant passage de la barrière intestinale. Après passage au travers de la barrière, seuls les digestats d'hémoglobine, de caséines et d'ovalbumine inhibaient l'activité de l'enzyme. Malheureusement, même si les études sont complémentaires à bien des égards, aucune corrélation directe n'a pu être établie entre les études *in vivo* et *in vitro*. Néanmoins, l'analyse des peptidomes par LC-MS/MS et la prédiction du potentiel inhibiteur des peptides, a montré un réel potentiel des différentes sources protéiques à fournir des peptides inhibiteurs, de tailles et de séquences différentes.

Conclusion : Les protéines ingérées agissent de manière différente sur l'activité de la DPP-IV plasmatique. Les populations peptidiques générées par la digestion varient beaucoup d'une source à l'autre ce qui pourrait expliquer les différences observées *in vivo* et *in vitro*. Cependant, l'analyse des peptidomes et la prédiction *in silico* QSAR n'explique que partiellement ces différences.

Article

In vivo and in vitro comparison of the DPP-IV inhibitory potential of food proteins from different origins after gastrointestinal digestion

Léa Fleury¹, Barbara Deracinois¹, Camille Dugardin¹, Alice B. Nongonierma², Richard J. FitzGerald², Christophe Flahaut¹, Benoit Cudennec^{1*} and Rozenn Ravallec^{1*}

¹ University of Lille, UMR-T 1158, BioEcoAgro, 59650 Lille, France.

² Department of Biological Sciences, University of Limerick, Limerick, Ireland.

* Correspondence: rozenn.ravallec@univ-lille.fr ; benoit.cudennec@univ-lille.fr.

Citation:; Fleury L.; Deracinois, B; Dugardin, C; Flahaut, C; Cudennec, B; Ravallec, R.. *In vivo* and *in vitro* comparison on the DPP-IV inhibition potential of food proteins from different origins after gastrointestinal digestion. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *x*. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) plays an essential role in glucose metabolism by inactivating incretins. In this context, food protein-derived DPP-IV inhibitors are promising glycemic regulators which may act by preventing the onset of type 2 diabetes in personalized nutrition. In this study, the DPP-IV inhibitory potential of seven proteins from diverse origins was compared for the first time in vitro and in vivo in rat plasma after intestinal barrier (IB) passage of the indigested proteins. The DPP-IV inhibitory potential of bovine hemoglobin, caseins, chicken ovalbumin, fish gelatin and pea proteins was determined in rat plasma thirty minutes after oral administration. In parallel, these proteins together with bovine whey and gluten proteins, were digested using the harmonized INFOGEST protocol adapted for proteins. The DPP-IV half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was determined in situ using Caco-2 cells. The DPP-IV inhibitory activity was also measured after IB passage using a Caco2/HT29-MTX mixed cell model. The peptide profiles were analyzed using reversed-phase high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS) with MS data bioinformatics management, and the IC₅₀ of identified peptides was predicted in silico. The in vitro and in vivo DPP-IV inhibitory activity of the proteins differs according to their origin. Vegetable proteins and hemoglobin yielded the highest DPP-IV inhibitory activity in vivo. However, no correlation was found between the in vivo and in vitro results. This may be partially explained by differences between peptidome analysis and the in silico predictions as well as the study complexity.

Keywords: DPP-IV activity; type 2 diabetes; bioactive peptides; dietary proteins; in vitro gastrointestinal digestion; peptidomics

1. Introduction

Over the past decades, type 2 diabetes (T2D) has become a major public health concern. In 2021, the International Diabetes Federation reported that 537 million people had diabetes worldwide. This figure is predicted to rise to 643 million by 2030, with T2D accounting for 90% of cases. This pathology affects more and more young people ². In addition to the social impact, T2D has a significant economic impact on countries and health systems. Annual global health expenditure on diabetes is about €882 billion, representing an increase of 316% over the past 15 years ¹. Medication, treatment of

complications, and management of disability or premature death represent a considerable cost to individuals and governments.

T2D is caused mainly by excess weight and a lack of physical activity, leading to a dysregulation of glucose homeostasis. This leads to a prolonged excess of plasma glucose concentration induced by impaired insulin secretion, and/or insulin resistance in peripheral tissues (liver, muscle)^{3,4}. In the long term, hyperglycemia causes the onset of severe and even fatal complications, such as cardiovascular diseases (stroke, myocardial infarction, etc.), neurodegeneration, nephropathies, eye diseases, etc.⁵. T2D can be controlled by lifestyle and dietary measures. However, when it can no longer be managed, a restrictive and sometimes invasive drug treatment (injection of insulin) may be required, which has undesirable effects⁶. The search for alternative treatments to metformin, the gold standard drug in the management of T2D, focuses on (i) inhibition of sodium/glucose co-transporter 2 (SGLT2) leading to reduced renal reabsorption of glucose, and (ii) inhibition of dipeptidyl-peptidase IV (DPP-IV) which indirectly improves insulin secretion⁷. DPP-IV is an enzyme that cleaves and inactivates incretin hormones such as glucagon-like peptides 1 (GLP-1) and gastric inhibitory polypeptide (GIP) responsible for insulin secretion³. GLP-1 and GIP are secreted into the bloodstream by intestinal cells after contact with nutrients. Ingestion of monosaccharides, long-chain fatty acids, proteins and certain amino acids stimulates GLP-1 secretion⁸. These two hormones stimulate insulin secretion by pancreatic beta cells⁹. In this context, DPP-IV inhibitors promote insulin secretion in a glucose-dependent manner by extending the half-life of the incretins^{10,11}. DPP-IV inhibitors have the advantage of not causing weight gain or hypoglycemia. They also have a long-lasting anti-hyperglycemia effect and a shallow drug interaction risk compared to other T2D medications^{4,12}. Therefore, the search for novel DPP-IV inhibitory molecules is an interesting strategy for the management of T2D.

Several studies in humans and rodents have shown that dietary proteins can regulate glucose homeostasis by lowering plasma glucose levels^{13,14} and increasing insulin sensitivity³. Furthermore, it has been shown in humans that dietary protein improve glucose homeostasis by stimulating insulin and incretin secretion^{15,16}. Dietary proteins can also improve glucose tolerance in short-term conditions in diabetics^{17,18}. However, the mechanism(s) of action behind the role of dietary proteins in glucose homeostasis is not yet fully understood. Currently, researchers focus on mechanisms involving the direct effect of protein-derived peptides and amino acids on the (i) stimulation of insulin secretion by pancreatic cells¹⁹, (ii) stimulation of incretin secretion (GIP, GLP-1) and cholecystokinin by enteroendocrine cells²⁰⁻²³, (iii) inhibition of intestinal glucose uptake²⁴ and (iiii) inhibition of enzymes involved in the regulation of glucose level (i.e., DPP-IV and α -glucosidase)²⁵. As a consequence, many studies have been focusing on natural DPP-IV inhibitors originating from the hydrolysis of dietary proteins²⁶⁻³⁴.

In this context, this study compared seven different dietary protein substrates originating from animal (cow, chicken and fish) and plant (pea and wheat) sources on their ability to inhibit DPP-IV activity. The aim was to determine the potential of peptides derived from these protein substrates to prevent and manage T2D in the framework of personalized nutrition. First, this study compared the potential ability of the different proteins to inhibit plasmatic DPP-IV in rat. In parallel, the ability of the peptides, generated during *in vitro* digestion of the seven proteins, to cross the intestinal barrier (IB) and to inhibit DPP-IV activity was studied with a cocultured cell-based *in vitro* IB model. Reversed-phase high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (RP-HPLC-MS/MS) was employed to analyze and identify peptides able to cross the *in vitro* IB model system. Furthermore, a quantitative structure-activity

relationship (QSAR) employed was used to predict their DPP-IV half maximal inhibitory concentration (IC₅₀).

2. Results

2.1. Characterization of protein content

The protein profile of the seven different dietary protein substrates was determined by SDS-PAGE (Figure 1) and a proteomic approach (Table 1).

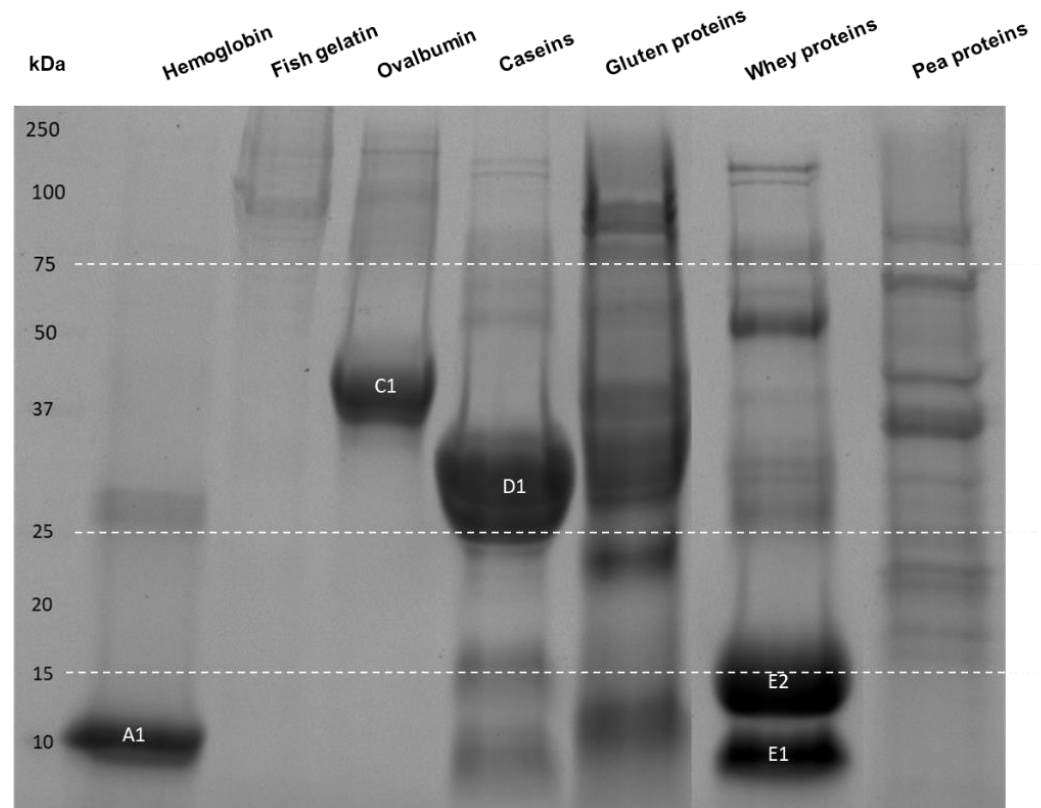


Figure 1. Apparent molecular mass distribution of the seven raw protein samples determined by SDS-PAGE. The amount of solubilized protein powder loaded was 17.4 µg for the hemoglobin and ovalbumin proteins, 69.6 µg for the caseins, whey, fish gelatin and pea proteins and 522 µg for the gluten proteins. A1: α - and β -subunits of hemoglobin, C1: ovalbumin, D1: caseins, E1/E2: α -lactoglobulin/ β -lactoglobulin.

For the proteomic approach, the proteins were reduced, alkylated, hydrolyzed by trypsin and subjected to an RP-HPLC-MS/MS analysis and bioinformatic treatment of the MS-data was used to identify the peptides and deduce the parent proteins (Table 1).

Table 1. Protein composition of raw protein samples determined by proteomics analysis.

Protein sources	Identified proteins	Number of identified peptides by protein	Average protein molecular mass (kDa)	Identification score (-10lgP)
Hemoglobin	Hemoglobin sub unit alpha	47	15.2	412
	Hemoglobin sub unit beta	46	15.9	394
	Carbonic anhydrase 2	3	29.1	123

	Peroxxiredoxin-2	3	21.9	112
	Serum albumin	2	69.2	72
Caseins	α_{s1} -Casein	64	24.5	425
	β -Casein	53	25.1	405
	α_{s2} -Casein	44	26	377
	κ -Casein	41	21.3	361
	β -Lactoglobulin	33	19.8	382
	Serum albumin	32	69.2	310
	α -Lactalbumin	10	16.2	247
	Lactadherin	11	47.4	212
Ovalbumin	Other proteins	54	14.7 to 146.7	90 to 249
	Ovalbumin	203	42.8	353
	β -Lactoglobulin	106	19.9	517
	α -Lactalbumin	38	16.2	387
	Serum albumin	50	69.2	366
Whey proteins	α_{s1} -Casein	24	24.5	313
	β -Casein	19	25.1	279
	α_{s2} -Casein	17	26	225
	κ -Casein	8	21.3	231
	Other proteins	116	127	116 to 300
	Fish gelatin	Fibrillar collagen	11	85.6 to 127
Collagen α		5	135.6	85
Other proteins		6	125.9	79
Pea proteins	Legumin	184	7 to 64.8	185 to 447
	Vicilin	253	49.4 to 52.2	409 to 447
	Convicilin	283	62.0 to 72.1	390 to 430
	Provicilin	109	31.5 to 46.3	336 to 406
	Albumin-1/-2	33	13.9 to 26.2	105 to 347
	Lectin	18	30.2	222
	Other proteins	156	11.4 to 97.2	95 to 314
Gluten proteins	Gliadin	166	32.5 to 33.9	170
	β -amylases	120	58.9 to 62.6	238 to 272
	Glutenin	103	69.5 to 84.0	179 to 222
	Triticin	20	64.9	221
	Other proteins	40	15.5 to 65	167 to 221

Proteins were identified by proteomics analysis after trypsin proteolysis of the protein samples, RP-HPLC-MS/MS analysis and bioinformatics management of MS-data. Proteins were sorted according to their PEAKS[®] Studio identification score (X+ score; -10 lgP).

Hemoglobin and ovalbumin protein samples were the purest in terms of protein content. Indeed, very few peptides other than α and β -subunits of hemoglobin or ovalbumin were identified by MS. The SDS-PAGE confirmed these results showing two main bands (A1 for α and β -subunits of hemoglobin and C1 for ovalbumin). Proteomics analysis of the fish gelatin sample allowed the identification of fibrillar and α type 1 collagen with only 16 identified peptides. In addition, the electrophoretic analysis of this sample was made difficult by the poor quality of the migration, probably due to high molecular weight gelatin. Regarding milk protein samples, caseins and whey proteins each contained the same proteins but in different abundance, either more caseins (D1) or

more whey proteins (E1 and E2), which was in line with their process of extraction (see M&M section). Plant protein samples were a mixture of proteins like glutenin and gliadin for gluten sample, legumin, vicilin, convicilin, provicilin, lectin, and albumins for pea protein sample and other protein constituents such as antinutritional factors or enzymes as revealed by proteomic analysis and by the presence of numerous distinct bands at different molecular masses in the gel electrophoretogram.

2.2. Protein ingestion inhibits plasma DPP-IV activity in rat

The effect of hemoglobin, caseins, ovalbumin, fish gelatin, and pea proteins on DPP-IV activity was first evaluated in vivo in rat plasma. The different protein samples ($1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) were orally administrated, and blood samples were collected 30 min later to measure plasma DPP-IV activity (Figure 2).

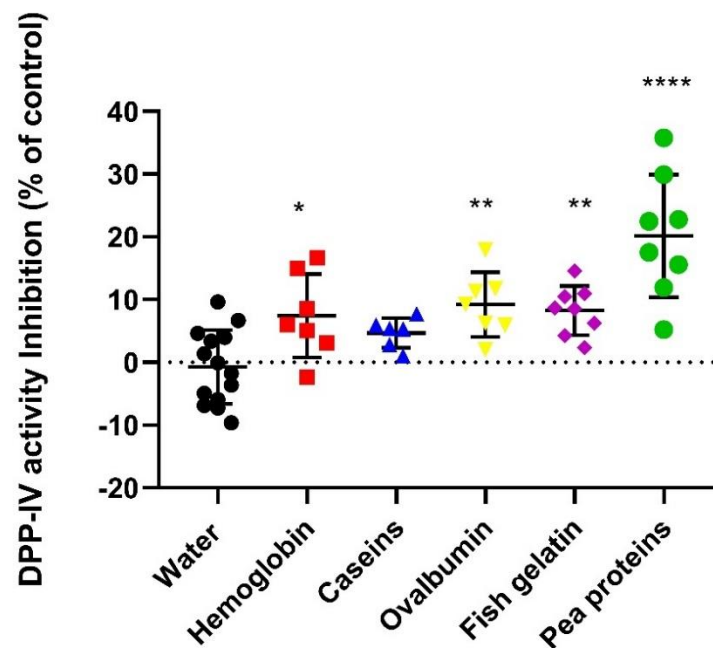


Figure 2. Dietary proteins decrease plasma DPP-IV activity after protein ingestion in rats. Overnight fasted rats received either water (control) or a protein solution (hemoglobin, ovalbumin, caseins, pea proteins or fish gelatin) at a dose of $1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight by oral gavage 30 min before collecting blood samples. DPP-IV activity was evaluated by calculating the percentage of DPP-IV activity inhibition of each protein relative to the control group (water). One-way ANOVA analysis (Dunnett's multiple comparison test) was performed to calculate statistical differences (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$) compared to Water control group ($n=8$).

All proteins except caseins significantly decrease plasma DPP-IV activity. Pea proteins were the most efficient and decreased DPP-IV activity by 20.2% ($p < 0.0001$). Ovalbumin and fish gelatin decreased it by 9.2 and 8.2% (p values were 0.0054 and 0.0094), respectively, and hemoglobin decreased rat plasma DPP-IV activity by 7.4% ($p = 0.0297$).

2.3. Digested proteins decrease DPP-IV activity in vitro at the enterocyte level and after IB passage

Dietary proteins were digested following simulated gastrointestinal digestion (SGID) using the INFOGEST protocol ³⁵ adapted to proteins alone ³⁶. Digested proteins

and blank digestion (blk SGID) samples were assayed for their ability to inhibit DPP-IV activity at the enterocyte level using live Caco-2 cells. Results showed that digested hemoglobin, caseins, whey, pea and gluten proteins strongly inhibit intestinal cell DPP-IV activity with an average IC_{50} value of $2.67 \pm 0.7 \text{ mg.mL}^{-1}$ (**Figure 3A**). Digested ovalbumin and gelatin were approximately four times less efficient in inhibiting DPP-IV activity with an average IC_{50} value of $9.85 \pm 1.25 \text{ mg.mL}^{-1}$. Nevertheless, all tested digested proteins significantly inhibit DPP-IV activity compared to blk SGID which was used as control ($p < 0.0001$).

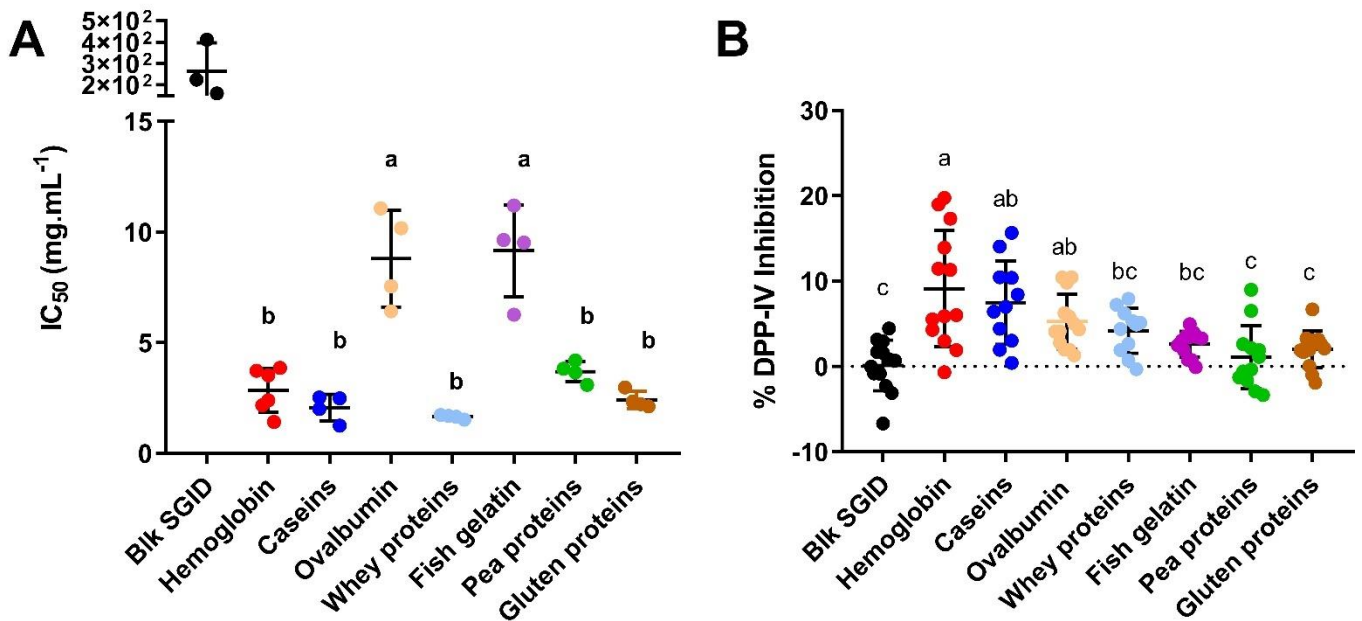


Figure 3. Digested proteins exert different DPP-IV activity inhibitory activity in intestinal cells (Caco-2) before (A) and after (B) simulated IB passage. (A) IC_{50} of digested proteins or blk SGID on DPP-IV activity was determined in live Caco-2 cells. Values are the mean of repeated measurement ($N > 3$). One-way ANOVA analysis with Tukey's post-hoc test ($p < 0.0001$) (B) DPP-IV inhibitory activity induced by the basal media after 1.5 h incubation with the digested proteins (31.25 mg.mL^{-1}). Values are the means of 12 repeated measurements ($n = 4$ in triplicate?). Statistical analysis was performed using one-way ANOVA analysis with Tukey's post-hoc test ($p < 0.05$). Means without a common letter are statistically different.

Then the fraction of digested proteins collected at the basal side of the IB was assessed for its ability to inhibit DPP-IV in vitro. Caco-2/HT29-MTX were incubated for 1.5 h with digested proteins in the apical compartment. Basal media were recovered at the end of the incubation time to test its ability to inhibit DPP-IV activity. The results showed that all basal media seem to decrease DPP-IV activity, but only digested hemoglobin, caseins and ovalbumin significantly inhibited DPP-IV activity compared to blk SGID (**Figure 3B**). The basal media obtained after incubation with digested hemoglobin decrease DPP-IV activity by approximately 9.12% ($p < 0.001$), caseins by 7.47% ($p = 0.0003$) and ovalbumin by 5.25% ($p = 0.020$).

2.4. Effect of digested proteins on intestinal DPP-IV gene expression

To investigate the effect of dietary proteins on DPP-IV gene expression at the intestinal level, *in vitro* digested proteins were incubated for 4, 12 and 24 h with the Caco-2/HT29-MTX cocultured cells. No significant differences were seen between groups incubated for 4 and 12 h and the control. However, significant differences were observed after 24h incubation (**Figure 4**). All digested proteins, except the dairy proteins and ovalbumin, inhibited DPP-IV mRNA expression. Digested gluten proteins decreased DPP-IV mRNA expression by 36% ($p < 0.0001$), while hemoglobin, fish gelatin and pea proteins, as well as blk SGID decreased DPP-IV mRNA expression by about 25% ($p < 0.01$) compared to the buffer Ctrl (**Figure 4**). However, the digested proteins did not induce any significant mRNA expression changes compared to blk SGID ($p > 0.05$).

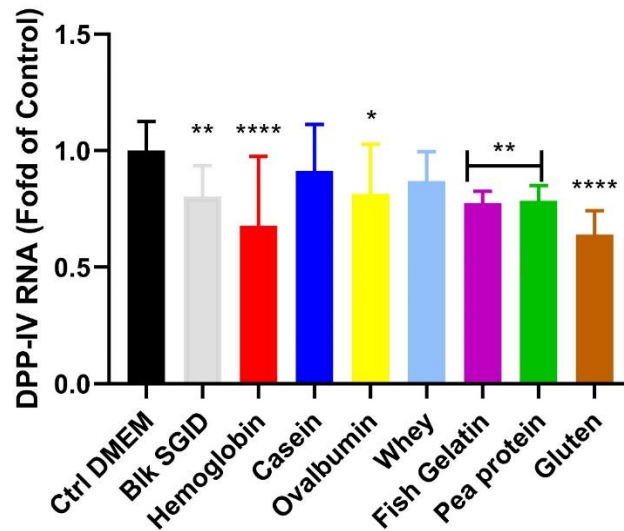


Figure 4. Digested proteins inhibit DPP-IV gene expression after 24 h in Caco-2/HT29-MTX coculture. Digested protein samples (5 mg.mL^{-1}) were incubated with Caco-2/HT29-MTX cocultured cells for 24 h before DPP-IV gene expression measurement by qPCR normalized to HPRT1. Values are the means of 9 repeated measurements ($n=3$ in triplicate). Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis analysis with Dunn's post-hoc test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

2.5. Effect of digested proteins on IB integrity and permeability

During the *in vitro* IB permeation experiments, the transepithelial electrical resistance (TEER) was measured before and after incubation with digested proteins. In parallel, IB permeability was determined at the end of the experiment by measuring the apparent permeability coefficient (P_{app}) using lucifer yellow (LY) (**Table 2**).

Table 2. Digested proteins modulate the permeability and IB integrity differently.

Intestinal samples	P_{app} (cm.s ⁻¹)	Δ TEER (Ω) (TEER Final - TEER Initial)
Buffer control	4.15E-06 \pm 7.88E-07	14.27 \pm 68.9
Blk SGID	5.48E-07 \pm 1,48E-07 ****	10.63 \pm 8.6
Hemoglobin	2.27E-06 \pm 3.59E-07	-241.08 \pm 18.5 **
Caseins	1.75E-06 \pm 3.78E-07	-182.00 \pm 80.9 **
Ovalbumin	1.03E-06 \pm 2.77E-07 **	83.69 \pm 36.5
Whey proteins	2.12E-06 \pm 5.05E-07	-318.31 \pm 90.6 ****
Fish gelatin	8.70E-07 \pm 1,79E-07 **	-14.38 \pm 5.3
Pea proteins	1.75E-06 \pm 3.25E-07	-119.15 \pm 61.1
Gluten proteins	1.78E-06 \pm 3.89E-07	23.15 \pm 74.0

The apparent permeability coefficient (P_{app}) in cm.s⁻¹ was determined with lucifer yellow. Absolute permeability values are the means of repeated measurement ($n \geq 12$; $n=3$ in quadruplicate). Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis analysis with Dunn's post-hoc test (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$) to compare digested samples to buffer control. The transepithelial electrical resistance (TEER) of Caco-2/HT29-MTX coculture for 21 days was measured before and after contact (1.5 h) with digested proteins (31.25 mg.mL⁻¹). Values are the difference between final and initial TEER from an average of repeated measurements ($N=4$). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA analysis with Sidacks multiple comparison post-hoc test (* $p < 0.05$ **; $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$) to compare digested samples to buffer control.

The blk SGID, digested ovalbumin and digested fish gelatin significantly decreased the permeability of the Caco-2/HT29-MTX cell monolayer compared to the buffer control ($p < 0.0001$; $p = 0.0063$; and $p = 0.0025$). On the other hand, the digested hemoglobin, casein, and whey decreased TEER by 34, 26 and 42%. TEER is a marker of membrane integrity. However, the TEER value remains within acceptable limits since the lowest value obtained was for digested whey proteins after 1.5 h of (333 Ω).

2.6. Impact of digested proteins on tight junction (TJ) protein gene expression

We investigated the effect of digested proteins on gene expression related to membrane integrity and molecule passage. The studied genes were Zonula Occludens-1 (ZO-1), Occludin, Claudins 1 - 4 -12 for integrity and Claudins 2 and 15 for permeability (Figure 5).

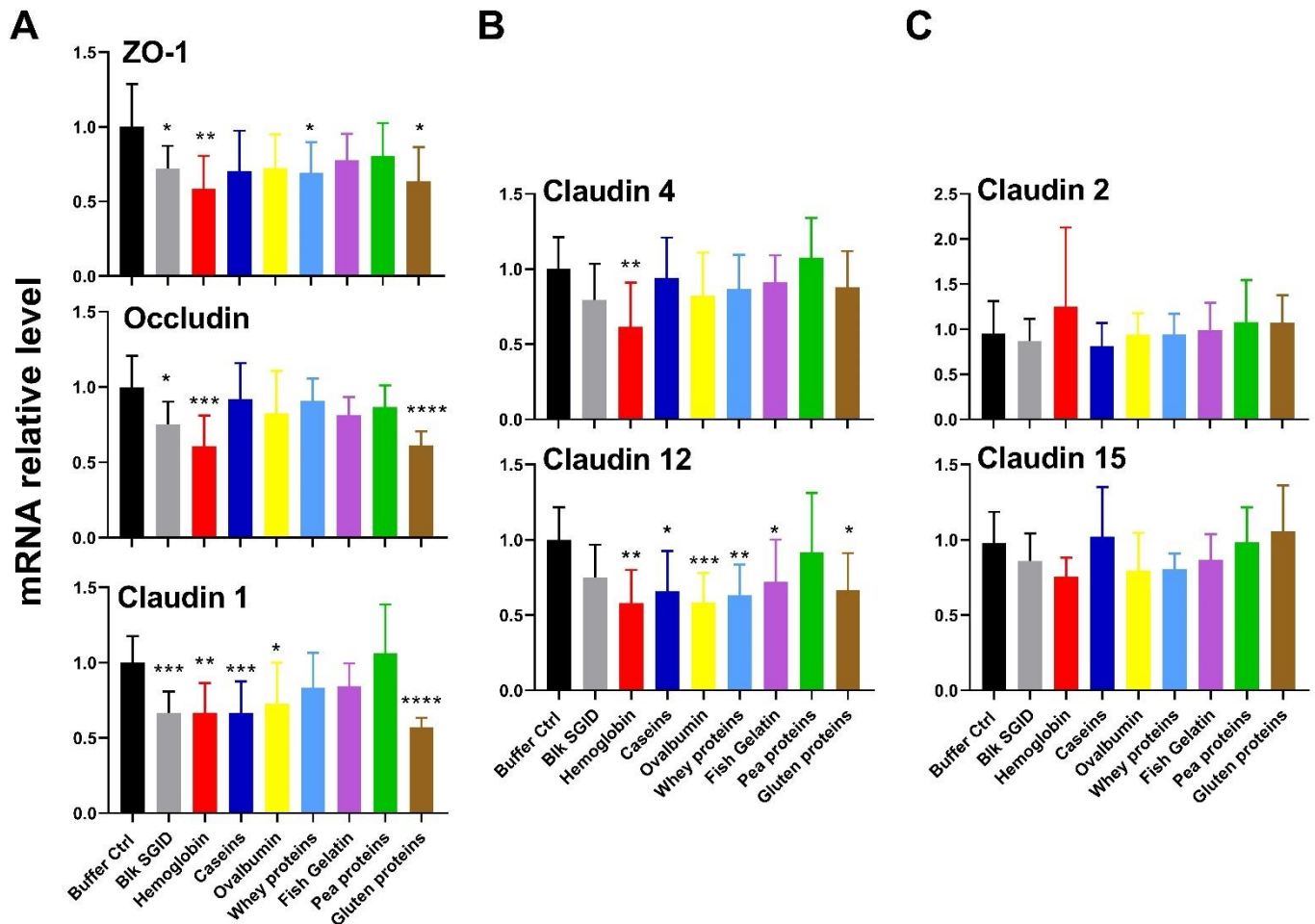


Figure 5. Digested proteins modulate TJ protein gene expression in vitro. (A) ZO-1, Occludin, Claudin 1, (B) Claudin 4, Claudin 12, (C) Claudin 2 and Claudin 15 mRNA relative expression levels normalized to HPRT1 in Caco-2/HT29-MTX cocultured cells incubated for 24 h with digested proteins ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). relative mRNA levels were expressed in the fold of Buffer control level value. For ZO-1, Claudin 1, Claudin 4, Claudin 2 and Claudin 15, the statistical analysis was performed using two-way ANOVA analysis with Dunnett's multiple comparison post-hoc test. For Occludin and Claudin 12 a Kruskal-Wallis analysis was performed, followed by a Dunn's multiple comparison post-hoc test to compare digested protein samples to the Buffer Ctrl group. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Digested samples tended to decrease the gene expression of TJ protein genes, particularly genes encoding ZO-1, Occludin, Claudin 1 and 12. Digested hemoglobin decreased gene expression of all the TJ proteins ($p < 0.01$) except for Claudin 2 and 15. Neither digested proteins influenced the expression of genes encoding Claudins 2 and 15. Digested gluten caused the most significant drop in gene expression of Occludin and Claudin 1 by 39 and 44%, respectively ($p < 0.0001$) and significantly decreased Claudin 12 expression ($p = 0.03$). Digested caseins and ovalbumin significantly reduced ZO-1, Claudin 1 and 12 gene expression ($0.05 < p < 0.001$) and digested whey protein significantly decreased ZO-1 and Claudin 12 gene expression ($p = 0.006$ and $p = 0.005$, respectively). Blk SGID also significantly reduced gene expression for ZO-1, Occludin

and Claudin 1 ($p = 0.011$; $p = 0.028$ and $p = 0.0005$, respectively). Finally, contrary to the other digested proteins, pea proteins had no significant effect on TJ protein gene expression.

2.7. Peptide identification after simulated IB passage and in silico prediction of their DPP-IV inhibitory activity

Following the in vitro IB passage experiment simulated by the Caco-2/HT29-MTX coculture, intact peptides resistant to digestion and those cleaved by the peptidases from the IB were identified in the apical and basolateral compartments by RP-HPLC-MS/MS and bioinformatic treatment of the MS-data. **Figure 6** represents the number of identified peptides for each digested protein sample in the apical, in the basolateral and in both compartments. Four thousand six hundred twenty-four peptide sequences were identified in total (by interrogation of the databases and by the spectral reading of de novo with average local confidence (ALC) score $> 80\%$) in all sources combined. On average, 3.6 times fewer peptides were identified in the basolateral than in the apical compartments. About 11% of the identified peptides in the basal compartment were able to cross the IB while remaining intact. At the same time, 14% of new peptides were generated during the simulated IB passage. No peptides were identified in the basolateral compartment for fish gelatin.

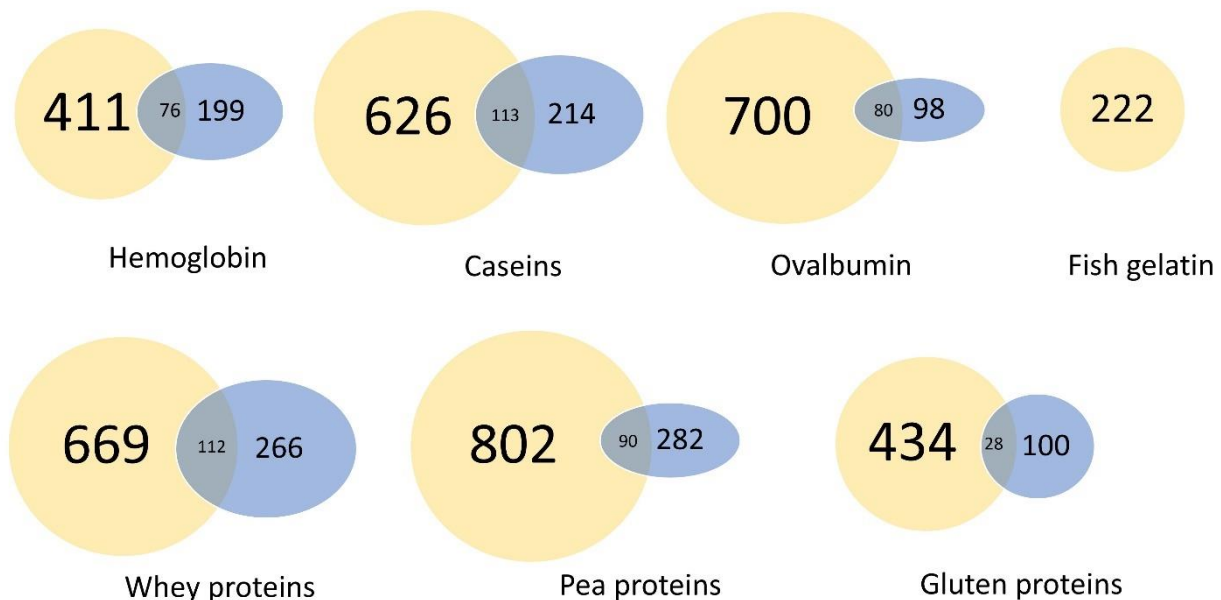


Figure 6. Peptides released during digestion of dietary proteins can cross the IB in vitro. Peptide distribution in Caco-2/HT29-MTX cocultured IB model after 1.5 h incubation with digested dietary proteins ($31.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). The number of different peptides identified (de novo included) at the apical (yellow), basolateral (blue), and both sides (grey) are indicated for each digested protein.

QSAR analysis was performed to predict the DPP-IV inhibitory activity of the identified peptides³⁷. Peptides from the apical and basolateral compartments with a predicted DPP-IV IC_{50} less than $300 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ were selected (**Figure 7**) and classified according to their IC_{50} as assigned by the QSAR analysis (**Figure 8**).

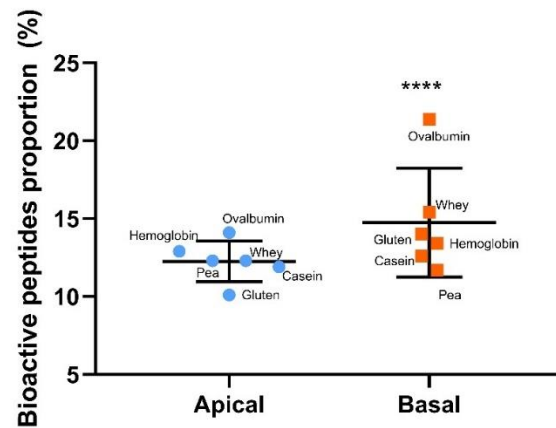


Figure 7. The richness in potential DPP-IV inhibitory peptides increases during the IB transfer. Values are the percentage of bioactive peptides (with predicted DPP-IV $IC_{50} < 300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for each experimental condition in each compartment (apical/basal). Statistical analysis was performed using a one-sample *t* test (**** $p < 0.0001$) between basal and apical means.

Overall, from a qualitative point of view, there was a higher percentage of potential DPP-IV inhibitory peptides (QSAR predicted DPP-IV $IC_{50} < 300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) in the basolateral (14.75%) compared to the apical compartment (12.27%) after 1.5 h of incubation.

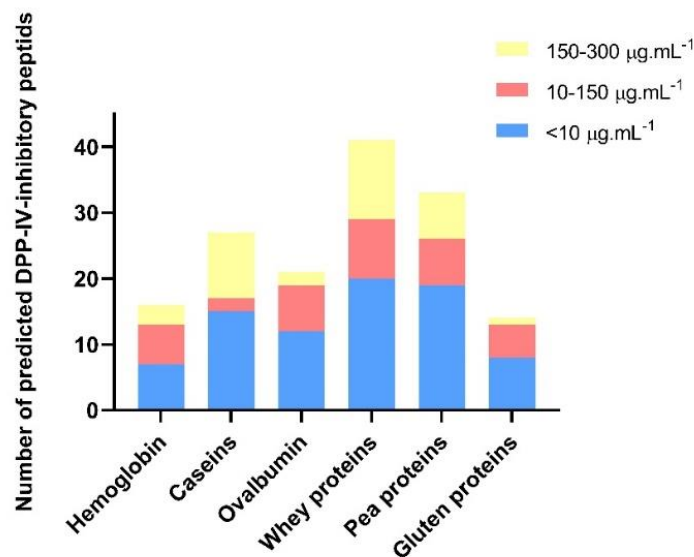


Figure 8. Number of QSAR predicted DPP-IV-inhibitory peptides identified in the basal compartment after the IB transfer. DPP-IV-inhibitory peptides (de novo included) are classified according to their DPP-IV IC_{50} values predicted with the QSAR model ($IC_{50} < 10$; 10-150 and 150-300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) for each digested protein samples.

Figure 8 represents the variety of bioactive peptides originating from all the digested dietary proteins, having a predicted DPP-IV IC_{50} value below 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Only the peptide sequences belonging to the protein fractions identified by MS were

considered among all sequences identified on interrogation of the databases and by the spectral reading of de novo. Peptides from the SGID control were not included and consequently do not appear in the peptide count.

Figure 8 shows that the gastrointestinal digestion and hydrolysis occurring during the IB passage of all the dietary proteins generated peptides with high predicted DPP-IV inhibitory activity. Digestion of pea and whey proteins yielded a greater variety of DPP-IV inhibitory peptides, approximately twice as many as that of hemoglobin, ovalbumin, and gluten proteins.

3. Discussion

Many studies have identified DPP-IV inhibitory peptides in protein hydrolysates originating from milk^{37,38}, plant^{27,39–41} and fish^{27,42}. However, very few studies have directly compared different sources of dietary proteins for their ability to inhibit the DPP-IV activity. Moreover, differences in the protocols used for measuring DPP-IV inhibition make comparisons difficult. Currently, diverse study models are used to identify food-derived peptides that may inhibit DPP-IV activity. Most studies measure DPP-IV inhibitory activity using purified and recombinant DPP-IV *in vitro*. Recently an *in vitro* approach involving live intestinal epithelial Caco-2 cells has been developed by our team⁴³ and has since been used in several studies to assess DPP-IV inhibitory activity^{33,40,43–45}. DPP-IV inhibitory activity has also been measured *ex vivo* in rat and in human plasma^{46–50}.

In this context, the objective of this study was to first compare the DPP-IV inhibitory potential of seven different food protein substrates both *in vivo* and *in vitro* at different levels. In the first instance, we compared the impact of protein source on plasma DPP-IV activity in rats. It should be noted that unfortunately, whey and gluten protein samples were not evaluated *in vivo* for technical reasons (refer to section 4.4.2.). Interestingly, all proteins except caseins decreased plasma DPP-IV. Caseins are classified as slow-digesting proteins because of their ability to form poorly soluble structures which are prone to gelling at the low pH conditions in the stomach thereby slowing down digestion³⁶. Indeed, plasma DPP-IV activity was measured 30 min after oral administration to fasted rats. It is likely that caseins were not yet equally digested as the other proteins studied. Therefore, the intestinal uptake of casein-derived DPP-IV inhibitory peptides was lower, potentially explaining the observed absence of DPP-IV inhibitory activity with the caseins. In contrast, oral administration of pea proteins led to the most potent DPP-IV inhibition. Pea proteins have previously been partially hydrolyzed by pepsin to facilitate oral administration. This may explain the overall higher DPP-IV inhibitory activity observed, since partial hydrolysis can improve digestion rate and absorption⁵¹.

Nevertheless, the different peptides capable of reaching the biological target in sufficient quantity as well as, peptide sequence and length may also explain the differences observed in plasma DPP-IV inhibition with different starting protein substrates. Indeed, the intestinal peptidomes generated during rat digestion varied in line with substantial differences inherent to protein sequence, conformation and digestibility of the native proteins.

These results provide new insights on the short-term effects of oral administration of different proteins on plasma DPP-IV activity in rat. To further study the peripheral effects of the digested protein-derived peptides at the intestinal level, *in vitro* experiments using a two cell-based model was used. DPP-IV activity was measured following simulated peptide IB transfer, and the mechanisms involved were further explored. First, the different proteins were digested *in vitro*, and the DPP-IV inhibition was assayed at the enterocyte level using live Caco-2 cells. The results highlighted a

major impact of the protein source in inhibiting intestinal DPP-IV activity. Indeed, after one hour incubation, digested hemoglobin, caseins, whey, pea, and gluten proteins showed significantly lower DPP-IV IC₅₀ values than those obtained for gelatin and ovalbumin digests. The DPP-IV IC₅₀ obtained in this study ranged from 1.5 to 10 mg.mL⁻¹. In comparison, Caron et al.⁴³ found an IC₅₀ for hemoglobin protein (1.6 mg.mL⁻¹), which is relatively close to the IC₅₀ found in this study (2.8 ± 0.4 mg.mL⁻¹). Similarly, Theysgeur et al.³³ reported an IC₅₀ of 3.7 mg.mL⁻¹ for an hydrolyzed fish by-product, while Santos-Hernández et al.⁵² found an IC₅₀ value of 1.17 mg.mL⁻¹ for whey protein digests, 0.87 mg.mL⁻¹ for casein digests and 1.75 mg.mL⁻¹ for egg white digests using the same cell-based method. Rivero-Pino et al.²⁷ found an IC₅₀ of 2.93 mg.mL⁻¹ for pea protein using an in vitro model. Except for fish gelatin and ovalbumin, the IC₅₀ values found in the literature are reasonably similar to those measured in the present study. For ovalbumin, the results seem not fully comparable because, in this study, we used purified albumin while Santos-Hernández et al. used egg white protein powder which also contains ovotransferrin, ovomucoid, ovomucin, and lysozyme⁵¹.

An IB in vitro model using Caco-2/HT29-MTX coculture was set up to simulate the last stages of protein digestion and absorption. Under these experimental conditions, digested hemoglobin, caseins and ovalbumin significantly reduced DPP-IV activity (between 5 to 10%) after simulated IB passage. This does not follow the same trend as the results obtained in vivo in rats. Several assumptions could be made: a) human SGID and intestinal cell models may be phylogenetically too far apart from the in vivo rat model; b) the difference in digestion duration between the in vivo and in vitro protocols may influence the results (30 min after ingestion for in vivo results versus complete digestion (4 h) and a 1.5 h IB incubation time for in vitro results); c) the level of some peptides and amino acids crossing the IB were below their limit of detection; d) the permeability of the in vitro IB model was lower than in physiological conditions, which significantly reduces the passage of molecules through the IB⁵³ and e) the glycaemia reducing mechanisms linked to DPP-IV activity are much more complex than what could be achieved with the in vitro model.

Nevertheless, the original model set up herein led to the ability to study the different mechanisms occurring during IB passage such as DPP-IV gene expression regulation. Indeed, digested plant proteins (pea and gluten), hemoglobin, and gelatin decreased DPP-IV gene expression. These result is in accordance with those of Domenger et al., who had previously shown a tendency for digested hemoglobin-derived synthetic peptides to decrease DPP-IV mRNA expression after 24 h incubation with Caco-2 cells⁵⁴. However, to our knowledge, this is the first time that regulation of DPP-IV gene expression has been reported with digested proteins.

The effects of digested protein on IB permeability and integrity were assessed by measuring the TEER and the apparent permeability (P_{app}). Moreover, the expression of ZO-1, occludin and claudins 1, 2, 4, 12 and 15 genes, which participate in tissue integrity, cell maintenance, shape, and the passage of electrolytes and small molecules, was assayed⁵⁵. A decrease in the TEER was observed after 1.5 h of contact with digested whey, hemoglobin and caseins, which could be linked to the decrease in ZO-1, occludin, claudin 1 and 4 gene expression. Other mechanisms may be involved for digested whey proteins, as no modulation in TJ gene expression was observed. Moreover, digested gluten decreased the expression of ZO-1, occludin and claudin 1 without affecting the TEER. However, it is essential to specify that even though digested caseins and hemoglobin decrease TEER, this remains within acceptable P_{app} values and below the control condition value (4.15E⁻⁰⁶ ± 7.88E⁻⁰⁷ cm.s⁻¹). The P_{app} is used to evaluate passive drug absorption by directly assessing the permeability through Caco-2/HT29-MTX. Even if there is no reference value for the Caco-2/HT-29 MTX coculture model, the P_{app}

obtained was within the acceptable limit values. The P_{app} is considered correct for the Caco-2 cell monolayer if it is less than $1E^{-06}$, and HT-29 cells are known to be much more permeable compared to Caco-2 cells^{56,57}.

Thus, all the digested proteins preserve TJ integrity. Nevertheless, all the digested proteins did not similarly affect IB permeability. The P_{app} of ovalbumin ($1.03E^{-06} \pm 2.77E^{-07}$ cm.s⁻¹) was lower than that of the control ($4.15E^{-06} \pm 7.88E^{-07}$ cm.s⁻¹). Likewise, the P_{app} of fish gelatin ($8.70E^{-07} \pm 1.79E^{-07}$) was lower than the control, suggesting that ovalbumin and fish gelatin improve the integrity of the TJ complex. However, P_{app} is only an indicator of passive diffusion, and the passage of peptides through the IB can follow different pathways. The uptake of amino acids, di- and tripeptides also involves passive diffusion, endocytosis, transcellular carrier-mediated transport, or some transmembrane co-transporters such as the proton-dependent H⁺/peptide PepT1 and the sodium-dependent oligopeptide transporters SOPT1 and SOPT2⁵⁸.

Regarding the effect of digested proteins on TJ gene expression, the decrease in ZO-1, occludin, and claudin 1 and 4 at transcript levels observed with digested hemoglobin, casein, and gluten proteins appears surprising. A study by Yasumatsu and Tanabe in 2010 showed that peptides derived from α_{s2} -casein up-regulated occludin gene expression, increased the TEER and then enforced the tight junction barrier⁵⁹. Another study by Anderson et al. in 2019, showed that a bovine colostrum protein concentrate (not digested) increased epithelial barrier integrity of Caco-2 cell monolayer⁶⁰. Bavaro et al. in 2021 showed that heat treatment of infant milk affected the integrity of the IB vs. microfiltered infant milk, with TJ proteins and the claudin 1 gene expression being significantly higher with microfiltered infant milk⁶¹.

In addition, peptide identification by proteomics approach with QSAR analysis was employed for bioactivity prediction of sequences identified at the apical and basolateral side of the IB model. The number of peptides found in both the apical and basal compartments differed depending on the starting protein substrate. Among these peptide populations, some peptides identified at the apical side were also found at the basolateral side, while new peptides were only identified at the basolateral side. This suggests that some peptides were resistant to IB peptidases and that some new peptides were generated during IB passage. Three times more peptide sequences were identified in the apical compartment vs. basal compartment, further highlighting the IB barrier integrity and peptide selectivity, as previously described⁶¹. Indeed, it is well known that di- and tri-peptides cross the IB more easily than larger peptide sequences or free amino acids. Peptide permeation is mediated by specific transporters like PepT1⁶². In addition, selected short peptide sequences can exert good DPP-IV-inhibitory activity. Unfortunately, these short peptides could not be identified in the present study as it is still very challenging to identify short peptide sequences (< 5 AA residues) by MS in digested samples^{63,64}.

Regarding fish gelatin source, no peptides could be identified in the IB basal compartment, and very few peptides were identified with the proteomics analysis. The difficulties of analysing fish gelatin are linked to (i) the gelling nature of gelatin making protein extraction difficult, (ii) the high number of specific post-translational modifications (proline hydroxylation) and (iii) the lack of fish protein database annotation.

The QSAR analysis permitted calculating a predicted DPP-IV IC₅₀ value for each identified peptide. Based on the results, a higher proportion of bioactive peptides appeared to be present in the basal compartment. The passage of peptides through the IB seemed to generate new inhibitory peptides even though short peptides were not identified in our study. This information is essential because it further highlights the impact of IB peptidases on DPP-IV inhibitory peptide generation during peptide

transfer. Some peptides are hydrolyzed by intracellular peptidases or by peptidases located at the basal pole of the IB. The variety of peptides generated during digestion is dictated by the starting protein sequences. The different DPP-IV inhibitory effects observed *in vitro* and *in vivo* in this study originate from the overall pool of peptides released during digestion and capable of crossing the IB.

In silico results have been used as predictions and they should therefore be taken with caution. *In silico* tools do not always have a high predictive capacity since they do not always translate in an adequate correspondence between predicted and IC₅₀ value. Indeed, QSAR analyses only use a small fraction of the primary peptide sequence, which relies on peptide motifs that have previously been reported as important for specific bioactive properties. Moreover, the predictive approach used herein remains qualitative due to the impossibility of analyzing the complexity of the digested samples and evaluating each peptide in relation to its sequence and abundance. Nevertheless, this study provides essential information regarding the diversity and nature of the potential DPP-IV inhibitory peptides depending on the parent dietary protein substrate.

4. Materials and Methods

4.1. Protein samples substrates?

Bovine hemoglobin (H2625), chicken egg white ovalbumin (A5503), and wheat gluten (G5004) powders came from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). whey protein isolate (Promilk® 852FB) and native micellar caseins (Prodiet® 85B) powders, extracted by a specific membrane separation and spray-drying process were from Ingredia (Arras, France). Pea protein powder (Nutralys® S85F) came from Roquette, and fish gelatin (high molecular weight dried cold fish gelatin) from Kenney & Ross. Total nitrogen content of powders was evaluated by the Kjeldahl method^{66,67} and converted to protein content with the appropriate conversion factors.

4.2. Chemicals

The following chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): porcine pepsin (P6887), pancreatin from porcine pancreas (P1750), Gly-Pro-7-amido-4-methylcoumarin hydrobromide (H-Gly-Pro-AMC, HBr), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), L-glutamine, penicillin and streptomycin. Foetal bovine serum (FBS) was from GIBCO Invitrogen (Karlsruhe, Germany). Water was purified using the Milli-Q system (Millipore, Burlington, USA).

4.3. One-dimensional sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Each protein substrate was analyzed by SDS-PAGE following the Laemmli method⁶⁸. Briefly, protein substrates were solubilized in H₂O at 1 (for hemoglobin and ovalbumin), 4 (for caseins, whey proteins, fish gelatin and pea proteins) and 30 mg.mL⁻¹ (for gluten) and diluted in Laemmli buffer containing β-mercaptoethanol and SDS before heating at 95 °C for 10 min. Twenty four μL samples and 4 μL of molecular mass marker solution (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) were deposited on an Any-kD™ Mini-Protean® TGX Stain-free™ gel (Bio-Rad). Protein migration was performed for 1 h in a buffer containing Tris-base (25 mM), glycine (0.19 mM), and SDS (3.5 mM) at constant voltage of 120 V. Thereafter, fluorescence generated by reaction between in gel-trihalo compounds and tryptophan residues of proteins was revealed after 5 min activation time with Gel Doc™ XR+ and Image Lab 6.1.0 software (Bio-Rad).

4.4. *In vivo* experiment

4.4.1. Animal conditions

The animal experiments were carried out according to the French ethical guidelines for studies on experimental animals (Animal house agreement no. 5900912, Authorization for Animal Experimentation no. 20992-201906031147321 v3, project approved by the local ethical committee no. CEEA75). All precautions were taken to prevent any potential animal suffering. Sixty four 12-week-old Wistar male rats were purchased from Envigo (Gannat, France) and housed in individual cages during the experiment. Temperature, humidity, and light-dark cycle were controlled, and rats were fed *ad libitum* with a standard rodent diet (Serlab, 3430PMS10). Rats had a week of acclimatization followed by three days force-feeding training with water. Before starting the experiment, rats were weighed and placed randomly in 8 groups (n=8).

4.4.2. Animal experiment

Rats were fasted for 16 hours before the experiment. On the experiment day, rats were force-fed by intragastric tube with a 100 mg.mL⁻¹ protein solution except for gluten and whey protein samples because of too low solubility for force-feeding. The pea protein sample was partially hydrolyzed with pepsin to be administrated. The volume of solution given was adjusted to the weight of each rat at 1 g.kg⁻¹. Rats were sacrificed 30 min after gavage, and blood samples were collected in tubes containing 10 µL 5% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). Tubes were centrifuged and supernatants stored at -80 °C before being assayed for plasma DPP-IV activity.

4.5. *In vitro* protein SGID

Before starting *in vitro* experiments, protein powders were digested according to the INFOGEST harmonized protocol³⁵ adapted for protein alone³⁶. Briefly, 2 g protein was solubilized in 8 mL ultrapure water and mixed with 8 mL simulated salivary fluid at pH 7.0 during 2 min. Then 4 mL salivary sample were collected and 12 mL simulated gastric fluid containing pepsin (6500 U.mL⁻¹) were added to the batch and incubated for two hours at pH 3.0. In the same way, 4 mL gastric sample were collected at the end of the incubation time and heated at 95°C for 10 min to inactivate pepsin. Twenty mL simulated intestinal fluid containing pancreatin (45 U.mL⁻¹) were finally added to the batch and incubated for two hours at pH 7.0. At the end of the incubation time, intestinal samples were heated at 95°C for 10 min and centrifuged at 13,400 g for 10 min at room temperature, then supernatants were collected and frozen at -20 °C for further analysis. A control blank SGID was performed in the same conditions but without protein. Protein digestion was repeated three times.

4.6. Cell lines and culture routine

Caco-2 cells and mucus-secreting HT29-MTX cells, both from human colon carcinoma, were purchased from Sigma-Aldrich (Villefranche-sur-Saône, France). These two cell lines were routinely cultivated in 75 cm² flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), under 5% CO₂, at 37°C, in DMEM (PAN Biotech, Aidencach, Germany) supplemented with penicillin/streptomycin (100 U.mL⁻¹), 2 mM L-glutamine and 10% heat-inactivated FBS.

4.7. Intestinal barrier (IB) passage

4.7.1. IB model

A Caco-2/HT29-MTX coculture model was used to analyze permeation of digested proteins through the IB. Caco-2 cells and HT29-MTX cells were seeded on inserts at a

ratio of 90/10 and at a density of 20,000 cells per transwell (microporous PET membrane, 3 µm pore size, Corning, Glendale, USA). Then, inserts were incubated for 21 days to allow growth and differentiation of coculture, under 5% CO₂, at 37°C, in DMEM (PAN Biotech, Aidencach, Germany) supplemented with penicillin/streptomycin (100 U.mL⁻¹), 2 mM L-glutamine, and 10 % heat-inactivated FBS. The culture medium was changed twice a week until the experimentation day.

A simpler IB model was also carried out with Caco-2 cells only. This model was used to measure the DPP-IV activity of intestinal epithelial cells. Caco-2 cells were seeded in 96-well black plate at a density of 8,000 cells per well in a volume of 150 µL supplemented DMEM. Plates were incubated for 15 days before experimentation.

4.7.2. IB permeation experiment

On the day of the permeation experiment, inserts of Caco2/HT29-MTX cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and 500 µL of 31.25 mg.mL⁻¹ digested proteins were deposited in the apical compartment, whereas 1 mL of non-supplemented DMEM was put in the basal compartment. After 1.5 h incubation, apical and basal media were collected and frozen at -20 °C until further analysis.

4.7.3. IB integrity analysis

The IB integrity was evaluated before and after incubation of digested proteins with the cells by measuring the TEER. The paracellular permeability of the Caco-2/HT29-MTX cell monolayer was determined using Lucifer yellow (LY) directly after the permeation experiment. Transwell inserts were thus emptied and a Hank's balanced salt solution (HBSS) containing 100 µM LY was added in the apical chamber. The same solution without LY was added in the basal chamber. Then transwells were incubated for 90 min and basal samples were collected at 15, 30, 45, 60 and 90 min and fluorescence measured with a spectrofluorometer (Spectramax, Molecular Devices, San José, USA) at 530 nm (excitation) and 585 nm (emission). The apparent permeability coefficient (P_{app}) was then calculated according to the following equation:

$$P_{app} \text{ (cm/s)} = \frac{1}{S * C_0} * \frac{dQ_t}{dt}$$

where S is the surface area of the membrane, C₀ the initial concentration of LY in the apical compartment, Q the amount of LY transported from the apical to basal chamber in a specific time period (t = 15, 30, 45, 60 or 90 min).

4.8. DPP-IV activity assay

4.8.1. Plasma DPP-IV activity assay

The activity of DPP-IV in rat plasma was assessed by adding 10 µL of plasma to 140 µL of 1 mM Gly-Pro-AMC diluted in Tris-HCl (pH 8.0) buffer. Then the fluorescence (360 nm excitation; 438 nm emission) was recorded every 2 min for 1 h at 37 °C using 96-well black microplates and a Xenius-XC spectrofluorometer (Safas Monaco, Monaco). The slope was then calculated and used to determine the percentage of DPP-IV activity inhibition of the different digested proteins compared to the control (water group).

4.8.2. In vitro intestinal DPP-IV activity inhibition assay

To measure DPP-IV activity before IB passage at the enterocyte level, analysis was performed following the method described by Caron et al. 2017 with some adjustments⁴³. Briefly, Caco-2 cells were washed with PBS, and digested proteins diluted in pH 7.4 PBS at four concentrations were deposited on Caco-2 cells with Gly-Pro-AMC

fluorescent substrate at 1mM. Kinetics was monitored with the same parameters as in vivo DPP-IV activity analysis. Then IC_{50} for each digested protein was calculated using the slope. To measure in vitro intestinal DPP-IV activity after in vitro IB permeation, 50 μ L Gly-Pro-AMC substrate (1 mM) and 25 μ L of DPP-IV human recombinant enzyme ($0.018 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) were added to 100 μ L basolateral medium. The slopes were then calculated and used to determine the percentage of DPP-IV inhibitory activity of the different proteins compared to the control (buffer).

4.9. Tight junction proteins and DPP-IV gene expression

For gene expression experiments, Caco-2/HT29-MTX cells were seeded into 24-well plates at a density of 40,000 cells per well, 500 μ L of supplemented DMEM. After 15 days of differentiation, cells were washed with PBS, and 500 μ L of digested proteins ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) diluted in non-supplemented DMEM were added and cells were incubated for 2, 4 or 24 h under 5% CO_2 at 37°C . At the end of the contact, the supernatant was removed, and RNA was extracted using the modified NucleoZOL (Macherey-Nagel, Düren, Germany) protocol. First, RNA concentration and purity were assessed using the Nanodrop lite spectrophotometer (ThermoFisher scientific, Waltham, USA). The reverse transcription was then performed using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), and mRNA levels were determined by qPCR on a CFX Connect Real-Time PCR detection system (Biorad) using the TakyonTM No Rox SYBR[®] MasterMix dTTP Blue (Eurogentec) and specific primers (Table 3).

Table 3. Primers used for qPCR experiments.

	Genes	Forward primer	Reverse primers
<i>Homo sapiens</i> origin	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	GCC CTG GCG TCG TGA TTA GT	GCA AGA CGT TCA GTC CTG TCC
	Dipeptidyl peptidase 4	ACAGAATCACATGGACGGGG	CGTTTGGAGACCACCACAGA
	ZO-1	CGGTCCTCTGAGCCTGTAAG	GGATCTACATGCGACGACAA
	Occludin	CAGGGAATATCCACCTATCACTTCAG	ATCAGCAGCAGCCATGTACTCTTCA C
	Claudin 1	CCCTATGACCCCAGTCAATGC	GGATAGGGCCTTGGTGTGG
	Claudin 2	TGGCCTCTCTTGGCCTCCAACCTGT	TTGACCAGGCCTTGGAGAGCTC
	Claudin 4	CCACTCGGACAACCTCCCAA	ACTTCCGTCCTCCCAATA
	Claudin 12	CTGAGAGGGAGACGCTCCAA	GTACCTGACAGTTCCAAAACAGC
	Claudin 15	GTACCCCGGAACCAAGTACG	CGTTTCTGCCGATTTGCCA

4.10. Proteomics and peptidomics analysis by RP-HPLC-MS/MS and Bioinformatics

4.10.1. Sample preparations

For the characterization of the protein powders, 200 μ g (for caseins, whey proteins, ovalbumin, fish gelatin, pea proteins and gluten) and 100 μ g (for hemoglobin) were subjected to reduction (5 mM dithiothreitol, 5 min at 80°C) and alkylation (3 mM

iodoacetamide, 20 min at 20 °C) in 30 µL of a 25 mM ammonium bicarbonate buffer before overnight trypsin hydrolysis with 0.2 µg of MS Grade Trypsin/Lys-C mix (Promega, Lyon, France). Digested proteins were directly analyzed by RP(C18)-HPLC-MS/MS after centrifugation (10 min at 8,000 xg).

For peptide identification before or after IB passage, 1.5 mL of apical and basal medium after 120 min of transport studies were dried using a centrifugal evaporator (miVac, Gene Vac, Ipswich, Royaume-Uni) for 2 h at 40 °C. Samples were solubilized in 50 µL 0.1% formic acid / 99.9% water (v / v) (solvent A) and centrifuged (10 min at 8,000 xg). Supernatants were directly analyzed by RP(C18AQ)-HPLC-MS/MS.

4.10.2. RP-HPLC-MS/MS analyses

Ten µL of samples were chromatographically separated at 30 °C in RP-HPLC using a C18 or a C18-AQ column (150 x 2.6 mm, 3 µm particles, Interchim, Montluçon, France) on a biocompatible ACQUITY UHPLC system (Waters, Manchester, UK). For the C18 column, the acetonitrile gradient (flow rate 0.5 mL.min⁻¹) was: 1% solvent B (0.1% formic acid / 99.9% acetonitrile (v / v)) during 1.5 min, then 1% to 45% solvent B for 43.5 min, then 45% to 70% solvent B for 5 min followed by washing and equilibrating procedures with respectively 95% and 1% solvent B during 5 min each. For the C18-AQ column, the acetonitrile gradient (flow rate 0.5 mL.min⁻¹) was: 1% solvent B during 5 min, then 1% to 10% solvent B for 25 min, then 10% to 30% solvent B for 20 min followed by washing and equilibrating procedures with respectively 95% and 1% solvent B during 5 min each. The HPLC eluent was then directly electrosprayed at the end of the column at a voltage of 3 kV, using a desolvation gas (N₂) at a flow of 600 L.h⁻¹, a nebulizer gas flow of 2.5 bar and a temperature of 300 °C. The HPLC was coupled with a SYNAPT-G2-Si mass spectrometer (Waters) that was previously calibrated using a sodium formate solution. MS measurements were made in sensitivity- and positive-mode using the proprietary MassLynx software (version 4.1, Waters). MS and MS/MS analyses were performed in a data dependent analysis (DDA) mode, and mass data were collected in the measurement range of 50 to 1700 m/z using lock mass correction with the 556.632 m/z, corresponding to simply charged leucine enkephalin. A maximum of 10 precursor ions with an intensity threshold of 10,000 counts were selected to be fragmented by collision-induced dissociation (CID) at an energy collision of 8 V to 9 V for low molecular mass ions and at a range of 40 V to 90 V for high molecular mass ions. The RP-HPLC-MS/MS analysis was carried out in triplicate for each protein substrate on three independent SGID (for basal compartment) and the transport study (for apical and basal compartment).

4.10.3. Peptide identification

Database searches were performed on PEAKS® Studio X+ (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canada) using the UniProt database (access on line, July 2020) for blank digestion, the UniProt database restricted to the complete proteome of *Bos taurus* organism (access on line, April 2019) for cow and dairy sources, of *Gallus gallus* organism (access on line, February 2021) for egg source, of *Pisum sativum* organism (access on line, September 2020) for pea source, of *Triticum* (access on line, October 2020) for wheat source and restricted to collagen proteins (access on line, March 2020) for fish source. A mass tolerance of 35 ppm, 3 missed cleavage sites for trypsin hydrolysis (for protein source characterization) or no specific enzyme (for transport study), and an MS/MS tolerance of 0.2 Da were allowed. Variable methionine oxidation was also considered. Peptide sequences identified by PEAKS® Studio X+ were filtered with a false discovery rate (FDR) < 1% while peptide sequences identified by *de novo* processing (for transport study) were filtered according to an ALC > 80%.

4.10.4. QSAR of DPP-IV inhibitory peptides

Peptides identified by database confrontation or *de novo* identification were sorted according to their actual occurrence within the sequence of the identified protein fractions. Then, peptides having the following features were selected: Phenylalanine, Isoleucine, Leucine or Tryptophane at the N-Terminal position, Proline or Alanine in the P2 position or Proline at the C-Terminal position. The determination of a predicted DPP-IV IC₅₀ value was carried out with the QSAR model developed by Nongonierma and FitzGerald (2016)⁶⁹ and the structural v-scale from Lin et al.⁷⁰. The peptide sequences incorporated in the QSAR model had a length ranging from 2 to 35 amino acid residues.

4.11. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using GraphPad Prism 8 software. A Shapiro-Wilk test was systematically performed to verify the normal distribution of values. One-way or two-way ANOVA was then used, followed by a Tukey or a Dunnett test for mean comparisons. When the values did not follow a normal distribution, a Kruskal Wallis test was performed, followed by a Dunn test for pairwise comparison. The differences were considered significant for a p-value <0.05. Values were expressed as mean ± SEM.

5. Conclusions

For the first time, the effects of dietary proteins originating from different sources on the DPP-IV inhibitory activity were evaluated *in vivo* and *in vitro* at different intestinal levels (i.e., before and after IB permeation). This study demonstrates that the ingestion of proteins influenced DPP-IV activity in physiologic conditions. Furthermore, the protein origin led to a more or less pronounced effect on the overall inhibitory properties. In parallel this study is the first report highlighting DPP-IV inhibitory activity and barrier integrity protein gene expression of digested proteins in an *in vitro* Caco-2/HT29-MTX cell model. Furthermore, MS-based peptidome identification associated with QSAR analysis showed that peptides crossing or generated during IB transfer could inhibit DPP-IV activity differently. The DPP-IV inhibitory activity depended on the source of the starting protein substrate. Based on these results and a score attribution (Table 4), plant proteins and hemoglobin seem to be the most promising starting proteins. This study provides some insights on the elaboration of specialized diets in the framework of a personalized nutrition to prevent or manage T2D.

Table 4. Global assessment of the DDP-IV inhibitory potential of protein from different origins.

	Hemoglobin	Caseins	Ovalbumin	Whey proteins	Fish gelatin	Pea proteins	Gluten proteins	SGID blk
In vivo DPP-IV inhibition	1	0	3		3	4		0
In vitro IB Apical DPP-IV inhibition	4	4	0	4	0	4	4	-
In vitro IB basal DPP-IV inhibition	4	3	2	1	1	0	0	0
In vitro DPP4 gene expression inhibition	2	0	0	0	2	2	4	2
SCORE	11	7	5	5*	6	10	8*	2

Scores were assigned based on significant differences ($p < 0.0001 = 4$ points ; $p < 0.001 = 3$ points; $p < 0.01 = 2$ points and $p < 0.05 = 1$ points) in different experiments * Proteins not studied in vivo.

Funding: This research was funded in the framework of Alibiotech research program, which is financed by European Union, French State, and the French Region of Hauts-de-France. Funding to Dr. Barabara Deracinois, Dr. Camille Dugardin, Dr. Benoit Cudennec, Dr. Alice B. Nongonierma and Pr. Richard J. FitzGerald is gratefully acknowledged from Campus France PHC/Irish Research Council Ulysses 2018 'Criblage des activités biologiques en relation avec le syndrome métabolique d'hydrolysats de protéines de diverses origines'. The HPLCMS/MS experiments were performed on the REALCAT platform funded by a French governmental subsidy managed by the French National Research Agency (ANR) within the frame of the "Future Investments' program (ANR-11-EQPX-0037)".

Author Contributions: Conceptualization, L.F, B.C ; methodology, L.F, B.C, A.B.N, R.J.F, B.D and C.F.; software, B.D, L.F.; validation, B.D, C.D, B.C, C.F and R.R.; formal analysis, L.F, B.C, B.D and C.D.; investigation, L.F, B.D, B.C and R.R.; data curation L.F, B.D. and BC; writing—original draft preparation, L.F, B.D and B.C.; writing—review and editing, L.F, B.D, C.D, B.C, C.F, A.B.N, R.J.F and R.R.; supervision, B.C, R.R.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by Ethics Committee no. CEEA75 (Animal Experimentation no. 20992-201906031147321 v3)

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest

Data Availability Statement: Data were generated during the study.

References

1. International Diabete Federation. Diabetes Atlas | Tenth Edition, 2021.
2. INSERM. *Diabète de type 2 · Inserm, La science pour la santé*. Inserm. <https://www.inserm.fr/dossier/diabete-type-2/> (accessed 2021-12-09).
3. Singh, A.-K.; Yadav, D.; Sharma, N.; Jin, J.-O. Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV Inhibitors with Antioxidant Potential Isolated from Natural Sources: A Novel Approach for the Management of Diabetes. *Pharmaceuticals (Basel)* **2021**, *14* (6), 586. <https://doi.org/10.3390/ph14060586>.
4. Van Gaal, L.; Scheen, A. Weight Management in Type 2 Diabetes: Current and Emerging Approaches to Treatment. *Diabetes Care* **2015**, *38* (6), 1161–1172. <https://doi.org/10.2337/dc14-1630>.
5. Fox, C. S.; Golden, S. H.; Anderson, C.; Bray, G. A.; Burke, L. E.; de Boer, I. H.; Deedwania, P.; Eckel, R. H.; Ershow, A. G.; Fradkin, J.; Inzucchi, S. E.; Kosiborod, M.; Nelson, R. G.; Patel, M. J.; Pignone, M.; Quinn, L.; Schauer, P. R.; Selvin, E.; Vafiadis, D. K. Update on Prevention of Cardiovascular Disease in Adults With Type 2 Diabetes Mellitus in Light of Recent Evidence: A Scientific Statement From the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Diabetes Care* **2015**, *38* (9), 1777–1803. <https://doi.org/10.2337/dci15-0012>.
6. Chawla, R.; Madhu, S. V.; Makkar, B. M.; Ghosh, S.; Saboo, B.; Kalra, S. RSSDI-ESI Clinical Practice Recommendations for the Management of Type 2 Diabetes Mellitus 2020. *Indian J Endocrinol Metab* **2020**, *24* (1), 1–122. https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM_225_20.
7. Paquot, P. N. Inhibiteur de la DPP-4 ou des SGLT2 après échec de la metformine seule dans le diabète de type 2. *REVUE MÉDICALE SUISSE* **2017**, *5*.
8. Müller, T. D.; Finan, B.; Bloom, S. R.; D'Alessio, D.; Drucker, D. J.; Flatt, P. R.; Fritsche, A.; Gribble, F.; Grill, H. J.; Habener, J. F.; Holst, J. J.; Langhans, W.; Meier, J. J.; Nauck, M. A.; Perez-Tilve, D.; Pocai, A.; Reimann, F.; Sandoval, D. A.; Schwartz, T. W.; Seeley, R. J.; Stemmer, K.; Tang-Christensen, M.; Woods, S. C.; DiMarchi, R. D.; Tschöp, M. H. Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1). *Mol Metab* **2019**, *30*, 72–130. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.010>.
9. Sabbagh, G.; Kurdi, B.; Khayata, W.; Lahdo, R. A Study on the Inhibitory Potential of Dpp-Iv Enzyme by Lobeline through In Silico and In Vivo Approaches. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry* **2021**, 79–91. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2021/v22i130376>.
10. Deacon, C. F. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes: A Comparative Review. *Diabetes Obes Metab* **2011**, *13* (1), 7–18. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01306.x>.
11. Dalle, S.; Burcelin, R.; Gourdy, P. Specific Actions of GLP-1 Receptor Agonists and DPP4 Inhibitors for the Treatment of Pancreatic β -Cell Impairments in Type 2 Diabetes. *Cell. Signal.* **2013**, *25* (2), 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.11.009>.
12. Scheen, A. J. Dipeptidylpeptidase-4 Inhibitors (Gliptins). *Clin Pharmacokinet* **2010**, *49* (9), 573–588. <https://doi.org/10.2165/11532980-000000000-00000>.
13. Uenishi, H.; Kabuki, T.; Seto, Y.; Serizawa, A.; Nakajima, H. Isolation and Identification of Casein-Derived Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP-4)-Inhibitory Peptide LPQNIPPL from Gouda-Type Cheese and Its Effect on Plasma Glucose in Rats. *International Dairy Journal* **2012**, *22* (1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.08.002>.
14. Cui-Feng Zhu. *Treatment with marine collagen peptides modulates glucose and lipid metabolism in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus*. <https://cdnsiencepub.com/doi/abs/10.1139/h10-075> (accessed 2021-10-06).
15. Comerford, K. B.; Pasin, G. Emerging Evidence for the Importance of Dietary Protein Source on Glucoregulatory Markers and Type 2 Diabetes: Different Effects of Dairy, Meat, Fish, Egg, and Plant Protein Foods. *Nutrients* **2016**, *8* (8). <https://doi.org/10.3390/nu8080446>.
16. Chartrand, D.; Da Silva, M. S.; Julien, P.; Rudkowska, I. Influence of Amino Acids in Dairy Products on Glucose Homeostasis: The Clinical Evidence. *Canadian Journal of Diabetes* **2017**, *41* (3), 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2016.10.009>.
17. Promintzer, M.; Krebs, M. Effects of Dietary Protein on Glucose Homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* **2006**, *9* (4), 463–468. <https://doi.org/10.1097/01.mco.0000232909.84483.a9>.
18. Ma, J.; Stevens, J. E.; Cukier, K.; Maddox, A. F.; Wishart, J. M.; Jones, K. L.; Clifton, P. M.; Horowitz, M.; Rayner, C. K. Effects of a Protein Preload on Gastric Emptying, Glycemia, and Gut Hormones after a Carbohydrate Meal in Diet-Controlled Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **2009**, *32* (9), 1600–1602. <https://doi.org/10.2337/dc09-0723>.
19. Conlon, J. M.; Mechkarska, M.; Abdel-Wahab, Y. H.; Flatt, P. R. Peptides from Frog Skin with Potential for Development into Agents for Type 2 Diabetes Therapy. *Peptides* **2018**, *100*, 275–281. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.09.001>.
20. Caron, J.; Cudennec, B.; Domenger, D.; Belguesmia, Y.; Flahaut, C.; Kouach, M.; Lesage, J.; Goossens, J.-F.; Dhulster, P.; Ravallec, R. Simulated GI Digestion of Dietary Protein: Release of New Bioactive Peptides Involved in Gut Hormone Secretion. *Food Research International* **2016**, *89*, 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.033>.
21. Caron, J.; Domenger, D.; Dhulster, P.; Ravallec, R.; Cudennec, B. Protein Digestion-Derived Peptides and the Peripheral Regulation of Food Intake. *Frontiers in Endocrinology* **2017**, *8*, 85. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00085>.

22. Santos-Hernández, M.; Tomé, D.; Gaudichon, C.; Recio, I. Stimulation of CCK and GLP-1 Secretion and Expression in STC-1 Cells by Human Jejunal Contents and *in Vitro* Gastrointestinal Digests from Casein and Whey Proteins. *Food Funct.* **2018**, *9* (9), 4702–4713. <https://doi.org/10.1039/C8FO01059E>.
23. Santos-Hernández, M.; Amigo, L.; Recio, I. Induction of CCK and GLP-1 Release in Enteroendocrine Cells by Egg White Peptides Generated during Gastrointestinal Digestion. *Food Chemistry* **2020**, *329*, 127188. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127188>.
24. Dugardin, C.; Fleury, L. An Exploratory Study of the Role of Dietary Proteins in the Regulation of Intestinal Glucose Absorption. *Front Nutr* **2022**, *8*, 769773. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.769773>.
25. Wongon, M.; Limpeanchob, N. Inhibitory Effect of Artocarpus Lakoocha Roxb and Oxxyresveratrol on α -Glucosidase and Sugar Digestion in Caco-2 Cells. *Heliyon* **2020**, *6* (3), e03458. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03458>.
26. Dugardin, C.; Cudennec, B.; Tourret, M.; Caron, J.; Guérin-Deremaux, L.; Behra-Mielliet, J.; Lefranc-Millot, C.; Ravallec, R. Explorative Screening of Bioactivities Generated by Plant-Based Proteins after *In Vitro* Static Gastrointestinal Digestion. *Nutrients* **2020**, *12* (12), 3746. <https://doi.org/10.3390/nu12123746>.
27. Rivero-Pino, F.; Espejo-Carpio, F. J.; Guadix, E. M. Identification of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides from Vegetable Protein Sources. *Food Chemistry* **2021**, *354*, 129473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129473>.
28. Amini Sarteshnizi, R.; Sahari, M. A.; Ahmadi Gavlighi, H.; Regenstein, J. M.; Nikoo, M.; Udenigwe, C. C. Influence of Fish Protein Hydrolysate-Pistachio Green Hull Extract Interactions on Antioxidant Activity and Inhibition of α -Glucosidase, α -Amylase, and DPP-IV Enzymes. *LWT* **2021**, *142*, 111019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111019>.
29. Obaroakpo, J. U.; Liu, L.; Zhang, S.; Lu, J.; Liu, L.; Pang, X.; Lv, J. *In Vitro* Modulation of Glucagon-like Peptide Release by DPP-IV Inhibitory Polyphenol-Polysaccharide Conjugates of Sprouted Quinoa Yoghurt. *Food Chemistry* **2020**, *324*, 126857. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126857>.
30. Liu, R.; Cheng, J.; Wu, H. Discovery of Food-Derived Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides: A Review. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030463>.
31. Nongonierma, A. B.; Paoletta, S.; Mudgil, P.; Maqsood, S.; FitzGerald, R. J. Identification of Novel Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides in Camel Milk Protein Hydrolysates. *Food chemistry* **2018**, *244*, 340–348.
32. Nongonierma, A. B.; Paoletta, S.; Mudgil, P.; Maqsood, S.; FitzGerald, R. J. Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Properties of Camel Milk Protein Hydrolysates Generated with Trypsin. *Journal of functional foods* **2017**, *34*, 49–58.
33. Theysgeur, S.; Cudennec, B.; Deracinois, B.; Perrin, C.; Guiller, I.; Lepoudère, A.; Flahaut, C.; Ravallec, R. New Bioactive Peptides Identified from a Tilapia Byproduct Hydrolysate Exerting Effects on DPP-IV Activity and Intestinal Hormones Regulation after Canine Gastrointestinal Simulated Digestion. *Molecules* **2020**, *26* (1), 136. <https://doi.org/10.3390/molecules26010136>.
34. Sharkey, S. J.; Harnedy-Rothwell, P. A.; Allsopp, P. J.; Hollywood, L. E.; FitzGerald, R. J.; O'Harte, F. P. M. A Narrative Review of the Anti-Hyperglycemic and Satiating Effects of Fish Protein Hydrolysates and Their Bioactive Peptides. *Molecular Nutrition & Food Research* **2020**, *64* (21), 2000403. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000403>.
35. Brodkorb, A.; Egger, L.; Alming, M.; Alvito, P.; Assunção, R.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu-Lacanal, C.; Boutrou, R.; Carrière, F.; Clemente, A.; Corredig, M.; Dupont, D.; Dufour, C.; Edwards, C.; Golding, M.; Karakaya, S.; Kirkhus, B.; Le Feunteun, S.; Lesmes, U.; Macierzanka, A.; Mackie, A. R.; Martins, C.; Marze, S.; McClements, D. J.; Ménard, O.; Minekus, M.; Portmann, R.; Santos, C. N.; Souchon, I.; Singh, R. P.; Vegarud, G. E.; Wickham, M. S. J.; Weitschies, W.; Recio, I. INFOGEST Static *In Vitro* Simulation of Gastrointestinal Food Digestion. *Nature Protocols* **2019**, *14* (4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
36. Atallah, N.; Deracinois, B.; Boulier, A.; Baniel, A.; Jouan-Rimbaud Bouveresse, D.; Ravallec, R.; Flahaut, C.; Cudennec, B. *In Vitro* Assessment of the Impact of Industrial Processes on the Gastrointestinal Digestion of Milk Protein Matrices Using the INFOGEST Protocol. *Foods* **2020**, *9* (11), 1580. <https://doi.org/10.3390/foods9111580>.
37. Tulipano, G. Role of Bioactive Peptide Sequences in the Potential Impact of Dairy Protein Intake on Metabolic Health. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228881>.
38. Nongonierma, A. B.; Paoletta, S.; Mudgil, P.; Maqsood, S.; FitzGerald, R. J. Identification of Novel Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides in Camel Milk Protein Hydrolysates. *Food chemistry* **2018**, *244*, 340–348.
39. Xu, F.; Yao, Y.; Xu, X.; Wang, M.; Pan, M.; Ji, S.; Wu, J.; Jiang, D.; Ju, X.; Wang, L. Identification and Quantification of DPP-IV-Inhibitory Peptides from Hydrolyzed-Rapeseed-Protein-Derived Napin with Analysis of the Interactions between Key Residues and Protein Domains. *Journal of agricultural and food chemistry* **2019**, *67* (13), 3679–3690.
40. Lammi, C.; Bollati, C.; Ferruzza, S.; Ranaldi, G.; Sambuy, Y.; Arnoldi, A. Soybean-and Lupin-Derived Peptides Inhibit DPP-IV Activity on *In Situ* Human Intestinal Caco-2 Cells and *Ex Vivo* Human Serum. *Nutrients* **2018**, *10* (8), 1082.
41. Bleakley, S.; Hayes, M.; O'Shea, N.; Gallagher, E.; Lafarga, T. Predicted Release and Analysis of Novel ACE-I, Renin, and DPP-IV Inhibitory Peptides from Common Oat (*Avena Sativa*) Protein Hydrolysates Using *In Silico* Analysis. *Foods* **2017**, *6* (12), 108.
42. Jin, R.; Teng, X.; Shang, J.; Wang, D.; Liu, N. Identification of Novel DPP-IV Inhibitory Peptides from Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Skin. *Food Research International* **2020**, *133*, 109161.

43. Caron, J.; Domenger, D.; Dhulster, P.; Ravallec, R.; Cudennec, B. Using Caco-2 Cells as Novel Identification Tool for Food-Derived DPP-IV Inhibitors. *Food Research International* **2017**, *92*, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.002>.
44. Harnedy-Rothwell, P. A.; McLaughlin, C. M.; O’Keeffe, M. B.; Le Gouic, A. V.; Allsopp, P. J.; McSorley, E. M.; Sharkey, S.; Whooley, J.; McGovern, B.; O’Harte, F. P. M.; FitzGerald, R. J. Identification and Characterisation of Peptides from a Boarfish (*Capros Aper*) Protein Hydrolysate Displaying in Vitro Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV) Inhibitory and Insulinotropic Activity. *Food Research International* **2020**, *131*, 108989. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108989>.
45. Xu, F.; Mejia, E. G. de; Chen, H.; Rebecca, K.; Pan, M.; He, R.; Yao, Y.; Wang, L.; Ju, X. Assessment of the DPP-IV Inhibitory Activity of a Novel Octapeptide Derived from Rapeseed Using Caco-2 Cell Monolayers and Molecular Docking Analysis. *J. Food Biochem.* **2020**, *44* (10). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13406>.
46. Mochida, T.; Hira; Hara. *Corn Protein, Zein Hydrolysate, Administered into the Ileum Attenuates Hyperglycemia via Its Dual Action on Glucagon-Like Peptide-1 Secretion and Dipeptidyl Peptidase-IV Activity in Rats | Endocrinology | Oxford Academic.* <https://academic.oup.com/endo/article/151/7/3095/2456756?login=true> (accessed 2021-10-22).
47. Uenishi, H.; Kabuki, T.; Seto, Y.; Serizawa, A.; Nakajima, H. Isolation and Identification of Casein-Derived Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP-4)-Inhibitory Peptide LPQNIPPL from Gouda-Type Cheese and Its Effect on Plasma Glucose in Rats. *International Dairy Journal* **2012**, *22* (1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.08.002>.
48. Huang, S.-L.; Hung, C.-C.; Jao, C.-L.; Tung, Y.-S.; Hsu, K.-C. Porcine Skin Gelatin Hydrolysate as a Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitor Improves Glycemic Control in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Journal of Functional Foods* **2014**, *11*, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.010>.
49. Ishikawa, Y.; Hira, T.; Inoue, D.; Harada, Y.; Hashimoto, H.; Fujii, M.; Kadowaki, M.; Hara, H. Rice Protein Hydrolysates Stimulate GLP-1 Secretion, Reduce GLP-1 Degradation, and Lower the Glycemic Response in Rats. *Food Funct.* **2015**, *6* (8), 2525–2534. <https://doi.org/10.1039/C4FO01054J>.
50. Zhang, J.; Qian, X.-K.; Song, P.-F.; Li, X.-D.; Wang, A.-Q.; Huo, H.; Yao, J.-C.; Zhang, G.-M.; Zou, L.-W. A High-Throughput Screening Assay for Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors Using Human Plasma. *Anal. Methods* **2021**, *13* (24), 2671–2678. <https://doi.org/10.1039/D1AY00415H>.
51. Clemente, A. Enzymatic Protein Hydrolysates in Human Nutrition. *Trends in Food Science & Technology* **2000**, *11* (7), 254–262. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00007-3).
52. Santos-Hernández, M.; Cermeño, M.; Recio, I.; FitzGerald, R. J. In Vitro Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Activity and in Situ Insulinotropic Activity of Milk and Egg White Protein Digests. *Food Funct.* **2021**, 10.1039/D1FO00641J. <https://doi.org/10.1039/D1FO00641J>.
53. Darling, N. J.; Mobbs, C. L.; González-Hau, A. L.; Freer, M.; Przyborski, S. Bioengineering Novel in Vitro Co-Culture Models That Represent the Human Intestinal Mucosa With Improved Caco-2 Structure and Barrier Function. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 992. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00992>.
54. Domenger, D.; Caron, J.; Belguesmia, Y.; Lesage, J.; Dhulster, P.; Ravallec, R.; Cudennec, B. Bioactivities of Hemorphins Released from Bovine Haemoglobin Gastrointestinal Digestion: Dual Effects on Intestinal Hormones and DPP-IV Regulations. *Journal of Functional Foods* **2017**, *36*, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.047>.
55. Lee, B.; Moon, K. M.; Kim, C. Y. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *Journal of Immunology Research* **2018**, *2018*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>.
56. *The Impact of Food Bioactives on Health*; Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>.
57. Béduneau, A.; Tempesta, C.; Fimbel, S.; Pellequer, Y.; Jannin, V.; Demarne, F.; Lamprecht, A. A Tunable Caco-2/HT29-MTX Co-Culture Model Mimicking Variable Permeabilities of the Human Intestine Obtained by an Original Seeding Procedure. *Eur J Pharm Biopharm* **2014**, *87* (2), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.017>.
58. Ozorio, L.; Mellinger-Silva, C.; Cabral, L. M. C.; Jardim, J.; Boudry, G.; Dupont, D. The Influence of Peptidases in Intestinal Brush Border Membranes on the Absorption of Oligopeptides from Whey Protein Hydrolysate: An Ex Vivo Study Using an Ussing Chamber. *Foods* **2020**, *9* (10), 1415. <https://doi.org/10.3390/foods9101415>.
59. Yasumatsu, H.; Tanabe, S. The Casein Peptide Asn-Pro-Trp-Asp-Gln Enforces the Intestinal Tight Junction Partly by Increasing Occludin Expression in Caco-2 Cells. *British Journal of Nutrition* **2010**, *104* (7), 951–956. <https://doi.org/10.1017/S0007114510001698>.
60. Anderson, R. C.; Dalziel, J. E.; Haggarty, N. W.; Dunstan, K. E.; Gopal, P. K.; Roy, N. C. Short Communication: Processed Bovine Colostrum Milk Protein Concentrate Increases Epithelial Barrier Integrity of Caco-2 Cell Layers. *Journal of Dairy Science* **2019**, *102* (12), 10772–10778. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16951>.
61. Bavaro, S. L.; Mamone, G.; Picariello, G.; Callanan, M. J.; Chen, Y.; Brodkorb, A.; Giblin, L. Thermal or Membrane Processing for Infant Milk Formula: Effects on Protein Digestion and Integrity of the Intestinal Barrier. *Food Chemistry* **2021**, *347*, 129019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129019>.
62. Wang, C.-Y.; Liu, S.; Xie, X.-N.; Tan, Z.-R. Regulation Profile of the Intestinal Peptide Transporter 1 (PepT1). *Drug Design, Development and Therapy* **2017**, *Volume 11*, 3511–3517. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S151725>.

63. Huo, Y.; Xv, R.; Ma, H.; Zhou, J.; Xi, X.; Wu, Q.; Duan, J.; Zhou, M.; Chen, T. Identification of <10 KD Peptides in the Water Extraction of Venenum Bufonis from Bufo Gargarizans Using Nano LC–MS/MS and De Novo Sequencing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2018**, *157*, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.05.027>.
64. Picariello, G.; Mamone, G.; Addeo, F.; Ferranti, P. The Frontiers of Mass Spectrometry-Based Techniques in Food Allergenomics. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218* (42), 7386–7398. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.033>.
65. Nongonierma, A. B.; FitzGerald, R. J. Features of Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides from Dietary Proteins. *Journal of food biochemistry* **2019**, *43* (1), e12451.
66. Bradstreet. Kjeldahl Method for Organic Nitrogen | Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry* **1954**, *26* (1).
67. Nielsen, S. S. Protein Nitrogen Determination. In *Food Analysis Laboratory Manual*; Nielsen, S. S., Ed.; Food Science Text Series; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 131–135. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_13.
68. He, F. Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol* **2011**, e80–e80.
69. Nongonierma, A. B.; FitzGerald, R. J. Structure Activity Relationship Modelling of Milk Protein-Derived Peptides with Dipeptidyl Peptidase IV (DPP-IV) Inhibitory Activity. *Peptides* **2016**, *79*, 1–7.
70. Lin, Z.; Long, H.; Bo, Z.; Wang, Y.; Wu, Y. New Descriptors of Amino Acids and Their Application to Peptide QSAR Study. *Peptides* **2008**, *29* (10), 1798–1805. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.004>.

Additional Table

Table additional: Peptide sequences identified by peptidomics approach (RP-HPLC-MS/MS and Bioinformatic retreatment of MS data) and the predicted DPP-IV IC₅₀ value obtained by QSAR analysis

Substrate	Peptide sequence	Predicted DPP-IV IC ₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Hemoglobin	I.VVYPWT	too small
	FAED	too small
	YPWT	too small
	LLGN	too small
	VVYPWT	too small
	VLDS	too small
	LLGNV	too small
	FTPA	23.60
	CFS	25.41
	WH	46.32
	LLVVYP	48.05
	HLDD	125.24
	HVDPEN	147.65
	LVVYP	159.59
	LIVTOTMKGLDIOKVAGTWYSLAMAASDISLLDAOSAPLR	175.04
	FGDL	267.09
Caseins	WC	too small
	WL	too small
	FPK	too small
	LVYFPFGPIP	too small
	LVYFPFGPIHN	too small
	FPEV	too small
	LLS	too small
	FLPYP	too small
	YFPFGPIP	too small
	FPM	too small
	YPE	too small
	LFC	too small
	YAEA	too small
	LPH	too small
	LPO	5.59
	YFYPE	38.70
	VPN	146.00
	FM	153.44
	LVYFPFGPI	167.05
	LVYFPFGPI	167.05
LIVTOTMKGLDIOKVAGTWYSLAMAASDISLLDAOSAPLR	175.04	

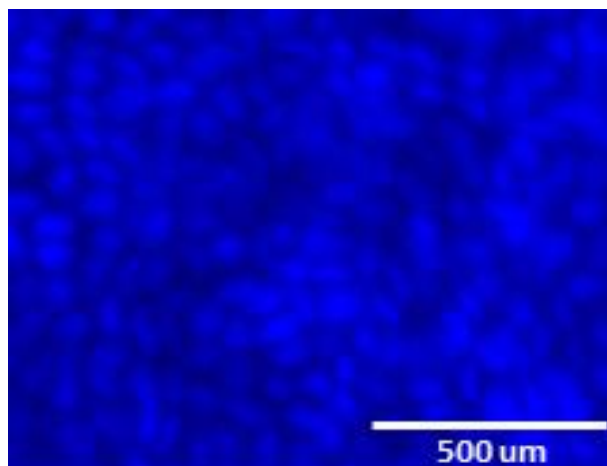
	TLTDVEN	192.62
	LPYP	223.65
	WO	233.69
	YM	246.95
	LPPL	288.37
	LIDIGVAG	288.84
Ovalbumin	ILELPFASGTMS	too small
	ILELPFASGT	too small
	LLPDE	too small
	VLLPDEVSGLEOLES	too small
	I.I.PDEV	too small
	LPE	too small
	VLLPD	too small
	VLOPS	too small
	LPDE	too small
	LVLLPDEV	too small
	VLOPSSVDS	too small
	LPDEV	too small
	VLLPDEVSGLEOLESIIINFEK	44.63
	ILELPFASGTM	45.40
	VLLPDEVSGLEOLESIIINFE	101.70
	ISOAVHA	113.91
	LPR	125.42
	ILELPFASGTMSM	133.16
	VLLPDE	139.70
	LLPDEVSG	200.06
	VLLPDEV	227.83
Whev nrotein	WI.	too small
	FLDDDLTDD	too small
	WT	too small
	FPE	too small
	LIVTOTMKGLDIOKVAGTWYSLAMAASDISLLDAOSAPLRVYVEELKP	too small
	LGYS	too small
	LVYFPFGPIP	too small
	I.I.D	too small
	LLS	too small
	LVNE	too small
	LPE	too small
	YVEELKPTPE	too small
	FLDDDLTDDI	too small
	LVLDTD	too small
	LVTD	too small
	FLDDDL	too small
	LPH	too small
	LPLS	too small
	CLLA	too small

	LPO	5.59
	FLDDDLTDDIM	16.09
	LLK	25.24
	LLH	30.76
	FME	40.58
	WH	46.32
	CLME	62.53
	YVEELKPTPEGDLE	117.33
	LPV	119.59
	LPM	125.76
	I.PMH	156.54
	VLDTD	157.00
	LVYFPFGPI	167.05
	LIVTOTMKGLDIOKVAGTWYSLAMAASDISLLDAOSAPLR	175.04
	YVE	187.83
	LLLV	208.44
	LPYP	223.65
	WO	233.69
	VPPE	240.28
	LPPL	288.37
	DLKA	293.93
Pea proteins	WM	too small
	YLGGNPET	too small
	FVPH	too small
	LLYV	too small
	LFEN	too small
	LLPH	too small
	MI.PH	too small
	LLSGN	too small
	LLENO	too small
	VFKT	too small
	LLTT	too small
	LVEV	too small
	LPH	too small
	FI.M	too small
	VLFA	too small
	FVSK	too small
	LFE	too small
	LAKV	too small
	LPO	5.59
	VLASLPT	41.17
	WD	97.96
	LGPK	108.85
	LPR	125.42
	LFLPO	127.37
	VPN	146.00

	LLFL	149.78
	FM	153.44
	FPF	167.94
	YVE	187.83
	LGGC	215.87
	MLM	238.78
	YM	246.95
	TLDYWPS	251.18
Gluten proteins	WP	too small
	YVFD	too small
	FPO	too small
	LPT	too small
	FGMA	too small
	LLPR	too small
	VLFA	too small
	LPO	5.59
	LLAA	28.51
	YPTSPO	87.23
	WD	97.96
	LPV	119.59
	LPR	125.42
	FPF	167.94

Predicted DPP-IV IC₅₀ values were calculated according to v-scale and QSAR model ⁶⁹
The DPP-IV IC 50 values below 0 are marked as too small and are assumed to be very efficient inhibitors.

Additional Figure



Caco-2/HT29-MTX monolayer after 21 days of culture

Fluorescent microphotography of a Caco2/HT29-MTX differentiated-cell monolayer after 21 days of culture. Cells were seeded at day 0 on inserts at a Caco-2/HT29-MTX ratio of 90/10 and at a density of 20,000 cells per cm². The insert was washed with PBS and cut up to be incubated for fifteen minutes in the dark with NucBlue Live Cell Stain ReadyProbes reagent (Invitrogen, Waltham (MA), USA). The photography was taken with a microscope Evos FL (Life Technologies, Carlsbad (CA), USA). The confluence of the cells was reached after 7 days of culture, and the differentiation began and continued for about 14 days. The TEER mean values obtained during differentiation were about 80, 310, 520 and between 750 and 1000 Ω .cm⁻² after 9, 12, 16 and 21 days of culture, respectively.

A retenir

- ❖ L'ingestion de protéines inhibe l'activité de la DPP-IV plasmatique.
- ❖ L'ingestion de protéine module différemment l'expression du gène codant la DPP-IV, en fonction de leur origine.
- ❖ La digestion des protéines d'origines différentes génère des peptidomes différents.
- ❖ La population peptidique identifiée après passage de la barrière intestinale est enrichie en peptides potentiellement inhibiteurs de la DPP-IV.
- ❖ L'ingestion de certaines protéines impacte la perméabilité intestinale.

Chapitre 3 : Etude exploratoire du rôle des protéines dans la régulation de l'absorption intestinale du glucose

Contexte de l'article :

L'article a été publié dans *Frontiers in Nutrition* en janvier 2022.

Cet article a été réalisé conjointement avec Camille Dugardin et a fait l'objet de plusieurs collaborations. La première collaboration concerne le Professeur Jean Lesage, chercheur au sein de l'unité Infinite qui nous a initié à la technique *ex vivo* mesurant l'absorption intestinale de glucose à travers des anses intestinales de rat. La deuxième collaboration a été réalisée avec Véronique Touche, Olivier Briand et Sophie Lestavel, chercheurs au sein du laboratoire EGID (UMR1011) qui ont réalisé toutes les expériences utilisant les cellules Caco-2/TC7.

Résumé

Introduction : Le diabète de type 2 et l'obésité étant devenus des problèmes de santé majeurs dans le monde, la recherche de solutions préventives ou d'optimisation des traitements devient cruciale. Ainsi, les composés naturels et leurs dérivés, comme les aliments fonctionnels ou les nutraceutiques, apparaissent comme des alternatives plus sûres pour limiter les effets secondaires liés à une utilisation prolongée de molécules de synthèse à des fins thérapeutiques. Les protéines alimentaires étant des régulateurs clés de l'homéostasie du glucose, elles pourraient donc être utilisées dans un contexte préventif de ces pathologies.

Objectif : Cette étude exploratoire vise à mettre en évidence et à comparer les effets aigus de 6 protéines alimentaires, provenant de différentes sources, sur la tolérance au glucose chez le rat et ensuite sur l'absorption intestinale du glucose via des modèles *in vitro* et *ex vivo*.

Méthode : La méthode expérimentale est schématisée par le **Figure 34** ci-dessous.

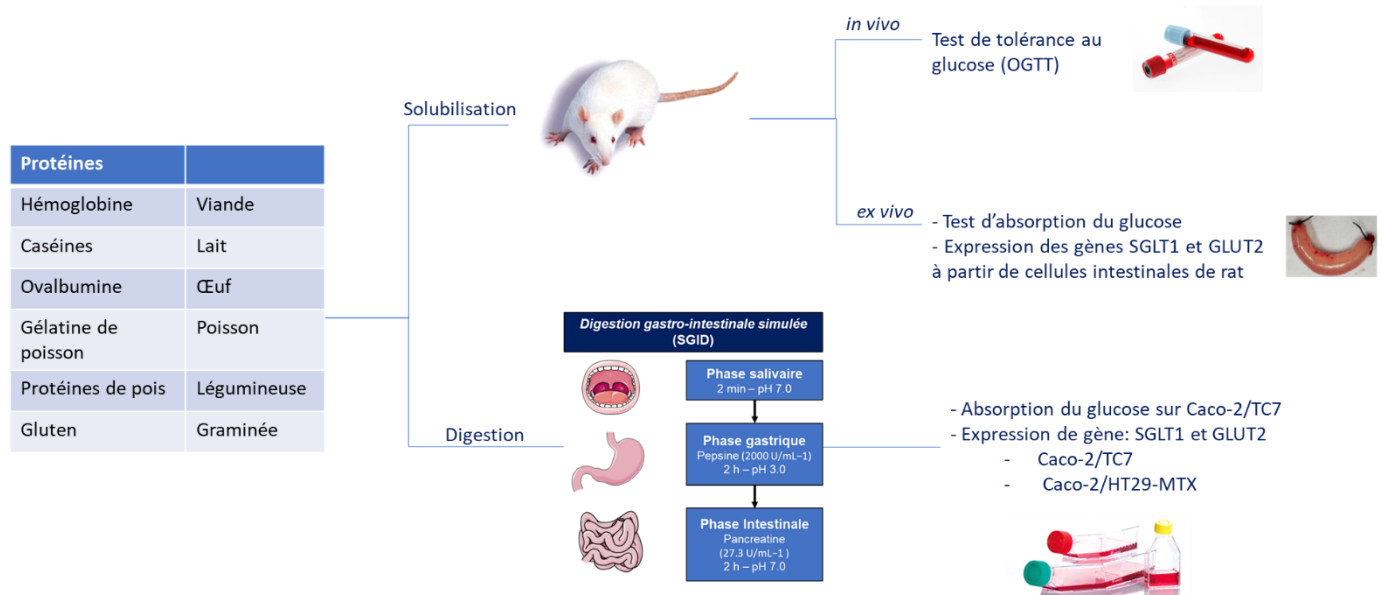


Figure 34: Démarche expérimental adoptée au cours de l'étude 3.

Six protéines alimentaires de diverses sources (hémoglobine, ovalbumine, caséines, protéines de pois, gélatine de poisson et gluten) ont été sélectionnées et testées *in vivo* pour leur capacité à améliorer la tolérance au glucose. Des rats Wistar ont été gavés avec ces protéines et un OGTT a été réalisé. Lors de cette expérience, la glycémie et l'insulinémie ont été mesurées. Parallèlement, les protéines ont été digérées grâce au protocole de digestion gastro-intestinale statique INFOGEST, adapté aux protéines, et ont été testées pour leur capacité à moduler l'absorption intestinale du glucose à l'aide de modèles *in vitro* (cellules Caco-2/TC7, coculture Caco-2/HT29-MTX) et *ex vivo* (sacs jéjunaux). L'effet aigu des protéines digérées a également été exploré *in vitro* sur l'expression des gènes codants pour les protéines SGLT1 et GLUT2 qui sont impliquées dans le transport du glucose.

Résultats : L'ingestion aiguë de caséines et de gélatine de poisson a permis d'améliorer la tolérance au glucose chez les rats Wistar sans effet significatif sur la sécrétion d'insuline pour la gélatine. De plus, les protéines digérées ont induit une diminution significative de l'absorption intestinale de glucose *in vitro* et *ex vivo* et certaines des protéines digérées ont diminué l'expression de l'ARNm de GLUT2 dans les entérocytes après une incubation à court terme.

Conclusion : Cette étude exploratoire suggère pour la première fois qu'un apport protéique aigu pourrait améliorer la tolérance au glucose en diminuant son absorption intestinale. Certaines sources protéiques se montrent plus efficaces que d'autres dans la régulation de l'homéostasie glucidique.



An Exploratory Study of the Role of Dietary Proteins in the Regulation of Intestinal Glucose Absorption

Camille Dugardin^{1*}, Léa Fleury^{1†}, Véronique Touche², Farah Ahdach¹, Jean Lesage³, Mathie Tenenbaum¹, Nadia Everaert^{1,4}, Olivier Briand², Sophie Lestavel², Rozenn Ravallec¹ and Benoit Cudennec^{1*}

¹ Univ. Lille, Univ. Artois, Université de Liège, UMRT 1158 BioEcoAgro – Bénéfice santé d'hydrolysats de protéines et coproduits agro-alimentaires, Lille, France, ² Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGID, Lille, France, ³ Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE, Lille, France, ⁴ Animal and Human Health Engineering, Department of Biosystems, Katholieke Universiteit Leuven, Heverlee, Belgium

OPEN ACCESS

Several studies have demonstrated that high protein diets improve glucose homeostasis. Nevertheless, the mechanisms underlying this effect remain elusive. This exploratory study aims to screen and compare the acute effects of dietary proteins from different sources on intestinal glucose absorption. Six dietary proteins from various sources were thus selected and digested thanks to the INFOGEST static gastro-intestinal digestion protocol. The digested proteins were able to decrease intestinal glucose absorption *in vitro* and *ex vivo*. Moreover, acute ingestion of casein and fish gelatin led to improved glucose tolerance in Wistar rats without significant effect on insulin secretion. In parallel, GLUT2 mRNA expression in enterocytes was decreased following short-term incubation with some of the digested proteins. These results strengthen the evidence that digested protein-derived peptides and amino acids are key regulators of glucose homeostasis and highlight their role in intestinal glucose absorption.

Keywords: digested proteins, intestinal glucose absorption, SGLT1, GLUT2, glucose tolerance

Edited by:
Marilia Seelaender,
University of São Paulo, Brazil

Reviewed by:
Raquel Galvao Figueredo Costa,
National Cancer Institute,
United States
Bohdan Luhovy,
Mount Saint Vincent
University, Canada
Chris Rayner,
University of Adelaide, Australia

*Correspondence:
Camille Dugardin
camille.dugardin@univ-lille.fr
Benoit Cudennec
benoit.cudennec@univ-lille.fr

[†]These authors share first authorship

Specialty section:
This article was submitted to
Clinical Nutrition,
a section of the journal
Frontiers in Nutrition

Received: 29 September 2021
Accepted: 06 December 2021
Published: 19 January 2022

Citation:
Dugardin C, Fleury L, Touche V,
Ahdach F, Lesage J, Tenenbaum M,
Everaert N, Briand O, Lestavel S,
Ravallec R and Cudennec B (2022) An
Exploratory Study of the Role of
Dietary Proteins in the Regulation of
Intestinal Glucose Absorption.

INTRODUCTION

According to UN figures, the world population is expected to reach 9.5 billion in 2050, corresponding to an increase of almost 30% in 50 years (United Nations, 2019 Revision of World Population Prospects). This growth implies an increased demand for food, particularly for proteins, due to socio-economic changes such as rising incomes, increased urbanization, and recognizing the role of proteins in a healthy diet (1). Simultaneously, obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) are becoming the primary and widespread globally chronic health problems, leading to a dysregulation of the control of energy balance and glucose homeostasis. Metformin is generally the first medication prescribed to people with T2DM since it helps to lower blood glucose levels by reducing hepatic glucose production and release. However, it has recently been suggested that the intestine is also involved in the blood glucose-lowering effect of metformin *via* the acute inhibition of intestinal glucose transport (2). T2DM can also be treated by other antidiabetic drugs such as dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV) inhibitors, which extend the half-life of the native incretins, such as the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP).

To limit the side effects of prolonged use of synthetic molecules for therapeutic purposes, natural compounds and their derivatives, such as functional foods or nutraceuticals, appear as safer alternatives. Dietary proteins from animal or plant origins exert, notably through the action of

peptides generated during their gastro-intestinal digestion, a wide range of nutritional and biological functions with beneficial effects on various pathological symptoms (3).

Dietary proteins are key regulators of glucose homeostasis and could therefore be developed in the context of obesity and T2DM. Indeed, several studies conducted in rodents and humans have shown that high protein diets improve glucose homeostasis (4, 5). Furthermore, proteins are involved in the regulation of energy metabolism by increasing energy expenditure, promoting satiety, and helping to maintain lean mass (6). High protein diets are beneficial to improve body composition by promoting fat loss while maintaining lean mass, which is remarkably interesting in the management of T2DM. Dietary proteins also play a critical role in the control of energy balance, *via* the induction of satiety effect and weight loss in both animals and humans (7) and the stimulation of appetite-regulating gut hormone secretion such as cholecystokinin (CCK), peptide YY, and the incretin GLP-1 (8). Likewise, it has recently been evidenced that peptides generated by bean protein hydrolysis induce a decreased glucose uptake in Caco-2 cells (9), suggesting that the detection of digested-derived proteins at the intestinal level could also modulate glucose transport from the intestinal lumen to blood circulation. This transport mainly involves the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) at the apical side of enterocytes and glucose transporter type 2 (GLUT2) at the basolateral side of enterocytes (10).

This exploratory study aimed to screen and compare the acute effects of 6 dietary proteins from different sources, specifically on intestinal glucose absorption using *in vitro* and *ex vivo* models. Their effect on glucose tolerance was thereafter studied *in vivo* in rats. In parallel, the acute effect of digested proteins on SGLT1 and GLUT2 mRNA expression was investigated *in vitro* and *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

Protein Samples

The following protein samples from diverse origins were purchased:

- Hemoglobin from bovine blood (ref H2625, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France);
- Ovalbumin from chicken egg white (ref A5503, Sigma-Aldrich);
- Casein from milk (ref PRODIET 85B, Ingredia, Arras, France);
- Pea proteins (ref NUTRALYS S85F, Roquette, Lestrem, France);
- High molecular weight dried fish gelatin (Keney & Ross, Port Saxon, Canada);
- The gluten from wheat (ref G5004, Sigma-Aldrich), which was tested only once digested for *in vitro* and *ex vivo* experiments because of its too weak solubility for *in vivo* manipulations.

Total nitrogen content was determined by the Kjeldahl method (11) and multiplied by the appropriate conversion factor to determine crude protein content (Table 1).

Simulated Gastro-intestinal Digestion

For *in vitro* and *ex vivo* experiments, protein samples were first digested *in vitro* according to the INFOGEST harmonized

TABLE 1 | Protein content (%) of the different protein samples determined by the kjeldahl method.

Protein sample	% Protein content
Hemoglobin	88.8
Ovalbumin	76.4
Casein	83.0
Pea proteins	65.6
Fish gelatin	87.6
Gluten	71.7

protocol (12) adapted for protein alone (13). Briefly, 2 g of protein sample (adjusted to % protein content) was solubilized in 8 mL of water and added to the reactor containing 8 mL simulated salivary fluid (SSF – Table 2) at pH 7.0, for 5 min. Then, 12 mL of simulated gastric fluid (SGF – Table 2) containing pepsin (ref P6887, 6,500 U/mL, Sigma-Aldrich) were added after saliva sampling (4 mL) and the pH solution was adjusted to 3.0 for 2 h. Finally, 20 mL of simulated intestinal fluid (SIF – Table 2) containing pancreatin (ref P1750, 45 U/mL, Sigma-Aldrich) were added to the batch after gastric sampling (4 mL), and the pH solution was adjusted to 7.0 for 2 h. Intestinal digest concentration reaches 31.25 mg/mL. After heating at 95°C for 10 min to assure enzyme denaturation without peptide damage, all samples were centrifuged at 13,400 g for 10 min at room temperature. Supernatants were collected and frozen at –20°C for further analysis. A blank SGID (without any protein sample but only with digestive enzymes) was also prepared in order to identify any activity due to enzyme autolysis in all further analyses.

Cell Culture

Caco-2/TC7 Cells

Caco-2/TC7 cells (from Pr. Chambaz, Centre de recherche des Cordeliers, Paris, France) were routinely grown in 25 cm² culture flasks (ref Biolite, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), under a humidified atmosphere containing 10% CO₂, at 37°C, in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) containing 25 mM glucose and L-glutamine (Gibco, Dun Laoghaire, Ireland) supplemented with penicillin/streptomycin (100 U/mL and 100 µg/mL, respectively), 1% non-essential amino acids, and 20% heat-inactivated fetal calf serum.

Caco-2 Cells

Caco-2 cells (Sigma-Aldrich) were routinely grown in 75 cm² culture flasks (Sarstedt), under a humidified atmosphere containing 5% CO₂, at 37°C, in DMEM (PAN Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with penicillin/streptomycin (100 U/mL), 2 mM L-glutamine, and 10% heat-inactivated fetal bovine serum.

HT29-MTX

Mucus-secreting HT29-MTX cells (Sigma-Aldrich) were routinely grown in 75 cm² culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), under a humidified atmosphere containing 5% CO₂, at 37°C, in DMEM (PAN Biotech) supplemented with

TABLE 2 | Chemical composition, protease concentration, and pH used for the different compartments of the *in vitro* simulated gastro-intestinal digestion.

	SSF	SGF	SIF
Chemical composition	KCl (15.1 mM) KH ₂ PO ₄ (3.7 mM) NaHCO ₃ (13.6 mM) – MgCl ₂ (0.15 mM) NH ₄ HCO ₃ (0.06 mM) CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ (1.5 mM)	KCl (6.9 mM) KH ₂ PO ₄ (0.9 mM) NaHCO ₃ (25 mM) NaCl (47.2 mM) MgCl ₂ (0.12 mM) NH ₄ HCO ₃ (0.5 mM) CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ (0.15 mM)	KCl (6.8 mM) KH ₂ PO ₄ (0.8 mM) NaHCO ₃ (85 mM) NaCl (38.4 mM) MgCl ₂ (0.33 mM) – CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ (0.6 mM)
Proteases		Pepsin 1:35 (w:w)	Pancreatin 1:2.75 (w:w)
pH	7.0	3.0	7.0

penicillin/streptomycin (100 U/mL), 2 mM L-glutamine, and 10% heat-inactivated fetal bovine serum.

In vitro Glucose Uptake

Caco-2/TC7 cells were seeded at a density of 250,000 cells per 4.2 cm² transwells (microporous PET membrane, 3 μm pore size, Falcon, Corning, New York, USA) and grown in supplemented DMEM to reach confluence after 1 week. Cells were further cultivated for 2 weeks with serum-free DMEM in the upper compartment and supplemented medium in the lower compartment. For uptake experiments, after 1-h of apical pre-incubation with 5 mg/mL digested proteins diluted in non-supplemented DMEM, cells were apically exposed for 40 min to the same digested protein-containing medium supplemented with 2 mM α-methyl-D-glucopyranoside (AMG) and 0.2 μCi/mL ¹⁴C-α-methyl-D-glucopyranoside (PerkinElmer, Waltham, USA). Uptake was stopped by washing the cells with cold PBS containing 0.5 mM phlorizin. Cells were solubilized in Solvable (PerkinElmer, Waltham, USA). Radioactivity in the cellular compartment was measured using a scintillation counter (TopCount NTX, PerkinElmer). Protein concentrations of lysates were measured using Pierce BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific).

Ex vivo Glucose Absorption

The experiments were performed using jejunal sacs from 16 h-fasted adult Wistar rats. The proximal jejunum was dissected and rinsed in a cold saline solution. Jejunal sacs (1 cm length) were prepared for ³H-D-[1-¹⁴C] glucose (49.5 mCi/mmol) transport as previously described (14). Jejunal sacs were filled with 0.3 mL of Krebs–Ringer Modified Buffer (KRB) containing digested proteins at 31.25 mg/mL and 0.02 Ci/mL of the isotopic tracer ³H-D-[1-¹⁴C] glucose supplemented by glucose to obtain a final concentration of 30 mM. Transmural glucose passage was quantified by measuring ³H-D-[1-¹⁴C] glucose release in the incubation medium for 20 min. Transport of the isotopic tracer was normalized to the weight (mg) of the jejunum segment. The area under the curve (AUC) was then calculated.

Animal Care

Experiments were performed on 12-week-old Wistar male rats purchased from Envigo (Gannat, France) according to the European Union guidelines for the use of laboratory animals and in compliance with the French ethical guidelines for studies on experimental animals (Animal house agreement no.

5900912, Authorization for Animal Experimentation no. 20992-201906031147321 v3, project approval by our local ethical committee no. CEEA75). Rats were housed in individual cages, in a temperature and humidity controlled room (22 ± 2°C), under a 12 h light–dark cycle, and fed *ad libitum* with a standard rodent diet (ref 3430PMS10, Serlab, Montataire, France). After 1 week of acclimatization, they were trained for intragastric administration with water for 3 days. At the end of the 1st week, rats were all weighed and distributed in 8 groups of homogeneous weight (*n* = 8).

Oral Glucose Tolerance Test

After overnight fasting, rats were gavaged with 1 g.kg⁻¹ bodyweight of protein samples (1.5 mL of proteins at 233 mg/mL) or water (control group) using a rigid curved gavage needle, 30 min before glucose load (2.5 g/kg bodyweight). Blood samples were collected *via* the tail vein before (T0) and 15, 30, 60, 90, and 120 min after the oral glucose load. Blood was collected in tubes containing EDTA and plasma was prepared by centrifugation. Plasma glucose and insulin were, respectively, determined using a glucometer (Accu-Chek, Roche, Bâle, Switzerland) and ELISA (ref EZRMI-13K, Merck Millipore, Burlington, USA) and incremental area under the curve (iAUC) calculated for both.

Total RNA Extraction, cDNA Synthesis, and RT-qPCR Analysis

Caco-2/TC7 Cells

Caco-2/TC7 cells were seeded in 12-well plates at a density of 60,000 cells per cm² in a volume of 1,000 μl supplemented DMEM and grown at 37°C, 10% CO₂ for 10 days. On the day of the experiment, cells were washed with PBS and 1,000 μl of each digested protein was added at 5 mg/ml (diluted in non-supplemented DMEM). At the end of incubation time (4 h), the supernatant was removed and RNA was extracted using TRIzol reagent (Life technologies, Carlsbad, USA). RNA concentration and purity were assessed using the Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Reverse transcription was performed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Waltham, USA) and mRNA levels of interest were determined by qPCR on an MX3005 device (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) using the Takyon Low Rox Probe MasterMix dTTP blue (Eurogentec, Seraing, Belgium) and specific primers (Table 3).

TABLE 3 | Primers used for qPCR experiments.

Gene	Model	Forward primer	Reverse primer
SGLT1	Caco-2/TC7 cells	TGGCAATCACTGCCCTTTAC	CAGGATTAAGACCCACCA
	Caco-2/HT29-MTX	CCGGATGTGCATCTCTACCG	TGGTCTCCTTAGGGCCTTCTT
	Rat jejunum	TTCGAATGGAACGCCTTGGT	GATCTGGATCCGCTTGCCCTC
GLUT2	Caco-2/TC7 cells	GGAGTTGGCGCTGTAAACAT	CAAACATCCCCTCATTCCA
	Caco-2/HT29-MTX	CGGTGAAATTGCTCCAACCG	GCAGGATGTGCCACAGATCA
	Rat jejunum	GCAACATGTCAGAAGACAAGATCAC	GAGGTGCATTGATCACACCGA
TBP	Caco-2/TC7 cells	GGAGAGTTCTGGGATTGTACCGC	ATATTCGGCGTTTCGGGCAC
HPRT1	Caco-2/HT29-MTX	GCCCTGGCGTCGTGATTAGT	GCAAGACGTTTCAGTCTGTCC
	Rat jejunum	TGCTTTCCTTGGTCAAGCAGT	AATCCAACAAGTCTGGCCTGT

Caco-2/HT29-MTX Co-culture

Caco-2/HT29-MTX cells were seeded at a ratio of 90/10 in 24-well plates at a density of 20,000 cells per cm² in a volume of 500 μ l supplemented DMEM and grown at 37°C, 5% CO₂ for 15 days. On the day of the experiment, cells were washed with PBS and 500 μ l of each digested protein was added at 5 mg/mL (diluted in non-supplemented DMEM). At the end of incubation time (2 or 4 h), the supernatant was removed and RNA was extracted using the modified NucleoZOL (Macherey-Nagel, Düren, Germany) protocol. RNA concentration and purity were assessed using the Nanodrop lite. Reverse transcription was performed using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) and mRNA levels were determined by qPCR on a CFX Connect Real-Time PCR detection system (BioRad, Hercules, USA) using the Takyon No Rox SYBR MasterMix dTTP Blue (Eurogentec) and specific primers (Table 3).

Rat Jejunum

After 14 h-fasting, rats were gavaged with 1 g/kg bodyweight of protein samples or water (control group) and sacrificed 30 min later ($n = 7/8$). Scraped mucosa from the jejunum was collected. Rat intestinal jejunum RNA was extracted using the modified NucleoZOL (Macherey–Nagel) protocol. RNA concentration and purity were assessed using the Nanodrop lite. Reverse transcription was performed using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific) and mRNA levels were determined by qPCR on a CFX Connect Real-Time PCR detection system (Biorad) using the Takyon No Rox SYBR MasterMix dTTP Blue (Eurogentec) and specific primers (Table 2).

Statistical Analysis

All data were expressed as mean values with their standard deviations. GraphPad Prism was used to calculate AUC and to carry out statistical analysis. All significances vs. the control group were measured using either one-way ANOVA followed by Dunnett's test or two-way ANOVA followed by Dunnett's test.

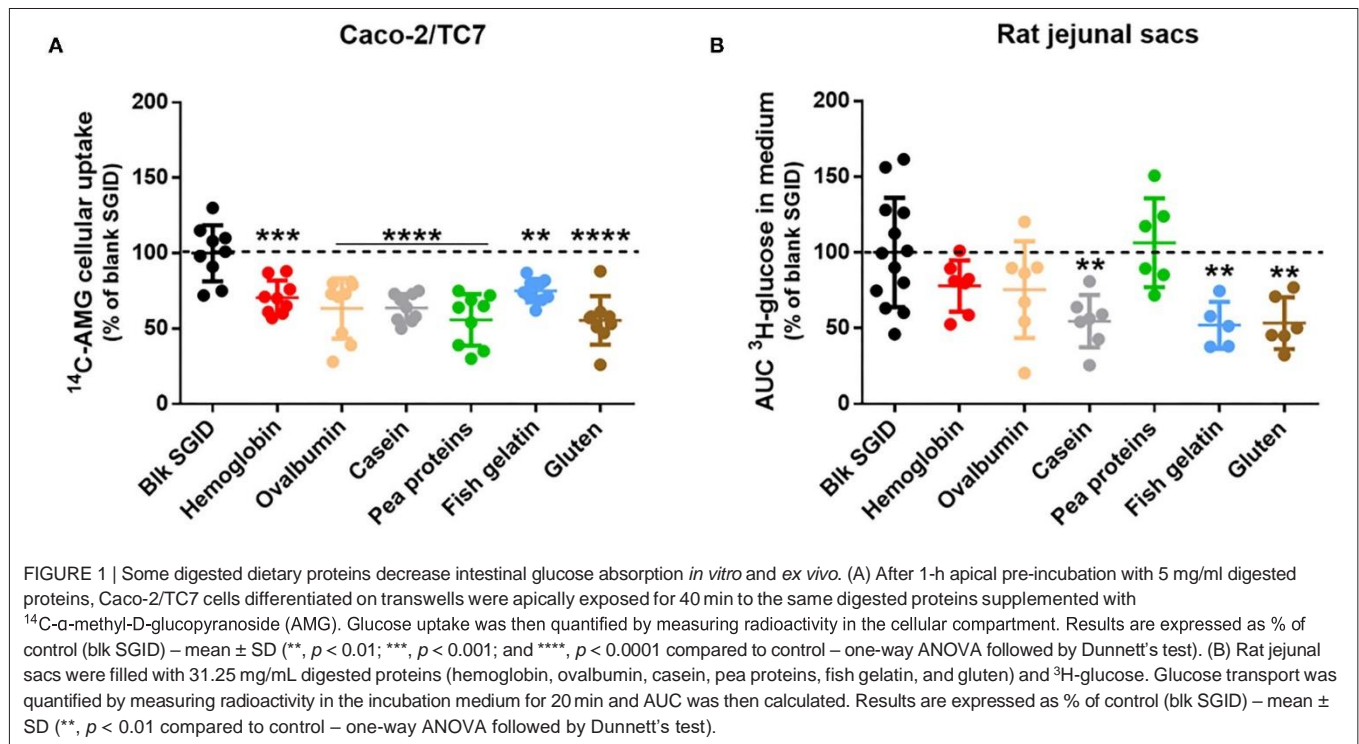
RESULTS

Decrease of Intestinal Glucose Absorption in Response to Digested Dietary Proteins

The acute effect of different digested dietary proteins (hemoglobin, ovalbumin, casein, pea proteins, fish gelatin, and gluten) on intestinal glucose absorption was evaluated using *in vitro* and *ex vivo* models. First, gastro-intestinal digestion of the dietary proteins was simulated following the recommendation of the consensual INFOGEST *in vitro* protocol (12). A blank SGID was also performed as a control. Differentiated Caco-2/TC7 cells on transwells were then pre-incubated for 40 min with the different digested proteins before being apically exposed to an SGLT1-specific glucose analog (AMG) to evaluate enterocyte glucose uptake. All digested proteins significantly decreased ¹⁴C-AMG uptake at the apical side of human enterocytes compared to the blank SGID (Figure 1A). To strengthen these *in vitro* results, rat jejunal sacs were filled with the different digested dietary proteins, and glucose transport from the intestinal lumen to the extracellular medium was assessed using a radioactive tracer. Incubation of rat jejunal sacs with digested casein, fish gelatin, and gluten significantly decreased intestinal glucose transport compared to the control blank SGID (Figure 1B).

Acute Effects of Proteins on Glucose Tolerance in Rats

Consequently, the acute effect of the different proteins on glucose tolerance was evaluated. To do that, overnight fasted rats were gavaged with proteins (hemoglobin, ovalbumin, casein, pea proteins, and fish gelatin) and received glucose by gavage 30 min later to perform an oral glucose tolerance test (OGTT). There was no statistical difference in baseline blood glucose (time 0) between the treatments. Acute ingestion of casein and fish gelatin improved glucose tolerance, as evidenced by the decreased blood glucose concentrations during OGTT (Figure 2A). In the same way, the calculated incremental area under the glucose curve (iAUC) was decreased in casein ($p < 0.01$) and nearly for fish gelatin ($p = 0.0835$) ingested groups as compared to water controls (Figure 2B). Plasma insulin levels were also determined during OGTT (Figure 2C) and iAUC calculated for each rat (Figure 2D). Acute ingestion of casein induced a significantly higher peak at 15 min of insulin secretion than the control group,



whereas acute ingestion of fish gelatin and pea proteins induced significantly lower insulin secretion, respectively, after 60 and 90 min (Figure 2C). Regarding iAUC, despite a lowering trend, no significant effect was highlighted, except for the fish gelatin group whose iAUC is lower than of the water group ($p < 0.05$) (Figure 2D).

Regulation of GLUT2 mRNA Expression in Response to Digested Dietary Proteins

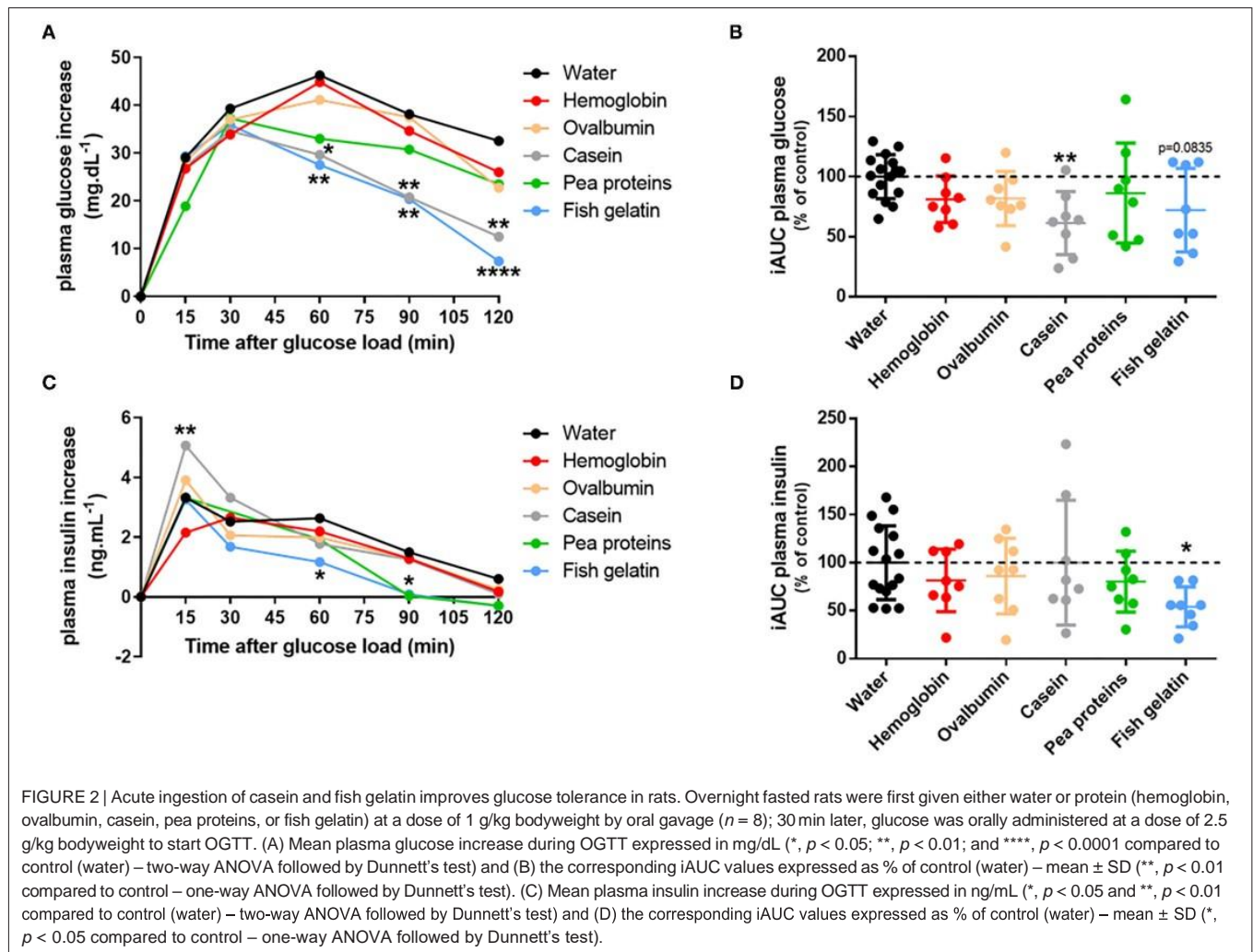
In parallel and to go further in this exploratory study, the acute effect of the different digested dietary proteins on the expression of the two main intestinal glucose transporters was investigated using different models. First, SGLT1 and GLUT2 mRNA expression was studied in Caco-2/TC7 cells (Figures 3A,B) but also in a Caco-2/HT29-MTX co-culture (Figures 3C,D) after a 4 h incubation with 5 mg/mL digested proteins (hemoglobin, ovalbumin, casein, pea proteins, fish gelatin, and gluten). Although short-term incubation with all digested proteins did not affect SGLT1 expression in Caco-2/TC7 cells (Figure 3A), digested casein, pea proteins, and gluten significantly decreased GLUT2 mRNA levels compared to the control blank SGID (Figure 3B). In Caco-2/HT29-MTX co-culture, no effect of digested proteins was observed on SGLT1 expression (Figure 3C). However, all digested proteins tend to decrease GLUT2 mRNA levels compared to the control blank SGID, with significant effect for digested pea proteins and gluten (digested casein, $p = 0.1141$) (Figure 3D). Overnight fasted rat jejunum was collected 30 min after protein gavage (hemoglobin, ovalbumin, casein, pea proteins, and fish gelatin) and jejunal mucosa was scraped to analyze SGLT1 and GLUT2 mRNA

expression. Even though there was a decreasing tendency except for hemoglobin, no significant effect of dietary proteins on SGLT1 (Figure 3E) and GLUT2 mRNA (Figure 3F) levels was highlighted *in vivo* compared to water controls.

DISCUSSION

While the world population increases, it is necessary to promote a sustainable diet that can meet nutritional recommendations and economic and ecological concerns (15). In this context, government and public health authorities recommend integrating more plant proteins into the diet and reducing animal protein consumption [PNNS, 2020 (16)]. The protein source is concomitantly more and more crucial in terms of impact on health and ecology highlighting the urgent need for better characterization and rational use of dietary proteins. In this context, this study was designed to explore the acute effect of animal and vegetal proteins from diverse origins on glucose homeostasis *in vitro* and *in vivo*.

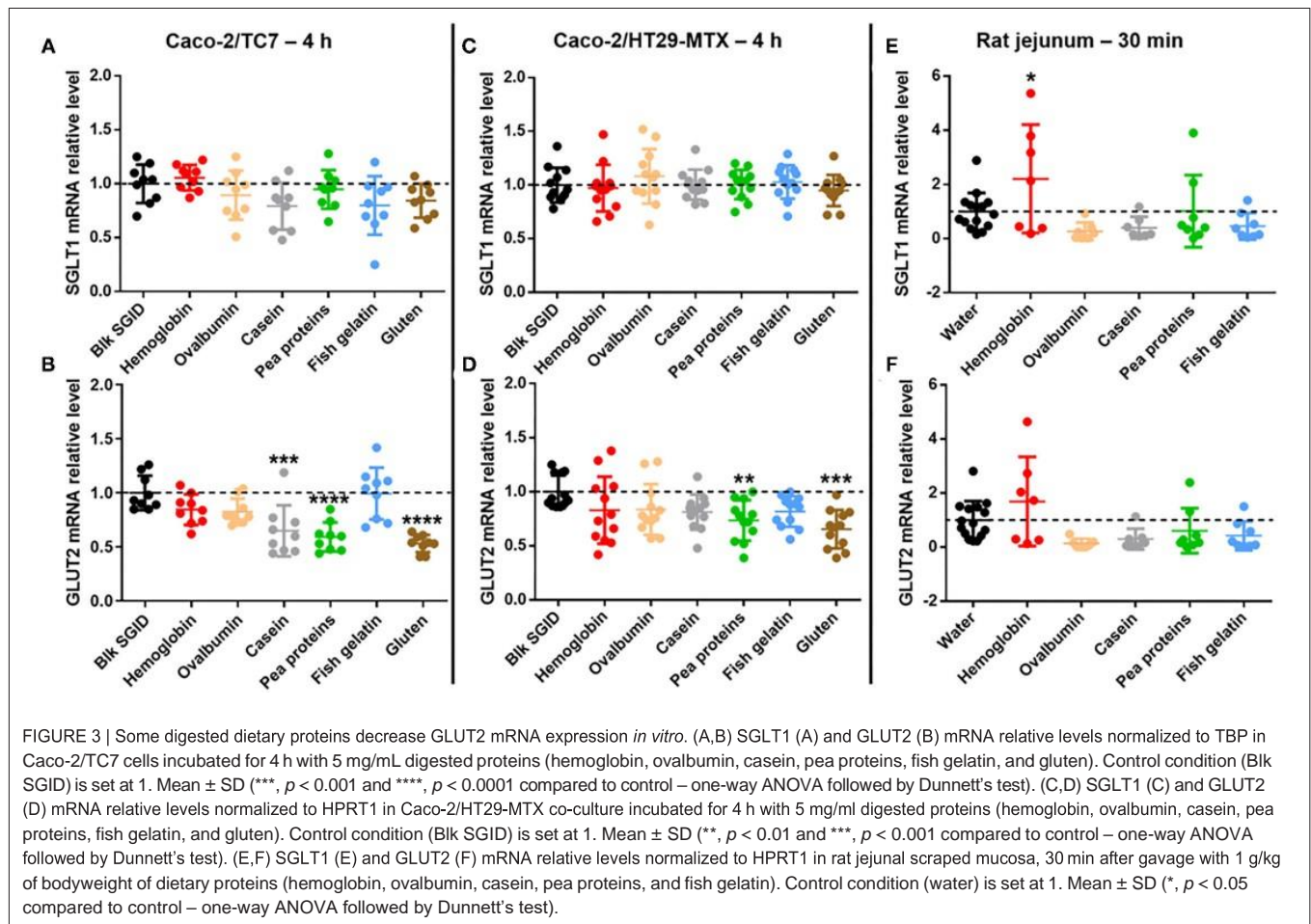
In this exploratory study, we have demonstrated, using Caco-2/TC7 cells differentiated on transwells, that *in vitro* digested dietary proteins, coming from different sources, could acutely decrease intestinal glucose uptake at the apical membrane of human enterocytes. Then, we evidenced for the first time that some of those digested proteins could also acutely decrease intestinal glucose transport *ex vivo*, using rat jejunal sacs. This decrease was significant for digested casein, fish gelatin, and gluten. Whereas, rat jejunal sacs permit the measurement of the whole intestinal glucose transport across the intestinal mucosa,



the Caco-2/TC7 cell model allows studying specifically SGLT1-specific glucose uptake at the apical side of enterocytes thanks to the use of AMG. Another experiment was performed using radioactive 2-deoxyglucose (2DG) in Caco-2/TC7 cells instead of AMG, and similar results were obtained: all digested dietary proteins coming from different sources could acutely decrease intestinal 2DG uptake at the apical membrane of enterocytes (**Supplementary Figure 1A**) and consequently its transport through the basolateral membrane (**Supplementary Figure 1B**).

After the results were obtained, dietary proteins were tested for their ability to improve glucose tolerance in rats. In humans, some proteins and amino acids have been shown to improve glucose homeostasis by stimulating insulin and incretin hormone secretion (17, 18). In T2D, it has also been highlighted that dietary proteins from different origins (meat, milk) could acutely improve glucose tolerance (19, 20). This effect was notably observed for animal-sourced proteins thanks to their high content of branched-chain amino acids. Among animal proteins, whey and cod proteins have shown remarkable results in improving acute glucose response. Indeed, a sufficient dose (≥ 0.8 g/kg/day) of these proteins associated with reduced carbohydrate

intake diminished the glycemic response by increasing insulin secretion and sensitivity in healthy adults (21–23). However, the long-term effect of high animal protein intake on glucose homeostasis is not yet clearly demonstrated, but it could lead to insulin resistance (17). Consumption of a high animal protein diet is associated with increased cardiovascular risk and diabetes incidence (24). This reverse effect may be partly due to a rise in the consumption of animal products related to higher consumption of saturated fatty acids and cholesterol. The impacts of the quantity and the quality of proteins for maintaining or improving blood glucose are not yet established. Proteins that best improve glucose tolerance by stimulating insulin are animal proteins and, more precisely, casein (18, 25). In our study, short-term fish gelatin also improved blood glucose but without increasing insulin level. This result suggested that fish gelatin-induced lowering effect on blood glucose during the OGTT cannot be explained by an increase of plasma insulin levels and thus involves some alternative mechanisms. In a study comparing cod, soy, and casein proteins on glucose tolerance in rats, the same differences between cod and casein proteins on glucose and insulin levels were found (26). Fish



gelatin and casein seem to act by different mechanisms to regulate blood glucose. Ingestion of casein improved blood glucose levels thanks to an increase in insulin secretion after 15 min, contrary to fish gelatin, which improved blood glucose levels after 60 min without involving insulin secretion. In a study, it was proposed that fish proteins could improve insulin sensitivity (27).

In parallel, we have shown that short-term incubation (4 h) with some digested dietary proteins led to decreased GLUT2 mRNA level without affecting SGLT1 mRNA expression in Caco-2/TC7 cells. We have reproduced and confirmed these results after 4 h but also 2 h-incubation with digested dietary proteins (**Supplementary Figure 2**) in a Caco-2/HT29-MTX co-culture model, which includes mucus-producing cells (28, 29). SGLT1 and GLUT2 mRNA levels were also evaluated in rat jejunum 30 min after protein gavage, but only a decreasing tendency could be highlighted compared to water controls. Whereas, the primary route for intestinal glucose transport from the intestinal lumen to blood circulation involves SGLT1 at the apical side of enterocytes and GLUT2 at the basolateral side of enterocytes, it was proposed that, in response to high glucose luminal concentrations (≥ 25 mM), a pool of endosomal

GLUT2 is transiently translocated to the apical membrane to increase intestinal glucose uptake (30). While SGLT1 and GLUT2 mRNA level analysis in response to digested dietary proteins in Caco-2/TC7 cells and Caco-2/HT29-MTX co-culture were performed in high glucose conditions (25 mM), it was not the case for rat jejunum since animals fasted overnight before the experiment. This suggests that when glucose concentration is high, digested protein sensing at the enterocyte level could acutely regulate and decrease GLUT2 expression. The peptide-lowering effect on intestinal glucose uptake has already been suggested (9). Indeed, in this study, peptides derived from black bean hydrolysis decreased glucose uptake and GLUT2 expression (mRNA and protein) as well as its location at the apical enterocyte membrane in Caco-2 cells after 30 min incubation. Other studies are needed to better understand SGLT1 and GLUT2 roles in that process and to evaluate their protein level and localization at the enterocyte membrane in response to acute protein intake. Some other pathways are still to be explored to explain the effect of dietary proteins on intestinal glucose absorption such as GLUT2-independent mechanisms (31). Moreover, the results of the present study strongly corroborate the existence of intestinal nutrient sensing

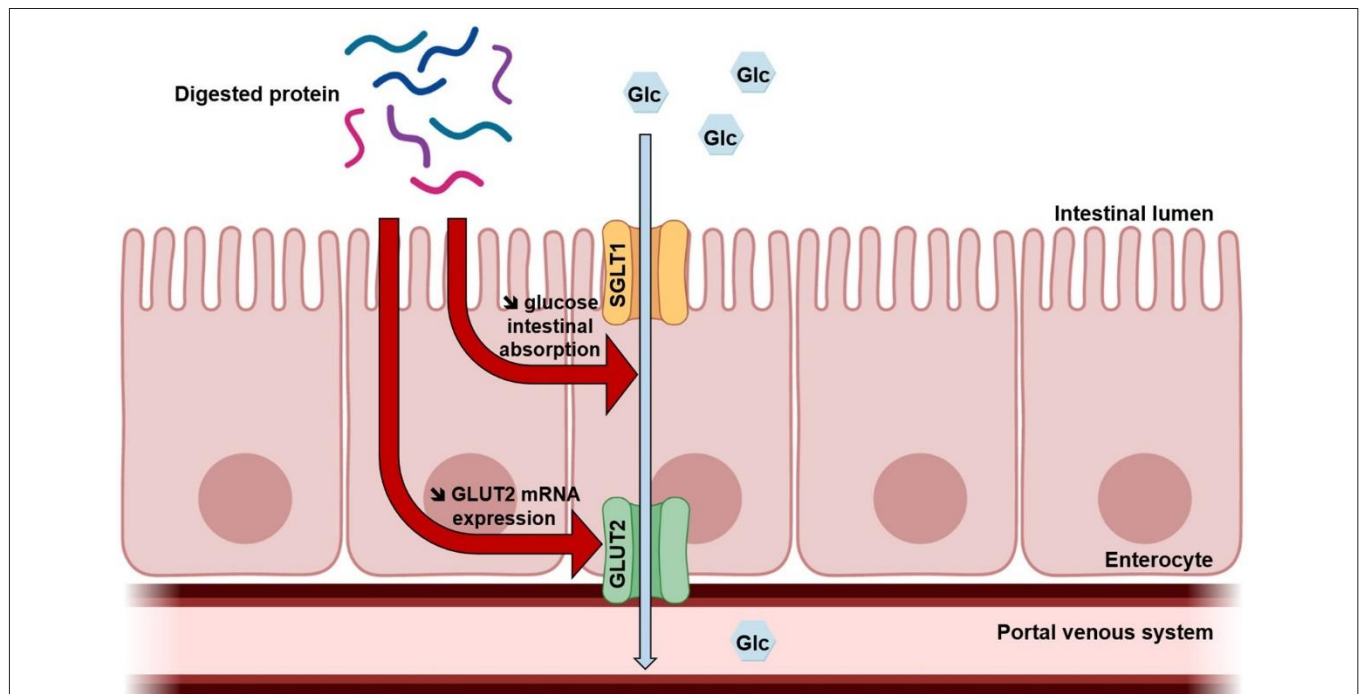


FIGURE 4 | Proposed mechanism of digested protein effects on intestinal glucose absorption. Once digested, dietary proteins decrease intestinal glucose absorption and GLUT2 mRNA expression in enterocytes.

to modulate glucose homeostasis (32) and suggest potential crosstalk between glucose sensing and peptide sensing at the enterocyte level. Peptide transporter 1 (PepT1) is a high-capacity, low-affinity di- and tripeptide transporter expressed at the brush border membrane. A recent study has already demonstrated the role of PepT1 in the detection of casein hydrolysate in the rat's upper small intestine to regulate the production of glucose (33). It has been also shown that PepT1 and SGLT1 are both regulated by the sodium–hydrogen exchanger 3 (NHE3) located at the brush-border membrane. Indeed, whereas NHE3 post-transcriptionally increases the transport activity of PepT1 (34), the inhibition of NHE3 expression increases the expression and activity of SGLT1 in non-transformed small intestinal epithelial IEC-18 cells and *vice versa* (35), suggesting an opposite regulation of peptide and glucose intestinal uptake. Furthermore, whereas high glucose concentration (75 mM) in perfused rat small intestine leads to increased GLUT2 expression at the apical membrane of enterocytes, it decreases PepT1 expression (36). Our hypothesis is that peptide detection at the apical side of enterocytes could reciprocally decrease GLUT2 expression. Our results even suggest that the concomitant presence of digested proteins and high glucose concentration in the intestinal lumen could favor peptide sensing over glucose sensing. Other studies are needed to assess PepT1 involvement in digested protein-induced intestinal glucose uptake regulation.

During the digestion of food proteins, the action of digestive proteases in the different compartments of the gastro-intestinal tract generates peptides of varying size, sequence, and structure,

which can exert numerous biological activities (37). However, studies comparing the effect of different protein sources on their bioactivities are limited (38–40). The aim of the present work was thus to compare the acute effect of animal and vegetal proteins from diverse origins on glucose homeostasis. Experiments were performed on *in vitro* and *ex vivo* models, using proteins that were first digested thanks to the consensual INFOGEST *in vitro* static protocol (12), but also *in vivo* in rats, using non-digested proteins. Although this static digestion method is simple to use and well-recognized, it does not take into account digestion kinetics nor the influence of microbiota during digestion. Moreover, it is difficult to predict *in vivo* outcomes from *in vitro* studies since they lack many other glucose-regulating factors. Thus, casein and fish gelatin have shown the most promising effect on intestinal glucose transport in rat jejunum and glucose tolerance in rats. Gluten also decreased intestinal glucose transport across the rat intestine, but its effect on glucose tolerance could not be tested because of its too weak solubility for oral administration. However, all proteins tested effectively decreased glucose uptake in Caco-2/TC7 cells. Some of them also reduced GLUT2 mRNA expression in enterocytes, the best ones being pea proteins and gluten. The ability of several plant-based proteins (among which pea proteins) to modulate glucose homeostasis has already been highlighted *in vitro* through GLP-1 secretion induction and DPP-IV activity inhibition (40). Our study provides evidence that plant-based proteins could improve glucose homeostasis through the reduction of intestinal glucose uptake.

CONCLUSIONS

This exploratory study suggests for the first time that acute protein intake could improve glucose tolerance partly due to a lowering effect on intestinal glucose uptake (**Figure 4**). It is recognized that SGLT1-mediated glucose intestinal absorption is responsible for the rapid postprandial increase in blood glucose levels observed in obesity and T2DM (10). Moreover, some studies demonstrate that in this context, insulin resistance leads to increased intestinal glucose uptake, also due to the loss of GLUT2 trafficking control leading to permanent GLUT2 localization at the apical membrane (41, 42). The results of the present study highlight dietary proteins as effective regulators of intestinal glucose uptake, which could thus be developed to prevent obesity and treat T2DM in a context of protein resource rational use. Other studies are needed to investigate molecular mechanisms and better understand this regulation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by European Union guidelines for the use of laboratory animals and in compliance with the French Ethical guidelines for studies on experimental animal (Animal house agreement no. 5900912, Authorization for Animal Experimentation no. 20992-201906031147321 v3, and project approval by our Local Ethical Committee no. CEEA75).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CD, LF, VT, FA, JL, MT, RR, and BC performed the experiments. CD, LF, VT, and BC analyzed the data. CD, LF, and BC wrote the manuscript. VT, JL, OB, NE, SL, and RR contributed to the critical review of the manuscript. All authors approved the final manuscript for submission.

FUNDING

This work has been carried out in the framework of ALIBIOTECH project which was financed by the European Union, French State, and the French Region of Hauts-de-France.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2021.769773/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Some digested dietary proteins decrease 2-DG intestinal transport in Caco-2/TC7 cells. After 1 h apical pre-incubation with 5 mg/mL digested proteins, Caco-2/TC7 cells differentiated on transwells were apically exposed for 8 min to the same digested proteins supplemented with ¹⁴C-2-deoxyglucose (2DG). Glucose uptake and absorption were then quantified by measuring radioactivity, respectively, in the cellular (A) and basolateral (B) compartments. Results are expressed as % of control (blk SGID) – mean ± SD (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; and ****, $p < 0.0001$ compared to control – one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

Supplementary Figure 2 | Some digested dietary proteins decrease GLUT2 mRNA expression after 2 h incubation in Caco-2/HT29-MTX co-culture. SGLT1 (A) and GLUT2 (B) mRNA relative levels normalized to HPRT1 in Caco-2/HT29-MTX co-culture incubated for 2 h with 5 mg/mL digested proteins (hemoglobin, ovalbumin, casein, pea proteins, fish gelatin, and gluten). Control condition (Blk SGID) is set at 1. Mean ± SD (*, $p < 0.05$ and **, $p < 0.01$ compared to control – one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

REFERENCES

- 1 Henchion M, Hayes M, Mullen A, Fenelon M, Tiwari B. Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*. (2017) 6:53. doi: 10.3390/foods6070053
- 2 Horakova O, Kroupova P, Bardova K, Buresova J, Janovska P, Kopecky J, et al. Metformin acutely lowers blood glucose levels by inhibition of intestinal glucose transport. *Sci Rep*. (2019) 9:6156. doi: 10.1038/s41598-019-42531-0
- 3 Chakrabarti S, Guha S, Majumder K. Food-derived bioactive peptides in human health: challenges and opportunities. *Nutrients*. (2018) 10:1738. doi: 10.3390/nu10111738
- 4 Gannon MC, Nuttall FQ, Saeed A, Jordan K, Hoover H. An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. (2003) 78:734–41. doi: 10.1093/ajcn/78.4.734
- 5 Boden G, Sargrad K, Homko C, Mozzoli M, Stein TP. Effect of a low-carbohydrate diet on appetite, blood glucose levels, and insulin resistance in obese patients with type 2 diabetes. *Ann Intern Med*. (2005) 142:403. doi: 10.7326/0003-4819-142-6-200503150-00006
- 6 Drummen M, Tischmann L, Gatta-Cherifi B, Adam T, Westerterp-Plantenga M. Dietary protein and energy balance in relation to obesity and co-morbidities. *Front Endocrinol*. (2018) 9:443. doi: 10.3389/fendo.2018.00443
- 7 Blachier F, Beaumont M, Portune KJ, Steuer N, Lan A, Audebert M, et al. High-protein diets for weight management: interactions with the intestinal microbiota and consequences for gut health. A position paper by the my new gut study group. *Clin Nutr*. (2019) 38:1012–22. doi: 10.1016/j.clnu.2018.09.016
- 9 Caron J, Domenger D, Dhulster P, Ravallec R, Cudennec B. Protein digestion-derived peptides and the peripheral regulation of food intake. *Front Endocrinol*. (2017) 8:85. doi: 10.3389/fendo.2017.00085
- 10 Mojica L, Luna-Vital DA, Gonzalez de Mejia E. Black bean peptides inhibit glucose uptake in caco-2 adenocarcinoma cells by blocking the expression and translocation pathway of glucose transporters. *Toxicol Rep*. (2018) 5:552–60. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.04.007
- 11 Merino B, Fernández-Díaz CM, Cózar-Castellano I, Perdomo G. Intestinal fructose and glucose metabolism in health and disease. *Nutrients*. (2019) 12:94. doi: 10.3390/nu12010094
- 12 Kjeldahl J. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpem. *Fresenius Z Anal Chem*. (1883) 22:366–82. doi: 10.1007/BF01338151
- 13 Brodkorb A, Egger L, Alminger M, Alvito P, Assunção R, Ballance S, et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastro-intestinal food digestion. *Nat Protoc*. (2019) 14:991–1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1
- 14 Atallah N, Deracinois B, Boulier A, Baniel A, Jouan-Rimbaud Bouveresse D, Ravallec R, et al. *In vitro* assessment of the impact of industrial processes on the gastro-intestinal digestion of milk protein matrices using the INFOGEST protocol. *Foods*. (2020) 9:1580. doi: 10.3390/foods9111580
- 15 Krimi RB, Letteron P, Chedid P, Nazaret C, Ducroc R, Marie JC. Resistin-like molecule- inhibits SGLT-1 activity and enhances GLUT2-Dependent jejunal glucose transport. *Diabetes*. (2009) 58:2032–8. doi: 10.2337/db08-1786
- 16 Garcia SN, Osburn BI, Jay-Russell MT. One health for food safety, food security, and sustainable food production. *Front Sustain Food Syst*. (2020) 4:1. doi: 10.3389/fsufs.2020.00001
- 17 Jerzak MA, Smiglak-Krajewska M. Globalization of the market for vegetable protein feed and its impact on sustainable agricultural development and food security in EU countries illustrated by the example of Poland. *Sustainability*. (2020) 12:888. doi: 10.3390/su12030888
- 18 Comerford K, Pasin G. Emerging evidence for the importance of dietary protein source on glucoregulatory markers and type 2 diabetes: different effects of dairy, meat, fish, egg, and plant protein foods. *Nutrients*. (2016) 8:446. doi: 10.3390/nu8080446
- 19 Chartrand D, Da Silva MS, Julien P, Rudkowska I. Influence of amino acids in dairy products on glucose homeostasis: the clinical evidence. *Can J Diabetes*. (2017) 41:329–37. doi: 10.1016/j.cjcd.2016.10.009
- 20 Promintzer M, Krebs M. Effects of dietary protein on glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. (2006) 9:463–8. doi: 10.1097/01.mco.0000232909.84483.a9
- 21 Ma J, Stevens JE, Cukier K, Maddox AF, Wishart JM, Jones KL, et al. Effects of a protein preload on gastric emptying, glycemia, and gut hormones after a carbohydrate meal in diet-controlled type 2 diabetes. *Diabetes Care*. (2009) 32:1600–2. doi: 10.2337/dc09-0723
- 22 Akhavan T, Luhovyy BL, Brown PH, Cho CE, Anderson GH. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. *Am J Clin Nutr*. (2010) 91:966–75. doi: 10.3945/ajcn.2009.28406
- 23 Gunnerud UJ, Östman EM, Björck IME. Effects of whey proteins on glycaemia and insulinaemia to an oral glucose load in healthy adults; a dose-response study. *Eur J Clin Nutr*. (2013) 67:749–53. doi: 10.1038/ejcn.2013.88
- 24 Kashima H, Uemoto S, Eguchi K, Endo MY, Miura A, Kobayashi T, et al. Effect of soy protein isolate preload on postprandial glycemic control in healthy humans. *Nutrition*. (2016) 32:965–9. doi: 10.1016/j.nut.2016.02.014
- 25 Malik VS, Li Y, Tobias DK, Pan A, Hu FB. Dietary protein intake and risk of type 2 diabetes in US men and women. *Am J Epidemiol*. (2016) 183:715–28. doi: 10.1093/aje/kwv268
- 26 Von Post-Skagegård M, Vessby B, Karlström B. Glucose and insulin responses in healthy women after intake of composite meals containing cod-, milk-, and soy protein. *Eur J Clin Nutr*. (2006) 60:949–54. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602404
- 27 Lavigne C, Marette A, Jacques H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. (2000) 278:E491–500. doi: 10.1152/ajpendo.2000.278.3.E491
- 28 Dale HF, Jensen C, Hausken T, Lied E, Hatlebakk JG, Brønstad I, et al. Effect of a cod protein hydrolysate on postprandial glucose metabolism in healthy subjects: a double-blind cross-over trial. *J Nutr Sci*. (2018) 7:e33. doi: 10.1017/jns.2018.23
- 29 Walter E, Janich S, Roessler BJ, Hilfinger JM, Amidon GL. HT29-MTX/Caco-2 cocultures as an *in vitro* model for the intestinal epithelium: *in vitro*-*in vivo* correlation with permeability data from rats and humans. *J Pharm Sci*. (1996) 85:1070–6. doi: 10.1021/js960110x
- 30 Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Regårdh CG, Lipka E, Amidon GL, Langguth P. Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *J Pharm Sci*. (2000) 89:63–75. doi: 10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6
- 31 Chen L, Tuo B, Dong H. Regulation of intestinal glucose absorption by ion channels and transporters. *Nutrients*. (2016) 8:43. doi: 10.3390/nu8010043
- 32 Stumpel F, Burcelin R, Jungermann K, Thorens B. Normal kinetics of intestinal glucose absorption in the absence of GLUT2: evidence for a transport pathway requiring glucose phosphorylation and transfer into the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci*. (2001) 98:11330–5. doi: 10.1073/pnas.211357698
- 33 Duca FA, Waise TMZ, Peppler WT, Lam TKT. The metabolic impact of small intestinal nutrient sensing. *Nat Commun*. (2021) 12:903. doi: 10.1038/s41467-021-21235-y
- 34 Dranse HJ, Waise TMZ, Hamr SC, Bauer PV, Abraham MA, Rasmussen BA, et al. Physiological and therapeutic regulation of glucose homeostasis by upper small intestinal PepT1-mediated protein sensing. *Nat Commun*. (2018) 9:1118. doi: 10.1038/s41467-018-03490-8
- 35 Watanabe C, Kato Y, Ito S, Kubo Y, Sai Y, Tsuji A. Na⁺/H⁺ exchanger affects transport property of H⁺/oligopeptide transporter 1. *Drug Metab Pharmacokin*. (2005) 20:443–51. doi: 10.2133/dmpk.20.443

- 36 Coon S, Kekuda R, Saha P, Sundaram U. Reciprocal regulation of the primary sodium absorptive pathways in rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* (2011) 300:C496–505. doi: 10.1152/ajpcell.00292.2010
- 37 Mace OJ, Lister N, Morgan E, Shepherd E, Affleck J, Helliwell P, et al. An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *J Physiol.* (2009) 587:195–210. doi: 10.1113/jphysiol.2008.159616
- 38 Rutherford-Markwick KJ. Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions. *Br J Nutr.* (2012) 108(Suppl. 2):S149–57. doi: 10.1017/S000711451200253X
- 39 Geraedts MCP, Troost FJ, Tinnemans R, Söderholm JD, Brummer RJ, Saris WHM. Release of satiety hormones in response to specific dietary proteins is different between human and murine small intestinal mucosa. *Ann Nutr Metab.* (2010) 56:308–13. doi: 10.1159/000312664
- 40 Chen W, Hira T, Nakajima S, Hara H. Wheat gluten hydrolysate potently stimulates peptide-YY secretion and suppresses food intake in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* (2018) 82:1992–9. doi: 10.1080/09168451.2018.1505482
- 41 Dugardin C, Cudennec B, Tourret M, Caron J, Guérin-Deremaux L, Behra-Miellet J, et al. Explorative screening of bioactivities generated by plant-based proteins after *in vitro* static gastro-intestinal digestion. *Nutrients.* (2020) 12:3746. doi: 10.3390/nu12123746
- 42 Tobin V, Le Gall M, Fioramonti X, Stolarczyk E, Blazquez AG, Klein C, et al. Insulin internalizes GLUT2 in the enterocytes of healthy but not insulin-resistant mice. *Diabetes.* (2008) 57:555–62. doi: 10.2337/db07-0928
- 43 Ait-Omar A, Monteiro-Sepulveda M, Poitou C, Le Gall M, Cotillard A, Gilet J, et al. GLUT2 accumulation in enterocyte apical and intracellular membranes: a study in morbidly obese human subjects and ob/ob and high fat-fed mice. *Diabetes.* (2011) 60:2598–607. doi: 10.2337/db10-1740

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Dugardin, Fleury, Touche, Ahdach, Lesage, Tenenbaum, Everaert, Briand, Lestavel, Ravallec and Cudennec. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

A retenir

- ❖ Les protéines alimentaires induisent une réduction de l'absorption intestinal du glucose.
- ❖ L'ingestion aigue de caséine et de gélatine de poisson augmentent la tolérance au glucose.
- ❖ Certaines protéines digérées diminuent l'expression de GLUT2 dans les entérocytes.

Discussion générale

L'ensemble de ces travaux a l'originalité d'avoir mis en relief les effets de différentes sources de protéines sur leur capacité à influencer des mécanismes inhérents à la régulation de l'homéostasie énergétique. Les expérimentations mises en œuvre dans ce projet se sont appuyées sur des résultats antérieurs obtenus au sein de l'équipe 7 de l'UMRt BioEcoAgro et portant sur le devenir des peptides bioactifs générés au cours de la digestion gastro-intestinale des protéines issues de l'agroalimentaire. Ces recherches ont contribué à mettre en évidence un des mécanismes à l'origine de l'effet satiétogène des protéines qui implique l'action de peptides générés au cours de la digestion gastro-intestinale de ces protéines sur la sécrétion des CCK et du GLP-1 (Caron et al., 2017a; Cudennec et al., 2012b; Domenger et al., 2017b; Theysgeur et al., 2020). Ces résultats ont amené notre équipe à vouloir déterminer si l'origine des protéines, et donc des peptidomes intestinaux différents, avait une influence sur la régulation à court terme de la prise alimentaire.

Ainsi, les travaux de cette thèse ont eu pour objectif de mieux caractériser l'effet des protéines alimentaires en fonction de leur origine, sur des mécanismes de l'homéostasie énergétique telles que la prise alimentaire, l'activité de l'enzyme DPP-IV ou encore l'absorption intestinale du glucose.

Pour y parvenir, il a été décidé d'associer une approche *in vivo* visant à identifier et comparer les effets biologiques globaux des différentes protéines, à une approche *in vitro* permettant d'étudier ces effets dans un environnement contrôlé et d'appréhender la compréhension des mécanismes étudiés aux niveaux cellulaire et moléculaire. De manière générale, cette thèse a permis de mettre en évidence l'importance de la source protéique dans ces différents mécanismes impliqués dans l'homéostasie énergétique.

Effet des protéines dans la régulation de la prise alimentaire

La première partie de cette thèse a été consacrée à l'étude de l'impact des protéines sur la régulation de la prise alimentaire à court terme. L'étude *in vivo* mise en place, a permis d'une part de comparer l'effet de sept protéines différentes à un contrôle glucidique (dextrine) et un contrôle hypocalorique (eau) sur la prise alimentaire afin de vérifier le postulat selon lequel les protéines sont le macronutriment le plus satiétogène (Bensaïd et al., 2002; Hill & Blundell, 1986; Stubbs et al., 1995), et d'autre part de nous renseigner sur l'influence de la source protéique sur l'effet satiétogène engendré. Les résultats obtenus ont montré une tendance des

protéines à diminuer la prise alimentaire au regard des contrôles eau et glucidique. Des différences significatives de toutes les protéines (à l'exception de l'hémoglobine) avec le contrôle hypocalorique (eau) ont été observées sur une période de 8 heures après l'administration des solutions protéiques. Parmi ces protéines, les protéines d'ovalbumine, de lactosérum et de gluten se sont démarquées des autres sources par leur pouvoir satiétogène plus important. Dans cette première expérimentation, il aurait été intéressant de déterminer l'effet des protéines étudiées sur la vitesse de vidange gastrique et comment cette cinétique peut impacter la régulation de la prise alimentaire à court terme. Cela aurait permis de compléter les résultats obtenus grâce à l'utilisation des cages métaboliques qui ont permis une analyse des dépenses énergétiques et du profil métabolique des rats durant les périodes d'observation grâce à la mesure des échanges gazeux. En effet, ces derniers résultats font ressortir des différences entre les protéines quant à leur vitesse de digestion. Ces différences se répercutent sur la cinétique de libération des peptides et AA impliqués dans le « sensing intestinal » et sur l'absorption des peptides et acides AA. Les protéines de lactosérum et d'hémoglobine semblent donc être plus facilement digérées que les protéines d'ovalbumine ce qui est en accord avec les différents profils peptidiques, et la taille des peptides, obtenus par SEC des protéines digérées *in vitro*. En effet, le peptidome intestinal de l'ovalbumine montre une proportion de peptides résistants à la digestion de plus haut poids moléculaire comparé à celles des autres protéines. Ces résultats sont à nuancer et d'autres processus sont vraisemblablement à l'œuvre comme en témoigne la diminution significative de la dépense énergétique à très court terme observée suite à l'ingestion d'ovalbumine. Concernant l'activité locomotrice, seules les protéines de lactosérum provoquent une diminution significative des déplacements. Cette étude confirme le rôle satiétogène des protéines et met en évidence l'influence de l'origine et de la nature des protéines, indépendamment de l'apport énergétique, sur les mécanismes régulateurs de la prise alimentaire à court terme.

De nombreuses études ont montré que les protéines induisaient *in vitro*, leur effet satiétogène notamment via la stimulation des sécrétions d'hormones intestinales telles que GLP-1, CCK et PYY et via l'inhibition de la sécrétion de ghréline au niveau gastrique. Aucun effet significatif n'a été mis en évidence dans cette étude sur la capacité des protéines digérées à stimuler la sécrétion des hormones intestinales *in vivo*, alors qu'elle est évidente *in vitro*. On observe néanmoins une diminution significative de la concentration plasmatique de ghréline induite par l'ovalbumine et les protéines de lactosérum. Cette diminution est à mettre en parallèle de l'effet

satiétogène globalement plus important de ces deux extraits protéiques comparés aux autres extraits.

Implication des protéines dans la modulation de l'activité DPP-IV

Le chapitre 2 de cette thèse s'est intéressé à l'étude de la DPP-IV qui est une enzyme impliquée dans de nombreux processus physiologiques et notamment dans la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme glucidique. L'effet des protéines digérées sur l'activité de la DPP-IV peut-être une piste explicative des différences d'effets observés *in vivo* et *in vitro* sur la satiété via la sécrétion de GLP-1 ou de GIP. En effet, l'effet satiétogène des protéines peut également être potentialisé par leur capacité à inhiber l'activité de la DPP-IV qui elle-même inactive le GLP-1, hormone clé de la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme glucidique. Néanmoins, cet effet est à minimiser, car à l'inverse du GLP-1, le clivage du PYY₁₋₃₆ par la DPP-IV produit du PYY₁₋₃₄ qui possède une activité satiétogène. Les résultats obtenus dans le chapitre 1 montraient que l'ovalbumine et les protéines de lactosérum inhibaient l'activité plasmatique de la DPP-IV à 30 min. Cette deuxième étude montre un effet inhibiteur de l'activité de la DPP-IV pour toutes les protéines à l'exception des protéines de caséine, avec un effet supérieur pour les protéines de pois qui étaient partiellement hydrolysées pour en faciliter le gavage. Ces légères différences peuvent s'expliquer par la méthode de calcul employée. Les résultats à 30 min, présentés dans le chapitre 1, ont été normalisés par rapport à l'activité basale de la DPP-IV (mesurée à t_0) pour chaque rat alors que pour ceux présentés dans le chapitre 2, issus d'une étude antérieure, l'activité n'avait été mesurée qu'à 30 min et directement comparée entre groupes. Ces deux études, nous permettent de conclure que les protéines alimentaires inhibent l'activité de la DPP-IV plasmatique indépendamment de l'apport calorique mais que la puissance de cette inhibition est influencée par la nature et l'origine de ces protéines, nature et origine qui déterminent leur digestibilité et leur cinétique de digestion. En effet, les profils peptidiques obtenus par SEC des échantillons en fin de phase intestinale montrent bien une hétérogénéité dans les populations peptidiques générées. Dans ce contexte, les protéines d'ovalbumine et de gluten semblent être plus difficilement digérées. Dans le chapitre 2, l'hydrolyse des peptides par les enzymes des entérocytes et l'absorption des protéines ont été simulées grâce à un modèle utilisant une coculture de Caco-2/HT29-MTX. Dans ce modèle expérimental, les protéines ont d'abord été digérées *in vitro* par les enzymes digestives apportées par le protocole de digestion INFOGEST, puis par les peptidases présentes

sur la bordure en brosse, mimée par la monocouche de cellules différenciées et cultivées sur inserts. Ensuite, les peptides présents dans les compartiments apical et basolatéral du dispositif, ont été identifiés par RP-HPLC-MS/MS. Afin de prédire le potentiel inhibiteur des peptides, une étude QSAR a permis de leur attribuer une valeur d'IC₅₀ théorique. Cette étude a permis de montrer que la digestion et le passage des peptides au travers de la barrière intestinale généraient de nouveaux peptides potentiellement inhibiteurs de la DPP-IV. De plus, la variété des peptides bioactifs produits est dépendante de la nature et de l'origine de la protéine. Chaque protéine n'a pas la même capacité à produire des peptides bioactifs qui pourront se retrouver dans la circulation générale, et ces peptides n'auront pas les mêmes séquences, en fonction de la séquence de la protéine initiale et de sa capacité à être digérée. Les résultats de cette étude ont permis de montrer que les protéines de lactosérum et de pois sont à l'origine d'une diversité plus importante de peptides bioactifs en regard de la DPP-IV (IC₅₀ < 300 mg.mL⁻¹) que les protéines de gluten ou d'hémoglobine par exemple. Néanmoins, ces résultats ne sont en aucun cas quantitatifs et il faut prendre en considération le fait que les peptides de petite taille (< 3 AA) n'ont pas été identifiés en raison des limites de la spectrométrie de masse appliquée à ces peptidomes très complexes.

Régulation de l'absorption intestinale de glucose par les protéines

Enfin, le dernier axe de cette thèse visait à explorer l'impact des protéines sur l'homéostasie glucidique et leur effet bénéfique sur la tolérance au glucose. Les résultats présentés dans les deux premiers chapitres du manuscrit ont mis en évidence un effet des protéines à stimuler la sécrétion des hormones pancréatiques et intestinales (GLP-1 et GIP) et à inhiber l'activité de la DPP-IV, dans des conditions d'alimentation sans glucose. Les protéines ont toutes eu une tendance à stimuler la sécrétion de glucagon et les protéines de lactosérum ont stimulé la sécrétion d'insuline dans des conditions de glycémie normale. Suite à ces résultats, il était intéressant d'étudier l'effet des protéines en état d'hyperglycémie. Les protéines de caséines ont amélioré la tolérance au glucose associée à une augmentation du taux d'insuline plasmatique à 15 min et les protéines de gélatine de poisson ont également amélioré la glycémie mais sans augmenter le taux d'insuline à court terme. Ces résultats suggèrent que l'effet induit par la gélatine de poisson sur la glycémie pendant l'OGTT n'est pas le même que celui de la caséine qui peut être lié à l'augmentation des taux plasmatiques d'insuline. Des études complémentaires ont ainsi été réalisées *in vitro* à l'aide de cellules Caco-2/TC7 différenciées

sur inserts et *ex vivo*, en utilisant des sacs jéjunaux de rat pour montrer que des protéines alimentaires digérées *in vitro*, provenant de différentes sources, pouvaient fortement diminuer la captation intestinale du glucose au niveau de la membrane apicale des entérocytes humains. L'étude *ex vivo*, nous a permis de mettre en évidence pour la première fois, que certaines protéines digérées pouvaient diminuer de manière aiguë le transport intestinal du glucose chez le rat. Cet effet était significatif pour la caséine digérée, la gélatine de poisson et le gluten. Alors que les sacs jéjunaux du rat ont permis de mesurer l'ensemble du transport intestinal du glucose à travers la muqueuse intestinale, le modèle cellulaire Caco-2/TC7 nous a permis d'étudier spécifiquement la captation du glucose par le transporteur SGLT1, spécifique du glucose du côté apical des entérocytes, grâce à l'utilisation de l'AMG. Une expérience similaire réalisée en utilisant du 2-désoxyglucose (2DG) radioactif dans des cellules Caco-2/TC7 au lieu d'AMG a été réalisée pour confirmer ce résultat. En parallèle, nous avons montré qu'une incubation à court terme (4 h) de certaines protéines alimentaires digérées, entraînait une diminution du niveau d'ARNm de GLUT2 sans affecter l'expression de l'ARNm de SGLT1 dans les cellules Caco-2/TC7. Nous avons reproduit et confirmé ces résultats sur un modèle de co-culture Caco-2/HT29-MTX. Cette même expérience réalisée sur les cellules de la bordure en brosse du jéjunum de rat prélevées, 30 min après le gavage protéique, n'a mis en évidence qu'une tendance à la baisse par rapport au contrôle (eau). Cela suggère que lorsque la concentration de glucose est élevée, la détection des protéines digérées au niveau des entérocytes pourrait réguler et diminuer de manière aiguë l'expression de GLUT2. Les résultats de cette étude corroborent fortement l'existence de la détection des nutriments intestinaux pour moduler l'homéostasie du glucose et suggèrent une interférence potentielle entre la détection du glucose et la détection des peptides au niveau des entérocytes.

L'ensemble de ces travaux nous a permis de constater que les protéines, suivant leur origine, agissent sur ces différents mécanismes notamment grâce à un contrôle de l'expression des gènes de certaines protéines d'intérêt et par une modulation de la perméabilité intestinale. En effet, les protéines digérées ont montré une capacité à moduler plus ou moins l'expression d'ARNm des gènes impliqués dans chacun des mécanismes abordés ci-dessus, tel que la sécrétion des hormones satiétogènes, la perméabilité de la barrière intestinale ou encore la production de DPP-IV et certaines protéines ont montré une capacité à diminuer la perméabilité intestinale, favorisant ainsi le passage des molécules par diffusion passive.

Perspectives

L'effet de la nature et de l'origine des protéines sur la prise alimentaire et sur certains mécanismes de l'homéostasie glucidique ayant bien été caractérisé *in vivo* et *in vitro*, il aurait été intéressant de poursuivre ces travaux par des études complémentaires ou plus approfondies des mécanismes à l'origine de ces effets. Les travaux de cette thèse montrent un « effet source » des protéines sur les différents éléments de l'homéostasie énergétique *in vivo*, mais sans réellement donner d'explication sur les mécanismes à l'origine de ces effets qui prennent place au niveau intestinal, même si on peut quand même évoquer les différences de séquences des peptides générés par la digestion gastro-intestinale des protéines. L'aspect *in vitro* de ces travaux de recherche est exploratoire. Même s'il a permis de mettre en avant une action directe des protéines sur la sécrétion des hormones intestinales, sur l'absorption intestinale de glucose ou encore sur l'effet de certaines protéines sur la perméabilité intestinale et la modulation de certains gènes, beaucoup de travaux sont encore nécessaires pour comprendre en détail ces mécanismes et mieux qualifier les protéines. En effet, les relations existantes entre la séquence, la taille et la structure des peptides, et leur capacité à interagir avec les récepteurs impliqués dans le « sensing intestinal », qui est à l'origine de leur implication dans l'homéostasie énergétique demeurent très mal connues. Les méthodes analytiques permettant la caractérisation des peptidomes intestinaux complexes issus de la digestion des protéines sont encore à améliorer. Néanmoins, un fractionnement des digestats intestinaux *in vitro* selon la masse moléculaire, la charge et/ou l'hydrophobie des peptides pourrait rendre possible l'identification des peptides responsables de la sécrétion des hormones intestinales ou de la diminution de l'absorption intestinale du glucose. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des récepteurs et transporteurs cellulaires permettrait en parallèle d'identifier les cibles de ces peptides régulateurs et d'affiner notre compréhension du dialogue existant entre les « sensing » intestinaux.

L'utilisation de tissus intestinaux de rat dans des chambres de Ussing par exemple, permettrait la mise en place d'un modèle plus physiologique pour tester l'effet des protéines digérées sur les différents mécanismes étudiés. De plus, des lignées cellulaires pancréatiques sécrétrices d'insuline et de glucagon pourraient être utilisées pour déterminer l'effet direct des protéines digérées sur la sécrétion de ces hormones, et un modèle de passage intestinal associé à un modèle d'activité pancréatique pourrait être mis au point afin de mieux qualifier les sources sur leur capacité à réguler l'homéostasie glucidique.

Ces modèles alternatifs pourraient être utilisés dans des études sur l'identification des mécanismes moléculaires et des voies de signalisation impliqués dans la sécrétion des hormones intestinales ou dans la régulation de l'absorption intestinale de glucose par les protéines alimentaires. Ceci pourrait être réalisé grâce à l'utilisation d'un panel de techniques (comme les qPCR, l'immunofluorescence, le docking moléculaire, ou encore des méthodes enzymatiques). Un travail plus approfondi sur l'interaction des séquences peptidiques identifiées avec les récepteurs GPR, du goût ou encore PepT1 apporterait de nouvelles connaissances sur ces mécanismes. Les résultats obtenus permettraient de mettre en exergue le lien entre la conformation des peptides, la séquence et l'activité biologique. En perspective de cette étape, une approche bio-informatique computationnelle serait développée dans le but de pouvoir prédire *in silico* le potentiel d'une protéine agro-alimentaire pour des utilisations dans des contextes physiologiques ou physiopathologiques.

En parallèle de cette seconde étape, les peptides synthétisés ayant montré une bioactivité significative pour l'effet escompté, pourraient être administrés *in vivo* pour analyser leur effet à long terme sur l'homéostasie énergétique ou la tolérance au glucose. Ces peptides pourraient devenir des molécules intéressantes dans le traitement ou la prévention de l'obésité et du diabète de type 2. Il serait également particulièrement pertinent d'observer l'effet de la source des protéines sur la régulation de l'homéostasie énergétique à long terme en cage métabolique avec de la nourriture donnée en condition *ad libitum* mais ne contenant qu'une seule source de protéine. Les effets sur le long terme pourraient être complètement différents de ceux observés à court terme et d'autres sources protéiques pourraient se montrer particulièrement intéressantes.

D'ailleurs, pour faire suite à ces travaux, il serait nécessaire d'étendre l'étude à des sources protéiques moins traditionnelles dont la production serait plus respectueuse de l'environnement. Les protéines d'algues et les protéines d'insectes, par exemple, doivent nécessairement être considérées comme un complément à l'utilisation traditionnelle de protéines animales et végétales et devraient donc être mieux caractérisées. De plus, les déchets et sous-produits protéiques provenant de nombreuses industries (par exemple, la pêche, l'alimentation ou l'agriculture) ne sont pas encore pleinement utilisés ou sont mal valorisés. Le fait de valoriser les coproduits apparaît aujourd'hui comme un point clé du développement d'une économie circulaire.

L'ensemble de ces travaux montre combien les protéines, suivant leur origine possèdent un potentiel santé différent et unique, qui implique un grand nombre de mécanismes encore inconnus pour la plupart. Face à l'augmentation de la demande en protéines et des problèmes écologiques qu'elle engendre, face à l'augmentation des cas d'obésité, et des maladies métaboliques, il est nécessaire d'envisager l'importance de chaque source protéique et d'étendre les recherches à une multitude de sources encore non valorisées sur plus de mécanismes.

Ainsi, la thermorégulation est un mécanisme inhérent à l'homéostasie énergétique et liée à la prise alimentaire. Le corps va produire de la chaleur par contraction musculaire et par un mécanisme faisant intervenir le tissu adipeux brun (BAT). Certains adipocytes contiennent de nombreuses mitochondries et maintiennent des niveaux d'expression élevés d'Ucp1, qui produisent de l'énergie par une activité de découplage. Cette activité a été proposée comme une stratégie prometteuse contre l'obésité et les maladies métaboliques (Chang et al., 2019). Les mécanismes qui lient des températures relativement chaudes à la suppression de l'appétit sont encore inconnus et l'effet de protéines sur ces voies métaboliques peut être une piste.

De nombreuses études mettent également en évidence une implication de la flore intestinale dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Les premières preuves à l'appui proviennent d'une étude qui a révélé que les souris axéniques (sans flore intestinale) étaient plus maigres que les souris ayant un microbiote et que l'implantation d'un microbiote chez ces souris axéniques pouvait induire une augmentation de la masse grasse et de la résistance à l'insuline (Bäckhed et al. 2004 ; Everard et Cani 2013). Plus récemment, il a été mis en évidence que le microbiote avait la capacité de produire des composés pouvant agir sur la sécrétion des hormones intestinales GLP-1 et PYY (Delzenne et al., 2019) et que certaines bactéries du microbiote intestinal possédaient une action inhibitrice de la DPP-IV (Delzenne et al., 2019).

Pour conclure, ce travail a permis de mieux caractériser les protéines d'hémoglobine, d'ovalbumine, de lait de vache, de gélatine de poisson, de gluten et de pois, pour leur implication dans la régulation de l'homéostasie énergétique et plus particulièrement dans la régulation périphérique de la prise alimentaire et du métabolisme glucidique au cours de la digestion gastro-intestinale. Le tableau 9 ci-dessous résume l'effet de chacune des protéines étudiées sur ces différents mécanisme. Il a permis de mieux caractériser ces protéines pour pouvoir à moyen terme proposer une utilisation plus rationalisée des protéines agro-

alimentaires, dans un contexte de raréfaction de ressources, avec un bénéfice santé potentiel, dans les domaines de la nutrition et des aliments fonctionnels.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif de l'impact des différentes protéines sur les mécanismes étudiés

		Hémoglobine	Caséines	Ovalbumine	Protéines de lactosérum	Gélatine de poisson	Protéines de pois	Gluten
Prise Alimentaire	In vivo Food Intake	1	2	7	5	4	3	6
	In vivo Hormones	4	4	6	7	2	4	1
	In vitro Hormones	7	4	2	4	1	4	6
	In vitro Expression des gènes	1	0	0	0	0	2	0
	Moyenne	3,25	1,5	3,75	4	1,75	3,25	3
Activité de la DPP-IV	In vivo inhibition de la DPP-IV	5	3	6	7	2	4	0
	In vitro inhibition DPP-IV (Basal)	7	6	5	4	3	2	1
	In vitro Expression gene	5	1	3	2	5	5	7
	Peptides Bioactifs	3	5	4	7	-	6	2
	Moyenne	5	3,75	4,5	5	3,3	4,25	2,5
Tolérance au glucose	In vivo tolerance glucose	4	6	3	-	5	1	-
	In vivo hormones (GIP-Insuline-Glucagon)	7	4	5	6	3	1	2
	Intestinal transport	3	5	4	-	1	6	7
	In vitro GIP	7	4	2	4	1	4	6
	Moyenne	4,25	4,75	3,5	5	2,5	3	4,6

Les protéines ont été classées par un chiffre entre 0 à 7 en fonction de leur effet significatif ou non sur les différents paramètres étudiés. Le chiffre 7 correspond à un effet plus prononcé et 0 aucun effet. Les protéines de lactosérum et d'ovalbumine montre un effet plus prononcé sur la satiété. Les protéines de lactosérum et d'hémoglobine semblent avoir une action inhibitrice de l'activité DPP-IV plus importante que les autres protéines et enfin ce sont les protéines laitières qui améliorent le mieux la tolérance au glucose.

Références

- Abou-Diab, M., Thibodeau, J., Deracinois, B., Flahaut, C., Fliss, I., Dhulster, P., Nedjar, N., & Bazinet, L. (2020). Bovine Hemoglobin Enzymatic Hydrolysis by a New Ecoefficient Process—Part I: Feasibility of Electrodialysis with Bipolar Membrane and Production of Neokyotorphin (α 137-141). *Membranes*, 10(10), 257. <https://doi.org/10.3390/membranes10100257>
- Abou-Samra, R., Keersmaekers, L., Brienza, D., Mukherjee, R., & Macé, K. (2011a). Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter. *Nutrition Journal*, 10(1), 139. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-139>
- Abou-Samra, R., Keersmaekers, L., Brienza, D., Mukherjee, R., & Macé, K. (2011b). Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter. *Nutrition Journal*, 10(1), 139. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-139>
- Adesogan, A. T., Havelaar, A. H., McKune, S. L., Eilittä, M., & Dahl, G. E. (2020). Animal source foods : Sustainability problem or malnutrition and sustainability solution? Perspective matters. *Global Food Security*, 25, 100325. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.100325>
- Adibi, S. A. (2003). Regulation of expression of the intestinal oligopeptide transporter (Pept-1) in health and disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 285(5), G779-G788. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00056.2003>
- Admassu, H., Gasmalla, M. A. A., Yang, R., & Zhao, W. (2018). Identification of Bioactive Peptides with α -Amylase Inhibitory Potential from Enzymatic Protein Hydrolysates of Red Seaweed (*Porphyra* spp). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(19), 4872-4882. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00960>
- Afssa (Éd.). (2007). *Apport en protéines : Consommation, qualité, besoins et recommandations*. Afssa.
- Ahmad, T., Ismail, A., Ahmad, S. A., Khalil, K. A., Kumar, Y., Adeyemi, K. D., & Sazili, A. Q. (2017). Recent advances on the role of process variables affecting gelatin yield and characteristics with special reference to enzymatic extraction: A review. *Food Hydrocolloids*. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.007>
- Ahrén, B., Holst, J. J., & Efendic, S. (2000). Antidiabetogenic action of cholecystokinin-8 in type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(3), 1043-1048. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.3.6431>
- Aiking, H., & de Boer, J. (2020). The next protein transition. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 515-522. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.008>
- Akhavan, T., Luhovyy, B. L., Panahi, S., Kubant, R., Brown, P. H., & Anderson, G. H. (2014). Mechanism of action of pre-meal consumption of whey protein on glycemic control in young adults. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(1), 36-43. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.08.012>
- Algloblan, A. (2014). Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 587. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S67400>
- Aluko, R. E. (2015). Antihypertensive Peptides from Food Proteins. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 235-262. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015520>

- Amarakoon, D., Thavarajah, D., McPhee, K., & Thavarajah, P. (2012). Iron-, zinc-, and magnesium-rich field peas (*Pisum sativum* L.) with naturally low phytic acid: A potential food-based solution to global micronutrient malnutrition—ScienceDirect. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.05.007>
- Amini Sarteshnizi, R., Sahari, M. A., Ahmadi Gavlighi, H., Regenstein, J. M., Nikoo, M., & Udenigwe, C. C. (2021). Influence of fish protein hydrolysate-pistachio green hull extract interactions on antioxidant activity and inhibition of α -glucosidase, α -amylase, and DPP-IV enzymes. *LWT*, 142, 111019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111019>
- AMIS. (2022). *Agricultural Market Information System : Home*. http://www.amis-outlook.org/#jfmulticontent_c363419-2
- Anderson et al. (2004a). *Dietary Proteins in the Regulation of Food Intake and Body Weight in Humans / The Journal of Nutrition / Oxford Academic*. <https://academic.oup.com/jn/article/134/4/974S/4757180>
- Anderson, G. H., Tecimer, S. N., Shah, D., & Zafar, T. A. (2004b). Protein source, quantity, and time of consumption determine the effect of proteins on short-term food intake in young men. *The Journal of Nutrition*, 134(11), 3011-3015. <https://doi.org/10.1093/jn/134.11.3011>
- Anderson, R. C., Dalziel, J. E., Haggarty, N. W., Dunstan, K. E., Gopal, P. K., & Roy, N. C. (2019). Short communication : Processed bovine colostrum milk protein concentrate increases epithelial barrier integrity of Caco-2 cell layers. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 10772-10778. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16951>
- Andreoli, V., Bagliani, M., Corsi, A., & Frontuto, V. (2021). Drivers of Protein Consumption : A Cross-Country Analysis. *Sustainability*, 13(13), 7399. <https://doi.org/10.3390/su13137399>
- Anema, S. G. (2020). Chapter 9 - The whey proteins in milk : Thermal denaturation, physical interactions, and effects on the functional properties of milk. In M. Boland & H. Singh (Éds.), *Milk Proteins (Third Edition)* (p. 325-384). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815251-5.00009-8>
- Asakawa, A., Inui, A., Kaga, O., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., Makino, S., Fujimiya, M., Nijjima, A., & Fujino, M. A. (2001). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology*, 120(2), 337-345.
- Atallah, N., Deracinois, B., Boulier, A., Baniel, A., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Ravallec, R., Flahaut, C., & Cudennec, B. (2020). In Vitro Assessment of the Impact of Industrial Processes on the Gastrointestinal Digestion of Milk Protein Matrices Using the INFOGEST Protocol. *Foods*, 9(11), 1580. <https://doi.org/10.3390/foods9111580>
- Aubry, M., & Boucrot, P. (1986). Etude comparative de la digestion des viciline, lécithine et lectine radiomarquées de *Pisumsativum* chez le rat. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 30(3), 175-182. <https://doi.org/10.1159/000177191>
- Avgerinos, K. I., Spyrou, N., Mantzoros, C. S., & Dalamaga, M. (2019). Obesity and cancer risk : Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*, 92, 121-135. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.11.001>
- Bäckhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy, A., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2004). The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage.

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(44), 15718-15723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407076101>
- Bailey, A. J., Macmillan, J., Shewry, P. R., Tatham, A. S., Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S., & Tatham, A. S. (2002). The structure and properties of gluten : An elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 357(1418), 133-142. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1024>
- Basdevant, A. (2006). L'obésité : Origines et conséquences d'une épidémie. *Comptes Rendus Biologies*, 329(8), 562-569. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2006.03.018>
- Baura, G. D., Foster, D. M., Porte, D., Kahn, S. E., Bergman, R. N., Cobelli, C., & Schwartz, M. W. (1993). Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(4), 1824-1830. <https://doi.org/10.1172/JCI116773>
- Bavaro, S. L., Mamone, G., Picariello, G., Callanan, M. J., Chen, Y., Brodkorb, A., & Giblin, L. (2021). Thermal or membrane processing for Infant Milk Formula : Effects on protein digestion and integrity of the intestinal barrier. *Food Chemistry*, 347, 129019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129019>
- Béduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F., & Lamprecht, A. (2014). A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(2), 290-298. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.017>
- Belza, A., Ritz, C., Sørensen, M. Q., Holst, J. J., Rehfeld, J. F., & Astrup, A. (2013). Contribution of gastroenteropancreatic appetite hormones to protein-induced satiety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 97(5), 980-989. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.047563>
- Bendtsen, L. Q., Lorenzen, J. K., Bendtsen, N. T., Rasmussen, C., & Astrup, A. (2013a). Effect of Dairy Proteins on Appetite, Energy Expenditure, Body Weight, and Composition : A Review of the Evidence from Controlled Clinical Trials. *Advances in Nutrition*, 4(4), 418-438. <https://doi.org/10.3945/an.113.003723>
- Bendtsen, L. Q., Lorenzen, J. K., Bendtsen, N. T., Rasmussen, C., & Astrup, A. (2013b). Effect of Dairy Proteins on Appetite, Energy Expenditure, Body Weight, and Composition : A Review of the Evidence from Controlled Clinical Trials. *Advances in Nutrition*, 4(4), 418-438. <https://doi.org/10.3945/an.113.003723>
- Benedict, C., Kern, W., Schultes, B., Born, J., & Hallschmid, M. (2008). Differential Sensitivity of Men and Women to Anorexigenic and Memory-Improving Effects of Intranasal Insulin. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(4), 1339-1344. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2606>
- Bensaïd, A., Tomé, D., Gietzen, D., Even, P., Morens, C., Gausseres, N., & Fromentin, G. (2002). Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiology & Behavior*, 75(4), 577-582. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00646-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00646-7)
- Benyaich, A., & Benyaich, K. (s. d.). *Les peptides orexigènes et anorexigènes impliqués dans la régulation centrale et périphérique du comportement alimentaire*. 27.

- Bhagwat, P. K., & Dandge, P. B. (2018). Collagen and collagenolytic proteases : A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *15*, 43-55. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.005>
- Bhat, Z. F., Morton, J. D., Bekhit, A. E.-D. A., Kumar, S., & Bhat, H. F. (2021). Effect of processing technologies on the digestibility of egg proteins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(5), 4703-4738. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12805>
- Biesiekierski, J. R. (2017). What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *32*(S1), 78-81. <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>
- Black, R. E., Allen, L. H., Bhutta, Z. A., Caulfield, L. E., de Onis, M., Ezzati, M., Mathers, C., & Rivera, J. (2008). Maternal and child undernutrition : Global and regional exposures and health consequences. *The Lancet*, *371*(9608), 243-260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61690-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61690-0)
- Black, R. E., Victora, C. G., Walker, S. P., Bhutta, Z. A., Christian, P., de Onis, M., Ezzati, M., Grantham-McGregor, S., Katz, J., Martorell, R., & Uauy, R. (2013). Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *The Lancet*, *382*(9890), 427-451. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60937-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60937-X)
- Bleakley, S., Hayes, M., O'Shea, N., Gallagher, E., & Lafarga, T. (2017). Predicted release and analysis of novel ACE-I, renin, and DPP-IV inhibitory peptides from common oat (*Avena sativa*) protein hydrolysates using in silico analysis. *Foods*, *6*(12), 108.
- Bloom, S. R., & Polak, J. M. (1987). Glucagonoma syndrome. *The American Journal of Medicine*, *82*(5B), 25-36. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(87\)90424-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(87)90424-4)
- Blüher, M. (2020). Metabolically Healthy Obesity. *Endocrine Reviews*, *41*(3), 405-420. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnaa004>
- Boden, G., Sargrad, K., Homko, C., Mozzoli, M., & Stein, T. P. (2005). Effect of a Low-Carbohydrate Diet on Appetite, Blood Glucose Levels, and Insulin Resistance in Obese Patients with Type 2 Diabetes. *Annals of Internal Medicine*, *142*(6), 403-411. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-142-6-200503150-00006>
- Bohl, M., Bjørnshave, A., Gregersen, S., & Hermansen, K. (2016). Whey and Casein Proteins and Medium-Chain Saturated Fatty Acids from Milk Do Not Increase Low-Grade Inflammation in Abdominally Obese Adults. *The Review of Diabetic Studies : RDS*, *13*(2-3), 148-157. <https://doi.org/10.1900/RDS.2016.13.148>
- Bohlen, H. G. (1980). Intestinal tissue PO₂ and microvascular responses during glucose exposure. *The American Journal of Physiology*, *238*(2), H164-171. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1980.238.2.H164>
- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M.-P., Maubois, J.-L., & Beaufrère, B. (1997). Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(26), 14930-14935. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.14930>
- Boirie, Y., & Guillet, C. (2018). Fast digestive proteins and sarcopenia of aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *21*(1), 37-41. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000427>
- Boland, M. (2016). Human digestion – a processing perspective. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *96*(7), 2275-2283. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7601>

- Boran, G., & Regenstein, J. M. (2010). Chapter 5—Fish Gelatin. In S. L. Taylor (Éd.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 60, p. 119-143). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)60005-8](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)60005-8)
- Botella, C. (2021). *Les protéines végétales : Intérêts et limites* [Sciences pharmaceutiques, Université de grenoble]. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03210847>
- Bourin, M. (2011). *Caractérisation fonctionnelle et biochimique des protéases et antiprotéases présentes dans le jaune d'oeuf « Gallus gallus »*. [Phdthesis, Université de Tours, Région Centre Val de Loire]. <https://hal.inrae.fr/tel-02888883>
- Boutry, C., Fouillet, H., Mariotti, F., Blachier, F., Tomé, D., & Bos, C. (2011). Rapeseed and milk protein exhibit a similar overall nutritional value but marked difference in postprandial regional nitrogen utilization in rats. *Nutrition & Metabolism*, 8, 52. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-52>
- Bowen, J., Noakes, M., & Clifton, P. M. (2006). Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad libitum energy intake. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(8), 2913-2919. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0609>
- Bradstreet. (1954). *Kjeldahl Method for Organic Nitrogen | Analytical Chemistry*. 26(1). <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60085a028>
- Brandsch, M., Knütter, I., & Bosse-Doenecke, E. (2010). Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(5), 543-585. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.5.0002>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019a). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019b). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Broyard, C., & Gaucheron, F. (2015). Modifications of structures and functions of caseins : A scientific and technological challenge. *Dairy Science & Technology*, 95(6), 831-862. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0220-y>
- Bueno, L., Ferre, J. P., & Ruckebusch, Y. (1978). Effects of anesthesia and surgical procedures on intestinal myoelectric activity in rats. *The American Journal of Digestive Diseases*, 23(8), 690-695. <https://doi.org/10.1007/BF01072353>
- Burdyga, G., Varro, A., Dimaline, R., Thompson, D. G., & Dockray, G. J. (2006). Ghrelin receptors in rat and human nodose ganglia : Putative role in regulating CB-1 and MCH receptor abundance. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290(6), G1289-1297. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00543.2005>

- Burton-Freeman, B., Gietzen, D. W., & Schneeman, B. O. (1997). Meal pattern analysis to investigate the satiating potential of fat, carbohydrate, and protein in rats. *The American Journal of Physiology*, 273(6), R1916-1922. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.6.R1916>
- Cai, H., Cong, W., Daimon, C. M., Wang, R., Tschöp, M. H., Sévigny, J., Martin, B., & Maudsley, S. (2013). Altered lipid and salt taste responsivity in ghrelin and GOAT null mice. *PLoS One*, 8(10), e76553.
- Calbet, J. A. L., & MacLean, D. A. (2002). Plasma Glucagon and Insulin Responses Depend on the Rate of Appearance of Amino Acids after Ingestion of Different Protein Solutions in Humans. *The Journal of Nutrition*, 132(8), 2174-2182. <https://doi.org/10.1093/jn/132.8.2174>
- Calvez, J., Benoit, S., Piedcoq, J., Khodorova, N., Azzout-Marniche, D., Tomé, D., Benamouzig, R., Airinei, G., & Gaudichon, C. (2021). Very low ileal nitrogen and amino acid digestibility of zein compared to whey protein isolate in healthy volunteers. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 113(1), 70-82. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqaa274>
- Camilleri, M., & Vazquez Roque, M. I. (2014). Gastrointestinal Functions. In M. J. Aminoff & R. B. Daroff (Éds.), *Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition)* (p. 411-416). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00501-7>
- Campbell, J., Berry, J., & Liang, Y. (2019). Chapter 71—Anatomy and Physiology of the Small Intestine. In C. J. Yeo (Éd.), *Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2 Volume Set (Eighth Edition)* (p. 817-841). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40232-3.00071-6>
- Campbell, J. E., & Drucker, D. J. (2013). Pharmacology, Physiology, and Mechanisms of Incretin Hormone Action. *Cell Metabolism*, 17(6), 819-837. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.008>
- Cani, P. D., Van Hul, M., Lefort, C., Depommier, C., Rastelli, M., & Everard, A. (2019). Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nature Metabolism*, 1(1), 34-46. <https://doi.org/10.1038/s42255-018-0017-4>
- Cano, V., Merino, B., Ezquerra, L., Somoza, B., & Ruiz-Gayo, M. (2008). A cholecystokinin-1 receptor agonist (CCK-8) mediates increased permeability of brain barriers to leptin. *British Journal of Pharmacology*, 154(5), 1009-1015. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.149>
- Capozzi, M. E., Wait, J. B., Koech, J., Gordon, A. N., Coch, R. W., Svendsen, B., Finan, B., D'Alessio, D. A., & Campbell, J. E. (2019). Glucagon lowers glycemia when β cells are active. *JCI Insight*, 4(16), e129954. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129954>
- Carip, C., & Louet, F. (2004). *Physiologie : Base physiologiques de la diététiques*. Lavoisier.
- Caron, J. (2016). *THÈSE DE DOCTORAT Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques*. 365.
- Caron, J., Cudennec, B., Domenger, D., Belguesmia, Y., Flahaut, C., Kouach, M., Lesage, J., Goossens, J.-F., Dhulster, P., & Ravallec, R. (2016a). Simulated GI digestion of dietary protein : Release of new bioactive peptides involved in gut hormone secretion. *Food Research International*, 89, 382-390. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.033>
- Caron, J., Cudennec, B., Domenger, D., Belguesmia, Y., Flahaut, C., Kouach, M., Lesage, J., Goossens, J.-F., Dhulster, P., & Ravallec, R. (2016b). Simulated GI digestion of dietary protein : Release of new bioactive peptides involved in gut hormone secretion. *Food Research International*, 89, 382-390. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.033>

- Caron, J., Domenger, D., Belguesmia, Y., Kouach, M., Lesage, J., Goossens, J.-F., Dhulster, P., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2016). Protein digestion and energy homeostasis : How generated peptides may impact intestinal hormones? *Food Research International*, *88*, 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.12.018>
- Caron, J., Domenger, D., Dhulster, P., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2017a). Protein Digestion-Derived Peptides and the Peripheral Regulation of Food Intake. *Frontiers in Endocrinology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00085>
- Caron, J., Domenger, D., Dhulster, P., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2017b). Using Caco-2 cells as novel identification tool for food-derived DPP-IV inhibitors. *Food Research International*, *92*, 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.002>
- Caron, J., Domenger, D., Dhulster, P., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2017c). Using Caco-2 cells as novel identification tool for food-derived DPP-IV inhibitors. *Food Research International*, *92*, 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.002>
- Caron, J., Domenger, D., Dhulster, P., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2017d). Protein Digestion-Derived Peptides and the Peripheral Regulation of Food Intake. *Frontiers in Endocrinology*, *8*, 85. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00085>
- Chan, E. K., Mackey, M. A., Snover, D. C., Schneider, P. D., Rucker, R. D., Allen, C. E., & Buchwald, H. (1984). Suppression of weight gain by glucagon in obese Zucker rats. *Experimental and Molecular Pathology*, *40*(3), 320-327. [https://doi.org/10.1016/0014-4800\(84\)90049-2](https://doi.org/10.1016/0014-4800(84)90049-2)
- Chan, M. (2017). Obesity and Diabetes : The Slow-Motion Disaster: Obesity and Diabetes: The Slow-Motion Disaster. *The Milbank Quarterly*, *95*(1), 11-14. <https://doi.org/10.1111/1468-0009.12238>
- Chang, S.-H., Song, N.-J., Choi, J. H., Yun, U. J., & Park, K. W. (2019). Mechanisms underlying UCP1 dependent and independent adipocyte thermogenesis. *Obesity Reviews*, *20*(2), 241-251. <https://doi.org/10.1111/obr.12796>
- Chartrand, D., Da Silva, M. S., Julien, P., & Rudkowska, I. (2017). Influence of Amino Acids in Dairy Products on Glucose Homeostasis : The Clinical Evidence. *Canadian Journal of Diabetes*, *41*(3), 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2016.10.009>
- Chawla, R., Madhu, S. V., Makkar, B. M., Ghosh, S., Saboo, B., & Kalra, S. (2020). RSSDI-ESI Clinical Practice Recommendations for the Management of Type 2 Diabetes Mellitus 2020. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, *24*(1), 1-122. https://doi.org/10.4103/ijem.IJEM_225_20
- Chen, M.-M., Huang, Y.-Q., Guo, H., Liu, Y., Wang, J.-H., Wu, J.-L., & Zhang, Q.-Q. (2014). Preparation, characterization, and potential biomedical application of composite sponges based on collagen from silver carp skin : ARTICLE. *Journal of Applied Polymer Science*, *131*(21). <https://doi.org/10.1002/app.40998>
- Chen, W., Hira, T., Nakajima, S., & Hara, H. (2018a). Wheat gluten hydrolysate potently stimulates peptide-YY secretion and suppresses food intake in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *82*(11), 1992-1999. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1505482>
- Chen, W., Hira, T., Nakajima, S., & Hara, H. (2018b). Wheat gluten hydrolysate potently stimulates peptide-YY secretion and suppresses food intake in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *82*(11), 1992-1999. <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1505482>

- Chereau, D., Rémond, D., Jeuffroy, M.-H., Francis, F., & Gauffier, A. (2015, février). *Les protéines : Un enjeu majeur pour une alimentation humaine et animale plus durable*.
- Chobert, J.-M. (2003). Milk protein modification to improve functional and biological properties. *Advances in Food and Nutrition Research*, 47, 1-71. [https://doi.org/10.1016/s1043-4526\(03\)47001-0](https://doi.org/10.1016/s1043-4526(03)47001-0)
- Cian, R. E., Campos-Soldini, A., Chel-Guerrero, L., Drago, S. R., & Betancur-Ancona, D. (2019). Bioactive Phaseolus lunatus peptides release from maltodextrin/gum arabic microcapsules obtained by spray drying after simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14031>
- Cifuentes, L., & Acosta, A. (2021). Homeostatic regulation of food intake. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 46(2), 101794. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101794>
- Cifuentes, L., & Acosta, A. (2022). Homeostatic regulation of food intake. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 46(2), 101794. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101794>
- Claude, M., Bouchaud, G., Lupi, R., Castan, L., Tranquet, O., Denery-Papini, S., Bodinier, M., & Brossard, C. (2017). How Proteins Aggregate Can Reduce Allergenicity: Comparison of Ovalbumins Heated under Opposite Electrostatic Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18), 3693-3701. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00676>
- Clemente, A. (2000). Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 11(7), 254-262. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00007-3)
- Comerford, K. B., & Pasin, G. (2016). Emerging Evidence for the Importance of Dietary Protein Source on Glucoregulatory Markers and Type 2 Diabetes: Different Effects of Dairy, Meat, Fish, Egg, and Plant Protein Foods. *Nutrients*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/nu8080446>
- Comesaña, S., Velasco, C., & Soengas, J. L. (2021). Leucine sensing in rainbow trout hypothalamus is direct but separate from mTOR signalling in the regulation of food intake. *Aquaculture*, 543, 737009. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737009>
- Conlon, J. M., Mechkarska, M., Abdel-Wahab, Y. H., & Flatt, P. R. (2018). Peptides from frog skin with potential for development into agents for Type 2 diabetes therapy. *Peptides*, 100, 275-281. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.09.001>
- Considine, R. V., Sinha, M. K., Heiman, M. L., Kriauciunas, A., Stephens, T. W., Nyce, M. R., Ohannesian, J. P., Marco, C. C., McKee, L. J., Bauer, T. L., & Caro, J. F. (1996). Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *New England Journal of Medicine*, 334(5), 292-295. <https://doi.org/10.1056/NEJM199602013340503>
- Cordier-Bussat, M. (1998). *Peptones stimulate both the secretion of the incretin hormone glucagon-like peptide 1 and the transcription of the proglucagon gene—PubMed*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9648826/>
- Couvreur, O. (2011). *Le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique: Impact de l'environnement maternel et implication du CNTF*. 216.
- Covasa, M., Stephens, R. W., Todorean, R., & Cobuz, C. (2019). Intestinal Sensing by Gut Microbiota: Targeting Gut Peptides. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 82. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00082>

- Cowley, M. A., Smith, R. G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K. L., Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., & Heiman, M. L. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, 37(4), 649-661.
- Cox, H. M., & Tough, I. R. (2002). Neuropeptide Y, Y₁, Y₂ and Y₄ receptors mediate Y agonist responses in isolated human colon mucosa : Neuropeptide Y receptors in human colon. *British Journal of Pharmacology*, 135(6), 1505-1512. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704604>
- Creamer, L. K., Parry, D. A. D., & Malcolm, G. N. (1983). Secondary structure of bovine β -lactoglobulin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227(1), 98-105. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90351-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90351-X)
- Cudennec, B., Fouchereau-Peron, M., Ferry, F., Duclos, E., & Ravallec, R. (2012a). In vitro and in vivo evidence for a satiating effect of fish protein hydrolysate obtained from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.003>
- Cudennec, B., Fouchereau-Peron, M., Ferry, F., Duclos, E., & Ravallec, R. (2012b). In vitro and in vivo evidence for a satiating effect of fish protein hydrolysate obtained from blue whiting (*Micromesistius poutassou*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 271-277. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.003>
- Cudennec, B., Ravallec-Plé, R., Courois, E., & Fouchereau-Peron, M. (2008). Peptides from fish and crustacean by-products hydrolysates stimulate cholecystokinin release in STC-1 cells. *Food Chemistry*, 111(4), 970-975. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.016>
- Cui-Feng Zhu. (2010). *Treatment with marine collagen peptides modulates glucose and lipid metabolism in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus*. <https://cdnscepub.com/doi/abs/10.1139/h10-075>
- Cummings, D. E., & Overduin, J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 13-23. <https://doi.org/10.1172/JCI30227>
- Dagorn-Scaviner, C., Gueguen, J., & Lefebvre, J. (1986). A comparison of interfacial behaviours of pea (*Pisum sativum* L.) legumin and vicilin at air/water interface. *Food / Nahrung*, 30(3-4), 337-347. <https://doi.org/10.1002/food.19860300332>
- Dale, H. F., Jensen, C., Hausken, T., Lied, E., Hatlebakk, J. G., Brønstad, I., Lihaug Hoff, D. A., & Lied, G. A. (2018). Effect of a cod protein hydrolysate on postprandial glucose metabolism in healthy subjects: A double-blind cross-over trial. *Journal of Nutritional Science*, 7, e33. <https://doi.org/10.1017/jns.2018.23>
- Dalle, S., Burcelin, R., & Gourdy, P. (2013). Specific actions of GLP-1 receptor agonists and DPP4 inhibitors for the treatment of pancreatic β -cell impairments in type 2 diabetes. *Cellular Signalling*, 25(2), 570-579. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.11.009>
- Daly, K., Al-Rammahi, M., Moran, A., Marcello, M., Ninomiya, Y., & Shirazi-Beechey, S. P. (2013). Sensing of amino acids by the gut-expressed taste receptor T1R1-T1R3 stimulates CCK secretion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 304(3), G271-G282. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00074.2012>

- Dalziel, J. E., Young, W., McKenzie, C. M., Haggarty, N. W., & Roy, N. C. (2017). Gastric Emptying and Gastrointestinal Transit Compared among Native and Hydrolyzed Whey and Casein Milk Proteins in an Aged Rat Model. *Nutrients*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/nu9121351>
- Daniel, H., & Zietek, T. (2015). Taste and move : Glucose and peptide transporters in the gastrointestinal tract: Taste and move: glucose and peptide transporters in the intestine. *Experimental Physiology*, 100(12), 1441-1450. <https://doi.org/10.1113/EP085029>
- Darling, N. J., Mobbs, C. L., González-Hau, A. L., Freer, M., & Przyborski, S. (2020). Bioengineering Novel in vitro Co-culture Models That Represent the Human Intestinal Mucosa With Improved Caco-2 Structure and Barrier Function. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 992. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00992>
- Date, Y., Murakami, N., Toshinai, K., Matsukura, S., Nijima, A., Matsuo, H., Kangawa, K., & Nakazato, M. (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, 123(4), 1120-1128. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.35954>
- De Vriese, C., Gregoire, F., Lema-Kisoka, R., Waelbroeck, M., Robberecht, P., & Delporte, C. (2004). Ghrelin degradation by serum and tissue homogenates : Identification of the cleavage sites. *Endocrinology*, 145(11), 4997-5005.
- Deacon, C. F. (2011). Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes : A comparative review. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 13(1), 7-18. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01306.x>
- de Castro, J. M., Paullin, S. K., & DeLugas, G. M. (1978). Insulin and glucagon as determinants of body weight set point and microregulation in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(3), 571-579. <https://doi.org/10.1037/h0077485>
- de Jong, A., Strubbe, J. H., & Steffens, A. B. (1977). Hypothalamic influence on insulin and glucagon release in the rat. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 233(5), E380. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1977.233.5.E380>
- Delgado, C. L. (2003a). Rising consumption of meat and milk in developing countries has created a new food revolution. *The Journal of Nutrition*, 133(11 Suppl 2), 3907S-3910S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.11.3907S>
- Delgado, C. L. (2003b). Rising Consumption of Meat and Milk in Developing Countries Has Created a New Food Revolution. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 3907S-3910S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.11.3907S>
- Delzenne, N. M., Knudsen, C., Beaumont, M., Rodriguez, J., Neyrinck, A. M., & Bindels, L. B. (2019). Contribution of the gut microbiota to the regulation of host metabolism and energy balance : A focus on the gut-liver axis. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 1.
- Desai, A. S., Brennan, M. A., Guo, X., Zeng, X.-A., & Brennan, C. S. (2019). Fish Protein and Lipid Interactions on the Digestibility and Bioavailability of Starch and Protein from Durum Wheat Pasta. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/molecules24050839>
- Development Initiatives. (2018). *Global Nutrition Report : Shining a Light to Spur Action Nutrition*. Development Initiatives. <https://globalnutritionreport.org/reports/global-nutrition-report-2018/>

- Diallo, A., Deschasaux, M., Latino-Martel, P., Hercberg, S., Galan, P., Fassier, P., Allès, B., Guéraud, F., Pierre, F. H., & Touvier, M. (2018). Red and processed meat intake and cancer risk : Results from the prospective NutriNet-Santé cohort study: Red and processed meat intake and cancer risk. *International Journal of Cancer*, *142*(2), 230-237. <https://doi.org/10.1002/ijc.31046>
- Diepvens, K., Häberer, D., & Westerterp-Plantenga, M. (2008). Different proteins and biopeptides differently affect satiety and anorexigenic/orexigenic hormones in healthy humans. *International Journal of Obesity*, *32*(3), 510-518. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803758>
- Díez-Sampedro, A., Hirayama, B. A., Osswald, C., Gorboulev, V., Baumgarten, K., Volk, C., Wright, E. M., & Koepsell, H. (2003). A glucose sensor hiding in a family of transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(20), 11753-11758. <https://doi.org/10.1073/pnas.1733027100>
- Domenger, D., Caron, J., Belguesmia, Y., Lesage, J., Dhulster, P., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2017a). Bioactivities of hemorphins released from bovine haemoglobin gastrointestinal digestion : Dual effects on intestinal hormones and DPP-IV regulations. *Journal of Functional Foods*, *36*, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.047>
- Domenger, D., Caron, J., Belguesmia, Y., Lesage, J., Dhulster, P., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2017b). Bioactivities of hemorphins released from bovine haemoglobin gastrointestinal digestion : Dual effects on intestinal hormones and DPP-IV regulations. *Journal of Functional Foods*, *36*, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.047>
- Domingo, J. L., & Nadal, M. (2017). Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat : A review of scientific news since the IARC decision. *Food and Chemical Toxicology*, *105*, 256-261. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.028>
- Dong, M., Liu, G., Pinon, D. I., & Miller, L. J. (2005). Differential Docking of High-Affinity Peptide Ligands to Type A and B Cholecystokinin Receptors Demonstrated by Photoaffinity Labeling. *Biochemistry*, *44*(17), 6693-6700. <https://doi.org/10.1021/bi050130q>
- Dramane, G., Ahyi, V., & Akpona, S. (2017). L'obésité dans les pays en développement : Causes et implications au Bénin. *Médecine des Maladies Métaboliques*, *11*(7), 657-663. [https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(17\)30158-X](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(17)30158-X)
- Dranse, H. J., Waise, T. M. Z., Hamr, S. C., Bauer, P. V., Abraham, M. A., Rasmussen, B. A., & Lam, T. K. T. (2018). Physiological and therapeutic regulation of glucose homeostasis by upper small intestinal PepT1-mediated protein sensing. *Nature Communications*, *9*(1), 1118. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03490-8>
- Dressman, J. B., Bass, P., Ritschel, W. A., Friend, D. R., Rubinstein, A., & Ziv, E. (1993). Gastrointestinal Parameters That Influence Oral Medications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *82*(9), 857-872. <https://doi.org/10.1002/jps.2600820902>
- Drucker, D. J. (2018). Mechanisms of Action and Therapeutic Application of Glucagon-like Peptide-1. *Cell Metabolism*, *27*(4), 740-756. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.001>
- Drummond, E., Flynn, S., Whelan, H., Nongonierma, A. B., Holton, T. A., Robinson, A., Egan, T., Cagney, G., Shields, D. C., Gibney, E. R., Newsholme, P., Gaudel, C., Jacquier, J.-C., Noronha, N., FitzGerald, R. J., & Brennan, L. (2018). Casein Hydrolysate with Glycemic Control Properties : Evidence from Cells, Animal Models, and Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(17), 4352-4363. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05550>

- D'Souza, R., Pandeya, D. R., Rahman, M., Seo Lee, H., Jung, J.-K., & Hong, S.-T. (2012). Genetic engineering of *Lactococcus lactis* to produce an amylase inhibitor for development of an anti-diabetes bioproduct. *The New Microbiologica*, 35(1), 35-42.
- Du, X., Wei, J., Luo, X., Liu, Z., Qian, Y., Zhu, B., Weng, Q., & Tang, H. (2020). Low-molecular-weight glutenin subunit LMW-N13 improves dough quality of transgenic wheat. *Food Chemistry*, 327, 127048. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127048>
- Due, A., Toubro, S., Skov, A. R., & Astrup, A. (2004). Effect of normal-fat diets, either medium or high in protein, on body weight in overweight subjects : A randomised 1-year trial. *International Journal of Obesity*, 28(10), 1283-1290. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802767>
- Dugardin, C., Cudennec, B., Tourret, M., Caron, J., Guérin-Deremaux, L., Behra-Miellet, J., Lefranc-Millot, C., & Ravallec, R. (2020). Explorative Screening of Bioactivities Generated by Plant-Based Proteins after In Vitro Static Gastrointestinal Digestion. *Nutrients*, 12(12), 3746. <https://doi.org/10.3390/nu12123746>
- Dugardin, C., Fleury, L., Touche, V., Ahdach, F., Lesage, J., Tenenbaum, M., Everaert, N., Briand, O., Lestavel, S., Ravallec, R., & Cudennec, B. (2022). An Exploratory Study of the Role of Dietary Proteins in the Regulation of Intestinal Glucose Absorption. *Frontiers in Nutrition*, 8, 769773. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.769773>
- Dulloo, A. G., Stock, M. J., Solinas, G., Boss, O., Montani, J.-P., & Seydoux, J. (2002). Leptin directly stimulates thermogenesis in skeletal muscle. *FEBS Letters*, 515(1-3), 109-113. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02449-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02449-3)
- Eissele, R., Göke, R., Willemer, S., Harthus, H. P., Vermeer, H., Arnold, R., & Göke, B. (1992). Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European Journal of Clinical Investigation*, 22(4), 283-291. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1992.tb01464.x>
- El-Salhy, M., Hatlebakk, J. G., & Hausken, T. (2020). Possible role of peptide YY (PYY) in the pathophysiology of irritable bowel syndrome (IBS). *Neuropeptides*, 79, 101973. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101973>
- El-Salhy, M., Mazzawi, T., Hausken, T., & Hatlebakk, J. G. (2016). Interaction between diet and gastrointestinal endocrine cells. *Biomedical Reports*, 4(6), 651-656. <https://doi.org/10.3892/br.2016.649>
- Engel, M., Hoffmann, T., Manhart, S., Heiser, U., Chambre, S., Huber, R., Demuth, H.-U., & Bode, W. (2006). Rigidity and Flexibility of Dipeptidyl Peptidase IV : Crystal Structures of and Docking Experiments with DPIV. *Journal of Molecular Biology*, 355(4), 768-783. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.014>
- Esteller, A. (2008). Physiology of bile secretion. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 14(37), 5641-5649. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.5641>
- Evaristus, N. A., Wan Abdullah, W. N., & Gan, C.-Y. (2018). Extraction and identification of α -amylase inhibitor peptides from *Nephelium lappacheum* and *Nephelium mutabile* seed protein using gastro-digestive enzymes. *Peptides*, 102, 61-67. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.03.001>
- Everard, A., & Cani, P. D. (2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.007>

- FAO. (s. d.). *Assistance Towards Feed Analysis. Increasing incomes, improving food safety and safeguarding the environment*. 8.
- FAO, FIDA, OMS, PAM, & UNICEF. (2018). *L'État de la sécurité alimentaire et de la nutrition dans le monde 2018 : Renforcer la résilience face aux changements climatiques pour la sécurité alimentaire et la nutrition*. Food & Agriculture Org.
- FAO, International Fund for Agricultural Development, UNICEF, World Food Programme, & World Health Organization. (2017). *The state of food security and nutrition in the world 2017 : Building resilience for peace and food security*. https://docs.wfp.org/api/documents/WFP-0000022419/download/?_ga=2.66376046.1370852863.1505482365-1879253830.1499355505
- Fermi, G., Perutz, M. F., Shaanan, B., & Fourme, R. (1984). The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 175(2), 159-174. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90472-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90472-8)
- Ferraro, V., Cruz, I. B., Jorge, R. F., Malcata, F. X., Pintado, M. E., & Castro, P. M. L. (2010). Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products : A review. *Food Research International*, 43(9), 2221-2233. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.034>
- Flint, A., Raben, A., Astrup, A., & Holst, J. J. (1998). Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(3), 515-520. <https://doi.org/10.1172/JCI990>
- Flores, Á., Maldonado, R., & Berrendero, F. (2013). Cannabinoid-hypocretin cross-talk in the central nervous system : What we know so far. *Frontiers in Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00256>
- Foltz, M., Ansems, P., Schwarz, J., Tasker, M. C., Lourbakos, A., & Gerhardt, C. C. (2008). Protein Hydrolysates Induce CCK Release from Enteroendocrine Cells and Act as Partial Agonists of the CCK₁ Receptor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 837-843. <https://doi.org/10.1021/jf072611h>
- Fox, C. S., Golden, S. H., Anderson, C., Bray, G. A., Burke, L. E., de Boer, I. H., Deedwania, P., Eckel, R. H., Ershow, A. G., Fradkin, J., Inzucchi, S. E., Kosiborod, M., Nelson, R. G., Patel, M. J., Pignone, M., Quinn, L., Schauer, P. R., Selvin, E., & Vafiadis, D. K. (2015). Update on Prevention of Cardiovascular Disease in Adults With Type 2 Diabetes Mellitus in Light of Recent Evidence : A Scientific Statement From the American Heart Association and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 38(9), 1777-1803. <https://doi.org/10.2337/dci15-0012>
- Fox, P. F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P. L. H., & O'Mahony, J. A. (2015). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Springer.
- Fresan, U., & Sabaté, J. (2019). Vegetarian Diets : Planetary Health and Its Alignment with Human Health. *Advances in Nutrition*, 10(Issue supplement), S380-S388. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz019>
- Fromentin, G., Darcel, N., Chaumontet, C., Marsset-Baglieri, A., Nadkarni, N., & Tomé, D. (2012). Peripheral and central mechanisms involved in the control of food intake by dietary amino acids and proteins. *Nutrition Research Reviews*, 25(1), 29-39. <https://doi.org/10.1017/S0954422411000175>

- Fujiwara, K., Gotoh, K., Chiba, S., Masaki, T., Katsuragi, I., Kakuma, T., & Yoshimatsu, H. (2012). Intraportal administration of DPP-IV inhibitor regulates insulin secretion and food intake mediated by the hepatic vagal afferent nerve in rats. *Journal of Neurochemistry*, *121*(1), 66-76. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07563.x>
- Gannon, M. C., Nuttall, F. Q., Saeed, A., Jordan, K., & Hoover, H. (2003). An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *78*(4), 734-741. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.4.734>
- Gaudichon, C., Bos, C., Morens, C., Petzke, K. J., Mariotti, F., Everwand, J., Benamouzig, R., Daré, S., Tomé, D., & Metges, C. C. (2002). Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology*, *123*(1), 50-59. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.34233>
- Gausserès, N., Mahé, S., Benamouzig, R., Luengo, C., Ferriere, F., Rautureau, J., & Tomé, D. (1997). [15N]-labeled pea flour protein nitrogen exhibits good ileal digestibility and postprandial retention in humans. *The Journal of Nutrition*, *127*(6), 1160-1165. <https://doi.org/10.1093/jn/127.6.1160>
- Geary, N. (1990). Pancreatic glucagon signals postprandial satiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *14*(3), 323-338. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80042-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80042-9)
- Geary, N. (1996). Glucagon and the Control of Appetite. In P. J. Lefèbvre (Éd.), *Glucagon III* (p. 223-238). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-61150-6_14
- Geary, N., & Asarian, L. (2001). Estradiol increases glucagon's satiating potency in ovariectomized rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *281*(4), R1290-R1294. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.4.R1290>
- Geary, N., Le Sauter, J., & Noh, U. (1993). Glucagon acts in the liver to control spontaneous meal size in rats. *The American Journal of Physiology*, *264*(1 Pt 2), R116-122. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1993.264.1.R116>
- Gebhardt, R., Doster, W., Friedrich, J., & Kulozik, U. (2006). Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM. *European Biophysics Journal*, *35*(6), 503-509. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0058-6>
- Geliebter, A. A. (1979). Effects of equicaloric loads of protein, fat, and carbohydrate on food intake in the rat and man. *Physiology & Behavior*, *22*(2), 267-273. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(79\)90086-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(79)90086-6)
- Geraedts, M. C. P., Troost, F. J., Fischer, M. A. J. G., Edens, L., & Saris, W. H. M. (2011a). Direct induction of CCK and GLP-1 release from murine endocrine cells by intact dietary proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(3), 476-484. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000142>
- Geraedts, M. C. P., Troost, F. J., Fischer, M. A. J. G., Edens, L., & Saris, W. H. M. (2011b). Direct induction of CCK and GLP-1 release from murine endocrine cells by intact dietary proteins. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(3), 476-484. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000142>
- Geraedts, M. C. P., Troost, F. J., Tinnemans, R., Söderholm, J. D., Brummer, R.-J., & Saris, W. H. M. (2010). Release of satiety hormones in response to specific dietary proteins is different between

- human and murine small intestinal mucosa. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 56(4), 308-313. <https://doi.org/10.1159/000312664>
- Gerspach, A. C., Steinert, R. E., Schönenberger, L., Graber-Maier, A., & Beglinger, C. (2011). The role of the gut sweet taste receptor in regulating GLP-1, PYY, and CCK release in humans. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 301(2), E317-325. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00077.2011>
- Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S. A., Morris, D. G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S., Carpenter, R., Grossman, A. B., & Korbonits, M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, 87(6), 2988-2991.
- Godfray, H. C. J., Aveyard, P., Garnett, T., Hall, J. W., Key, T. J., Lorimer, J., Pierrehumbert, R. T., Scarborough, P., Springmann, M., & Jebb, S. A. (2018). Meat consumption, health, and the environment. *Science*, 361(6399), eaam5324. <https://doi.org/10.1126/science.aam5324>
- Goesaert, H., Brijs, K., Veraverbeke, W. S., Courtin, C. M., Gebruers, K., & Delcour, J. A. (s. d.). Wheat flour constituents : How they impact bread quality, and how to impact their functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 12-30.
- Goodman, B. E. (2010). Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in Physiology Education*, 34(2), 44-53. <https://doi.org/10.1152/advan.00094.2009>
- Goyal, R. K., Guo, Y., & Mashimo, H. (2019). Advances in the physiology of gastric emptying. *Neurogastroenterology & Motility*, 31(4), e13546. <https://doi.org/10.1111/nmo.13546>
- Grala, W., Verstegen, M. W. A., Jansman, A. J. M., Huisman, J., & Leeuwen, P. van. (1999). Apparent protein digestibility and recovery of endogenous nitrogen at the terminal ileum of pigs fed diets containing various soyabean products, peas and rapeseed hulls. *Animal Feed Science and Technology*, 80, 231-245. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00058-9)
- Grau-Bové, C., Miguéns-Gómez, A., González-Quilen, C., Fernández-López, J.-A., Remesar, X., Torres-Fuentes, C., Ávila-Román, J., Rodríguez-Gallego, E., Beltrán-Debón, R., Blay, M. T., Terra, X., Ardévol, A., & Pinet, M. (2020). Modulation of Food Intake by Differential TAS2R Stimulation in Rat. *Nutrients*, 12(12), 3784. <https://doi.org/10.3390/nu12123784>
- Gray, S., Page, L., & Tong, J. (2019). Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Journal of Neuroendocrinology*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jne.12705>
- Greeley, G. H., JR., Hashimoto, T., Izukura, M., Gomez, G., JENG, J., Hill, F., Lluís, F., & Thompson, J. (1989). A Comparison of Intraduodenally and Intracolonicly Administered Nutrients on the Release of Peptide-YY in the Dog*. *Endocrinology*, 125(4), 1761-1765. <https://doi.org/10.1210/endo-125-4-1761>
- Grill, H. J. (2006). Distributed neural control of energy balance : Contributions from hindbrain and hypothalamus. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 14 Suppl 5, 216S-221S. <https://doi.org/10.1038/oby.2006.312>
- Guan, X.-M., Yu, H., Palyha, O. C., McKee, K. K., Feighner, S. D., Sirinathsinghji, D. J., Smith, R. G., Van der Ploeg, L. H., & Howard, A. D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Molecular brain research*, 48(1), 23-29.

- Gudipati, V. (2013). Marine Peptides : Bioactivities and Applications—PMC. In *Marine Proteins and Peptides : Biological Activities and Applications* (p. 271-295). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4515606/>
- Guerville, M. (2017). *Axe intestin-cerveau et régulation de la satiété chez l'obèse : Étude de l'origine de l'endotoxémie métabolique et de son rôle sur la physiologie du nerf vague dans un modèle d'obésité induite par un régime occidental chez le rat*. 2017, 386.
- Guillin, F. M., Gaudichon, C., Guérin-Deremaux, L., Lefranc-Millot, C., Airinei, G., Khodorova, N., Benamouzig, R., Pomport, P.-H., Martin, J., & Calvez, J. (2022). Real ileal amino acid digestibility of pea protein compared to casein in healthy humans : A randomized trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *115*(2), 353-363. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab354>
- Gunnerud, U. J., Östman, E. M., & Björck, I. M. E. (2013). Effects of whey proteins on glycaemia and insulinaemia to an oral glucose load in healthy adults; a dose–response study. *European Journal of Clinical Nutrition*, *67*(7), 749-753. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.88>
- Gupta, V., & Kalra, S. (2011). Choosing a Gliptin. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, *15*(4), 298-308. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.85583>
- Hajishafiee, M., Bitarafan, V., & Feinle-Bisset, C. (2019). Gastrointestinal Sensing of Meal-Related Signals in Humans, and Dysregulations in Eating-Related Disorders. *Nutrients*, *11*(6), 1298. <https://doi.org/10.3390/nu11061298>
- Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J., & Morgan, L. M. (2003a). Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition*, *89*(2), 239-248. <https://doi.org/10.1079/BJN2002760>
- Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J., & Morgan, L. M. (2003b). Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition*, *89*(2), 239-248. <https://doi.org/10.1079/BJN2002760>
- Hall, W. L., Millward, D. J., Long, S. J., & Morgan, L. M. (2003c). Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *The British Journal of Nutrition*, *89*(2), 239-248. <https://doi.org/10.1079/BJN2002760>
- Halton, T. L., & Hu, F. B. (2004). The Effects of High Protein Diets on Thermogenesis, Satiety and Weight Loss : A Critical Review. *Journal of the American College of Nutrition*, *23*(5), 373-385. <https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719381>
- Harnedy-Rothwell, P. A., McLaughlin, C. M., O’Keeffe, M. B., Le Gouic, A. V., Allsopp, P. J., McSorley, E. M., Sharkey, S., Whooley, J., McGovern, B., O’Harte, F. P. M., & FitzGerald, R. J. (2020). Identification and characterisation of peptides from a boarfish (*Capros aper*) protein hydrolysate displaying in vitro dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitory and insulinotropic activity. *Food Research International*, *131*, 108989. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108989>
- Harris, R. B. S. (2014). Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1842*(3), 414-423. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.009>
- HAS (Éd.). (2007). *Stratégie de prise en charge en cas de dénutrition protéino-énergétique chez la personne âgée*. HAS.

- Havel, P. J. (2001). Peripheral Signals Conveying Metabolic Information to the Brain : Short-Term and Long-Term Regulation of Food Intake and Energy Homeostasis. *Experimental Biology and Medicine*, 226(11), 963-977. <https://doi.org/10.1177/153537020122601102>
- He, F. (2011). Laemmli-SDS-PAGE. *Bio-protocol*, e80-e80. <https://bio-protocol.org/bio101/e80>
- He, W., Xu, H., Lu, Y., Zhang, T., Li, S., Lin, X., Xu, B., & Wu, X. (2019). Function, digestibility and allergenicity assessment of ovalbumin–EGCG conjugates. *Journal of Functional Foods*, 61, 103490. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103490>
- Heffernan, S., Nunn, L., Harnedy-Rothwell, P. A., Gite, S., Whooley, J., Giblin, L., FitzGerald, R. J., & O'Brien, N. M. (2022). Blue Whiting (*Micromesistius poutassou*) Protein Hydrolysates Increase GLP-1 Secretion and Proglucagon Production in STC-1 Cells Whilst Maintaining Caco-2/HT29-MTX Co-Culture Integrity. *Marine Drugs*, 20(2), 112. <https://doi.org/10.3390/md20020112>
- Henchion, M., Hayes, M., Mullen, A. M., Fenelon, M., & Tiwari, B. (2017). Future Protein Supply and Demand : Strategies and Factors Influencing a Sustainable Equilibrium. *Foods*, 6(7), 53. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Hill, A. J., & Blundell, J. E. (1986). Macronutrients and satiety : The effects of a high-protein or high-carbohydrate meal on subjective motivation to eat and food preferences. *Nutrition and Behavior (USA)*, 3(2), 133-144.
- Hira, T., Maekawa, T., Asano, K., & Hara, H. (2009). Cholecystokinin secretion induced by β -conglycinin peptone depends on Gαq-mediated pathways in enteroendocrine cells. *European Journal of Nutrition*, 48(2), 124-127. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-0764-1>
- HLPE. (2017). *Nutrition and food systems* (N° 12; p. 152). HLPE. <http://www.fao.org/3/a-i7846e.pdf>
- Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J. S., Williams, L. M., Trayhurn, P., & Mercer, J. G. (1997). Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 11073-11078. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.11073>
- Holst, J. J., Albrechtsen, N. J. W., Gabe, M. B. N., & Rosenkilde, M. M. (2018). Oxyntomodulin : Actions and role in diabetes. *Peptides*, 100, 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.09.018>
- Holst, J. J., Schwartz, T. W., Lovgreen, N. A., Pedersen, O., & Beck-Nielsen, H. (1983). Diurnal profile of pancreatic polypeptide, pancreatic glucagon, gut glucagon and insulin in human morbid obesity. *International Journal of Obesity*, 7(6), 529-538.
- Hoppe, C., Mølgaard, C., Dalum, C., Vaag, A., & Michaelsen, K. F. (2009). Differential effects of casein versus whey on fasting plasma levels of insulin, IGF-1 and IGF-1/IGFBP-3 : Results from a randomized 7-day supplementation study in prepubertal boys. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(9), 1076-1083. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2009.34>
- Hoque, M., Akash, Mondal, S., & Adusumilli, S. (2022). Chapter Eighteen—Way forward for sustainable livestock sector. In S. Mondal & R. L. Singh (Éds.), *Emerging Issues in Climate Smart Livestock Production* (p. 473-488). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822265-2.00016-8>

- Hou, Y., & Wu, G. (2018). Nutritionally Essential Amino Acids. *Advances in Nutrition*, 9(6), 849-851. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy054>
- Hu, Y., Smith, D. E., Ma, K., Jappar, D., Thomas, W., & Hillgren, K. M. (2008). Targeted disruption of peptide transporter Pept1 gene in mice significantly reduces dipeptide absorption in intestine. *Molecular pharmaceutics*, 5(6), 1122-1130.
- Huang, S.-L., Hung, C.-C., Jao, C.-L., Tung, Y.-S., & Hsu, K.-C. (2014). Porcine skin gelatin hydrolysate as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 11, 235-242. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.09.010>
- Huo, Y., Xv, R., Ma, H., Zhou, J., Xi, X., Wu, Q., Duan, J., Zhou, M., & Chen, T. (2018). Identification of <10 KD peptides in the water extraction of Venenum Bufonis from Bufo gargarizans using Nano LC-MS/MS and De novo sequencing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 157, 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.05.027>
- Hussain, S. S., & Bloom, S. R. (2013). The regulation of food intake by the gut-brain axis : Implications for obesity. *International Journal of Obesity (2005)*, 37(5), 625-633. <https://doi.org/10.1038/ijo.2012.93>
- IDF. (2021). *IDF Diabetes Atlas 2021, 10e edition*. Atlas. <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>
- INPES. (2006). *Guide nutrition à partir de 55ans pour les aidants des personnes âgées*.
- INSERM. (2019). *Diabète de type 2 · Inserm, La science pour la santé*. Inserm. <https://www.inserm.fr/dossier/diabete-type-2/>
- International Diabete Federation. (2021). *Diabetes Atlas | Tenth Edition*. <https://diabetesatlas.org/>
- Ishikawa, Y., Hira, T., Inoue, D., Harada, Y., Hashimoto, H., Fujii, M., Kadowaki, M., & Hara, H. (2015a). Rice protein hydrolysates stimulate GLP-1 secretion, reduce GLP-1 degradation, and lower the glycemic response in rats. *Food & Function*, 6(8), 2525-2534. <https://doi.org/10.1039/C4FO01054J>
- Ishikawa, Y., Hira, T., Inoue, D., Harada, Y., Hashimoto, H., Fujii, M., Kadowaki, M., & Hara, H. (2015b). Rice protein hydrolysates stimulate GLP-1 secretion, reduce GLP-1 degradation, and lower the glycemic response in rats. *Food & Function*, 6(8), 2525-2534. <https://doi.org/10.1039/C4FO01054J>
- Ivy & Oldberg. (1928). *A HORMONE MECHANISM FOR GALL-BLADDER TION AND EVACUATION*. 15.
- Jackson, S. E., Llewellyn, C. H., & Smith, L. (2020). The obesity epidemic – Nature via nurture : A narrative review of high-income countries. *SAGE Open Medicine*, 8, 2050312120918265. <https://doi.org/10.1177/2050312120918265>
- Jahan-Mihan, A., Luhovyy, B. L., El Khoury, D., & Anderson, G. H. (2011). Dietary Proteins as Determinants of Metabolic and Physiologic Functions of the Gastrointestinal Tract. *Nutrients*, 3(5), 574-603. <https://doi.org/10.3390/nu3050574>
- Janssen, S., & Depoortere, I. (2013). Nutrient sensing in the gut : New roads to therapeutics? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 24(2), 92-100. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.11.006>
- Jin, R., Teng, X., Shang, J., Wang, D., & Liu, N. (2020). Identification of novel DPP-IV inhibitory peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Food Research International*, 133, 109161.

- Johnsen, A. H. (1998). Phylogeny of the Cholecystokinin/Gastrin Family. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 19(2), 73-99. <https://doi.org/10.1006/frne.1997.0163>
- Johnston, A. J., Mollard, R. C., Dandeneau, D., MacKay, D. S., Ames, N., Curran, J., Bouchard, D. R., & Jones, P. J. (2021). Acute effects of extruded pea fractions on glycemic response, insulin, appetite, and food intake in healthy young adults, results of a double-blind, randomized crossover trial. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 46(9), 1126-1132. <https://doi.org/10.1139/apnm-2020-0571>
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2006). Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: Chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloids*, 20(8), 1216-1222. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.01.006>
- Kalra, S. P., Ueno, N., & Kalra, P. S. (2005). Stimulation of appetite by ghrelin is regulated by leptin restraint: Peripheral and central sites of action. *The Journal of nutrition*, 135(5), 1331-1335.
- Kamvissi-Lorenz, V., Raffaelli, M., Bornstein, S., & Mingrone, G. (2017). Role of the Gut on Glucose Homeostasis: Lesson Learned from Metabolic Surgery. *Current Atherosclerosis Reports*, 19(2), 9. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0642-5>
- Kaneko, K., Iwasaki, M., Yoshikawa, M., & Ohinata, K. (2010). Orally administered soymorphins, soy-derived opioid peptides, suppress feeding and intestinal transit via gut μ_1 -receptor coupled to 5-HT_{1A}, D₂, and GABA_B systems. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(3), G799-G805. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00081.2010>
- Kanoski, S. E., Hayes, M. R., & Skibicka, K. P. (2016). GLP-1 and weight loss: Unraveling the diverse neural circuitry. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(10), R885-R895. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00520.2015>
- Karim, A. A., & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: Properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.07.002>
- Karpe, F. (2011). Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. *Diabetes*, 60(10), 2441-2449. <https://doi.org/10.2337/db11-0425>
- Kashima, H., Uemoto, S., Eguchi, K., Endo, M. Y., Miura, A., Kobayashi, T., & Fukuba, Y. (2016). Effect of soy protein isolate preload on postprandial glycemic control in healthy humans. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 32(9), 965-969. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.02.014>
- Kashyap, S., Shivakumar, N., Varkey, A., Duraisamy, R., Thomas, T., Preston, T., Devi, S., & Kurpad, A. V. (2018). Ileal digestibility of intrinsically labeled hen's egg and meat protein determined with the dual stable isotope tracer method in Indian adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 108(5), 980-987. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy178>
- Kashyap, S., Varkey, A., Shivakumar, N., Devi, S., Reddy B H, R., Thomas, T., Preston, T., Sreeman, S., & Kurpad, A. V. (2019). True ileal digestibility of legumes determined by dual-isotope tracer method in Indian adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 110(4), 873-882. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz159>
- Kastin, A. J., Akerstrom, V., & Pan, W. (2002). Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 18(1-2), 7-14. <https://doi.org/10.1385/JMN:18:1-2:07>

- Kasuga, M. (2006). Insulin resistance and pancreatic cell failure. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(7), 1756-1760. <https://doi.org/10.1172/JCI29189>
- Kawano, H., Mineta, M., Asaka, M., Miyashita, M., Numao, S., Gando, Y., Ando, T., Sakamoto, S., & Higuchi, M. (2013). Effects of different modes of exercise on appetite and appetite-regulating hormones. *Appetite*, *66*, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2013.01.017>
- Kendig, D. M., & Grider, J. R. (2015). Serotonin and colonic motility. *Neurogastroenterology & Motility*, *27*(7), 899-905. <https://doi.org/10.1111/nmo.12617>
- Kieffer, T. J., Heller, R. S., Unson, C. G., Weir, G. C., & Habener, J. F. (1996). Distribution of glucagon receptors on hormone-specific endocrine cells of rat pancreatic islets. *Endocrinology*, *137*(11), 5119-5125. <https://doi.org/10.1210/endo.137.11.8895386>
- Kim, D.-Y., Heo, G., Kim, M., Kim, H., Jin, J. A., Kim, H.-K., Jung, S., An, M., Ahn, B. H., Park, J. H., Park, H.-E., Lee, M., Lee, J. W., Schwartz, G. J., & Kim, S.-Y. (2020). A neural circuit mechanism for mechanosensory feedback control of ingestion. *Nature*, *580*(7803), 376-380. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2167-2>
- Kim, J. S., Nam, K., & Chung, S.-J. (2019). Effect of nutrient composition in a mixed meal on the postprandial glycemic response in healthy people : A preliminary study. *Nutrition Research and Practice*, *13*(2), 126-133. <https://doi.org/10.4162/nrp.2019.13.2.126>
- Kim, K.-S., Seeley, R. J., & Sandoval, D. A. (2018). Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(4), 185-196. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.8>
- Kim, T., Nason, S., Holleman, C., Pepin, M., Wilson, L., Berryhill, T. F., Wende, A. R., Steele, C., Young, M. E., Barnes, S., Drucker, D. J., Finan, B., DiMarchi, R., Perez-Tilve, D., Tschöp, M., & Habegger, K. M. (2018). Glucagon Receptor Signaling Regulates Energy Metabolism via Hepatic Farnesoid X Receptor and Fibroblast Growth Factor 21. *Diabetes*, *67*(9), 1773-1782. <https://doi.org/10.2337/db17-1502>
- Kjaergaard, M., Salinas, C. B. G., Rehfeld, J. F., Secher, A., Raun, K., & Wulff, B. S. (2019). PYY(3-36) and exendin-4 reduce food intake and activate neuronal circuits in a synergistic manner in mice. *Neuropeptides*, *73*, 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2018.11.004>
- Koehnle, T. J., Russell, M. C., & Gietzen, D. W. (2003). Rats Rapidly Reject Diets Deficient in Essential Amino Acids. *The Journal of Nutrition*, *133*(7), 2331-2335. <https://doi.org/10.1093/jn/133.7.2331>
- Koepsell, H. (2020). Glucose transporters in the small intestine in health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *472*(9), 1207-1248. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02439-5>
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, *402*(6762), 656-660.
- Kojima, S., Tohei, A., Ikeda, M., & Anzai, N. (2015). An Endogenous Tachykinergic NK2/NK3 Receptor Cascade System Controlling the Release of Serotonin from Colonic Mucosa. *Current Neuropharmacology*, *13*(6), 830-835.

- Koliaki, C., Kokkinos, A., Tentolouris, N., & Katsilambros, N. (2010). The Effect of Ingested Macronutrients on Postprandial Ghrelin Response: A Critical Review of Existing Literature Data. *International Journal of Peptides*, 2010, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2010/710852>
- Komatsu, Y., Wada, Y., Izumi, H., Shimizu, T., Takeda, Y., Hira, T., & Hara, H. (2019). Casein materials show different digestion patterns using an in vitro gastrointestinal model and different release of glucagon-like peptide-1 by enteroendocrine GLUTag cells. *Food Chemistry*, 277, 423-431. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.123>
- Kopf-Bolan, K. A., Schwander, F., Gijs, M., Vergères, G., Portmann, R., & Egger, L. (2014). Impact of milk processing on the generation of peptides during digestion. *International Dairy Journal*, 35(2), 130-138. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.012>
- Kuhre, R. E., Christiansen, C. B., Saltiel, M. Y., Wewer Albrechtsen, N. J., & Holst, J. J. (2017). On the relationship between glucose absorption and glucose-stimulated secretion of GLP-1, neurotensin, and PYY from different intestinal segments in the rat. *Physiological Reports*, 5(23). <https://doi.org/10.14814/phy2.13507>
- Kuhre, R. E., Frost, C. R., Svendsen, B., & Holst, J. J. (2015). Molecular Mechanisms of Glucose-Stimulated GLP-1 Secretion From Perfused Rat Small Intestine. *Diabetes*, 64(2), 370-382. <https://doi.org/10.2337/db14-0807>
- Kullmann, S., Heni, M., Hallschmid, M., Fritsche, A., Preissl, H., & Häring, H.-U. (2016). Brain insulin resistance at the crossroads of metabolic and cognitive disorders in humans. *Physiological reviews*, 96(4), 1169-1209.
- Kumar, U., & Singh, S. (2020). Role of Somatostatin in the Regulation of Central and Peripheral Factors of Satiety and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072568>
- Kung, B., Anderson, G. H., Paré, S., Tucker, A. J., Vien, S., Wright, A. J., & Goff, H. D. (2018). Effect of milk protein intake and casein-to-whey ratio in breakfast meals on postprandial glucose, satiety ratings, and subsequent meal intake. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 8688-8701. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14419>
- Kunitz, M. (1939). FORMATION OF TRYPSIN FROM CRYSTALLINE TRYPSINOGEN BY MEANS OF ENTEROKINASE. *The Journal of General Physiology*, 22(4), 429-446. <https://doi.org/10.1085/jgp.22.4.429>
- Lacroix, I. M., & Li-Chan, E. C. (2012). Dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity of dairy protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 25(2), 97-102.
- Laeger, T., Reed, S. D., Henagan, T. M., Fernandez, D. H., Taghavi, M., Addington, A., Münzberg, H., Martin, R. J., Hutson, S. M., & Morrison, C. D. (2014). Leucine acts in the brain to suppress food intake but does not function as a physiological signal of low dietary protein. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 307(3), R310-320. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00116.2014>
- Lafferty, R. A., Flatt, P. R., & Irwin, N. (2018a). Emerging therapeutic potential for peptide YY for obesity-diabetes. *Peptides*, 100, 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.11.005>
- Lafferty, R. A., Flatt, P. R., & Irwin, N. (2018b). C-terminal degradation of PYY peptides in plasma abolishes effects on satiety and beta-cell function. *Biochemical Pharmacology*, 158, 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.10.004>

- Lambeir, A.-M., Durinx, C., Scharpé, S., & Meester, I. D. (2003). Dipeptidyl-Peptidase IV from Bench to Bedside : An Update on Structural Properties, Functions, and Clinical Aspects of the Enzyme DPP IV. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 40(3), 209-294. <https://doi.org/10.1080/713609354>
- Lammi, C., Bollati, C., Ferruzza, S., Ranaldi, G., Sambuy, Y., & Arnoldi, A. (2018). Soybean-and lupin-derived peptides inhibit DPP-IV activity on in situ human intestinal Caco-2 cells and ex vivo human serum. *Nutrients*, 10(8), 1082.
- Landi, F., Calvani, R., Tosato, M., Martone, A., Ortolani, E., Saveria, G., D'Angelo, E., Sisto, A., & Marzetti, E. (2016). Protein Intake and Muscle Health in Old Age : From Biological Plausibility to Clinical Evidence. *Nutrients*, 8(5), 295. <https://doi.org/10.3390/nu8050295>
- Langhans, W., Pantel, K., Muller-Schell, W., Eggenberger, E., & Scharrer, E. (1984). Hepatic handling of pancreatic glucagon and glucose during meals in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 247(5), R827-R832. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1984.247.5.R827>
- Larsen, P. J., Tang-Christensen, M., Holst, J. J., & Ørskov, C. (1997). Distribution of glucagon-like peptide-1 and other preproglucagon-derived peptides in the rat hypothalamus and brainstem. *Neuroscience*, 77(1), 257-270. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(96\)00434-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(96)00434-4)
- Larsen, P. S., Donges, C. E., Guelfi, K. J., Smith, G. C., Adams, D. R., & Duffield, R. (2017). Effects of Aerobic, Strength or Combined Exercise on Perceived Appetite and Appetite-Related Hormones in Inactive Middle-Aged Men. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 27(5), 389-398. <https://doi.org/10.1123/ijnsnem.2017-0144>
- Lasztity, R. (1995). *The Chemistry of Cereal Proteins, Second Edition*. CRC Press.
- Lavigne, C., Marette, A., & Jacques, H. (2000). Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 278(3), E491-E500. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2000.278.3.E491>
- Lavine, J. A., Kibbe, C. R., Baan, M., Sirinvaravong, S., Umhoefer, H. M., Engler, K. A., Meske, L. M., Sacotte, K. A., Erhardt, D. P., & Davis, D. B. (2015). Cholecystokinin expression in the β -cell leads to increased β -cell area in aged mice and protects from streptozotocin-induced diabetes and apoptosis. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 309(10), E819-E828. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00159.2015>
- Layman, D. K., Boileau, R. A., Erickson, D. J., Painter, J. E., Shiue, H., Sather, C., & Christou, D. D. (2003). A Reduced Ratio of Dietary Carbohydrate to Protein Improves Body Composition and Blood Lipid Profiles during Weight Loss in Adult Women. *The Journal of Nutrition*, 133(2), 411-417. <https://doi.org/10.1093/jn/133.2.411>
- Lecerf, J.-M. (2008). Acides gras et maladies cardiovasculaires De l'épidémiologie à la pratique clinique. *CERIN*, 110. http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/sbssa/IMG/pdf/chole_doc_2008_-_AG_et_MCV.pdf
- Lecerf, J.-M., & Delzenne, N. (2021). *Microbiote intestinale et santé humaine*. Elsevier Health Sciences.
- Lecleire, S. (2008). Digestion et absorption des nutriments. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 43(1), 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0007-9960\(08\)70279-7](https://doi.org/10.1016/S0007-9960(08)70279-7)

- Lee, B., Moon, K. M., & Kim, C. Y. (2018). Tight Junction in the Intestinal Epithelium : Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *Journal of Immunology Research*, 2018, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/2645465>
- Lehmann, A., & Hornby, P. J. (2016). Intestinal SGLT1 in metabolic health and disease. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(11), G887-G898. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00068.2016>
- Leidy, H. J., Clifton, P. M., Astrup, A., Wycherley, T. P., Westerterp-Plantenga, M. S., Luscombe-Marsh, N. D., Woods, S. C., & Mattes, R. D. (2015). The role of protein in weight loss and maintenance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(6), 1320S-1329S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.084038>
- Li, Q., Zhang, L., & Lametsch, R. (2022). Current progress in kokumi-active peptides, evaluation and preparation methods : A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(5), 1230-1241. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1837726>
- Li, S., Ye, A., & Singh, H. (2021). Impacts of heat-induced changes on milk protein digestibility : A review. *International Dairy Journal*, 123, 105160. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105160>
- Li, Y., Fu, J., Shen, Q., & Yang, D. (2021). High-Molecular-Weight Glutenin Subunits : Genetics, Structures, and Relation to End Use Qualities. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 184. <https://doi.org/10.3390/ijms22010184>
- Lim, Y.-S., Ok, Y.-J., Hwang, S.-Y., Kwak, J.-Y., & Yoon, S. (2019). Marine Collagen as A Promising Biomaterial for Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 17(8), 467. <https://doi.org/10.3390/md17080467>
- Lin, L., Umahara, M., York, D. A., & Bray, G. A. (1998). β -Casomorphins Stimulate and Enterostatin Inhibits the Intake of Dietary Fat in Rats. *Peptides*, 19(2), 325-331. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(97\)00307-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(97)00307-0)
- Lin, R., Liu, W., Piao, M., & Zhu, H. (2017). A review of the relationship between the gut microbiota and amino acid metabolism. *Amino Acids*, 49(12), 2083-2090. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2493-3>
- Lin, Z., Long, H., Bo, Z., Wang, Y., & Wu, Y. (2008). New descriptors of amino acids and their application to peptide QSAR study. *Peptides*, 29(10), 1798-1805. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.06.004>
- Linnankoski, J., Mäkelä, J., Palmgren, J., Mauriala, T., Vedin, C., Ungell, A., Lazorova, L., Artursson, P., Urtti, A., & Yliperttula, M. (2010). Paracellular Porosity and Pore Size of the Human Intestinal Epithelium in Tissue and Cell Culture Models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(4), 2166-2175. <https://doi.org/10.1002/jps.21961>
- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and Gelatin. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 527-557. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>
- Liu, R., Cheng, J., & Wu, H. (2019). Discovery of Food-Derived Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitory Peptides : A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030463>

- Lovshin, J., & Drucker, D. (2000). Synthesis, secretion and biological actions of the glucagon-like peptides : Glucagon-like peptides. *Pediatric Diabetes*, *1*(1), 49-57. <https://doi.org/10.1034/j.1399-5448.2000.010108.x>
- Lu, V. B., Gribble, F. M., & Reimann, F. (2021). Nutrient-Induced Cellular Mechanisms of Gut Hormone Secretion. *Nutrients*, *13*(3), 883. <https://doi.org/10.3390/nu13030883>
- Luger, M., Holstein, B., Schindler, K., Kruschitz, R., & Ludvik, B. (2013). Feasibility and efficacy of an isocaloric high-protein vs. Standard diet on insulin requirement, body weight and metabolic parameters in patients with type 2 diabetes on insulin therapy. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, *121*(5), 286-294. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1341472>
- Luquet, S. (2008). Régulation de la prise alimentaire. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, *22*(2), 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.nupar.2008.04.011>
- Ma, J., Stevens, J. E., Cukier, K., Maddox, A. F., Wishart, J. M., Jones, K. L., Clifton, P. M., Horowitz, M., & Rayner, C. K. (2009). Effects of a protein preload on gastric emptying, glycemia, and gut hormones after a carbohydrate meal in diet-controlled type 2 diabetes. *Diabetes Care*, *32*(9), 1600-1602. <https://doi.org/10.2337/dc09-0723>
- Mabilleau, G., Gobron, B., Bouvard, B., Legrand, E., & Chappard, D. (2018). Polypeptide insulinothrique dépendant du glucose (GIP) : Hormone indispensable dans l'obtention d'un tissu osseux de bonne qualité et résistant. *Morphologie*, *102*(338), 155. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2018.07.100>
- Mace, O. J., Schindler, M., & Patel, S. (2012). The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. *The Journal of Physiology*, *590*(12), 2917-2936. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.223800>
- Madureira, A. R., Tavares, T., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2010). Invited review : Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*, *93*(2), 437-455. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2566>
- Malik, V. S., Li, Y., Tobias, D. K., Pan, A., & Hu, F. B. (2016). Dietary Protein Intake and Risk of Type 2 Diabetes in US Men and Women. *American Journal of Epidemiology*, *183*(8), 715-728. <https://doi.org/10.1093/aje/kwv268>
- Mangel, A. W., Prpic, V., Wong, H., Basavappa, S., Hurst, L. J., Scott, L., Garman, R. L., Hayes, J. S., Sharara, A. I., & Snow, N. D. (1995). Phenylalanine-stimulated secretion of cholecystokinin is calcium dependent. *The American Journal of Physiology*, *268*(1 Pt 1), G90-94. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1995.268.1.G90>
- Mano-Otagiri, A., Ohata, H., Iwasaki-Sekino, A., Nemoto, T., & Shibasaki, T. (2009). Ghrelin suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *Journal of Endocrinology*, *201*(3), 341.
- Mariotti, F. (2017). *35—Plant Protein, Animal Protein, and Protein Quality* (p. 621). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803968-7.00035-6>
- Martos, G., Contreras, P., Molina, E., & López-Fandiño, R. (2010). Egg White Ovalbumin Digestion Mimicking Physiological Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(9), 5640-5648. <https://doi.org/10.1021/jf904538w>

- Marty, N., Dallaporta, M., & Thorens, B. (2007). Brain Glucose Sensing, Counterregulation, and Energy Homeostasis. *Physiology*, 22(4), 241-251. <https://doi.org/10.1152/physiol.00010.2007>
- Masuda, Y., Tanaka, T., Inomata, N., Ohnuma, N., Tanaka, S., Itoh, Z., Hosoda, H., Kojima, M., & Kangawa, K. (2000). Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochemical and biophysical research communications*, 276(3), 905-908.
- Mathai, J. K., Liu, Y., & Stein, H. H. (2017). Values for digestible indispensable amino acid scores (DIAAS) for some dairy and plant proteins may better describe protein quality than values calculated using the concept for protein digestibility-corrected amino acid scores (PDCAAS). *The British Journal of Nutrition*, 117(4), 490-499. <https://doi.org/10.1017/S0007114517000125>
- Matsui, T. (2018). Are Peptides Absorbable Compounds? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(2), 393-394. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05589>
- Micha, R., Wallace, S. K., & Mozaffarian, D. (2010). Red and Processed Meat Consumption and Risk of Incident Coronary Heart Disease, Stroke, and Diabetes Mellitus : A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation*, 121(21), 2271-2283. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.924977>
- Michael Conlon, J. (2002). The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides*, 23(2), 269-278. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00608-8](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00608-8)
- Miguel, M., Dávalos, A., Manso, M. A., de la Peña, G., Lasunción, M. A., & López-Fandiño, R. (2008). Transepithelial transport across Caco-2 cell monolayers of antihypertensive egg-derived peptides. PepT1-mediated flux of Tyr-Pro-Ile. *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(12), 1507-1513. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700503>
- Miller, L. J., Harikumar, K. G., Wootten, D., & Sexton, P. M. (2021). Roles of Cholecystokinin in the Nutritional Continuum. Physiology and Potential Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 655. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.684656>
- Miner-Williams, W. M., Stevens, B. R., & Moughan, P. J. (2014). Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? *Nutrition Research Reviews*, 27(2), 308-329. <https://doi.org/10.1017/S0954422414000225>
- Ministère de l'agriculture et de l'alimentation. (2021). *Stratégie nationale sur les protéines végétales*. <https://agriculture.gouv.fr/plan-proteines-vegetales>
- Mochida, T., Hira, T., & Hara, H. (2010). The Corn Protein, Zein Hydrolysate, Administered into the Ileum Attenuates Hyperglycemia via Its Dual Action on Glucagon-Like Peptide-1 Secretion and Dipeptidyl Peptidase-IV Activity in Rats. *Endocrinology*, 151(7), 3095-3104. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1510>
- Modvig, I. M., Kuhre, R. E., Jepsen, S. L., Xu, S. F. S., Engelstoft, M. S., Egerod, K. L., Schwartz, T. W., Ørskov, C., Rosenkilde, M. M., & Holst, J. J. (2021). Amino acids differ in their capacity to stimulate GLP-1 release from the perfused rat small intestine and stimulate secretion by different sensing mechanisms. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 320(5), E874-E885. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00026.2021>
- Mohanty, D. P., Mohapatra, S., Misra, S., & Sahu, P. S. (2016). Milk derived bioactive peptides and their impact on human health—A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 577-583. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.005>

- Mohtar, N. F., Perera, C. O., Quek, S.-Y., & Hemar, Y. (2013). Optimization of gelatine gel preparation from New Zealand hoki (*Macruronus novaezelandiae*) skins and the effect of transglutaminase enzyme on the gel properties. *Food Hydrocolloids*, *31*(2), 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.011>
- Mori, T., Shibasaki, Y., Matsumoto, K., Shibasaki, M., Hasegawa, M., Wang, E., Masukawa, D., Yoshizawa, K., Horie, S., & Suzuki, T. (2013). Mechanisms that underlie μ -opioid receptor agonist-induced constipation: Differential involvement of μ -opioid receptor sites and responsible regions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *347*(1), 91-99. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.204313>
- Mouel, C. L., & Mora, O. (2019). Productions animales, usage des terres et sécurité alimentaire en 2050 : L'éclairage de la prospective Agrimonde-Terra. *INRAE Productions Animales*, *32*(2), 95-110. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2019.32.2.2508>
- Moughan, P. J. (2003). Amino acid availability: Aspects of chemical analysis and bioassay methodology. *Nutrition Research Reviews*, *16*(02), 127. <https://doi.org/10.1079/NRR200365>
- Moughan, P. J., & Wolfe, R. R. (2019). Determination of Dietary Amino Acid Digestibility in Humans. *The Journal of Nutrition*, *149*(12), 2101-2109. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz211>
- Mulet-Cabero, A.-I., Torcello-Gómez, A., Saha, S., Mackie, A. R., Wilde, P. J., & Brodkorb, A. (2020). Impact of caseins and whey proteins ratio and lipid content on in vitro digestion and ex vivo absorption. *Food Chemistry*, *319*, 126514. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126514>
- Muller, O. (2005). Malnutrition and health in developing countries. *Canadian Medical Association Journal*, *173*(3), 279-286. <https://doi.org/10.1503/cmaj.050342>
- Müller, T. D., Finan, B., Bloom, S. R., D'Alessio, D., Drucker, D. J., Flatt, P. R., Fritsche, A., Gribble, F., Grill, H. J., Habener, J. F., Holst, J. J., Langhans, W., Meier, J. J., Nauck, M. A., Perez-Tilve, D., Pocai, A., Reimann, F., Sandoval, D. A., Schwartz, T. W., ... Tschöp, M. H. (2019). Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular Metabolism*, *30*, 72-130. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.09.010>
- Nakajima, S., Hira, T., Eto, Y., Asano, K., & Hara, H. (2010). Soybean β 51-63 peptide stimulates cholecystokinin secretion via a calcium-sensing receptor in enteroendocrine STC-1 cells. *Regulatory Peptides*, *159*(1-3), 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.11.007>
- Nauck, M. A., & Meier, J. J. (2016). The incretin effect in healthy individuals and those with type 2 diabetes: Physiology, pathophysiology, and response to therapeutic interventions. *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, *4*(6), 525-536. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00482-9](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00482-9)
- Nauck, M. A., & Meier, J. J. (2018). Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, *20 Suppl 1*, 5-21. <https://doi.org/10.1111/dom.13129>
- Neacsu, M., Fyfe, C., Horgan, G., & Johnstone, A. M. (2014a). Appetite control and biomarkers of satiety with vegetarian (soy) and meat-based high-protein diets for weight loss in obese men: A randomized crossover trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *100*(2), 548-558. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.077503>
- Neacsu, M., Fyfe, C., Horgan, G., & Johnstone, A. M. (2014b). Appetite control and biomarkers of satiety with vegetarian (soy) and meat-based high-protein diets for weight loss in obese men: A randomized crossover trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *100*(2), 548-558. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.077503>

- Netsomboon, K., & Bernkop-Schnürch, A. (2016). Mucoadhesive vs. Mucopenetrating particulate drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 98, 76-89. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.11.003>
- Ngoh, Y.-Y., Choi, S. B., & Gan, C.-Y. (2017). The potential roles of Pinto bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto) bioactive peptides in regulating physiological functions : Protease activating, lipase inhibiting and bile acid binding activities. *Journal of Functional Foods*, 33, 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.029>
- Nielsen, S. S. (2017). Protein Nitrogen Determination. In S. S. Nielsen (Éd.), *Food Analysis Laboratory Manual* (p. 131-135). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_13
- Nieto-Suárez, M., López-Quintela, M. A., & Lazzari, M. (2016). Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly. *Carbohydrate Polymers*, 141, 175-183. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.12.064>
- Nilsson, G., & Uvnäs-Wallensten, K. (1977). Effect of teasing and sham feeding on plasma glucagon concentration in dogs. *Acta Physiologica Scandinavica*, 100(3), 298-302. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1977.tb05953.x>
- Nishi, T., Hara, H., Hira, T., & Tomita, F. (2001). Dietary Protein Peptic Hydrolysates Stimulate Cholecystokinin Release via Direct Sensing by Rat Intestinal Mucosal Cells. *Experimental Biology and Medicine*, 226(11), 1031-1036. <https://doi.org/10.1177/153537020122601110>
- Nittari, G., Scuri, S., Petrelli, F., Pirillo, I., Luca, N. M. di, & Grappasonni, I. (2019). Fighting obesity in children from European World Health Organization member states. Epidemiological data, medicalsocial aspects, and prevention programs : Doi: 10.7417/CT.2019.2137. *La Clinica Terapeutica*, 170(3), e223-e230. <https://clincaterapeutica.it/ojs/index.php/1/article/view/111>
- Noakes, M., Keogh, J. B., Foster, P. R., & Clifton, P. M. (2005). Effect of an energy-restricted, high-protein, low-fat diet relative to a conventional high-carbohydrate, low-fat diet on weight loss, body composition, nutritional status, and markers of cardiovascular health in obese women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(6), 1298-1306. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.6.1298>
- Noble, F., Wank, S. A., Crawley, J. N., Bradwejn, J., Seroogy, K. B., Hamon, M., & Roques, B. P. (1999). International Union of Pharmacology. XXI. Structure, Distribution, and Functions of Cholecystokinin Receptors. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS*, 37.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2016a). Learnings from quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies with respect to food protein-derived bioactive peptides : A review. *RSC Advances*, 6(79), 75400-75413. <https://doi.org/10.1039/C6RA12738J>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2016b). Structure activity relationship modelling of milk protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. *Peptides*, 79, 1-7.
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2016c). Prospects for the management of type 2 diabetes using food protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. *Current Opinion in Food Science*, 8, 19-24. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.01.007>
- Nongonierma, A. B., & FitzGerald, R. J. (2019). Features of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from dietary proteins. *Journal of food biochemistry*, 43(1), e12451.

- Nongonierma, A. B., Paoletta, S., Mudgil, P., Maqsood, S., & FitzGerald, R. J. (2017). Dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory properties of camel milk protein hydrolysates generated with trypsin. *Journal of functional foods*, *34*, 49-58.
- Nongonierma, A. B., Paoletta, S., Mudgil, P., Maqsood, S., & FitzGerald, R. J. (2018a). Identification of novel dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides in camel milk protein hydrolysates. *Food chemistry*, *244*, 340-348.
- Nongonierma, A. B., Paoletta, S., Mudgil, P., Maqsood, S., & FitzGerald, R. J. (2018b). Identification of novel dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides in camel milk protein hydrolysates. *Food chemistry*, *244*, 340-348.
- Norton, M., Cork, S. C., Roberts, A., Patel, Y., Cheng, S., Hansford, R., Cao, Y., Hanyaloglu, A., Chang, W., & Murphy, K. G. (2019, novembre 6). <SMALL>L</SMALL>-Phenylalanine simulates the secretion of pancreatic hormones via vagal CaSR. Society for Endocrinology BES 2019. <https://doi.org/10.1530/endoabs.65.P233>
- Nyemb, K., Guérin-Dubiard, C., Dupont, D., Jardin, J., Rutherford, S. M., & Nau, F. (2014). The extent of ovalbumin in vitro digestion and the nature of generated peptides are modulated by the morphology of protein aggregates. *Food Chemistry*, *157*, 429-438. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.048>
- Obaroakpo, J. U., Liu, L., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Pang, X., & Lv, J. (2020). In vitro modulation of glucagon-like peptide release by DPP-IV inhibitory polyphenol-polysaccharide conjugates of sprouted quinoa yoghurt. *Food Chemistry*, *324*, 126857. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126857>
- Obici, S., Feng, Z., Karkaniyas, G., Baskin, D. G., & Rossetti, L. (2002). Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature neuroscience*, *5*(6), 566-572.
- O'Halloran, F., Bruen, C., McGrath, B., Schellekens, H., Murray, B., Cryan, J. F., Kelly, A. L., McSweeney, P. L. H., & Giblin, L. (2018). A casein hydrolysate increases GLP-1 secretion and reduces food intake. *Food Chemistry*, *252*, 303-310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.107>
- OMS. (2020). *Obésité et surpoids*. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Onaka, T., & Takayanagi, Y. (2019). Role of oxytocin in the control of stress and food intake. *Journal of Neuroendocrinology*, *31*(3), e12700. <https://doi.org/10.1111/jne.12700>
- Oseguera-Toledo, M. E. (2015). Hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins hydrolyzed by alcalase and bromelain produced bioactive peptide fractions that inhibit targets of type-2 diabetes and oxidative stress. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *76*(Pt 3), 839-851. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.046>
- Overduin, J., Figlewicz, D. P., Bennett-Jay, J., Kittleson, S., & Cummings, D. E. (2012). Ghrelin increases the motivation to eat, but does not alter food palatability. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *303*(3), R259-R269.
- Owyang, C., & Heldsinger, A. (2011). Vagal Control of Satiety and Hormonal Regulation of Appetite. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, *17*(4), 338-348. <https://doi.org/10.5056/jnm.2011.17.4.338>

- Ozorio, L., Mellinger-Silva, C., Cabral, L. M. C., Jardin, J., Boudry, G., & Dupont, D. (2020). The Influence of Peptidases in Intestinal Brush Border Membranes on the Absorption of Oligopeptides from Whey Protein Hydrolysate : An Ex Vivo Study Using an Ussing Chamber. *Foods*, 9(10), 1415. <https://doi.org/10.3390/foods9101415>
- Paddon-Jones, D., Campbell, W. W., Jacques, P. F., Kritchevsky, S. B., Moore, L. L., Rodriguez, N. R., & van Loon, L. J. (2015). Protein and healthy aging. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(6), 1339S-1345S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.084061>
- Pal, S., Radavelli-Bagatini, S., Hagger, M., & Ellis, V. (2014). Comparative effects of whey and casein proteins on satiety in overweight and obese individuals : A randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 68(9), 980-986. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2014.84>
- Pan, A., Sun, Q., Bernstein, A. M., Schulze, M. B., Manson, J. E., Willett, W. C., & Hu, F. B. (2011). Red meat consumption and risk of type 2 diabetes : 3 cohorts of US adults and an updated meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 94(4), 1088-1096. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.018978>
- Pappenheimer, J. R., & Michel, C. C. (2003). Role of villus microcirculation in intestinal absorption of glucose : Coupling of epithelial with endothelial transport. *The Journal of Physiology*, 553(2), 561-574. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.043257>
- Paquot, P. N. (2017). Inhibiteur de la DPP-4 ou des SGLT2 après échec de la metformine seule dans le diabète de type 2. *Revue médicale suisse*, 5.
- Parihar, A. K., Dixit, G. P., Singh, U., Singh, A. K., Kumar, N., & Gupta, S. (2021). Potential of Field Pea as a Nutritionally Rich Food Legume Crop. In D. S. Gupta, S. Gupta, & J. Kumar (Éds.), *Breeding for Enhanced Nutrition and Bio-Active Compounds in Food Legumes* (p. 47-82). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-59215-8_3
- Parker, H. E., Reimann, F., & Gribble, F. M. (2010). Molecular mechanisms underlying nutrient-stimulated incretin secretion. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12, e1. <https://doi.org/10.1017/S146239940900132X>
- Pathak, V., Flatt, P. R., & Irwin, N. (2018). Cholecystokinin (CCK) and related adjunct peptide therapies for the treatment of obesity and type 2 diabetes. *Peptides*, 100, 229-235. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.09.007>
- Pathania, H. (2019). *Stability of proteins during processing and storage*. (In C. M. Galanakis). Academic Press. <https://dokumen.pub/qdownload/proteins-9780128172865-012817286x-9780128166956.html>
- Patten, G., Abeywardena, & Head, R. (2011). Effects of casoxin 4 on morphine inhibition of small animal intestinal contractility and gut transit in the mouse. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 23. <https://doi.org/10.2147/CEG.S16161>
- Pedroso, J. A. B., Zampieri, T. T., & Donato, J. (2015a). Reviewing the Effects of l-Leucine Supplementation in the Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Glucose Homeostasis. *Nutrients*, 7(5), 3914-3937. <https://doi.org/10.3390/nu7053914>
- Pedroso, J. A. B., Zampieri, T. T., & Donato, J. (2015b). Reviewing the Effects of l-Leucine Supplementation in the Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Glucose Homeostasis. *Nutrients*, 7(5), 3914-3937. <https://doi.org/10.3390/nu7053914>

- Penick, S. B., & Hinkle, L. E. (1961). Depression of food intake induced in healthy subjects by glucagon. *The New England Journal of Medicine*, 264, 893-897. <https://doi.org/10.1056/NEJM196105042641801>
- Pennings, B., Groen, B. B. L., van Dijk, J.-W., de Lange, A., Kiskini, A., Kuklinski, M., Senden, J. M. G., & van Loon, L. J. C. (2013). Minced beef is more rapidly digested and absorbed than beef steak, resulting in greater postprandial protein retention in older men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(1), 121-128. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.051201>
- Perrot, C. (1995). Les protéines de pois : De leur fonction dans la graine à leur utilisation en alimentation animale. *INRAE Productions Animales*, 8(3), 151-164. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.1995.8.3.4122>
- Petersen, M. C., & Shulman, G. I. (2018). Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiological Reviews*, 98(4), 2133-2223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>
- Petr, M. A., Alfaras, I., Krawczyk, M., Bair, W.-N., Mitchell, S. J., Morrell, C. H., Studenski, S. A., Price, N. L., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., Scheibye-Knudsen, M., Lakatta, E. G., Ferrucci, L., Aon, M. A., Bernier, M., & de Cabo, R. (2021). A cross-sectional study of functional and metabolic changes during aging through the lifespan in male mice. *eLife*, 10, e62952. <https://doi.org/10.7554/eLife.62952>
- Phadungath, C. (2005). Casein micelle structure : A concise review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27.
- Philippe, J. (2009). Rôle et place des analogues du GLP-1 dans le traitement du diabète de type 2. *Revue Médicale Suisse*. <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2009/revue-medicale-suisse-2006/role-et-place-des-analogues-du-glp-1-dans-le-traitement-du-diabete-de-type-2>
- Pi, M., Nishimoto, S. K., & Quarles, L. D. (2016). GPRC6A : Jack of all metabolism (or master of none). *Molecular Metabolism*, 6(2), 185-193. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.12.006>
- Picariello, G., Mamone, G., Addeo, F., & Ferranti, P. (2011). The frontiers of mass spectrometry-based techniques in food allergenomics. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7386-7398. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.033>
- Pizarroso, N., Fuciños, P., Gonçalves, C., Pastrana, L., & Amado, I. (2021). A Review on the Role of Food-Derived Bioactive Molecules and the Microbiota–Gut–Brain Axis in Satiety Regulation. *Nutrients*, 13(2), 632. <https://doi.org/10.3390/nu13020632>
- Poher, A.-L., Tschöp, M. H., & Müller, T. D. (2018). Ghrelin regulation of glucose metabolism. *Peptides*, 100, 236-242. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.015>
- Popkin, B. M. (2012). Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*, 70(1), 3-21. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2011.00456.x>
- Porte, D., & Woods, S. C. (1981). Regulation of food intake and body weight by insulin. *Diabetologia*, 20(1), 274-280. <https://doi.org/10.1007/BF00254493>
- Potier, M., Darcel, N., & Tomé, D. (2009a). Protein, amino acids and the control of food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 12(1), 54-58. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32831b9e01>

- Potier, M., Darcel, N., & Tomé, D. (2009b). Protein, amino acids and the control of food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 12(1), 54-58. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32831b9e01>
- Prinz, P., & Stengel, A. (2017). Control of Food Intake by Gastrointestinal Peptides : Mechanisms of Action and Possible Modulation in the Treatment of Obesity. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 23(2), 180-196. <https://doi.org/10.5056/jnm16194>
- Promintzer, M., & Krebs, M. (2006). Effects of dietary protein on glucose homeostasis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 9(4), 463-468. <https://doi.org/10.1097/01.mco.0000232909.84483.a9>
- Psichas, A., Reimann, F., & Gribble, F. M. (2015). Gut chemosensing mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 908-917. <https://doi.org/10.1172/JCI76309>
- Qian, F., Sun, J., Cao, D., Tuo, Y., Jiang, S., & Mu, G. (2017). Experimental and Modelling Study of the Denaturation of Milk Protein by Heat Treatment. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(1), 44-51. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.1.44>
- Quiñones, M., Al-Massadi, O., Gallego, R., Fernø, J., Diéguez, C., López, M., & Nogueiras, R. (2015). Hypothalamic CaMKK β mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Molecular Metabolism*, 4(12), 961-970. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2015.09.014>
- Raben, A., Andersen, H. B., Christensen, N. J., Madsen, J., Holst, J. J., & Astrup, A. (1994). Evidence for an abnormal postprandial response to a high-fat meal in women predisposed to obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 267(4), E549-E559. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1994.267.4.E549>
- Rasoamanana, R., Darcel, N., Fromentin, G., & Tomé, D. (2012). Nutrient sensing and signalling by the gut. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 71(4), 446-455. <https://doi.org/10.1017/S0029665112000110>
- Rehfeld, J. F. (1998). The New Biology of Gastrointestinal Hormones. *Physiological Reviews*, 78(4), 1087-1108. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.1087>
- Rehfeld, J. F. (2019). Premises for Cholecystokinin and Gastrin Peptides in Diabetes Therapy. *Clinical Medicine Insights: Endocrinology and Diabetes*, 12, 1179551419883608. <https://doi.org/10.1177/1179551419883608>
- Rehfeld, J. F. (2020). Measurement of cholecystokinin in plasma with reference to nutrition related obesity studies. *Nutrition Research*, 76, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2020.01.003>
- Rehfeld, J. F. (2021). Cholecystokinin and Panic Disorder : Reflections on the History and Some Unsolved Questions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(18), 5657. <https://doi.org/10.3390/molecules26185657>
- Rérat, A. A. (1981). Digestion and absorption of nutrients in the pig. Some new data concerning protein and carbohydrates. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 37, 229-287.
- Ribadeau-Dumas, B., & Grappin, R. (1989). Milk protein analysis. *Le Lait*, 69(5), 357-416. <https://doi.org/10.1051/lait:1989527>
- Richter, M., Baerlocher, K., Bauer, J. M., Elmadfa, I., Heseker, H., Leschik-Bonnet, E., Stangl, G., Volkert, D., Stehle, P., & on behalf of the German Nutrition Society (DGE). (2019). Revised

- Reference Values for the Intake of Protein. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(3), 242-250. <https://doi.org/10.1159/000499374>
- Rigamonti, A. E., Leoncini, R., Casnici, C., Marelli, O., Col, A. D., Tamini, S., Lucchetti, E., Cicolini, S., Abbruzzese, L., Cella, S. G., & Sartorio, A. (2019). Whey Proteins Reduce Appetite, Stimulate Anorexigenic Gastrointestinal Peptides and Improve Glucometabolic Homeostasis in Young Obese Women. *Nutrients*, 11(2), 247. <https://doi.org/10.3390/nu11020247>
- Ripken, D., van der Wielen, N., van der Meulen, J., Schuurman, T., Witkamp, R. F., Hendriks, H. F. J., & Koopmans, S. J. (2015). Cholecystokinin regulates satiation independently of the abdominal vagal nerve in a pig model of total subdiaphragmatic vagotomy. *Physiology & Behavior*, 139, 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.11.031>
- Rivero-Pino, F. (2021). Identification of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from vegetable protein sources. *Food Chemistry*, 354, 129473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129473>
- Rivero-Pino, F., Espejo-Carpio, F. J., & Guadix, E. M. (2021). Identification of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides from vegetable protein sources. *Food Chemistry*, 354, 129473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129473>
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., & Guerra, M. (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus : The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*, 31(4), 757-776. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.01.003>
- Rosenbaum, M., & Leibel, R. L. (2014). 20 years of leptin : Role of leptin in energy homeostasis in humans. *Journal of Endocrinology*, 223(1), T83-T96.
- Rowan, A. M., Moughan, P. J., & Wilson, M. N. (1994). Comparaison of the ileal and faecal digestibility of dietary amino acids in adult humans and evaluation of the pig as a model animal for digestion studies in man. *British Journal of Nutrition*, 71, 29-42.
- Rutherford, S. M., Fanning, A. C., Miller, B. J., & Moughan, P. J. (2015). Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Scores and Digestible Indispensable Amino Acid Scores Differentially Describe Protein Quality in Growing Male Rats. *The Journal of Nutrition*, 145(2), 372-379. <https://doi.org/10.3945/jn.114.195438>
- Sababi, M., & Bengtsson, U. H. (2001). Enhanced intestinal motility influences absorption in anaesthetized rat : Influence of motility on absorption. *Acta Physiologica Scandinavica*, 172(2), 115-122. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2001.00849.x>
- Sabbagh, G., Kurdi, B., Khayata, W., & Lahdo, R. (2021). A Study on the Inhibitory Potential of Dpp-IV Enzyme by Lobeline through In silico and In vivo Approaches. *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, 79-91. <https://doi.org/10.9734/irjpac/2021/v22i130376>
- Sacks, F. M., Bray, G. A., Carey, V. J., Smith, S. R., Ryan, D. H., Anton, S. D., McManus, K., Champagne, C. M., Bishop, L. M., Laranjo, N., Leboff, M. S., Rood, J. C., de Jonge, L., Greenway, F. L., Loria, C. M., Obarzanek, E., & Williamson, D. A. (2009). Comparison of Weight-Loss Diets with Different Compositions of Fat, Protein, and Carbohydrates. *New England Journal of Medicine*, 360(9), 859-873. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804748>
- Sadiq, U., Gill, H., & Chandrapala, J. (2021). Casein Micelles as an Emerging Delivery System for Bioactive Food Components. *Foods*, 10(8), 1965. <https://doi.org/10.3390/foods10081965>

- Santos-Hernández, M., Amigo, L., & Recio, I. (2018). *Influence of the food peptide size in the release of gastrointestinal hormones in enteroendocrine cells*. <https://digital.csic.es/handle/10261/194835>
- Santos-Hernández, M., Amigo, L., & Recio, I. (2020). Induction of CCK and GLP-1 release in enteroendocrine cells by egg white peptides generated during gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 329, 127188. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127188>
- Santos-Hernández, M., Cermeño, M., Recio, I., & FitzGerald, R. J. (2021). In vitro dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity and in situ insulintropic activity of milk and egg white protein digests. *Food & Function*, 10.1039/D1FO00641J. <https://doi.org/10.1039/D1FO00641J>
- Santos-Hernández, M., Miralles, B., Amigo, L., & Recio, I. (2018a). Intestinal Signaling of Proteins and Digestion-Derived Products Relevant to Satiety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(39), 10123-10131. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02355>
- Santos-Hernández, M., Miralles, B., Amigo, L., & Recio, I. (2018b). Intestinal Signaling of Proteins and Digestion-Derived Products Relevant to Satiety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(39), 10123-10131. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02355>
- Santos-Hernández, M., Tomé, D., Gaudichon, C., & Recio, I. (2018). Stimulation of CCK and GLP-1 secretion and expression in STC-1 cells by human jejunal contents and *in vitro* gastrointestinal digests from casein and whey proteins. *Food & Function*, 9(9), 4702-4713. <https://doi.org/10.1039/C8FO01059E>
- Sarwar Gilani, G., Wu Xiao, C., & Cockell, K. A. (2012). Impact of Antinutritional Factors in Food Proteins on the Digestibility of Protein and the Bioavailability of Amino Acids and on Protein Quality. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S315-S332. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002371>
- Scheen, A. J. (2010). Dipeptidylpeptidase-4 Inhibitors (Gliptins). *Clinical Pharmacokinetics*, 49(9), 573-588. <https://doi.org/10.2165/11532980-000000000-00000>
- Schiavo, L., Scalera, G., Pilone, V., De Sena, G., Quagliariello, V., Iannelli, A., & Barbarisi, A. (2017a). A Comparative Study Examining the Impact of a Protein-Enriched Vs Normal Protein Postoperative Diet on Body Composition and Resting Metabolic Rate in Obese Patients after Sleeve Gastrectomy. *Obesity Surgery*, 27(4), 881-888. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2382-y>
- Schiavo, L., Scalera, G., Pilone, V., De Sena, G., Quagliariello, V., Iannelli, A., & Barbarisi, A. (2017b). A Comparative Study Examining the Impact of a Protein-Enriched Vs Normal Protein Postoperative Diet on Body Composition and Resting Metabolic Rate in Obese Patients after Sleeve Gastrectomy. *Obesity Surgery*, 27(4), 881-888. <https://doi.org/10.1007/s11695-016-2382-y>
- Schulman, J. L., Carleton, J. L., Whitney, G., & Whitehorn, J. C. (1957). *Effect of Glucagon on Food Intake and Body Weight in Man*. *Journal of Applied Physiology*, 11(3), 419-421. <https://doi.org/10.1152/jappl.1957.11.3.419>
- Secher, A., Jelsing, J., Baquero, A. F., Hecksher-Sørensen, J., Cowley, M. A., Dalbøge, L. S., Hansen, G., Grove, K. L., Pyke, C., Raun, K., Schäffer, L., Tang-Christensen, M., Verma, S., Witgen, B. M., Vrang, N., & Bjerre Knudsen, L. (2014). The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor

- agonist liraglutide-dependent weight loss. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(10), 4473-4488. <https://doi.org/10.1172/JCI75276>
- Semba, R. D., Shardell, M., Sakr Ashour, F. A., Moaddel, R., Trehan, I., Maleta, K. M., Ordiz, M. I., Kraemer, K., Khadeer, M. A., Ferrucci, L., & Manary, M. J. (2016). Child Stunting is Associated with Low Circulating Essential Amino Acids. *EBioMedicine*, 6, 246-252. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.02.030>
- Serrano, J., Casanova-Martí, À., Blay, M., Terra, X., Ardévol, A., & Pinent, M. (2016). Defining Conditions for Optimal Inhibition of Food Intake in Rats by a Grape-Seed Derived Proanthocyanidin Extract. *Nutrients*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/nu8100652>
- Sharkey, S. J., Harnedy-Rothwell, P. A., Allsopp, P. J., Hollywood, L. E., FitzGerald, R. J., & O'Harte, F. P. M. (2020). A Narrative Review of the Anti-Hyperglycemic and Satiating Effects of Fish Protein Hydrolysates and Their Bioactive Peptides. *Molecular Nutrition & Food Research*, 64(21), 2000403. <https://doi.org/10.1002/mnfr.202000403>
- Shen, W., & Matsui, T. (2017). Current knowledge of intestinal absorption of bioactive peptides. *Food & Function*, 8(12), 4306-4314. <https://doi.org/10.1039/C7FO01185G>
- Shewry, P. R., Tatham, A. S., Forde, J., Kreis, M., & Mifflin, B. J. (1986). The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: A reassessment. *Journal of Cereal Science*, 4(2), 97-106. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(86\)80012-1](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(86)80012-1)
- Shi, Q., Zhu, X., & Deng, S. (2021). Sweet Taste Receptor Expression and Its Activation by Sucralose to Regulate Glucose Absorption in Mouse Duodenum. *Journal of Food Science*, 86(2), 540-545. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14586>
- Shimizu, M. (2004). Food-derived peptides and intestinal functions. *BioFactors*, 21(1-4), 43-47. <https://doi.org/10.1002/biof.552210109>
- Shimizu, M., Tsunogai, M., & Arai, S. (1997). Transepithelial Transport of Oligopeptides in the Human Intestinal Cell, Caco-2. *Peptides*, 18(5), 681-687. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(97\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(97)00002-8)
- Shimomura, I., Hammer, R. E., Ikemoto, S., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1999). Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature*, 401(6748), 73-76. <https://doi.org/10.1038/43448>
- Shiraga, T., Miyamoto, K., Tanaka, H., Yamamoto, H., Taketani, Y., Morita, K., Tamai, I., Tsuji, A., & Takeda, E. (1999). Cellular and molecular mechanisms of dietary regulation on rat intestinal H⁺/Peptide transporter PepT1. *Gastroenterology*, 116(2), 354-362. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70132-0](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70132-0)
- Silva, S. V., & Malcata, F. X. (2005). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15(1), 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.009>
- Silvester, K. R., & Cummings, J. H. (1995). Does digestibility of meat protein help explain large bowel cancer risk? *Nutrition and Cancer*, 24(3), 279-288. <https://doi.org/10.1080/01635589509514417>
- Silvipriya, K. S., Kumar, K. K., Bhat, A. R., Kumar, B. D., John, A., & Lakshmanan, P. (2015). Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5(3), 123-127. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50322>

- Singh, A.-K., Yadav, D., Sharma, N., & Jin, J.-O. (2021). Dipeptidyl Peptidase (DPP)-IV Inhibitors with Antioxidant Potential Isolated from Natural Sources : A Novel Approach for the Management of Diabetes. *Pharmaceuticals*, *14*(6), 586. <https://doi.org/10.3390/ph14060586>
- Singh, B., Khattab, F., Chae, H., Desmet, L., Herrera, P. L., & Gilon, P. (2021). KATP channel blockers control glucagon secretion by distinct mechanisms : A direct stimulation of α -cells involving a $[Ca^{2+}]_c$ rise and an indirect inhibition mediated by somatostatin. *Molecular Metabolism*, *53*, 101268. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101268>
- Siow, H.-L., Lim, T. S., & Gan, C.-Y. (2017). Development of a workflow for screening and identification of α -amylase inhibitory peptides from food source using an integrated Bioinformatics-phage display approach : Case study - Cumin seed. *Food Chemistry*, *214*, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.069>
- Skibicka, K. P., Hansson, C., Egecioglu, E., & Dickson, S. L. (2012). Role of ghrelin in food reward : Impact of ghrelin on sucrose self-administration and mesolimbic dopamine and acetylcholine receptor gene expression. *Addiction biology*, *17*(1), 95-107.
- Skov, A., Toubro, S., Rønn, B., Holm, L., & Astrup, A. (1999). Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *International Journal of Obesity*, *23*(5), 528-536. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800867>
- Smith, G. P., Gibbs, J., Jerome, C., Pi-Sunyer, F. X., Kissileff, H. R., & Thornton, J. (1981). The satiety effect of cholecystokinin : A progress report. *Peptides*, *2*, 57-59. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(81\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0196-9781(81)90011-5)
- Smith, G. P., Jerome, C., & Norgren, R. (1985). Afferent axons in abdominal vagus mediate satiety effect of cholecystokinin in rats. *The American Journal of Physiology*, *249*(5 Pt 2), R638-641. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1985.249.5.R638>
- Spreckley, E., & Murphy, K. G. (2015). The L-Cell in Nutritional Sensing and the Regulation of Appetite. *Frontiers in Nutrition*, *2*, 23. <https://doi.org/10.3389/fnut.2015.00023>
- Staljanssens, D., Van Camp, J., Billiet, A., De Meyer, T., Al Shukor, N., De Vos, W. H., & Smagghe, G. (2012). Screening of soy and milk protein hydrolysates for their ability to activate the CCK1 receptor. *Peptides*, *34*(1), 226-231. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.11.019>
- Steinert, R. E., Feinle-Bisset, C., Asarian, L., Horowitz, M., Beglinger, C., & Geary, N. (2017). Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3–36) : Secretory Controls and Physiological Roles in Eating and Glycemia in Health, Obesity, and After RYGB. *Physiological Reviews*, *97*(1), 411-463. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2014>
- Sternini, C., Patierno, S., Selmer, I.-S., & Kirchgessner, A. (2004). The opioid system in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterology and Motility*, *16*(s2), 3-16. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00553.x>
- Stillhart, C., Vučićević, K., Augustijns, P., Basit, A. W., Batchelor, H., Flanagan, T. R., Gesquiere, I., Greupink, R., Keszthelyi, D., Koskinen, M., Madla, C. M., Matthys, C., Miljuš, G., Mooij, M. G., Parrott, N., Ungell, A.-L., de Wildt, S. N., Orlu, M., Klein, S., & Müllertz, A. (2020). Impact of gastrointestinal physiology on drug absorption in special populations—An UNGAP review. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *147*, 105280. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105280>

- Strasser, B., Volaklis, K., Fuchs, D., & Burtscher, M. (2018). Role of Dietary Protein and Muscular Fitness on Longevity and Aging. *Aging and Disease*, 9(1), 119. <https://doi.org/10.14336/AD.2017.0202>
- Stubbs, R. J., Harbron, C. G., Murgatroyd, P. R., & Prentice, A. M. (1995). Covert manipulation of dietary fat and energy density : Effect on substrate flux and food intake in men eating ad libitum. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62(2), 316-329. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.2.316>
- Sufian, M. K. N. B., Hira, T., Miyashita, K., Nishi, T., Asano, K., & Hara, H. (2006). Pork peptone stimulates cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells and suppresses appetite in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(8), 1869-1874. <https://doi.org/10.1271/bbb.60046>
- Sultan, A., & Bauduceau, B. (2020). Risque infectieux au cours du diabète : Parlons-en ! *Médecine des Maladies Métaboliques*, 14(1), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.mmm.2019.12.017>
- Sun, M., Tan, Y., Rexiati, M., Dong, M., & Guo, W. (2019). Obesity is a common soil for premature cardiac aging and heart diseases—Role of autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1865(7), 1898-1904. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.004>
- Sun, Q. (2012). Red Meat Consumption and Mortality : Results From 2 Prospective Cohort Studies. *Archives of Internal Medicine*, 172(7), 555. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.2287>
- Sun, X., Acquah, C., Aluko, R. E., & Udenigwe, C. C. (2020). Considering food matrix and gastrointestinal effects in enhancing bioactive peptide absorption and bioavailability. *Journal of Functional Foods*, 64, 103680. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103680>
- Sun, X., & Wu, J. (2017). Food derived anti-adhesive components against bacterial adhesion : Current progresses and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 148-156. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.002>
- Svoboda, M., Tastenoy, M., Vertongen, P., & Robberecht, P. (1994). Relative quantitative analysis of glucagon receptor mRNA in rat tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 105(2), 131-137. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(94\)90162-7](https://doi.org/10.1016/0303-7207(94)90162-7)
- Swaigood, H. E. (1993). Review and Update of Casein Chemistry. *Journal of Dairy Science*, 76(10), 3054-3061. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77645-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77645-6)
- Tan, T., & Bloom, S. (2013). Gut hormones as therapeutic agents in treatment of diabetes and obesity. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(6), 996-1001. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.09.005>
- Tatemoto, K. (1982). Isolation and characterization of peptide YY (PYY), a candidate gut hormone that inhibits pancreatic exocrine secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(8), 2514-2518. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.8.2514>
- Tavoularis, G., & Sauvage, E. (2019). *Les nouvelles générations transforment la consommation de viande* (N° 300; Consommation et modes de vie). Crédoc. <file:///C:/Users/Lea%20Perso/Downloads/CMV300.pdf>
- Thewissen, B. G., Celus, I., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2011). Foaming Properties of Wheat Gliadin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1370-1375. <https://doi.org/10.1021/jf103473d>

- Theysgeur, S., Cudennec, B., Deracinois, B., Perrin, C., Guiller, I., Lepoudère, A., Flahaut, C., & Ravallec, R. (2020). New Bioactive Peptides Identified from a Tilapia Byproduct Hydrolysate Exerting Effects on DPP-IV Activity and Intestinal Hormones Regulation after Canine Gastrointestinal Simulated Digestion. *Molecules*, 26(1), 136. <https://doi.org/10.3390/molecules26010136>
- Thorens, B. (2012). Sensing of Glucose in the Brain. In H.-G. Joost (Éd.), *Appetite Control* (p. 277-294). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-24716-3_12
- Tilman, D., & Clark, M. (2014). Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature*, 515(7528), 518-522. <https://doi.org/10.1038/nature13959>
- Timper, K., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis : Pathways to obesity. *Disease Models & Mechanisms*, 10(6), 679-689. <https://doi.org/10.1242/dmm.026609>
- Tomé, D. (2009). Besoins en protéines et en acides aminés & qualité des protéines alimentaires. *CERIN*, 111. https://www2.ac-lyon.fr/enseignement/sbssa/IMG/pdf/chole_doc_2009_-_besoin_en_prot_et_aa_et_qualite_des_prot.pdf
- Tong, J., Mannea, E., Aimé, P., Pfluger, P. T., Yi, C.-X., Castaneda, T. R., Davis, H. W., Ren, X., Pixley, S., & Benoit, S. (2011). Ghrelin enhances olfactory sensitivity and exploratory sniffing in rodents and humans. *Journal of Neuroscience*, 31(15), 5841-5846.
- Tschöp, M., Smiley, D. L., & Heiman, M. L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407(6806), 908-913.
- Tsubone, T., Masaki, T., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., & Yoshimatsu, H. (2005). Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regulatory peptides*, 130(1-2), 97-103.
- Tulipano, G. (2020). Role of Bioactive Peptide Sequences in the Potential Impact of Dairy Protein Intake on Metabolic Health. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228881>
- Tulipano, G., Faggi, L., Cacciamali, A., & Caroli, A. M. (2017). Whey protein-derived peptide sensing by enteroendocrine cells compared with osteoblast-like cells : Role of peptide length and peptide composition, focussing on products of β -lactoglobulin hydrolysis. *International Dairy Journal*, 72, 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.04.004>
- Udenigwe, C. C., & Fogliano, V. (2017). Food matrix interaction and bioavailability of bioactive peptides : Two faces of the same coin? *Journal of Functional Foods*, 35, 9-12. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.05.029>
- Uenishi, H., Kabuki, T., Seto, Y., Serizawa, A., & Nakajima, H. (2012a). Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. *International Dairy Journal*, 22(1), 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.08.002>
- Uenishi, H., Kabuki, T., Seto, Y., Serizawa, A., & Nakajima, H. (2012b). Isolation and identification of casein-derived dipeptidyl-peptidase 4 (DPP-4)-inhibitory peptide LPQNIPPL from gouda-type cheese and its effect on plasma glucose in rats. *International Dairy Journal*, 22(1), 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.08.002>

- Ueno, H., Yamaguchi, H., Mizuta, M., & Nakazato, M. (2008). The role of PYY in feeding regulation. *Regulatory Peptides*, *145*(1), 12-16. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.09.011>
- UNICEF, WHO, & World Bank Group. (2018). *Levels and trends in child malnutrition*.
- van der Klaauw, A. A., Keogh, J. M., Henning, E., Trowse, V. M., Dhillon, W. S., Ghatei, M. A., & Farooqi, I. S. (2013). High protein intake stimulates postprandial GLP1 and PYY release : PYY and GLP-1 After High Protein Meals. *Obesity*, *21*(8), 1602-1607. <https://doi.org/10.1002/oby.20154>
- van der Wielen, N., Moughan, P. J., & Mensink, M. (2017). Amino Acid Absorption in the Large Intestine of Humans and Porcine Models. *The Journal of Nutrition*, *147*(8), 1493-1498. <https://doi.org/10.3945/jn.117.248187>
- Van Gaal, L., & Scheen, A. (2015). Weight management in type 2 diabetes : Current and emerging approaches to treatment. *Diabetes Care*, *38*(6), 1161-1172. <https://doi.org/10.2337/dc14-1630>
- Van Nieuwenhove, I., Salamon, A., Peters, K., Graulus, G.-J., Martins, J., Frankel, D., Kersemans, K., De Vos, F., Van Vlierberghe, S., & Dubruel, P. (2016). Gelatin- and starch-based hydrogels, part A : Hydrogel development, characterization and coating. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, *152*, 129-139. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.098>
- Vana, V., Lærke, M. K., Rehfeld, J. F., Arnold, M., Dmytriyeva, O., Langhans, W., Schwartz, T. W., & Hansen, H. S. (2022). Vagal afferent cholecystokinin receptor activation is required for glucagon-like peptide-1-induced satiation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *24*(2), 268-280. <https://doi.org/10.1111/dom.14575>
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., & Wichers, H. (Éds.). (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>
- Vernooy, J. H. J., Drummen, N. E. A., van Suylen, R. J., Cloots, R. H. E., Möller, G. M., Bracke, K. R., Zuyderduyn, S., Dentener, M. A., Brusselle, G. G., Hiemstra, P. S., & Wouters, E. F. M. (2009). Enhanced pulmonary leptin expression in patients with severe COPD and asymptomatic smokers. *Thorax*, *64*(1), 26-32. <https://doi.org/10.1136/thx.2007.085423>
- Vig, B. S., Stouch, T. R., Timoszyk, J. K., Quan, Y., Wall, D. A., Smith, R. L., & Faria, T. N. (2006). Human PEPT1 pharmacophore distinguishes between dipeptide transport and binding. *Journal of medicinal chemistry*, *49*(12), 3636-3644.
- Vilacundo, R. (2017). Release of dipeptidyl peptidase IV, α -amylase and α -glucosidase inhibitory peptides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) during in vitro simulated gastrointestinal digestion—ScienceDirect. *Journal of Functional Foods*, *35*, 531-539. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.024>
- Wada, Y., & Lönnnerdal, B. (2014). Bioactive peptides derived from human milk proteins—Mechanisms of action. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *25*(5), 503-514. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.012>
- Wang, C.-Y., Liu, S., Xie, X.-N., & Tan, Z.-R. (2017). Regulation profile of the intestinal peptide transporter 1 (PepT1). *Drug Design, Development and Therapy*, *Volume 11*, 3511-3517. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S151725>

- Wang, L., Zhang, X., Liu, F., Ding, Y., Wang, R., Luo, X., Li, Y., & Chen, Z. (2017). Study of the functional properties and anti-oxidant activity of pea protein irradiated by electron beam. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.01.005>
- Warrilow, A., Turner, M., Naumovski, N., & Somers, S. (2022). Role of cholecystokinin in satiation : A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, 1-25. <https://doi.org/10.1017/S0007114522000381>
- Waterson, M. J., & Horvath, T. L. (2015). Neuronal Regulation of Energy Homeostasis : Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metabolism*, 22(6), 962-970. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.026>
- Wauson, E. M., Lorente-Rodríguez, A., & Cobb, M. H. (2013). Minireview : Nutrient Sensing by G Protein-Coupled Receptors. *Molecular Endocrinology*, 27(8), 1188-1197. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1100>
- Weigle, D. S., Breen, P. A., Matthys, C. C., Callahan, H. S., Meeuws, K. E., Burden, V. R., & Purnell, J. Q. (2005a). A high-protein diet induces sustained reductions in appetite, ad libitum caloric intake, and body weight despite compensatory changes in diurnal plasma leptin and ghrelin concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(1), 41-48. <https://doi.org/10.1093/ajcn/82.1.41>
- Weigle, D. S., Breen, P. A., Matthys, C. C., Callahan, H. S., Meeuws, K. E., Burden, V. R., & Purnell, J. Q. (2005b). A high-protein diet induces sustained reductions in appetite, ad libitum caloric intake, and body weight despite compensatory changes in diurnal plasma leptin and ghrelin concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(1), 41-48. <https://doi.org/10.1093/ajcn/82.1.41>
- Wei-Liang Tan, J., Valerio, C., Barnes, E. H., Turner, P. J., Van Asperen, P. A., Kakakios, A. M., Campbell, D. E., & Beating Egg Allergy Trial (BEAT) Study Group. (2017). A randomized trial of egg introduction from 4 months of age in infants at risk for egg allergy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(5), 1621-1628.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.035>
- Westerterp-Plantenga, M. S. (2008). Protein intake and energy balance. *Regulatory Peptides*, 149(1-3), 67-69. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2007.08.026>
- Westerterp-Plantenga, M. S., Lemmens, S. G., & Westerterp, K. R. (2012). Dietary protein – its role in satiety, energetics, weight loss and health. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), S105-S112. <https://doi.org/10.1017/S0007114512002589>
- Wiesner, G., Vaz, M., Collier, G., Seals, D., Kaye, D., Jennings, G., Lambert, G., Wilkinson, D., & Esler, M. (1999). Leptin is released from the human brain : Influence of adiposity and gender. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(7), 2270-2274. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.7.5854>
- Willesen, M. G., Kristensen, P., & Rømer, J. (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology*, 70(5), 306-316.
- Wolfe, R. R. (2006). The underappreciated role of muscle in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84(3), 475-482. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.3.475>

- Wongon, M., & Limpeanchob, N. (2020). Inhibitory effect of *Artocarpus lakoocha* Roxb and oxyresveratrol on α -glucosidase and sugar digestion in Caco-2 cells. *Heliyon*, 6(3), e03458. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03458>
- Woods, S. C., Lotter, E. C., McKay, L. D., & Porte, D. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature*, 282(5738), 503-505. <https://doi.org/10.1038/282503a0>
- World Health Organization. (2021). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Wu, G., Fanzo, J., Miller, D. D., Pingali, P., Post, M., Steiner, J. L., & Thalacker-Mercer, A. E. (2014a). Production and supply of high-quality food protein for human consumption : Sustainability, challenges, and innovations: Sustainability, challenge and innovations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1321(1), 1-19. <https://doi.org/10.1111/nyas.12500>
- Wu, G., Fanzo, J., Miller, D. D., Pingali, P., Post, M., Steiner, J. L., & Thalacker-Mercer, A. E. (2014b). Production and supply of high-quality food protein for human consumption : Sustainability, challenges, and innovations: Sustainability, challenge and innovations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1321(1), 1-19. <https://doi.org/10.1111/nyas.12500>
- Wycherley, T. P., Moran, L. J., Clifton, P. M., Noakes, M., & Brinkworth, G. D. (2012). Effects of energy-restricted high-protein, low-fat compared with standard-protein, low-fat diets : A meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(6), 1281-1298. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.044321>
- Xu, F., Mejia, E. G. de, Chen, H., Rebecca, K., Pan, M., He, R., Yao, Y., Wang, L., & Ju, X. (2020). Assessment of the DPP-IV inhibitory activity of a novel octapeptide derived from rapeseed using Caco-2 cell monolayers and molecular docking analysis. *Journal of Food Biochemistry*, 44(10). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13406>
- Xu, F., Yao, Y., Xu, X., Wang, M., Pan, M., Ji, S., Wu, J., Jiang, D., Ju, X., & Wang, L. (2019). Identification and quantification of DPP-IV-inhibitory peptides from hydrolyzed-rapeseed-protein-derived napin with analysis of the Interactions between Key Residues and Protein Domains. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(13), 3679-3690.
- Xu, Q., Hong, H., Wu, J., & Yan, X. (2019). Bioavailability of bioactive peptides derived from food proteins across the intestinal epithelial membrane : A review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 399-411.
- Yada, R. Y. (2017). *Proteins in Food Processing*. Woodhead Publishing.
- Yarandi, S. S., Hebbbar, G., Sauer, C. G., Cole, C. R., & Ziegler, T. R. (2011). Diverse roles of leptin in the gastrointestinal tract: Modulation of motility, absorption, growth, and inflammation. *Nutrition*, 27(3), 269-275. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.07.004>
- Yasuda, T., Masaki, T., Kakuma, T., & Yoshimatsu, H. (2003). Centrally administered ghrelin suppresses sympathetic nerve activity in brown adipose tissue of rats. *Neuroscience letters*, 349(2), 75-78.
- Yasumatsu, H., & Tanabe, S. (2010). The casein peptide Asn-Pro-Trp-Asp-Gln enforces the intestinal tight junction partly by increasing occludin expression in Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition*, 104(7), 951-956. <https://doi.org/10.1017/S0007114510001698>

- Ye, R., & Harte, F. (2013). Casein maps : Effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl₂ on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of Dairy Science*, 96(2), 799-805. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5838>
- Youngentob, K. N., Lindenmayer, D. B., Marsh, K. J., Krockenberger, A. K., & Foley, W. J. (2021). Food intake : An overlooked driver of climate change casualties? *Trends in Ecology & Evolution*, 36(8), 676-678. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.04.003>
- Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J., & Chen, F. (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against α -glucosidase and α -amylase. *Food Chemistry*, 135(3), 2078-2085. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.088>
- Zambrowicz, A., Eckert, E., Pokora, M., Bobak, Ł., Dąbrowska, A., Szołtysik, M., Trziszka, T., & Chrzanowska, J. (2015). Antioxidant and antidiabetic activities of peptides isolated from a hydrolysate of an egg-yolk protein by-product prepared with a proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *RSC Advances*, 5(14), 10460-10467. <https://doi.org/10.1039/C4RA12943A>
- Zazzo, J.-F. (2010). *Dénutrition : Une pathologie méconnue en société d'abondance*. Ministère de la santé et des sports. www.sante.gouv.fr/htm/pointsur/nutrition/actions42.htm
- Zhang, J., Qian, X.-K., Song, P.-F., Li, X.-D., Wang, A.-Q., Huo, H., Yao, J.-C., Zhang, G.-M., & Zou, L.-W. (2021). A high-throughput screening assay for dipeptidyl peptidase-IV inhibitors using human plasma. *Analytical Methods*, 13(24), 2671-2678. <https://doi.org/10.1039/D1AY00415H>
- Zhang, J. V., Ren, P.-G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.-W., Rauch, R., Klein, C., & Hsueh, A. J. W. (2005). Obestatin, a Peptide Encoded by the Ghrelin Gene, Opposes Ghrelin's Effects on Food Intake. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1117255>
- Zhang, Y., Guo, K., LeBlanc, R. E., Loh, D., Schwartz, G. J., & Yu, Y.-H. (2007). Increasing Dietary Leucine Intake Reduces Diet-Induced Obesity and Improves Glucose and Cholesterol Metabolism in Mice via Multimechanisms. *Diabetes*, 56(6), 1647-1654. <https://doi.org/10.2337/db07-0123>
- Zhang, Y., Wu, P., Jeantet, R., Dupont, D., Delaplace, G., Chen, X. D., & Xiao, J. (2020). How motility can enhance mass transfer and absorption in the duodenum : Taking the structure of the villi into account. *Chemical Engineering Science*, 213, 115406. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.115406>
- Zhou, Y., Chi, J., Lv, W., & Wang, Y. (2021). Obesity and diabetes as high-risk factors for severe coronavirus disease 2019 (Covid-19). *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 37(2), e3377. <https://doi.org/10.1002/dmrr.3377>

Titre : Etude comparative de l'implication des protéines alimentaires dans l'homéostasie énergétique

Mots clés : Régulation de la prise alimentaire, digestion *in vitro*, protéines agro-alimentaires, hormones gastro-intestinales, DPP-IV, absorption intestinale de glucose

Résumé : En plus d'être une source de nutriments essentiels à notre organisme, les protéines alimentaires participent à la régulation de l'homéostasie énergétique. Dans un contexte épidémique d'obésité, de surconsommation alimentaire, et donc de raréfaction des ressources, la caractérisation du rôle des protéines sur la santé devient cruciale. De manière générale, les protéines sont connues pour réduire la prise alimentaire et améliorer l'homéostasie du glucose, mais très peu d'études se sont intéressées à comparer les effets de l'origine protéique sur ces phénomènes. L'objectif de cette thèse est de comparer des protéines, de sources alimentaires différentes, sur certains mécanismes impliqués dans la régulation périphérique de la prise alimentaire et du métabolisme glucidique. Ainsi des protéines d'origine animale et végétale ont été sélectionnées : l'hémoglobine bovine, les caséines, l'ovalbumine, le lactosérum, la gélatine de poisson, les protéines de pois et de gluten. Une première étude a permis d'étudier et de comparer leurs effets sur la prise alimentaire à court terme. Une seconde a permis

d'étudier l'effet des protéines sur l'inhibition de l'activité de la DPP-IV (Dipeptidyl peptidase IV). Et enfin, une troisième étude, a été réalisée pour déterminer l'effet des protéines sur l'absorption intestinale du glucose. Les résultats obtenus mettent globalement en évidence un effet de la source protéique sur l'homéostasie énergétique via des actions différentes sur les marqueurs étudiés tels que les hormones intestinales et certaines enzymes impliquées. Ce travail met également en évidence, pour la première fois, qu'un apport aigu en protéines pourrait améliorer la tolérance au glucose en inhibant son absorption par l'intestin. L'ensemble de ces études, a permis de mettre en évidence l'importance des protéines dans les mécanismes de régulation de l'homéostasie énergétique par leurs actions sur certains marqueurs du métabolisme glucidique et de la prise alimentaire. Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent également l'importance de l'origine et de la nature des protéines et contribuent ainsi à mieux les caractériser pour de meilleures utilisations et valorisations.

Title: A comparative study of the involvement of dietary proteins in energy homeostasis

Key words: Food intake regulation, *in vitro* digestion, food proteins, gastro-intestinal hormones, DPP-IV, intestinal glucose uptake

Abstract: In addition to being a source of essential nutrients for our body, dietary proteins participate in the regulation of energy homeostasis. In an epidemic context of obesity, overconsumption of food, and therefore the scarcity of resources, the characterization of the role of proteins on health becomes crucial. In general, proteins are known to reduce food intake and improve glucose homeostasis, but very few studies have focused on comparing the effects of protein origin on these phenomena. This thesis compares the effects of dietary proteins of different nature and origins on the peripheral regulation of food intake and carbohydrate metabolism related-mechanisms. Thus, proteins of animal and vegetable origin have been selected: bovine hemoglobin, caseins, ovalbumin, whey, fish gelatin, pea and gluten proteins. A first study compared their effect on short-term food intake. A second one investigated their impact

on the inhibition of DPP-IV (Dipeptidyl peptidase IV) activity. Finally, a third study determined their effects on intestinal glucose absorption. The results obtained globally highlight an effect of the protein source on energy homeostasis via different actions on the markers studied, such as intestinal hormones and certain enzymes involved. For the first time, this work also highlights that an acute protein intake could improve glucose tolerance by inhibiting its absorption by the intestine. These studies have highlighted the importance of proteins in the mechanisms regulating energy homeostasis through their actions on specific markers of carbohydrate metabolism and food intake. The results obtained during this work evidence the importance of the origin and nature of proteins and thus contribute to better characterising them for better use and valuation.

